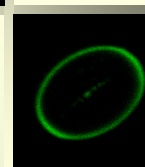
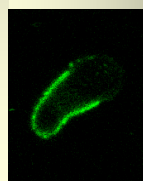
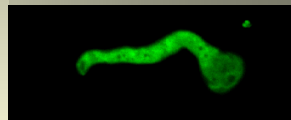
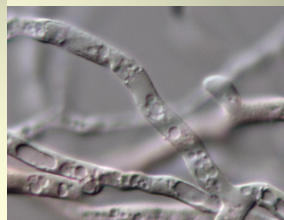
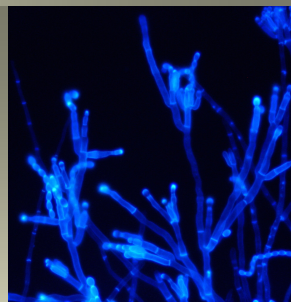
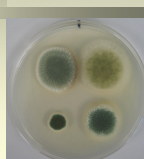
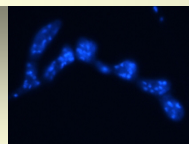




UNIVERSIDAD  
POLITÉCNICA DE  
VALENCIA



CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS



**CARACTERIZACIÓN DE DISTINTOS PÉPTIDOS  
ANTIMICROBIANOS CON ACTIVIDAD FRENTE  
A HONGOS FITOPATÓGENOS DE INTERÉS  
AGROALIMENTARIO**

ALBERTO MUÑOZ RODRÍGUEZ  
TESIS DOCTORAL  
VALENCIA, 2008







UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“Caracterización de distintos Péptidos Antimicrobianos con  
actividad frente a hongos Fitopatógenos de interés  
Agroalimentario”**

Memoria presentada por

**Alberto Muñoz Rodríguez**

Para optar al grado de

Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos

por la Universidad Politécnica de Valencia





INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

El Doctor Jose Fco. Marcos López, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con destino en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) :

CERTIFICA: Que Don Alberto Muñoz Rodríguez, Licenciado en Ciencia y Tecnología de Alimentos por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título: **“Caracterización de distintos Péptidos Antimicrobianos con actividad frente a Hongos Fitopatógenos de interés Agroalimentario”** presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a 4 de febrero de 2008.

Dr. Jose Fco. Marcos López

Científico Titular del CSIC



A mi familia



*" Si quieres aprender algo, léelo,  
si quieres saber algo, escríbelo,  
si quieres dominar algo, enséñalo."*

Yogui Bhajan

(1929-2004, maestro de kundalini yoga)





Me gustaría agradecer la excelente dirección del Dr. Jose F. Marcos durante la realización de este trabajo, la inestimable ayuda de la Dra. M<sup>a</sup> Belén López y la inmejorable asistencia técnica de Dña. M<sup>a</sup> Jose Pascual.

También quiero agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Gómez y al Servicio de Microscopia del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC, Valencia) su ayuda con las técnicas de microscopia y en especial por la utilización del microscopio confocal láser; a los Drs. Emili Montesinos y Eduard Bardají (Institut de Tecnologia Agroalimentària y LIPPSO, Universitat de Girona) por proporcionarnos alícuotas de los péptidos BP15 y BP76; al Dr. Joan B. Salom (Centro de Investigación La Fe, Valencia) por su ayuda en la extracción de muestras de sangre para los ensayos de hemólisis; y a la Dra. Blanca San Segundo (Instituto de Biología Molecular de Barcelona, IIBM, Consorci CSIC-IRTA, Barcelona) por proporcionarnos el aislado de *Magnaporthe grisea* (PR9), la Dra. Marisé Borja (Fundación Promiva, Madrid) por el aislado de *Botrytis cinerea*, y la Dra. Margarita Orejas (IATA, Valencia) por la cepa de *Aspergillus nidulans* (biA1). Otros microorganismos utilizados proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

A las explotaciones comerciales de cítricos Agrimarba SA (Llíria, Valencia) y La Reva (Regadí y Energía de Valencia SA) (Chiva, Valencia), por habernos proporcionado los frutos para la realización de los bioensayos.

A los tres evaluadores de esta memoria, por haber contribuido con sus sugerencias a la corrección y mejora de este documento. A la Dra. Luisa Ventura (IATA) por su ayuda con la traducción al valenciano del resumen.

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del Departamento de Ciencia de los Alimentos del IATA (CSIC), gracias a sendas becas predoctorales dentro del proyecto BIO2003-00927 del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), y el proyecto Intramural 2004-70E149 (CSIC). Mi formación doctoral se ha completado dentro del programa de doctorado de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), con la ayuda de una beca del MEC para la movilidad de alumnos en Programas de Doctorado con Mención de Calidad (cursos 2004/05 y 2005/06). Quiero agradecer especialmente la ayuda desinteresada de mi tutora de doctorado, la Dra. Nuria Martínez (UPV, Valencia).

Tras estos agradecimientos ‘formales’, quiero mencionar y agradecerle la ayuda a todas esas personas que me han apoyado, ayudado y compartido conmigo algunos de los mejores momentos que he pasado durante estos años de doctorado en Valencia.

Esta tesis se la debo mucho a mi familia, mis padres y hermanos que siempre han estado conmigo, desde el primer momento que les dije: -que me voy a Valencia...!!! Estoy seguro que os hace tanta ilusión verla acabada como a mi y por eso quiero sepáis que es por vosotros.

Gracias a los compañeros del laboratorio de Postcosecha del IATA por acogirme en vuestra casa. Además de los ya mencionados Jose, Belén y M<sup>a</sup> José, quiero mencionar a los becarios que están y que se fueron: Ana R, Mario, Berta, Lourdes, Beatriz, Aníbal, Jacques, Yolanda, y a los nuevos que llegan de recambio; a las técnicas Ana I, Lolita y Amparo, y a los Drs. Luis González, Lorenzo Zacarías, M<sup>a</sup> Teresa Lafuente y M<sup>a</sup> Jesús Rodrigo. También recuerdo con agrado los buenos momentos que he pasado con muchos amigos que dejo en el IATA, en especial a Santi y Alvaro, gracias por la calidez y compañía, y por presentarme también a esa pequeña *princesa* llamada Lidia a la quiero especialmente agradecer su cariño y compañía, y toda esa ilusión que irradia.

También me gustaría acordarme en esta tesis de todos los amigos que he hecho en mi andadura por Valencia, compartir estancia y piso con Bea, Merce, Mauricio, Carlo, Javi, Belen, Juanjo, Pablo, ha sido una de las cosas más gratas que me ha ocurrido en este tiempo. Gracias a todos por estar ahí. Y también por último a todos mis viejos amigos, de la infancia y de la universidad, por haber venido a visitarme y ayudado en repetidas ocasiones.

Quiero cerrar con unos bellos versos que una vez me dedicaron:

*“Si ves a la luna su reflejo, te devolverá mi mirada,  
si sientes al mar su brisa, es el abrazo cálido de mi alma.”*

L.J.T.

# ÍNDICE



**ÍNDICE GENERAL**

RESUMEN/SUMMARY .....	1
INTRODUCCIÓN .....	9
1. HONGOS FITOPATÓGENOS: IMPORTANCIA Y CONTROL. ....	12
1.1. Los hongos como patógenos de plantas.....	13
1.2. Importancia de los hongos fitopatógenos en la postcosecha de frutos. ....	23
1.3. Control de podredumbres postcosecha. ....	27
1.4. Estrategias alternativas de control en postcosecha. ....	31
2. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS. ....	36
2.1. Péptidos antimicrobianos naturales.....	38
2.2. Diseño racional de nuevos péptidos antimicrobianos.....	42
2.3. Utilización de herramientas combinatoriales en la identificación de péptidos antimicrobianos. ....	47
2.4. Péptidos derivados de proteínas. ....	52
2.5. Nuevas estrategias de identificación de péptidos. ....	54
3. MODO DE ACCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS. ....	55
3.1. Propiedades biofísicas de péptidos antimicrobianos. ....	55
3.2. Interacción con microorganismos. ....	58
3.3. Efectos sobre microorganismos. ....	60
3.4. Modos de acción intracelular.....	62
3.5. Escrutinios dirigidos de actividad antimicrobiana contra dianas específicas. ....	63
3.6. Mecanismos de respuesta frente a péptidos antimicrobianos. ....	64

4. UTILIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN PROTECCIÓN VEGETAL. ....	65
4.1. Control de fitopatologías mediante adición de péptidos.....	65
4.2. Aplicación en el control de podredumbres postcosecha de frutos.....	66
4.3. Producción y utilización mediante expresión transgénica.....	67
OBJETIVOS .....	75
MATERIALES Y MÉTODOS .....	79
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS. ....	81
2. MEDIOS DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO....	82
2.1. Hongos. ....	82
2.2. Levaduras. ....	83
2.3. Bacterias.....	83
3. PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	83
3.1. Propiedades.....	83
3.2. Cuantificación espectrofotométrica. ....	84
4. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> SOBRE MICROORGANISMOS.....	86
4.1. Ensayos de inhibición del crecimiento en placas de microtítulo. ....	87
4.2. Ensayos de inhibición en medio sólido. ....	90
4.3. Cuantificación de la permeabilización celular. ....	91
4.4. Ensayos de actividad microbicida de los péptidos. ....	92
5. VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA. ....	93
5.1. Tinción con la sonda verde Sytox.....	93
5.2. Tinción de la quitina con blanco de Calcofluor.....	93
5.3. Tinción de los núcleos con DAPI. ....	94

---

5.4. Localización del péptido PAF26 marcado con fluoresceína. ....	94
6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA. ....	96
7. ENSAYOS DE UNIÓN A ÁCIDOS NUCLEICOS.....	96
8. ENSAYOS DE INOCULACIÓN SOBRE FRUTOS CÍTRICOS. ....	97
9. ANALISIS ESTADÍSTICOS.....	99
RESULTADOS.....	101
1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA LACTOFERRINA BOVINA FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS . ....	103
1.1. Selección de péptidos antimicrobianos derivados de LfcinB. ....	103
1.2. Actividad antimicrobiana comparada de PAF26 y de los péptidos derivados de la LfcinB. ....	106
1.3. Estudio microscópico del efecto de LfcinB <sub>17-31</sub> sobre <i>P. digitatum</i> .....	111
1.4. Inhibición de la infección de <i>P. digitatum</i> en frutos cítricos. ....	114
2. ESTUDIO DEL MODO DE ACCIÓN DE PAF26.....	116
2.1. Alteraciones morfológicas producidas en el micelio de <i>P. digitatum</i> por exposición a PAF26. ....	116
2.2. Actividad antimicrobiana y capacidad de permeabilización de PAF26. Estudio comparado con Melitina. ....	123
2.3. Actividad fungicida sobre conidios. ....	128
2.4. Actividad hemolítica sobre glóbulos rojos. ....	129
2.5. Localización de PAF26 marcado con FITC. ....	130
2.6. Estudio de la interacción de PAF26 con tRNA. ....	137
2.7. Estudio comparado de la actividad de PAF26 y otros compuestos antimicrobianos sobre especies del género <i>Penicillium</i> . ....	138

3. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SERIE DE HEPTAPÉPTIDOS DERIVADOS DE PAF26. ....	143
3.1. Selección de residuos de aminoácidos. ....	144
3.2. Inhibición del crecimiento de microorganismos. ....	145
3.3. Propiedades microbidas sobre distintos microorganismos. ....	151
3.4. Actividad hemolítica sobre glóbulos rojos. ....	154
4. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE DISTINTOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS PODREDUMBRES POSTCOSECHA DE CÍTRICOS CAUSADAS POR <i>P. digitatum</i> .....	154
4.1. Péptidos antimicrobianos seleccionados. ....	155
4.2. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de microorganismos. ....	158
4.3. Bioensayos de control frente a la infección de frutos causada por <i>P. digitatum</i> . ....	160
DISCUSIÓN .....	169
1. IDENTIFICACIÓN Y DISEÑO RACIONAL DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS.....	171
1.1. Identificación de péptidos derivados de PAF26.....	171
1.2. Comparativa de AMP procedentes de orígenes distintos. ....	174
1.3. Importancia de los residuos de aminoácidos en las propiedades antimicrobianas de los péptidos. ....	178
2. MODO DE ACCIÓN DE PAF26.....	181
2.1. Interacción de PAF26 con microorganismos. ....	182
2.2. Efecto sobre la morfología de <i>P. digitatum</i> .....	184
2.3. Permeabilización celular. Diferencias con el péptido Melitina.....	185
2.4. PAF26 como péptido tipo penetratina. ....	187



2.5. Posible implicación de la biosíntesis de quitina.....	194
3. APLICACIÓN DE AMP EN EL CONTROL DE PATOLOGÍAS POSTCOSECHA.....	198
3.1. Eficacia de distintos AMP en condiciones de postcosecha. ....	198
3.2. Estrategias de producción y utilización de AMP.....	202
CONCLUSIONES.....	207
DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	211
BIBLIOGRAFÍA.....	215



---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AMP:	Péptido antimicrobiano
CAMP:	Péptido antimicrobiano catiónico
CP-AMP:	Péptido antimicrobiano tipo penetratina
CPP:	Péptido tipo penetratina
CECT:	Colección Española de Cultivos Tipo
CFW:	Blanco de calcofluor
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DO:	Densidad óptica
dpi:	Días después de la inoculación
$\epsilon$ :	Coefficiente de extinción molar
FITC:	5-isotiocianato de fluoresceína
Fmoc:	N-(9-fluorenil)-metoxicarbonilo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno
HR:	Respuesta hipersensible
IC <sub>50</sub> :	Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento
IF:	Intensidad de fluorescencia
IMZ:	Imazalil
LB:	Luria-Bertani
LF:	Lactoferrina
Lfcin:	Lactoferricina
LfcinB:	Lactoferricina bovina
LfcinH:	Lactoferricina humana
LPS:	Lipopolisacarido

MIC:	Mínima concentración inhibitoria
MOPS:	3-(N-morfolino)-propanesulfónico
PAF:	Péptido AntiFúngico
PBS:	Tampón fosfato sódico
PEG:	Peptidoglicano
PDA:	Agar de patata dextrosa
PDB:	Caldo de patata dextrosa
RMN:	Resonancia magnética nuclear
RNA:	Ácido ribonucleico
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
SAR:	Resistencia sistémica adquirida
SD:	Desviación estándar
SDS:	Dodecil sulfato sódico
SG:	Verde Sytox
SOPP:	Ortofenilfenato sódico
TBZ:	Tiabendazol
tRNA:	Ácido ribonucleico de transferencia
UFC:	Unidad formadora de colonia

## **RESUMEN/SUMMARY**



## **“Caracterización de distintos Péptidos Antimicrobianos con actividad frente a hongos Fitopatógenos de interés Agroalimentario”**

Los problemas derivados del uso de fungicidas en agricultura justifican la búsqueda de nuevos compuestos activos y estrategias de control que los sustituyan de una manera eficaz y segura tanto para el medio ambiente como para los consumidores. Una alternativa prometedora es la aplicación de péptidos antimicrobianos, inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos identificado y caracterizado distintos péptidos con actividad antimicrobiana frente a hongos fitopatógenos de interés agronómico. Debido a sus propiedades, hemos seleccionado el hexapéptido PAF26 como péptido de referencia. Su actividad *in vitro* e *in vivo* ha sido caracterizada en detalle y comparada con otros péptidos de orígenes diversos, incluyendo péptidos de mamíferos (como los péptidos derivados de la lactoferrina o la indolicidina) y de insectos (como la melitina), así como otros que provienen de estudios de identificación *de novo* de péptidos. PAF26 es un péptido preferentemente antifúngico con propiedades fungicidas sobre conidios del hongo *Penicillium digitatum* y ausencia de actividad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos. También se ha caracterizado con detalle su modo de acción frente a *P. digitatum*, y comparado sus propiedades con las del péptido citotóxico melitina. Se ha marcado PAF26 con fluoresceína y se ha visualizado mediante microscopía confocal su interacción con distintas estructuras del hongo y su posterior translocación al interior celular. Además, PAF26 ha servido como compuesto líder en la generación de una serie de heptapéptidos derivados con distintos perfiles de actividad antimicrobiana, en algunos casos específicos para determinados microorganismos. Los distintos péptidos estudiados se han aplicado en condiciones experimentales de postcosecha a través de bioensayos de control de las podredumbres de frutos cítricos producidas por *P. digitatum*. Las propiedades antifúngicas de los péptidos PAF les confieren capacidad protectora incluso a concentraciones tan bajas como 4  $\mu$ M, convirtiéndolos en buenos candidatos para su aplicación en conservación postcosecha.





**“Characterization of different Antimicrobial Peptides with activity against Phytopathogenic Fungi of Agronomic relevance.”**

Problems derived from use of fungicides in agriculture have made it necessary to search for novel active compounds and control strategies that effectively replace them, while lowering the negative impact on consumer health and the environment. A promising alternative is the use of antimicrobial peptides, capable of inhibiting the growth of pathogenic microorganisms.

During the development of this work, we have identified and characterized several peptides with activity against phytopathogenic fungi of agronomic relevance. Due to its properties, we have selected the hexapeptide PAF26 as a reference peptide. The *in vivo* and *in vitro* activity of PAF26 has been further characterized and compared with that of peptides from distinct origins, including mammalian peptides (such as lactoferricin-derived peptides or indolicidin), peptides from insects (i.e. melittin), as well as peptides obtained from *de novo* peptide identification studies. PAF26 is mostly an antifungal peptide with fungicidal properties against *Penicillium digitatum* conidia and absence of hemolytic activity to human red blood cells. Also, its mode of action towards the fungus *P. digitatum* has been characterized in detail and its properties compared to those of the cytolytic peptide melittin. PAF26 has been labelled with fluorescein to visualize its interaction with different fungal structures and subsequent translocation inside the cell. In addition, PAF26 has been used as a leader peptide to derive novel heptapeptides with distinct antimicrobial activity profiles and microorganism specificity. Finally, peptides studied in this work have been applied under simulation of postharvest storage, by means of bioassays to control citrus fruit decay caused by *P. digitatum*. Antifungal properties of PAF peptides confer protection even at concentrations as low as 4  $\mu\text{M}$  under these assay conditions, and reveal them as good candidates to future development as postharvest preservatives.



## “Caracterització de distints Pèptids Antimicrobians amb activitat enfront de fongs Fitopatògens d'interés Agroalimentari”

Els problemes derivats de l'ús de fungicides en agricultura justifiquen la recerca de noves substàncies actives i estratègies de control que els substituïsquen d'una manera eficaç i segura tant per al medi ambient com per als consumidors. Una alternativa prometedora a l'utilització de fungicides és l'aplicació de pèptids antimicrobians (AMP), inhibidors del creixement de microorganismes patògens.

Durant el desenvolupament d'aquest treball hem identificat i caracteritzat distints pèptids amb activitat antimicrobiana enfront de fongs fitopatògens d'interés agronòmic. Per les seues propietats, hem seleccionat l'hexapèptid PAF26 com a pèptid de referència. La seua activitat *in vitro* i *in vivo* ha sigut caracteritzada i comparada amb altres pèptids d'orígens diversos, incloent pèptids de mamífers (com els pèptids derivats de la lactoferrina o l'indolicidina) i d'insectes (com la melitina), així com altres que provenen d'estudis d'identificació *de novo* de pèptids. PAF26 és un pèptid preferentment antifúngic amb propietats fungicides sobre conidis del fong *Penicillium digitatum* i absència total d'activitat hemolítica sobre glòbuls rojos humans. També s'ha caracteritzat amb detall el seu mode d'acció enfront de *P. digitatum*, i s'han comparat les seues propietats amb les del pèptid citotòxic melitina. S'ha marcat PAF26 amb fluoresceïna visualitzant-se per microscòpia confocal la seua interacció amb distintes estructures del fong i la seua posterior translocació a l'interior cel·lular. A més, PAF26 ha servit com pèptid líder en la generació d'una sèrie d'heptapèptids amb distints perfils d'activitat antimicrobiana, en alguns casos específics per a determinats microorganismes. Els distints pèptids estudiats s'han aplicat en condicions experimentals de postcollita fent servir bioassajos de control de la podridura de fruits cítrics produïts per *P. digitatum*. Les propietats antifúngiques dels pèptids PAF els conferixen capacitat protectora fins i tot a concentracions tan baixes com 4 µM, convertint-los en bons candidats per la seua aplicació en conservació postcollita.



# INTRODUCCIÓN



El desarrollo de la agricultura fue fundamental en el surgimiento de nuestra civilización. Hoy en día, la producción agraria sigue siendo una fuente primaria y esencial de alimento y de recursos para el hombre. Por este motivo, adquiere especial importancia el estudio de las enfermedades vegetales. Su conocimiento permite el desarrollo de métodos de control efectivos y apropiados que se han convertido en una de las claves fundamentales en el mantenimiento sostenible de nuestros recursos.

Una estimación de las pérdidas globales que se ocasionan en agricultura se cifra en torno al 35% de la producción anual por término medio (Knight *et al.*, 1997; Oerke, 1999; Agrios, 2004), por un lado debido a factores abióticos (condiciones climatológicas y medioambientales) y por otro a factores bióticos, entre los que se encuentran los insectos y las enfermedades ocasionadas por agentes infecciosos (virus y viroides, bacterias y mollicutes, hongos, nemátodos, protozoos o plantas superiores parásitas).

A mediados del siglo XIX, la epidemia producida en cultivos de patata en Irlanda y el norte de Europa provocó una hambruna y la muerte de un millón de personas, así como un movimiento demográfico hacia América de más de un millón y medio de europeos. Fue el científico alemán Anton deBary, considerado el padre de la fitopatología, quien en 1861 finalmente estableció experimentalmente que la causa de esta epidemia fue el hongo *Phytophthora infestans*, tras años de estudios microscópicos sobre la naturaleza y desarrollo de los hongos y su relación con las enfermedades de las plantas.

En la actualidad, ya conocemos que los **hongos fitopatógenos** son los principales agentes infecciosos en plantas, produciendo enfermedades y/o sustancias tóxicas para la salud humana que repercuten en pérdidas económicamente importantes en el rendimiento de los cultivos (Knogge, 1996a). Su control ha sido cada vez más dependiente del uso de fungicidas químicos. Sin embargo, muchos de los fungicidas utilizados habitualmente son tóxicos para microorganismos no diana y para animales, pudiendo llegar a serlo también para los humanos. En la actualidad, una gran parte de la investigación en fitopatología se centra en la búsqueda de nuevas alternativas al uso de estos compuestos, capaces de reducir las pérdidas del producto sin reducir su calidad, salvaguardando al mismo tiempo nuestra salud y la del medioambiente.

Este estudio se enmarca en la búsqueda de alternativas para el control de las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos. En concreto, en la **identificación y caracterización de péptidos antimicrobianos** como potenciales agentes de control frente a hongos fitopatógenos de interés agroalimentario. Especialmente trabajaremos en las podredumbres que se ocasionan en frutos vegetales durante su postcosecha y comercialización, centrando nuestro interés en los frutos cítricos y en las especies de hongos patógenas de éstos de mayor importancia.

Los **cítricos** constituyen el primer cultivo frutal del mundo, con una producción de 108 millones de toneladas y una superficie de 7,4 millones de hectáreas (FAO, 2005, <http://www.fao.org/>). En España también constituyen el principal cultivo frutal, con una producción de 6,1 millones de toneladas y una superficie de 300.000 hectáreas, de la cual el 68% se encuentra en la Comunidad Valenciana (MAPA, 2005, <http://www.mapa.es>). Nuestro país es el quinto productor de cítricos (después de Brasil, EE.UU., China y México) y el primer exportador de fruta fresca a nivel mundial, por lo que las condiciones de conservación postcosecha adquieren especial relevancia.

## **1. HONGOS FITOPATÓGENOS: IMPORTANCIA Y CONTROL.**

Los hongos constituyen un amplio grupo de organismos eucariotas, de nutrición heterótrofa y que ocupan la mayor parte de los hábitats terrestres. La mayoría de las más de 100.000 especies conocidas de hongos son saprofitas estrictas, es decir, viven sobre una matriz de tejido orgánico muerto al que ayudan a descomponerse. Muchos de ellos son macroscópicos y algunos también comestibles. Aproximadamente el 10% del total de especies de hongos conocidas son capaces de colonizar tejidos vegetales y sólo una fracción menor (unas 8.000) es capaz de producir enfermedades en las plantas (Schäfer, 1994; Knogge, 1996a). Por el contrario, sólo unas 50 especies de hongos son patógenas de humanos y animales, y la mayor parte de ellos causan enfermedades superficiales en la piel (dermatofitos).



## 1.1. Los hongos como patógenos de plantas.

Todas las plantas son atacadas por varios tipos de hongos; así mismo, algunos de los hongos patógenos pueden infectar y causar enfermedad sobre varios tipos de plantas (Agrios, 2004). El efecto nocivo de los hongos se debe a su capacidad para destruir físicamente los tejidos de la planta, alterar la fisiología vegetal reduciendo el crecimiento de toda la planta o de órganos determinados, o producir toxinas que afectan tanto a plantas como animales. Algunos hongos, conocidos como **biotrofos**, pueden crecer y multiplicarse manteniéndose durante todo su ciclo de vida en la planta huésped, viviendo y obteniendo nutrientes sin causar la muerte. Otros son **necrotrofos**, en una parte de su ciclo vital requieren una planta huésped pudiendo crecer sobre tejido muerto o producir la muerte celular para absorber los nutrientes del tejido muerto. Muchas infecciones empiezan con una fase biotrófica que se convierte más tarde en necrotrófica. Algunos hongos son simbiontes facultativos, creciendo tanto libres como asociados a plantas, y otros son simbiontes obligados, creciendo sólo si están asociados a plantas.

### 1.1.1. Hongos de importancia en agricultura.

Existe una gran variedad de géneros de hongos de importancia agronómica y alimentaria, causantes de pérdidas tanto en el campo durante el cultivo como en las posteriores etapas de recolección, almacenamiento y distribución, ya sea el órgano aprovechable el fruto, tallo, hojas, raíces o tubérculos de la planta (Agrios, 2004; Strange y Scott, 2005). Dentro de esta variedad destacaremos algunos géneros y especies de importancia en agricultura y ampliamente caracterizados en fitopatología (Xu *et al.*, 2006) que han sido estudiados en este trabajo.

***Magnaporthe grisea*** es el responsable de la piriculariosis del arroz, la enfermedad que produce las mayores pérdidas en el cultivo de este cereal a nivel mundial (Figura 1A). Por su importancia económica, la interacción arroz-*M. grisea* representa un sistema modelo en el estudio de las interacciones planta-patógeno, y el proceso de infección por este hongo ha sido ampliamente estudiado (Talbot, 2007). Además, se ha obtenido la secuencia completa de su genoma, que contiene al menos 11.000 genes (Dean *et al.*, 2005). Este avance está permitiendo la realización de estudios de genómica funcional con este

patógeno (Jeon *et al.*, 2007). La combinación de la información genética disponible de este hongo con la del ya publicado genoma del arroz (*Oryza sativa*) (Yu *et al.*, 2002) permitirá el estudio de esta interacción a escala genómica, ayudando a dilucidar mecanismos de infección del patógeno así como las respuestas de defensa de la planta.

***Fusarium* sp.** es un hongo causante de enfermedades vasculares en muchos vegetales y flores, plantas ornamentales y cultivos en campo. La especie más representativa y conocida es *F. oxysporum* (Figura 1C), que está a su vez compuesta por numerosas *formae speciales*, morfológicamente similares pero con marcada especificidad de huésped (Ortoneda *et al.*, 2004). También de importancia son *F. culmorum*, *F. solani* y *F. graminearum*. Esta última especie, uno de los mayores patógenos de trigo y cebada, ha sido muy estudiada a nivel molecular y su genoma también está totalmente secuenciado y accesible en las bases de datos públicas (Goswami y Kistler, 2004; Cuomo *et al.*, 2007).

***Botrytis cinerea*** es uno de los fitopatógenos más comunes y afecta a más de 200 especies de plantas, produciendo distintas manifestaciones de la llamada podredumbre gris (Figura 1D). Ataca tanto a frutos como a partes

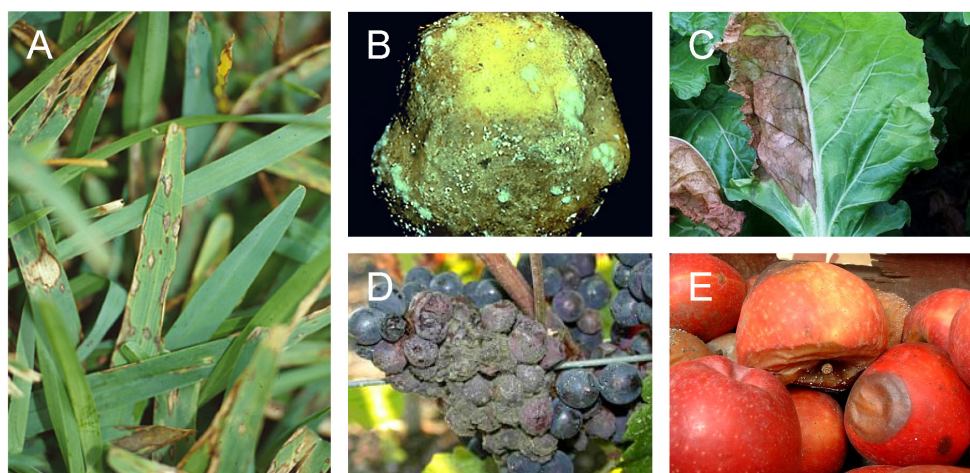


Figura 1. Fotografías de distintas enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. (A) Piriculariosis causada por *Magnaporthe grisea* en hojas de arroz, (B) Podredumbre blanda de *Phytophthora infestans* en tubérculos de patata, (C) Marchitamiento de *Fusarium oxysporum* en hojas de remolacha, (D) Podredumbre gris de *Botrytis cinerea* en racimos de uva y (E) Podredumbre de *Penicillium expansum* en frutos de manzana.

vegetativas, preferentemente a plantas debilitadas, jóvenes o senescentes. Debido a esta promiscuidad, este es otro de los hongos elegidos como modelos de estudio en fitopatología y ha sido ampliamente caracterizado desde distintas aproximaciones experimentales (van Kan, 2006; Williamson *et al.*, 2007). Recientemente se ha llevado a cabo la secuenciación de su genoma (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fgi/>) (Broad Institute, USA).

Otros ejemplos de hongos de relevancia son: *Phytophthora* sp., causante de una gran variedad de devastadoras enfermedades en varios tipos de plantas (la especie más conocida es *P. infestans*) (Figura 1B); *Rhizopus* sp., patógeno ampliamente distribuido por todo el mundo y causante de podredumbres blandas en frutos y vegetales; *Alternaria* sp., causante de enfermedades comunes en muchos tipos de plantas, afectando a hojas, flores, frutos o incluso también a los troncos de algunos árboles como los de cítricos o al manzano; *Colletotrichum* sp., responsable de la enfermedad de la antracnosis en numerosas hortalizas y frutos frescos; *Aspergillus* sp., patógeno común de granos de cereales y leguminosas almacenados, además de productor de importantes toxinas (aflatoxinas); y dentro del amplio género *Penicillium* sp., un determinado número de especies responsables de podredumbres postcosecha muy comunes (Figura 1E).

### 1.1.2. Proceso de infección de hongos fitopatógenos.

El desarrollo de la enfermedad es el resultado de la interacción del hongo con la planta según una secuencia de etapas que pueden resumirse en cuatro (Schäfer, 1994; Knogge, 1996b): (1) unión a la superficie de la planta, (2) germinación sobre dicha superficie y formación de estructuras de infección, (3) penetración en el huésped, y (4) colonización de los tejidos del huésped.

Los hongos fitopatógenos muestran una variedad de especificidad hacia la planta o el órgano al cual infectan. En cualquier caso, la infección del hongo precisa del **contacto** y la **adherencia a la superficie vegetal** de las esporas y/o de la primera hifa que resulta de su germinación (tubo germinativo). La germinación se produce cuando se dan (entre otras) las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes. En muchos casos es difícil delimitar los procesos de unión a la superficie, germinación y

penetración. Los mecanismos básicos de estos procesos han sido poco estudiados.

La **penetración** se puede producir a través de heridas causadas por procesos naturales, prácticas agrícolas o ataques por insectos, o a través de aberturas naturales como las lenticelas en tallos y frutos, y los estomas en las hojas. Otros hongos fitopatógenos penetran directamente a través de la superficie intacta de la planta por medio de **estructuras especializadas** más complejas como son los apresorios (por ejemplo en *M. grisea*) (Kahmann y Basse, 2001; Kankanala *et al.*, 2007). La penetración e invasión también puede producirse por **digestión enzimática** de las barreras físicas de la planta, como la cutícula externa y/o la pared celular. En este sentido, es importante la secreción por parte del hongo de enzimas tales como cutinasas y esterases (van Kan *et al.*, 1997; Kahmann y Basse, 2001). Incluso en algún ejemplo se ha demostrado la implicación de cutinasas en la diferenciación de apresorios (Skamnioti y Gurr, 2007). También se han identificado endopoligaracturonasas involucradas en la patogénesis (ten Have *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 2000a).

La penetración es seguida por un **crecimiento interno**, que puede en ocasiones verse detenido dando lugar a infecciones latentes. A partir de la hifa que penetra en la planta se desarrollan las hifas primarias y secundarias filamentosas, encargadas de colonizar el tejido del vegetal por crecimiento inter y/o intracelular. La colonización del tejido por crecimiento intercelular de hifas ramificadas es propio de los hongos biotrofos (mildius, royas, etc.), mientras que el crecimiento intracelular, que a menudo ocasiona la muerte de las células del huésped mediante la secreción de enzimas líticas y toxinas, es característico de los hongos necrotrofos (van Kan, 2006).

### 1.1.3. *Morfología y pared celular de hongos filamentosos.*

Los hongos fitopatógenos generalmente son microscópicos, en su mayoría filamentosos y ramificados. Poseen un cuerpo vegetativo llamado **micelio** que crece ramificado en todas las direcciones. A los filamentos que constituyen el micelio se les denomina **hifas**, de anchura normalmente uniforme (entre 2 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) y formadas generalmente por más de una célula, con uno o dos núcleos por célula. La longitud del micelio es variable y su crecimiento ocurre en los ápices de las hifas. En el caso del

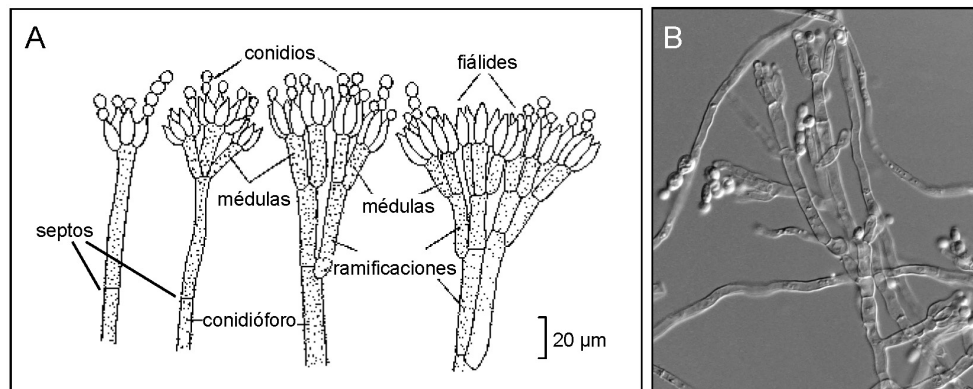


Figura 2. Estructuras morfológicas del micelio de *Penicillium* sp. Esquema de las partes y tipos de conidióforos en función de sus ramificaciones (A), y visualización de conidióforos de *Penicillium digitatum* en microscopía óptica con contraste interferencial diferencial DIC (B).

micelio tabicado, existen paredes de división entre células que se conocen con el nombre de **septos** (Figura 2).

La reproducción de los hongos puede ser sexual o asexual, en ambos casos dando lugar a la formación de esporas. Las esporas asexuales o **conidios** se producen en unas estructuras especiales denominadas **conidióforos** localizados en los ápices de las hifas (Figura 2). Los conidios de la mayoría de los hongos fitopatógenos dependen para su diseminación de distintos agentes tales como el viento, agua, insectos, pájaros u otros animales.

La **pared celular** es un factor esencial en todos los procesos de morfogénesis, y mantiene la forma e integridad de las células fúngicas. En hongos fitopatógenos hay distintas evidencias de la implicación de los componentes estructurales de sus paredes en el proceso de interacción planta-patógeno. De hecho, se ha estudiado su papel como elicitores (ver más adelante) en las respuestas de defensa de plantas (y animales) frente al patógeno (Hoffmann *et al.*, 1999; Selitrennikoff, 2001).

La pared celular del hongo unicelular modelo *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente estudiada (Bulawa, 1993; Klis *et al.*, 2002). En la levadura está compuesta principalmente por  **$\beta$ -1,3-** y  **$\beta$ -1,6-glucanos** (50-60% del peso seco de la pared celular), **manoproteínas** (40-50%) y **quitina** (2%). En hongos

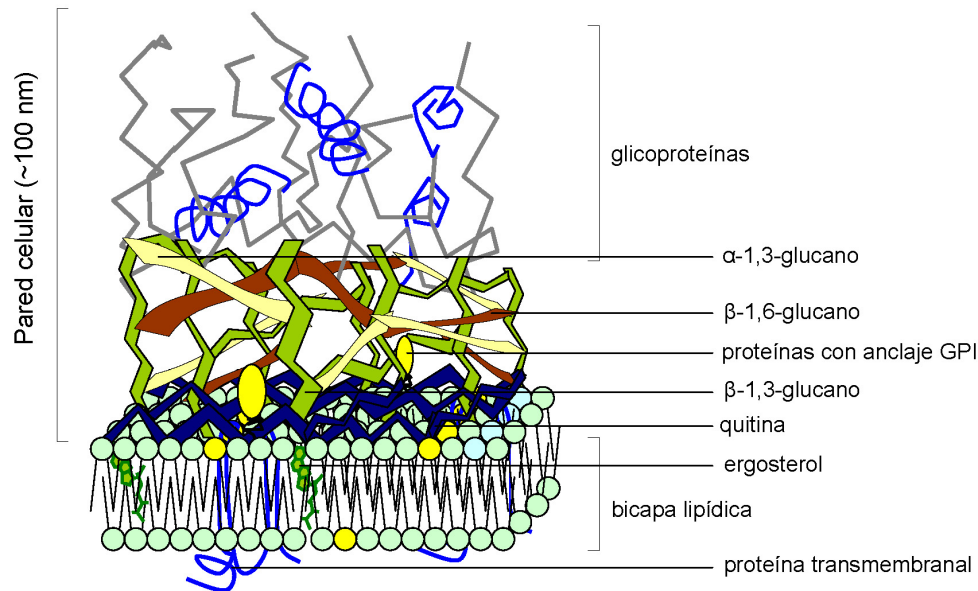


Figura 3. Esquema simplificado de la estructura y composición de la pared celular de hongos filamentosos.

filamentosos la composición es básicamente la misma salvo que está enriquecida en quitina (10-15%) y además contiene polímeros adicionales de  **$\alpha$ -1,3-glucanos** (10-35%) (Figura 3) (Fontaine *et al.*, 2000; Odds *et al.*, 2003). La composición y estructura de la pared celular no es estática, varía con el crecimiento e incluso con la composición del medio externo, pudiendo además modificarse y reorganizarse en respuesta a situaciones de estrés (Damveld *et al.*, 2005a; 2005b; Klis *et al.*, 2006). Al diferir sustancialmente las paredes celulares fúngicas de las de animales o plantas, éstas por sí mismas y su metabolismo han proporcionado sitios o dianas únicos para el desarrollo y la actuación de compuestos antifúngicos (Debono y Gordee, 1994; Selitrennikoff y Nakata, 2003).

#### 1.1.4. Estrategias de control: fungicidas

Las estrategias agronómicas más frecuentes en el control de las enfermedades fúngicas son el uso de variedades vegetales resistentes, de material vegetal certificado, la destrucción de plantas infectadas que pudieran actuar como reservorios, la utilización de utensilios, material y maquinaria

desinfectados, la rotación de cultivos, el uso de microorganismos antagonistas (ver más adelante) y la aplicación de productos agroquímicos y/o fungicidas. Generalmente es necesaria la combinación de varias técnicas para un control efectivo y diversas medidas preventivas y curativas pueden conseguir reducir la incidencia de enfermedad al mínimo. Sin embargo, en la actualidad y para la mayoría de enfermedades fúngicas, es la aplicación de fungicidas el método más efectivo de control, algunas veces incluso el único, y el más utilizado (Knight *et al.*, 1997).

Existe un amplio espectro de agentes antifúngicos que se diferencian en su naturaleza química, propiedades y modo de acción. Algunos han sido descubiertos tras el bioensayo de colecciones de microorganismos con propiedades antibióticas, aunque la mayoría resulta de la síntesis y ensayo de un gran número de compuestos, normalmente relacionados estructuralmente con compuestos ya existentes con propiedades antifúngicas. Unos pocos han sido diseñados *de novo* para aprovechar las diferencias entre la bioquímica de hongos y otros organismos. La mayoría de agentes antifúngicos usados hoy en día tienen alta especificidad, ya que interaccionan con un número limitado de componentes o procesos bioquímicos de la célula [revisado en (Orth, 1999; Odds *et al.*, 2003)]. Ejemplos son: los inhibidores de la mitosis (**benzimidazoles**), de la síntesis de DNA (**5-fluorocitosina**), RNA (**acilalaninas**), ergosterol (**imidazoles**), quitina (**polioxinas y nikomicinas**), inhibidores de la respiración (**carboxamidas**), o los alterantes de la membrana plasmática (**nistatina y anfotericina B**).

Una de las clases de fungicidas más recientes y significativas son las **estrobilurinas**, cuyo desarrollo se produce tras el descubrimiento de compuestos antimicrobianos naturales producidos por determinados hongos (Bartlett *et al.*, 2002; Balba, 2007). A partir de éstos se han generado distintas familias de derivados sintéticos más eficaces y estables para su aplicación en protección vegetal. En los últimos cinco años las estrobilurinas y entre ellas la azoxystrobina han pasado a tener una posición dominante en el mercado global de fungicidas.

### 1.1.5. *Mecanismos de defensa de las plantas.*

Las plantas están continuamente expuestas a múltiples patógenos potenciales; sin embargo no es frecuente que se produzca la infección. La llamada resistencia no-huésped es la consecuencia de la incapacidad del microorganismo para reconocer e infectar la planta, o de la habilidad de la misma para activar rápida y eficazmente mecanismos de defensa que la protegen frente a la colonización por parte de un gran número de microorganismos (Kombrink y Somssich, 1995).

Con el objeto de impedir la colonización e infección del patógeno, las plantas tienen una serie de **mecanismos de defensa pre-existentes** y otros **inducidos** que se activan cuando se percibe su ataque [revisado en (Baker *et al.*, 1997; Veronese *et al.*, 2003)]. El reconocimiento por parte de la planta de señales originadas por los microorganismos le permite activar los mecanismos de defensa correspondientes. Los compuestos que se generan durante la interacción planta-patógeno y que están implicados en la activación de respuestas defensivas de la planta se conocen como **elicitors** (De Wit, 1997).

La primera línea de defensa de las plantas la constituye su propia superficie: es la **barrera física**, tanto de defensa del organismo (epidermis y cutícula) como celular (pared y membrana celulares), que el patógeno debe penetrar o destruir para infectar. Entre las respuestas vegetales frente a la infección se encuentran cambios estructurales entre los que destaca un reforzamiento de la pared celular, lignificación y deposición de celulosa, así como acumulación de proteínas estructurales de pared (ricas en hidroxiprolina, prolina y glicina) y la deposición de resina en los espacios intercelulares. De ello deriva la importancia en la patogénesis fúngica de la secreción de enzimas líticas capaces de degradar estas barreras estructurales.

Las **barreras bioquímicas** consisten en la acumulación constitutiva o inducida de compuestos que pueden resultar tóxicos para el patógeno. Algunos ejemplos son compuestos fenólicos, taninos, derivados de ácidos grasos, compuestos esteroideos, terpenoides glucosilados, fitoalexinas, o especies reactivas de oxígeno (ROS) (Dixon, 2001; Agrios, 2004). No está claro, sin embargo que una planta pueda ser resistente a un patógeno concreto por el mero hecho de acumular estas sustancias.



Un tipo de respuesta de la planta a la infección es la llamada **respuesta hipersensible** (HR) que consiste en la muerte o suicidio celular de unas pocas células en el punto inicial de infección, lo que confina al patógeno y limita su progresión (Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 1997). En muchos casos, la HR se asocia a la llamada **resistencia sistémica adquirida** (SAR), según la cual la infección local por el patógeno provoca una inducción de resistencia de amplio espectro en otras partes de la planta (Durrant y Dong, 2004). Esta respuesta se correlaciona con la inducción de genes que codifican las llamadas proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR, del inglés ‘*pathogenesis related proteins*’).

Las **proteínas PR** son un grupo estructuralmente diverso de proteínas cuya acumulación se eleva tras el ataque de un patógeno o condiciones de estrés. Existen hasta 17 grupos de proteínas PR clasificadas según su función, peso molecular, secuencia de aminoácidos u otras propiedades determinadas. (Van Loon *et al.*, 2006). Distintas clases de PR poseen actividad directa frente a patógenos, y en especial frente a hongos. Así, dentro de las proteínas PR destacan: las proteínas PR1 (antioomicetos y antifúngica), PR2 ( $\beta$ -1,3-glucanasas), PR3 (quitinasas), PR4 (antifúngicas), PR6 (inhibidores de proteinasas), lisozimas, peroxidadas, lipooxigenasas y proteínas tipo taumatina.

#### 1.1.6. *Proteínas antimicrobianas vegetales.*

Aunque inicialmente no fue así, ya se consideran como proteínas PR varias familias relacionadas de pequeñas proteínas o péptidos con actividad antimicrobiana directa (Van Loon *et al.*, 2006), representadas por las tioninas, defensinas y proteínas de transferencia de lípidos (LTP) (Broekaert *et al.*, 1997; García-Olmedo *et al.*, 1998; Castro y Fontes, 2005). Una característica de estas proteínas es su alto contenido en cisteínas y puentes disulfuro, que unido a su pequeño tamaño hacen que su estructura sea muy compacta y estable.

La purotionina es una **tionina** aislada de semillas de trigo que fue la primera proteína de pequeño tamaño de plantas para la que se demostró actividad antimicrobiana *in vitro* frente a fitopatógenos bacterianos (Fernández de Caleyá *et al.*, 1972). La secuencia de aminoácidos de las tioninas tiene un tamaño de alrededor de 45 residuos, está muy conservada, y su estructura tridimensional es similar a la letra griega gamma mayúscula (ver más adelante

Figura 5). Las tioninas pueden clasificarse en al menos 5 tipos distintos en función de la homología de su secuencia y del número de puentes disulfuro (2, 3 ó 4) (García-Olmedo *et al.*, 1998). Las tioninas tienen actividad *in vitro* frente a bacterias y hongos fitopatógenos, incluso se observa cierta especificidad en su acción en función del tipo al que pertenecen (Molina *et al.*, 1993).

Las **defensinas** son un grupo de proteínas básicas más heterogéneas, de aproximadamente 4-5 kDa (entre 40 y 50 residuos de aminoácidos), y estructuradas en diferentes motivos (ver ejemplos en Figura 5). Las defensinas de plantas comparten propiedades estructurales y funcionales con las defensinas de mamíferos e insectos (Broekaert *et al.*, 1995). Su conservación filogenética como parte del sistema inmune innato de plantas, vertebrados e invertebrados, sugiere que son un grupo muy antiguo y posiblemente originado antes de la divergencia entre plantas y animales (Thomma *et al.*, 2002; Thevissen *et al.*, 2004). Se pueden agrupar en 4 subfamilias en función de su secuencia de aminoácidos (García-Olmedo *et al.*, 1998). La mayoría de las defensinas de plantas inhiben el crecimiento *in vitro* de un número importante de microorganismos sin ser tóxicas para células de mamíferos ni de plantas. Observaciones *in planta* apoyan el papel protector de las defensinas. Representan el 30% de las proteínas liberadas durante la germinación de semillas y se inducen por distintas moléculas reguladoras de la respuesta SAR así como por ataque de hongos fitopatógenos (Penninckx *et al.*, 1996; Broekaert *et al.*, 1997).

La otra familia importante son las **LTP**, una familia de polipéptidos de mayor tamaño (90-95 aminoácidos) que tienen actividad antimicrobiana *in vitro* pero cuya función biológica no está tan clara. Inicialmente se relacionaron con el transporte de lípidos entre orgánulos o la biosíntesis de cutina [revisado en (Kader, 1996)]; pero también han sido implicadas en defensa vegetal (Segura *et al.*, 1993; García-Olmedo *et al.*, 1995), incluso no sólo por su actividad antimicrobiana sino como transportadores de moléculas señalizadoras de defensa (Maldonado *et al.*, 2002). Una planta tiene un número variable de genes que codifican LTP con distinto espectro antimicrobiano, indicando cierto grado de especificidad. En la práctica totalidad de las LTP se conserva aproximadamente 1/3 de la secuencia de aminoácidos, incluidas 8 cisteínas unidas por 4 puentes disulfuro.

Junto con estas familias, existen otros ejemplos de pequeñas proteínas y péptidos, algunos de reciente descubrimiento. Estos son los péptidos tipo **heveína** y **knotina** que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (García-Olmedo *et al.*, 1998), la familia de las **snakin**s identificada inicialmente en tubérculos de patata (Segura *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002), o las puroindolinas con actividad antifúngica y relacionadas con las LTPs y tioninas (Krishnamurthy *et al.*, 2001). Entre estos péptidos hay un gran número aislados de semillas, por ejemplo de *Impatiens balsamia* (Ib-AMP) (Tabla 2) (Tailor *et al.*, 1997), *Amaranthus caudatus* (Ac-AMP) (Broekaert *et al.*, 1992), *Amaranthus retroflexus* (Ar-AMP1) (Lipkin *et al.*, 2005), *Mirabilis jalapa* (Mj-AMP) (Cammue *et al.*, 1992), o de melón (Ribeiro *et al.*, 2007).

Así pues, existe un número muy importante y variado de pequeñas proteínas vegetales con actividad antimicrobiana directa, que formarían parte de los mecanismos de defensa naturales de las plantas. Recientemente, un análisis bioinformático ha demostrado la existencia, entre las secuencias de genes vegetales depositadas en bases de datos, de alrededor de unos 13.000 genes que codifican secuencias con características comunes y que corresponderían a estas familias de proteínas antimicrobianas (Silverstein *et al.*, 2007). En el mismo estudio se ha estimado que el 2-3% de los genomas vegetales se corresponden con péptidos potencialmente antimicrobianos.

## **1.2. Importancia de los hongos fitopatógenos en la postcosecha de frutos.**

Los mecanismos de defensa de las plantas no necesariamente se corresponden con los de sus frutos. Un estudio clásico demostró que la susceptibilidad a un mismo patógeno (*B. cinerea*) en plantas de distintas variedades de fresa no se correlacionaba con la susceptibilidad a la infección postcosecha de sus frutos (Daubeny y Pepin, 1977). Hay que señalar que las presiones de selección natural que han dado lugar a los mecanismos de defensa de las partes vegetativas o de los frutos de una planta no necesariamente tienen que ser las mismas, debido a las diferentes funciones biológicas del fruto.

Los productos vegetales son susceptibles al ataque por patógenos después de su recolección debido, fundamentalmente, a la pérdida de la resistencia intrínseca que los protege durante el desarrollo en la planta y a su

alto contenido en agua y nutrientes. Los hongos fitopatógenos son los principales agentes bióticos que causan alteraciones postcosecha, y problemas de calidad relacionados con el aspecto, valor nutricional, características organolépticas y conservación de frutas y hortalizas (Agrios, 2004).

Además, en algunos casos, los hongos fitopatógenos son indirectamente los responsables de trastornos patológicos, alérgicos o tóxicos en los consumidores debido a la producción de micotoxinas o alérgenos que contaminan el producto vegetal. En este sentido, dos son los ejemplos más representativos: determinadas especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son capaces de originar intoxicaciones por patulinas (clariformina o leucipina, producidas por *P. expansum* o *P. griseofulvum*) o aflatoxinas (producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*) (Pohland, 1993).

#### 1.2.1. *Patógenos fúngicos de postcosecha.*

Los frutos y vegetales cosechados son atacados de forma natural por un grupo de patógenos relativamente pequeño de aproximadamente 40 especies. Los hongos patógenos postcosecha más representados son especies de *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus* y *Sclerotinia* (Wills *et al.*, 1998). La mayoría de las frutas son sensibles a varias especies de hongos, aunque es frecuente encontrar relaciones de alta especificidad entre el patógeno y el fruto o vegetal que infecta (ver más adelante) (Barkai-Golan, 2001).

#### 1.2.2. *Enfermedades postcosecha de frutos cítricos.*

Un porcentaje importante de la producción citrícola se pierde cada año como consecuencia de las alteraciones que se producen en la manipulación y conservación postcosecha de los frutos. Los hongos constituyen los principales patógenos de los frutos cítricos durante su conservación y comercialización. Las pérdidas producidas por estos microorganismos son variables, dependiendo en muchos casos de las condiciones medioambientales de la campaña, época del año, madurez del fruto, y procesos de recolección, almacenamiento, confección y comercialización. Se estima un porcentaje habitual entre el 3 y 5% de pérdidas debidas a podredumbres, pudiendo

alcanzar entre 8 y 12% en años de climatología desfavorable (Tuset, 1987; 1999). Si consideramos la producción anual de cítricos de la Comunidad Valenciana, estas pérdidas supondrían un mínimo de 150.000 toneladas.

Hasta la fecha, se han detectado cerca de una veintena de especies de hongos causantes de enfermedades en los frutos cítricos (Tabla 1 y Figura 4). 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 citrícolas. En España, las especies de hongos de mayor incidencia e importancia son *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, pudiendo llegar a ser responsables de hasta el 80% de las pérdidas (Tuset, 1987).

**Tabla 1. Principales agentes y enfermedades que producen que afectan a los frutos cítricos.**

<b>Agente Causal</b>	<b>Enfermedad producida</b>
<i>Penicillium digitatum</i>	Podredumbre verde
<i>Penicillium italicum</i>	Podredumbre azul
<i>Phytophthora citrophthora</i>	Aguado o podredumbre marrón
<i>Phytophthora</i> sp.	
<i>Geotrichum candidum</i>	Podredumbre amarga
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Podredumbre blanca
<i>Trichoderma viride</i>	Podredumbre verde-amarilla
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	Antracnosis
<i>Alternaria citri</i>	Podredumbre negra o verde oscura
<i>Alternaria alternata</i>	
<i>Diplodia natalensis</i>	Podrido del tallo
<i>Cladosporium berbarum</i>	Podredumbre verde-gris
<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Podredumbre por Rhizopus
<i>Rhizopus oryzae</i>	

***P. digitatum* Sacc.** es un deuteromiceto u hongo imperfecto, cuya fase sexual no es conocida (Agrios, 2004). Su forma de reproducción es mediante esporas asexuales o conidios. Es el patógeno cuantitativamente más importante

en la postcosecha de cítricos en todas las zonas productoras, causante de la podredumbre verde (Figura 4A). Un aspecto relevante es que *P. digitatum* es un patógeno específico de frutos cítricos, no descrito en otros sistemas vegetales. Es un patógeno de herida que necesita pequeñas lesiones preexistentes en la piel para penetrar en el tejido vegetal (Kavanagh y Wood, 1967). Los conidios están latentes en la superficie de los frutos hasta que encuentran una rotura en la cutícula para penetrar y germinar. La contaminación por este hongo tiene lugar durante la recolección, transporte, confección y comercialización, aunque el inóculo mayoritario procede, en última instancia, del campo (Tuset, 1987).

*P. italicum* Wehmer sigue en importancia a *P. digitatum*, y está estrechamente relacionado filogenética y biológicamente con él (Tuset, 1987; López-García, 2002). Este hongo causa la podredumbre azul (Figura 4B) y es especialmente importante durante la frigoconservación ya que, a diferencia de *P. digitatum*, es capaz de desarrollarse a temperaturas próximas a 5° C. Es un patógeno importante de frutos cítricos pero puede además atacar otros frutos y vegetales, cosa que no sucede con *P. digitatum*.

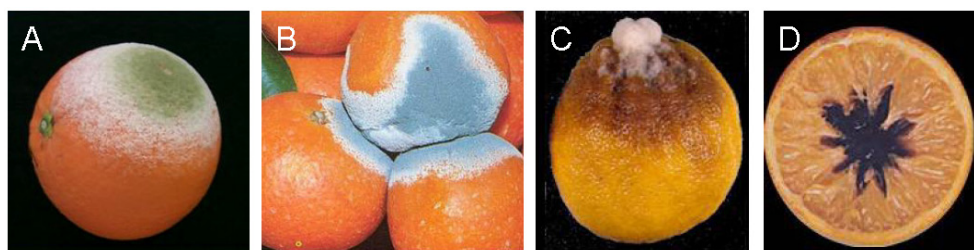


Figura 4. Síntomas sobre frutos cítricos de las podredumbres causadas por *P. digitatum* (A), *P. italicum* (B), *B. cinerea* (C) y *A. citri* (D).

Ya hemos mencionado *B. cinerea* (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* Whetzel). Es un ascomiceto, patógeno que causa la podredumbre gris en condiciones de frío y humedad (Figura 4C). Normalmente *Botrytis* es un patógeno de herida en condiciones comerciales de postcosecha y conservación. Sin embargo, también es capaz de penetrar a través de las partes florales en los frutos jóvenes en el campo, dando lugar a una infección latente susceptible de desarrollarse durante la maduración y el almacenamiento (Jarvis, 1962).

Existen otras especies de hongos que también tienen incidencia, aunque mucho menor, sobre los cítricos durante la postcosecha (Tabla 1) [revisado en (Tuset, 1987; Barkai-Golan, 2001)]. *Geotrichum candidum* es un patógeno de herida que causa la podredumbre amarga, y necesita una delgada capa de agua sobre la superficie del fruto para que se produzca la estimulación de la germinación. *G. candidum*, junto con *Rhizopus stolonifer*, están habitualmente presentes en el ambiente de las centrales hortofrutícolas y de sus cámaras de frigoconservación, representando una importante fuente de contaminación en estos casos (Tuset, 1987). La infección por *Alternaria citri* sólo se produce si el fruto está dañado o fisiológicamente débil. Produce la podredumbre negra que afecta al tejido interno del fruto (Figura 4D). Es un podrido típico de aquellos frutos que han permanecido largo tiempo en frigoconservación. *A. citri*, junto con *Diplodia natalensis*, producen el llamado podrido del pedúnculo de frutos cítricos; se alojan en la superficie inferior del fruto, generalmente hasta después de la cosecha, cuando el hongo progresa desde la parte inferior del fruto hacia el interior e inicia la infección del centro del fruto (Figura 4D). *Phytophthora citrophthora* infecta los frutos cítricos sólo cuando los frutos permanecen húmedos durante largos periodos de tiempo produciendo la podredumbre marrón. *Trichoderma viride* es capaz de descomponer celulosa y las esporas al germinar penetran a través de las heridas en el fruto desarrollándose una masa de conidios verde o verde-amarillenta bajo condiciones húmedas, similar a la podredumbre verde de *P. digitatum*. *Colletotrichum gloeosporoides* es el único de estos patógenos que puede penetrar en el tejido de forma mecánica mediante la formación de apresorios y dar lugar a la antracnosis.

### 1.3. Control de podredumbres postcosecha.

Existen distintas alternativas y tratamientos de uso comercial para el control de las podredumbres postcosecha. Los vamos a revisar centrándonos en algunos que son específicos en la postcosecha de frutos cítricos.

#### 1.3.1. Medidas preventivas.

Durante la etapa de desarrollo en campo de los frutos, y como medida preventiva general, es importante conseguir una **buena calidad** de la piel de

los frutos en su periodo de madurez y aumentar la calidad sanitaria del producto reduciendo 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 durante el tiempo que permanecen los frutos almacenados y suponen un ambiente apropiado para que las infecciones fúngicas no inmediatas o latentes se desarrollen. Además es muy importante mantener al mínimo posible las dosis de inóculo en toda la maquinaria utilizada en los procesos de recolección, almacenamiento y confección.

Las prácticas comerciales realizadas durante la postcosecha de frutos cítricos, como la desverderización, los lavados, el encerado y la confección, pueden producir alteraciones que han sido citados como factores de predisposición al podrido (Tuset, 1987). El etileno es una hormona vegetal que regula múltiples procesos biológicos en las plantas. El tratamiento comercial de desverderización con etileno es utilizado porque acelera el cambio de color de los frutos. Este proceso puede incrementar la incidencia de podridos debido a que acelera los procesos naturales de senescencia y los frutos tratados se hacen más susceptibles al podrido que aquellos no tratados (Ben-Yehoshua *et al.*, 1995). Además, el etileno estimula el desarrollo de patógenos como *P. digitatum* y *P. italicum* (El-Kazzaz *et al.*, 1983) e induce la germinación y formación de apresorios en *Colletotrichum* (Flaishman y Kolattukudy, 1994). Sin embargo el etileno es también un inductor de mecanismos de defensa vegetal, y su aplicación a bajas dosis puede hacer que el fruto sea menos susceptible a la infección fúngica (El-Kazzaz *et al.*, 1983; Marcos *et al.*, 2005; Broekaert *et al.*, 2006).

### 1.3.2. *Tratamientos con fungicidas.*

Al margen de las medidas preventivas la estrategia generalizada de control directo sobre los hongos es la aplicación de fungicidas (Eckert y Ogawa, 1985; Knight *et al.*, 1997; Barkai-Golan, 2001; Narayanasamy, 2006). Estos actúan mediante: (i) la inactivación de esporas presentes en la piel del fruto; (ii) la muerte del propágulo ya germinado; (iii) la inhibición de la esporulación del micelio sobre la superficie de los frutos ya infectados,



evitando así la propagación a otros frutos; y (iv) la protección frente a una infección posterior por recubrimiento de la superficie del fruto.

Históricamente, se comenzó utilizando el fungicida orgánico **bifenilo** para inhibir la esporulación de *Penicillium* sobre cítricos, pero su uso ya no está permitido por problemas asociados al olor y a la alta toxicidad de sus residuos. El **2-aminobutano** (2-AB) fue desarrollado como un fungicida postcosecha para frutos cítricos a mediados de los años sesenta. Sin embargo, no es activo frente a *Alternaria*, *Geotrichum* o *Phytophthora*. Posteriormente se empezó a utilizar el **ortofenilfenato sódico** (SOPP), un ejemplo de un fungicida de amplio espectro, y el **dióxido de azufre** (SO<sub>2</sub>), aplicándose mediante fumigación para eliminar las esporas de los frutos con el fin de inhibir las infecciones superficiales y evitar la infección por contacto durante el almacenamiento.

A finales de los sesenta, se introdujeron los **derivados del benzimidazol** como el tiabendazol (TBZ), benomilo y carbendazima. Estos compuestos son muy eficaces frente a un amplio espectro de hongos, entre ellos *Penicillium*, *D. natalensis*, *B. cinerea* y *Colletotrichum*. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con la tubulina del citoesqueleto, previniendo su polimerización y la elongación de microtúbulos en el núcleo, e interfiriendo en los procesos de división y movimiento celular (Davidse, 1988). Otros fungicidas introducidos a finales de los setenta son los **derivados del imidazol**, como el imazalil (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, benomilo, etc. (Eckert y Ogawa, 1985).

Existen otros fungicidas disponibles en el mercado [revisado en (Barkai-Golan, 2001)] como son el etaconazol (derivado del triazol), la guazatina, el metalaxil, el fosetil-Al (Eckert y Ogawa, 1985), el Bórax, derivados de la morfina (fenpropimorf y tridemorf), o el fludioxonilo (derivado del pirrol), el cual en estudios recientes ha demostrado actividad similar al IMZ (Schirra *et al.*, 2005; Errampalli *et al.*, 2006). Los tratamientos con fungicidas se realizan mediante el baño, la ducha o la inclusión en ceras utilizadas para la

confección. Actualmente los fungicidas más utilizados en la Comunidad Valenciana para el control de las podredumbres en frutos cítricos durante la postcosecha son el SOPP, el TBZ y el IMZ.

### 1.3.3. *Inconvenientes de la aplicación de fungicidas.*

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

Otro de los problemas asociados a la utilización de fungicidas es el de la **aparición de resistencias** (Eckert, 1988; Holmes y Eckert, 1999). Los fungicidas de alta especificidad van perdiendo efectividad con los años de utilización, fundamentalmente porque su actividad se debe a la interacción con un componente único. Por lo tanto, una mutación puntual en éste puede teóricamente conferirle al microorganismo resistencia frente a él. El problema de las resistencias se agrava por la utilización a veces masiva y descontrolada de los fungicidas.

Por último, los fungicidas utilizados no son efectivos frente a todos los patógenos debido a su **limitado espectro de acción**. Generalmente actúan solo frente a determinados hongos, lo que conlleva en algunos casos la necesidad de utilizar mezclas de productos. El espectro de acción limitado de algunos fungicidas puede además alterar el equilibrio biológico, favoreciendo la presencia de hongos no susceptibles que inicialmente no eran problemáticos. Dentro de la postcosecha de frutos cítricos un ejemplo lo ofrecen los productos habitualmente utilizados, TBZ, IMZ y SOPP, que controlan principalmente los dos patógenos más comunes *P. digitatum* y *P. italicum*, y sin embargo no ofrecen nivel de protección comercialmente aceptable frente a *B. cinerea* (Tuset *et al.*, 2000).

#### 1.4. Estrategias alternativas de control en postcosecha.

Como consecuencia de su toxicidad, se han planteado serios problemas a la utilización de fungicidas en alimentos (Stone, 1994; Blair y Zahm, 1995), siendo esto especialmente importante en el caso de frutos y vegetales no procesados y consumidos en fresco. Además, existe un incremento del interés de los consumidores hacia temas relacionados con la salud y la protección del medio ambiente. Ello ha motivado la aparición de reglamentos cada vez más estrictos en lo referente a la utilización de fungicidas y sus residuos en frutos. Esta situación genera la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control de las enfermedades en postcosecha (Barkai-Golan, 2001; Narayanasamy, 2006).

##### 1.4.1. *Tratamientos físicos y químicos.*

Existen varias estrategias alternativas basadas en distintos tratamientos físicos que reducen el desarrollo de infecciones postcosecha en los frutos. Una de ellas son los **tratamientos térmicos**, especialmente los baños de agua caliente y el curado (Tuset *et al.*, 1996; Nunes *et al.*, 2007). El tratamiento de curado a 37° C durante 3 días en condiciones de alta humedad relativa consigue retrasar los ‘daños por frío’ durante el almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas (Martinez-Jávega *et al.*, 1994; Lafuente *et al.*, 1997), además de impedir el desarrollo de una infección incipiente. Las elevadas temperaturas tienen un efecto directo sobre la viabilidad del patógeno. Pero también se ha demostrado que el tratamiento térmico sobre frutos cítricos que presentan una infección incipiente promueve la inducción de mecanismos de resistencia del fruto frente a la infección (Ballester, 2007). El principal inconveniente para la aplicación comercial de estas estrategias es el hecho de que las combinaciones tiempo-temperatura que mejores resultados ofrecen están muy próximas a las que provocan la aparición de daños por calor en la piel del fruto durante la aplicación de baños en agua caliente.

Otro método físico de control en estudio es la irradiación de los frutos con **luz UV** (Wilson y Wisniewski, 1994). Su efecto protector se debe por un lado al efecto germicida directo de radiación y, por otro, también a la inducción de respuestas de defensa del fruto. Las dos limitaciones importantes de este tratamiento son que la dosis de irradiación necesaria puede provocar daños en el fruto (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992) y que la dosis óptima puede variar entre

distintas variedades de frutos y, dentro de la misma, con el estado de maduración del fruto (Droby *et al.*, 1993)

Antes de la aparición de los fungicidas orgánicos ya había sido utilizado el tratamiento en forma de baños con compuestos antifúngicos de baja especificidad como son las **sales inorgánicas** de bicarbonato sódico, carbonato sódico o cloruro de calcio, y sales orgánicas de benzoato sódico, sorbato potásico o acetato sódico. Muchos de estos compuestos son usados desde hace años como aditivos para controlar el pH y el deterioro de distintos alimentos, así como para modificar sus propiedades organolépticas de sabor y textura, y por tanto son reconocidos como tratamientos seguros. Mediante el tratamiento de frutos cítricos con baños en soluciones acuosas de estas sales, se han obtenido niveles aceptables de control de las infecciones de *P. digitatum* y *P. italicum* (Smilanick *et al.*, 1999; Usall *et al.*, 1999; Smilanick y Sorenson, 2001; Palou *et al.*, 2002). Sin embargo, la principal desventaja es que este método no impide la esporulación del patógeno cuando se produce la infección, y estas esporas pueden contaminar el resto de frutos.

#### 1.4.2. Control biológico.

Las estrategias de control biológico se basan en la utilización de **microorganismos como agentes de biocontrol** (BCA) que actúan como antagonistas e inhiben la infección de patógenos (Wilson y Wisniewski, 1989; Janisiewicz y Korsten, 2002).

Este efecto inhibitorio se basa en distintos mecanismos (no excluyentes entre sí) en los que está implicado el agente antagonista (Spadaro y Gullino, 2004). La mayoría de las infecciones en postcosecha se producen a través de heridas. Los antagonistas efectivos colonizan la herida e inhiben el crecimiento del hongo compitiendo por los nutrientes y/o el espacio. En segundo lugar, los BCA pueden secretar al medio sustancias inhibitorias que actúen directamente sobre el patógeno. Por último, hay que considerar los posibles modos de acción del antagonista basados en interacciones más complejas con el huésped y el patógeno. Un antagonista efectivo puede inducir resistencia en el huésped indirectamente provocando cambios químicos y/o fisiológicos a favor del antagonista que favorecerían el control del patógeno. Se ha demostrado que el modo de acción del hongo *Trichoderma harzianum* T39 (componente activo del

producto comercial ‘Tricodex’) se basa, además de la secreción de enzimas líticos, en la competición con el patógeno por nutrientes y espacio, e induciendo resistencia en el huésped (Benítez *et al.*, 2004).

Se han publicado numerosos trabajos describiendo distintas especies de microorganismos con potencial aplicación de biocontrol en la postcosecha de frutos (Chalutz y Wilson, 1990; Piano *et al.*, 1997; Viñas *et al.*, 1998; Arras, 2002; Bonaterra *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005; Francés *et al.*, 2006; Calvo *et al.*, 2007). En la actualidad, distintos formulados basados en BCA han llegado a ser comerciales. Los primeros ejemplos fueron el producto “**Aspire**” (Ecogen, Langhorne, PA, USA) basado en la levadura *Candida oleophila* (Droby *et al.*, 1998) y “**BioSave**” (EcoScience, Worcester, MA, USA) basado en la bacteria *Pseudomonas syringae* (Janisiewicz y Jeffers, 1997). Pese a las expectativas generadas, los niveles de control alcanzados no han sido satisfactorios y han dificultado su implantación. Otros ejemplos comerciales más recientes son “**Yield Plus**” (Anchor Bio-Technologies, Ciudad del Cabo, Sudáfrica) basado en la levadura *Cryptococcus albidus* (Fan y Tian, 2001) y “**Shemer**” (Agrogreen, Israel) basado en la levadura *Metschnikowia fructicola* (Kurtzman y Droby, 2001). Nuestro grupo de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del IATA ha caracterizado cepas de levadura con potencial actividad de biocontrol y de aplicación en postcosecha de cítricos.

#### 1.4.3. *Compuestos antimicrobianos naturales.*

En los últimos años, se ha estudiado la aplicación de una serie de compuestos naturales biológicamente activos como alternativa a los fungicidas sintéticos. Algunos de éstos son compuestos aromáticos de alimentos (acetaldehídos, hexanal, benzaldehídos), ácido acético, ácido jasmónico y metil jasmonatos, glucosinolatos, aceites esenciales, o extractos de plantas enriquecidos en sus compuestos naturales de defensa (Tripathi y Dubey, 2004). En frutos cítricos se ha demostrado que la aplicación exógena de **citral** a limones inoculados con *P. digitatum* previene el desarrollo de la infección del hongo (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). También se ha usado el compuesto **quitosano**, como alternativa para el control de infecciones fúngicas en pre y postcosecha. Se trata de la forma deacetilada de la quitina, natural y biodegradable, obtenida de las conchas de crustáceos. Su uso es habitual en

productos cosméticos. Posee un efecto dual, por un lado posee propiedades fungiestáticas y fungicidas, y por otro tiene la capacidad de inducir mecanismos de defensa en las plantas, induciendo la producción de sustancias defensivas como glucanohidrolasas, compuestos fenólicos y fitoalexinas, junto con el reforzamiento de las barreras estructurales a través de la síntesis de ligninas (Wu *et al.*, 2005; Bautista-Baños *et al.*, 2006).

#### 1.4.4. *Inducción de resistencias.*

Algunas de estas alternativas de control se asocian con la inducción de mecanismos de defensa naturales de los frutos. Se ha visto como la aplicación experimental de distintos tratamientos térmicos sobre los frutos cítricos posteriores a una infección incipiente inducen la biosíntesis de metabolitos y proteínas asociados a mecanismos de defensa vegetales (Kim *et al.*, 1991; Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; 1995; Ballester, 2007). También, en cítricos, se produce la inducción de la síntesis de la fitoalexina escoparona por tratamiento con luz UV (Kim *et al.*, 1991; Rodov *et al.*, 1992; D' hallewin *et al.*, 1999). La adición de algunos compuestos también puede desencadenar la resistencia de la planta o el fruto (Terry y Joyce, 2004). El ácido  $\beta$ -aminobutírico sobre heridas se ha visto que induce resistencia a la infección posterior con *P. digitatum* (Porat *et al.*, 2003). Por último, en algunos casos se ha demostrado que la utilización de microorganismos BCA induce mecanismos de defensa, como son la producción de fitoalexinas en cítricos por la levadura *C. famata* (Arras, 1996).

#### 1.4.5. *Biotecnología vegetal.*

Durante las últimas dos décadas, se han identificado muchos genes de resistencia cuyos productos están implicados en el reconocimiento de patógenos, diseccionado rutas de señalización de respuesta a la infección, e identificado un gran número de compuestos antifúngicos sintetizados por plantas y otros organismos. La era genómica, con la secuenciación completa de genomas, ha permitido los estudio globales de estas cuestiones; inicialmente en especies modelo pero seguidamente también en cultivos de interés agronómico. Todo este conocimiento unido al desarrollo de técnicas de transformación genética de plantas, han llevado al desarrollo de un número

considerable de estrategias para la producción mediante biotecnología de plantas resistentes a infecciones.

Existen ejemplos relevantes de plantas con resistencia incrementada gracias a la producción transgénica de distintos compuestos antimicrobianos. Dentro de éstos, destacan los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. La estilbeno sintasa de uvas que codifica para la fitoalexina resveratrol, fue introducida en plantas de tabaco obteniéndose una resistencia incrementada al hongo *B. cinerea* (Hain *et al.*, 1993). Plantas transgénicas similares fueron obtenidas en arroz, tomate, trigo, cebada y alfalfa, viéndose también mayor resistencia a las infecciones por *M. grisea*, *P. infestans*, *B. cinerea* y *Phoma medicaginis* respectivamente (Stark-Lorenzen *et al.*, 1997; Thomzik *et al.*, 1997; Leckband y Lorz, 1998; Hipskind y Paiva, 2000). Estos trabajos adquieren mayor importancia por el hecho de que el resveratrol es una de las fitoalexinas en la que se han demostrado propiedades beneficiosas para la salud humana (Ulrich *et al.*, 2005), por lo que su expresión transgénica posee además un interés nutracéutico (Paiva, 2002).

La utilización de la biotecnología también es potencialmente útil para identificar y modificar la expresión de genes responsables de la compatibilidad básica entre la planta y el patógeno, y poder incrementar así los sistemas de defensa de las plantas (y sus frutos) (Grover y Gowthaman, 2003). Para este tipo de aproximación es necesario el entendimiento de los mecanismos básicos que gobiernan la interacción planta-patógeno. Dentro del Grupo de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del IATA se desarrollan varias líneas de investigación en el campo de la postcosecha de cítricos utilizando herramientas de genómica funcional en el estudio de la interacción de los frutos con *P. digitatum*, a través de una colección de EST de cítricos desarrollada dentro del Proyecto de Genómica Funcional de Frutos Cítricos (CFGP, <http://genomica.ibmcp.upv.es/>) (Forment *et al.*, 2005). Dichos trabajos proporcionarán conocimientos acerca de la patogénesis por parte del hongo, así como de las respuestas de los frutos frente a la infección. En este sentido ya se ha demostrado que la interacción de frutos con el patógeno *P. digitatum* desencadena y modifica distintas actividades enzimáticas y producción de metabolitos como respuesta de defensa frente a su infección (Ballester *et al.*, 2006; Ballester, 2007).

#### 1.4.6. *Control Integrado.*

El llamado control integrado se viene desarrollando como una estrategia basada en la **combinación de varios métodos de control** de podredumbres, que pueden o no afectar a distintos procesos, de forma que el tratamiento de distintos métodos alternativos junto con la aplicación de fungicidas, puede llegar a reducir (si no eliminar completamente) su dosis en postcosecha.

Por ejemplo, el uso de tratamientos térmicos permiten una reducción de la cantidad de fungicida utilizado. Se ha obtenido mayor efectividad de los fungicidas IMZ y benomilo, así como fungitóxicos de baja especificidad (carbonatos, bicarbonatos, sorbato potásico o benzoato sódico) en el control de podredumbres postcosecha cuando éstos se aplicaban en soluciones de agua caliente o combinados con tratamientos de curado (Tuset *et al.*, 1996; Smilanick *et al.*, 1997; Palou *et al.*, 2002).

También se encuentran en estudio las combinaciones de distintos tratamientos con la utilización de BCA. Por ejemplo, su utilización junto con dosis menores de fungicidas ha resultado efectiva (Hofstein *et al.*, 1994; Arras, 2002). Además, y con el fin de eliminar completamente el uso de fungicidas, se están llevando a cabo diversas investigaciones para mejorar la eficacia de los BCA en otros tratamientos combinados, por ejemplo con temperatura y sales inorgánicas u orgánicas (Porat *et al.*, 2002; Obagwu y Korsten, 2003; Spadaro *et al.*, 2004).

## **2. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.**

Durante la segunda mitad del siglo XX se determinó la naturaleza proteica de algunas sustancias antimicrobianas presentes en las secreciones y fluidos de seres vivos. Se trataba de pequeñas proteínas de carácter básico y actividad antibacteriana específica. En un trabajo pionero, se caracterizaron por primera vez dos pequeños péptidos antimicrobianos procedentes de insectos, las cecropinas A y B (Tabla 2) (Steiner *et al.*, 1981), aunque ya hemos mencionado que una década antes se había demostrado actividad antibacteriana *in vitro* en una purotionina vegetal (Fernández de Caleyá *et al.*,



1972). Desde entonces, el campo de estudio se ha ampliado notablemente y se han caracterizado un gran número de pequeñas proteínas y péptidos naturales con propiedades antimicrobianas directas.

Los **péptidos antimicrobianos** (AMP, del inglés “*antimicrobial peptides*”) forman parte de los mecanismos de defensa conservados a lo largo de la evolución y presentes en organismos de muy distinta escala filogenética, desde procariotas hasta animales y plantas superiores (Andreu y Rivas, 1998; Hancock, 2001; Zasloff, 2002; Brogden, 2005; Brown y Hancock, 2006). En animales superiores las defensas son mediadas a través de un sistema inmune y células especializadas, pero también se produce la liberación de AMP de pequeño peso molecular. En insectos, anfibios y otros organismos inferiores es aún mayor el papel que desempeñan estos péptidos en el sistema de defensa e inmunidad innata (Otvos, 2000). Así mismo, es cada vez más evidente que los vegetales poseen también un sistema de defensa específico donde intervienen de forma natural pequeñas proteínas y péptidos con actividad frente a microorganismos fitopatógenos, como son las tioninas, defensinas o proteínas de transferencia de lípidos que hemos visto anteriormente (Broekaert *et al.*, 1997; García-Olmedo *et al.*, 1998).

La gran cantidad de AMP existentes ha motivado distintos intentos de sistematización en forma de **bases de datos** de acceso público, como son la “*Antimicrobial Sequences Database*” (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/amsdb.html>) (Tossi *et al.*, 2000), la “*Antimicrobial Peptide Database*” (<http://aps.unmc.edu/AP/main.html>) (Wang y Wang, 2004), y ANTIMIC (<http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/>) (Brahmachary *et al.*, 2004). Estos recursos están orientados a describir péptidos naturales y sus derivados de interés biomédico proporcionando herramientas de búsqueda, visualización de estructuras secundarias, o desarrollo de nuevas secuencias antimicrobianas.

El preocupante aumento de cepas bacterianas y fúngicas resistentes a antibióticos y las propiedades específicas de determinados AMP, han conducido a proponer su **utilización médica** como agentes terapéuticos (De Lucca y Walsh, 1999; Hancock, 2001; Zasloff, 2002; Hancock y Sahl, 2006). Su aplicación en **protección vegetal** también fue propuesta casi desde el momento de su identificación (Jaynes *et al.*, 1987; Casteels *et al.*, 1989; Rao,

1995; van der Biezen, 2001; Montesinos, 2007). Sin embargo, al tratarse de péptidos naturales pueden presentar inconvenientes derivados de su biodisponibilidad, limitado espectro de acción, toxicidad inespecífica o estabilidad. Pero también es cierto que su pequeño tamaño multiplica las posibilidades de diseño racional por cambios en su secuencia de aminoácidos, y por tanto modulación de sus propiedades en lo referente a estabilidad proteolítica, especificidad de patógeno, potencia o toxicidad. Su tamaño también posibilita la síntesis y purificación química, o su producción biotecnológica de forma heteróloga mediante el diseño de genes sintéticos (Ingham y Moore, 2007). Estas propiedades dotan a este grupo de moléculas de un elevado interés científico.

### **2.1. Péptidos antimicrobianos naturales.**

Un grupo de péptidos antimicrobianos de importancia en la industria agroalimentaria son las **bacteriocinas** (Cotter *et al.*, 2005). Dentro de éstas se encuentra la familia de lantibióticos, cuyo representante más utilizado y estudiado es la **nisina**. Son antibióticos producidos por bacterias mediante modificación post-traducciona de un esqueleto peptídico que incluye aminoácidos no habituales. Las cepas productoras poseen genes que posibilitan estas modificaciones post-traduccionales. Estos lantibióticos tienen actividad antimicrobiana generalmente frente a procariontas, y se han convertido en un método natural para el control de bacterias patógenas o contaminantes de alimentos, al ser muchas de las cepas productoras de bacteriocinas especies usadas en productos alimentarios (como la bacteria ácido láctica *L. lactis*) (Rydlo *et al.*, 2006). La nisina fue la primera bacteriocina descrita en 1947 y ya en 1969 se aprobó su uso en alimentos, entrando unos años después en la lista de aditivos alimentarios permitidos en Europa (número E234).

Estas bacteriocinas pertenecen a la clase de AMP modificados post-traduccionalmente y comparten con otros AMP algunas propiedades en su modo de acción (ver más adelante). Sin embargo, y debido a la presencia de modificaciones post-traduccionales, su biosíntesis heteróloga es compleja, y por tanto no incluimos esta familia de antimicrobianos dentro del grupo de AMP que vamos a estudiar y describir en este trabajo. En cualquier caso, es

incuestionable que estos AMP no ribosómicos poseen también un alto potencial para el control de enfermedades vegetales (Montesinos, 2007).

Los AMP son un grupo amplio que se definen clásicamente como pequeños péptidos (de tamaño inferior a 30-40 aminoácidos), con carga neta positiva (debida a la presencia de residuos de arginina y lisina), alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos y actividad antimicrobiana (Powers y Hancock, 2003) (Tabla 2) Se pueden subdividir a su vez en diversos subgrupos en función de su origen, composición aminoacídica y estructura (Figura 5) (Epanand y Vogel, 1999; Brogden, 2005).

**Tabla 2. Secuencias de péptidos de origen natural.**

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia <sup>a</sup></b>	<b>Origen</b>
Buforina 2	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	Anfibios
Dermaseptina B1	AMWKDVLKKIGTVALHAGKAALGAVADTISQ	Anfibios
Magainina 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVALKAL	Anfibios
Indolicidina	ILPWKWPWWPWR	Animales
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPP	Animales
Protegrina 1 (1-18)	GGRLCYCRRRFVCVGR	Animales
Taciplesina	RRWCFRVCYRGCYRKCR	Animales
Tripticina	VRRFPWWPFLRR	Animales
Histatina 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY	Humanos
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	Humanos
Apidaecina	GNNRPVYIPQPRPPHPRI	Insectos
Cecropina A	KWKFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVIGSAKAI	Insectos
Cecropina B	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAI AVLGEAKAL	Insectos
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	Insectos
Ib-AMP1	QWGRRCGGWGPGRRYCVRWC	Plantas

<sup>a</sup> 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, y en negrita los de cisteína formadores de puentes disulfuro.

Un primer subgrupo, minoritario, es el compuesto por péptidos aniónicos, de pequeño tamaño y ricos en residuos de glutámico y aspártico. Un ejemplo es la **dermicidina** de humanos (presente en extractos y fluidos bronco-alveolares y células epiteliales) (Schitteck *et al.*, 2001). El segundo grupo lo forman péptidos lineares catiónicos que carecen de residuos de cisteína y poseen estructuras secundarias en  $\alpha$ -hélice. Pertenecen a este grupo la **melitina** y **cecropinas** de insectos, **magaininas** y **buforinas** de anfibios, o la **LL-37** de humanos (Tabla 2 y Figura 5) (Tossi *et al.*, 2000). El tercer grupo contiene péptidos catiónicos enriquecidos en aminoácidos específicos. Carecen también de residuos de cisteína por lo que generalmente adoptan una estructura lineal, aunque no tan definida como los anteriores. En este grupo se encuentra el péptido **indolicidina** de animales (Tabla 2 y Figura 5), el cual es un péptido catiónico enriquecido en residuos de triptofano (Chan *et al.*, 2006), o las **histatinas** (Tabla 2), enriquecidos en residuos de histidina (De Smet y Contreras, 2005). Un cuarto grupo lo forman aquellos péptidos que contienen cisteínas en su estructura primaria y que por lo tanto son capaces de formar puentes disulfuro y estructuras en lamina- $\beta$  estables. Este grupo se suele subdividir a su vez en subgrupos en función del número de puentes disulfuro que posean, uno, dos, tres, o más de tres. Pertenecen a este grupo las **defensinas** de animales, plantas e insectos (ejemplos en Figura 5) (Ganz, 2004; Lehrer, 2004; Seebah *et al.*, 2007), o el péptido **plectasina** aislado del hongo saprofito *Pseudoplectania nigrella* (Mygind *et al.*, 2005), y son la clase emparentada con las proteínas antimicrobianas vegetales que se han mencionado anteriormente (defensinas, tioninas o LTP). Por último, el quinto grupo lo constituyen AMP provenientes de fragmentos de grandes proteínas (ver más adelante).

Dentro del cuarto subgrupo anterior, hay que mencionar el aislamiento y caracterización de pequeñas proteínas ricas en cisteína y puentes disulfuro, de carácter básico y con propiedades antimicrobianas, a partir de ciertos hongos de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* (Nakaya *et al.*, 1990; Marx *et al.*, 1995; Gun *et al.*, 1999; Geisen, 2000; Hao *et al.*, 2000). En general, se han denominado **AFP** (del inglés “*antifungal protein*”) y presentan actividad frente a una gran variedad de hongos filamentosos, incluyendo fitopatógenos (Lacadena *et al.*, 1995; Vila *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2003; Kaiserer *et al.*, 2003;

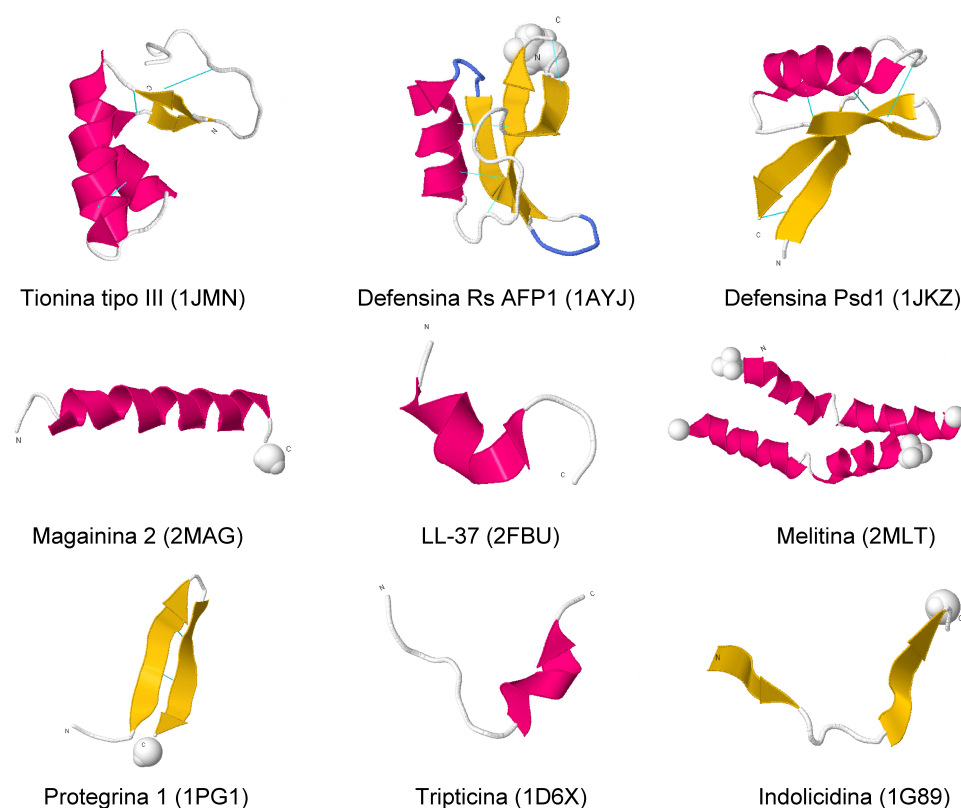


Figura 5. Estructuras secundarias representativas de péptidos y proteínas antimicrobianas de origen natural (ver referencias en el texto). Obtenidas desde la base de datos PDB y visualizadas a través del programa Jmol Viewer (<http://www.fli-leibniz.de/cgi-bin/>). En el paréntesis seguido del nombre se indica el identificador en la base de datos PDB.

Theis *et al.*, 2003). La AFP de 51 aminoácidos aislada del hongo ascomiceto *Aspergillus giganteus* es una de las más estudiadas. Su estructura ha sido resuelta mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (Campos-Olivas *et al.*, 1995), llevándose a cabo además estudios acerca de su modo de acción (Martínez del Pozo *et al.*, 2002; Theis *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2006) y su producción en plantas transgénicas resistentes (ver más adelante).

## 2.2. Diseño racional de nuevos péptidos antimicrobianos.

El desarrollo de la síntesis química de péptidos y sus análogos ha supuesto un gran avance en la caracterización e identificación de péptidos bioactivos, de forma que se pueden ensayar prácticamente a voluntad el efecto que tienen modificaciones, adiciones o deleciones concretas de determinados aminoácidos sobre la actividad de un péptido, o diseñar secuencias *de novo* y ensayar su actividad antimicrobiana pudiendo incluso dirigirla frente a microorganismos o dianas específicas de estos, como veremos más adelante.

### 2.2.1. Modificación de péptidos naturales.

Una estrategia obvia en el diseño de AMP es la modificación de péptidos naturales con el fin de potenciar sus propiedades dotándoles de mayor actividad, especificidad y espectro de acción, o por otro lado reduciendo aquellas que no son deseables como serían su toxicidad, pobre estabilidad, o limitado espectro de acción. **Cecropinas, magaininas y melitina** (Tabla 2 y Figura 5) son AMP citotóxicos que han sido bien caracterizados en cuanto a sus relaciones estructura-función (Bechinger, 2004). Sin embargo poseen como característica no deseable su toxicidad inespecífica. En numerosos trabajos se ha tratado de modular esta propiedad a través de sus análogos de secuencia o del diseño de nuevos péptidos híbridos.

Las cecropinas son una familia amplia de péptidos antibacterianos de 35-37 residuos originalmente derivados de la mariposa nocturna *Hyalophora cecropia* (Tabla 2). En esta familia se incluyen péptidos homólogos de otras especies, y constituyen componentes esenciales de la respuesta inmune de insectos, aunque también existen péptidos análogos en mamíferos (Steiner *et al.*, 1988). Se han sintetizado análogos de secuencia de la cecropina B con menor toxicidad (**SB-37** y **Shiva-1**, Tabla 3), y se demostró que poseían actividades antibacterianas frente a distintas bacterias fitopatógenas (Nordeen *et al.*, 1992; Jaynes *et al.*, 1993); sin embargo, estos análogos mantenían cierta toxicidad sobre protoplastos vegetales.

La melitina, péptido citotóxico de 26 aminoácidos aislado y principal constituyente en peso del veneno de abeja (*Apis mellifera*) (Tabla 2), tiene actividad citolítica de lisis celular y ha sido profusamente estudiado como

modelo estructural y funcional de interacción de péptidos líticos con membranas biológicas (Terwillinger y Eisenberg, 1982). También se han llevado a cabo estudios de los determinantes de su toxicidad con análogos de secuencia (Blondelle *et al.*, 1993; Oren y Shai, 1997; Asthana *et al.*, 2004). Un análogo de melitina de 15 residuos derivado de su extremo C-terminal ha mostrado propiedades antibacterianas comparables al péptido parental, con reducida actividad hemolítica (Subbalakshmi *et al.*, 1999). También, mediante el ensayo de una serie de análogos no hemolíticos de melitina con similitud de secuencia y estructura con un dominio de la proteína de cubierta del virus del mosaico del tabaco (TMV), se identificaron péptidos que inhibían la infección del virus en experimentos de co-inoculación e interaccionaban de forma anómala con el RNA viral (**Mel.subK7I**, Tabla 3) (Marcos *et al.*, 1995). Este fue un ejemplo de obtención de una nueva propiedad, en este caso antiviral, mediante la modificación de péptidos naturales.

Se han diseñado y caracterizado fusiones de AMP naturales o de determinados dominios de éstos. Un ejemplo muy documentado es el de híbridos cecropina-melitina (Tabla 3). Destacan entre ellos los péptidos quiméricos **CEMA** (Piers *et al.*, 1994) y su derivado **MsrA1** (Osusky *et al.*, 2000); el péptido **CAMEL**, en primer lugar identificado frente a aislados clínicos bacterianos (Oh *et al.*, 2000) y posteriormente testado frente a especies fitopatógenas de la bacteria *Pectobacterium* (anteriormente *Erwinia*) (Kamysz *et al.*, 2005); **Pep1** que es activo frente a distintos hongos fitopatógenos (Cavallarin *et al.*, 1998); o el híbrido **CA(1-8)M(1-18)** y distintos derivados de éste activos frente a cepas colisticina-resistentes de interés biomédico (Saugar *et al.*, 2006). Así mismo, determinados híbridos cecropina A-magainina 2 como el péptido **P18** presentan actividad antibacteriana, e incluso antitumoral, superior a los péptidos que lo forman, pero no presentan actividad hemolítica (Lee *et al.*, 2004).

Otra propiedad no deseable en AMP es la susceptibilidad a la degradación proteolítica, lo cual les confiere poca estabilidad. Las cecropinas se degradan en presencia de extractos vegetales (Mills *et al.*, 1994) o proteasas producidas por microorganismos (Bland y De Lucca, 1998). También péptidos de animales como indolicidina o LL-37 son sensibles a la degradación por proteasas bacterianas (Osapay *et al.*, 2000; Schmidtchen *et al.*, 2002).

Se han diseñado distintos análogos antimicrobianos con mayor resistencia a la degradación por proteasas vegetales. Son ejemplos de la cecropina A el péptido **Pep3** (Tabla 3) (Cavallarin *et al.*, 1998) y de la cecropina B el péptido **MB39** (Tabla 3) (Owens y Heutte, 1997). A su vez, un derivado de Pep3 es el péptido **BP76** (Tabla 3) con actividad mejorada frente a bacterias fitopatógenas y de menor actividad hemolítica y susceptibilidad frente a la degradación *in vitro* por Proteinasa K (Ferre *et al.*, 2006). Otro ejemplo es el derivado de magainina 2 **Myp30** (Tabla 3) (Li *et al.*, 2001). El derivado de indolicidina **Rev4** está formado por la misma secuencia que el péptido parental pero de manera reversa, y curiosamente demostró mayor resistencia a la degradación por proteasas de extractos vegetales y de cócteles comerciales, unido además a una elevada actividad antifúngica *in vitro* frente al hongo patógeno de tabaco *Peronospora tabacina* (Tabla 3) (Li *et al.*, 2002).

También por modificación de secuencia, se ha conseguido mejorar la potencia antimicrobiana frente a determinados fitopatógenos. El péptido derivado de la magainina 2, **MSI-99** (Tabla 3) tiene mayor carga positiva y actividad antibacteriana que su péptido parental, conservando la actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos *Alternaria solani* y *P. digitatum* y el oomiceto *P. infestans* (Alan y Earle, 2002). Otros ejemplos son determinados derivados del péptido indolicidina. Inicialmente, se diseñó el análogo **CP-11** (Falla y Hancock, 1997) con mayor número de cargas positivas, anfipaticidad, manteniendo su tamaño e incrementando su actividad antibacteriana y antifúngica, así como sus propiedades de permeabilización de membranas bacterianas. CP-11 tiene además disminuida su capacidad de hemólisis frente a eritrocitos humanos. Estos estudios sirvieron para el diseño posterior de los péptidos **10R** (derivado de indolicidina) y **11R** (derivado de CP-11) (Tabla 3), que poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana *in vitro* frente a distintos fitopatógenos (virus, bacterias y hongos) (Bhargava *et al.*, 2007b).



Tabla 3. Secuencias de péptidos antimicrobianos análogos de péptidos naturales.

Péptido (Péptido de origen) <sup>a</sup>	Secuencia (los cambios aparecen subrayados) <sup>b</sup>	Fitopatógeno
SB-37 (Cec B)	<u>MP</u> <u>KW</u> <u>KV</u> <u>F</u> <u>KKI</u> <u>E</u> <u>KV</u> <u>GRN</u> <u>I</u> <u>RNG</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>AG</u> <u>PA</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u>	Bacterias
Shiva-1 (Cec B)	<u>M</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u>	Bacterias
Mel.subK7I (Mel)	<u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>Q</u>	Virus (TMV)
CEMA(Cec A::Mel)	<u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>KKI</u> : : <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u>	Bacterias; <i>F. solani</i>
MrsA1 (Cec A::Mel)	<u>M</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>KKI</u> : : <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u>	<i>E. carotovora</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>P. cactorum</i>
CAMEL (Cec A::Mel)	<u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>KKI</u> : : <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u>	Bacterias
Pep1 (Cec A::Mel)	<u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>KKI</u> : : <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u>	Hongos; <i>P. infestans</i>
P18 (Cec A::Mag)	<u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>KKI</u> : : <u>P</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>F</u>	Bacterias; <i>F. oxysporum</i>
Pep3 (Cec A)	<u>W</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>KKI</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u>	Hongos; <i>P. infestans</i>
BP76 (Cec A)	<u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>KKI</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>L</u>	Bacterias
MB39 (Cec B)	<u>H</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>KKI</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>GRN</u> <u>I</u> <u>RNG</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>AG</u> <u>PA</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u>	Bacterias; hongos
Myp30 (Mag)	<u>M</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>P</u>	<i>E. carotovora</i> ; <i>P. tabacina</i>
MSI-99 (Mag)	<u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u>	Bacterias; hongos
Rev4 (Ind)	<u>R</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>I</u>	<i>P. tabacina</i>
10R (Ind)	<u>R</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>R</u>	<i>E. carotovora</i> ; hongos;
11R (Ind)	<u>R</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>K</u>	virus
MsrA2 (Der)	<u>M</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>I</u> S <u>Q</u>	<i>E. carotovora</i> ; hongos
MsrA3 (Tem)	<u>M</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u>	Bacterias; hongos
PV5 (Pol)	<u>M</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>R</u>	<i>E. carotovora</i> ; hongos; virus
MBG01 (Rs-AFP1)	<u>A</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>F</u>	<i>F. culmorum</i>

<sup>a</sup> Cec: cecropina; Mag: magainina 2; Mel: melitina; Ind: indolicidina; Der: dermaseptina B1; Tem: temporina A; Pol: polifemusina I.

<sup>b</sup> El código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 2.

Otra estrategia utilizada para mejorar las propiedades antimicrobianas y la estabilidad frente a la degradación de pequeños péptidos ha sido la ciclación. Inicialmente, esta aproximación se ha aplicado a péptidos ricos en arginina y triptófano. Así se ha ciclado en una unión cabeza con cola un hexapéptido, demostrándose un incremento de la especificidad antibacteriana (Dathe *et al.*, 2004). Se diseñó un análogo de indolicidina (**cycloCP-11**) en el cual la incorporación en su secuencia de dos residuos de cisteína posibilitó la creación de un puente disulfuro que resultó en un aumento de hasta 5 veces la resistencia a la degradación proteolítica, sin perder propiedades antimicrobianas (Rozek *et al.*, 2003). En otros trabajos, también se han diseñado péptidos catiónicos cíclicos con propiedades mejoradas de potencia, toxicidad y resistencia a la degradación proteolítica, dirigidos frente a bacterias fitopatógenas (Monroc *et al.*, 2006a; 2006b).

### 2.2.2. Péptidos con actividad antimicrobiana diseñados de novo.

El diseño *de novo* de péptidos se basa en el conocimiento de las propiedades biofísicas y estructurales de los AMP naturales, en su mayoría catiónicos, con presencia de residuos hidrofóbicos y estructura anfipática (ver más adelante). En uno de los primeros trabajos en los que se aplicaron estos conceptos al diseño de péptidos contra fitopatógenos se identificaron los péptidos **ESF1** y **ESF12** (Tabla 4) que mimetizan la distribución de cargas y estructura de las magaininas, pero con una secuencia de aminoácidos diferente (Powell *et al.*, 1995). Este estudio concluyó que la disminución de la carga positiva y el número de aminoácidos conlleva una disminución de la actividad antimicrobiana. Dos variantes de ESF1, los péptidos **GR7** y **SA3** (Tabla 4), con 1 ó 2 cambios de residuos respectivamente, aumentaron notablemente su anfipaticidad, carga neta positiva, plegamiento en  $\alpha$ -hélice y actividad, sin incrementar su toxicidad frente a glóbulos rojos, llevando la concentración inhibitoria *in vitro* frente a *F. oxysporum* hasta 0,1  $\mu$ M (Dykes *et al.*, 1998).

De forma similar se diseñaron los péptidos sintéticos **D4E1** (De Lucca *et al.*, 1998) y **D2A21** (Rioux *et al.*, 2000) (Tabla 4). D4E1 presenta una estructura secundaria en lamina- $\beta$ , a diferencia de la mayoría de los casos que hemos visto hasta ahora. Su actividad se comparó con la de cecropina B y un análogo de magainina 2, demostrándose que es más activo (Jacobi *et al.*, 2000).

### 2.3. Utilización de herramientas combinatoriales en la identificación de péptidos antimicrobianos.

Desde mediados de los años noventa, la química combinatorial ha creado grandes expectativas en la identificación de nuevas sustancias bioactivas ya que posibilita la síntesis y ensayo de grandes colecciones de compuestos relacionados (llamadas bibliotecas) (Blondelle y Houghten, 1996; Ganesan, 1998). Las bibliotecas combinatoriales sintéticas permiten ensayar de forma rápida una gran diversidad química de una familia de compuestos. A pesar del inconveniente de su alto coste, ya se empiezan a conocer ejemplos de su aplicación a problemas de interés agroalimentario (Khan y Vulfson, 2003; Lindell y Scherkenbeck, 2005; Miyashita *et al.*, 2007).

**Tabla 4. Secuencias de péptidos antimicrobianos sintéticos de nuevo diseño.**

Péptido	Secuencia <sup>a</sup>	Fitopatógenos
ESF1	MASRAAGLAARLARLALRAL	Bacterias; hongos
GR7	MASRAARLAARLARLALRAL	Bacterias; hongos
SA3	MAARAARLAARLARLALRAL	Bacterias; hongos
ESF12	MASRAAGLAARLARLALR	Bacterias; hongos
D4E1	FKLRAKIKVRLRAKIKL	Bacterias; hongos
D2A21	FAKKFAKKFKKFAKKFAKF	Bacterias; hongos
PAF26D	rkkwfw	Hongos
PAF34D	rkwlfw	Hongos
PPD1	frlhfh	Hongos
66-10	frlkfh	Hongos
77-3	frlkfhf	<i>Fusarium sambucinum</i>
BP100	KKLFKKILKYL	Bacterias
ACHE-I-7.1	SINWRHH	Nemátodos

<sup>a</sup> El código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 2.

### 2.3.1. Estrategias combinatoriales sintéticas. Identificación de los péptidos PAF.

Una de las clases de bibliotecas combinatorias sintéticas más utilizadas son las compuestas por péptidos. Las llamadas bibliotecas “no definidas” no presuponen ninguna restricción de secuencia y representan todas las combinaciones posibles de un n-péptido. Se han utilizado bibliotecas de hexapéptidos como compromiso entre un número de mezclas manejable y una concentración efectiva en cada una de ellas.

Mediante el llamado proceso de deconvolución se identifican los compuestos bioactivos a partir del ensayo de las mezclas de péptidos, que representan los millones de variantes distintas presentes en una biblioteca. Existen dos estrategias alternativas para ello: las llamadas “iterativa” y “posicional”. En la primera se identifican los aminoácidos más apropiados para cada posición mediante sucesivos ciclos iterativos de ensayo, selección y síntesis. Típicamente, en el caso de péptidos se inicia el experimento con 400 mezclas distintas que contienen cada una de ellas todos los péptidos definidos para cada una de las combinaciones posibles de aminoácidos naturales en sus dos primeras posiciones (20 x 20). El ensayo de las 400 mezclas permite identificar los dos residuos más apropiados para las dos primeras posiciones, generándose seguidamente 20 nuevas mezclas cada una de ellas con uno de los 20 aminoácidos definidos en la tercera posición y continuándose con sucesivos ciclos de ensayo y síntesis. Esta estrategia se siguió con éxito en la identificación de un peptapéptido (**PPD1**) y un hexapéptido (**66-10**) (Tabla 4) en un ensayo simultáneo frente a cuatro hongos fitopatógenos (Reed *et al.*, 1997). Esta estrategia es costosa porque sólo el primer grupo de 400 mezclas es “universal”, y cada nueva posición requiere la síntesis “a la carta” de nuevas mezclas (bibliotecas), que serán diferentes para cada experimento y aplicación.

La segunda estrategia de deconvolución es la “posicional”. Una biblioteca posicional se divide en tantas sub-bibliotecas como número de aminoácidos contenga la secuencia. Cada sub-biblioteca se corresponde con una posición definida y está compuesta por tantas mezclas distintas como aminoácidos diferentes se incluyan. En el caso típico de hexapéptidos y utilización de los 20 aminoácidos naturales el total de mezclas es 120 (6 x 20). Una ventaja de la estrategia posicional es la rapidez en la identificación de

compuestos, ya que con una única biblioteca universal se puede realizar la identificación completa de la secuencia. En este caso se requiere que la secuencia identificada se sintetice químicamente para confirmar su actividad, mientras que en el proceso iterativo el último paso de síntesis y ensayo ya se realizaría sobre 20 péptidos definidos.

En este tipo de aproximación es común trabajar con D-aminoácidos debido a que presentan mayor estabilidad (Blondelle y Houghten, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que este tipo de AMP cortos no presentan diferencias significativas de actividad cuando son sintetizados con los estereoisómeros D- o L- (Wade *et al.*, 1990), algo que probablemente está relacionado con su modo de acción.

En trabajos anteriores de nuestro grupo, se ha utilizado una biblioteca de hexapéptidos en formato posicional frente a *P. digitatum*, identificándose una serie de D-hexapéptidos, llamados genéricamente **PAFs**, con actividad antifúngica específica (López-García *et al.*, 2002). Una cuestión importante es que la biblioteca y los péptidos definidos se ensayaron también contra microorganismos no diana como la bacteria *E. coli* y el hongo unicelular *S. cerevisiae*, con el objetivo de identificar AMP no sólo activos, sino también específicos. El péptido **PAF26D** (Tabla 4 y Figura 6) fue seleccionado de entre toda la colección de PAF (PAF1 a PAF36) como el que mostró la combinación

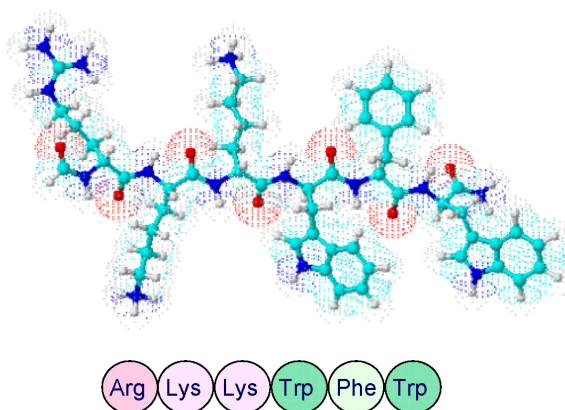


Figura 6. Representación de la estructura y secuencia del péptido sintético PAF26. Obtenida a través del programa informático ACD/3D Viewer (<http://www.acdlabs.com/>).

óptima de potencia antifúngica y especificidad en su acción frente a hongos filamentosos, en especial frente a *P. digitatum*.

Otras estrategias combinatoriales sintéticas, que además permiten conseguir péptidos mayores sin aumentar el número de mezclas, es utilizar bibliotecas “definidas” o “restringidas”, bien por secuencia de aminoácidos o por estructura. Se ha identificado el péptido **KSL** (KKVVFVKVFK) a partir de una biblioteca combinatoria de decapeptidos sintetizada con tan solo 7 aminoácidos (Hong *et al.*, 1998). También se pueden diseñar bibliotecas derivadas de un péptido líder (*lead*) con el fin de mejorar su actividad. Así, se han obtenido 18-meros antimicrobianos utilizando una biblioteca definida conformacionalmente a partir de AMP de 18 aminoácidos [LK]<sup>3,6</sup> (Blondelle *et al.*, 1996). Un ejemplo conceptualmente más sencillo es el caso de los heptapéptidos **77-3** (Tabla 4) y **77-12**, seleccionados frente al patógeno de patata *Fusarium sambucinum* a partir de una serie de hexapéptidos sintetizados por extensión del péptido 66-10, en la continuación de la estrategia iterativa descrita anteriormente (Gonzalez *et al.*, 2002). Muy recientemente, y partiendo de un péptido que ya había sido obtenido por diseño racional, se ha sintetizado una biblioteca combinatorial definida modificando las posiciones 1 y 10 del péptido BP76 (Tabla 3), obteniéndose el undecapéptido **BP100** (Tabla 4) con propiedades antimicrobianas *in vivo* mejoradas frente a la bacteria fitopatógena *Erwinia amylovora* (Badosa *et al.*, 2007). De modo similar, la aproximación combinatorial en las posiciones 1-4 de un decapeptido cíclico, proporcionó la obtención de péptidos más activos frente a esta bacteria y de menor citotoxicidad (Monroc *et al.*, 2006a).

En este sentido, y siguiendo estas aproximaciones, uno de los objetivos abordados en el presente trabajo es la posibilidad de mejora del hexapéptido PAF26 mediante extensión de su secuencia, siguiendo una estrategia iterativa de adición en su extremo N-terminal de distintos residuos de aminoácidos (ver **Objetivo 3**).

### 2.3.2. Generación de bibliotecas mediante biotecnología.

Una ventaja del trabajo con péptidos es que pueden ser producidos mediante biotecnología. Una opción teórica (aunque menos explorada) es **producir las bibliotecas *in vivo*** mediante la utilización de oligonucleótidos

degenerados, y su expresión condicional dentro de un microorganismo. Estos sistemas de producción se pueden dividir en aquellos en los cuales los péptidos (las bibliotecas) pueden ser identificados en presencia del inductor de expresión porque muestran actividad antimicrobiana en “cis” contra el propio microorganismo productor (estrategia de suicidio) (Choi *et al.*, 2002) y los que lo hacen en “trans” frente a un microorganismo diana (Raventós *et al.*, 2005).

Un refinamiento adicional son los procedimientos de evolución dirigida aplicados a la identificación de AMP, tales como el “codon-shuffling” (Rao *et al.*, 2005), que permite trabajar con genes de mayor tamaño. Estos procedimientos podrían ser usados para dirigir de forma efectiva la evolución *in vitro* de proteínas y AMP naturales hacia propiedades optimizadas.

Existen otras alternativas para la identificación de AMP mediante expresión biotecnológica de bibliotecas. La estrategia de presentación en fago (del inglés “*phage-display*”) es ampliamente conocida y usada en la selección de pequeños péptidos y proteínas con afinidad hacia otras biomoléculas (Smith y Scott, 1993). Se ha identificado con una biblioteca de péptidos producida en fagos un heptapéptido inhibidor del enzima acetilcolinesterasa de nemátodos, con el objetivo de poder alterar la normal quimiotaxis de esta clase de fitopatógenos (ver más adelante) (Winter *et al.*, 2002). Otra biblioteca en fagos ha permitido identificar péptidos con afinidad *in vitro* por las envueltas de las zoosporas del oomiceto *Phytophthora capsici* (Bishop-Hurley *et al.*, 2002). La hipótesis de partida era que dichos péptidos podrían alterar el ciclo vital del hongo. Posteriormente se demostró que la expresión transgénica de los péptidos así identificados generó plantas resistentes a la infección (Fang *et al.*, 2006).

Un aptámero es un péptido que se une a una proteína diana y la inactiva. Utilizando el sistema del doble híbrido en levadura (Bai y Elledge, 1997) y una biblioteca de péptidos al azar se han identificado aptámeros que se unen a una proteína viral esencial para la replicación del geminivirus del mosaico dorado del tomate (TGMV) (Lopez-Ochoa *et al.*, 2006). Más de una treintena de péptidos distintos fueron capaces de inhibir la replicación y acumulación del DNA viral en protoplastos de tabaco. La comparación de sus secuencias permite establecer motivos peptídicos que podrían servir como base a péptidos capaces de conferir protección de amplio espectro frente a

geminivirus. En una estrategia similar pero más definida, la colección de péptidos ensayada con el sistema del doble híbrido la constituían fragmentos al azar de una proteína de nucleocápsida del tospovirus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV), encontrándose un aptámero de 29 aminoácidos capaz de conferir resistencia a dicho virus (Rudolph *et al.*, 2003).

#### 2.4. Péptidos derivados de proteínas.

Se han identificado pequeños péptidos con propiedades antimicrobianas procedentes de las secuencias de aminoácidos o fragmentos de grandes proteínas, las cuales pueden tener o no actividad antimicrobiana. En el ejemplo que acabamos de mencionar en el apartado anterior, el péptido activo contra el TSWV es en realidad un fragmento de su proteína de cápsida (Rudolph *et al.*, 2003). Un caso notable es el de la lisozima, enzima antibacteriana muy conocida por su actividad muramidasa. Se ha demostrado que la lisozima T4 contiene en su secuencia péptidos con actividad antimicrobiana directa y desligada de la enzimática (During *et al.*, 1999).

También se han descrito péptidos bioactivos correspondientes a secuencias más cortas de proteínas naturales con actividad antimicrobiana presentes en plantas. Este es el caso del péptido **MBG01** (Tabla 3) (Schaaper *et al.*, 2001), derivado de un dominio de la defensina vegetal de *Raphanus sativus* Rs-AFP1 (Figura 5) (Terras *et al.*, 1992). De igual forma se han sintetizado y ensayado distintos fragmentos derivados de una tionina para identificar su dominio antimicrobiano (Vila-Perelló *et al.*, 2005), y en un desarrollo posterior se han sintetizado distintos péptidos lineares de 9 a 13 residuos de aminoácidos con modificaciones puntuales pero con actividad antimicrobiana equiparable a la de la proteína original (Vila-Perelló *et al.*, 2006).

Por razones obvias la obtención de AMP derivados de proteínas que se encuentran de forma habitual en la alimentación humana presenta numerosas ventajas (Pellegrini, 2003). Un ejemplo clásico es el caso de la leche, de la que se han obtenido distintos péptidos bioactivos con distintas actividades de relevancia en alimentación funcional, incluyendo antimicrobianas, a partir de proteínas tales como la lisozima,  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, caseínas o lactoferrina (Clare *et al.*, 2003; Meisel, 2005; Korhonen y Pihlanto, 2006).



Uno de los casos más relevantes es el de la proteína **lactoferrina** (LF), que debe su nombre a su presencia en la leche de mamíferos y capacidad para quelar hierro (Figura 7). Es una proteína de funciones diversas relacionadas fundamentalmente con el aporte de hierro y defensas al recién nacido, habiendo sido extensamente caracterizada por sus propiedades antibacterianas (Farnaud y Evans, 2003). El péptido **lactoferricina** (Lfcin) se origina a partir de la LF mediante digestión con pepsina (Figura 7) (Tomita *et al.*, 1991; Bellamy *et al.*, 1992b). En el caso de la proteína de vaca, la estructura primaria de la lactoferricina bovina (LfcinB) se corresponde con los residuos 17-41 de la proteína nativa y presenta mayor actividad antibacteriana que la propia LF bovina. Se han demostrado distintas propiedades muy interesantes de la Lfcin y sus distintos péptidos derivados, con actividad antibacteriana (Bellamy *et al.*, 1992a; Gifford *et al.*, 2005), antifúngica (Ueta *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2002), propiedades antitumorales (Eliassen *et al.*, 2002; 2003), antivirales (Andersen *et al.*, 2004) e incluso actividad antihipertensiva (Centeno *et al.*, 2006).

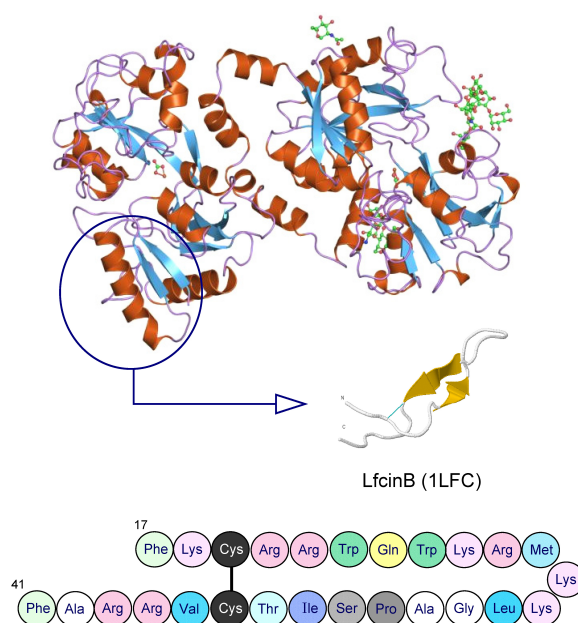


Figura 7. Estructura tridimensional de la Lactoferrina Bovina y de su péptido derivado lactoferricina (LfcinB). Se señala la localización del extremo N-terminal, del cual se obtiene el péptido LfcinB tras la digestión con pepsina. En la parte inferior se detalla la secuencia de aminoácidos del péptido.

El interés por la LF, y sus péptidos derivados, se basa en que está considerada como “segura” para distintas aplicaciones biotecnológicas (Tomita *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 2006), y ya hay ejemplos de proteínas o péptidos recombinantes de origen bovino (LfcinB) o humano (LfcinH) producidas en hongos, plantas o animales con finalidad protectora, terapéutica o nutricional (Ward *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998b; Chong y Langridge, 2000; Lee *et al.*, 2002; Nandi *et al.*, 2002; van Berkel *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Weinberg, 2007). Muy recientemente, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha aprobado un ensayo de campo confinado de una variedad de arroz modificado genéticamente que produce la LF humana (<http://www.usda.gov/>). Además, existen empresas que están en fase avanzada de desarrollo de derivados de Lfcin incluso para usos médicos (Hancock y Sahl, 2006; Weinberg, 2007).

Aunque las propiedades antibacterianas de péptidos derivados de LfcinB son ampliamente conocidas, en el momento de iniciar este trabajo los datos sobre sus propiedades antifúngicas eran muy escasos y fundamentalmente relacionados con levaduras y hongos de interés en medicina. Uno de los objetivos de este trabajo de investigación ha sido la evaluación de la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de LfcinB contra hongos fitopatógenos (ver **Objetivo 1**).

## **2.5. Nuevas estrategias de identificación de péptidos.**

Aunque todavía no se han aplicado en el campo de la fitopatología, existen estrategias adicionales de identificación de AMP como son el desarrollo de sistemas *in silico*, capaces de evaluar virtualmente bibliotecas de compuestos o predecir la actividad de compuestos individuales de nuevo diseño, limitando así la cantidad de bioensayos a realizar (Raventós *et al.*, 2005; Soltani *et al.*, 2007). En la misma línea, se ha propuesto el diseño de AMP no naturales a través de modelos computacionales que integrarían las “reglas gramaticales” de todas las secuencias de AMP existentes, de forma que los nuevos péptidos diseñados podrían tener varios grados de homología con AMP naturales (Loose *et al.*, 2006). Ambas estrategias, son herramientas bioinformáticas que en el caso de AMP integran bases de datos con información sobre relaciones estructura-actividad, o sobre el modo de acción antimicrobiano.

También se han desarrollado sistemas de escrutinio de péptidos mediante el ensayo frente a cepas bacterianas transformadas con el gen de la luciferasa, cuantificándose la actividad antimicrobiana del péptido en función de la disminución de la luz emitida por el microorganismo (Hilpert *et al.*, 2005; 2006).

### 3. MODO DE ACCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.

El conocimiento detallado del modo de acción es necesario para abordar la aplicación de los péptidos antimicrobianos en protección vegetal. Además, es esperable que dicho conocimiento contribuirá a dirigir el diseño de nuevas generaciones de AMP así como a mejorar su utilidad. De especial relevancia es el estudio de los mecanismos que confieren especificidad para actuar sobre determinados microorganismos, evitando la toxicidad inespecífica frente a células animales y vegetales. Existen numerosas revisiones que abordan estas cuestiones en el caso de péptidos activos de interés en biomedicina (Zasloff, 2002; Brogden, 2005), siendo muchas de sus generalizaciones aplicables también en el campo de la fitopatología.

Dentro de este trabajo, hemos seleccionado el péptido PAF26 como un modelo para estudiar en detalle su modo de acción frente al hongo *P. digitatum* (ver **Objetivo 2**), desde distintas aproximaciones experimentales relacionadas con los datos conocidos de otros AMP y que a continuación se resumen.

#### 3.1. Propiedades biofísicas de péptidos antimicrobianos.

Algunas de las propiedades estructurales que afectan a la actividad y especificidad de AMP son: (i) su **secuencia de aminoácidos**, a menudo contienen residuos catiónicos (lisina y arginina) e hidrofóbicos (triptófano y fenilalanina) junto con otros también representativos como leucina, isoleucina, valina o tirosina (ver Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4); (ii) su **carga neta**, un gran número de AMP tienen carga positiva a pH fisiológico, (iii) su **anfipaticidad**, su composición aminoacídica les confiere predisposición para adoptar estructuras anfipáticas, muchas veces inducidas bajo determinadas condiciones, que facilitan su interacción con bicapas lipídicas, y (iv) **estructura** y

**conformación**, pudiendo asumir una gran variedad de estructuras secundarias distintas incluyendo  $\alpha$ -hélices, láminas- $\beta$ , o estructuras no convencionales (sobre todo para péptidos de pequeño tamaño) (ver ejemplos en Figura 5).

El modo de acción de AMP ha sido ampliamente estudiado mediante técnicas biofísicas desde la perspectiva de estas propiedades, y dentro de ellas desde la relación existente entre la estructura de los péptidos y su actividad antimicrobiana e interacción efectiva con membranas modelo y bicapas lipídicas artificiales, que en algunos casos emulan a las de los microorganismos diana [amplias revisiones en (Erand y Vogel, 1999; Powers y Hancock, 2003; Lohner y Blondelle, 2005)]. Así, se ha demostrado la capacidad de inserción en membranas modelo de diferentes AMP; algunos ejemplos de relevancia en este trabajo son determinadas LTP (Regente *et al.*, 2005), péptidos derivados de LfcinB (Schibli *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2005), o el trabajo de nuestro grupo con el péptido sintético PAF26 y determinadas variantes del mismo (López-García *et al.*, 2004) (ver en Discusión).

Existen varios **modelos topológicos** propuestos para la interacción e inserción de los AMP en las membranas biológicas [excelentes presentaciones en (Brogden, 2005; Bechinger y Lohner, 2006)] (Figura 8). A bajas concentraciones de péptido las moléculas de péptido interaccionarían con las membranas biológicas, colocándose en sus proximidades, en principio en una conformación “paralela”. Al aumentar la relación péptido:lípido por encima de un valor umbral (Huang, 2000), las moléculas de péptido se orientarían “perpendicularmente” a las membranas, pudiendo difundir y llegar a insertarse en las mismas. Cuando dicha relación se aumenta todavía más las propiedades de los AMP les permiten actuar como detergentes, atravesando la bicapa y finalmente formando canales o poros. Estos poros desintegran la membrana pudiendo seguir en su formación varias tipologías distintas: son los llamados modelo en barril, alfombra, y toroidal (Figura 8).

El modo concreto de interacción y la inserción en la membrana dependerían fuertemente del tamaño del péptido, y se considera que son necesarios un mínimo de entre 8-12 ó 18-20 residuos para que un monómero de AMP con estructura extendida o en  $\alpha$ -hélice, respectivamente, pueda atravesar la bicapa lipídica de lado a lado (Powell *et al.*, 2000b).

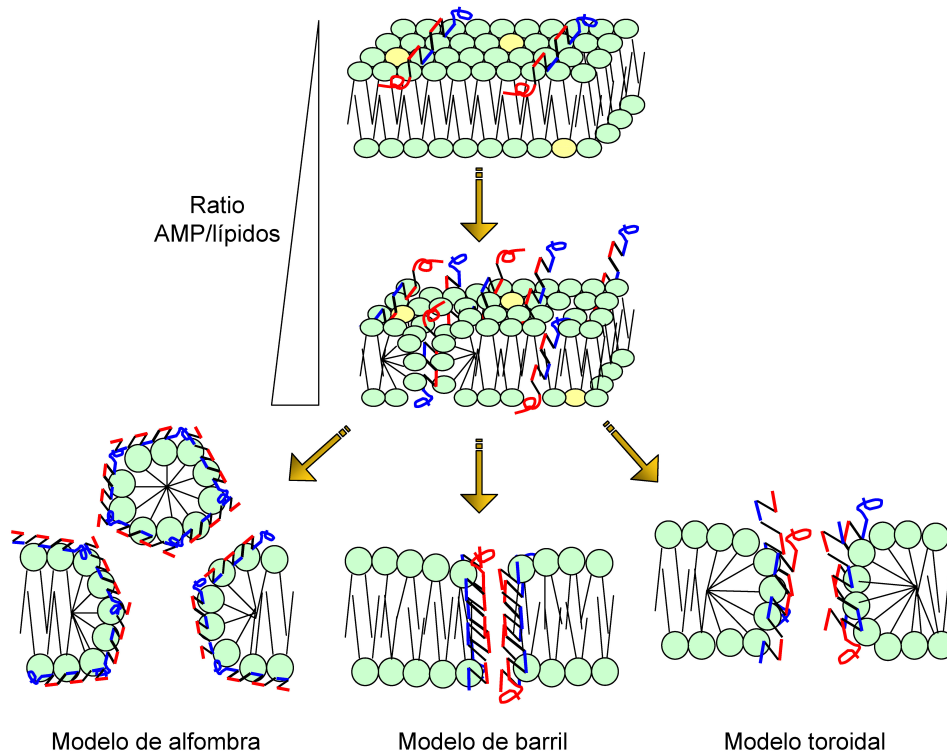


Figura 8. Representación esquemática de los modelos topológicos propuestos para la permeabilización de membranas producida por AMP. Las regiones hidrofílicas del péptido aparecen en rojo mientras las hidrofóbicas en azul. El aumento de la relación AMP/lípido de membrana da lugar a la desestabilización y permeabilización de las membranas siguiendo tres modelos distintos. En el modelo de alfombra los péptidos se sitúan paralelos a la superficie de las membranas actuando como un detergente, rodeándolas y desestabilizándolas a través de la formación de micelas. En el modelo de barril los péptidos se agregan a la bicapa lipídica uniéndose a través de su región hidrofóbica, mientras la hidrofílica queda formando el interior de un poro de varios nanómetros de diámetro. En el modelo toroidal las regiones hidrofóbicas de los péptidos se unen a las cabezas polares de los lípidos de las membranas generando monocapas que las desestabilizan y dejan poros en su estructura [esquemas adaptados de (Brogden, 2005)].

Este tipo de estudios y modelos han sido extraordinariamente útiles, y sus conclusiones han permitido el diseño de nuevos péptidos con propiedades mejoradas, incluso para su aplicación en fitopatología (Powell *et al.*, 1995; De Lucca *et al.*, 1998; Rioux *et al.*, 2000). Pero también es cierto que estas

aproximaciones se han heredado del hecho de que los primeros AMP descritos interactúan y desestabilizan membranas celulares con facilidad (ejemplos muy claros son la melitina y las magaininas), y por ello también han “viciado” los desarrollos dentro de este campo, ya que durante cierto tiempo los han dirigido en una única dirección. Por ejemplo, estos modelos obvian el hecho de que la primera línea de interacción entre un péptido y un microorganismo no es la bicapa lipídica de una membrana biológica, sino las envueltas y estructuras exteriores a ella (Figura 3), y que varían de un tipo de microorganismo a otro.

### 3.2. Interacción con microorganismos.

El primer paso en la acción antimicrobiana es la aproximación e interacción física del péptido con las cubiertas celulares del microorganismo. De forma generalista, se asume que la interacción de AMP de pequeño tamaño con microorganismos no es estereoespecífica, ya que se ha demostrado que péptidos con la misma secuencia de aminoácidos sintetizados con los estereoisómeros D- ó L- no presentan diferencias sustanciales de actividad (Wade *et al.*, 1990; López-García *et al.*, 2000).

La naturaleza catiónica de muchos AMP conlleva una **atracción electrostática** por las envueltas celulares cargadas negativamente, como en el caso del lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, o de las glicoproteínas y glicoesfingolípidos de las paredes fúngicas. De hecho, esta es una razón plausible para la especificidad frente a microorganismos y ausencia de toxicidad frente a células de animales y plantas (Epanand y Vogel, 1999; Zasloff, 2002). La interacción con el LPS se ha demostrado en algunos casos. Mutantes de la bacteria fitopatogena *Ralstonia solanacearum* con la sensibilidad alterada a tioninas y LTP presentan alteraciones en un gen de biosíntesis de LPS (Titarenko *et al.*, 1997). El péptido CEMA (Tabla 3) une el LPS, y esa capacidad de unión se correlaciona con la actividad diferencial de un péptido análogo (Piers *et al.*, 1994).

Como ocurre con determinadas proteínas antimicrobianas de plantas (Broekaert *et al.*, 1997; García-Olmedo *et al.*, 1998) y con AMP de mamíferos (Dorschner *et al.*, 2006), la actividad de AMP catiónicos sintéticos disminuye en general con el aumento de la fuerza iónica del medio (López-García *et al.*,

2000), lo que se interpreta como un apantallamiento de la interacción electrostática.

Pero también existen ejemplos significativos de AMP cuya interacción no depende primariamente de la atracción electrostática. Un ejemplo muy característico de interacción con componentes específicos de membranas bacterianas es el de la **nisina**. Comparte con muchos otros AMP la capacidad de formar poros en las membranas. Pero dicha capacidad esconde un mecanismo más sutil: Su interacción primaria se produce con el **precursor del Lípido II**, un componente fundamental del peptidoglicano (PEG) de las membranas bacterianas, facilitando entonces su actividad “basal” formadora de poros hasta en tres ordenes de magnitud (Breukink *et al.*, 1999). Posteriormente, esta interacción molecular fue resuelta al detalle mediante técnicas de RMN (Hsu *et al.*, 2004). En otros casos se ha demostrado que determinadas bacterias patógenas que normalmente están expuestas a la acción de AMP, tienen receptores de membrana implicados en el reconocimiento de péptidos catiónicos (Llama-Palacios *et al.*, 2005; Bader *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007b).

También se ha demostrado que una  $\alpha$ -tionina de vegetales tiene afinidad en su unión por el  **$\beta$ -glucano** de las paredes fúngicas (Oita *et al.*, 2000). El péptido D4E1 (Tabla 4) interacciona preferentemente con **ergosterol**, un esteroles característico de membranas fúngicas (De Lucca *et al.*, 1998). Mutantes de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Aspergillus oryzae* en la biosíntesis de **quitina**, han mostrado menor sensibilidad a la proteína antifúngica AFP de *Aspergillus giganteus* y a su efecto de permeabilización de membranas (Hagen *et al.*, 2007).

La utilización de microorganismos modelo está permitiendo identificar factores celulares que determinan la sensibilidad a determinadas proteínas antimicrobianas de plantas. Se ha utilizado *S. cerevisiae* para demostrar que la interacción de la proteína PR-5 (osmotina) con la levadura está influenciada por determinadas **glicoproteínas** de pared (Yun *et al.*, 1997; Ibeas *et al.*, 2000; Salzman *et al.*, 2004) y se ha encontrado un receptor específico de membrana plasmática que activa respuestas de apoptosis (Narasimhan *et al.*, 2005). También, la sensibilidad de *S. cerevisiae* a distintas defensinas vegetales está mediada por la interacción con diferentes **glicolípidos** específicos de

membranas fúngicas (Thevissen *et al.*, 2003; 2004; 2005; Aerts *et al.*, 2006). Por otra parte, empiezan también a desarrollarse estudios del modo de acción de AMP con hongos filamentosos modelo, como es el caso de *Neurospora crassa*, en el cual se ha visto que mutantes resistentes a defensinas vegetales tienen alterado su perfil de glicolípidos de membrana (Park *et al.*, 2005).

### **3.3. Efectos sobre microorganismos.**

Una vez se ha producido la interacción del AMP con el microorganismo, se pueden producir una serie de efectos y cambios dinámicos que afectan a su morfología e integridad, y en última instancia a su viabilidad. Los dos más ampliamente documentados en distintos AMP son la permeabilización celular y las alteraciones de la morfología y desarrollo del microorganismo.

#### *3.3.1. Permeabilización celular.*

La capacidad de determinados péptidos para permeabilizar vesículas artificiales membranosas se puede medir mediante la liberación al medio de sondas fluorescentes encapsuladas, como por ejemplo dextranos marcados con fluoróforos. Se ha demostrado para un número muy amplio de AMP que su capacidad de inserción y desestabilización de bicapas lipídicas se correlaciona directamente con un efecto de permeabilización *in vitro* de vesículas artificiales. Algunos ejemplos son los péptidos melitina, cecropina A, magainina 2, o defensinas animales (Matsuzaki *et al.*, 1997; Hristova *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001), incluyendo proteínas antimicrobianas de plantas (Regente *et al.*, 2005), así como péptidos que vamos a estudiar dentro de este trabajo como son la indolicidina o derivados de la LfcinB (Zhao *et al.*, 2001; Schibli *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2005).

La utilización de **sondas fluorescentes** también ha permitido visualizar y cuantificar la permeabilización celular y comprobar que la acción de AMP produce la permeabilización de los microorganismos susceptibles. Los ensayos se basan en la incubación del microorganismo con el péptido y la sonda. Esta sonda puede penetrar al interior de células con sus membranas alteradas y una vez allí emitir fluorescencia por sus propiedades biofísicas. El



incremento de la fluorescencia y su visualización por microscopía se interpretan entonces como un aumento de la permeabilización celular debida a la exposición al péptido. Resultados de este tipo se han obtenido con defensinas (Thevissen *et al.*, 1999) y LTP vegetales (Regente *et al.*, 2005), con la proteína AFP de hongos (Moreno *et al.*, 2003; Theis *et al.*, 2003), péptidos de anfibios (Mangoni *et al.*, 2004), o con AMP sintéticos (Reed *et al.*, 1997; Rioux *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2002; Oard *et al.*, 2004).

En estudios previos no publicados de nuestro grupo se confirmó que la exposición de *P. digitatum* a altas concentraciones de PAF26 produce una permeabilización generalizada del micelio (López-García, 2002). El presente trabajo pretende, dentro del estudio del modo de acción de PAF26, re-explorar y analizar con mayor detalle este efecto (ver **Objetivo 2**).

### 3.3.2. Alteraciones morfológicas.

Los estudios de microscopía han permitido describir distintas alteraciones morfológicas y de crecimiento del micelio en hongos fitopatógenos sometidos a la acción de proteínas y péptidos antimicrobianos (ver en Discusión) (Kristyenne *et al.*, 1997; Cavallarin *et al.*, 1998; Ali y Reddy, 2000; Rajasekaran *et al.*, 2001; Kaiserer *et al.*, 2003; Theis *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2006). Así, se observó a concentraciones de péptido que ejercen un efecto fungiestático en los hongos sensibles, alteraciones severas en sus paredes y membranas celulares, engrosamientos o adelgazamientos de hifas dependiendo del caso, alteraciones en los patrones de ramificación y de esporulación, así como la distorsión y retraimiento de la membrana plasmática de las células.

Al igual que en hongos filamentosos, se ha estudiado la morfología de células de bacterias y levaduras unicelulares en presencia de AMP, y se han visualizado distintas alteraciones morfológicas en las membranas externa e interna de la bacteria *E. coli* sometida a la exposición a distintos péptidos (Mangoni *et al.*, 2004; Meincken *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007a). En la mayoría de estos trabajos es difícil establecer una comparación entre los resultados de distintos laboratorios. Pero en un caso particular, se observaron distintas alteraciones producidas sobre *Pseudomonas aeruginosa* por dos péptidos distintos pero de secuencia relacionada (Kalfa *et al.*, 2001), lo que sugiere la existencia de distintas dianas o mecanismos de acción.

No obstante, está todavía por comprobar si las diferentes alteraciones descritas se deben a distintas condiciones experimentales o microorganismos ensayados o, por otra parte, a diferencias en el modo de acción de los péptidos, y en cualquier caso su relación con las propiedades antimicrobianas.

### 3.4. Modos de acción intracelular.

Es obvio que la capacidad de muchos AMP para formar poros transmembrana está asociada a un efecto de lisis (muerte) celular. Por lo general, y hasta muy recientemente, se ha asumido que el modo de acción primario de pequeños péptidos antimicrobianos es la permeabilización celular. Sin embargo, estudios recientes sugieren que esta generalización puede ser errónea y que estos efectos no son los únicos mecanismos de muerte celular inducida por AMP [revisado en (Brogden, 2005)], tal y como vamos a discutir en nuestro estudio. Incluso en algún ejemplo se ha demostrado que determinados AMP matan a los microorganismos (bacterianos) sin producir permeabilización celular (Casteels y Tempst, 1994; Steffen *et al.*, 2006).

Los péptidos catiónicos ricos en arginina y residuos aromáticos (triptófano) tienen propensión a atravesar membranas biológicas y localizarse en el interior celular, comportándose como **péptidos tipo penetratinas** o **CPP** (del inglés '*cell-penetrating peptides*') (Futaki *et al.*, 2003; Joliot y Prochiantz, 2004; Henriques *et al.*, 2006). Los CPP tienen la capacidad de atravesar las membranas de una forma no destructiva venciendo la naturaleza impermeable de la membrana celular. Muchos de estos péptidos fueron inicialmente descritos en proteínas homeóticas de desarrollo y señalización intercelular y en proteínas virales. Se ha propuesto incluso la utilización de estos péptidos como lanzaderas de proteínas bioactivas (Schwarze *et al.*, 1999; Prochiantz, 2007).

Esta propiedad de traslocación se ha demostrado en el caso de algunos AMP o proteínas antimicrobianas (Park *et al.*, 1998; Haukland *et al.*, 2001; Powers *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2006; Chadha y Das, 2006). Una vez en el interior celular se ha demostrado que determinados AMP pueden ejercer su acción antimicrobiana mediante mecanismos intracelulares específicos, como son la unión a ácidos nucleicos, o la inhibición de la biosíntesis de proteínas, pared celular o ácidos nucleicos (ver Discusión) [revisado en (Brogden, 2005)]. Estos AMP pueden llegar a tener propiedades pleiotrópicas que trascienden su

actividad antimicrobiana, como son capacidades antitumorales o inmunomoduladoras lo cual podría estar también relacionado con un modo de acción intracelular (Mader *et al.*, 2005; Gifford *et al.*, 2005; Kristian *et al.*, 2007).

Ejemplos relevantes en protección vegetal son la proteína de tabaco PR-5 (Narasimhan *et al.*, 2001) y la proteína antifúngica aislada de *Penicillium chrysogenum* (Leiter *et al.*, 2005), para las que se ha demostrado que alteran rutas de señalización intracelular en *S. cerevisiae* y *A. nidulans*, respectivamente, e inducen la apoptosis de sus células. La defensina Psd1 de guisante (*Pisum sativum*) (Figura 5), posee actividad antifúngica *in vitro* frente a distintos hongos fitopatógenos. Se ha demostrado su interacción con una proteína relacionada con el ciclo celular en el hongo *Neurospora crassa*, detectándose su localización en los núcleos de las células (Lobo *et al.*, 2007).

### 3.5. Escrutinios dirigidos de actividad antimicrobiana contra dianas específicas.

La industria farmacéutica ha mostrado interés en el escrutinio de nuevos compuestos antibióticos dirigido frente actividades biológicas y/o enzimáticas determinadas, pudiendo así identificar compuestos con un modo de acción concreto y que presentarán mejoras en cuanto a su especificidad. En el campo de la fitopatología estos ejemplos son todavía escasos.

El heptapéptido **ACHE-I-7.1** (Tabla 4) fue identificado en un ensayo de inhibición del enzima acetilcolinesterasa con el objetivo de poder alterar la quimiotaxis de nemátodos fitopatógenos, de modo similar a nematicidas comerciales inhibidores de este mismo enzima (Winter *et al.*, 2002). El péptido demostró actividad para el caso de *Heterodera glycines* y *Globodera pallida*.

Un segundo ejemplo relevante en nuestro estudio, fue el uso de una biblioteca combinatorial de octapéptidos a través de un doble escrutinio de inhibición del crecimiento de levaduras (*S. cerevisiae* y *C. albicans*) y de la actividad de la ATPasa de membrana Pma1p de levadura (Monk *et al.*, 2005). Se identificaron el octapéptido (**BM0**) (Tabla 4) y el decapéptido (**BM2**: D-NH<sub>2</sub>-rrrfwwfrrr-Am) con actividad antifúngica de amplio espectro, que se unen a la superficie de hongos unicelulares e inhiben la actividad fisiológica de Pma1p a concentraciones micromolares.

### 3.6. Mecanismos de respuesta frente a péptidos antimicrobianos.

Se ha propuesto que la gran diversidad existente de AMP naturales es el resultado de la co-evolución de éstos y de los mecanismos de resistencia de los microorganismos frente a ellos, de manera que se ha establecido un balance entre las estrategias de invasión-inhibición-adaptación dentro de la interacción entre el huésped y el patógeno, del que ha surgido a lo largo de los años el amplio repertorio actual de AMP (Peschel y Sahl, 2006).

Existen distintos modelos propuestos sobre los mecanismos que poseen los microorganismos para contrarrestar la acción de los AMP [revisado en (Yeaman y Yount, 2003; Peschel y Sahl, 2006)]. Se pueden resumir de forma general en cuatro tipos de respuestas que incluso algunos autores interpretan de modo secuencial: (i) la liberación de **proteasas** extracelulares que degradarían las proteínas y péptidos antimicrobianos; (ii) la secreción de **proteínas secuestradoras**; (iii) cambios estructurales o de expresión de **proteínas transmembrana** transportadoras; y (iv) la alteración de la **carga neta** de las superficies exteriores. Algunos ejemplos de estas respuestas se describen a continuación.

Se ha demostrado la degradación de cecropina A por proteasas extracelulares que ocurre con determinados hongos fitopatógenos (De Lucca *et al.*, 1997; Bland y De Lucca, 1998). Por otra parte, en procariontes y eucariontes existen proteínas transportadoras de membrana (por ejemplo las proteínas ABC, de “*ATP-Binding Cassette*”) con funciones de detoxificación por extrusión de compuestos tóxicos para la célula. Algunos de los correspondientes genes bacterianos están relacionados con una mayor o menor susceptibilidad a AMP y codifican proteínas ABC (Parra-López *et al.*, 1993), y además en el caso de determinados patógenos vegetales se ha demostrado que están relacionados con su virulencia (López-Solanilla *et al.*, 1998). Ya hemos mencionado cómo las modificaciones de la carga neta de las envueltas bacterianas pueden afectar a la sensibilidad a péptidos antimicrobianos tanto en el caso del LPS de bacterias gram negativas (Titarenko *et al.*, 1997), como del PEG de gram positivas (Peschel *et al.*, 1999).

En cualquier caso, las respuestas que hemos descrito son modelos simplistas, ya que la reacción de microorganismos a la exposición a péptidos

antimicrobianos puede ser más compleja e implicar procesos que *a priori* podrían no estar relacionados (Dorschner *et al.*, 2006; Nogales *et al.*, 2006). No sólo esto, se ha sugerido la posibilidad de que la respuesta del microorganismo sea específica del péptido, lo cual puede tener importantes implicaciones en el estudio de las interacciones planta-patógeno (Nogales *et al.*, 2006).

#### **4. UTILIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN PROTECCIÓN VEGETAL.**

Hasta hace poco tiempo, la gran mayoría de trabajos de identificación y selección de AMP en fitopatología se habían basado en la actividad *in vitro* en medios de cultivo. Sin embargo, es obvio que la interacción entre el péptido y el patógeno en el microambiente vegetal puede estar modulada por factores complejos que se deben considerar a la hora de evaluar su utilidad. Por este motivo, son de relevancia los trabajos que caracterizan y evalúan la actividad protectora de AMP frente a enfermedades vegetales mediante estudios *in vivo*, demostrándose así la capacidad del péptido de controlar al patógeno antes, o durante, el proceso de infección.

Se han propuesto distintas estrategias de utilización de AMP, desde su uso como aditivos fitosanitarios directamente en campo durante el cultivo o sobre fases posteriores de su comercialización, hasta la modificación genética de cultivos mediante la expresión de genes que codifiquen péptidos y proteínas antimicrobianas.

##### **4.1. Control de fitopatologías mediante adición de péptidos.**

Se han realizado ensayos de **co-inoculación** del patógeno y el AMP sobre un tejido vegetal susceptible como un método en algunos casos de escrutinio *in vivo* para la selección de péptidos activos. Los más utilizados han sido hojas o discos de hojas (en plantas de patata y tomate) (Ali y Reddy, 2000; Alan y Earle, 2002), flores (de manzano y peral) (Badosa *et al.*, 2007), frutos (cítricos, tomate y fresa) (López-García *et al.*, 2000; 2002; 2003; Liu *et al.*, 2007) o tubérculos de patata (López-Solanilla *et al.*, 1998; Ali y Reddy, 2000; Kamysz *et al.*, 2005). En general, se ha demostrado una disminución en la progresión de

la enfermedad que se correlaciona con los resultados *in vitro*. También, estas metodologías han servido para evaluar la fitotoxicidad de algunos AMP. Aunque hay que aclarar que el efecto protector de estos ensayos es limitado, probablemente debido a que si el patógeno puede llegar a escapar del punto de inoculación, colonizando áreas libres de péptido, escapa también de la presión antimicrobiana. Este inconveniente de este tipo de bioensayos está agravado por el alto coste de los péptidos sintéticos, que impiden tratamientos de la planta (o fruto) entera.

#### **4.2. Aplicación en el control de podredumbres postcosecha de frutos.**

En la actualidad, existen todavía pocos trabajos de aplicación de AMP en el control de podredumbres de frutos en postcosecha. El alto coste de los péptidos y la dificultad de su expresión transgénica en frutos, limitan de momento su estudio a los ejemplos de co-inoculación de los AMP con el patógeno sobre heridas discretas de la superficie del fruto y su mantenimiento en condiciones similares a las de postcosecha.

Hay que destacar también que el uso de AMP en postcosecha ofrece una ventaja adicional sobre otros tipos de patosistemas vegetales, ya que es factible su aplicación de la misma forma que cualquier otro **aditivo postcosecha**. El problema entonces estriba en su producción, aspecto éste que analizaremos en la Discusión de este texto.

Nuestro grupo propuso la utilización de AMP como alternativa en el control de podredumbres postcosecha (López-García *et al.*, 2000). Los estudios se llevaron a cabo con frutos de tomate y cítricos mediante co-inoculación de *Penicillium* o *Botrytis* con distintos péptidos PAF (López-García *et al.*, 2000; 2002; 2003). En un experimento diseñado para comparar el efecto del péptido antimicrobiano **PAF26D** y los fungicidas comerciales TBZ e IMZ en condiciones de inoculación controlada, se demostró que el efecto protector del péptido fue comparable al alcanzado con los fungicidas (López-García *et al.*, 2003). Es importante destacar que cepas de hongos resistentes a fungicidas comerciales son sensibles a péptidos antimicrobianos; e incluso que su actividad *in vitro* e *in vivo* es similar frente a cepas resistentes y sensibles a fungicidas (Gonzalez *et al.*, 2002; López-García *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha utilizado el péptido **CgPep33** procedente de hidrolizados enzimáticos de ostras, para controlar la infección postcosecha producida por *B. cinerea* en frutos de fresa. La co-inoculación del patógeno con el péptido proporcionó una reducción significativa de la incidencia de la enfermedad y del diámetro de las lesiones en los frutos (Liu *et al.*, 2007).

Uno de los objetivos de este trabajo, ha sido la evaluación de la capacidad de distintos AMP para controlar la incidencia de las infecciones postcosecha de frutos cítricos causadas por *P. digitatum*, mediante bioensayos sobre los frutos (ver **Objetivo 4**).

### **4.3. Producción y utilización mediante expresión transgénica.**

La biotecnología aplicada a la protección de plantas frente a enfermedades representa una atractiva alternativa para la agricultura, complementando así las técnicas más clásicas de mejora genética dirigidas a la obtención de cultivos resistentes. A mediados de los años ochenta del siglo pasado se publicaron los primeros resultados de obtención de plantas con protección frente a patógenos vegetales, en ese caso fueron virus, mediante transformación genética (Abel *et al.*, 1986; Fitchen y Beachy, 1993). Otro ejemplo de gran trascendencia fue el control de plagas de insectos basado en la expresión de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Barton *et al.*, 1987; Estruch *et al.*, 1997). En ambos casos, ya existen aplicaciones comerciales basadas en estos descubrimientos iniciales. Desde entonces, y quizás con la única excepción del continente europeo, la **biotecnología vegetal** se está utilizando de modo creciente con el fin de desarrollar cultivos protegidos frente a las enfermedades y plagas causadas por hongos, virus, bacterias e insectos, y aumentar así la productividad.

El desarrollo de plantas transgénicas que expresen proteínas y péptidos antimicrobianos puede ser de gran utilidad en el contexto del control de enfermedades vegetales, sobre todo en aquellos casos en los que éstas no son eficientemente controladas por los métodos tradicionales.

#### 4.3.1. *Proteínas antimicrobianas.*

La expresión de los propios genes de defensa de las plantas que codifican proteínas con actividad antimicrobiana directa frente a patógenos ha sido una estrategia muy utilizada y que ha dado lugar a resultados experimentales efectivos. Un grupo importante con numerosos ejemplos son las proteínas de defensa PR. Ya en el año 1991, se produjeron plantas de tabaco resistentes a *R. solani* que expresaban una quitinasa (**PR3**) de guisante (Broglie *et al.*, 1991). También, un poco más tarde, fue la expresión de la proteína **PR-1a** la que confirió resistencia frente a *P. tabacina* (Alexander *et al.*, 1993). Por otro lado, se han expresado, aisladas de cebada, una tionina en plantas de tabaco (resistentes frente a bacterias fitopatógenas) (Carmona *et al.*, 1993) y la proteína **LTP2** en *Arabidopsis* (que protegió a la planta frente a la infección por *P. syringae*) (Molina y García-Olmedo, 1997). La defensina de alfalfa **AlfAFP** fue expresada en patata (otorgándole resistencia a los patógenos *Verticillium dahliae*, *A. solani* y *F. culmorum*) (Gao *et al.*, 2000) y la defensina de la planta *Dahlia merckii* **Dm-AMP1** en berenjena (mostrando resistencia frente a los hongos *B. cinerea* y *Verticillium albo-atrum*) (Turrini *et al.*, 2004) y en plantas de papaya (resistentes a *Phytophthora palmivora*) (Zhu *et al.*, 2007). Distintas proteínas tipo **heveína** también han sido expresadas con éxito (Koo *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003b).

Con el mismo fin, se ha estudiado la transferencia de genes antimicrobianos de diferentes orígenes distintos de plantas (bacterias, hongos, insectos, anfibios o mamíferos). La transformación con los genes que codifican enzimas líticos de hongos micoparásitos y antagonistas como *T. harzanium* son efectivas frente a fitopatógenos (Lorito *et al.*, 1998; Dana *et al.*, 2006). **Quitinasas** de este hongo han sido expresadas en plantas transgénicas de manzano incrementando su resistencia a la infección por el hongo *Venturia inaequalis* (Bolar *et al.*, 2001). También la proteína antifúngica de hongos **AFP** ha sido expresada en plantas de trigo confiriéndoles resistencia frente a *Erysiphe graminis* (Oldach *et al.*, 2001), en plantas de arroz frente a *M. grisea* (Coca *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005), o en plantas de mijo haciéndolas resistentes a infecciones por hongos y oomicetos (Girgi *et al.*, 2006). La proteína de mamíferos **LF**, como ya se ha comentado, ha sido uno de los ejemplos más estudiados de una proteína de mamíferos que ha mostrado



capacidad de protección frente a infecciones de distintos microorganismos en plantas de tabaco (Mitra y Zhang, 1994; Salmon *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2004), de arroz (Nandi *et al.*, 2002; Takase *et al.*, 2005; 2005), de tomate (Lee *et al.*, 2002) y de patata (Chong y Langridge, 2000).

Por último, se han usado **fusiones de genes** antimicrobianos con proteínas de distintas funciones. En *A. thaliana* han sido expresadas distintas poliproteínas formadas por la fusión de un anticuerpo específico frente al hongo *Fusarium*, junto con la proteína AFP, la defensina Rs-AFP2 y una quitinasa de trigo (Peschen *et al.*, 2004). Líneas obtenidas con las distintas construcciones fueron resistentes a la infección por el hongo *F. oxysporum*.

#### 4.3.2. Péptidos antimicrobianos.

Una consecuencia obvia del trabajo con péptidos compuestos por aminoácidos naturales es su producción mediante biotecnología, a través de transgenia del cultivo al que se pretende proteger, de igual modo a como se ha realizado con distintas proteínas antimicrobianas, como acabamos de ver. El pequeño tamaño de los AMP ofrece ventajas en cuanto a las posibilidades de diseño racional, pero de cara a la expresión transgénica facilita además el diseño de genes sintéticos desde oligonucleótidos “a la carta” que cubran toda la secuencia peptídica y permite la producción de distintos péptidos (con distintas especificidades antimicrobianas) fusionados en una única construcción. Sin embargo, por contrapartida, existen cuestiones que pueden afectar a su viabilidad como son su expresión específica de tejido, constitutiva o inducible, su secreción o localización intracelular, su estabilidad (posible degradación por proteasas) y, especialmente en el caso de péptidos y proteínas con puentes disulfuro, su plegamiento apropiado. Además, debido a que muchos AMP perturban las membranas biológicas, sería ideal que la célula los sintetizara en una forma inactiva para minimizar el daño causado a las células huésped hasta que se produzca la infección del patógeno. Otro de los problemas de la expresión de AMP en plantas es el hecho de que su actividad antimicrobiana es, en la mayoría de los casos, reducida por la presencia de concentraciones fisiológicas de cationes.

En la Tabla 5 se resumen las contribuciones más significativas de protección lograda mediante la expresión transgénica de AMP de diseño racional, no naturales. En el texto que sigue resumimos dichos trabajos.

Los intentos iniciales de expresión transgénica utilizando AMP naturales dieron lugar en muchos casos a resultados pobres o no deseables, probablemente debido a problemas de estabilidad o toxicidad inespecífica. Finalmente, determinados análogos estables de cecropina B fueron expresados con éxito en plantas de tabaco, protegiéndolas frente a la infección por distintas *Pseudomonas* (Jaynes *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1997). En uno de estos trabajos se estudiaron dos análogos distintos con similares actividades *in vitro*, siendo sólo uno de ellos activo *in planta*, el péptido **Shiva-1** (Tabla 3) (Jaynes *et al.*, 1993). Probablemente esto fue debido a la mayor similitud del otro, el péptido SB-37 (Tabla 3), con la cecropina B que es más susceptible a la degradación (Mills *et al.*, 1994). Sin embargo, en un trabajo posterior, **SB-37** ha sido expresado con éxito en plantas de patata confiriéndoles resistencia frente a la bacteria *Erwinia carotovora* (Arce *et al.*, 1999). Otra alternativa para estabilizar la cecropina *in planta* ha sido expresarla fusionada a secuencias que la dirigen al espacio intercelular, preservándola del ataque de proteasas y obteniendo en este caso líneas de arroz con susceptibilidad reducida frente a patógenos naturales (Sharma *et al.*, 2000). El direccionamiento a espacios celulares determinados ha producido resultados diferenciales y prometedores en distintos AMP (Li *et al.*, 2001; Coca *et al.*, 2006). También se ha mostrado la utilidad de expresar determinados AMP mediante el genoma cloroplástico, para conseguir un confinamiento génico más eficiente y mejorar los niveles de producción del péptido (DeGray *et al.*, 2001).

El péptido quimérico **MsrA1** (Tabla 3) se diseñó para eliminar la capacidad hemolítica de sus dos péptidos parentales, y se expresó en patata (Osusky *et al.*, 2000). Se demostró protección en planta frente a hongos y en tubérculos frente a la podredumbre blanda causada por *Erwinia*. Su ausencia de toxicidad se confirmó mediante ensayos de alimentación de ratones. Este trabajo es muy relevante ya que es el primer ejemplo en el que un AMP de diseño se produce en planta y se consigue un fenotipo de protección de importancia agronómica y con ausencia de toxicidad demostrada.

Tabla 5. Protección vegetal mediante expresión transgénica de AMP.

Péptido	Huésped	Patógeno(s)	Referencia
Shiva-1	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	<i>P. solanacearum</i>	(Jaynes <i>et al.</i> , 1993)
	Patata ( <i>S. tuberosum</i> )	<i>E. carotovora</i>	(Yi <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Paulownia tomentosa</i>	Molicutes (fitoplasma)	(Du <i>et al.</i> , 2005)
MB39	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	<i>P. syringae</i>	(Huang <i>et al.</i> , 1997)
	Manzano ( <i>M. domestica</i> )	<i>E. amylovora</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2001)
SB-37	Patata ( <i>S. tuberosum</i> )	<i>E. carotovora</i>	(Arce <i>et al.</i> , 1999)
MsrA1	Patata ( <i>S. tuberosum</i> )	<i>E. carotovora</i> ; <i>P. cactorum</i> ; <i>F. solani</i>	(Osusky <i>et al.</i> , 2000)
D4E1	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	<i>C. destructivum</i>	(Cary <i>et al.</i> , 2000)
	Chopo ( <i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i> )	<i>A. tumefaciens</i> ; <i>X. populi</i>	(Mentag <i>et al.</i> , 2003)
	Algodón ( <i>G. hirsutum</i> )	<i>T. basicota</i>	(Rajasekaran <i>et al.</i> , 2005)
Myp30	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	<i>E. carotovora</i> ; <i>P. tabacina</i>	(Li <i>et al.</i> , 2001)
ESF12	Álamo ( <i>Populus</i> sp.)	<i>S. musiva</i>	(Liang <i>et al.</i> , 2002)
MSI-99	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	Bacterias; hongos	(DeGray <i>et al.</i> , 2001; Chakrabarti <i>et al.</i> , 2003;
	Vid ( <i>V. vinifera</i> )		Vidal <i>et al.</i> , 2006)
	Banana ( <i>Musa</i> sp.)	<i>F. oxysporum</i> ; <i>M. musicota</i>	(Alan <i>et al.</i> , 2004)
	Tomate ( <i>L. esculentum</i> )	<i>P. syringae</i>	
Pep11	Tomate ( <i>L. esculentum</i> )	<i>P. infestans</i>	(Jones <i>et al.</i> , 2004)
MsrA3	Patata ( <i>S. tuberosum</i> )	<i>E. carotovora</i> ; <i>P. infestans</i> ; <i>P. erythroseptica</i>	(Osusky <i>et al.</i> , 2004)
CEMA	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	<i>F. solani</i>	(Yevtushenko <i>et al.</i> , 2005)
MsrA2	Patata ( <i>S. tuberosum</i> )	<i>E. carotovora</i> ; hongos	(Osusky <i>et al.</i> , 2005)
	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	Bacterias; hongos; oomicetos	(Yevtushenko y Misra, 2007)
ACHE-I-7.1	Patata ( <i>S. tuberosum</i> )	<i>G. pallida</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2005)
Rev4	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	Bacterias; oomicetos	(Xing <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>		
10R y 11R	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	<i>E. carotovora</i> ; hongos; TMV	(Bhargava <i>et al.</i> , 2007b)
PV5	Tabaco ( <i>N. tabacum</i> )	<i>E. carotovora</i> ; hongos; TMV	(Bhargava <i>et al.</i> , 2007a)

El AMP sintético **D4E1** (Tabla 4) es activo cuando es producido en tabaco y confiere protección en bioensayos de inoculación foliar de hongos fitopatógenos (Rajasekaran *et al.*, 2001). En el caso de péptidos tan pequeños es necesario considerar el posible efecto sobre la actividad de la adición de residuos adicionales de aminoácidos, derivada del diseño de genes sintéticos, y en este aspecto D4E1 parece ser particularmente apropiado y es uno de los AMP más contrastados mediante expresión en distintos trabajos y cultivos, algunos de interés agronómico (Mentag *et al.*, 2003; Rajasekaran *et al.*, 2005).

Otro de los péptidos más estudiados a nivel de expresión transgénica en distintas plantas ha sido el péptido **MSI-99** (Tabla 3). Se ha expresado en plantas de tabaco (DeGray *et al.*, 2001; Chakrabarti *et al.*, 2003), vid (Vidal *et al.*, 2006), banana (Chakrabarti *et al.*, 2003) y tomate (Alan *et al.*, 2004), dando resultados satisfactorios frente a la infección por distintos fitopatógenos.

Una alternativa para soslayar la posible inestabilidad de AMP motivada por su pequeño tamaño es el mimetizar sistemas naturales para la producción de pequeños péptidos derivados de pre-proteínas de mayor tamaño, de forma análoga a lo que sucede con la indolicidina. En plantas de tomate, la sistemina es un péptido de 18 aminoácidos muy conocido por su papel en la señalización de respuestas vegetales frente al ataque por insectos masticadores, y que se sintetiza como un precursor de mayor tamaño (prosistemina) (Pearce *et al.*, 1991). En una aproximación muy interesante se utilizó la prosistemina como un sistema lanzadera para producir y liberar el péptido antimicrobiano previamente caracterizado **Pep11** (Owens y Heutte, 1997; Cavallarin *et al.*, 1998), confiriendo resistencia en plantas de tomate frente a la infección por el patógeno *P. infestans* (Jones *et al.*, 2004)

Los datos de toxicidad y bioactividad *in vitro* son importantes pero no deberían ser completamente determinantes en la valoración de la utilidad de un AMP. El péptido **MsrA3** (Tabla 3) tiene una pobre potencia *in vitro* pero sin embargo ha dado resultados satisfactorios cuando se ha expresado en plantas de patata y suficientes para prolongar significativamente el tiempo de almacenamiento de sus tubérculos (Osusky *et al.*, 2004). Por el contrario, en el caso de péptidos con alta toxicidad (inespecífica) una alternativa interesante es su expresión bajo el control de promotores inducibles por patógenos, y que sólo se activarían localmente cuando un patógeno intenta infectar el tejido

vegetal (Mitsuhara *et al.*, 2000; Yevtushenko *et al.*, 2005; Yevtushenko y Misra, 2007). En este contexto hay que destacar la expresión del péptido **Shiva-1** en plantas de patata bajo el control del promotor del gen *PAL5* (Yi *et al.*, 2004). Este gen codifica un enzima, la fenilalanina amonioliasa, que se expresa como respuesta a distintas situaciones de estrés entre las que se encuentra el ataque de patógenos. En cítricos se ha demostrado la inducción de un gen PAL como respuesta a la infección por *P. digitatum* (Marcos *et al.*, 2005). Este trabajo demostró una reducción significativa de las infecciones producidas por la bacteria *E. carotovora* sobre los propios tubérculos mayor bajo la expresión de este promotor que cuando la infección se producía en líneas transgénicas transformadas con el AMP bajo la expresión de un promotor constitutivo. Otro ejemplo es el clonaje del péptido **MB39** (Tabla 3) bajo la expresión del promotor de la proteína PR osmotina en plantas de manzano, resultando los vástagos obtenidos en algunas líneas transgénicas más resistentes a la infección por la bacteria *E. amylovora* (Liu *et al.*, 2001).

Es significativo la inhibición del parasitismo de nemátodos sobre patata mediante la expresión del heptapéptido **ACHE-I-7.1** (Tabla 4) que había mostrado inhibición *in vitro* de la actividad acetilcolinesterasa (el mismo mecanismo que el de otros nematicidas del mercado) (Liu *et al.*, 2005).

Dentro de este estudio, también es interesante destacar los resultados positivos obtenidos con distintos péptidos derivados de Indolicidina. El derivado **Rev4** (Tabla 3) ha sido expresado en plantas de tabaco y de *A. thaliana* a través de diferentes construcciones en las cuales se fusionaron al péptido secuencias señal de localización extracelular (Xing *et al.*, 2006). Además, en el caso de *A. thaliana*, Rev4 fue co-expresado con el péptido **Myp30** (Tabla 3). Las distintas líneas transgénicas obtenidas mostraron resistencia a la bacteria *E. carotovora* y al oomiceto *P. tabacina* en plantas de tabaco, y a la bacteria *P. syringae* y al oomiceto *Peronospora parasitica* en plantas de *A. thaliana*. También derivados de indolicidina y expresados en plantas de tabaco son los péptidos **10R** y **11R** (Tabla 3) (Bhargava *et al.*, 2007b).

Finalmente, un ejemplo significativo por el amplio espectro de resistencia descrito es el del péptido **PV5** (derivado de la polifemusina I) (Tabla 3) (Zhang *et al.*, 2000). Su expresión en plantas de tabaco ha conferido resistencia a la infección causada por distintas clases de fitopatógenos: los

hongos *B. cinerea*, *Verticillium* sp. y *F. oxysporum*; la bacteria *E. carotovora*; y el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Bhargava *et al.*, 2007a). En los dos últimos trabajos, se examinó además que la expresión de los péptidos 10R, 11R, y PV5 no tuvo un efecto fitotóxico sobre la viabilidad de las células de la propia planta (Bhargava *et al.*, 2007a; 2007b).

## **OBJETIVOS**





Este trabajo se enmarca en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Como principal modelo experimental se ha utilizado la podredumbre postcosecha de frutos cítricos causada por el hongo *Penicillium digitatum*. A lo largo de la Introducción se ha destacado y justificado la relevancia de los péptidos antimicrobianos, y de su modificación y diseño racional, como alternativas para el control de fitopatologías. En este contexto, se han propuesto inicialmente los objetivos que se detallan a continuación.

Como **Objetivo 1** se ha planteado el estudio comparado de la actividad antimicrobiana de **péptidos derivados de la proteína natural Lactoferrina bovina** y del hexapéptido previamente identificado PAF26, frente a distintos hongos fitopatógenos de interés agroalimentario.

El **Objetivo 2** ha sido el **análisis detallado del modo de acción antimicrobiano de PAF26** sobre el hongo fitopatógeno de postcosecha *P. digitatum*.

Dentro del **Objetivo 3** hemos utilizado el péptido PAF26 como un compuesto líder en la **generación e identificación de nuevos péptidos antimicrobianos** con propiedades mejoradas frente a hongos fitopatógenos.

Por último, el **Objetivo 4** ha sido la **evaluación comparada de la capacidad de control** de distintos péptidos antimicrobianos sobre la **podredumbre verde causada por *P. digitatum*** en frutos cítricos.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Los microorganismos utilizados en este estudio se detallan en la Tabla 6. Entre ellos se encuentran aislados naturales de hongos relacionados con las enfermedades postcosecha de cítricos y frutos de pepita, así como otros hongos de importancia agronómica. También se incluyeron determinadas cepas tipo de laboratorio de hongo, levadura y bacterias (ver más abajo).

Se eligieron tres aislados de *Penicillium* patógenos de postcosecha identificados taxonómicamente en trabajos previos mediante secuenciación del ITS del rRNA (López-García, 2002). *P. italicum* (aislado PHI-1) y *P. digitatum* (PHI-26) son conocidos patógenos de cítricos, mientras *P. expansum* (PHI-65) es patógeno de manzanas. *P. brevicompactum* (PHI-8) es un aislado obtenido mediante placas de contacto de la maquinaria de una central hortofrutícola, el cual se ha visto que posee una pobre capacidad infectiva sobre frutos cítricos (López-García *et al.*, 2003).

Además se seleccionaron algunos ejemplos de otros hongos de relevancia en fitopatología. *Alternaria* sp. (PHI-44) es un aislado procedente de un lavado de piel de naranja (López-García *et al.*, 2003) y es un ejemplo de especie poco afectada por los fungicidas comúnmente usados en la industria de cítricos. *Fusarium oxysporum* (CECT2866) causante de la fusariosis vascular del tomate, *Botrytis cinerea* causante de la podredumbre gris [aislado #8 es un aislado obtenido de plantas ornamentales (Moreno *et al.*, 2003)], y el hongo *Magnaporthe grisea* (aislado PR9) (Coca *et al.*, 2004) causante de la pìriculariosis del arroz, son representantes de hongos patógenos de plantas ampliamente estudiados tanto desde el punto de vista básico como por la importancia de las pérdidas que ocasionan.

Las cepas modelo de laboratorio del hongo filamentoso *A. nidulans* (biA1), de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (FY1679) y de las bacterias *Bacillus subtilis* (CECT498) y *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) también fueron incluidas en el estudio para valorar la especificidad en la acción antifúngica de los péptidos.

**Tabla 6. Microorganismos utilizados en este estudio.**

Clasificación	Aislado	Procedencia	Fuente
<i>B. cinerea</i>	#8	Fundación PROMIVA (Madrid)	(Moreno <i>et al.</i> , 2003)
<i>M. grisea</i>	PR9	Dep. Genética Molecular (IBMB)	(Coca <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. nidulans</i>	biA1	Lab. Biotecnología (IATA)	
<i>F. oxysporum</i>	CECT2866	CECT	
<i>P. italicum</i>	PHI-1	Lab. Postcosecha (IATA)	(López-García <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. brevicompactum</i>	PHI-8	Lab. Postcosecha (IATA)	(López-García <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. digitatum</i>	PHI-26	Lab. Postcosecha (IATA)	(López-García <i>et al.</i> , 2000)
<i>Alternaria</i> sp.	PHI-44	Lab. Postcosecha (IATA)	(López-García <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. expansum</i>	PHI-65	Lab. Postcosecha (IATA)	(López-García <i>et al.</i> , 2003)
<i>S. cerevisiae</i>	FY1679	Lab. Biotecnología (IATA)	
<i>B. subtilis</i>	CECT498	CECT	
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$	Lab. Postcosecha (IATA)	

## 2. MEDIOS DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO.

### 2.1. Hongos.

Todos los hongos se crecieron en placas de PDA (‘agar de patata dextrosa’, Difco-BD Diagnostic, Sparks, MD, USA) durante 7-10 días dependiendo del hongo a 24 °C en estufa. La única excepción fue *M. grisea*, que fue crecido en medio de harina de arroz (20 g/L de harina de arroz, 15 g/L agar y 2,5 g/L de extracto de levadura) (Coca *et al.*, 2004).

Cuando el micelio había esporulado, las esporas se recogieron adicionando agua estéril sobre la superficie del micelio en la placa y rascando con una espátula estéril, o rascando directamente desde la placar y transfiriendo el material a un tubo con agua estéril. Las esporas se filtraron a través de lana de vidrio estéril y se cuantificaron con una cámara cuenta-glóbulos para ajustar a la concentración deseada para los distintos ensayos. En los experimentos antifúngicos en medio líquido se utilizó el medio PDB (‘caldo de patata dextrosa’) para todos los hongos.

## 2.2. Levaduras.

*S. cerevisiae* se creció a una temperatura de 30 °C en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa, más 1,5% agar bacteriológico en caso de placas de medio sólido). Inicialmente, se creció en un cultivo nocturno en agitación, cuantificándose el número de UFC/mL con una cámara cuenta-glóbulos para ajustar la concentración apropiada para cada ensayo.

## 2.3. Bacterias.

*E. coli* y *B. subtilis* se crecieron a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1,5% agar bacteriológico en el caso de placas de medio sólido). Se crecieron en un cultivo nocturno con agitación, diluyéndose a la mañana siguiente en medio fresco LB. Tras 2-3 h adicionales de incubación se estimó el número de UFC/mL en el momento de crecimiento exponencial del cultivo mediante la medida de la DO<sub>600nm</sub> (una unidad de DO equivale a  $3,50 \times 10^8$  UFC/mL) ajustándose hasta la concentración adecuada usada en los ensayos antibacterianos.

## 3. PÉPTIDOS SINTÉTICOS.

### 3.1. Propiedades.

La mayoría de los péptidos usados (Tabla 7) fueron sintetizados por una compañía externa, (GenScript Corporation, Piscataway, NJ, USA) (<http://www.genscript.com/>) mediante la química del grupo base-lábil N-(9-fluorenil)-metoxicarbonilo (Fmoc) (Fields y Noble, 1990). Todos los péptidos se solicitaron en cantidades de entre 10 y 50 mg y a una pureza de >90%. Los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC) y su identidad se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF. Salvo indicación contraria (ver Tabla 7), los péptidos se sintetizaron con sus extremos modificados por acetilación (Ac) en el amino terminal y amidación (NH<sub>2</sub>) en el carboxilo terminal. Además, en el caso del péptido PAF26L también se utilizó una versión con su extremo amino terminal

modificado por adición covalente del fluoróforo 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC-PAF26L) (ver más adelante Figura 13).

Por otra parte, se utilizó el péptido comercial melitina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y los péptidos BP15 y BP76 cedidos amablemente por los Drs. E. Montesinos y E. Bardají (Institut de Tecnologia Agroalimentària y Laboratori d'Innovació en Processos i Productes de Síntesi Orgànica, Universitat de Girona) (Ferre *et al.*, 2006).

Todos los péptidos utilizados poseen una carga neta positiva según estimaciones a pH fisiológico (entre +3 y +6), y son de bajo peso molecular. El índice GRAVY de hidropaticidad (Kyte y Doolittle, 1982) se calculó mediante un servidor público de Internet (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) Valores negativos en el índice GRAVY indican que el péptido es hidrofílico, mientras que valores positivos corresponden a moléculas hidrofóbicas.

En los distintos estudios realizados se utilizaron versiones de los péptidos sintetizados con D-aminoácidos, de forma paralela a los estudios previos de identificación y caracterización de los péptidos PAF (López-García, 2002), y/o versiones de sus estereoisómeros L. En los péptidos PAF, y en cada caso que corresponda, se indicará si el péptido utilizado es la versión formada por D- o L-aminoácidos, con el correspondiente sufijo en el nombre del péptido (Tabla 7).

### **3.2. Cuantificación espectrofotométrica.**

Los péptidos liofilizados se disolvieron en tampón 5 mM 3-(N-morfolino)-ácido propanosulfónico (MOPS) a pH 7. Las concentraciones de cada péptido se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm ( $\epsilon^{280} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  del residuo de Trp), reconfirmándose antes de cada experimento (Figura 9A). En el caso del péptido FITC-PAF26L, la concentración también se determinó mediante la medida de la absorbancia a 495 nm ( $\epsilon^{495} = 68000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  del fluoróforo FITC) (Figura 9B). Soluciones stock de cada péptido se prepararon a 1-5 mM en tampón MOPS a pH 7 y se guardaron a -20 °C.



Tabla 7. Secuencias y propiedades de los péptidos usados en este estudio.

Péptido	Secuencia <sup>a</sup>	Carga neta <sup>b</sup>	MW	GRAVY <sup>c</sup>	Fuente <sup>d</sup>
PAF26D	Ac-rkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3	991,2	-1,883	[1]
PAF26L	Ac-RKKWFW-NH <sub>2</sub>	+3	991,2	-1,883	[2]
PAF34D	Ac-rkwlfw-NH <sub>2</sub>	+2	976,2	-0,600	[1]
PAF38D	Ac-rrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+4	1147,4	-2,257	[2]
PAF38L	Ac-RRKKWFW-NH <sub>2</sub>	+4	1147,4	-2,257	[2]
PAF39D	Ac-krkkwfw-NH <sub>2</sub>	+4	1119,4	-2,171	[2]
PAF40D	Ac-hrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3,1	1128,3	-2,071	[2]
PAF40L	Ac-HRKKWFW-NH <sub>2</sub>	+3,1	1128,3	-2,071	[2]
PAF41D	Ac-frkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3	1138,4	-1,214	[2]
PAF42D	Ac-wrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3	1177,4	-1,743	[2]
PAF43D	Ac-yrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3	1154,4	-1,800	[2]
PAF44D	Ac-lrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3	1104,4	-1,071	[2]
PAF45D	Ac-trkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3	1092,3	-1,714	[2]
PAF46D	Ac-qrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3	1119,3	-2,114	[2]
PAF47D	Ac-arkkwfw-NH <sub>2</sub>	+3	1062,3	-1,357	[2]
LfcinB <sub>20-25</sub>	Ac-RRWQWR-NH <sub>2</sub>	+3	1030,0	-3,133	[3]
LfcinB <sub>17-31</sub>	Ac-FKCRRWQWRMKKLG-NH <sub>2</sub>	+6	2020,5	-1,207	[4]
Melitina	GIGAVLKVLTITGLPALISWIKRKRQQ	+5	2847,4	0,273	[5]
Mel.subK7I	GIGAVLIVLTTITGLPALISWIKRKRQQ	+4	2832,4	0,596	[6]
BM0	Ac-RFWWFRRR-NH <sub>2</sub>	+4	1350,6	-1,775	[7]
Indolicidina	Ac-ILPWKWPWWPWR-NH <sub>2</sub>	+3	1948,3	-1,069	[8]
BP15	KKLFFKKILKVL-NH <sub>2</sub>	+5	1356,8	0,309	[9]
BP76	KKLFFKKILKFL-NH <sub>2</sub>	+5	1404,9	0,182	[9]

<sup>a</sup> En mayúsculas y minúsculas se muestran los estereoisómeros L y D, respectivamente, de los aminoácidos. También se indica la acetilación en el extremo N-terminal y la amidación en C-terminal. La secuencia LfcinB<sub>20-25</sub> dentro de LfcinB<sub>17-31</sub> aparece subrayada. El código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 2.

<sup>b</sup> Carga neta estimada a pH 7.

<sup>c</sup> El índice GRAVY (*Peptide grand average of hydropathicity*) (<http://www.expasy.ch/>).

<sup>d</sup> Referencia de la fuente: [1] (López-García *et al.*, 2002); [2] Este trabajo; [3] (Tomita *et al.*, 1994b); [4] (Haug y Svendsen, 2001); [5] (Terwillinger y Eisenberg, 1982); [6] (Pérez-Payá *et al.*, 1994); [7] (Monk *et al.*, 2005); [8] (Chan *et al.*, 2006); [9] (Ferre *et al.*, 2006).

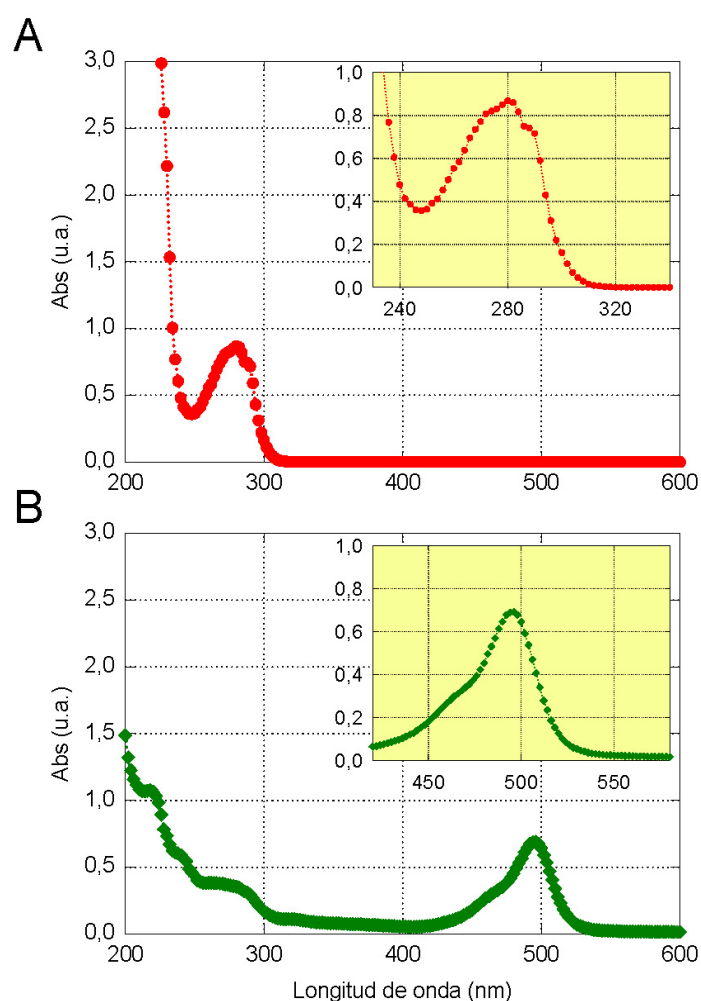


Figura 9. Cuantificación espectrofotométrica de los péptidos utilizados en este trabajo. Espectro de PAF26L a la concentración de 80  $\mu$ M (A) y FITC-PAF26L a 10  $\mu$ M (B). Se observa el pico de absorbancia del Trp a 280 nm (A) y el del fluoróforo FITC a 495 nm (B).

#### 4. ESTUDIOS *IN VITRO* SOBRE MICROORGANISMOS.

Al igual que con otros compuestos antimicrobianos, el efecto de los AMP sobre un microorganismo se puede manifestar como una inhibición o retardo de su crecimiento mientras está en contacto con el péptido (actividad bacterioestática o fungiestática), o como su muerte irreversible (actividad

microbicida). En el caso de microorganismos cultivables, se pueden realizar estos ensayos en su medio de cultivo y en condiciones de laboratorio. De este modo, se ha caracterizado la actividad antimicrobiana de los péptidos.

#### **4.1. Ensayos de inhibición del crecimiento en placas de microtítulo.**

La inhibición del crecimiento *in vitro* en medio líquido de bacterias, levaduras y hongos se determinó mediante placas de microtítulo adaptando una técnica previamente utilizada (Broekaert *et al.*, 1990). El crecimiento se sigue por la variación de la densidad óptica (DO) del microcultivo. Esta técnica es particularmente útil para la obtención de curvas dosis-respuesta además de ser rápida, sensible, analizar un amplio intervalo de concentraciones y requerir el uso de cantidades mínimas de péptido.

##### *4.1.1. Condiciones del ensayo.*

El ensayo de crecimiento de los microorganismos se realizó en placas estériles de microtítulo de 96 ó 384 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) (Figura 10). El volumen final por pocillo fue de 100  $\mu\text{L}$  en las placas de 96 pocillos y de 40  $\mu\text{L}$  en las de 384 pocillos. En primer lugar, se dispensó sobre las placas 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de las distintas diluciones seriadas del péptido a concentraciones 2 X. A continuación, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de la solución del microorganismo en su medio de cultivo correspondiente (ver más abajo) también a la concentración 2 X. En las placas de 384 pocillos, la metodología seguida fue análoga, escalándose los volúmenes para un volumen final de 40  $\mu\text{L}$ .

Las placas se incubaron a la temperatura apropiada para cada microorganismo en estufa y sin agitación. La evolución del incremento de biomasa se siguió determinado la  $\text{DO}_{492\text{nm}}$  a diferentes tiempos de incubación en un espectrofotómetro de placas Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation, Finland). En todos los experimentos se prepararon tres réplicas para cada tratamiento (concentración de péptido). Además se prepararon al menos tres replicas control de crecimiento en ausencia de péptido y al menos tres replicas de blancos de ausencia de microorganismo. Con estos datos, se calculó la  $\text{DO}_{492\text{nm}}$  media y la desviación estándar (SD) para cada tratamiento.

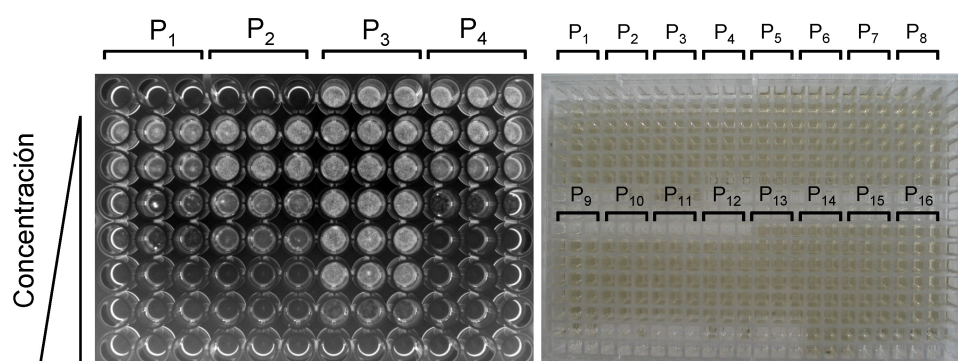


Figura 10. Placas de microtítulo de 96 (izquierda) y de 384 pocillos (derecha) utilizadas en los ensayos antimicrobianos *in vitro*.  $P_i$  representa las combinaciones de los diferentes péptidos para un microorganismo dado.

#### 4.1.2. Hongos.

Como medio de crecimiento para los hongos se usó medio PDB ('caldo de patata dextrosa', Difco-BD Diagnostics) diluido veinte veces (5% PDB) conteniendo 0,003% (w/v) de cloranfenicol y una concentración inicial de esporas de  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL, junto con los péptidos en un intervalo de concentraciones desde 0,25 hasta 32 ó 48  $\mu\text{M}$ , según el microorganismo. Las placas de microtítulo se incubaron a 24 °C realizándose las medidas espectrofotométricas cada 3-5 h durante los 4 días siguientes de crecimiento.

De forma similar, se efectuaron otro tipo de ensayos en los que se evaluó la actividad antimicrobiana de los péptidos sobre micelio fúngico en fase exponencial de crecimiento. En éstos se creció el hongo en las placas de microtítulo durante 24-26 h hasta un DO  $\sim 0,1$  adicionando a continuación los péptidos a las concentraciones finales desde 0,5 hasta 15  $\mu\text{M}$ , monitorizando su crecimiento en las 48 h siguientes mediante la variación de su DO<sub>492nm</sub> con el tiempo.

#### 4.1.3. Levaduras.

El medio líquido fue YPD diluido diez veces (10% YPD) conteniendo también 0,003% (w/v) de cloranfenicol. El inóculo se llevó a la concentración

inicial deseada de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Los péptidos se ensayaron en concentraciones desde 0,5 hasta 64  $\mu$ M. Las placas se incubaron a 30 °C. El tiempo de incubación fue de 2 días.

#### 4.1.4. *Bacterias.*

El medio líquido fue LB diluido diez veces (10% LB). El inóculo se llevó a la concentración inicial deseada de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Los péptidos se ensayaron en el intervalo de concentraciones de 1 a 128  $\mu$ M. Las placas se incubaron a la temperatura de 37 °C durante los 2 días siguientes.

#### 4.1.5. *Determinación de los parámetros de actividad antimicrobiana.*

El  $IC_{50}$  de un péptido se definió como la concentración requerida para obtener un 50% de inhibición en el crecimiento después de un periodo de incubación en el cual se alcanza el 50% del crecimiento final en los controles de ausencia de péptido (44-48 horas para hongos y 18-20 horas para bacterias y levaduras). El valor de  $IC_{50}$  para cada experimento se estimó mediante una regresión no lineal de los datos experimentales con una curva sigmoide de cuatro parámetros (Figura 11 y Ecuación 1) usando el software SigmaPlot v 8.02 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Este modelo de ajuste se usa para curvas en donde los datos no muestran una tendencia lineal, por ejemplo en curvas sigmoides. El valor estimado se consideró válido sólo si el ajuste a la curva de los datos experimentales tuvo una regresión  $r > 0,95$  y la estimación del valor  $IC_{50}$  una  $p < 0,05$ .

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{\left(1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^P\right)}$$

Ecuación 1. Ecuación sigmoide de cuatro parámetros utilizada en el cálculo del valor  $IC_{50}$ . En nuestro caso, los valores de X e Y son los de concentración de péptido y DO, respectivamente

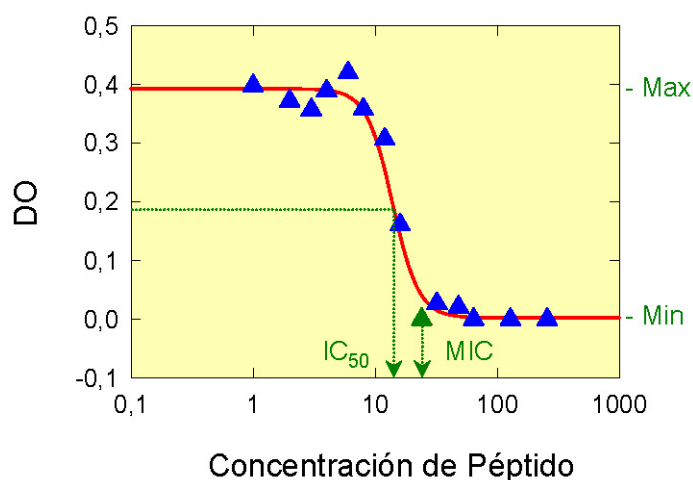


Figura 11. Un ejemplo de ajuste mediante una regresión no lineal con la ecuación de cuatro parámetros (ver Ecuación 1) de los datos experimentales de DO a una curva sigmoide. Los puntos experimentales se muestran como triángulos azules y el ajuste matemático como una línea roja. Se muestran además los valores de los parámetros obtenidos. El valor MIC se calcula a partir de los datos experimentales y corresponde a la mínima concentración que no muestra crecimiento.

A partir de los datos experimentales se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un péptido para un microorganismo dado, definida como la mínima concentración de péptido que no mostró crecimiento al final del experimento (después de 4 días de incubación en el caso de los hongos y 2 días para levaduras y bacterias), en ninguno de los distintos experimentos llevados a cabo con esa combinación de péptido-microorganismo (Figura 11).

#### 4.2. Ensayos de inhibición en medio sólido.

Por otro lado se realizaron ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento de los distintos aislados de *Penicillium* sobre placas de medio sólido PDA, a las cuales se les añadió en el medio distintos compuestos antimicrobianos antes de su solidificación. Posteriormente, se depositó sobre las placas gotas de 2,5-5  $\mu\text{L}$  de una suspensión de conidios de los hongos.

En este tipo de experimentos se ensayó la actividad de compuestos tales como el blanco de Calcofluor (CFW) (Ram y Klis, 2006) (Figura 12)

(Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Sigma-Aldrich) o el dodecil-sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich) a la temperatura normal de crecimiento de los hongos (24 °C) y a temperatura restrictiva en los hongos de género *Penicillium* (30 °C).

Se realizaron también pruebas con los péptidos aplicándolos de esta forma en el medio de crecimiento, pero no se obtuvo ningún resultado de actividad antimicrobiana dentro de los márgenes de concentraciones de péptido ensayados.

### 4.3. Cuantificación de la permeabilización celular.

La sonda verde Sytox (SG) tiene una longitud máxima de excitación y de emisión de 502 y de 523 nm, respectivamente. En condiciones normales, la emisión de fluorescencia del SG es mínima. Sin embargo, su unión a ácidos nucleicos resulta en un aumento de más de 500 veces en la emisión de fluorescencia. La principal utilidad de esta sonda se deriva de su incapacidad de penetrar a través de la bicapa lipídica de células. Sólo cuando se produce la alteración de las membranas celulares, la sonda es capaz de penetrar e interactuar con el DNA celular (Lebaron *et al.*, 1998). Es por ello que se utiliza como sonda marcadora de permeabilización y muerte celular.

Se ha llevado a cabo un ensayo con la sonda SG (Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA) para determinar la permeabilización celular producida por exposición a los distintos péptidos del hongo *P. digitatum*. De forma paralela a los ensayos de inhibición sobre micelio, y utilizando placas de microtítulo de 96 pocillos blancas (Nunc), se cuantificó la fluorescencia del SG en presencia de los péptidos. A 90  $\mu$ L por pocillo de muestra de hongo ( $2,5 \times 10^4$  condios/mL) en medio 5% PDB se le añadió 10  $\mu$ L de los péptidos a concentración 10 X, junto con 5  $\mu$ L de la sonda SG (4  $\mu$ M, en medio 5% PDB), llevándola ésta a una concentración final de 0,2  $\mu$ M. Las placas se incubaron en oscuridad cuantificándose la fluorescencia en intervalos de tiempo de 2 min durante las 3 h siguientes en forma de cinética mediante un fluorímetro de placas (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems, Finland) (excita la sonda a 485 nm y recoge la fluorescencia emitida a 538 nm). También se realizaron medidas puntuales a tiempos más largos, a las 24, 48 y 72 h siguientes, adicionando la sonda e incubando 2 h adicionales antes de la

determinación De forma análoga a lo descrito anteriormente, en todos los experimentos se prepararon tres réplicas para cada concentración de péptido, y los correspondientes controles y se calculó la Intensidad de Fluorescencia (IF) media y SD para cada tratamiento.

#### **4.4. Ensayos de actividad microbica de los péptidos.**

Adicionalmente a la actividad inhibitoria del crecimiento, también se ha analizado la actividad microbica de los distintos péptidos, sobre conidios del hongo *P. digitatum* y células de la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria gram negativa *E. coli*.

En el caso de *P. digitatum* se realizaron varios tipos de ensayos. Por una parte, conidios no germinados ( $2,5 \times 10^4$  conidios/mL) se incubaron con los péptidos a diferentes concentraciones en medio de cultivo 5% PDB o en agua estéril durante distintos tiempos a temperatura ambiente. A continuación, se extendieron muestras de 25-50  $\mu\text{L}$  o se aplicaron en forma de gotas de 2,5  $\mu\text{L}$  sobre placas de medio sólido PDA en ausencia de péptido. En otro tipo de ensayos, alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de las muestras anteriores, fueron concentradas por centrifugación y lavadas tres veces con agua estéril para eliminar de este modo el péptido. Posteriormente las muestras se extendieron en placas de PDA. En todos los casos, las placas se incubaron a 24 °C durante 2 días para monitorizar el crecimiento y número de colonias viables.

En las muestras de la levadura y la bacteria, suspensiones de células ( $5,0 \times 10^5$  UFC/mL) se incubaron con los péptidos a distintas concentraciones en medio líquido de crecimiento diluido 10% y depositaron sobre placas de YPD y LB libres de péptido, respectivamente, en forma de gotas de 2,5  $\mu\text{L}$ . Las placas se crecieron a su temperatura óptima de crecimiento hasta la aparición de crecimiento.



## 5. VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA.

### 5.1. Tinción con la sonda verde Sytox.

La permeabilización del hongo se visualizó microscópicamente gracias a la fluorescencia de la sonda verde Sytox (SG). Sobre micelio de *P. digitatum* expuesto a los péptidos a diferentes concentraciones durante un mínimo de 24 h (como se ha detallado anteriormente), se añadió 5  $\mu$ L por pocillo de una solución stock de SG (4  $\mu$ M, en medio 5% PDB) hasta una concentración final de 0,2  $\mu$ M y se incubó en oscuridad durante 5 min. Seguidamente el micelio se lavó y se montó sobre un portaobjetos en una solución de glicerol 20% para su visualización microscópica.

La visualización microscópica de las muestras se realizó en el Servicio de Microscopía del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC, Valencia) mediante un fotomicroscopio óptico vertical Eclipse E-600 (Nikon) con contraste interferencial diferencial DIC, equipado con un sistema de epi-fluorescencia con fuente de iluminación de mercurio (100 W) y con los filtros para las longitudes de onda de excitación de 450-490 nm y de emisión de 515-565 nm necesarios para la visualización del SG.

En determinados experimentos, muestras equivalentes se visualizaron mediante un microscopio confocal laser Leica TCS SL (Leica), equipado con el filtro de fluorescencia para la longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 510-560 nm.

### 5.2. Tinción de la quitina con blanco de Calcofluor.

El CFW (Figura 12) tiene alta afinidad por la quitina presente en las paredes celulares de hongos, permitiendo su detección y visualización (Pringle, 1991). Del mismo modo que se detalla en el apartado anterior, a las muestras de micelio tratado con los péptidos se les añadió 5  $\mu$ L de CFW 0,1% (w/v) hasta la concentración final de 50  $\mu$ g/mL. Las muestras se incubaron 5 min en oscuridad, lavaron y montaron en solución de glicerol 20% sobre portaobjetos. En determinados experimentos, esta tinción se realizó sobre las mismas muestras que habían sido ya teñidas con SG, permitiendo una visualización dual sobre la misma muestra de los resultados que ofrecen ambas tinciones.

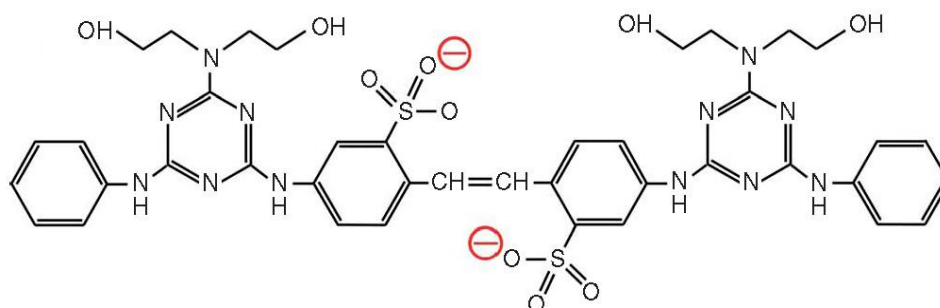


Figura 12. Estructura química del blanco de Calcofluor. Aparecen representadas las cargas negativas proporcionadas por los grupos de ácido sulfónico ( $\text{SO}_3^-$ ) a  $\text{pH} > 5,5$  [adaptado de (Ram y Klis, 2006)].

La visualización microscópica se realizó como en el caso de SG (Fotomicroscopio óptico vertical Eclipse E-600, Nikon), utilizando el sistema de filtros para el CFW de excitación a 395 nm y de emisión a 440 nm.

### 5.3. Tinción de los núcleos con DAPI.

Se utilizó la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes) para la visualización de los núcleos de las células del hongo *P. digitatum*. Del mismo modo que en los casos anteriores, a 100  $\mu\text{L}$  de muestra de micelio del hongo en pocillo de placas de microtítulo, se añadió 5  $\mu\text{L}$  de solución de DAPI (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) hasta una concentración final de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se incubó en oscuridad 20-30 min, se lavó con agua estéril y se montó sobre el portaobjetos en solución de glicerol 20%.

El DAPI tiene una longitud de excitación de 345 nm y de emisión de 455. Su visualización microscópica se realizó del mismo modo que para el CFW al utilizar ambos fluoróforos longitudes de onda de excitación y emisión en el mismo intervalo.

### 5.4. Localización del péptido PAF26 marcado con fluoresceína.

El péptido PAF26 se marcó covalentemente con FITC (Figura 13) mediante síntesis con su extremo N-terminal modificado (ver apartados 3.1 y 3.2 de Métodos). Se visualizó la interacción de FITC-PAF26L con conidios y

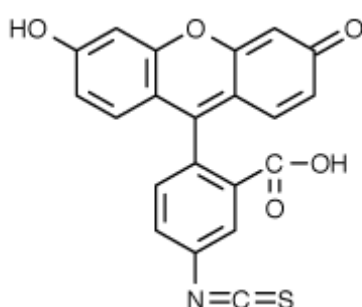


Figura 13. Estructura química del 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC). El grupo isotiocianato ( $-N=C=S$ ) dota a la molécula de fluoresceína de funcionalidad pudiendo reaccionar con grupos amino libres de proteínas. En nuestro estudio, el péptido PAF26L fue sintetizado con su extremo N-terminal unido covalentemente al FITC.

micelio de *P. digitatum*, y con células de la levadura *S. cerevisiae* mediante microscopia confocal laser.

En el caso de conidios del hongo, éstos se incubaron con el péptido marcado a las concentraciones finales de 0,3, 3 y 30  $\mu\text{M}$  en agua estéril durante 30 min, 1 h y 16 h. Posteriormente las muestras se lavaron, concentraron y montaron sobre el portaobjetos.

En la visualización de tubos germinativos y micelio en crecimiento, se depositaron 300  $\mu\text{L}$  de una solución de  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL en medio PDB 5% sobre cubreobjetos estériles dispuestos en microcámaras húmedas fabricadas con placas Petri. Estas muestras se incubaron toda la noche a 24 °C (a partir de las 14 h empiezan a observarse tubos germinativos y germínulas desde la espora). A continuación, se añadió el péptido marcado a las mismas concentraciones finales que en el caso anterior. Después del tratamiento durante varios tiempos con FITC-PAF26L, desde 2 min hasta 1 h, se eliminó el líquido del cubreobjetos colocándose a continuación de forma invertida, la parte donde se incubó el hongo hacia abajo, sobre el portaobjetos y visualizándose rápidamente bajo el microscopio confocal, como se ha descrito anteriormente con longitudes de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 510-560 nm.

A esas mismas concentraciones se incubó una suspensión de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL de *S. cerevisiae* en medio YPD 10% con FITC-PAF26L. Tras distintos tiempos de tratamiento las células se lavaron, concentraron y visualizaron del mismo modo que las anteriores.

## 6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.

La actividad hemolítica de los péptidos se determinó sobre glóbulos rojos humanos. Desde muestras de sangre recién extraída, se sedimentaron los eritrocitos mediante centrifugación (1000 rpm durante 15 min). A continuación se lavaron tres veces en tampón fosfato sódico (PBS) (35 mM tampón fosfato, 150 mM NaCl, pH 7) y resuspendieron en PBS en cuatro veces el volumen original de sangre. Se dispensaron 90  $\mu$ L de la suspensión por pocillo en placas de microtítulo de 96 pocillos (Nunc) a los que se añadieron 10  $\mu$ L de un stock 10 X de cada péptido hasta una concentración final de 1, 10 y 100  $\mu$ M. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 1 h, después centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min y el sobrenadante transferido a una nueva placa de microtítulo. El contenido de hemoglobina se cuantificó mediante la medida de la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro de placas Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation). Los controles de 0% y 100% de hemólisis se determinaron con PBS y con 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) añadidos en lugar de los péptidos, respectivamente. La actividad hemolítica de cada péptido fue calculada como el porcentaje de la relación existente entre la hemoglobina cuantificada para ese tratamiento comparada con la hemoglobina obtenida de la incubación con 0,1% Triton X-100 mediante la Ecuación 2.

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{(Abs_{415[\text{Péptido}]} - Abs_{415[\text{PBS}]})}{(Abs_{415[\text{TritonX-100}]} - Abs_{415[\text{PBS}]})}$$

Ecuación 2. Porcentaje de hemólisis producido por los péptidos.

## 7. ENSAYOS DE UNIÓN A ÁCIDOS NUCLEICOS.

El estudio de la unión de PAF26L a ácidos nucleicos se llevo a cabo mediante un ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA), esencialmente como se describe en la literatura (Marcos *et al.*, 1999), y utilizando ácido ribonucleico de transferencia (tRNA) comercial de *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich). Partiendo de una solución stock de tRNA de 100  $\mu$ g/mL en tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) se mezclaron cantidades

crecientes de péptido desde 0,5 a 64  $\mu\text{M}$  con 250 ng de tRNA. Se incubaron las muestras en hielo durante 30 min en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  de TE, y analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en tampón TAE (40 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). Los geles se tiñieron con Bromuro de Etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se fotografiaron bajo luz UV.

## 8. ENSAYOS DE INOCULACIÓN SOBRE FRUTOS CÍTRICOS.

Para evaluar el efecto de los péptidos sobre la podredumbre verde causada por *P. digitatum* sobre frutos cítricos se realizaron bioensayos de inoculación controlada. En estos ensayos se producían heridas en la piel del fruto y se inoculaban con una suspensión de conidios en presencia o ausencia de los péptidos. Estos procedimientos se basan en estudios clásicos (Kavanagh y Wood, 1967) que han sido ya utilizados en la evolución de diferentes tratamientos postcosecha (Smilanick *et al.*, 1999; Smilanick y Sorenson, 2001; 2005) y en anteriores trabajos de nuestro grupo con péptidos antimicrobianos (López-García *et al.*, 2000; 2002; 2003).

Los experimentos se realizaron sobre frutos recién cosechados de mandarinas (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) y de naranjas (*Citrus sinensis* Osbeck 'Navelina', 'Navel', 'Navelate' y 'Lanelate') (Figura 14A-B). Se utilizaron tres procedencias diferentes durante tres campañas distintas de recolección (años 2004 a 2007). Los frutos fueron recolectados por nosotros mismos en explotaciones comerciales de Agrimaba SA (Llíria, Valencia) o de La Reva (Regadí y Energía de Valencia SA) (Chiva, Valencia), o suministrados ya recolectados por la Cooperativa Vinícola de Llíria (Llíria, Valencia).

La superficie de los frutos se desinfectó mediante un baño de 5 min en 5% de lejía comercial, lavado posterior con agua y secado a temperatura ambiente (Figura 14C). Se realizaron cuatro heridas en la región ecuatorial del fruto de 3 mm de profundidad con una punta de clavo estéril. En cada herida se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de una solución de inóculo con conidios de *P. digitatum* (Figura 14D-F). La solución de inoculación contenía  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL sin péptido o en presencia de los péptidos a distintas concentraciones. Para cada tratamiento se hicieron tres réplicas, de cinco frutos por réplica y cuatro

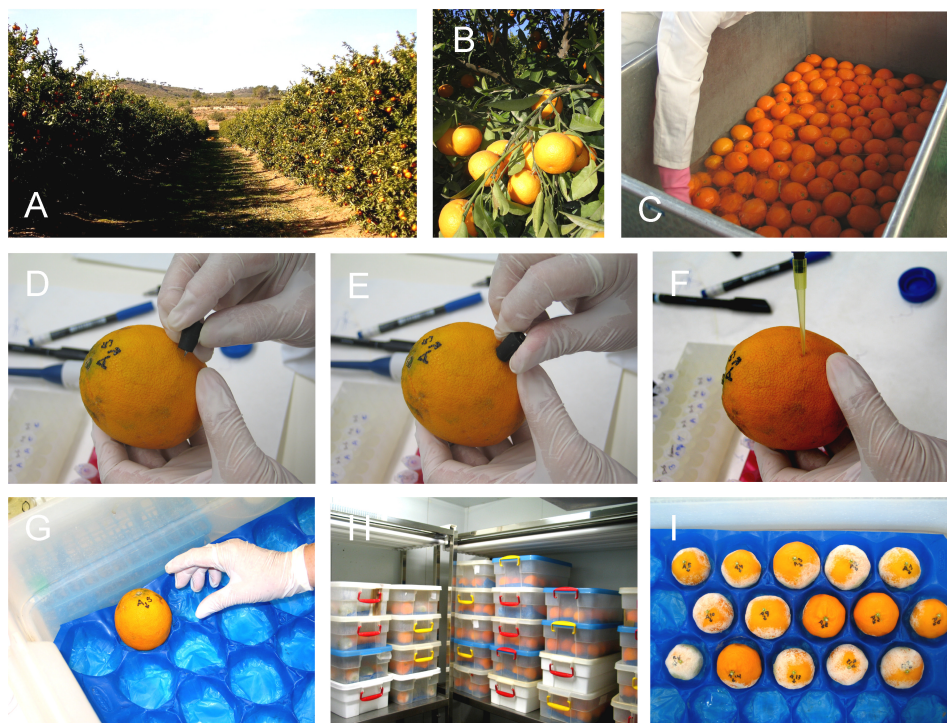


Figura 14. Imágenes representativas de la metodología seguida en los ensayos de inoculación sobre frutos. (A-B) Campo de Liria (Valencia) donde se recogieron algunos de los frutos seleccionándolos directamente desde el árbol. (C) Lavado y desinfección de los frutos en la balsa en solución de lejía 5%. (D-F) A lo largo del ecuador se realizan 4 heridas por fruto de 3 mm de profundidad con un clavo estéril donde se inoculan 5  $\mu$ L de solución de conidios del hongo. (G-I) 15 frutos por muestra son incubados y almacenados en cajas acondicionadas en cámaras a 20° C y 90% humedad relativa, durante los 7 días siguientes a la inoculación, determinándose la aparición y número de los síntomas.

heridas por fruto (20 heridas por réplica, 60 heridas por tratamiento). Los frutos se mantuvieron en cámara a 20 °C y 90% de humedad relativa simulando condiciones comerciales de almacenamiento (Figura 14G-I).

El desarrollo de la infección se determinó diariamente desde los 2 días después de la inoculación (dpi), registrándose como el porcentaje de heridas infectadas por réplica, y calculando la media y la desviación estándar para cada tratamiento (Figura 15).

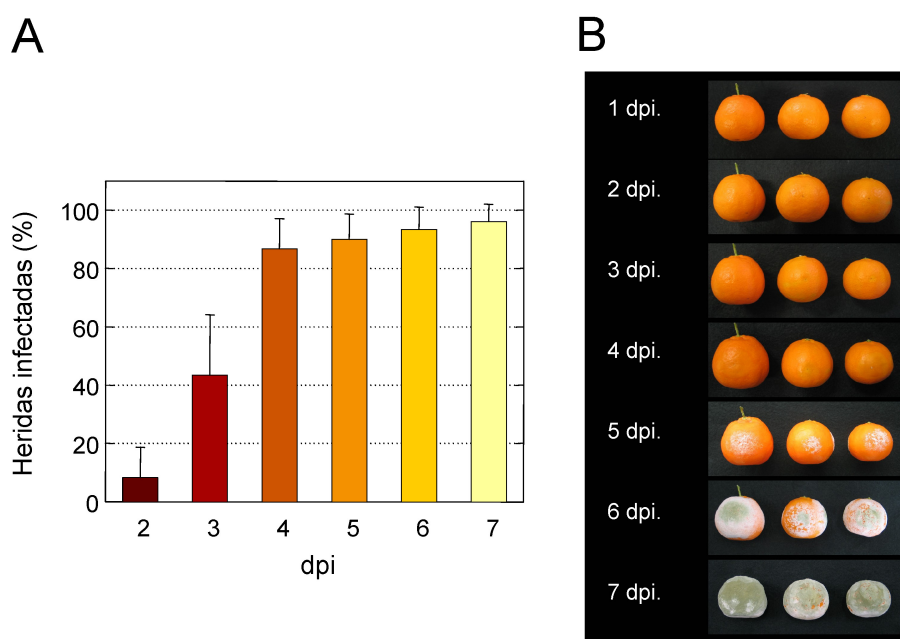


Figura 15. Progreso de la podredumbre causada por *P. digitatum* en frutos cítricos. (A) Representación gráfica de la infección como el porcentaje de heridas infectadas cada día post inoculación (dpi) (inóculo de  $10^5$  conidios/mL). (B) Fotografías de tres frutos del experimento mostrado en (A) a cada dpi.

## 9. ANALISIS ESTADÍSTICOS.

Los análisis estadísticos de resultados se realizaron mediante el paquete de programas StatGraphics Plus 5.1 (StatPoint, Herndon, VA, USA). Se determinó si hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los distintos tratamientos al 95% de confianza ( $F$ -test) y, en caso afirmativo, se determinó que medias eran estadísticamente diferentes a las restantes al 95% de confianza (test de la diferencia significativa real de Tukey).

En los recuentos de viables obtenidos en los ensayos de actividad fungicida de los péptidos, se llevó a cabo la transformación logarítmica de los datos experimentales para cumplir los criterios de igualdad de varianza en los análisis ANOVA.





## **RESULTADOS**



## **1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA LACTOFERRINA BOVINA FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS.**

En los últimos años se han identificado nuevos péptidos antimicrobianos derivados de proteínas que pueden tener o no actividad antimicrobiana de forma natural. Como ya se ha comentado en la Introducción, un ejemplo es el caso del péptido lactoferrina (Lfcin) originado a partir de la proteína lactoferrina (LF) mediante digestión con pepsina (Tomita *et al.*, 1991; Bellamy *et al.*, 1992b).

En el presente estudio, hemos seleccionado dos péptidos derivados del motivo antimicrobiano de la Lfcin Bovina (LfcinB) (ver Introducción y Figura 7) con el objetivo de explorar su actividad antimicrobiana y potencial aplicación fitopatológica frente a hongos patógenos de plantas, en un estudio comparado con el péptido PAF26 identificado previamente por nuestro grupo.

### **1.1. Selección de péptidos antimicrobianos derivados de LfcinB.**

La LfcinB es un fragmento peptídico de 25 aminoácidos que se encuentra en el dominio N-terminal de la LF bovina y que se corresponde con los residuos 17-41 de la proteína nativa (ver Introducción, Figura 7). Presenta mayor actividad antibacteriana que la propia LF bovina, y también mayor que el fragmento análogo de la proteína humana (LfcinH) (Bellamy *et al.*, 1992b; Tomita *et al.*, 2002) (Figura 16). La composición en aminoácidos de la LfcinB es similar a la de AMP catiónicos, ricos en residuos básicos e hidrofóbicos. Distintos péptidos derivados de la LfcinB han sido usados en el estudio del papel que desempeñan los residuos de aminoácidos en su actividad y en su modo de acción, identificando determinantes de sus propiedades antibacterianas (Haug y Svendsen, 2001; Farnaud y Evans, 2003; Orsi, 2004; Haug *et al.*, 2007). Estudios de secuencia realizados a través de metodologías como el uso de análogos de sustitución de alanina han demostrado que los residuos básicos e hidrofóbicos son los que contribuyen en mayor medida y de forma decisiva en mantener la actividad antibacteriana de estos péptidos (Strom *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2002).

En lo que respecta a las propiedades antifúngicas se ha demostrado actividad de distintos péptidos derivados de LfcinB, fundamentalmente frente a *Candida* sp. (Ueta *et al.*, 2001; Nikawa *et al.*, 2004; van der Kraan *et al.*, 2005), y se ha propuesto como una alternativa al uso de antifúngicos convencionales al mostrar niveles inhibitorios frente a células de *C. albicans* del orden de los alcanzados con los antifúngicos comerciales miconazol o fluconazol (Ueta *et al.*, 2001), e incluso sinergismo con éstos mejorando su actividad sobre cepas azol-resistentes (Wakabayashi *et al.*, 1998). Como ocurre con la proteína parental LF, es obvia la potencial aplicación biotecnológica y ya hay ejemplos de péptidos derivados de Lfcin en fases previas a su desarrollo como fármacos (Hancock y Sahl, 2006).

El motivo mínimo antibacteriano de la LfcinB se ha reducido a seis residuos de aminoácidos [posiciones 20-25 de la secuencia parental con el extremo C-terminal amidado (RRWQWR-NH<sub>2</sub>)] y posee actividad bactericida similar a la de la LfcinB (Tomita *et al.*, 1994a; Schibli *et al.*, 1999). La secuencia de aminoácidos de este motivo antibacteriano es similar a la del grupo de hexapéptidos PAF (López-García *et al.*, 2000), y en concreto a PAF26 (Figura 16). La hidrofobicidad que posee su estructura primaria se caracteriza, al igual que en los péptidos PAF, por la presencia de un motivo formado por dos residuos de Triptófano flanqueando a un tercer aminoácido (Trp-Xaa-Trp). En un estudio inicial de nuestro grupo, el péptido LfcinB<sub>20-25</sub> mostró una actividad antifúngica similar a la de PAF19D y PAF26D frente a los dos patógenos postcosecha más importantes de frutos cítricos (López-García *et al.*, 2003). En medio completo de crecimiento PDB, LfcinB<sub>20-25</sub> mostró valores inhibitorios *in vitro* de 60 µM frente a *P. italicum* y *P. digitatum*, mientras que los péptidos PAF19D y PAF26D tuvieron valores MIC de 60 y 40 µM frente a *P. italicum* y 60 y 20 µM frente a *P. digitatum*, respectivamente.

En este trabajo hemos extendido estas observaciones y se han explorado las actividades antimicrobianas de dos péptidos representativos derivados de la LfcinB: (i) el núcleo antimicrobiano de seis residuos LfcinB<sub>20-25</sub> (Tomita *et al.*, 1994a; Schibli *et al.*, 1999), y (ii) el péptido de quince residuos LfcinB<sub>17-31</sub> seleccionado como modelo de péptido ampliamente estudiado (Haug y Svendsen, 2001; Strom *et al.*, 2002) y muy similar al péptido de catorce residuos que ha mostrado actividad frente a células de *Candida* sp. (Nikawa *et*

*al.*, 2004; van der Kraan *et al.*, 2005) (Figura 16). Además se ha comparado la actividad de éstos dos péptidos con el péptido previamente identificado PAF26. Con el objetivo de llevar a cabo una mejor comparación con los péptidos naturales derivados de la LfcinB, se ha utilizado en este estudio el péptido PAF26 sintetizado con L-aminoácidos. En anteriores trabajos se demostró que la actividad antimicrobiana de la versión L de PAF19, no difirió sustancialmente de su estereoisómero D (López-García *et al.*, 2000). En este trabajo hemos ensayado PAF26D y PAF26L en paralelo frente a *P. digitatum*, corroborándose que la actividad antifúngica de los péptidos sintetizados alternativamente con estereoisómeros fue similar (ver más adelante, Figura 44).

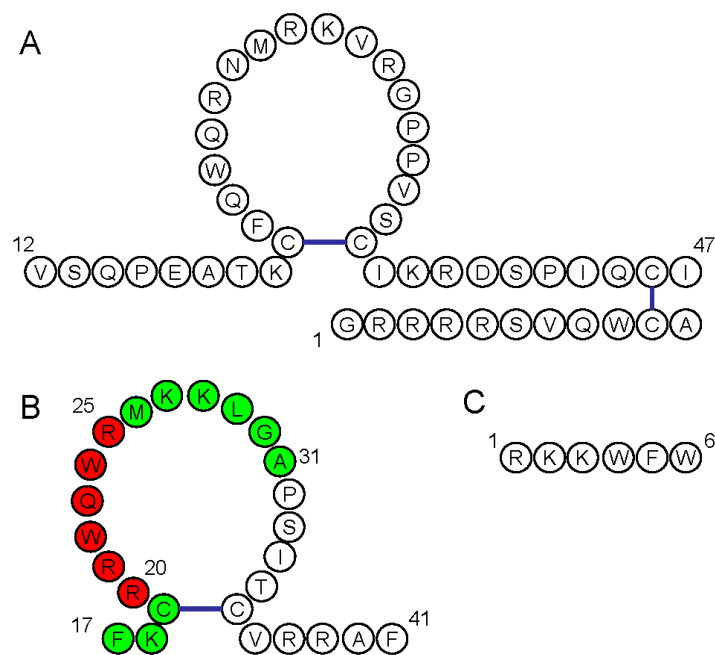


Figura 16. Secuencias de los péptidos LfcinH (A) y LfcinB (B), mostrándose los puentes disulfuro en su estructura, junto con la de PAF26L (C). La numeración corresponde a la posición que ocupan los residuos en la proteína parental LF. Los aminoácidos de los péptidos derivados de LfcinB usados en este estudio aparecen sombreados en rojo (péptido LfcinB<sub>20-25</sub>) y su extensión en verde (LfcinB<sub>17-31</sub>) [adaptado de (Bellamy *et al.*, 1992b)].

## 1.2. Actividad antimicrobiana comparada de PAF26 y de los péptidos derivados de la LfcinB.

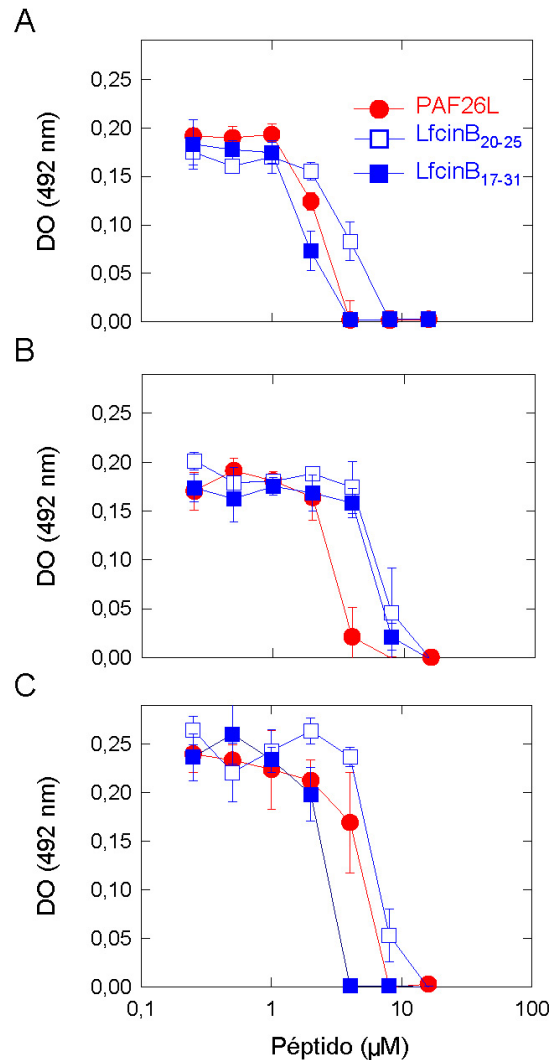
Se exploraron y compararon las actividades antimicrobianas de estos péptidos contra distintos fitopatógenos fúngicos entre los que se encuentran varias especies de *Penicillium* de importancia en la postcosecha de frutos, y algunas especies representantes de patógenos de plantas (Tabla 6). Además se incluyeron como microorganismos modelo de laboratorio el hongo filamentoso *A. nidulans*, la levadura *S. cerevisiae*, y las bacterias *B. subtilis* y *E. coli*, con el fin de valorar en paralelo la especificidad de los péptidos.

Mediante los ensayos en placas de microtítulo se obtuvieron las curvas dosis-respuesta para cada uno de los péptidos frente a los microorganismos ensayados. A modo de ejemplo se muestran las curvas de los tres péptidos frente a *P. digitatum*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* (Figura 17). Se determinaron de esta manera los valores de los parámetros IC<sub>50</sub> y MIC para cada combinación péptido-microorganismo, y que se muestran en la Tabla 8.

Como tendencia general, LfcinB<sub>20-25</sub> fue menos activo que el péptido extendido LfcinB<sub>17-31</sub>. También PAF26L y LfcinB<sub>17-31</sub> tuvieron una actividad similar contra todos los hongos, aunque PAF26L fue menos tóxico frente a las bacterias y la levadura que LfcinB<sub>17-31</sub> bajo nuestras condiciones experimentales, indicando que la especificidad contra hongos filamentosos es mayor en PAF26L que en LfcinB<sub>17-31</sub>, el cual está caracterizado como un péptido muy bactericida (Strom *et al.*, 2002; Farnaud *et al.*, 2004; Ulvatne *et al.*, 2004).

Cuando se comparó la sensibilidad de los diferentes hongos filamentosos a los tres péptidos, los más susceptibles fueron los dos patógenos de cítricos *P. digitatum* y *P. italicum*, mientras que el menos fue *M. grisea*. En este sentido, hay que recordar que la aproximación combinatorial que condujo a la identificación de PAF26 fue dirigida frente a *P. digitatum* PHI-26 (López-García *et al.*, 2002). En general, para la mayoría de los hongos se obtuvieron buenos valores inhibitorios con los péptidos PAF26L y LfcinB<sub>17-31</sub>.

Figura 17. Actividad inhibitoria de los péptidos sobre el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum* PHI-26 (A), *B. cinerea* #8 (B), y *F. oxysporum* CECT2866 (C). Se incubaron  $2.5 \times 10^4$  conidios/mL de cada hongo en 5% PDB en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos PAF26L (●), LfcinB<sub>20-25</sub> (□) y LfcinB<sub>17-31</sub> (■). Las muestras se prepararon por triplicado y los datos muestran los valores medios  $\pm$  SD de las medidas de  $DO_{492\text{ nm}}$  para cada concentración de péptido a las 48 h de incubación.



Con el objetivo de determinar si la actividad de los péptidos sobre el hongo *P. digitatum* es fungiestática (inhibición del crecimiento) o fungicida (inactivación irreversible de los conidios), muestras del hongo mantenidas durante 4 días en presencia de distintas concentraciones de los péptidos (tiempo de duración del experimento mostrado en la Figura 17) se depositaron

en placas de medio sólido PDA sin péptido (Figura 18). Un experimento análogo se realizó con los microorganismos *S. cerevisiae* y *E. coli*, pasando alícuotas de la incubación de éstos en presencia de los péptidos durante 1 día a placas de medio agar (Figura 18).

**Tabla 8. Propiedades antimicrobianas *in vitro* de los péptidos frente a los distintos microorganismos.**

Microorganismo	PAF26L		LfcinB <sub>20-25</sub>		LfcinB <sub>17-31</sub>	
	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sup>b</sup>
<i>P. digitatum</i> PHI-26	2,6	4	4,0	8	1,1	4
<i>P. italicum</i> PHI-1	2,4	4	3,4	8	2,0	4
<i>P. expansum</i> PHI-65	4,2	8	9,5	16	3,3	8
<i>P. brevicompactum</i> PHI-8	7,2	16	11,4	32	3,7	8
<i>Alternaria</i> sp. PHI-44	4,6	8	n.d. <sup>c</sup>	>32 <sup>d</sup>	9,5	16
<i>A. nidulans</i> biA1	3,6	8	7,2	8	2,7	4
<i>B. cinerea</i> #8	3,2	8	5,6	16	6,3	16
<i>F. oxysporum</i> CECT2866	4,6	8	6,4	16	2,3	8
<i>M. grisea</i> PR-9	n.d. <sup>c</sup>	>32 <sup>d</sup>	n.d. <sup>c</sup>	>32 <sup>d</sup>	n.d. <sup>c</sup>	>32 <sup>d</sup>
<i>S. cerevisiae</i> FY1679	n.d. <sup>c</sup>	48	n.d. <sup>c</sup>	>48 <sup>d</sup>	28,3	32
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	27,1	48	n.d. <sup>c</sup>	>48 <sup>d</sup>	5,4	16
<i>B. subtilis</i> CECT498	16,7	24	10,7	48	4,1	16

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) es el valor medio para cada combinación péptido-microorganismo, obtenido por el cálculo promedio del valor estimado IC<sub>50</sub> en al menos dos experimentos independientes. El coeficiente de variación entre los experimentos fue siempre menor del 20%.

<sup>b</sup> MIC ( $\mu$ M) es la concentración mínima que produce una inhibición completa en todos los experimentos independientes para cada combinación péptido-microorganismo.

<sup>c</sup> n.d., no determinado.

<sup>d</sup> El símbolo “>” indica que a esa concentración de péptido (la mayor ensayada para ese microorganismo) no se obtuvo una inhibición completa del crecimiento.

De forma inesperada, se observó una marcada diferencia de actividad fungicida entre los péptidos PAF26L y LfcinB<sub>17-31</sub> sobre *P. digitatum* (Figura 18), ello a pesar de su actividad similar de inhibición del crecimiento en medio líquido (Figura 17A). Resulto más fungicida sobre el hongo el péptido PAF26L



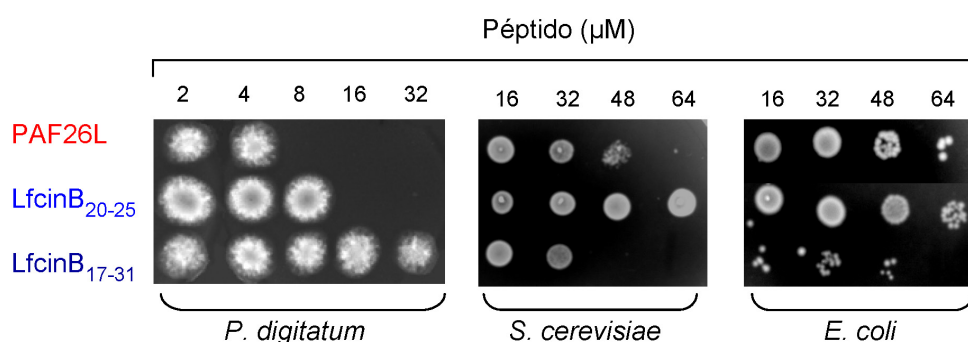


Figura 18. Valoración de la actividad microbicida de los péptidos. Muestras de conidios de *P. digitatum* PHI-26, células de *S. cerevisiae* FY1679, o células de *E. coli* DH5α tratadas con los péptidos a las concentraciones indicadas durante 4 días (*P. digitatum*) o 1 día (*S. cerevisiae* y *E. coli*) se aplicaron al final de la incubación como gotas de 2,5 µL sobre placas de medio de cultivo sólido libre de péptido, que se incubaron a las correspondientes temperaturas óptimas de crecimiento.

(y también Lfcin<sub>20-25</sub>) que el péptido LfcinB<sub>17-31</sub>, para el cual se recuperó crecimiento de *P. digitatum* incluso después del tratamiento a concentraciones de 32 µM de péptido (Figura 18). En cualquier caso, se observó crecimiento del hongo sobre las placas en muestras que habían sido incubadas a concentraciones de péptido por encima de su valor MIC (4 µM) y que no presentaban un valor de DO<sub>492</sub> detectable en el momento de la toma de muestra. Por otra parte, los resultados con *S. cerevisiae* y *E. coli* manifestaron perfiles de actividad microbicida reversos entre PAF26L y LfcinB<sub>17-31</sub>. Este último tuvo un efecto microbicida mayor que PAF26L sobre la bacteria o la levadura (Figura 18), correspondiéndose, en este caso sí, sus actividades microbicidas con sus propiedades inhibitorias del crecimiento (Tabla 8).

Para extender estos experimentos de actividad fungicida e intentar delimitar las causas de los resultados aparentemente contradictorios con los experimentos de inhibición en medio líquido, se incubaron conidios de *P. digitatum* en agua estéril o en medio de crecimiento PDB de uno a cuatro días con distintas concentraciones de los péptidos. Posteriormente, las muestras se lavaron, concentraron y extendieron en placas de medio sólido PDA libre de péptido con el objetivo de monitorizar el crecimiento de viables, cuantificando el número de unidades formadoras de colonias (Figura 19).

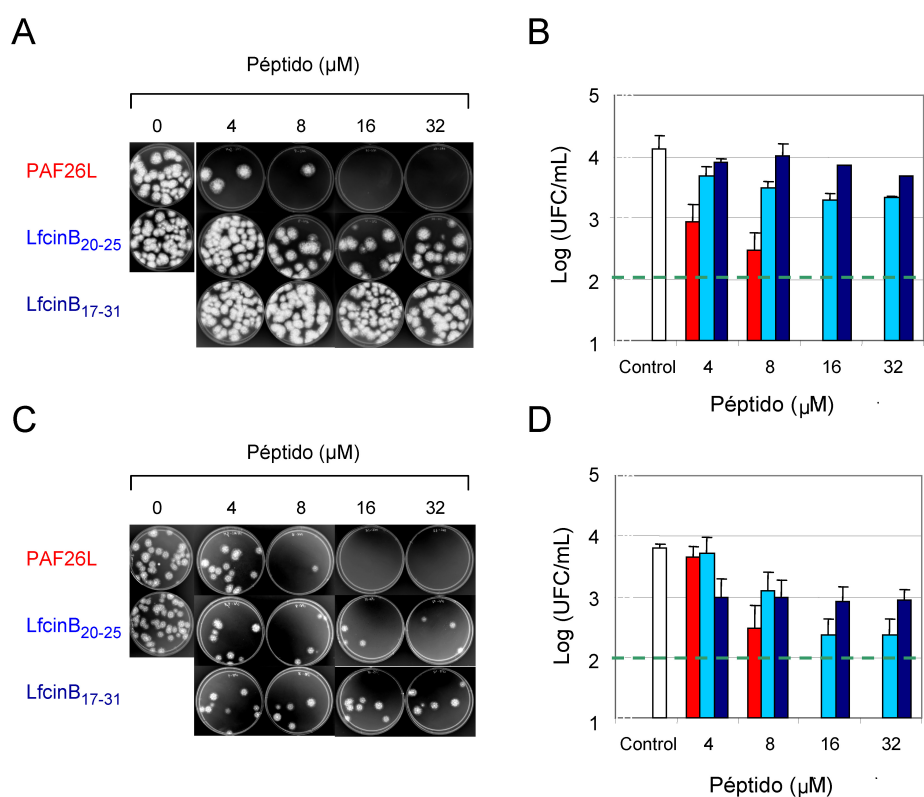


Figura 19. Actividad fungicida de los péptidos sobre conidios de *P. digitatum* PHI-26. Se incubaron  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL durante 1 día en agua estéril (A y B) y en medio 5% PDB (C y D) con los péptidos a las concentraciones de 4-32  $\mu\text{M}$ . Posteriormente alícuotas de éstos fueron lavadas y diluciones apropiadas extendidas en placas de PDA para monitorizar y contar el crecimiento de colonias viables. Apartados (A y C) muestran las fotografías representativas de las placas de crecimiento, mientras (B y D) corresponden a los recuentos de colonias realizados en las placas control (barras blancas) y en las pertenecientes a las incubaciones con PAF26L (barras rojas), LfcinB<sub>20-25</sub> (barras azules) y LfcinB<sub>17-31</sub> (barras fucsia). La línea verde discontinua en las gráficas (B y D) indica el límite de detección en estos experimentos.

Los datos de crecimiento en las placas confirmaron que los péptidos LfcinB<sub>20-25</sub> y LfcinB<sub>17-31</sub> no fueron fungicidas sobre conidios de 8 a 32  $\mu\text{M}$  a pesar de la ausencia de crecimiento en medio líquido a esas concentraciones, mientras que PAF26L sí fue marcadamente fungicida en ambas condiciones sin detectarse la recuperación de viables ya a concentraciones por encima de 8  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, es de destacar una mayor actividad aparente de los péptidos

derivados de la LfcinB al realizar la incubación de los conidios junto con los péptidos en medio 5% PDB (Figura 19C-D) siendo la recuperación de viables menor que en la incubación en agua estéril (Figura 19A-B), y reduciéndose los recuentos de conidios/mL en comparación a los controles en torno a un orden de magnitud (compárense la Figura 19B y D). En este sentido los resultados obtenidos son más similares a los mostrados en la Figura 18.

Es de destacar las marcadas diferencias de actividad fungicida de PAF26L y LfcinB<sub>20-25</sub> sobre los conidios de *P. digitatum*, a pesar del tamaño, carga y contenido en Trp similar en ambos péptidos.

### 1.3. Estudio microscópico del efecto de LfcinB<sub>17-31</sub> sobre *P. digitatum*.

Distintos trabajos han estudiado la correlación entre la actividad antimicrobiana de péptidos y la permeabilización de las membranas celulares de los microorganismos afectados (ver apartado siguiente y Discusión). La sonda fluorescente SG se ha usado para examinar la permeabilización celular de microorganismos tratados con distintos péptidos antimicrobianos (Roth *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1997; Rioux *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2002). Por ello, se dirigió la investigación a determinar si LfcinB<sub>17-31</sub> era capaz de permeabilizar células de *P. digitatum* en alguno de los estadios del ciclo vital fúngico. Los conidios tratados con concentraciones por encima del MIC del péptido LfcinB<sub>17-31</sub> fueron expuestos a SG y no mostraron fluorescencia detectable inducida por la exposición al péptido y por lo tanto permeabilización (datos no mostrados).

Con el objetivo de estudiar si se daba permeabilización celular en el caso de micelio del hongo expuesto al péptido LfcinB<sub>17-31</sub>, se diseñó un ensayo antimicrobiano (Figura 20), en el cual el micelio de *P. digitatum* resultante de la incubación de conidios durante 24 h en medio 5% PDB fue expuesto a concentraciones crecientes del péptido, determinándose el crecimiento durante las 48 h siguientes mediante la variación de DO<sub>492nm</sub>. El valor MIC obtenido en estos experimentos fue de 10 µM, mayor que el encontrado en los ensayos anteriores llevados a cabo sobre conidios (Figura 20). Posteriormente, estas muestras fueron expuestas a SG y visualizadas por microscopía para correlacionar la inhibición del crecimiento con el incremento en la permeabilización celular que refleja la fluorescencia de la sonda SG (Figura 21).

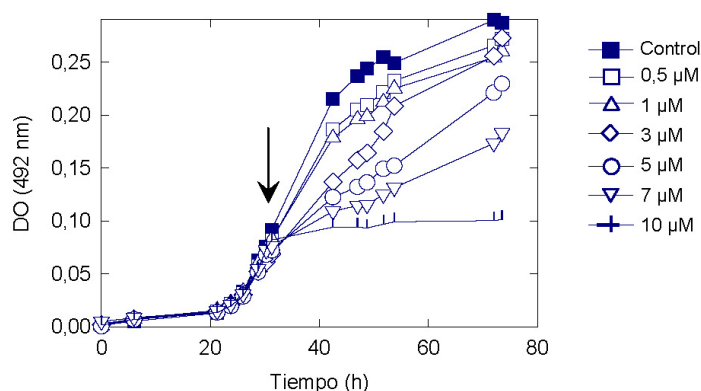


Figura 20. Efecto del péptido LfcinB<sub>17-31</sub> sobre el aumento de biomasa del micelio de *P. digitatum* PHI-26 en fase de crecimiento exponencial. La flecha señala el momento de adición del péptido a las concentraciones finales indicadas.

El micelio tratado con LfcinB<sub>17-31</sub> fue además teñido con el fluoróforo específico blanco de Calcofluor (CFW) que permite visualizar la localización de la quitina y por tanto las paredes celulares de hongos y levaduras (Pringle, 1991). La observación microscópica de las muestras control no tratadas con péptido (Figura 21A), mostró el patrón esperado de deposición de quitina con tinción preferencial del CFW en conidios, conidióforos, paredes y septos intercelulares. La morfología del micelio y conidióforos puede considerarse normal y típica de hongos del género *Penicillium* (Figura 2). En estas mismas muestras control no se detectó fluorescencia del SG, indicando que las células en estas condiciones control son impermeables a la sonda utilizada.

A concentraciones sub-MIC de LfcinB<sub>17-31</sub> que causaron aproximadamente el 50% de inhibición en este ensayo (5-7 µM), se redujeron las distancias intersepto y se observaron alteraciones morfológicas en micelio y conidióforos, que eran más acusadas cuanto mayor eran las concentraciones de péptido, siempre por debajo del MIC (Figura 21B-C). Los conidióforos se mostraron con morfología anómala caracterizada por paredes engrosadas, irregulares y presentando largos rosarios de conidios con mayor frecuencia que en los controles. Estas alteraciones fueron evidentes con la tinción con CFW, indicando una alteración en la deposición de quitina de la pared celular. A pesar de estas alteraciones, la permeabilización de micelio observada mediante SG fue mínima a estas concentraciones de péptido (Figura 21B3 y C3).

Las concentraciones MIC (10  $\mu\text{M}$ ) causaron una reducción en el espesor de las hifas y la total permeabilización del micelio, desapareciendo los septos intercelulares y mostrándose la fluorescencia del CFW de una forma desorganizada (Figura 21D), todo ello indicativo de un colapso generalizado y muerte celular. Finalmente, y en comparación a los controles, no se observó desarrollo de conidióforos a esta concentración.

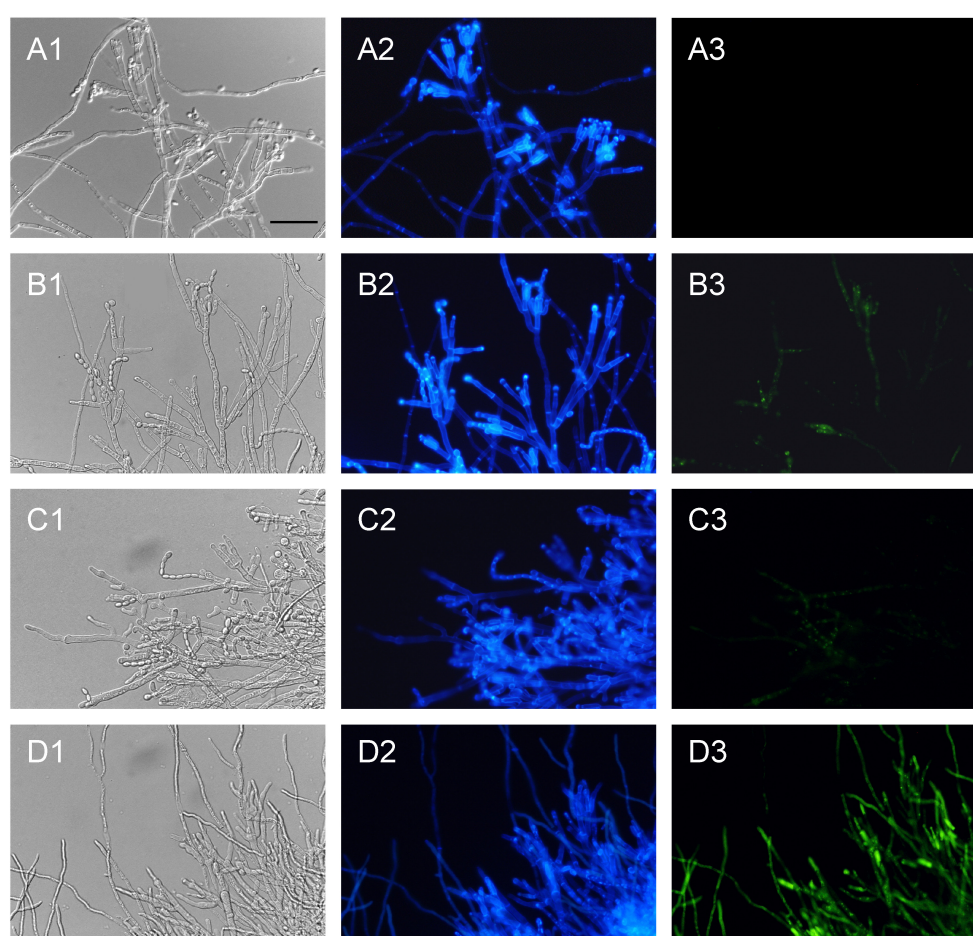


Figura 21. Visualización microscópica del micelio de *P. digitatum* PHI-26 crecido 24 h y tratado con el péptido LfcinB<sub>17-31</sub> como se muestra en la Figura 20. Micrografías del control (A) y tratamientos con el péptido a 5 (B), 7 (C) y 10  $\mu\text{M}$  (D). Paneles 1 a 3 muestran el mismo área visualizada con campo claro (paneles 1), o fluorescencia del CFW (paneles 2) y SG (paneles 3). La barra representa la longitud de 25  $\mu\text{m}$ .

#### **1.4. Inhibición de la infección de *P. digitatum* en frutos cítricos.**

Para evaluar la protección que confieren los péptidos frente al avance de la infección del hongo *P. digitatum* sobre frutos cítricos se han utilizado procedimientos de inoculación experimental análogos a los ya utilizados en la evaluación de diferentes tratamientos postcosecha (Smilanick *et al.*, 1999). En trabajos anteriores, nuestro grupo evaluó el efecto de la co-inoculación de los péptidos PAF19D y PAF26D con conidios de los hongos patógenos *B. cinerea* y *P. digitatum*, causantes de las podredumbres en tomates y en frutos cítricos respectivamente (López-García, 2002; López-García *et al.*, 2003), demostrando un retraso en la aparición de los síntomas así como a una reducción en el tamaño del área infectada.

Dentro de este estudio, se ha comparado el efecto de los dos péptidos derivados de la LfcinB y de PAF26L sobre la infección causada por el hongo *P. digitatum*. Este tipo de experimentos pueden llegar a presentar una importante variabilidad, ya que la incidencia de la infección depende del inóculo inicial del hongo pero también de la variedad de fruta, la campaña anual o las condiciones agronómicas o medioambientales del fruto durante su desarrollo y cosecha. Estos factores hacen variar la susceptibilidad de los frutos a la infección. Es por ello que los experimentos de infección recogidos en este trabajo son representativos de tratamientos realizados al menos en dos campañas anuales distintas y sobre distintas variedades de frutos cítricos (ver más adelante apartado 4 de Resultados).

En la Figura 22 se presentan los resultados de los bioensayos de control de la podredumbre causada por *P. digitatum* en frutos cítricos de mandarina (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan. cv. Clementina de Nules). Los frutos fueron inoculados con conidios del hongo en combinación con los péptidos a la concentración de 100  $\mu$ M. Se determinó la evolución de la infección en los distintos tratamientos mediante el porcentaje de heridas infectadas a los diferentes dpi. El análisis de las medias reveló una reducción significativa en el porcentaje de heridas infectadas en frutos co-inoculados con el hongo y el péptido PAF26L en todos los experimentos llevados a cabo. La co-inoculación con los péptidos derivados de LfcinB proporcionó una reducción de la infección estadísticamente significativa sólo en algunos experimentos (representativo de esto es el mostrado en la Figura 22), pero solo una

reducción de la incidencia no significativa en otros experimentos realizados. De este modo PAF26L fue más efectivo y dio unos resultados claramente más reproducibles que los péptidos derivados de la LfcinB en los ensayos de inhibición de podredumbres postcosecha.

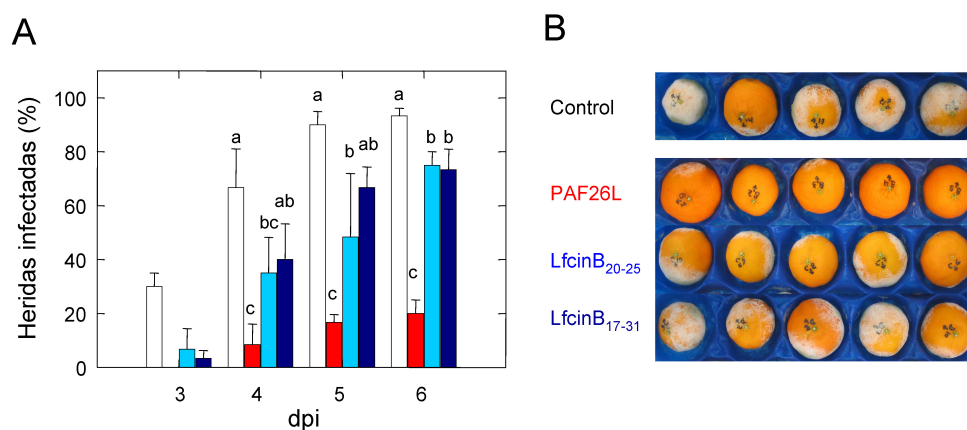


Figura 22. Efecto de los péptidos en el control de la podredumbre causada por *P. digitatum* en frutos cítricos. (A) Frutos de mandarina fueron inoculados con *P. digitatum* PHI-26 solo (barras blancas), o en combinación con los péptidos PAF26L (barras rojas), LfcinB<sub>20-25</sub> (barras azules) y LfcinB<sub>17-31</sub> (barras fucsias) a la concentración de 100  $\mu$ M. Los resultados son mostrados como la media del porcentaje de heridas infectadas  $\pm$  SD para cada tratamiento y día post inoculación (dpi). Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los cuatro tratamientos para cada dpi, al 95% de confianza (F-test). Las barras dentro del mismo día etiquetadas con la misma letra no difieren estadísticamente al 95% de confianza (test de la diferencia significativa real de Tukey). (B) Fotografías a los 5 dpi de una de las tres réplicas de cinco frutos para cada tratamiento efectuado en el experimento mostrado en (A).

## 2. ESTUDIO DEL MODO DE ACCIÓN DE PAF26.

El estudio y conocimiento del mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos es importante para su caracterización funcional, pero también como paso previo para la mejora de su actividad mediante diseño racional. Con el objetivo último de optimizar las propiedades antimicrobianas de los péptidos PAF, en este apartado hemos centrado la investigación en el modo de acción del péptido PAF26. Este hexapéptido ha demostrado poseer un buen balance de potencia/especificidad frente a nuestro microorganismo diana *P. digitatum*, en comparación con otros péptidos PAF (López-García *et al.*, 2002) y con los péptidos derivados de la LfcinB estudiados en el apartado anterior.

En estudios previos a este trabajo se determinó mediante microscopía óptica de fluorescencia utilizando la sonda SG que el péptido PAF26D a altas concentraciones (superiores a su concentración MIC) promueve la permeabilización celular del micelio de *P. digitatum* (López-García, 2002). En el presente estudio, y como continuación y extensión de aquellos resultados previos, hemos caracterizado más exhaustivamente la acción antifúngica del péptido PAF26 sobre el hongo *P. digitatum* en relación con los cambios microscópicos producidos y su capacidad de permeabilización, en un estudio comparado con el péptido Melitina. También se ha estudiado la interacción de PAF26 con *P. digitatum* mediante marcaje fluorescente del péptido y analizado su potencial unión a ácidos nucleicos. Finalmente, se ha comparado el efecto de PAF26 con el de otros compuestos antimicrobianos y condiciones de estrés, en el hongo *P. digitatum* y en otras tres especies del género *Penicillium*.

### 2.1. Alteraciones morfológicas producidas en el micelio de *P. digitatum* por exposición a PAF26.

Se estudiaron las alteraciones morfológicas producidas por PAF26L sobre micelio de *P. digitatum* en fase exponencial de crecimiento, en un diseño experimental análogo al descrito en el apartado anterior con el péptido LfcinB<sub>17-31</sub> (Figura 20). Como ocurría con éste, las propiedades inhibitorias de PAF26L resultaron ser algo diferentes al utilizar micelio en crecimiento en vez de conidios como material de partida en los ensayos antimicrobianos (Figura 23). Al comparar los valores obtenidos de IC<sub>50</sub> y MIC se observó una



reducción en el  $IC_{50}$  de PAF26L de  $2,2 \mu\text{M}$  a  $1,3 \mu\text{M}$ , mientras el MIC se incrementó de  $4 \mu\text{M}$  a  $6 \mu\text{M}$  (Figura 23 y ver más adelante Tabla 10).

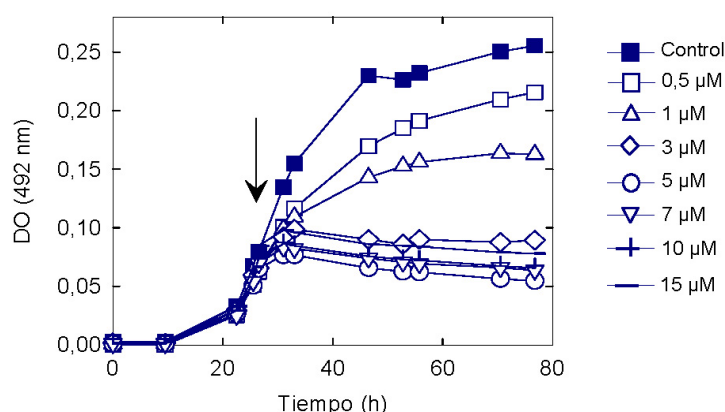
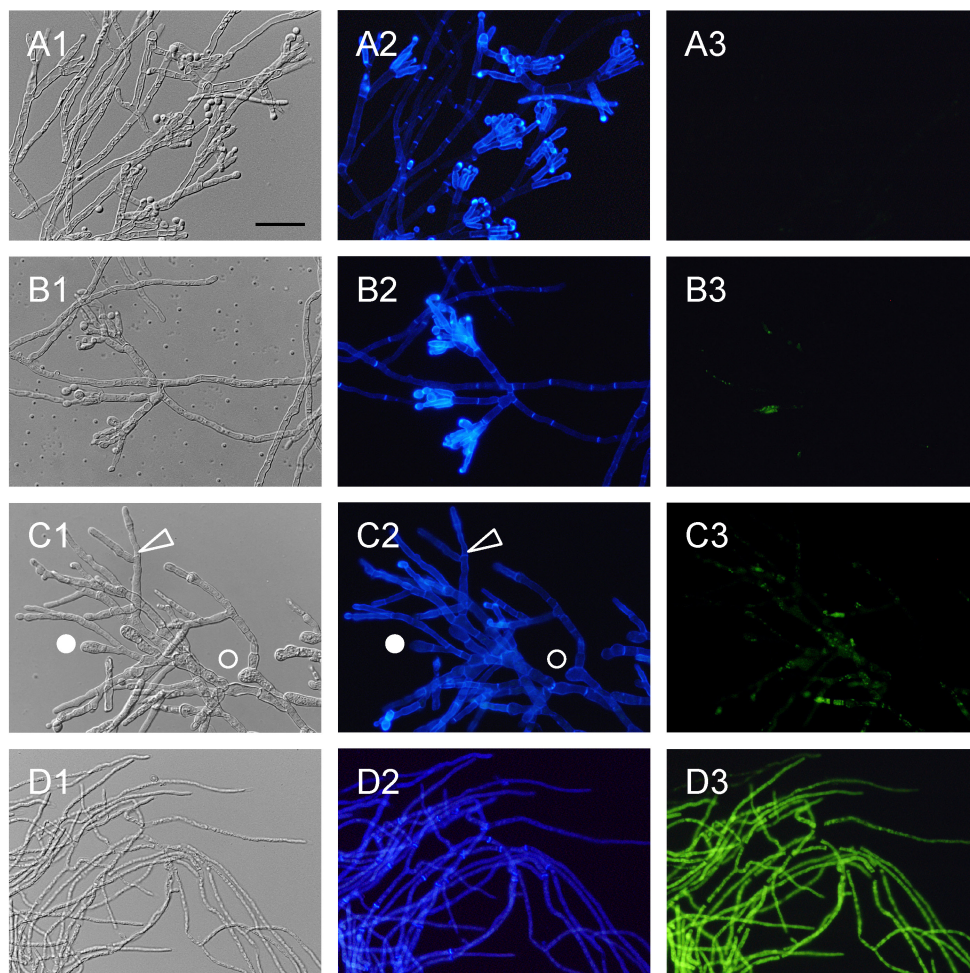


Figura 23. Efecto del péptido PAF26L sobre el aumento de biomasa del micelio de *P. digitatum* PHI-26 en fase de crecimiento exponencial. La flecha señala el momento de adición del péptido a las concentraciones finales indicadas.

Estas muestras de micelio tratado con diferentes concentraciones de PAF26L fueron posteriormente teñidas simultáneamente con los compuestos fluorescentes CFW y SG, y visualizadas mediante microscopía óptica de fluorescencia (ver Figura 24 en página siguiente). En los controles en los cuales *P. digitatum* se incubó con la sonda SG sin tratamiento con péptido, no se apreció señal de fluorescencia detectable mediante microscopía óptica (Figura 24A3) o microscopía confocal láser (datos no mostrados). Sobre las mismas muestras control, el fluoróforo CFW (Figura 24A2) mostró una tinción análoga a la descrita anteriormente (Figura 21A).

La incubación a las concentraciones MIC reveló la presencia de hifas totalmente colapsadas mostrándose muy parecidas las tinciones de SG y CFW, indicando la muerte celular caracterizada por la desorganización de las paredes y la permeabilización celular del micelio (Figura 24D). Este resultado es equivalente al obtenido en los trabajos iniciales de permeabilización con SG en donde se visualizaba la fluorescencia del micelio de muestras tratadas con PAF26D a altas concentraciones (López-García, 2002).

A estas concentraciones MIC de PAF26L, la tinción con CFW no se localizó preferentemente en determinadas zonas (conidióforos) como ocurría en los controles, si no que se mostró a lo largo de toda la hifa (Figura 24D2). También la fluorescencia del SG fue muy intensa detectándose prácticamente en todas las hifas del micelio (Figura 24D3). Por tanto, las hifas aparecían sin septos de separación definidos y exhibiendo la tinción verde del SG coincidiendo con zonas de acumulación de material intracelular. Observaciones similares a ésta han llevado a la conclusión de que la actividad de distintos AMP se basa en la permeabilización de microorganismos diana (Rajasekaran *et al.*, 2001; Oard *et al.*, 2004).



Sin embargo, el tratamiento con PAF26L a concentraciones sub-MIC mostró resultados cualitativamente distintos. El crecimiento fúngico observado a esas concentraciones (Figura 23) resultó presentar alteraciones morfológicas tal y como habíamos visto con el péptido LfcinB<sub>17-31</sub>, aunque la apariencia de dichas alteraciones era diferente. A 1  $\mu$ M de PAF26L (concentración cercana al IC<sub>50</sub>) la tinción de la quitina fue todavía predominante en los septos, ápices de hifas y conidióforos, aunque éstos mostraron una morfología anormal y las distancias intersepto disminuyeron (Figura 24B1-B2). Estas anomalías se visualizaron además en campos en los que prácticamente no se observó permeabilización mediante la sonda SG (Figura 24B3).

A concentraciones de 3-6  $\mu$ M de PAF26L, por encima del valor IC<sub>50</sub> pero todavía sub-MIC, se siguieron visualizando y con mayor frecuencia estructuras del micelio con la morfología alterada (Figura 24C). Al estudiarlas con más detalle (Figura 25), se observó además la presencia de un número significativo de ramificaciones laterales abortadas y dicotomías apicales en los extremos de las hifas en crecimiento. Así mismo, en algunos ejemplos los extremos de las hifas presentaban acúmulos de tinción con CFW (ver Figura 25A2). También se observó la formación de abombamientos en células individuales del micelio que pueden encontrarse en los ápices o en el interior de las hifas, además de la reducción de las distancias intersepto dentro de las hifas (Figura 25). Se puede visualizar en esos abombamientos que células aisladas aparecen con una tinción de CFW más intensa y evidente, lo cual indica alteraciones en la acumulación de quitina y/o componentes estructurales de las paredes fúngicas de esas zonas (Figura 25D2).

---

Figura 24. Microscopía óptica de fluorescencia del micelio de *P. digitatum* PHI-26 tratado con PAF26L. Se muestran micrografías del micelio del hongo sin tratamiento con el péptido (A) y después del tratamiento durante 48 h con PAF26L a las concentraciones finales de 1  $\mu$ M (B), 3  $\mu$ M (C) y 15  $\mu$ M (D). Después de la incubación, las muestras se tiñeron con CFW y SG. Los paneles 1-3 muestran en cada caso el mismo campo mediante contraste interferencial (paneles 1), fluorescencia azul emitida por el CFW (paneles 2) y fluorescencia verde producida por el SG (paneles 3). En las fotografías aparecen indicados los abombamientos en las células dentro de las hifas (○) o en las puntas apicales (●), junto con la presencia de dicotomías apicales del micelio (Δ). Barra: 25  $\mu$ m.

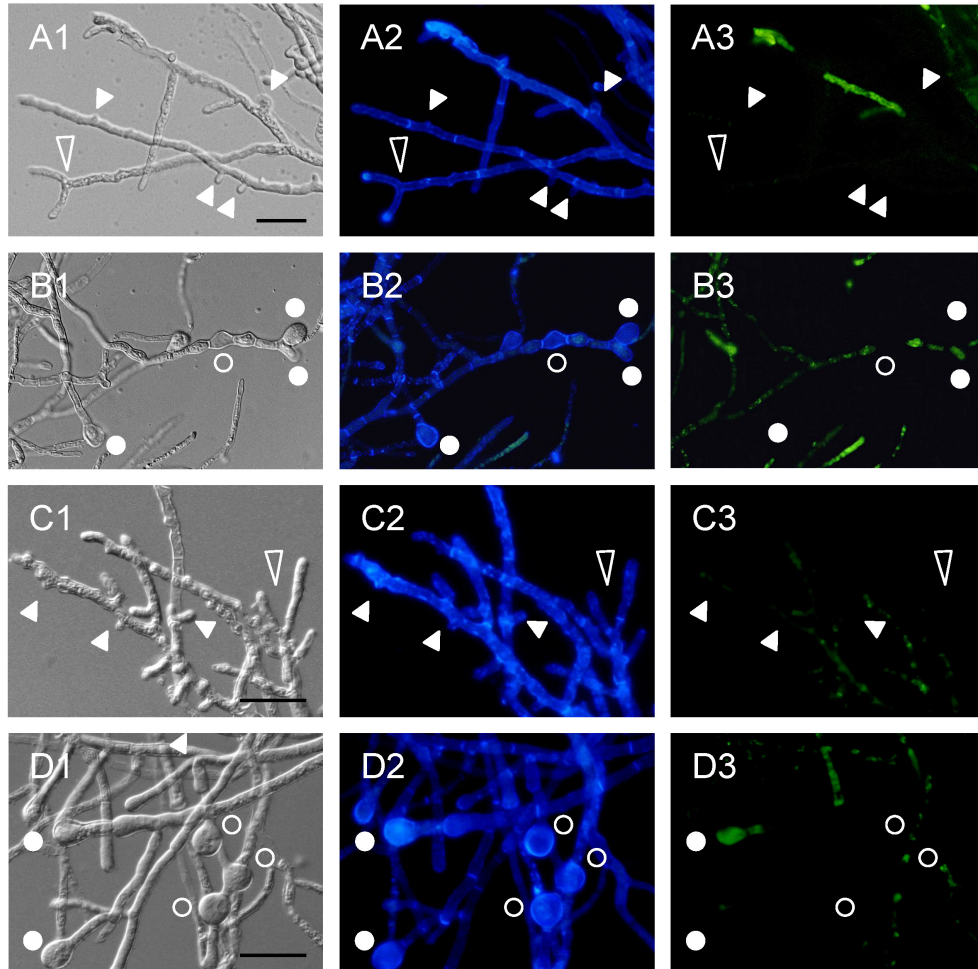


Figura 25. Microscopía óptica de fluorescencia del micelio de *P. digitatum* PHI-26 tratado con PAF26L. Se muestran las micrografías del micelio tratado con el péptido a las concentraciones finales de 1  $\mu\text{M}$  (A) y 3  $\mu\text{M}$  (B, C y D). Después de la incubación, las muestras fueron teñidas con CFW y SG. Los paneles representan las imágenes tomadas en campo claro con contraste interferencial (paneles 1), la fluorescencia emitida por el CFW (paneles 2) y por el SG (paneles 3) en los mismos campos de visión. En las fotografías aparecen indicados los abombamientos en las células dentro de las hifas (○) o en las puntas apicales (●), junto con la presencia de dicotomías apicales del micelio (▽) y de ramificaciones laterales abortadas (▲). Barra: 25  $\mu\text{m}$ .

Como ocurría anteriormente, todas estas alteraciones se observan generalmente en zonas carentes de fluorescencia de SG (Figura 25), lo que se interpreta como ausencia detectable de permeabilización celular. La tinción de CFW en otras muestras aparece desorganizada e irregular a lo largo de las paredes en comparación con las muestras no tratadas (Figura 25C2), sin mostrar en ningún caso preferencia por estructuras definidas como conidióforos, conidios o septos intercelulares, como ocurre en el caso de la visualización de los controles.

La observación mediante microscopia confocal láser mostró una discontinuidad en la distribución de la fluorescencia emitida por la sonda SG en células contiguas del micelio, con morfología normal o alterada, después del tratamiento a concentraciones sub-MIC de PAF26L (Figura 26). Esto sugiere distintas formas o estadios en la permeabilización, pudiéndose visualizar células: (i) con ausencia total de fluorescencia, es decir no permeabilizadas; (ii) con fluorescencia en forma de cuerpos discretos en el interior celular (flechas blancas en Figura 26); y por último (iii) con fluorescencia a lo largo de todo el

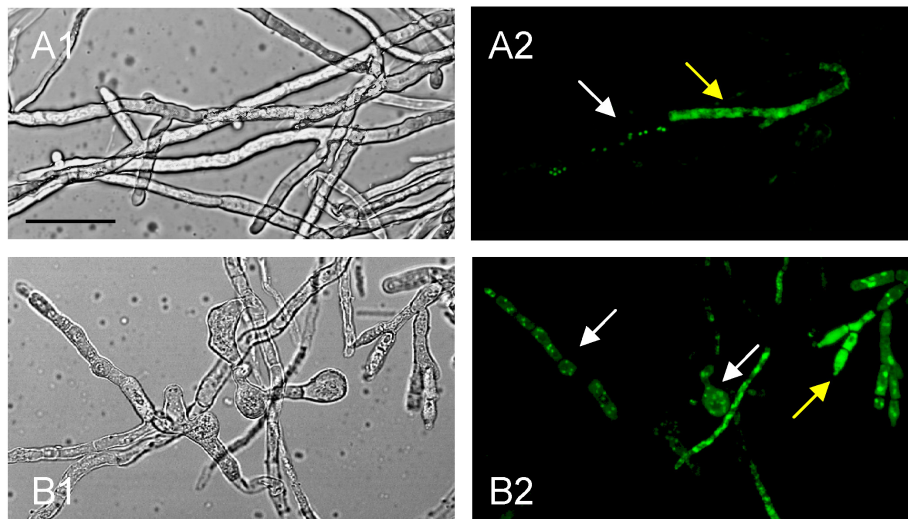


Figura 26. Microscopia confocal láser del micelio de *P. digitatum* PHI-26 tratado con PAF26L a la concentración de 3  $\mu\text{M}$ . Los paneles 1 representan las imágenes de campo claro y los paneles 2 la fluorescencia emitida por el SG, la cual aparece en algunos casos a lo largo de todo el citoplasma de la célula (flechas amarillas) o en forma de cuerpos discretos en el interior celular (flechas blancas). Barra: 25  $\mu\text{m}$ .



interior citoplasmático (flechas amarillas en Figura 26). También se puede observar cómo emergen pequeñas ramificaciones abortadas de las células no permeabilizadas o en las fases iniciales de permeabilización, (Figura 26A1).

Utilizando la tinción específica con el fluoróforo DAPI, hemos visualizado la distribución de los núcleos celulares en las células del hongo que presentan alteraciones morfológicas por exposición a PAF26L (Figura 27). El micelio de *P. digitatum* sin tratar con péptido mostró la distribución normal de núcleos, indicando aproximadamente un núcleo dentro de cada espacio intersepto (Figura 27A). Sin embargo, se observó que las células que presentan alteraciones en forma de abombamientos tras la exposición al péptido aparecían multinucleadas (Figura 27B). Estas células, con las paredes más gruesas y no permeabilizadas (como hemos visto en la Figura 25D2-3), presentan un gran número de núcleos distribuidos en el citosol celular (Figura 27B2).

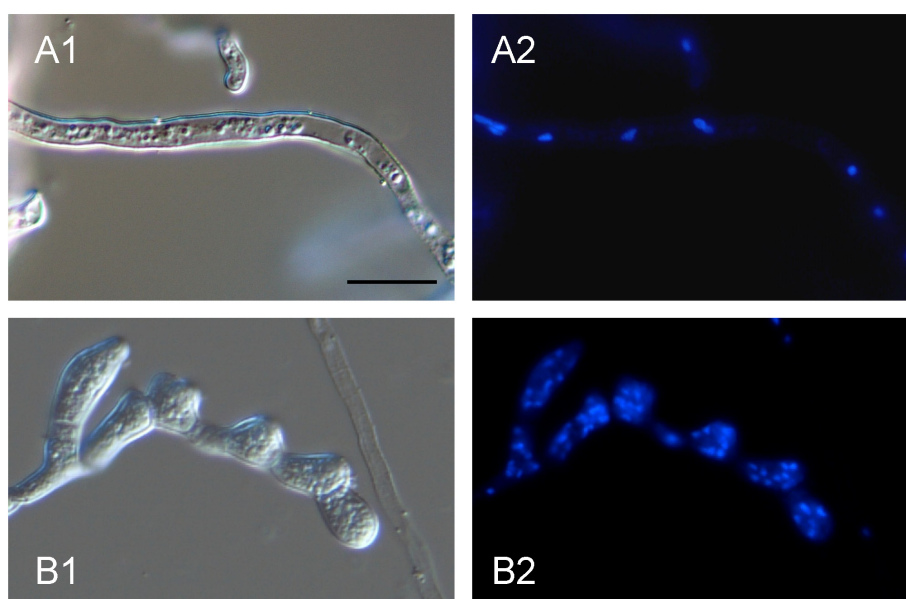


Figura 27. Visualización por microscopía óptica de fluorescencia de la tinción de núcleos con DAPI de células normales de *P. digitatum* (A) o células con alteraciones morfológicas causadas por la exposición a concentraciones sub-MIC de PAF26L (B). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

## 2.2. Actividad antimicrobiana y capacidad de permeabilización de PAF26. Estudio comparado con Melitina.

Las observaciones anteriores plantean la cuestión de la relación entre la actividad antimicrobiana de PAF26 y su efecto de permeabilización celular. Se diseñó un experimento para cuantificar la permeabilización producida sobre el micelio de *P. digitatum* por exposición a PAF26L, comparándola en paralelo con el efecto sobre el aumento de la biomasa del hongo. En condiciones experimentales similares a las usadas en la determinación de las propiedades inhibitorias de los péptidos sobre micelio del hongo (como las mostradas en la Figura 23), y tras 24 h de incubación con el péptido, se adicionó la sonda fluorescente SG. De este modo, se cuantificó la fluorescencia emitida, y se obtuvieron las curvas dosis-respuesta de permeabilización que permitieron evaluar la correlación existente entre las propiedades de inhibición del crecimiento y la permeabilización de PAF6L sobre *P. digitatum* (ver más adelante, Figura 28A).

La cuantificación de la fluorescencia registró una curva de incremento de permeabilización con el aumento de la dosis de péptido que era paralela a la curva de inhibición. Sin embargo, en diferentes experimentos realizados se observó que concentraciones de PAF26L cercanas al valor  $IC_{50}$  (0,5-1  $\mu$ M) tuvieron un efecto discernible sobre el crecimiento mientras que sólo producían un mínimo aumento en la permeabilización (Figura 28A). Este resultado complementa las observaciones microscópicas a concentraciones sub- $IC_{50}$ , en las que se encontró una pobre fluorescencia del SG en áreas del micelio con morfología y crecimiento alterado (Figura 24B y Figura 25A).

Para abordar la cuestión de la permeabilización celular desde otra perspectiva, decidimos hacer un estudio comparado con el péptido melitina (Tabla 9). El efecto antimicrobiano y tóxico de la melitina se debe a su incorporación en la bicapa lipídica de membranas biológicas, la segregación de fosfolípidos y la consiguiente desorganización de la bicapa y permeabilización celular (Matsuzaki *et al.*, 1997). La melitina ha sido ampliamente estudiada como un modelo de péptido citotóxico que interacciona con membranas (Bechinger y Lohner, 2006). Nuestro grupo ha mostrado que la melitina presenta actividad inhibitoria frente a *P. digitatum* similar a la de PAF26D, aunque con mayor potencia antibacteriana (López-García *et al.*, 2002).

Tabla 9. Secuencias de los péptidos ensayados.

Péptido	Secuencia <sup>a</sup>
PAF26L	Ac-RKKWFW-NH <sub>2</sub>
Melitina	GIGAVLKVLTGTPALISWIKRKRQQ
Mel.subK7I	GIGAVLIVLTGTPALISWIKRKRQQ

<sup>a</sup> El código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 2.

Además, se utilizó en nuestro estudio un análogo de secuencia de la melitina, el péptido mel.subK7I (Tabla 9), que presenta propiedades alteradas en términos de estructura, interacción con membranas lipídicas y toxicidad celular (Pérez-Payá *et al.*, 1994; Marcos *et al.*, 1995). Mel.subK7I es un análogo de la melitina con una única sustitución de Lys por Ile en la posición 7, la cual implica una reducción en su interacción con membranas y disminución de su toxicidad sobre glóbulos rojos humanos, medida por sus propiedades hemolíticas (Pérez-Payá *et al.*, 1994).

Se realizaron una serie de experimentos con el objetivo de comparar distintas propiedades de PAF26L y de melitina, relacionadas con su carácter antimicrobiano y su capacidad de permeabilización celular (ver este subapartado y los dos siguientes). En primer lugar, se determinaron los parámetros antimicrobianos de melitina y Mel.subK7I en ensayos estándar de inhibición del crecimiento. Además, y de modo similar a lo efectuado para el péptido PAF26L, se realizaron experimentos de adición de péptido a distintas concentraciones finales sobre micelio de *P. digitatum* crecido 24 h en medio 5% PDB (Tabla 10).

Al igual que ocurre con PAF26L, los valores inhibitorios de melitina y mel.subK7I difieren ligeramente al ensayarse frente a micelio o conidios. El péptido melitina que sobre conidios muestra una mayor actividad inhibitoria que PAF26L (IC<sub>50</sub> de 1,1 µM y MIC de 4 µM) pasa a tenerla menor sobre micelio (2,9 y 8 µM, de IC<sub>50</sub> y MIC respectivamente) (compárense en Tabla 10). El péptido mel.subK7I posee menores actividades antimicrobianas que su secuencia parental melitina y que PAF26L, en ambas condiciones (Tabla 10).



**Tabla 10. Valores inhibitorios de los péptidos ensayados frente a *P. digitatum* PHI-26.**

Péptido	Conidios (5% PDB)		Micelio (5% PDB)	
	IC <sub>50</sub> (μM)	MIC (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	MIC (μM)
PAF26L	2,2 ± 0,2	4	1,3 ± 0,4	6
Melitina	1,1 ± 0,5	4	2,9 ± 0,7	8
Mel.subK7I	3,2 ± 0,9	8	n.d. <sup>a</sup>	>15

<sup>a</sup>n.d., no determinado.

En las curvas dosis-respuesta para los péptidos melitina (Figura 28B) y mel.subK7I (Figura 28C) se puede observar, al igual que ocurre con PAF26L, que la permeabilización que se produce es dependiente de la concentración de péptido y se correlaciona con la inhibición del crecimiento fúngico, a mayor concentración aumenta la permeabilización y decrece el crecimiento. Sin embargo, en ambos péptidos no ocurre como en el caso de PAF26L que a concentraciones cercanas al IC<sub>50</sub> se produce un descenso significativo en el crecimiento sin apenas observarse permeabilización (Figura 28A). En melitina, y también en mel.subK7I, ambas curvas de crecimiento-permeabilización se encuentran más ligadas entre sí (Figura 28B-C). En el caso de la melitina además, a altas concentraciones y también a lo largo del tiempo, la fluorescencia decae, lo cual podría indicar la degradación del material intracelular debido a la extensa permeabilización producida (Figura 28B).

Como ya hemos indicado, los registros de fluorescencia de la Figura 28 están tomados a las 2 h de adición de SG, la cual se produjo después de 24 h de exposición a los péptidos. Se realizaron ensayos adicionales para determinar las cinéticas de permeabilización del micelio durante las 3 primeras horas de exposición a los péptidos. Simultáneamente a la adición de éstos, se añadió la sonda SG y se registró el incremento de fluorescencia en intervalos de 2 min (Figura 29). Estos ensayos también sugieren diferencias en el modo de acción de los tres péptidos. En las concentraciones de 3 a 15  $\mu\text{M}$  de melitina se vieron incrementos de fluorescencia muy rápidos y similares entre sí durante los

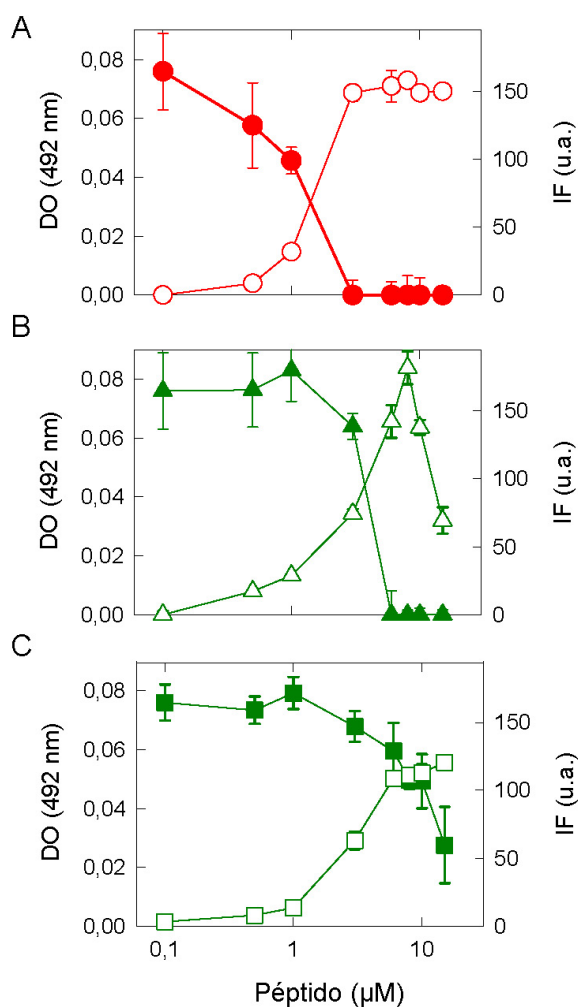


Figura 28. Efecto sobre el crecimiento y el aumento de la fluorescencia de la sonda SG en micelio de *P. digitatum* PHI-26. El hongo se creció en medio 5% PDB durante 24 h e incubó nuevamente 24 h con los péptidos PAF26L (A), Melitina (B) y mel.subK7I (C). Tras la incubación se añadió la sonda SG y tras 2 h de incubación adicional se determinaron los valores de DO a 492 nm (símbolos llenos) y de IF a 538 nm (símbolos vacíos) (u.a. unidades arbitrarias). Los valores corresponden a las medias  $\pm$  la desviación estándar de las tres réplicas realizadas.

primeros 30 min (Figura 29B), mientras que en el caso de PAF26L y mel.subK7I, los incrementos fueron más lentos y diferentes para las distintas concentraciones (Figura 29A y C). Estos datos indican una rápida y más eficiente permeabilización de las membranas fúngicas por parte de melitina. A las concentraciones más altas se detectó una estabilización y posterior descenso de fluorescencia (similar a lo observado en la Figura 28B), lo cual sugiere la degradación de los componentes intracelulares.

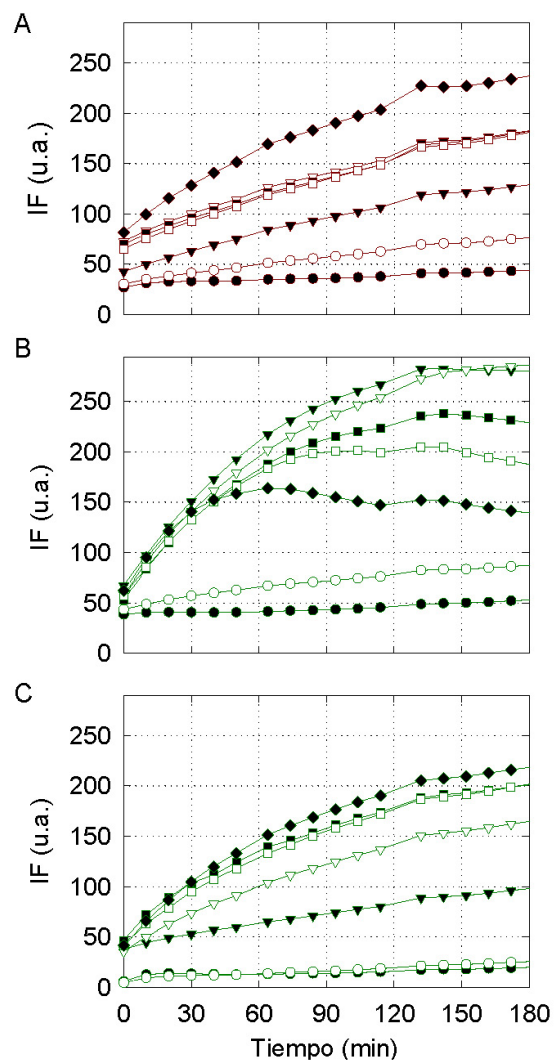


Figura 29. Cinéticas de permeabilización del micelio de *P. digitatum* PHI-26 tras la adición de los péptidos PAF26L (A), Melitina (B) y mel.subK7I (C). Se añadió la sonda SG junto con los péptidos a las concentraciones de 0,5 (●), 1 (○), 3 (▼), 6 (▽), 8 (■), 10 (□) y 15 (◆)  $\mu$ M, registrándose el incremento de fluorescencia emitida por la sonda SG a 538 nm. en intervalos de 2 min durante 3 las horas siguientes de incubación.

### 2.3. Actividad fungicida sobre conidios.

Los diferentes modos de permeabilización sobre las células del micelio del hongo por parte de los péptidos PAF26L y melitina, nos llevaron a explorar la actividad fungicida de ambos péptidos sobre los conidios de *P. digitatum*.

En una serie de experimentos, se determinó la viabilidad de conidios tras su incubación con los dos péptidos a distintas concentraciones y/o durante distintos tiempos de tratamiento. Como ejemplo, se muestran los resultados obtenidos a una concentración alta, 30  $\mu\text{M}$ , por encima de los valores MIC obtenidos en los distintos ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento para cualquiera de los dos péptidos. Esta concentración ya hemos mostrado que es fungicida sobre conidios de *P. digitatum* en los ensayos realizados anteriormente con PAF26L y los péptidos derivados de LfcinB (Figura 19). Se obtuvo una cinética de la pérdida de viabilidad de conidios en función del tiempo de contacto con los péptidos (Figura 30). Se aprecia cómo los dos péptidos difieren marcadamente en su capacidad fungicida sobre las esporas. Tras 15 min de tratamiento, PAF26L es capaz de reducir la viabilidad de los conidios

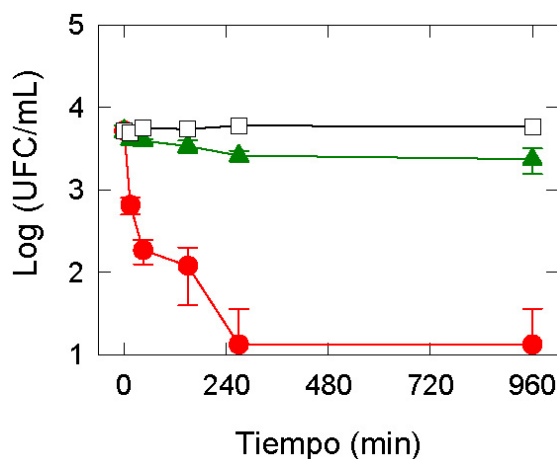


Figura 30. Cinética de actividad fungicida de los péptidos Melitina y PAF26L sobre conidios de *P. digitatum* PHI-26. Las esporas se incubaron en agua estéril a diferentes tiempos desde 15 min hasta 16 h en ausencia de péptido (□) o en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de PAF26L (●) y melitina (▲). Los valores muestran los datos medios  $\pm$  la desviación estándar de los recuentos realizados de cada muestra por triplicado.

en un orden de magnitud (de  $10^4$  a  $10^3$  conidios/mL), y ya a partir de los 60 min reducir el porcentaje de viabilidad en más de un 99%. En contraposición a este efecto, en los conidios tratados con melitina sólo se observa una pequeña reducción en la viabilidad tras un tratamiento como mínimo de 16 h. Este resultado pone de manifiesto nuevamente la existencia de diferentes mecanismos de actuación antimicrobiana de PAF26L y de melitina sobre el hongo de estudio *P. digitatum*.

#### **2.4. Actividad hemolítica sobre glóbulos rojos.**

Se evaluó la citotoxicidad de los péptidos melitina y PAF26L a través de un ensayo de hemólisis sobre glóbulos rojos humanos. La actividad hemolítica de numerosos péptidos catiónicos se ha estudiado y comparado con su actividad antimicrobiana, sirviendo incluso de ensayo de referencia para optimizar las propiedades antimicrobianas de AMP que se pretendan utilizar en estrategias terapéuticas o en protección fitopatológica.

Los ensayos de actividad hemolítica se realizaron a tres concentraciones de péptido (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ). El límite de detección en nuestras condiciones experimentales fue de 0,3% de la hemólisis del control. Los resultados obtenidos demuestran una reducida citólisis del péptido PAF26L frente a eritrocitos humanos (ver Tabla 11 en página siguiente). De acuerdo con las distintas concentraciones ensayadas, PAF26L mostró del orden de  $10^3$ - $10^4$  veces menos actividad hemolítica que el péptido melitina. Este resultado confirma el distinto modo de acción de los dos péptidos y además sugiere la existencia de una interacción distinta con las membranas biológicas del péptido PAF26L a la que posee un péptido citolítico como la melitina. Por otro lado, también confirmamos la reducción en la citotoxicidad del análogo de melitina mel.subK7I en aproximadamente cuatro veces por la simple sustitución en uno de sus residuos, como se ha descrito previamente (Pérez-Payá *et al.*, 1994).

**Tabla 11. Actividades hemolíticas de los péptidos sobre glóbulos rojos humanos <sup>a</sup>.**

Péptido	Concentración de péptido ensayada ( $\mu\text{M}$ )		
	1	10	100
PAF26L	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Melitina	< 0,3	32,7 $\pm$ 0,7	115,7 $\pm$ 2,5
Mel.subK7I	< 0,3	9,1 $\pm$ 0,7	30,2 $\pm$ 2,8

<sup>a</sup> Los valores indican el porcentaje de hemólisis relativa al control 100% obtenido en el tratamiento con 0,1% de Tritón X-100. El límite de detección del ensayo es 0,3 % de hemólisis.

## 2.5. Localización de PAF26 marcado con FITC.

El marcaje fluorescente y la microscopia confocal láser se han utilizado en trabajos previos para investigar la interacción entre péptidos catiónicos y distintos microorganismos (Vives *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2000; Kragol *et al.*, 2002; van der Kraan *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2006). PAF26L fue sintetizado con su extremo N-terminal modificado mediante la adición covalente del fluoróforo FITC con el objetivo de visualizar su interacción con conidios y micelio del hongo *P. digitatum*.

En primer lugar se comprobó que la adición covalente del fluoróforo FITC no influía en la actividad antimicrobiana del péptido PAF26L sobre *P. digitatum*. También se analizó que el compuesto fluorescente no tuviera un efecto por sí solo sobre el crecimiento del hongo (Figura 31). FITC-PAF26L apenas difirió en su actividad antifúngica de PAF26L, y el compuesto FITC no mostró actividad antimicrobiana alguna, lo que nos indicó que el marcaje de PAF26L con FITC tuvo un efecto mínimo en su bioactividad.

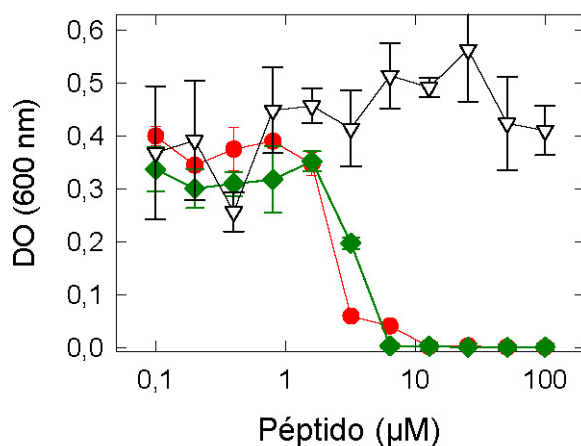


Figura 31. Curvas dosis-respuesta del efecto sobre el crecimiento de *P. digitatum* PHI-26 de los péptidos PAF26L (●) y FITC-PAF26L (◆), y del fluoróforo FITC (▽). Se expusieron  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL en medio líquido 5% PDB a la presencia de los péptidos o el compuesto FITC a distintas concentraciones. Las curvas muestran los datos medios de  $DO_{600\text{ nm}} \pm$  la desviación estándar después de 48 h de incubación. Los valores calculados de  $IC_{50}$  de PAF26L y FITC-PAF26L no difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

### 2.5.1. Interacción con conidios.

Se incubaron conidios en agua estéril con el péptido FITC-PAF26L a las concentraciones de 0,3, 3 y 30  $\mu\text{M}$ , durante distintos tiempos. Sólo a la mayor concentración ensayada de FITC-PAF26L (30  $\mu\text{M}$ ) se observó una señal positiva de fluorescencia mediante microscopía confocal láser (Figura 32A-B). A los 30 min de incubación la fluorescencia se visualizó en las envueltas exteriores de la espora, y sólo una muy pequeña cantidad se podía observar en el interior celular (Figura 32A).

Después de tiempos de incubación mucho más largos ( $\geq 16$  h) y también a la concentración más elevada (30  $\mu\text{M}$ ), se pudo observar una clara fluorescencia en el interior de la espora, que indicaba que el péptido FITC-PAF26L había sido internalizado (Figura 32B). La señal de fluorescencia estaba excluida de las envueltas exteriores (ver la superposición de imágenes en Figura 32B3). En estas condiciones, la presencia de la fluorescencia interior se pudo

ver en un 42% del total de los conidios visibles. Además, se pudo distinguir de forma clara el colapso de las membranas internas de la espora por debajo de la cubierta exterior, retraídas hacia el interior celular, en comparación con conidios sin péptido o incubados sólo 30 min (comparar Figura 32A con Figura 32B-C).

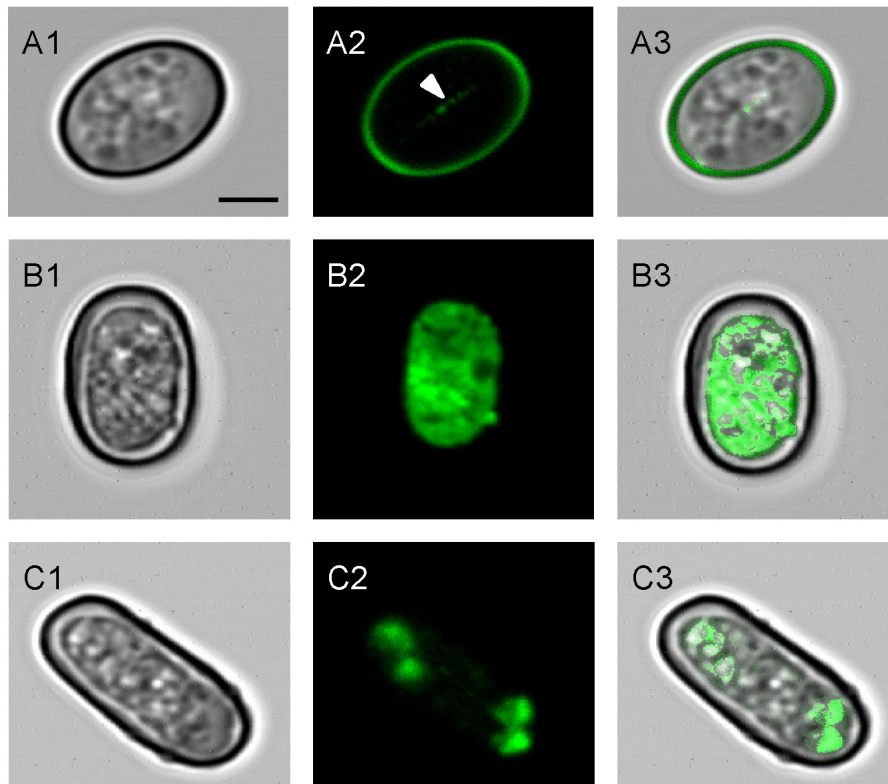


Figura 32. Visualización de la interacción de FITC-PAF26L con conidios de *P. digitatum* PHI-26 mediante microscopia confocal láser. Conidios en estado quiescente incubados con el péptido a la concentración de 30  $\mu$ M en agua estéril durante 30 min (A) o 16 h (B). (C) Tratamiento de los conidios con PAF26L a 30  $\mu$ M durante 16 h y posterior tinción con la sonda fluorescente SG. Las fotografías muestran el mismo campo de visión en campo claro (paneles 1), fluorescencia (paneles 2) y la superposición de las dos imágenes (paneles 3). La cabeza de flecha (A2) señala la mínima fluorescencia observada en el interior de la espora. Barra: 5  $\mu$ m.



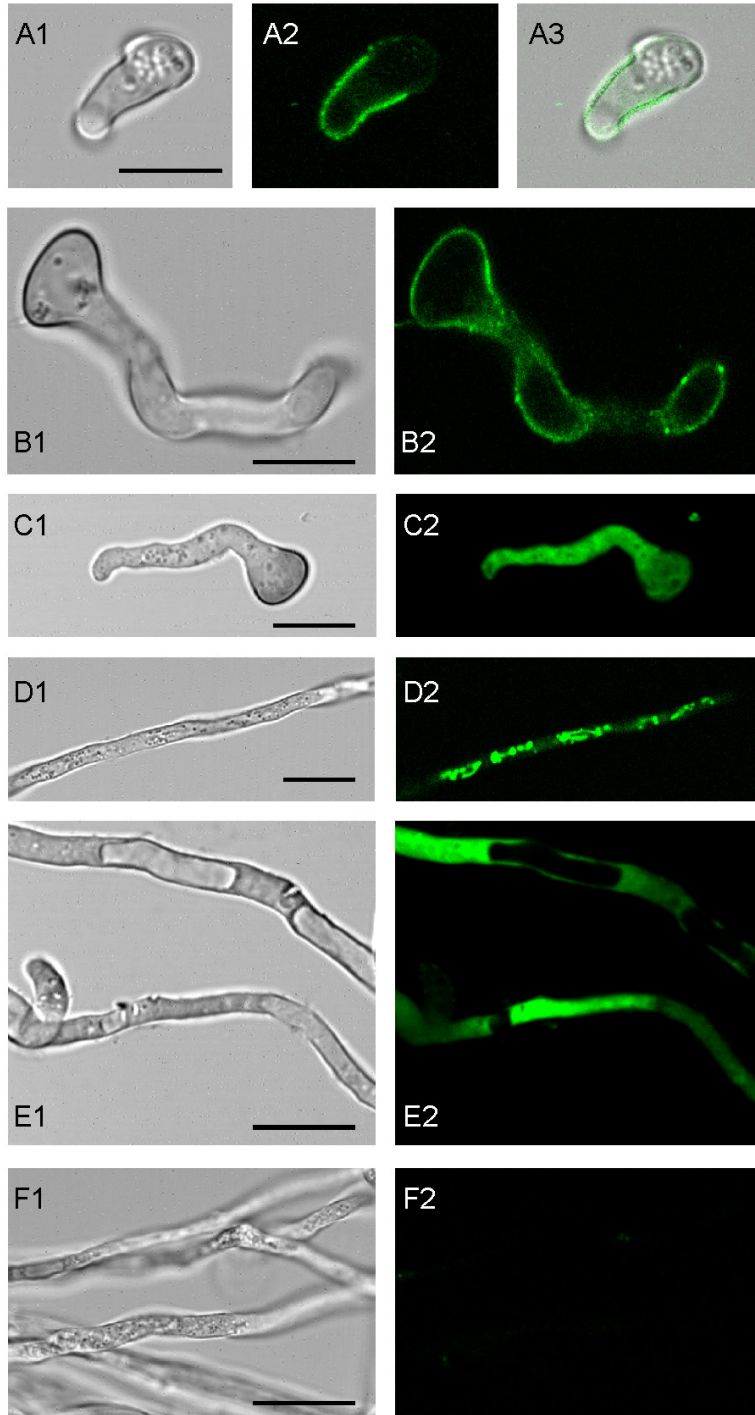
En un experimento diferente, se incubaron conidios con PAF26L sin marcar a esas condiciones de alta concentración (30  $\mu\text{M}$ ) y largo tiempo (16 h), y en presencia de la sonda fluorescente SG. Se observó por microscopía la permeabilización de la espora utilizando la sonda SG (Figura 32C), de forma análoga a lo que ocurría en el caso de micelio (ver Figura 24 y Figura 25).

### 2.5.2. Interacción con tubos germinativos y micelio en crecimiento.

A continuación se pasó a estudiar la interacción de FITC-PAF26L con conidios que están germinando y micelio en desarrollo. Para ello a esporas incubadas en medio de crecimiento 5% PDB durante un tiempo mínimo de 14-16 h, tiempo en torno al cual rompe el tubo germinativo de la espora, se les adicionó el péptido FITC-PAF26L igual que en el caso anterior a las concentraciones de 0,3, 3 y 30  $\mu\text{M}$ . Tras su incubación durante distintos tiempos, las muestras se visualizaron, mediante microscopía confocal.

En estos experimentos realizados con tubos germinativos y micelio, hay que remarcar la diferencia existente con la visualización de las esporas a las distintas concentraciones de FITC-PAF26L. A las concentraciones mayores la saturación en la fluorescencia era muy elevada, y hacía imposible discernir si en la interacción existían zonas o estructuras preferentes.

En las muestras de conidios germinando la interacción FITC-PAF26L era visible a la menor concentración ensayada (0,3  $\mu\text{M}$ ); por lo tanto se examinaron todas las muestras a esa concentración de péptido marcado. La interacción ocurre rápidamente, en 1-2 min después de la adición de péptido, con las paredes y membranas de los tubos germinativos en crecimiento (Figura 33A), difundiéndose después por la membrana plasmática de forma lateral hasta la espora germinada (Figura 33B). A continuación, a partir de los 5 min de incubación, el péptido se localizó en el interior celular rellenando todo el espacio citoplasmático (Figura 33C). De esta manera se demuestra que tras un corto espacio de tiempo el péptido PAF26L es capaz de internalizarse a concentraciones a las cuales no es observable un efecto en la permeabilización celular (Figura 28A). A tiempos más largos, el péptido FITC-PAF26L se observaba disperso por el citoplasma de las células (Figura 33E) o concentrado en vesículas o pequeños cuerpos discretos en el interior celular (Figura 33D), los cuales todavía no han sido identificados.



El micelio tratado simultáneamente con el fluoróforo FITC y el péptido PAF26L sin marcar, ambos a la concentración de 0,3  $\mu\text{M}$ , no mostró señal de fluorescencia ni en las paredes ni en el interior celular (Figura 33F). Este resultado demuestra que la internalización del FITC requiere la unión covalente al péptido, y también que a esa concentración PAF26L es incapaz de hacer permeables las paredes celulares a moléculas como el FITC (Figura 33F) o la sonda SG (Figura 29A).

### 2.5.3. Interacción con células de *S. cerevisiae*.

En experimentos paralelos a los realizados con *P. digitatum*, se estudió cómo se produce la interacción del péptido FITC-PAF26L con el hongo unicelular modelo *S. cerevisiae*. Estos experimentos estaban inicialmente concebidos para evaluar la especificidad de las interacciones que estábamos visualizando. PAF26L ha mostrado mayor actividad antimicrobiana sobre el hongo filamentoso que sobre la levadura, en comparación con otros AMP, como el péptido LfcinB<sub>17-31</sub> (Figura 18) o el péptido melitina (López-García *et al.*, 2002), los cuales poseen mayor actividad antimicrobiana sobre *S. cerevisiae* que PAF26L.

Se visualizó por microscopia confocal la interacción de FITC-PAF26L a distintas concentraciones con *S. cerevisiae* y durante varios intervalos de tiempo (Figura 34). El primer resultado observable fue que sólo era posible visualizar el péptido FITC-PAF26L si estaba a concentraciones como mínimo de 15  $\mu\text{M}$ , por debajo de ésta no se detectaba la fluorescencia (datos no

---

Figura 33. Visualización de la interacción de FITC-PAF26L con conidios germinando (A-C) y células de micelio crecido (D y E) de *P. digitatum* PHI-26 mediante microscopia confocal láser. Se incubó FITC-PAF26L a la concentración de 0,3  $\mu\text{M}$  durante menos de 2 min (A y B), 5 min (C), y 15 min (D y E). (F) Micelio de *P. digitatum* expuesto simultáneamente a la presencia de 0,3  $\mu\text{M}$  de FITC y 0,3  $\mu\text{M}$  de PAF26L durante 5 min. Las fotografías muestran el mismo campo de visión bajo luz normal (paneles 1), fluorescencia (paneles 2) y la superposición de las dos imágenes (paneles 3). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

mostrados). Se visualizaron las células de *S. cerevisiae* a la concentración de 30  $\mu\text{M}$  incubadas con FITC-PAF26L durante 2, 5 y 30 min y más de 1 h. En los primeros instantes se vio que la interacción se produce de forma desigual con las células de la levadura, en algunas rápidamente se visualiza el péptido en el interior celular mientras que con otras no muestra ninguna interacción (Figura 34A).

Al aumentar el tiempo de incubación (a partir de los 30 min), se consigue una interacción del péptido marcado con prácticamente todas las células de la muestra (Figura 34B). Además, tanto a tiempos cortos como largos, la fluorescencia siempre se observó en el citoplasma celular, exenta de la pared exterior (Figura 34B3), y nunca se observó una fase inicial de interacción con las envueltas celulares, tal y como ocurre con *P. digitatum*.

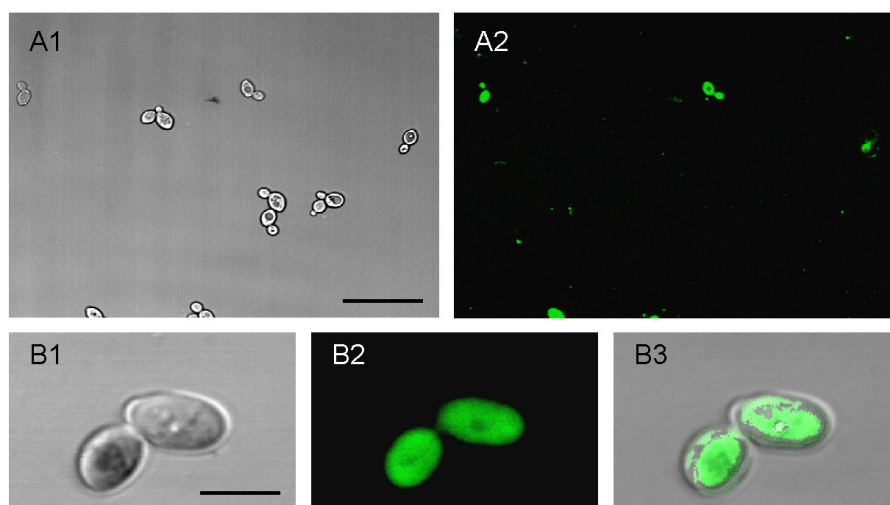


Figura 34. Visualización de la interacción de FITC-PAF26L con la levadura *S. cerevisiae* FY1679 en microscopia confocal láser.  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL de la levadura crecidas en un cultivo nocturno de YPD se resuspendieron en medio 10% YPD e incubaron con el péptido FITC-PAF26L a la concentración de 30  $\mu\text{M}$  durante 5 min (A) y 1 h (B). El panel B3 muestra la superposición de las dos imágenes. Barra: 25  $\mu\text{m}$  (A) y 5  $\mu\text{m}$  (B).

## 2.6. Estudio de la interacción de PAF26 con tRNA.

Vista la capacidad del péptido FITC-PAF26L para translocarse al interior celular, y considerando su carácter catiónico, se evaluó la potencial interacción de PAF26L con ácidos nucleicos.

De forma similar a otros estudios (Moreno *et al.*, 2006), el análisis se realizó mediante un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) utilizando tRNA de levadura. Se incubó una cantidad de 250 ng de tRNA con distintas concentraciones de PAF26, y se determinó su movilidad en un gel de poliacrilamida (Figura 35). La unión del péptido a tRNA se detectó a partir de 8  $\mu\text{M}$ , observándose la desaparición de la banda correspondiente al tRNA libre hasta en un 80% del total a las concentraciones de 32-64  $\mu\text{M}$  (Figura 35). Las concentraciones a las cuales se produce la unión PAF26L:RNA en estos experimentos indican una interacción inespecífica. Además, se observa que el tRNA unido aparece formando un continuo de movilidad electroforética, no observándose bandas definidas como se ha descrito en el caso de péptidos de unión específica a ácidos nucleicos (Aparicio *et al.*, 2003). Estos datos nos permiten concluir que PAF26L tiene la capacidad de unir inespecíficamente tRNA (y probablemente otros ácidos nucleicos celulares).

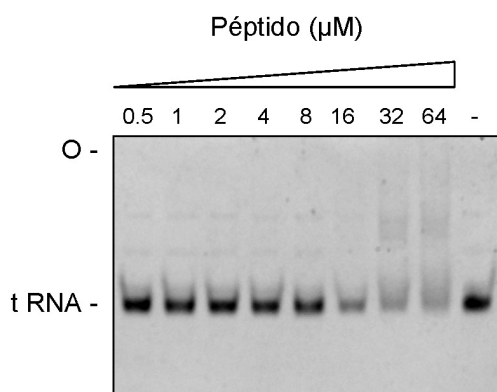


Figura 35. Análisis de las propiedades de unión a tRNA de PAF26L mediante EMSA. tRNA comercial de levadura fue incubado con PAF26L a las concentraciones indicadas arriba y analizada su movilidad electroforética en gel de poliacrilamida 10%. Las posiciones del origen (O) y de la banda de t RNA libre aparecen indicadas a la izquierda.

## 2.7. Estudio comparado de la actividad de PAF26 y otros compuestos antimicrobianos sobre especies del género *Penicillium*.

Para completar la caracterización de la actividad del péptido PAF26, ésta se ha comparado con la de otros compuestos antimicrobianos de propiedades conocidas, con el objetivo de aportar datos sobre las bases que definen la susceptibilidad a PAF26 en hongos del género *Penicillium*.

Este estudio se realizó sobre cuatro especies de *Penicillium*. Como ya se ha comentado, *P. digitatum* y *P. italicum* son patógenos naturales de frutos cítricos. Otra especie de *Penicillium* de gran importancia en postcosecha de frutos es *P. expansum*, patógeno de frutos de pepita como manzanas o peras. Este último posee una muy reducida virulencia sobre frutos cítricos, mientras que *P. brevicompactum* se muestra prácticamente avirulento en cítricos (López-García, 2002). Estas cuatro especies de *Penicillium* poseen además diferencias morfológicas en su crecimiento en placa en cuanto a su aspecto, color y compactación del micelio (Figura 36). En los resultados previos de nuestro grupo (López-García, 2002) y en los obtenidos en el transcurso del presente trabajo, se observa una distinta sensibilidad a PAF26 de estas cuatro especies.

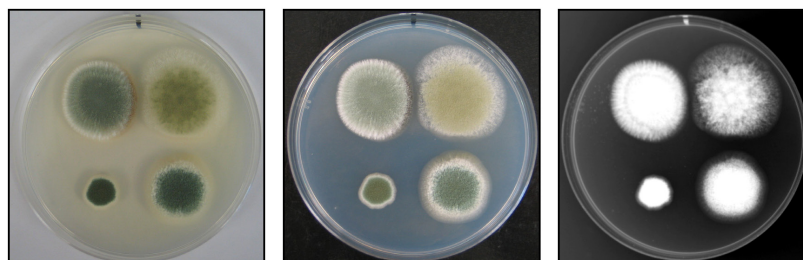


Figura 36. Aspecto y crecimiento en placa de medio sólido PDA de las cuatro especies de *Penicillium* ensayadas. Desde la parte superior izquierda y en sentido horario aparecen *P. italicum* PHI-1, *P. digitatum* PHI-26, *P. expansum* PHI-65, y *P. brevicompactum* PHI-8. Los conidios de los hongos se aplicaron en forma de gotas de 2,5  $\mu$ L desde una solución de  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL. Las placas se incubaron durante 3-4 días a la temperatura de 24° C. Esta disposición de los hongos será la utilizada en los ensayos en placa realizados en este apartado con los distintos compuestos antimicrobianos. Se muestran las fotografías a color con fondo blanco y negro (izquierda y centro, respectivamente), y el negativo sin color (derecha) que será la mostrada en los distintos resultados expuestos en este apartado.

### 2.7.1. Comparativa de la susceptibilidad a PAF26 y a CFW.

En anteriores trabajos se había encontrado en las cuatro especies de *Penicillium* un perfil de sensibilidad a la acción del péptido PAF26D que se correlaciona con su virulencia sobre frutos cítricos (López-García, 2002). Así, en medio completo PDB, los no patógenos de cítricos *P. expansum* y *P. brevicompactum* fueron insensibles a PAF26D a las concentraciones ensayadas, mientras que los más sensibles al péptido fueron *P. digitatum* y *P. italicum*.

En el presente trabajo, se realizaron experimentos adicionales de inhibición y ensayos de actividad fungicida del péptido. La Figura 37A muestra el estudio en medio completo PDB o diluido al 5%; en el primer caso se confirman los resultados anteriores y en el segundo la actividad del péptido se hace más evidente, pudiéndose observar que el hongo más resistente fue *P. brevicompactum*. Este perfil de susceptibilidad al efecto de PAF26D en medio líquido se reproduce al evaluar la actividad fungicida del péptido sobre esporas sin germinar de las cuatro especies. Nuevamente *P. digitatum* resulto tener la mayor sensibilidad al péptido y *P. brevicompactum* la menor (Figura 37B).

Hemos usado el blanco de calcofluor (CFW) para visualizar las células de *P. digitatum* mediante microscopía. Pero además es conocido su efecto antimicrobiano, ya que interacciona con las paredes celulares, interfiriendo con su formación e inhibiendo el crecimiento y el desarrollo normal del hongo. Históricamente, el CFW ha sido un compuesto utilizado en métodos de escrutinio de colecciones de mutantes con alteraciones en los genes responsables de la biosíntesis de quitina y por tanto con diferencias en la estructura de sus paredes celulares (Roncero *et al.*, 1988a; 1988b; Ram *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 2006).

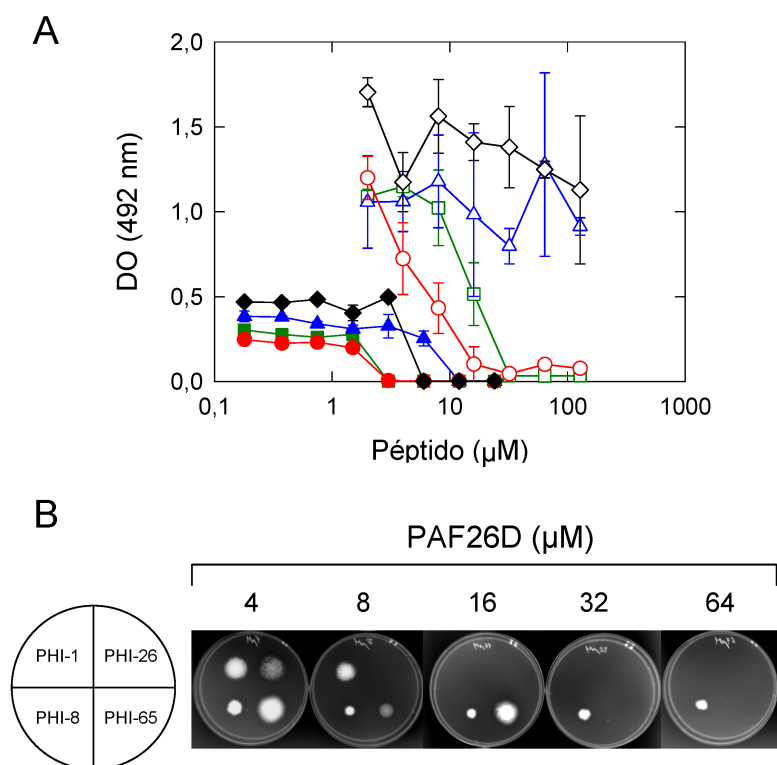


Figura 37. Crecimiento de cuatro especies de *Penicillium* en presencia de PAF26D en medio líquido (A), o en medio sólido tras la exposición de esporas de los hongos al péptido (B). (A) Curvas dosis-respuesta de *P. digitatum* PHI-26 (círculos rojos), *P. italicum* PHI-1 (cuadrados verdes), *P. expansum* PHI-65 (rombos negros) y *P. brevicompactum* PHI-8 (triángulos azules) en medio 5% PDB (símbolos llenos) o en medio completo (símbolos vacíos). (B) Placas de PDA con el crecimiento de alícuotas de los hongos (2,5 µL desde una suspensión de  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL) tras una exposición de 16 h a PAF26D a las concentraciones finales indicadas.

Se comparó la susceptibilidad al CFW en las cuatro especies de *Penicillium*. Se realizaron ensayos en placas de medio sólido PDA a las que se adicionaron concentraciones crecientes de CFW y sobre las que se depositaron conidios de los hongos (Figura 38). Se obtuvo de este modo un perfil de sensibilidad a la acción del CFW en los cuatro aislados. Los hongos sobre los que el CFW resultó más inhibitorio fueron *P. digitatum* (a 125 µg/mL no se obtuvo ya crecimiento) y *P. italicum* (150 µg/mL), con notables diferencias con



*P. expansum* (250  $\mu\text{g/mL}$ ) y *P. brevicompactum* ( $>300 \mu\text{g/mL}$ ). Es de destacar que este perfil comparado de susceptibilidad al CFW por los cuatro hongos fue muy similar al encontrado para el péptido PAF26D (Figura 37).

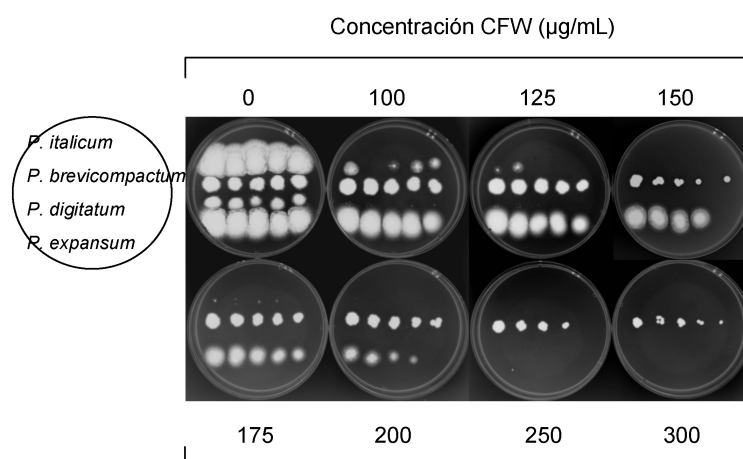


Figura 38. Crecimiento de las cuatro especies de *Penicillium* en presencia de concentraciones crecientes de CFW en medio sólido de crecimiento PDA. Las esporas se aplicaron sobre las placas en forma de gotas de 2,5  $\mu\text{L}$  desde una suspensión de  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL y diluciones seriadas 1/2 de ésta.

### 2.7.2. Comparativa con otros antimicrobianos y condiciones de estrés.

Seguidamente, se comparó la susceptibilidad de los hongos a otras dos moléculas de efecto antimicrobiano: el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el dodecil sulfato sódico (SDS) (Figura 39). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es producido en las plantas durante el estrés oxidativo que se induce en determinadas condiciones de ataque por patógenos, y posee un papel antimicrobiano y antifúngico importante en los mecanismos de defensa naturales en plantas (Lamb y Dixon, 1997; Miguel *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2006).

El SDS es un detergente lipofílico que interacciona con las membranas celulares, alterando su estabilidad. Esta acción produce una respuesta de estrés en las células fúngicas que reaccionan reforzando su pared celular (de Groot *et al.*, 2001; Damveld *et al.*, 2005b). Es por ello que el SDS ha sido utilizado como

agente para identificar y caracterizar mutaciones o alteraciones relacionadas con la arquitectura y/o composición de la pared celular de hongos (de Groot *et al.*, 2001).

Se ensayó la actividad de estos dos compuestos sobre los hongos en placas de medio sólido PDA incubadas a 24° C durante 3-4 días. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el hongo que mostró la mayor sensibilidad fue *P. italicum*, siendo el más resistente *P. brevicompactum* y también, aunque en menor medida, *P. digitatum* (Figura 39, superior). En presencia de SDS el resultado fue el opuesto en lo referido a los dos hongos patógenos de cítricos. *P. digitatum* fue con diferencia el más sensible, mientras que *P. italicum* junto con *P. brevicompactum* los más resistentes (Figura 39, inferior). *P. expansum* en ambas situaciones mostró un comportamiento intermedio dentro los cuatro hongos.

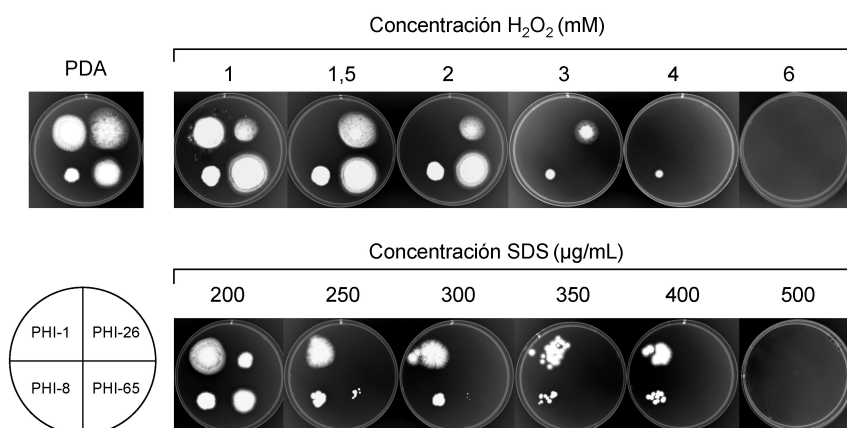


Figura 39. Crecimiento de las cuatro especies de *Penicillium* (*P. digitatum* PHI-26, *P. italicum* PHI-1, *P. expansum* PHI-65 y *P. brevicompactum* PHI-8) en presencia de concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (panel superior) y SDS (panel inferior) en medio sólido de crecimiento PDA. Las esporas se aplicaron sobre las placas en forma de gotas de 2,5 µL desde una suspensión de 2,5 x 10<sup>4</sup> conidios/mL.

También analizamos el crecimiento de los hongos en condiciones de estrés térmico, incubándolos a la temperatura restrictiva de 30° C. Los dos hongos que mostraron una mayor termosensibilidad fueron *P. brevicompactum* y *P. expansum* (Figura 40). Por el contrario, en los otros dos hongos, el efecto de la temperatura fue menor. La temperatura restrictiva en *P. digitatum* redujo su

crecimiento, mientras que en *P. italicum* no produjo un efecto observable. Por otra parte, el crecimiento de los hongos en presencia del osmoestabilizador D-sorbitol fue similar, y su adición recuperó parcialmente la termosensibilidad.

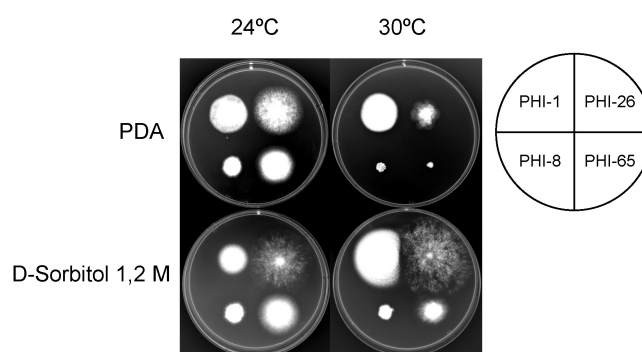


Figura 40. Crecimiento de las cuatro especies de *Penicillium* (*P. digitatum* PHI-26, *P. italicum* PHI-1, *P. expansum* PHI-65 y *P. brevicompactum* PHI-8) a su temperatura normal de crecimiento 24° C y a la temperatura restrictiva de 30° C, en medio sólido de crecimiento PDA y PDA suplementado con D-Sorbitol 1,2 M. Las esporas se aplicaron sobre las placas en forma de gotas de 2,5  $\mu$ L desde una suspensión de  $2,5 \times 10^4$  conidios/mL.

### 3. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SERIE DE HEPTAPÉPTIDOS DERIVADOS DE PAF26.

Se ha utilizado el péptido PAF26D como compuesto líder en el diseño de una serie de heptapéptidos derivados de él por adición de distintos residuos de aminoácidos en su extremo N-terminal. Se ha estudiado y comparado el espectro de acción de los distintos heptapéptidos frente a diversos microorganismos que incluyen hongos fitopatógenos de relevancia agronómica, así como su actividad microbicida y toxicidad frente a células humanas. Se ha puesto especial énfasis en evaluar la especificidad de los péptidos frente al hongo *P. digitatum*. El objetivo de esta aproximación es obtener - si ello fuera posible - nuevos péptidos antimicrobianos derivados de PAF26D, mejorados en potencia y especificidad. Además, los resultados de

este estudio permitirán analizar la variación de las características antimicrobianas de los distintos péptidos resultantes en función del residuo adicionado, y por tanto profundizar en el papel que desempeñan los distintos aminoácidos en las propiedades de estos pequeños péptidos catiónicos.

### 3.1. Selección de residuos de aminoácidos.

En estudios previos de nuestro grupo, se analizó la influencia de cada residuo del péptido PAF26D en sus características antimicrobianas utilizando una serie completa de seis análogos de sustitución de cada uno de sus aminoácidos por alanina (López-García, 2002) (ver también en Discusión). Estos estudios mostraron que todos los residuos de PAF26D contribuyen en mayor o menor grado a sus propiedades frente a *P. digitatum*. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas. Como ya hemos visto, PAF26D posee características anfipáticas debidas a la presencia de tres residuos catiónicos en su extremo N-terminal, seguidos de tres aromáticos e hidrofóbicos en C-terminal (Figura 6). Los resultados obtenidos habían mostrado que las sustituciones que más afectaron a las propiedades del péptido fueron las que se realizaron en su parte catiónica N-terminal (ver más adelante Figura 50).

Debido a esto, la estrategia de mejora del péptido por adición de residuos de aminoácidos se realizó sobre el extremo N-terminal de PAF26D. Se eligieron para la adición los diez aminoácidos más representativos de entre los veinte aminoácidos naturales con mayor presencia en las secuencias de péptidos depositadas en las bases de datos de AMP (Tossi *et al.*, 1997; 2000; Wang y Wang, 2004; Brahmachary *et al.*, 2004; Loose *et al.*, 2006; Seebah *et al.*, 2007). Estos fueron los aminoácidos cargados positivamente Arg, Lys e His, los residuos aromáticos Trp, Phe y Tyr, los alifáticos Leu y Ala, y por último los residuos hidrofílicos Thr y Gln. Se obtuvo una serie de diez heptapéptidos denominados desde PAF38D a PAF47D, con carga neta positiva a pH neutro de entre +3 y +4, y con ligeras variaciones en su carácter hidropático (Tabla 12 y ver también Tabla 7).

Además del péptido PAF26D y los diez heptapéptidos derivados del mismo, se incluyó en el estudio el péptido PAF34D como un control de péptido con menor especificidad que PAF26D (López-García *et al.*, 2002). PAF34D difiere de PAF26D en tan solo dos residuos (Tabla 12) y sin embargo

posee propiedades antimicrobianas reversas y es claramente más inespecífico. PAF34D tiene una menor actividad antifúngica frente a *P. digitatum* que PAF26D, pero en cambio es más activo que éste frente a la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria *E. coli*.

**Tabla 12. Secuencias de los péptidos ensayados.**

Péptido	Secuencia <sup>a</sup>
PAF26D	Ac-rkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF34D	Ac-rkwlfw-NH <sub>2</sub>
PAF38D	Ac-rrkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF39D	Ac-krkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF40D	Ac-hrkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF41D	Ac-frkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF42D	Ac-wrkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF43D	Ac-yrkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF44D	Ac-lrkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF45D	Ac-trkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF46D	Ac-qrkkwfw-NH <sub>2</sub>
PAF47D	Ac-arkkwfw-NH <sub>2</sub>

<sup>a</sup> El código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 2.

### 3.2. Inhibición del crecimiento de microorganismos.

La evaluación del espectro y potencia antimicrobiana de los péptidos se llevo a cabo frente al mismo panel de microorganismos ya utilizados en el primer apartado (Tabla 6), entre los que se encuentran hongos filamentosos de importancia agronómica así como cepas modelo de hongo, levadura y bacterias. En la Figura 41 se representan a modo de ejemplo las curvas dosis-respuesta de los péptidos frente a dos hongos de relevancia en fitopatología: *P. digitatum* (Figura 41A) y *B. cinerea* (Figura 41B). En la Tabla 13 se presentan los valores IC<sub>50</sub> y MIC para cada combinación ensayada péptido-microorganismo.

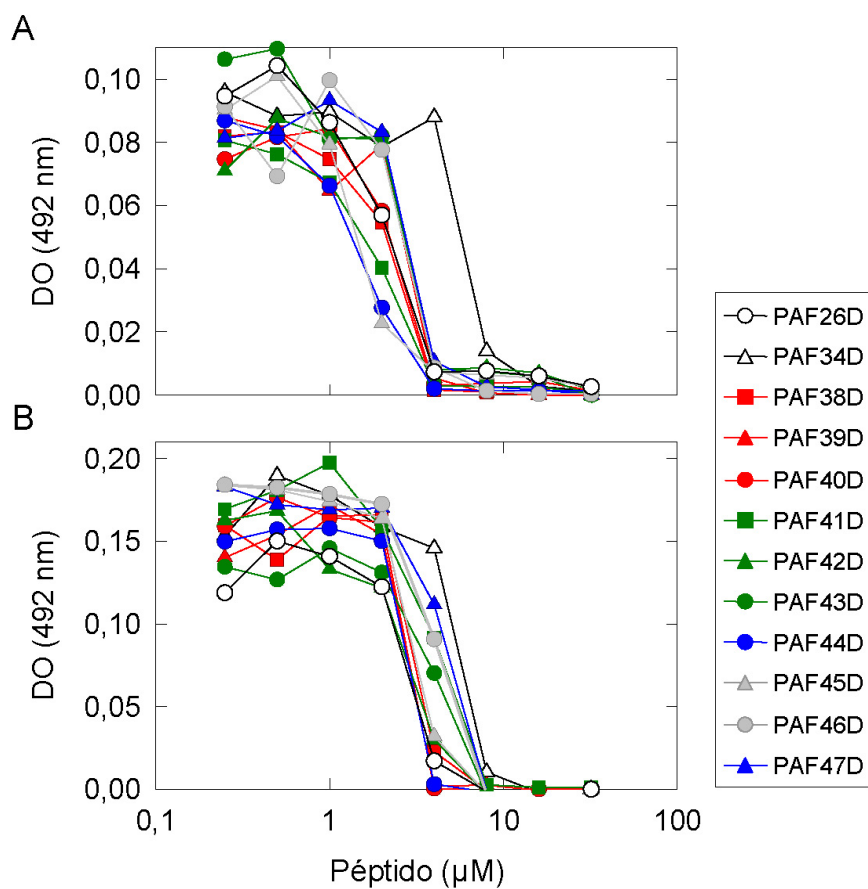


Figura 41. Curvas dosis-respuesta de los péptidos PAF26D, PAF34D y la serie de heptapéptidos derivados de PAF26D frente a los hongos fitopatógenos *P. digitatum* PHI-26 (A) y *B. cinerea* #8 (B). Para hacer más claras las figuras se representan sólo los valores medios de  $DO_{492\text{ nm}}$ .

Dentro de los microorganismos el más sensible a la acción de los heptapéptidos fue *P. digitatum*. Por otro lado, los microorganismos menos sensibles fueron el hongo *M. grisea*, la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria *E. coli*. Curiosamente, el microorganismo que tuvo una susceptibilidad más similar a los hongos filamentosos fue la bacteria Gram positiva *B. subtilis*.

Tabla 13. Actividades *in vitro* de los péptidos frente a distintos microorganismos.

Microorganismo	Péptido <sup>a</sup>												
	PAF26D	34D	38D	39D	40D	41D	42D	43D	44D	45D	46D	47D	
<i>P. digitatum</i> PHI-26	2,2 (4)	6,9 (8)	1,4 (4)	2,3 (4)	1,7 (4)	1,7 (4)	1,6 (4)	2,8 (8)	1,5 (4)	1,4 (8)	1,6 (8)	1,9 (8)	
<i>P. italicum</i> PHI-1	2,3 (4)	6,0 (8)	1,9 (4)	3,4 (8)	2,1 (4)	2,4 (4)	3,4 (4)	2,1 (4)	2,2 (4)	2,2 (4)	3,2 (8)	3,8 (8)	
<i>P. expansum</i> PHI-65	3,2 (8)	6,9 (16)	2,7 (8)	3,5 (8)	4,2 (8)	4,2 (8)	4,4 (8)	4,4 (8)	2,3 (8)	4,5 (8)	4,1 (8)	4,7 (8)	
<i>Alternaria</i> sp. PHI-44	4,6 (8)	8,1 (16)	2,4 (8)	4,5 (8)	7,0 (8)	5,1 (8)	5,1 (8)	6,8 (16)	6,9 (8)	5,5 (8)	7,0 (16)	5,7 (16)	
<i>A. nidulans</i> biA1	3,6 (8)	7,2 (8)	2,2 (4)	2,1 (4)	2,3 (4)	2,4 (8)	2,6 (8)	3,8 (8)	2,3 (4)	3,7 (8)	2,4 (4)	2,2 (4)	
<i>B. cinerea</i> #8	2,9 (8)	5,4 (16)	3,1 (8)	2,7 (8)	2,4 (4)	4,3 (8)	3,1 (8)	4,1 (8)	3,5 (8)	3,2 (8)	4,0 (8)	4,4 (8)	
<i>F. oxysporum</i> CECT2866	4,5 (8)	7,5 (16)	2,3 (4)	2,3 (8)	2,5 (8)	2,7 (8)	2,4 (8)	4,1 (8)	3,7 (8)	4,1 (8)	3,4 (8)	4,1 (8)	
<i>M. grisea</i> PR-9	(>32) <sup>b</sup>	9,4 (32)	(>32) <sup>b</sup>	(>32) <sup>b</sup>	(>32) <sup>b</sup>	9,0 (16)	6,7 (16)	(>32) <sup>b</sup>	(>32) <sup>b</sup>	(>32) <sup>b</sup>	(>32) <sup>b</sup>	(>32) <sup>b</sup>	
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	20,4 (64)	15,5 (32)	4,5 (8)	6,7 (8)	12,7 (32)	4,5 (8)	5,1 (8)	8,7 (16)	14,4 (16)	17,1 (32)	22,2 (64)	17,3 (32)	
<i>B. subtilis</i> CECT498	4,0 (16)	5,6 (16)	2,0 (8)	2,6 (8)	4,1 (8)	2,1 (8)	1,1 (4)	2,5 (8)	2,5 (8)	4,3 (16)	4,8 (16)	5,4 (16)	
<i>S. cerevisiae</i> FY1679	15,9 (32)	13,4 (32)	9,0 (16)	8,1 (16)	9,2 (16)	10,5 (16)	16,6 (32)	17,6 (32)	15,5 (32)	13,0 (32)	12,9 (32)	20,1 (32)	

<sup>a</sup> Los datos corresponden al valor IC<sub>50</sub> seguido del valor MIC entre paréntesis, en unidades de  $\mu$ M.

<sup>b</sup> El símbolo “>” indica que a la mayor concentración ensayada no se obtuvo la inhibición completa del crecimiento del microorganismo. En estos casos, el valor IC<sub>50</sub> no fue calculado.

Se obtuvieron distintos perfiles de actividad dentro de la serie de heptapéptidos. De forma general, se puede decir que los valores  $IC_{50}$  y/o MIC de PAF26D disminuyeron en los heptapéptidos formados tras la adición de los aminoácidos con carga positiva Arg (PAF38D), Lys (PAF39D) o His (PAF40D), y en menor medida de los aminoácidos aromáticos Phe (PAF41D) o Trp (PAF42D). Por el contrario, los aminoácidos cuya adición aumentó los valores  $IC_{50}$  y MIC y por tanto disminuyó la actividad de PAF26D, fueron los residuos de Ala (PAF47D), Gln (PAF46D), Thr (PAF45D) y Tyr (PAF43D). Además de estos últimos, el péptido PAF34D fue el que menor actividad mostró frente a la mayoría de los hongos filamentosos y, de forma significativa, sólo sobre *M. grisea* tuvo una ligera mayor actividad que PAF26D. Es de destacar también cómo la adición específica de los residuos de Phe (PAF41D) y Trp (PAF42D) mejoraron notablemente los valores inhibitorios de PAF26D (MIC de  $> 32 \mu\text{M}$ ) sobre *M. grisea*, el hongo filamentoso de menor sensibilidad a los péptidos, pasando a tener éstos un valor MIC de  $16 \mu\text{M}$  (Tabla 13).

Además de los parámetros clásicos  $IC_{50}$  y MIC, y para conseguir una mejor visualización de la variación en la actividad de los heptapéptidos frente a cada uno de los microorganismos en función del residuo adicionado, se representó gráficamente un parámetro calculado de actividad relativa. Este parámetro se define como la actividad relativa de cada heptapéptido en relación a la actividad de PAF26D frente a un microorganismo determinado y a una concentración definida (la cual es distinta para cada microorganismo y fue la que más se aproximaba a la concentración  $IC_{50}$  de PAF26D frente a ese microorganismo de entre todas las determinadas experimentalmente). Esta actividad relativa del heptapéptido se calculó mediante la Ecuación 3.

$$\textit{Actividad relativa de } PAF_i = \text{Log}_2 \left[ \frac{\textit{Inhibición } PAF_i (\%)}{\textit{Inhibición } PAF26D (\%)} \right]$$

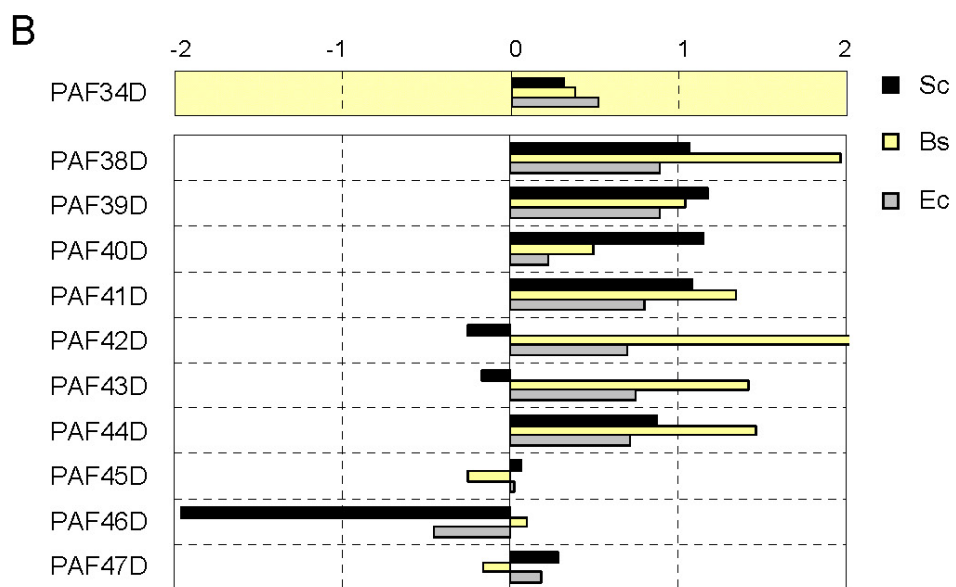
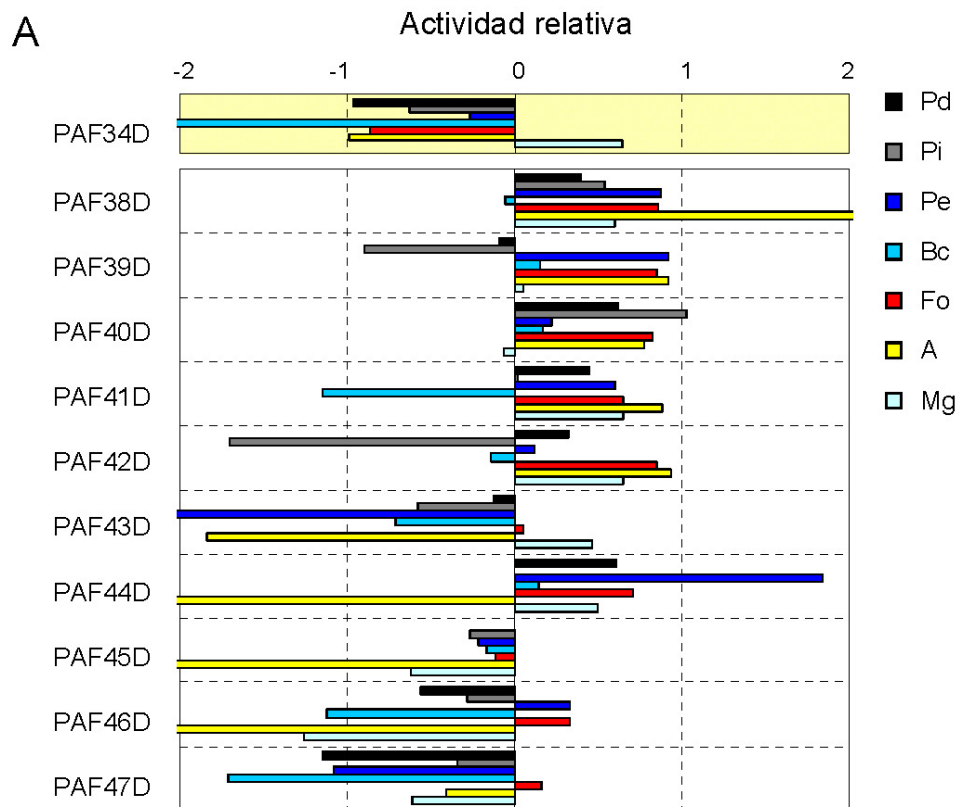
Ecuación 3. Actividad relativa de un péptido  $PAF_i$  respecto a la de PAF26D.



Una actividad relativa igual a cero indica que el heptapéptido posee una capacidad inhibitoria igual a la de PAF26D. Valores positivos indican que el heptapéptido es más inhibitorio que PAF26D, correspondiéndose un valor de 1 al doble de actividad inhibitoria del péptido; mientras que valores negativos indicarían la pérdida de actividad inhibitoria del péptido en relación a PAF26D sobre el microorganismo testado, siendo un valor de -1 la pérdida a la mitad de actividad en el péptido. A partir de la representación gráfica de las actividades relativas se puede analizar más fácilmente de qué manera influye la adición de los distintos residuos en la actividad y espectro de acción de los heptapéptidos (ver Figura 42 en página siguiente).

La variación en la actividad relativa del péptido PAF34D con respecto a PAF26D es muy ilustrativa de las diferencias existentes entre estos dos péptidos, demostradas ya en trabajos anteriores (López-García *et al.*, 2002), y de las conclusiones que se pueden obtener mediante esta representación gráfica. PAF34D es menos activo frente a casi todos los hongos filamentosos (valores negativos), y sin embargo inhibe más eficientemente el crecimiento de la levadura y las bacterias (valores positivos) (Figura 42).

En la representación del valor de actividad relativa para cada heptapéptido confirmamos cómo los residuos con carga positiva, en los péptidos PAF38D (Arg), PAF39D (Lys) y PAF40D (His), incrementaron de forma importante (hasta en más dos veces en algunos casos) la actividad inhibitoria frente a la mayoría de los hongos filamentosos. También con la adición de determinados residuos aromáticos en PAF41D (Phe) y PAF42D (Trp), y del residuo alifático en PAF44D (Leu), se aumentó la potencia antifúngica, salvo con alguna excepción puntual. Por otro lado, en el caso de los péptidos PAF43D (Tyr), PAF45D (Thr), PAF46D (Gln) y PAF47D (Ala) disminuyó la actividad de forma general, aunque con algunas excepciones significativas. Es el caso de PAF43D frente a *M. grisea*, que es el único hongo filamentoso para el cual PAF43D sería más activo que PAF26D según este análisis. (Figura 42A).



Al considerar los microorganismos no diana, se observa que en muchos de los casos el incremento de actividad antifúngica se ve acompañado de una mayor actividad frente a la levadura y las bacterias (Figura 42B). Sin embargo se dieron también distintos perfiles de actividad según el microorganismo y el residuo adicionado. PAF38D (Arg), PAF39D (Lys), PAF41D (Phe) y PAF44D (Leu) aumentaron de forma notable frente a los tres microorganismos por igual. Por otro lado PAF45D (Thr) y PAF47D (Ala) apenas variaron en su actividad respecto a PAF26D. Un resultado más específico o diferente dependiendo del microorganismo se produjo en el caso de los otros cuatro péptidos. PAF46D (Gln) disminuyó en gran medida su actividad inhibitoria frente a la levadura *S. cerevisiae*, al igual que ocurría en los hongos filamentosos, manteniéndose similar en las bacterias. En PAF40D (His) se incremento la actividad al doble frente a la levadura sin ser tan notable el aumento en el caso de las bacterias. Finalmente, en PAF42D (Trp) y PAF43D (Tyr) ocurrió el efecto inverso aumentando la actividad sólo frente a las bacterias.

### 3.3. Propiedades microbicidas sobre distintos microorganismos.

Los resultados que hemos observado en el estudio con los péptidos derivados de la LfcinB o en la caracterización de los modos de acción de PAF26 y melitina, reflejan cómo la actividad inhibitoria del crecimiento del hongo y la actividad fungicida sobre esporas no están necesariamente relacionadas. La existencia de los distintos perfiles de actividad fungiestática y bacterioestática encontrados en los heptapéptidos motivó la caracterización de la actividad fungicida y bactericida de esta nueva serie de péptidos. Se evaluó la

---

Figura 42. Actividad relativa de PAF34D y de los heptapéptidos respecto a la de PAF26D frente a distintos microorganismos evaluados. En (A) se encuentran representados los hongos filamentosos y en (B) la levadura y las bacterias. Las concentraciones de péptido a las cuales se realizaron los cálculos son distintas, siendo las experimentales más próximas al  $IC_{50}$  calculado de PAF26D para cada microorganismo. En concreto fueron las concentraciones de 2  $\mu$ M para *P. digitatum* (Pd), *P. italicum* (Pi) y *B. subtilis* (Bs), 4  $\mu$ M para *P. expansum* (Pe), *Alternaria* sp. (A), *B. cinerea* (Bc) y *F. oxysporum* (Fo), y 16  $\mu$ M para *M. grisea* (Mg), *S. cerevisiae* (Sc) y *E. coli* (Ec).

viabilidad de conidios de *P. digitatum* y células de *S. cerevisiae* y *E. coli* tras el tratamiento con los péptidos mediante su siembra en placas de medio sólido apropiado en ausencia de péptido (Figura 43).

De nuevo se incluyó en los ensayos el péptido PAF34D como control interno, confirmándose los perfiles reversos de actividad fungicida y bactericida entre PAF26D y PAF34D (Figura 43A). En estos ensayos se confirmó que PAF26D es más fungicida sobre *P. digitatum* que PAF34D, el cual es más microbicida sobre *S. cerevisiae* y *E. coli*.

Los datos de actividad microbicida de los heptapéptidos confirmaron y extendieron las diferencias en su distinto perfil de actividad vistas en los experimentos anteriores. Los derivados catiónicos PAF38D (Arg) y PAF39D (Lys) mostraron el mayor aumento de actividad fungicida sobre conidios del hongo, pero también mataron más eficientemente células de la levadura y la bacteria, perdiendo por tanto especificidad (Figura 43B).

También resultaron ligeramente más activos que PAF26D los péptidos PAF40D (His), PAF41D (Phe), PAF42D (Trp) y PAF44D (Leu) frente a conidios, aunque de nuevo fueron más microbicidas frente a la levadura y la bacteria. En el caso de PAF38D, PAF39D, PAF41D y PAF42D el incremento de actividad bactericida fue muy superior y destacado con respecto a las otras dos actividades microbicidas ensayadas. Las dos notables excepciones al respecto son PAF40D y en menor medida PAF44D. PAF40D mostró en estos experimentos hasta cuatro veces menos actividad microbicida frente a la bacteria *E. coli* que los otros heptapéptidos (Figura 43B), corroborando lo observado en los ensayos anteriores de crecimiento (Figura 42B).

Al igual que PAF40D, PAF43D (Tyr) mostró un comportamiento interesante. Perdió actividad fungicida frente al hongo y la levadura mientras que aumentó su capacidad bactericida. Por otro lado, es de destacar la pérdida de actividad fungicida en los péptidos PAF45D (Thr), PAF46D (Gln) y PAF47D (Ala), tanto frente al hongo *P. digitatum* como a la levadura *S. cerevisiae* (Figura 43B).

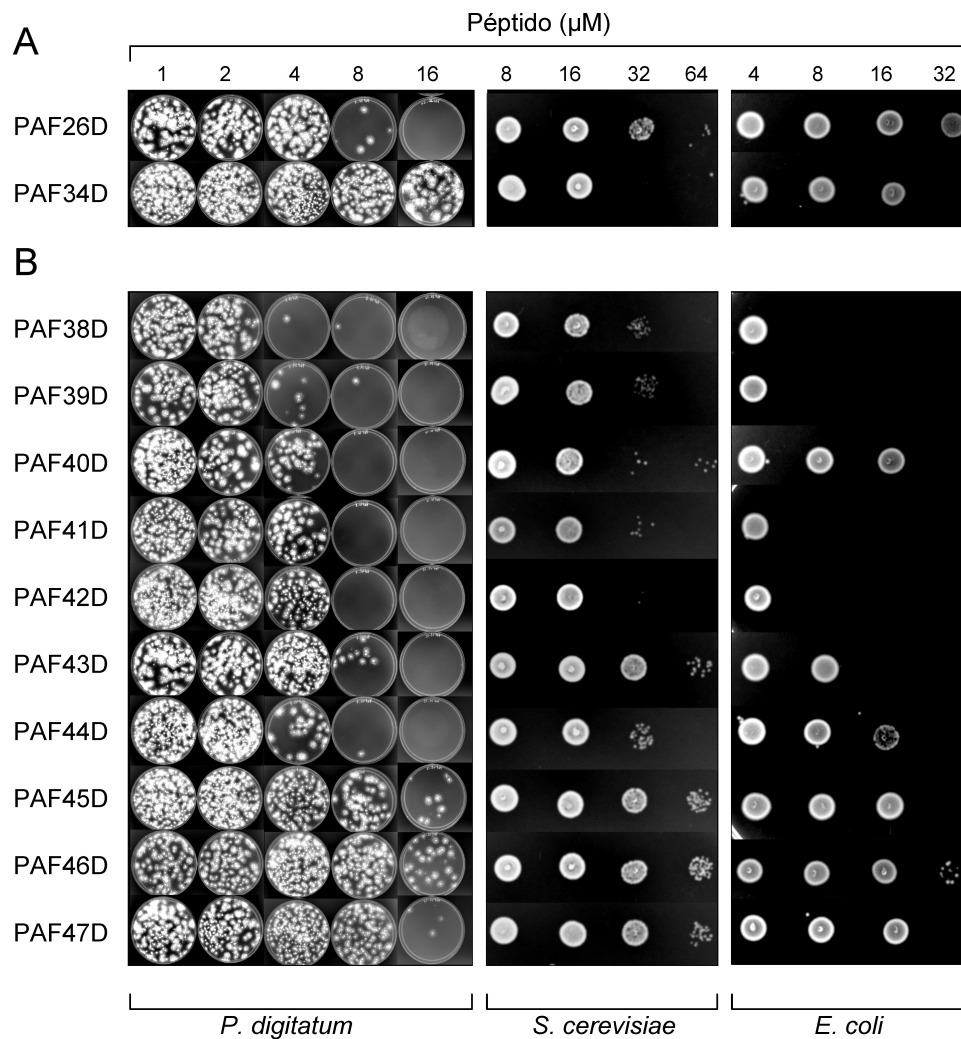


Figura 43. Actividad microbicida de los péptidos PAF26D, PAF34D y la serie de heptapéptidos derivados de PAF26D frente a *P. digitatum* PHI-26, *S. cerevisiae* FY1679 y *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se incubaron muestras de conidios (*P. digitatum*) o UFC (*S. cerevisiae* y *E. coli*) con los péptidos a las concentraciones indicadas arriba durante 1 día en medio 5% PDB, 10% YPD y 10% LB, respectivamente. Posteriormente se extendieron (en el caso de conidios) o aplicaron en forma de gotas (en la levadura y bacteria) sobre placas de medio sólido de crecimiento. Se muestran las fotografías representativas de los hexapéptidos previamente caracterizados PAF26D y PAF34D (A) y de los nuevos heptapéptidos (B).

### **3.4. Actividad hemolítica sobre glóbulos rojos.**

Como hemos hecho anteriormente (Tabla 11), la evaluación de la citotoxicidad frente a células humanas se llevo a cabo mediante ensayos de actividad hemolítica. Ninguno de los heptapéptidos derivados de PAF26D, excepto uno, mostraron actividad hemolítica por encima del límite de detección de la técnica (0,3%) a la mayor concentración ensayada (100  $\mu$ M). Solamente el péptido PAF42D (Trp) produjo un 0,6% de hemólisis a 100  $\mu$ M. Por tanto, podemos concluir que todos los péptidos PAFs utilizados en esta tesis fueron al menos 1000 veces menos citolíticos frente a glóbulos rojos humanos que el péptido citotóxico melitina.

## **4. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE DISTINTOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS PODREDUMBRES POSTCOSECHA DE CÍTRICOS CAUSADAS POR *P. digitatum*.**

En el transcurso de este trabajo hemos identificado y caracterizado una serie de péptidos con propiedades antifúngicas sobre el crecimiento *in vitro* de diferentes hongos fitopatógenos, entre los cuales se encuentran importantes patógenos de frutos durante su conservación postcosecha. Con el fin de determinar si la actividad antifúngica *in vitro* se corresponde con una inhibición de la infección fúngica causada *in vivo*, se llevaron a cabo experimentos de inoculación controlada de *P. digitatum* y los péptidos sobre frutos cítricos.

Estos estudios adquieren especial relevancia, puesto que ya hemos comprobado que péptidos con similar actividad *in vitro* pueden presentar diferencias en el control de la infección causada por el hongo sobre frutos (Figura 22). Los resultados obtenidos se evaluarán y considerarán de forma global conjuntamente con los obtenidos en los bioensayos realizados con los péptidos derivados de LfcinB. Se utilizaron en este estudio varios péptidos distintos, algunos de los cuales ya han sido ensayados y caracterizados *in vitro* en el presente trabajo, mientras que otros los incluimos a modo comparativo bien por ser AMP presentes en la naturaleza, por su secuencia relacionada a los PAF, o por su diseño *de novo* e identificación a través de metodologías similares a las nuestras, tal y como se detalla a continuación.

#### 4.1. Péptidos antimicrobianos seleccionados.

El objetivo de este estudio es la evaluación comparada de péptidos antimicrobianos procedentes de orígenes diferentes, como alternativa para el control de la podredumbre verde en frutos cítricos. Todos los péptidos ensayados en esta parte del trabajo fueron sintetizados con L-aminoácidos, de forma similar a los ensayos realizados con los péptidos derivados de la LfcinB, y con el objetivo de poder realizar una comparación adecuada entre los péptidos procedentes de la naturaleza y aquellos diseñados de forma dirigida o por estrategias combinatoriales (como los péptidos PAF) y que normalmente son inicialmente sintetizados y caracterizados como D-estereoisómeros.

Se seleccionaron tres péptidos PAFs como potenciales buenos candidatos para su aplicación postcosecha. El péptido PAF26L, ya bien caracterizado y que nos servirá como control interno en estos ensayos. Además, se escogieron los nuevos heptapéptidos PAF38L y PAF40L, ya estudiados *in vitro* en su versión sintetizada con los D-estereoisómeros en el apartado anterior, y que se eligieron por sus características de potencia antifúngica y especificidad frente al hongo *P. digitatum*. En este sentido, y como experimento preliminar, se compararon las curvas dosis-respuesta frente a *P. digitatum* de los tres péptidos cuando están sintetizados con los estereoisómeros D- o L- (Figura 44), confirmando que la actividad de ambas versiones no difiere de forma significativa. El único péptido que tuvo una ligera pérdida de actividad fue PAF26L, aunque hay que mencionar que el mostrado en la Figura 44 fue, de entre los experimentos realizados, el que mostró esta pérdida de forma más acusada.

Hemos seleccionado también el octapéptido BM0, identificado desde una biblioteca combinatorial de octapéptidos como inhibitorio del crecimiento de levaduras y de una ATPasa de membrana de levadura (Monk *et al.*, 2005). BM0 tiene alta homología de secuencia de aminoácidos con los péptidos PAFs (Tabla 14) y pertenece también a la clase de péptidos catiónicos ricos en triptófano (Chan *et al.*, 2006). BM0 fue identificado como un D-octapéptido con el extremo N-terminal libre y el C-terminal amidado. En este trabajo, BM0 será sintetizado con L-amino ácidos poseyendo las mismas modificaciones terminales que los péptidos PAFs (acetilación y amidación en los extremos N y C-terminal, respectivamente).

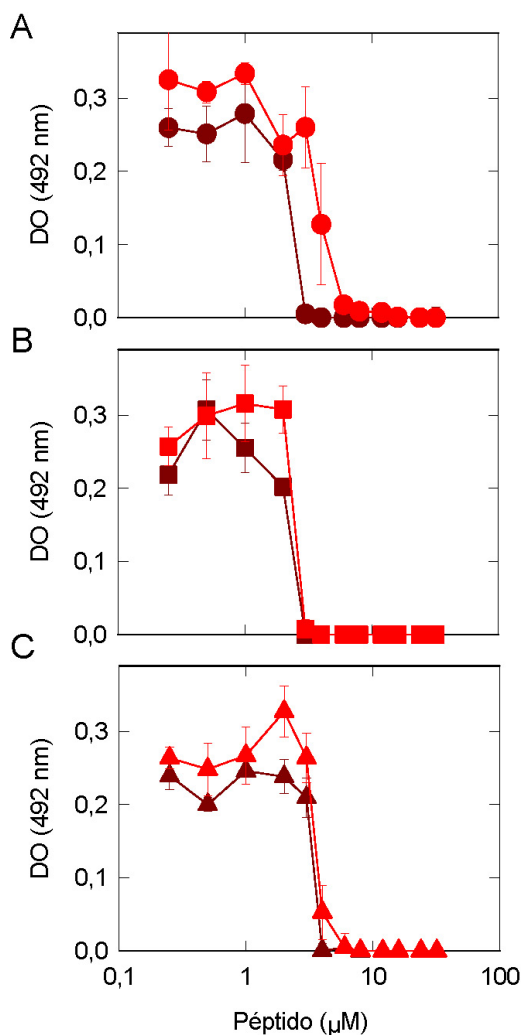


Figura 44. Curvas dosis-respuesta frente a *P. digitatum* de los péptidos PAF26 (A), PAF38 (B) y PAF40 (C) comparando en cada uno el D-estereoisómero (símbolos granates) con el L- (símbolos rojos). Los datos se muestran como valores medios de  $DO_{492\text{ nm}} \pm SD$  para cada combinación, tomados a las 48 h de crecimiento del microorganismo.

Otros péptidos seleccionados diseñados *de novo* son BP15 y BP76 (Tabla 14), los cuales son derivados del péptido híbrido cecropina-melitina Pep3 (ver en Introducción, página 42) con modificaciones puntuales de su secuencia. BP15 y BP76 han sido identificados en un escrutinio frente a las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, y *Xanthomonas vesicatoria* (Ferre *et al.*, 2006). Estos péptidos muestran mayor actividad bactericida que su parental, con menor actividad hemolítica y mayor resistencia a la degradación por proteasas.



Tabla 14. Secuencias de los péptidos ensayados en este apartado.

Péptido	Secuencia <sup>a</sup>
PAF26L	Ac-RKKWFW-NH <sub>2</sub>
PAF38L	Ac-RRKKWFW-NH <sub>2</sub>
PAF40L	Ac-HRKKWFW-NH <sub>2</sub>
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
Indolicidina	Ac-ILPWKWPWWPWRR-NH <sub>2</sub>
BM0	Ac-RFWWFRRR-NH <sub>2</sub>
BP15	KKLFKKILKVL-NH <sub>2</sub>
BP76	KKLFKKILKFL-NH <sub>2</sub>

<sup>a</sup> El código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 2.

Por último, fueron incluidos en el estudio dos AMP presentes en la naturaleza. Uno es el péptido melitina (Terwillinger y Eisenberg, 1982; Blondelle y Houghten, 1991), que como ya hemos visto presenta actividad *in vitro* frente a *P. digitatum* comparable a la de PAF26, aunque carece de capacidad fungicida frente a conidios (Figura 30).

Por otro lado se escogió el péptido indolicidina, perteneciente a la familia de las catelicidinas, y que es también un péptido catiónico con amplio espectro de actividad antimicrobiana (Falla *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2006). La indolicidina es además un péptido muy rico en triptófanos al poseer hasta cinco residuos en su estructura primaria, siendo el péptido natural con mayor proporción de este amino ácido encontrado hasta la fecha, y el de mayor contenido de todos los péptidos ensayados en este trabajo.

Los péptidos usados en este estudio (Tabla 14 y ver también Tabla 7) poseen carga neta positiva a pH neutro y son por tanto considerados como AMP catiónicos. Cinco de los péptidos poseen un valor calculado del índice GRAVY negativo, lo cual indica que son moléculas hidrofílicas, a diferencia de BP15, BP76 y melitina que son péptidos más hidrofóbicos. Con la excepción de melitina que tiene 26 residuos de aminoácidos, el resto son péptidos de

pequeño tamaño, de entre 6 y 13 residuos. La actividad de los péptidos PAF38L, PAF40L (en sus versiones formadas por L-aminoácidos), BM0, BP15, BP76 e Indolicidina no había sido todavía evaluada frente al hongo fitopatógeno *P. digitatum*.

#### 4.2. Inhibición del crecimiento *in vitro* de microorganismos.

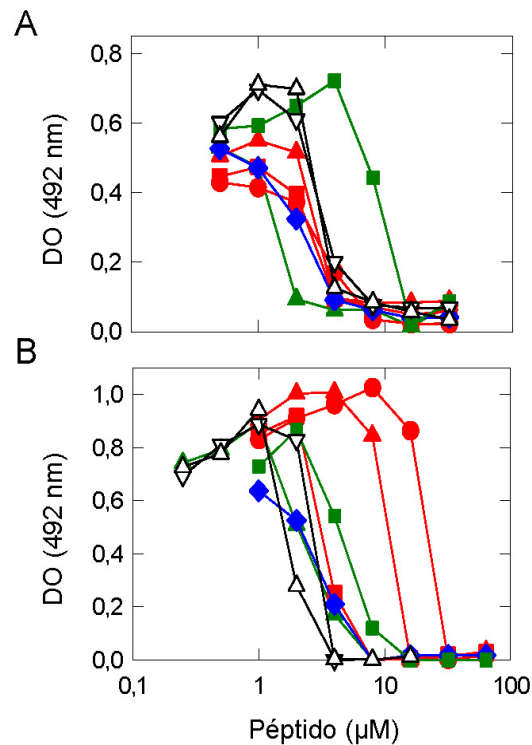
Se determinó en paralelo las propiedades de inhibición del crecimiento *in vitro* de los ocho péptidos seleccionados frente al hongo *P. digitatum*, la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria Gram negativa *E. coli*. Como hemos mencionado en otros apartados, los ensayos frente a la levadura y la bacteria se llevaron a cabo con el objetivo de evaluar la especificidad de los péptidos. La Figura 45 muestra como ejemplo las curvas dosis-respuesta sobre *P. digitatum* y *E. coli* ilustrando la potencia antimicrobiana relativa de los péptidos. Los valores inhibitorios MIC aparecen recogidos en la Tabla 15 para cada combinación péptido-microorganismo.

**Tabla 15. Valores inhibitorios de los péptidos frente a los microorganismos ensayados.**

Péptido	MIC ( $\mu\text{M}$ )		
	<i>P. digitatum</i> PHI-26	<i>S. cerevisiae</i> FY1679	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
PAF26L	4	32	32
PAF38L	4	16	8
PAF40L	4	16	16
Melitina	2	16	8
Indolicidina	16	n.d. <sup>a</sup>	16
BM0	4	32	8
BP15	4	16	4
BP76	4	16	4

<sup>a</sup>n.d., no determinado.

Figura 45. Curvas dosis-respuesta frente a los microorganismos *P. digitatum* PHI-26 (A) y *E. coli* DH5 $\alpha$  (B) de los péptidos ensayados PAF26L (●), PAF38L (■), PAF40L (▲), melitina (▲), indolicidina (■), BM0 (◆), BP15 (△) y BP76 (▽). Los datos muestran los valores medios de DO<sub>492 nm</sub> para cada concentración de péptido después de 48 h de incubación para *P. digitatum* (A) o 24 h para *E. coli* (B).



El péptido melitina fue el más activo frente a *P. digitatum* en estos experimentos, aunque de forma general la mayoría de los péptidos excepto indolicidina fueron también muy inhibitorios del crecimiento del hongo con valores MIC de 4  $\mu\text{M}$  (Tabla 15 y Figura 45A). Se observó menor actividad antimicrobiana y con pocas diferencias entre los péptidos frente a la levadura modelo de laboratorio *S. cerevisiae* (Tabla 15). Sin embargo, las diferencias más significativas se obtuvieron en los ensayos antibacterianos, siendo BP15 y BP76 los péptidos más inhibitorios del crecimiento de *E. coli* (con valores MIC de 4  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 15 y Figura 45B). Éste es el resultado esperable al ser dos péptidos identificados frente a bacterias fitopatógenas (Ferre *et al.*, 2006). Por lo tanto en lo que se refiere a especificidad de los distintos péptidos frente a los microorganismos, se puede concluir que BP15, BP76 e indolicidina tienen un amplio espectro de acción al poseer valores MIC similares frente al hongo y la bacteria, mientras que otros como PAF26L o PAF40L son claramente más activos frente a *P. digitatum* que frente a *S. cerevisiae* o *E. coli*.

### **4.3. Bioensayos de control frente a la infección de frutos causada por *P. digitatum*.**

Se llevaron a cabo bioensayos con los distintos péptidos analizados *in vitro* en este apartado con el objeto de estudiar su capacidad potencial de control de las podredumbres postcosecha de cítricos ocasionadas por *P. digitatum*.

Como se ha demostrado anteriormente, en los estudios previos de nuestro grupo (López-García *et al.*, 2002; 2003) y en los realizados en este trabajo con los péptidos derivados de LfcinB, siguiendo procedimientos de inoculación controlada en condiciones similares a las de postcosecha se puede demostrar la capacidad de los AMP para inhibir del desarrollo de las infecciones fúngicas en los frutos.

Hay que tener muy presente la importante variabilidad experimental que puede llegar a presentar este tipo de ensayos al influir en ellos un gran número de factores. Además del inóculo inicial del hongo, en el desarrollo de la infección afectarán la propia variedad de fruto, la campaña anual, las condiciones medioambientales de cultivo o la misma manipulación postcosecha. Con el objetivo de considerar estos factores y poder así obtener conclusiones más fiables, se han realizados los bioensayos utilizando distintas variedades frutales, recogidas en distintas campañas y provenientes desde diferentes explotaciones comerciales.

#### *4.3.1. Ensayos de inoculación controlada sobre frutos.*

Nuestro grupo ha demostrado que los péptidos PAF19D y PAF26D son capaces de inhibir el desarrollo de la podredumbre de *P. digitatum* en bioensayos en los cuales los conidios fueron co-inoculados con los péptidos a altas concentraciones, entre 50 y 100  $\mu\text{M}$  (López-García *et al.*, 2002; 2003). De forma similar, dentro de este trabajo, ya hemos demostrado que PAF26L y los dos péptidos derivados de la LfcinB a 100  $\mu\text{M}$  producen retrasos en la aparición de la podredumbre, aunque con diferencias significativas entre péptidos (Figura 22). En este estudio se han usado concentraciones más bajas con el objetivo de discriminar qué AMP son los más activos y con mayor capacidad de control.

Los péptidos ensayados se mezclaron a la concentración final de 32  $\mu$ M con conidios, e inmediatamente se inocularon. Únicamente se logró un pequeño retardo en la progresión de la infección por parte de determinados péptidos (Figura 46A, panel superior; y Tabla 16, condición 1). Por ejemplo, PAF38L y PAF40L mostraron un modesto retraso en la aparición de síntomas, que fue significativo a algunos tiempos de muestreo y en algunos experimentos. Solamente BM0 produjo una reducción estadísticamente significativa en la infección con respecto al control en ausencia de péptido hasta el final del experimento (7 dpi) (Figura 46A, panel superior).

En los distintos experimentos realizados con PAF26L habíamos observado que se mejora el control del desarrollo de las podredumbres al extender el tiempo de incubación de los conidios del hongo con el péptido antes del momento de la inoculación sobre el fruto (datos no mostrados).

Se realizaron experimentos paralelos en los cuales se incubaron conidios del hongo junto con los péptidos en agua estéril durante al menos 16 h antes de la inoculación (Figura 46A, panel inferior; y Tabla 16, condición 2). En la Tabla 16 se presenta en forma numérica los resultados y la comparativa entre ambas condiciones (i.e., tiempos de incubación de los conidios con los péptidos), evaluada para cada péptido y dpi (test estadístico *t*-student). Los resultados obtenidos indican que el control de la infección por los péptidos PAF26L, PAF38L, PAF40L, BM0 e indolicidina, se incrementaba de forma significativa con el aumento del tiempo de incubación de los conidios con los péptidos, y era además reproducible durante todos los dpi hasta el final del experimento.

Los análisis de separación de medias de los datos obtenidos con todos los péptidos en la incubación por un periodo de 16 h (Figura 46A, panel inferior), revelaron una reducción significativa en el control de la podredumbre por parte de los péptidos PAF38L, PAF40L y BM0. Sin embargo, en otros péptidos como melitina no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos tiempos de incubación. Solamente al inicio del experimento hubo un efecto destacable, hasta los 4 dpi. A partir de éste ambas condiciones no difirieron en ninguno de los días post-inoculación (Tabla 16), e incluso no se observó ninguna reducción de las podredumbres al final del experimento (7 dpi, Figura 46A).

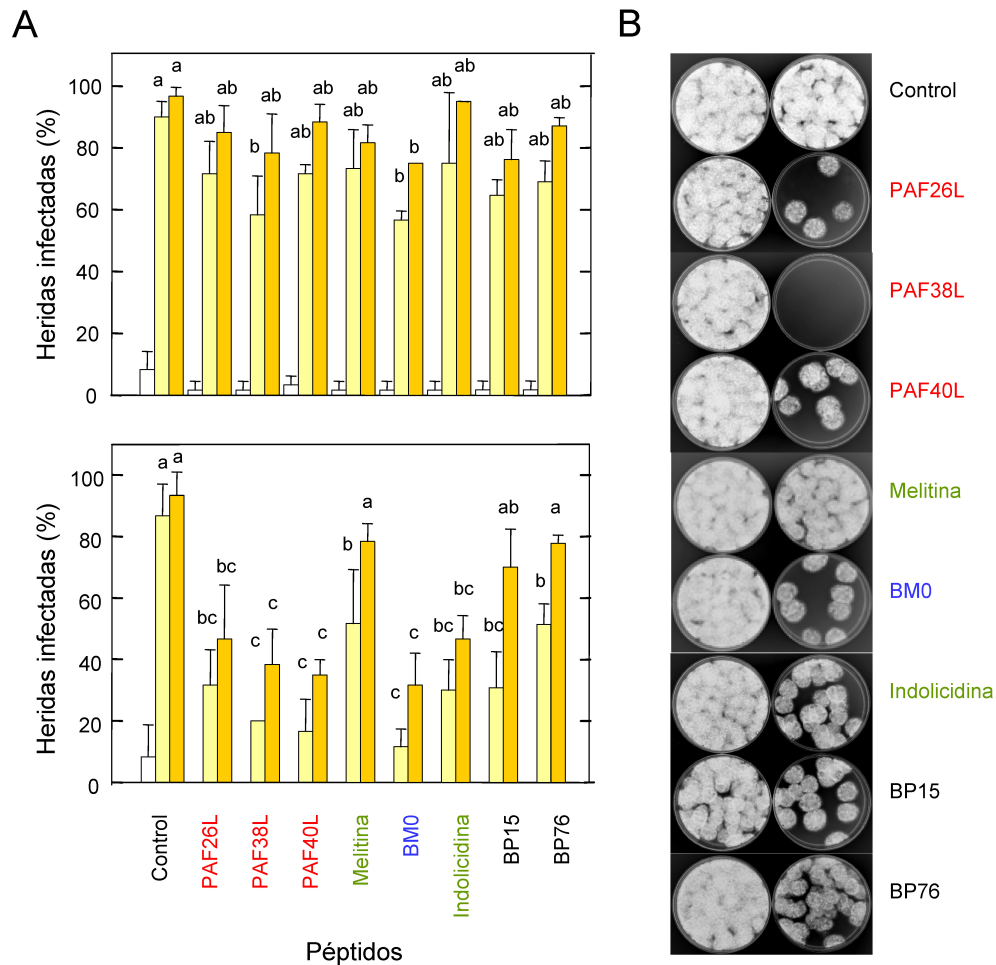


Figura 46. Efecto de los péptidos sobre la infección y viabilidad de conidios de *P. digitatum* PHI-26. (A) Efecto sobre la infección de frutos cítricos. Los frutos (*C. sinensis* L. Osbeck cv. Navelina) se inocularon con conidios de *P. digitatum* solos (control), o en presencia de los péptidos a la concentración de 32  $\mu$ M. Los conidios se mezclaron con los péptidos en agua estéril y, o bien fueron inmediatamente inoculados (panel superior), o bien se incubaron durante 16 h a temperatura ambiente y posteriormente se inocularon (panel inferior). Los resultados se muestran como las medias del porcentaje de heridas infectadas  $\pm$  SD para cada tratamiento a los 3 (barras blancas), 5 (amarillas) y 7 (naranjas) dpi. Las barras dentro del mismo dpi marcadas con la misma letra no difieren estadísticamente al 95% de confianza. (B) Efecto de los péptidos en la viabilidad de los conidios. Alícuotas del experimento representado en (A) se extendieron sobre placas de PDA libre de péptido justo antes del momento de su inoculación. Las muestras de las columnas izquierda y derecha se corresponden con los paneles en (A) superior e inferior, respectivamente.

Tabla 16. Efecto de distintos tratamientos sobre la incidencia de la infección de *P. digitatum* en frutos de *Citrus sinensis*.

Tratamiento	4 dpi <sup>a</sup>				5 dpi				6 dpi				7 dpi			
	Cond-1 <sup>b</sup>	Cond-2 <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>	Cond-1 <sup>b</sup>	Cond-2 <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>	Cond-1 <sup>b</sup>	Cond-2 <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>	Cond-1 <sup>b</sup>	Cond-2 <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>	Cond-1 <sup>b</sup>	Cond-2 <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>	
Control	52 ± 15	43 ± 1	0,61	90 ± 5	87 ± 10	0,64	97 ± 3	90 ± 9	0,27	97 ± 3	93 ± 8	0,62	97 ± 3	93 ± 8	0,62	
PAF26L	32 ± 10	3 ± 6	0,02	72 ± 10	32 ± 12	0,01	80 ± 9	47 ± 18	0,04	85 ± 9	47 ± 18	0,03	85 ± 9	47 ± 18	0,03	
PAF38L	15 ± 15	2 ± 3	0,20	58 ± 13	20 ± 0	< 0,01	75 ± 13	37 ± 14	0,03	78 ± 13	38 ± 12	0,02	78 ± 13	38 ± 12	0,02	
PAF40L	28 ± 3	2 ± 3	0,01	72 ± 3	17 ± 10	< 0,01	85 ± 5	28 ± 10	< 0,01	88 ± 6	35 ± 5	< 0,01	88 ± 6	35 ± 5	< 0,01	
Melitina	45 ± 13	5 ± 3	0,01	73 ± 13	52 ± 18	0,16	78 ± 8	70 ± 13	0,40	82 ± 6	78 ± 6	0,52	82 ± 6	78 ± 6	0,52	
Indolicidina	23 ± 15	8 ± 10	0,23	75 ± 23	30 ± 10	0,04	93 ± 3	42 ± 10	< 0,01	95 ± 0	47 ± 8	< 0,01	95 ± 0	47 ± 8	< 0,01	
BM0	18 ± 6	3 ± 3	0,02	57 ± 3	12 ± 6	< 0,01	72 ± 3	23 ± 3	< 0,01	75 ± 9	32 ± 10	< 0,01	75 ± 9	32 ± 10	< 0,01	
BP15	16 ± 7	1 ± 3	0,02	65 ± 5	31 ± 12	0,01	78 ± 5	63 ± 14	0,15	76 ± 10	70 ± 12	0,53	76 ± 10	70 ± 12	0,53	
BP76	18 ± 12	3 ± 3	0,09	69 ± 7	51 ± 7	0,03	83 ± 5	72 ± 4	0,06	87 ± 3	78 ± 3	0,06	87 ± 3	78 ± 3	0,06	

<sup>a</sup> día post-inoculación (dpi).

<sup>b</sup> La condición-1 (Cond-1) refiere el % de heridas infectadas ± SD de los ensayos realizados de co-inoculación inmediata de conidios de *P. digitatum* PHI-26 más los péptidos a la concentración de 32 µM.

<sup>c</sup> La condición-2 (Cond-2) refiere el % de heridas infectadas ± SD de los ensayos realizados de inoculación de conidios de *P. digitatum* PHI-26 con los péptidos a la concentración de 32 µM tras un periodo de incubación de 16 h.

<sup>d</sup> Se muestra el *valor p* obtenido del análisis de separación de medias al 95 % de los valores correspondientes a cada una de las condiciones para cada péptido y dpi. Los valores con un *p* < 0,05 aparecen coloreados en rojo.

En los péptidos BP15 y BP76 el aumento del tiempo de incubación indujo también un retraso en la aparición de los síntomas que en estos péptidos fue significativo hasta el 5 dpi inclusive. A partir de este día y hasta el final del experimento este retraso ya no fue significativo (Tabla 16).

#### 4.3.2. *Actividad fungicida de los péptidos.*

En el transcurso del presente trabajo se han caracterizado péptidos capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum*, pero que no poseen propiedades fungicidas (Figura 18, Figura 19 y Figura 30). Un ejemplo claro lo constituye el péptido melitina cuya actividad inhibitoria es similar a la de PAF26L (Tabla 10 y Tabla 15) y sin embargo difiere enormemente en su capacidad fungicida sobre conidios (Figura 30). Se exploró a continuación si las diferentes propiedades fungicidas de los péptidos podrían explicar las diferencias encontradas en los ensayos de inoculación sobre frutos. Una estimación de la actividad fungicida se realizó extendiendo sobre placas de medio sólido alícuotas de las mismas muestras de inóculo aplicadas sobre los frutos, sometidas a las distintas condiciones mostradas en la Figura 46A y Tabla 16. La viabilidad de los conidios se redujo notablemente tras la exposición durante 16 h a los péptidos PAF26L, PAF38L, PAF40L y BM0 (Figura 46B). Indolicidina, BP15 y BP76 mostraron una actividad intermedia, mientras que melitina no tuvo un efecto observable en estas condiciones.

Se cuantificó la actividad fungicida de los péptidos a través de ensayos dosis-respuesta con distintas concentraciones de péptido y posterior determinación del número de conidios viables como UFC/mL (Figura 47). Se observó la existencia de diferentes actividades fungicidas en los péptidos sobre los conidios del hongo. PAF38L, PAF40L y BM0 disminuyeron la viabilidad de las esporas en dos órdenes de magnitud incluso a la concentración de 4  $\mu$ M. Indolicidina mostró peor actividad fungicida que los anteriores. Melitina, como ya habíamos determinado, apenas redujo el número de conidios viables incluso a la mayor concentración ensayada. Curiosamente, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones ensayadas para un péptido determinado.



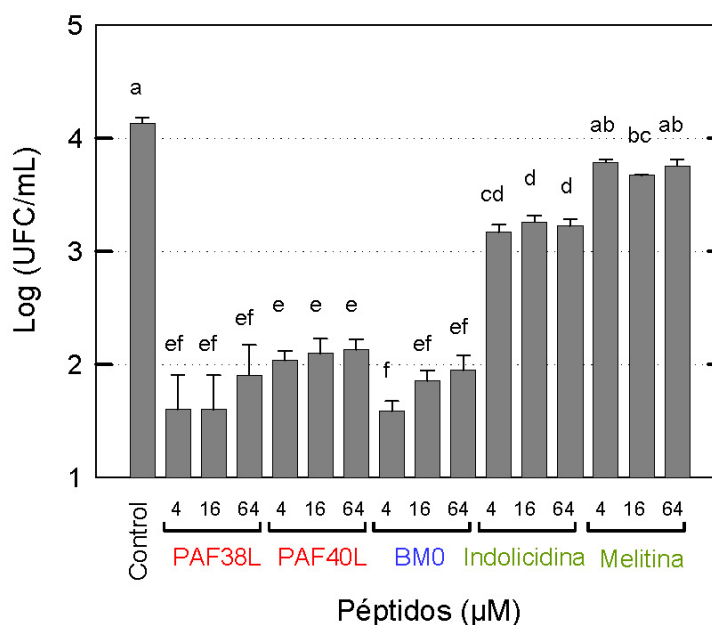


Figura 47. Efecto dosis-respuesta de péptidos sobre la viabilidad de los conidios de *P. digitatum* PHI-26. Se incubaron los conidios en agua estéril durante 16 h a temperatura ambiente solos o en presencia de los péptidos señalados a las concentraciones de 4, 16 y 64 µM. Los datos se representan como barras del logaritmo del valor medio de la recuperación de UFC/mL  $\pm$  SD para cada tratamiento. Las barras etiquetadas bajo la misma letra no difieren estadísticamente al 95% de confianza.

#### 4.3.3. Efecto de la concentración de péptido en los bioensayos sobre frutos.

Con el objetivo de definir mejor qué péptidos son los que poseen un mayor potencial para su aplicación postcosecha, se ensayaron concentraciones diferentes de los péptidos, en distintas variedades de frutos cítricos y en experimentos de inoculación independientes, siempre bajo condiciones extendidas de incubación del inóculo con los péptidos (esto es, 16 h de contacto). Estos ensayos se realizaron con el objetivo de obtener resultados comparativos más amplios debido a la variabilidad experimental a la que están sujetos este tipo de estudios *in vivo*.

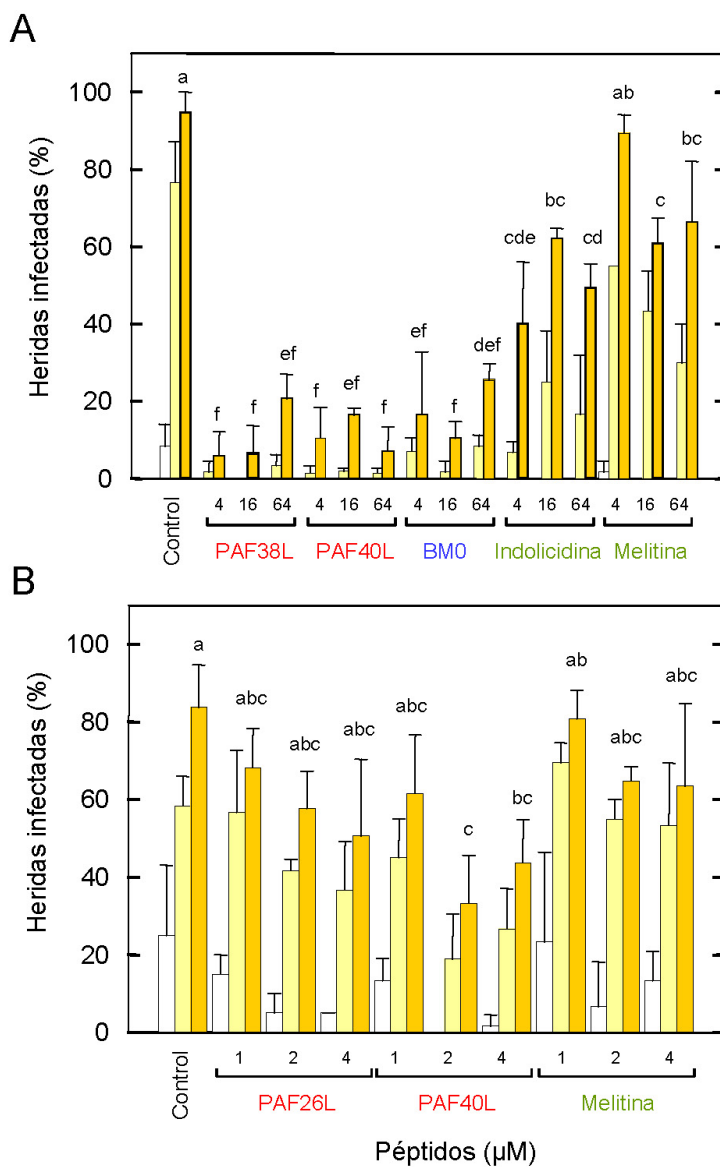


Figura 48. Efecto dosis-respuesta de distintos péptidos sobre la infección de *P. digitatum* PHI-26. Se inocularon frutos cítricos de naranja con conidios de *P. digitatum* solos o incubados con los péptidos durante 16 h a las concentraciones de 4, 16 y 64 μM en (A) y 1, 2 y 4 μM en (B). Los frutos pertenecieron a las variedades de *C. sinensis* L. Osbeck cv. Navelate (A) y cv. Lanelate (B). Los resultados muestran la media del porcentaje de heridas infectadas ± SD para cada tratamiento a los 3 (barras blancas), 5 (amarillas) y 7 (naranjas) dpi. Para simplificar, sólo se muestra el resultado de la separación estadística de medias al 95% de confianza en las barras correspondientes a los 7 dpi.

La Figura 48 muestra los resultados de dos experimentos independientes representativos de estos estudios, efectuados con concentraciones de los péptidos desde 1  $\mu\text{M}$  hasta 64  $\mu\text{M}$  y en dos variedades diferentes de frutos cítricos de naranja, de las variedades Navelate (Figura 48A) y Lanelate (Figura 48B), distintas también a la que se ha utilizado anteriormente en los ensayos mostrados en la Figura 46A (Navelina).

Los péptidos PAF38L, PAF40L y BM0 mostraron los mejores niveles de control y, como ocurría en los experimentos de actividad fungicida, los análisis de separación de medias entre las distintas concentraciones testadas no difirieron de forma significativa en estos péptidos a partir de la concentración de 4  $\mu\text{M}$  (Figura 48A y Figura 49). Por otra parte el péptido melitina, el cual no dio de forma consistente actividad de protección en los distintos ensayos realizados, solamente mostró una ligera mejora en su control del desarrollo de

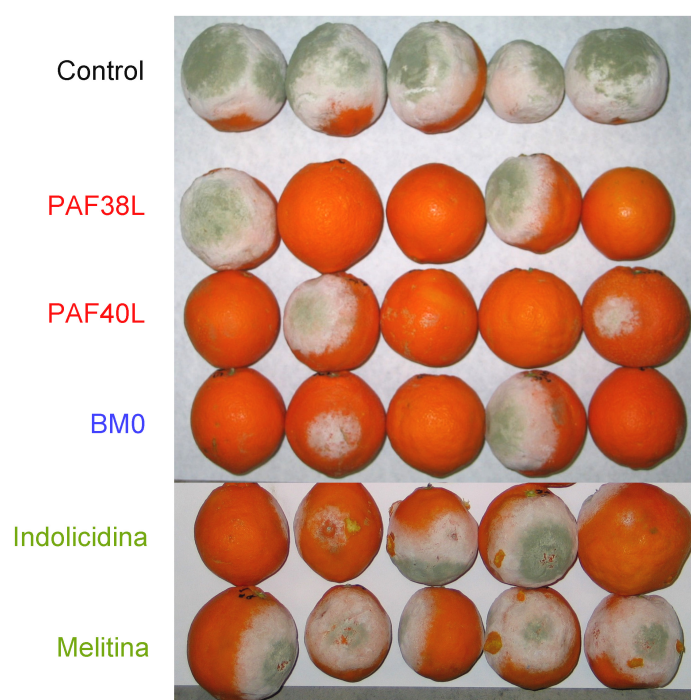


Figura 49. Fotografías de una de las réplicas de 5 frutos utilizadas en el experimento mostrado en la Figura 48A. Los frutos cítricos (*C. sinensis* L. Osbeck cv. Navelate) corresponden a la concentración de 16  $\mu\text{M}$  ensayada con los distintos péptidos.

los síntomas del hongo al aumentar la concentración a partir de 16  $\mu\text{M}$  y sólo en algunos ensayos (Figura 48A, Figura 49, y datos no mostrados). Este resultado sin embargo, no se correlaciona con los recuentos de conidios viables obtenidos tras su exposición al péptido a tales concentraciones (Figura 47), donde la actividad fungicida del péptido no presentó ninguna mejora al ensayarlo a concentraciones por encima de 16  $\mu\text{M}$ .

De forma consistente, los resultados han mostrado que los péptidos PAF38L, PAF40L y BM0 son capaces de controlar el desarrollo de las infecciones del hongo a concentraciones muy bajas, llegando incluso a 2  $\mu\text{M}$  (Figura 48B y datos no mostrados). Otros péptidos como melitina o indolicidina no mostraron protección alguna a estas bajas concentraciones.

## **DISCUSIÓN**



## 1. IDENTIFICACIÓN Y DISEÑO RACIONAL DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS.

Los problemas derivados del uso de fungicidas en agroalimentación exigen la búsqueda de nuevos compuestos activos que los sustituyan de una manera eficaz y segura, tanto para el medio ambiente como para los consumidores. Una fuente muy relevante de estos compuestos deriva del estudio de péptidos y proteínas antimicrobianas. La utilización de AMP como potenciales agentes de control de enfermedades vegetales ya ha sido propuesta por distintos autores (Jaynes *et al.*, 1987; Casteels *et al.*, 1989; Rao, 1995; van der Biezen, 2001; Montesinos, 2007), siguiendo aproximaciones más desarrolladas en el campo de la biomedicina y la clínica (De Lucca y Walsh, 1999; Hancock, 2001; Zasloff, 2002; Hancock y Sahl, 2006). Se han identificado un gran número de AMP desde fuentes naturales. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas químicas de síntesis y modificación de péptidos está permitiendo el diseño racional de AMP frente a dianas o microorganismos específicos, pudiendo además modificar a elección péptidos naturales con el objetivo de mejorar (o incluso eliminar) determinadas propiedades no deseables.

### 1.1. Identificación de péptidos derivados de PAF26.

PAF26 es un péptido catiónico y rico en triptófano identificado en el bioensayo de una biblioteca combinatorial frente al hongo *P. digitatum* (López-García *et al.*, 2002). Muestra actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos y especificidad de acción. El péptido PAF34 posee una actividad reversa a la de PAF26, aunque sólo se diferencia en dos residuos (Figura 43A).

PAF26 posee características anfipáticas en su molécula debidas a la presencia de tres residuos catiónicos en su extremo N-terminal, seguidos de tres aromáticos e hidrofóbicos en C-terminal (ver Figura 6). En estudios previos de nuestro grupo, se analizó la influencia de cada residuo en las propiedades del péptido utilizando una serie completa de seis análogos de sustitución por alanina con los que se determinaron sus distintas propiedades antimicrobianas sobre *P. digitatum* (López-García, 2002). Este estudio determinó que todos los residuos de PAF26 contribuyen en mayor o menor

medida en sus propiedades al mostrar todos los análogos menor actividad que PAF26 frente a *P. digitatum*. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los péptidos (Figura 50). Al cuantificar y comparar con PAF26 las propiedades inhibitorias y fungicidas de los seis análogos, la disminución más acusada se produjo con las sustituciones de los aminoácidos con carga positiva, en los que su actividad antifúngica disminuyó hasta en cuatro veces. A continuación, en menor medida fueron también afectados los dos residuos de triptófano, y por último el residuo de fenilalanina que fue el aminoácido que mostró las menores variaciones.

También fueron comparadas sus propiedades de permeabilización del micelio de *P. digitatum*. Todos los análogos excepto PAF26.f5a tuvieron mayores pérdidas en su capacidad de permeabilización que en su actividad de inhibición (comparar barras blancas y negras en Figura 50). Este efecto diferencial de cada sustitución de Ala nos sugiere la disociación entre las propiedades de inhibición del crecimiento y de permeabilización celular entre los distintos residuos del péptido (Muñoz *et al.*, 2007).

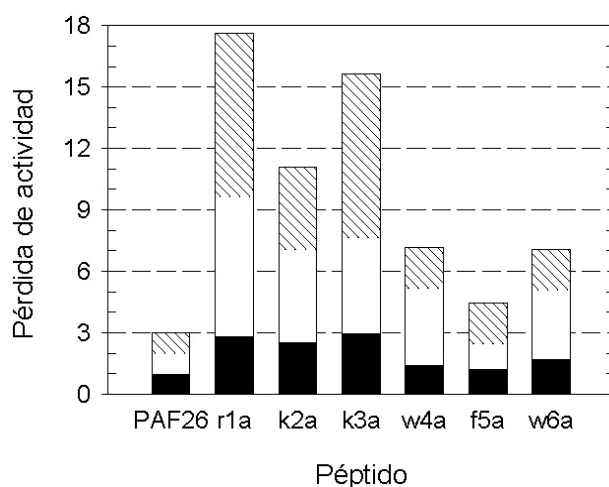


Figura 50. Pérdida relativa de actividad de cada uno de los seis análogos de sustitución por Ala en comparación con el péptido parental PAF26D. Las barras representan el valor relativo obtenido para cada péptido representativo de la inhibición del crecimiento (barras negras), la permeabilización (blancas) y la actividad fungicida (ralladas) frente a *P. digitatum*. Los valores relativos se calcularon con los correspondientes de PAF26D como referencia [adaptado de (Muñoz *et al.*, 2007)].



La mejora en la potencia y/o especificidad de PAF26 se podría alcanzar a través del reemplazo o adición de aminoácidos específicos. Esta posibilidad ha sido explorada en este trabajo mediante la adición de diez aminoácidos seleccionados en el extremo N-terminal del péptido, ensayando las propiedades antimicrobianas de la colección de heptapéptidos resultante. La estrategia de extensión de AMP por adición de distintos residuos ya ha sido utilizada con resultados positivos en otros trabajos. Por ejemplo la identificación del péptido 77-3 (derivado de 66-10) frente al hongo fitopatógeno *F. sambucinum* (Tabla 4) (Gonzalez *et al.*, 2002), o el péptido BM2 (derivado de BM0) con un mayor espectro de actividad fungicida (Monk *et al.*, 2005).

La serie de heptapéptidos derivados de PAF26 mostró distintos perfiles de actividad/especificidad antimicrobiana y ausencia total de actividad hemolítica (ver apartado 3 de Resultados). En general, en el conjunto de experimentos realizados sobre hongos filamentosos, los más activos fueron los heptapéptidos PAF38 y PAF39, junto con PAF40, PAF41 y PAF42. Este resultado era en cierto modo esperable ya que las sustituciones de los residuos catiónicos en PAF26 fueron las que produjeron las mayores pérdidas de actividad. Es de destacar que frente al patógeno de arroz *M. grisea*, uno de los fitopatógenos destructores de cultivos más relevante en la actualidad, fueron los heptapéptidos PAF41 y PAF42 los que mostraron la actividad antifúngica mayor y no los péptidos PAF38 y PAF39. En el caso de *B. cinerea* y *F. oxysporum* el mayor incremento en el MIC, aunque no elevado, lo mostraron PAF40 y PAF38, respectivamente (Tabla 13).

En general, esta estrategia ha llevado a la identificación de heptapéptidos que han mostrado mejores actividades que PAF26 frente a la mayoría de los fitopatógenos testados (Figura 42A), aunque en algunos de ellos también supuso el aumento de su actividad frente a los microorganismos no diana de nuestro estudio (la levadura y las bacterias) (Figura 42B).

Los ensayos microbicidas confirmaron y extendieron las observaciones encontradas en los ensayos de inhibición, siendo los derivados catiónicos (PAF38, PAF39 y PAF40) y los aromáticos (PAF41 y PAF42) los que aumentaron su actividad fungicida frente a conidios de *P. digitatum*. Sin embargo, estos péptidos también mataron más eficientemente células de la levadura y la

bacteria, a excepción de PAF40 que mostró la mejor relación de potencia y especificidad frente a *P. digitatum* (Figura 43B, y Tabla 17).

En conjunto, nuestros resultados indican que determinadas modificaciones llevaron a la identificación de péptidos antimicrobianos de más amplio espectro, y que por tanto no serían deseables siempre que la diana antimicrobiana fueran específicamente hongos filamentosos. En cualquier caso, nuestros datos proporcionan información acerca del desarrollo de nuevos péptidos antimicrobianos. Sin embargo, es de destacar el hecho de que en algunos péptidos se empeoraron sus propiedades antifúngicas tras la adición de determinados residuos (ver más adelante), lo que nos indica que la secuencia de PAF26 por sí misma no garantiza la potencia ni especificidad antifúngica en los heptapéptidos.

Otra conclusión de este estudio es que no se encontró una clara relación entre la potencia/especificidad antimicrobiana y las características físicas de carga neta, tamaño o hidrofobicidad de los péptidos (ver Tabla 7), lo cual sugiere la existencia de interacciones más complejas entre los residuos de aminoácidos y la actividad antimicrobiana de los péptidos.

## **1.2. Comparativa de AMP procedentes de orígenes distintos.**

La identificación de los péptidos antifúngicos PAF motivó la búsqueda en las bases de datos accesibles de homologías de secuencia con AMP naturales. De este modo, en estudios previos se había observado que el núcleo de seis residuos de la LfcinB (LfcinB<sub>20-25</sub>) comparte características comunes en su estructura primaria con el péptido PAF26, como son la presencia de aminoácidos básicos con carga positiva junto con un motivo de dos residuos de Trp flanqueando a un tercer aminoácido (Figura 16) (López-García *et al.*, 2003). Estos dos péptidos han supuesto el punto de inicio de la comparativa realizada en este trabajo acerca de la actividad, especificidad y toxicidad de distintos AMP. Los escasos estudios existentes acerca de la actividad antifúngica del péptido LfcinB y sus derivados se habían centrado en la levadura *C. albicans* y algunos hongos filamentosos dermatofitos patógenos de humanos (Bellamy *et al.*, 1994; Farnaud y Evans, 2003; Orsi, 2004). En este trabajo, hemos extendido estas observaciones a hongos filamentosos de interés agronómico.

La LfcinB y algunos de sus derivados tienen alta actividad bactericida y fungicida frente a *Candida* que se ha correlacionado con la disrupción de las funciones y permeabilización de la membrana en bacterias (Bellamy *et al.*, 1993b) y levaduras (Bellamy *et al.*, 1993a; Wakabayashi *et al.*, 1998; van der Kraan *et al.*, 2005). Hemos demostrado que la LfcinB<sub>17-31</sub> a concentraciones MIC induce una masiva permeabilización y colapso de las hifas de *P. digitatum* (Figura 21D). Este resultado ha sido también obtenido con LfcinB<sub>20-25</sub> (datos no mostrados). Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos con otros AMP sobre conidios de hongos (Reed *et al.*, 1997; Rioux *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2002), no se observó permeabilización sobre esporas de *P. digitatum* tratado con LfcinB<sub>17-31</sub>. En algunos de estos ejemplos la permeabilización de los conidios se correlaciona con su pérdida de viabilidad (Gonzalez *et al.*, 2002). LfcinB<sub>17-31</sub> no fue fungicida sobre esporas a la mayor concentración ensayada después de largos tiempos de exposición. LfcinB<sub>20-25</sub> aunque disminuyó el porcentaje de viables, tampoco fue en ninguna de las condiciones ensayadas completamente fungicida (Figura 19). LfcinB<sub>17-31</sub> fue más tóxico frente a micelio en crecimiento que frente a conidios, mientras que LfcinB<sub>20-25</sub> mostró el resultado contrario, ejemplificando que las propiedades fungiestáticas o fungicidas sobre conidios no necesariamente se correlacionan (Bland y De Lucca, 1998) (ver más adelante).

Además, LfcinB<sub>17-31</sub> es capaz de inducir alteraciones en el crecimiento y esporulación de *P. digitatum* a concentraciones sub-MIC (Figura 21B y C). La presencia de alternaciones en la morfología de microorganismos expuestos a la acción de péptidos y proteínas antimicrobianas es común y ha sido documentada en distintos trabajos con hongos (ver más adelante). LfcinB<sub>17-31</sub> produce alteraciones morfológicas en áreas donde no se observa permeabilización. Se ha descrito que la LfcinB y péptidos derivados poseen múltiples propiedades entre las que se incluyen su acumulación en el citoplasma de bacterias, su unión a DNA o propiedades antitumorales [revisado en (Farnaud y Evans, 2003)]. Por lo tanto, como se reconoce para ciertos AMP (Brogden, 2005), el péptido LfcinB<sub>17-31</sub> podría ejercer un efecto inhibitorio sobre funciones celulares y de membrana distinto al de la permeabilización celular (ver más adelante).

Melitina es otro de los péptidos caracterizados en este trabajo (Tabla 17). De origen natural, citotóxico y de modo de acción conocido (Terwillinger y Eisenberg, 1982), ha sido ampliamente analizado como modelo de péptido con actividad lítica. En nuestro caso, ha servido en el estudio comparativo del modo de acción de PAF26. Melitina se ha comportado de manera muy activa inhibiendo la germinación y el crecimiento de *P. digitatum* (Tabla 10), permeabilizando las membranas de las células del micelio fúngico (Figura 28B y Figura 29B), inhibiendo el crecimiento bacteriano (Figura 45B) y mostrando una marcada hemólisis (Tabla 11). Sin embargo no tuvo un efecto fungicida sobre conidios en estado quiescente del hongo (Figura 30 y Figura 47).

Se han ensayado también dos péptidos relacionados en su estructura primaria con PAF26 y los derivados de LfcinB, que pertenecen a la clase de AMP catiónicos ricos en residuos de Trp (Chan *et al.*, 2006). Son el péptido de origen natural indolicidina (Falla *et al.*, 1996), que posee el mayor número de Trp de todos los péptidos ensayados en este trabajo, y el octapéptido BM0 (Monk *et al.*, 2005), identificado mediante el escrutinio dirigido de una biblioteca combinatorial frente a una protón ATPasa de levadura, y muy parecido a PAF38 en residuos y carga neta. El péptido indolicidina inhibe el desarrollo del hongo, aunque en menor medida que otros péptidos (Figura 45A), y también carece del efecto fungicida tan elevado de PAF26 (Figura 47). BM0 tiene actividad antifúngica, propiedades fungicidas sobre conidios de *P. digitatum*, y actividad antibacteriana elevadas (Tabla 15, Figura 45 y 47).

De igual modo, se estudiaron los péptidos BP15 y BP76, también catiónicos aunque sin residuos de Trp y ricos en aminoácidos alifáticos identificados a través de una estrategia combinatorial dirigida frente a bacterias fitopatógenas (Ferre *et al.*, 2006). Los péptidos BP no mostraron actividad fungicida sobre *P. digitatum* aunque sí fungiestática y elevada actividad antibacteriana (Tabla 15 y Figura 45B).

En la Tabla 17 se representa a modo de resumen una comparativa de determinadas actividades de los distintos péptidos evaluados en el transcurso de este trabajo. La valoración de su actividad fungiestática y fungicida frente a *P. digitatum*, así como la bactericida frente a *E. coli* nos permite realizar una aproximación a la especificidad que muestran los distintos péptidos y también a su potencia antifúngica. Así, PAF26 y PAF40 además de ser muy específicos

son muy activos, de forma diferente a PAF46 o LfcinB<sub>20-25</sub> que también tuvieron cierta especificidad pero poca potencia antifúngica (ver valores de la columna IE, Tabla 17).

**Tabla 17. Resumen esquemático de la especificidad en la acción antimicrobiana de los distintos péptidos evaluados en este trabajo.**

Péptido	Secuencia <sup>a</sup>	A.Fst <sup>b</sup>	A.Fcd <sup>b</sup>	A.Bact <sup>b</sup>	IE <sup>c</sup>
PAF26	Ac-rkkwfw-NH <sub>2</sub>	++	++	+	8
PAF34	Ac-rkwlfw-NH <sub>2</sub>	+	—	++	2
PAF38	Ac-rrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+++	+++	++	2
PAF40	Ac-hrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+++	++	+	8
PAF42	Ac-wrkkwfw-NH <sub>2</sub>	++	++	++	2
PAF43	Ac-yrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+	++	++	2
PAF46	Ac-qrkkwfw-NH <sub>2</sub>	+	—	—	8
LfcinB <sub>20-25</sub>	Ac-RRWQWR-NH <sub>2</sub>	+	+	+	8
LfcinB <sub>17-31</sub>	Ac-FKCRRWQWRMKKLGGA-NH <sub>2</sub>	+++	—	++	4
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	+++	—	+++	2
Indolicidina	Ac-ILPWKWPWWPWR-NH <sub>2</sub>	+	+	+	1
BM0	Ac-RFWWFRRR-NH <sub>2</sub>	+++	+++	++	2
BP76	KKLFKKILKFL-NH <sub>2</sub>	++	—	+++	1

<sup>a</sup> El código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 2.

<sup>b</sup> Los símbolos (—) y (+) y la escala de colores (de amarillo a rojo) representan una estimación de la actividad de cada péptido. A. Fst: Actividad fungiestática; A. Fcd: Actividad fungicida; A. Bact: Actividad antibacteriana.

<sup>c</sup> El Índice de Especificidad (IE) por *P. digitatum* es un valor calculado dividiendo el valor MIC de *E. coli* entre el valor MIC de *P. digitatum*. Los valores indican que el péptido es tantas veces más inhibitorio sobre el hongo que sobre la bacteria. Los valores utilizados son una media de los obtenidos en todos los experimentos llevados a cabo.

Por los resultados obtenidos, concluimos que las estrategias combinatoriales y de diseño racional en la identificación de AMP son una herramienta efectiva en la obtención de secuencias específicas frente a microorganismos específicos, como por ejemplo PAF26 o PAF40 frente a *P. digitatum*, o los péptidos BP15 y BP76 frente a bacterias.

Por otra parte, los trabajos de identificación de péptidos frente a dianas específicas (como BM0) ilustran una cuestión destacable en el diseño de estrategias de identificación de AMP ya que es una aproximación “reversa” a la realizada en los péptidos anteriores. La identificación de actividades enzimáticas susceptibles de ensayos miniaturizados, y que además fueran importantes para la viabilidad o patogenicidad del microorganismo, posibilitaría un salto cualitativo importante. Por ello, los grupos que trabajan en la identificación de AMP seguirán de cerca los estudios de caracterización de factores de virulencia y/o patogenicidad de microorganismos fitopatógenos. En cualquier caso es muy destacable la similitud entre algunos de los péptidos PAF y BM0 en cuanto a las propiedades estudiadas en este trabajo. Futuros estudios evaluarán si determinados PAF tienen también dianas moleculares similares a las de BM0.

### **1.3. Importancia de los residuos de aminoácidos en las propiedades antimicrobianas de los péptidos.**

Los péptidos que hemos analizado en este estudio son de muy pequeño tamaño y por ello no es esperable que tengan una estructura secundaria definida. Esto se ha demostrado en PAF19D y PAF26D (López-García, 2002; López-García *et al.*, 2004). Por lo tanto uno de los factores claves en su actividad es su contenido en aminoácidos así como el orden de éstos dentro de la molécula. El uso de pequeños péptidos, junto con sus modificaciones, deleciones o adiciones de residuos, nos permite el estudio detallado de la influencia de cada aminoácido en sus propiedades antimicrobianas. En un estudio frente a *Pseudomonas* sp. de un péptido de 13 aminoácidos con el que se sintetizaron análogos de su secuencia realizando variaciones al azar de la posición de sus residuos, se obtuvieron hasta 6 categorías distintas de actividad antibacteriana donde se agrupaban péptidos formados por los mismos aminoácidos diferenciándose en tan solo la posición de cada uno (Hilpert *et al.*, 2006). En otros AMP ricos en Arg y Trp, se ha demostrado que la apropiada posición y agrupamiento de determinados residuos es fundamental en su actividad y propiedades de especificidad (Wessolowski *et al.*, 2004).

El ensayo de los heptapéptidos derivados de PAF26 ha permitido extraer conclusiones sobre la importancia de distintos aminoácidos, pudiendo

discernir qué residuos y de qué manera propician o empeoran las propiedades de actividad y especificidad del péptido. Así, en los resultados obtenidos con los análogos de sustitución de alanina (Figura 50), fueron los residuos catiónicos los que más influyeron en la actividad del péptido, y en segundo lugar los aromáticos. De acuerdo con este resultado, la potencia antimicrobiana en los heptapéptidos aumentó en mayor medida con la adición de los residuos catiónicos Arg (PAF38), Lys (PAF39) e His (PAF40), junto con los residuos aromáticos de Phe (PAF41) y Trp (PAF42) en segundo lugar (Figura 42A). Este resultado se manifiesta también con el perfil de actividad y especificidad que muestra el péptido BM0, muy similar al de PAF38 (Tabla 17).

Todas estas conclusiones también dependen sobremanera del patógeno diana. Un caso curioso donde el aumento de actividad se produce de forma notable con la adición de los residuos aromáticos es, como hemos comentado anteriormente, sobre el hongo *M. grisea* (Tabla 13).

El ensayo de los heptapéptidos frente a la levadura y las bacterias nos ayuda a tener más información acerca del efecto de determinados residuos sobre la especificidad de microorganismo (Figura 42B y Figura 43B). El aminoácido de His (PAF40) aumenta la actividad frente a los hongos filamentosos, pero sin embargo no lo hace tanto frente a las bacterias como el resto de los péptidos más activos frente a hongos. La adición de Tyr (PAF43) mostró un notable descenso de actividad frente a los hongos filamentosos mientras que frente a las bacterias el efecto fue reverso, aumentando su actividad hasta en cuatro veces. Relacionado con este resultado, recientemente se ha publicado un estudio de mejora de la actividad del péptido BP76 frente a la bacteria *E. amylovora* a través de análogos de sustitución. El péptido mejorado BP100 fue obtenido al sustituir el residuo de Phe en la posición 10 por el de Tyr en la secuencia de BP76 (ver Tabla 4) (Badosa *et al.*, 2007).

Por el contrario, la adición del residuo de Gln en PAF46 disminuyó la actividad frente a los hongos y la levadura y especialmente la actividad fungicida frente a conidios de *P. digitatum*, manteniéndose en las bacterias, por lo que este residuo sugerimos que no es aconsejable en péptidos diseñados frente a hongos. En este sentido, es de destacar la presencia del residuo de Gln en otros péptidos evaluados y que también poseen una pobre actividad fungicida, como son los derivados de LfcinB y la melitina.

Queremos también comentar la presencia de aminoácidos alifáticos (Leu, Val e Ile) en muchos AMP. En nuestro estudio, estos residuos se encuentran en péptidos que han mostrado una actividad antibacteriana elevada, unida a una menor especificidad, además de baja actividad fungicida frente a conidios; ejemplos son melitina, indolicidina o BP76 (Tabla 17). El heptapéptido formado tras la adición de Leu (PAF44) aumento la actividad antifúngica del péptido frente a algunos hongos, entre ellos *P. digitatum*, pero también bastante frente a la levadura y las bacterias disminuyendo así la especificidad de PAF26 (Figura 42B). Así, el péptido PAF34, que como hemos comentado difiere de PAF26 en tan solo la posición de dos residuos y solo uno de naturaleza distinta, la Leu en la posición 4 en lugar de una Lys, muestra un perfil de actividad reverso al de PAF26 con una notable mayor actividad bactericida y menor especificidad (Figura 43A) (Tabla 17). También hemos evaluado AMP identificados por otros autores como son los péptidos 66-10 (Reed *et al.*, 1997) y 77-3 (Tabla 4) (Gonzalez *et al.*, 2002), ricos en residuos de Phe pero sin Trp y con un residuo de Leu, y que han mostrado notables actividades frente a los hongos filamentosos y los microorganismos no diana de nuestro estudio en las mismas condiciones de ensayo, junto que una notable actividad hemolítica [datos no mostrados y (López-García *et al.*, 2000)]. Estos péptidos poseen un amplio espectro de actividad, menor especificidad antifúngica por tanto, y mayor toxicidad inespecífica. En distintos estudios con péptidos catiónicos de pequeño tamaño, se ha demostrado que el aumento de residuos hidrofóbicos se correlaciona con un incremento de la citotoxicidad inespecífica y por lo tanto debería ser evitado (Powell *et al.*, 2000b).

En este trabajo, hemos tenido en cuenta las distintas modificaciones en los extremos N- y C-terminal de los péptidos (Tabla 7) con el objeto de realizar la mejor comparativa posible entre actividades de péptidos. Los péptidos PAF fueron identificados y caracterizados con sus extremos acetilados y amidados (López-García *et al.*, 2000). Se ha demostrado previamente que la acetilación y amidación de PAF26 no cambia substancialmente la actividad del péptido *in vitro* frente a *P. digitatum* (López-García *et al.*, 2007). Aunque indolicidina, como el péptido melitina, se encuentra en la naturaleza con el extremo amino libre y el carboxilo amidado (Chan *et al.*, 2006), utilizamos la indolicidina amidada para una mejor comparación. Un ejemplo interesante es el de BM0, que fue



identificado como muy activo frente a levaduras en su versión D- con el extremo N-terminal libre (Monk *et al.*, 2005). Se demostró que tanto la versión sintetizada con L-aminoácidos con el extremo amino libre como la versión D- con el extremo acetilado tuvieron una reducción de cuatro veces su actividad frente a las levaduras ensayadas (Monk *et al.*, 2005). En nuestro caso, y como esperábamos, nuestra versión del péptido BM0 tuvo actividad reducida frente a la levadura *S. cerevisiae* (Tabla 15). Los péptidos BP15 y BP76, que habían sido caracterizados con su extremo N-terminal libre y el C-terminal amidado (Ferre *et al.*, 2006), han sido usados de esta manera con el propósito de comparar sus propiedades antifúngicas con las previamente descritas antibacterianas.

## 2. MODO DE ACCIÓN DE PAF26.

Como se ha comentado en la Introducción, el modo de acción de los AMP es complejo y dependiente de múltiples factores entre los que intervienen no solo las características del péptido, sino también las de los microorganismos sobre los que actúa. A modo de resumen, se constata que la naturaleza catiónica de muchos AMP les permite su interacción electrostática con las estructuras cargadas negativamente de las envueltas celulares de los microorganismos. En numerosos trabajos se ha correlacionado la actividad antimicrobiana de péptidos con su capacidad de interacción e inserción en bicapas lipídicas y su desestabilización, así como con la permeabilización de las membranas celulares de microorganismos (Epanand y Vogel, 1999; Shai, 1999; Lohner y Blondelle, 2005). Estos datos parecen indicar que el modo de acción primario es a través de la lisis celular causada por la disrupción de las membranas biológicas. Sin embargo, el reciente incremento de nuevos datos sugiere que determinados AMP podrían usar mecanismos más sofisticados de actuación, no necesariamente relacionados con la permeabilización celular (Hancock y Lehrer, 1998; Yeaman y Yount, 2003; Brogden, 2005; Lohner y Blondelle, 2005).

Es obvio por tanto, la necesidad de clarificar cuál es el modo de acción de los AMP, particularizando en casos concretos de interés. Este conocimiento será de gran utilidad en la optimización y diseño de nuevas secuencias antimicrobianas.

### 2.1. Interacción de PAF26 con microorganismos.

Las observaciones realizadas en microscopía confocal con algunos CAMP como indolicidina (Lee *et al.*, 2003a), o con el propio PAF26 marcado con fluoresceína (Figura 33A y B), confirman que la interacción primaria de estos péptidos es con las superficies de sus células diana. Es sabido que la actividad de los péptidos catiónicos, incluyendo aquellos ricos en Trp como es el caso de PAF26, es dependiente de la fuerza iónica del medio (López-García *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2006), indicando que esa interacción inicial con los microorganismos es electrostática. Los resultados obtenidos con: (i) el estudio con los análogos de PAF26 de sustitución por alanina, en donde fue la sustitución de los residuos catiónicos la que más afectó a la actividad antifúngica del péptido (Figura 50) (López-García, 2002), y (ii) los heptapéptidos en los que la adición de residuos catiónicos fue la que más incrementó la potencia antimicrobiana (Tabla 13 y Figura 42), confirman la importancia de tales interacciones.

Se ha demostrado que mutantes de la bacteria *R. solanacearum* en genes de biosíntesis del LPS tienen una mayor sensibilidad a tioninas y LTPs, y una menor virulencia sobre tejidos vegetales (Titarenko *et al.*, 1997). Nuestro grupo ha utilizado un microorganismo modelo para demostrar, de forma análoga, que mutaciones en los genes *MprF* y *Dlt* hacen a la bacteria *Staphylococcus aureus* susceptible a PAF26 (López-García *et al.*, 2007). *MprF* es un enzima que transfiere L-lisina al fosfatidilglicerol (Peschel *et al.*, 2001) mientras que el operón *DLT* está implicado en la transferencia de D-alanina al ácido teicoico (Peschel *et al.*, 1999), aumentando en ambos casos la carga neta externa de las envueltas bacterianas y por tanto la repulsión de péptidos catiónicos.

La interacción con membranas modelo de distintos péptidos PAF, entre ellos PAF26, fue estudiada mediante técnicas de espectroscopia de fluorescencia y dicroísmo circular utilizando micelas y bicapas fosfolipídicas (López-García *et al.*, 2004). En estos experimentos se demostró que la presencia de residuos de Triptófano es determinante para la interacción de PAF26 con vesículas fosfolipídicas. En su conjunto, estos resultados sugieren una diferenciación de la molécula de PAF26 en dos partes, su extremo N-terminal catiónico necesario para la interacción electrostática y su C-terminal hidrofóbico que le capacita para interactuar con membrana.

En este trabajo hemos demostrado que los péptidos PAF26, PAF38 y PAF40 sintetizados con L-aminoácidos no difieren substancialmente de sus correspondientes estereoisómeros D- en su actividad *in vitro* frente a *P. digitatum* (Figura 44), indicando que la interacción no se produce mediante receptores estereoespecíficos.

Hemos observado que la interacción de FITC-PAF26 se puede visualizar sobre células fúngicas a concentraciones hasta 100 veces menores (300 nM) (Figura 33) que las necesarias en el caso de células de *S. cerevisiae* (30  $\mu$ M) (Figura 34). Estos resultados indican la existencia de un(os) componente(s) en las envueltas celulares de *P. digitatum* y otros hongos fitopatógenos que median su mayor susceptibilidad a PAF26, y que no poseen (o en menor medida) el resto de microorganismos analizados aunque a algunos, como la bacteria *S. aureus* y mediante modificaciones de sus envueltas, se les puede incrementar la sensibilidad a AMP. Existen ejemplos descritos de péptidos y proteínas antimicrobianas que interaccionan con componentes específicos de las envueltas de microorganismos. Se ha demostrado la afinidad de una  $\alpha$ -tionina de vegetales por el  $\beta$ -glucano de las paredes fúngicas (Oita *et al.*, 2000), la interacción del péptido D4E1 (Tabla 4) preferentemente con el ergosterol (De Lucca *et al.*, 1998), o la sensibilidad de *S. cerevisiae* a distintas defensinas vegetales mediada por diferentes glicolípidos (Thevissen *et al.*, 2003; 2004; 2005; Aerts *et al.*, 2006).

En cualquier caso, e independiente de la existencia de estas interacciones específicas, sí que se han demostrado la presencia de sistemas sensores moleculares en bacterias de la presencia de AMP y que permiten señalar su existencia y modular una respuesta defensiva. El operón PhoP-PhoQ es un sistema de membrana con actividad quinasa implicado en la patogénesis de bacterias y que es capaz de activarse en presencia de péptidos antimicrobianos (Bader *et al.*, 2005). En la bacteria fitopatógena *Erwinia crysanthemii* se vio la implicación de este sistema en su virulencia sobre tejidos vegetales así como su susceptibilidad a tioninas vegetales (Llama-Palacios *et al.*, 2005).

## 2.2. Efecto sobre la morfología de *P. digitatum*.

En distintos estudios se ha descrito la alteración de la morfología de hongos filamentosos como parte de la respuesta de éstos a la exposición a AMP. Algunos ejemplos son el hongo *R. solani* en el que se ha detectado la formación de hifas dentadas y desiguales, desorganización y agregaciones citoplasmáticas, e invaginaciones de la membrana plasmática, en presencia de péptidos sintéticos de pequeño tamaño (Rajasekaran *et al.*, 2001; Oard *et al.*, 2004). También, *P. infestans* presentó hifas más cortas con una disminución en la distancia intersepto, alteraciones en los patrones de ramificación y de esporulación, con ramificaciones anormales y engrosamientos de células hifales más cortas (Cavallarin *et al.*, 1998; Ali y Reddy, 2000). De forma general, este tipo de alteraciones descritas con otros péptidos las hemos observado en el micelio de *P. digitatum* expuesto al péptido LfcinB<sub>17-31</sub> (Figura 21) y a PAF26 (Figura 24B, y Figura 25A y C).

Análisis microscópicos han mostrado que diferentes AMP causan cambios ultraestructurales diferenciados en células bacterianas, como es el caso de los péptidos SMAP29 y CAP18 sobre *Pseudomonas aeruginosa*, indicando que tienen diferentes dianas celulares o modos de acción (Kalfa *et al.*, 2001; Brogden, 2005). En un trabajo reciente con el hongo *F. graminearum*, se han descrito también cambios en la morfología claramente diferenciales por la exposición del hongo a dos defensinas distintas procedentes de dos especies de *Medicago* y de secuencia de aminoácidos relacionada (Ramamoorthy *et al.*, 2007). El mismo trabajo demostró la implicación de dos cascadas de señalización de MAP quinasas en la respuesta a una de esas defensinas pero no a la otra. Estos trabajos ha demostrado de una forma elegante que distintos péptidos o proteínas antimicrobianas inducen alteraciones diferenciales en un mismo microorganismo que probablemente están relacionadas con distintos modos de acción o de percepción del antimicrobiano.

Nos hemos centrado más en PAF26, y en este caso hemos detectado algunas alteraciones morfológicas significativas. La presencia de dicotomías apicales y ramificaciones emergentes abortadas de las hifas son fenocopias de mutantes de hongos filamentosos con alteraciones en los genes implicados en el mantenimiento de la polaridad, crecimiento apical, integridad de la pared celular y formación de septos, y ramificaciones subapicales (Momany, 2002;

Harris y Momany, 2004; Momany, 2005). Estos resultados nos indican que los péptidos están actuando sobre el crecimiento polar de los hongos, para el cual se requiere la movilización y localización de la maquinaria morfogénica hacia sitios específicos de deposición de sus paredes celulares.

Otra alteración producida por la exposición a PAF26 en *P. digitatum* es la formación de abombamientos de células en ápices y zonas intermedias de las hifas, en las que se da una deposición anormal de la quitina, como lo determina una intensa tinción de CFW en estas zonas (Figura 24C, y Figura 25B y D). Este otro tipo de alteraciones son fenocopias de mutantes en los genes de biosíntesis de quitina en hongos filamentosos (Borgia y Dodge, 1992; Specht *et al.*, 1996; Horiuchi *et al.*, 1999; Martín-Udíroz *et al.*, 2004) y en la fase filamentosa de la levadura *C. albicans* (Munro *et al.*, 2001). Un estudio de los genes de biosíntesis de quitina en el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* reveló la presencia de hinchamientos en células individuales de las hifas de mutantes conteniendo un gran número de núcleos tras la tinción con DAPI (Martín-Udíroz *et al.*, 2004), de modo similar a lo que hemos visto con el péptido PAF26 a concentraciones IC<sub>50</sub> sobre el micelio de *P. digitatum* (Figura 27). Este es uno de los resultados de nuestro estudio que nos sugiere la implicación de la biosíntesis de quitina como factor de susceptibilidad a PAF26 (ver más adelante).

### 2.3. Permeabilización celular. Diferencias con el péptido Melitina.

Las observaciones microscópicas realizadas junto con las curvas dosis-respuesta de PAF26 (Figura 28A), revelan una pobre fluorescencia de la sonda SG a concentraciones sub-MIC de PAF26 a las cuales hay cierta inhibición del crecimiento de *P. digitatum* y se producen alteraciones en su morfología, indicando que la permeabilización celular es mínima a concentraciones que afectan al crecimiento fúngico. Estudios previos han discutido el hecho de que no siempre existe una correlación completa entre la capacidad de ciertos AMP para permeabilizar membranas y su actividad antimicrobiana (Epanand y Vogel, 1999; Wu *et al.*, 1999). Un ejemplo similar es el de los péptidos BM0 y BM2, que como hemos visto poseen importantes similitudes en su secuencia con el péptido PAF26 (Tabla 17). Concentraciones bajas de BM2 que fueron inhibitorias del crecimiento, no causaron la permeabilización de las células de la

levadura ni indujeron hemólisis en células humanas (Monk *et al.*, 2005), sugiriendo que dicha permeabilización no es necesariamente el mecanismo primario de acción antimicrobiana del péptido.

Para aportar datos adicionales sobre esta cuestión hemos realizado un estudio comparado entre PAF26 y Melitina. La melitina es un péptido conocido por su capacidad formadora de poros, actuando presumiblemente sobre las membranas fúngicas a través de un mecanismo lítico (Matsuzaki *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001; Bechinger, 2004). Su acción antimicrobiana está ligada a la permeabilización. Los parámetros de IC<sub>50</sub> y MIC de PAF26 y Melitina son similares. No obstante, las curvas dosis-respuesta de melitina indican que la fluorescencia del SG precede a la inhibición del crecimiento (Figura 28B). Este péptido permeabiliza las células del micelio de *P. digitatum* (B) y produce hemólisis de glóbulos rojos humanos (Tabla 11) de manera mucho más rápida y eficiente que PAF26. El péptido análogo mel.subK7I tiene alterada su estructura y disminuida su interacción con las membranas. Posee menor actividad antifúngica que melitina (y menor que PAF26) y la permeabilización que produce es más pausada y de menor intensidad, la cual a su vez es similar a la obtenida con PAF26 (Figura 28C y Figura 29C).

La actividad inhibitoria de PAF26 fue mayor que la de melitina y su análogo mel.subK7I, produciéndose incluso a concentraciones a las cuales apenas se observó permeabilización. Por lo tanto, de estos resultados se puede concluir indirectamente que el efecto antimicrobiano primario de PAF26 no es la permeabilización celular como sí lo es en melitina. Previamente, se ha descrito que PAF26 no posee efecto sinérgico con los fungicidas TBZ e IMZ (López-García *et al.*, 2003). En esta falta de sinergismo, PAF26 difiere marcadamente de otros péptidos sintéticos, como el péptido 77-3, que promueven la permeabilización y sí tienen un efecto sinérgico con TBZ, muy posiblemente porque facilitan el acceso del fungicida al interior celular (Gonzalez *et al.*, 2002). PAF26 no facilitaría la internalización de estos fungicidas a través de la permeabilización de las membranas a concentraciones sub-IC<sub>50</sub> de péptido necesarias para cuantificar el sinergismo. También, a diferencia de PAF26, melitina carece de propiedades fungicidas sobre conidios (Figura 30) a pesar de actuar de manera muy efectiva sobre las células del

micelio. Este resultado que se produce también con el péptido LfcinB<sub>17-31</sub>, pone de manifiesto las diferencias en los modos de acción de los péptidos.

Hemos señalado ya la existencia de diferentes modelos que explican la actividad antimicrobiana de péptidos desestabilizantes de membranas (ver Introducción) (Figura 8) (Shai, 1999; Huang, 2000; Brogden, 2005). En contraste con melitina, PAF26 es un péptido demasiado corto para traspasar y permeabilizar las membranas biológicas como un monómero, por lo que interacciones de mayor grado entre monómeros (a concentraciones altas de PAF26) serán necesarias para explicar de alguna forma una permeabilización del péptido basada en sus propiedades biofísicas. Esta diferencia también se manifiesta en las diferentes cinéticas de permeabilización de *P. digitatum* causadas por ambos péptidos (Figura 29).

La presencia de diferentes estadios de permeabilización en las células, la ninguna o poca correlación entre la permeabilización y la formación de alteraciones morfológicas en el micelio expuesto al péptido PAF26 a concentraciones sub-MIC, y las diferencias observadas con el modo de acción de melitina, sugieren la existencia de un modo de acción antimicrobiano del péptido que no está ligado en primera instancia con la desestabilización de las membranas y su consiguiente permeabilización celular.

#### **2.4. PAF26 como péptido tipo penetratina.**

Como hemos comentado en la Introducción, existe un tipo de péptidos, llamados en primer lugar dominios de transducción de proteínas (PTD) y posteriormente rebautizadas como péptidos tipo penetratina (CPP), que son capaces de internalizarse de una forma no destructiva venciendo la naturaleza impermeable de las membranas lipídicas (Prochiantz, 2000; Lindgren, 2000; Leifert y Whitton, 2003). Los primeros péptidos descubiertos con estas características fueron derivados de Tat (Proteína activadora de la transcripción del VIH-1) (Frankel y Pabo, 1988), y pAntp (Factor de transcripción homeótico antenapedia de *Drosophila*) (Joliot *et al.*, 1991). Su capacidad para translocarse se atribuyó a las propiedades de los aminoácidos básicos de sus secuencias, identificándose posteriormente en ambos casos la mínima secuencia peptídica necesaria para que ocurra la internalización [Tat (48-60) (Vives *et al.*, 1997) y penetratina (Derossi *et al.*, 1994)]. Una vez en el

interior celular, estos péptidos actúan sobre sus dianas moleculares regulando la expresión de genes nucleares o virales.

El marcaje fluorescente se ha usado para demostrar la interacción e internalización de péptidos catiónicos capaces de atravesar membranas celulares y vesículas modelo (Vives *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2000; Kragol *et al.*, 2002; van der Kraan *et al.*, 2005). El péptido FITC-PAF26 interacciona con el micelio de *P. digitatum* a concentraciones subinhibitorias y rápidamente se transloca al interior celular, sin alteración aparente de su morfología o permeabilización. FITC-PAF26 se internaliza a 300 nM (Figura 33C-E), concentración cinco veces menor que su IC<sub>50</sub> (Tabla 10) y diez veces menor que el IC<sub>50</sub> y la concentración de permeabilización de la melitina (Tabla 10 y Figura 28B). A esta concentración tan baja de péptido, no se observa la entrada en “trans” de SG (Figura 28A) o de FITC (Figura 33F). Es de destacar que en la caracterización inicial del péptido Tat (48-60), su internalización se detectó a concentraciones en torno a 100 nM (Vives *et al.*, 1997).

Se ha descrito la capacidad de penetración al interior celular en determinados AMP, algunos de secuencia similar a los CPP y también a PAF26. Estos dominios o péptidos son catiónicos, ricos en residuos catiónicos y con motivos de residuos de Phe y Trp críticos en su capacidad de internalización (Futaki *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2003) (ver Tabla 18).

Algunos ejemplos son los péptidos buforina 2 (Park *et al.*, 1998) y polifemusina I (Powers *et al.*, 2006), que se acumulan en el interior de la bacteria *E. coli* a concentraciones por debajo de las inhibitorias, como ocurre con PAF26. Péptidos derivados de LfcinB también han sido detectados en el interior celular bacteriano (Haukland *et al.*, 2001; van der Kraan *et al.*, 2005). La proteína antifúngica AFP de *A. giganteus* también se internaliza y localiza en el núcleo celular del hongo *M. grisea* (Moreno *et al.*, 2006).

Un ejemplo relevante es el de las proteínas PR10, las cuales tienen actividad ribonucleasa que se asocia a su actividad antimicrobiana (Van Loon *et al.*, 2006). Se ha demostrado que una PR10 de cacahuete se localiza en el interior de *F. oxysporum* (Chadha y Das, 2006). Se generó un mutante deficiente en actividad ribonucleasa que se internaliza pero que no inhibe el crecimiento del hongo ni le causa permeabilización celular, disociando la actividad tipo CPP



de la antimicrobiana. Esto sugiere que la permeabilización observada en el hongo es consecuencia de la muerte celular y no un efecto derivado de la capacidad de la proteína para atravesar las membranas biológicas.

Estas relaciones entre CPP y AMP catiónicos han hecho que algunos autores cuestionen abiertamente las diferencias reales existentes entre determinadas familias de péptidos antimicrobianos y los péptidos tipo penetratina (Henriques *et al.*, 2006). Pero también se ha dado un paso más, y estudios recientes han derivado o demostrado propiedades antimicrobianas partiendo de péptidos que sólo eran conocidos inicialmente por sus capacidades de penetración celular (Jung *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006; Palm *et al.*, 2006). Como se resume en la Tabla 18, son cada vez más los ejemplos de CPP en los que se encuentran propiedades antimicrobianas y a su vez AMP en los que se descubre un modo de acción tipo penetratina.

**Tabla 18. Ejemplos de algunos péptidos con actividad descrita de AMP y CPP.**

Péptido	Secuencia	AMP	CPP
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	[1] <sup>a</sup>	[2]
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	[3]	[4]
Tat (47-58)	GRKKRRQRRRPPQ	[5]	[6]
Apidaecina	GNNRPVYIPQPRPPHPI	[7]	[8]
Buforina 2	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	[9]	[10]
Indolicidina	ILPWKWPWWPWR	[11]	[12]
LfcinB	FKCRRWQWRMKKLGAPSI TCVRRAF	[13]	[14]
Magainina 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVALKAL	[15]	[16]
PAF26	RKKWFW	[17]	Este trabajo
Polifemusina I	RRWCFRVCYRGF CYRKCR	[18]	[19]

<sup>a</sup> [1] (Palm *et al.*, 2006); [2] (Derossi *et al.*, 1994); [3] (Zhu *et al.*, 2006); [4] (Morris *et al.*, 2001); [5] (Jung *et al.*, 2006); [6] (Vives *et al.*, 1997); [7] (Casteels *et al.*, 1989); [8] (Casteels y Tempst, 1994); [9] (Park *et al.*, 1996); [10] (Kobayashi *et al.*, 2004); [11] (Falla *et al.*, 1996); [12] (Subbalakshmi y Sitaram, 1998); [13] (Tomita *et al.*, 1991); [14] (Haukland *et al.*, 2001); [15] (Zaslouff, 1987); [16] (Matsuzaki *et al.*, 1995); [17] (López-García *et al.*, 2002); [18] (Miyata *et al.*, 1989); [19] (Powers *et al.*, 2006).

Basándonos en los resultados obtenidos y las similitudes en las propiedades de secuencia encontradas, sugerimos que ciertos AMP pueden llegar a tener propiedades de esta clase de péptidos tipo penetratina (Tabla 18). Así, incluimos a PAF26 en lo que sería una nueva subclase de antimicrobianos para los que proponemos la denominación de péptidos antimicrobianos tipo penetratina (CP-AMP, del inglés “*cell-penetrating antimicrobial peptides*”).

Otra consecuencia importante de nuestro trabajo es que la eficiente translocación de PAF26 abre el camino para un posible uso del péptido como un dominio de internalización, que podría dirigir la entrada en “cis” de péptidos o proteínas frente a hongos filamentosos. Esta estrategia ya ha sido propuesta para alcanzar dianas terapéuticas en el interior de células mediante el uso de CPP como vectores (Prochiantz, 2007) y ya existen estudios con fusiones formadas con los péptidos Tat (47-58) (Schwarze *et al.*, 1999; Silhol, 2002; Nori *et al.*, 2003) o Pep-1 (Morris *et al.*, 2001). Además, la especificidad de PAF26 por el hongo *P. digitatum* permitiría el diseño de fusiones de PAF26 a proteínas tóxicas de forma que les dotaría de especificidad frente a este hongo, actuando en el interior celular a concentraciones del orden de nM. Recientemente, se ha publicado el primer trabajo de creación de una molécula antimicrobiana selectiva frente a la bacteria *Pseudomonas* sp., formada por la fusión de un dominio de 12 aminoácidos específico por la bacteria y el antibiótico de amplio espectro novispirina, actuando sobre esta bacteria y nada, o muy poco, frente a *E. coli* y *Streptococcus mutants* (Eckert *et al.*, 2006).

A modo de resumen de los resultados obtenidos durante este trabajo, presentamos la Figura 51 señalando la secuencia de interacción y efectos que tendrían lugar sobre *P. digitatum* en función de la concentración y tiempo de exposición al péptido PAF26. Así, el péptido rápidamente interacciona y difunde por las membranas, translocándose a continuación al interior celular. A concentraciones sub-MIC PAF26 causa inhibición del crecimiento y altera la morfología en un estado anterior a la permeabilización. Muchas de estas alteraciones no están permeabilizadas pudiendo incluso estar rodeadas de áreas o células sí permeables al SG. Concentraciones letales del péptido son capaces de permeabilizar de forma masiva las membranas y producir la muerte celular, llevándolo a cabo posiblemente mediante un mecanismo lítico distinto al que posee el péptido melitina, como hemos visto.

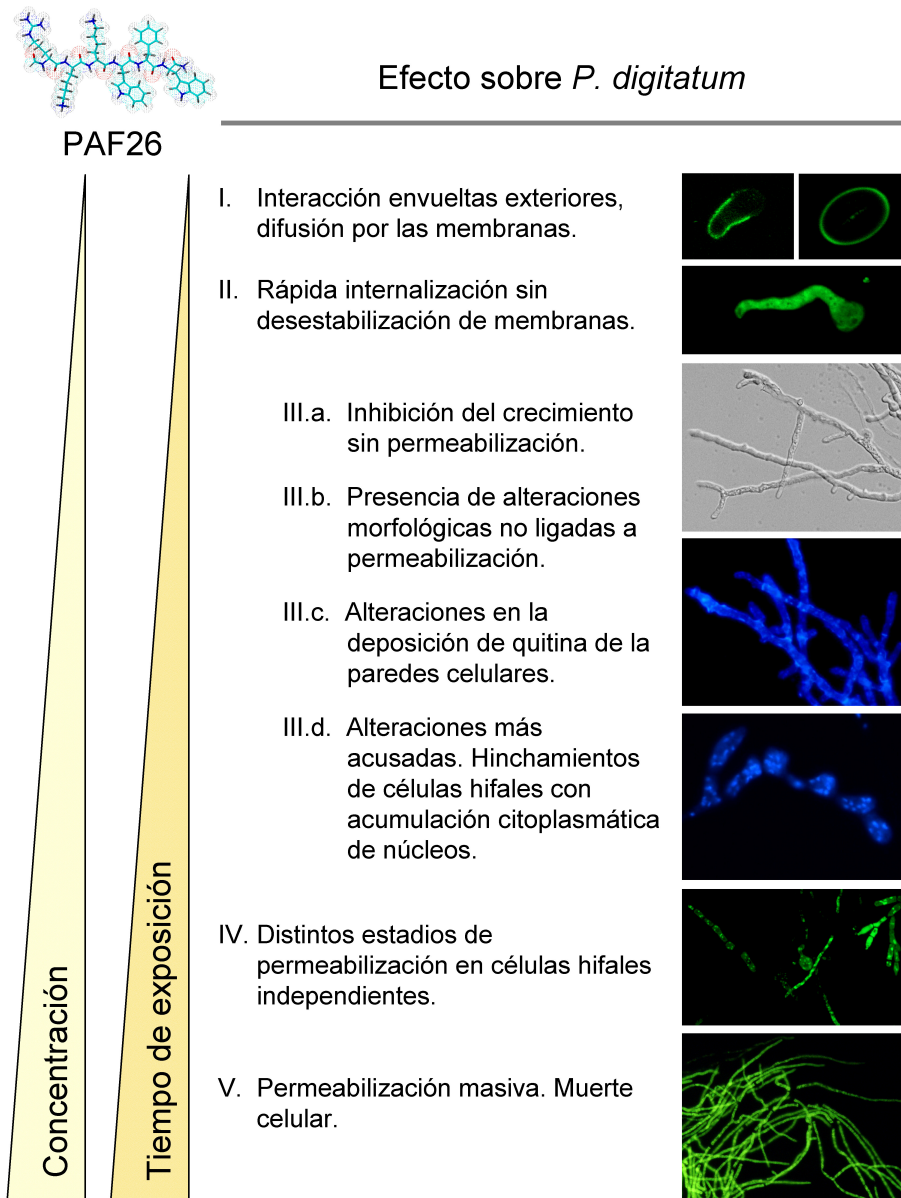


Figura 51. Esquema que resume los resultados obtenidos en el estudio morfológico de la interacción entre el péptido PAF26 y el hongo *P. digitatum*. Se proponen una serie de etapas en el efecto antifúngico de PAF26 que van acompañadas de las micrografías representativas en cada proceso.

Cuando son traslocados al interior celular los CP-AMP podrían perturbar las funciones celulares mediante un(os) mecanismo(s) independiente(s) al de la disrupción de las membranas, que incluyen unión a ácidos nucleicos, inhibición de la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos e inhibición de ciertas actividades enzimáticas [revisado en (Brogden, 2005)]. Por ejemplo, en el péptido Indolicidina se han observado propiedades inhibitorias de la síntesis de macromoléculas y ácidos nucleicos en bacterias (Subbalakshmi y Sitaram, 1998). El péptido LfcinB también es capaz de unirse al RNA y/o inhibir la síntesis de macromoléculas en el interior celular (Ulvatne *et al.*, 2004).

Dentro de nuestro trabajo, el estudio de la unión de PAF26 a potenciales dianas intracelulares tales como los ácidos nucleicos, reveló la interacción *in vitro* del péptido con tRNA mediante uniones inespecíficas (Figura 35), de forma análoga a lo que se ha demostrado para la AFP de *Apergillus* (Moreno *et al.*, 2006), lo que podría interferir en funciones intracelulares en donde estuvieran implicados RNAs (ver Figura 52). La observación de multinuclearización celular provocada por PAF26 (Figura 27) nos sugiere que el péptido está afectando intracelularmente a la división y distribución nuclear o a la formación de septos en las hifas. En vista de este resultado, este efecto de la acción de PAF26 podría no ser específico, y por lo tanto el perfil de especificidad del péptido frente a hongos filamentosos sería una consecuencia de distintas interacciones con las envueltas exteriores de los microorganismos, como se ejemplifica en las diferencias encontradas en su interacción con conidios y células del micelio de *P. digitatum*.

Los resultados obtenidos durante este trabajo se ajustan y enriquecen un modelo general de interacción y mecanismo de acción de péptidos y proteínas antimicrobianas sobre microorganismos (Figura 52) (Marcos *et al.*, 2008). Este modelo se basa en otros previamente propuestos por otros autores (Zasloff, 2002; Brogden, 2005; Bechinger y Lohner, 2006) y destaca de forma especial que aunque la interacción de AMP con bicapas lipídicas y membranas celulares y capacidad de permeabilización es una propiedad y etapa esencial en el mecanismo antimicrobiano, existen otros procesos, como la interacción con envueltas celulares exteriores, translocación al interior celular, o presuntas dianas intracelulares, que deberían recibir más atención en el desarrollo futuro de nuevos AMP.

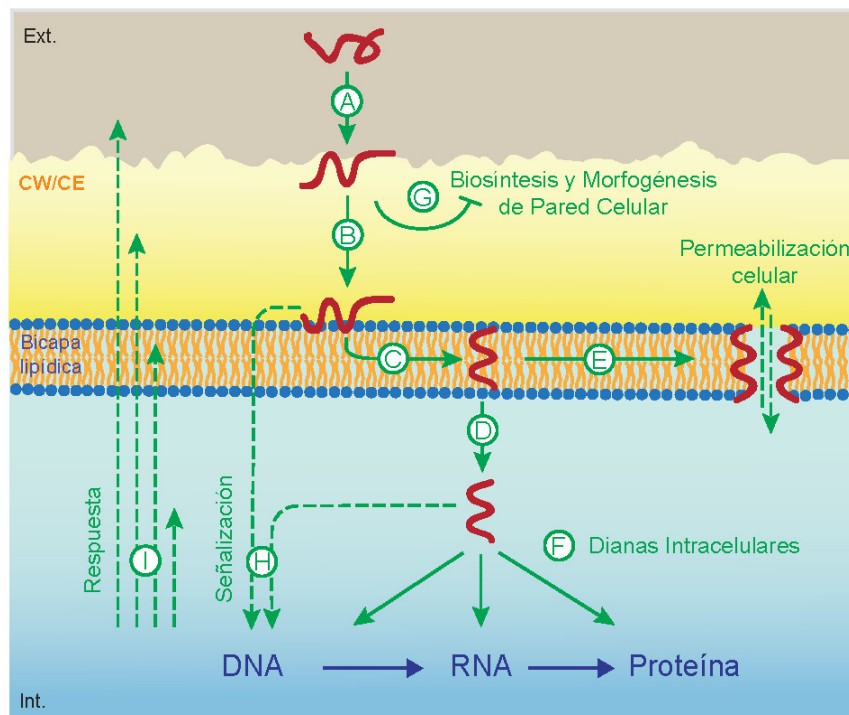


Figura 52. Modelo de la interacción y modo de acción antimicrobiano de AMP basado en los resultados previos y las observaciones recientes resumidas en el texto. Tal y como se muestra, es aplicable para células procariontas y eucariotas. (A) El AMP (en rojo) interactúa con las envueltas exteriores, siendo la atracción electrostática la fuerza inicial que conduce a la interacción. (B) El AMP puede difundir a través de la pared e interactuar con las bicapas lipídicas, permitiendo sus propiedades biofísicas su inserción en las membranas biológicas (C), en un proceso dependiente de la composición lipídica. Durante esta progresión, los AMP sufren plegamientos debidos a cambios en el microentorno que podrían aumentar su anfipaticidad y propiedades antimicrobianas. En este punto, los AMP pueden translocarse hacia el interior celular (D), desestructurar la arquitectura de la membrana llevando a la permeabilización celular (E), o bien producirse ambos fenómenos en función del balance entre concentración de péptido y tiempo de contacto, así como entre sus propiedades y las de los componentes celulares implicados. (F) Una vez internalizado, el AMP puede unirse a DNA, RNA y/o proteínas, alterando procesos como la replicación, síntesis de RNA o determinadas actividades enzimáticas. La actuación intracelular puede también producir la muerte y la subsiguiente permeabilización celular. (G) Otros modos de acción de AMP son la desestabilización de la síntesis, arquitectura o morfología de la pared celular. Se conoce además, que los microorganismos poseen mecanismos señaladores que detectan la presencia de AMP (H), un proceso necesario para modificar la expresión génica y responder a la acción de los AMP a nivel de citosol, membrana, envueltas celulares o exterior celular (I).

## 2.5. Posible implicación de la biosíntesis de quitina.

Como una aproximación paralela al estudio del modo de acción de PAF26, hemos realizado una comparación de la diferente sensibilidad al péptido en cuatro especies de *Penicillium* confirmando datos previos no publicados de nuestro grupo (López-García, 2002), y comparándola a su vez con la que éstas presentan a distintos compuestos antimicrobianos y situaciones de estrés. Estos aislados han sido seleccionados partiendo de la hipótesis de la implicación de los componentes de las paredes/membranas de hongos en su susceptibilidad a AMP, y en particular de *P. digitatum* a PAF26 (en este trabajo).

Como se describió anteriormente, los aislados de estas cuatro especies poseen además un interés añadido, al existir en ellos una correlación entre su sensibilidad a PAF26 y su virulencia sobre frutos cítricos (López-García, 2002). La Tabla 19 resume los datos de crecimiento de los distintos aislados en cada una de las condiciones. Así, el aislado de *P. brevicompactum* muestra la mayor resistencia a CFW, SDS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y PAF26, junto con un fenotipo de sensibilidad al crecimiento a temperatura restrictiva. *P. expansum* muestra un fenotipo similar, aunque con menor grado de resistencia a los antimicrobianos. Lo contrario ocurre con los dos patógenos de frutos cítricos *P. italicum* y *P. digitatum*, que de forma general aunque con excepciones puntuales son claramente más sensibles a los antimicrobianos y termotolerantes.

**Tabla 19. Crecimiento de especies de *Penicillium* bajo distintas condiciones.**

Microorganismo	Termo- tolerancia <sup>a</sup>	Compuesto <sup>a</sup>			
		PAF26	CFW	SDS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>P. italicum</i> PHI-1	+++	—	—	+++	—
<i>P. brevicompactum</i> PHI-8	—	+++	+++	+++	+++
<i>P. digitatum</i> PHI-26	+	—	—	—	++
<i>P. expansum</i> PHI-65	—	++	++	+	+

<sup>a</sup> Los símbolos (+) y el código de colores (de amarillo a rojo) representan una estimación del crecimiento de un microorganismo en las distintas condiciones evaluadas, atribuyendo la cantidad de (+++) al aislado que mostró el mayor crecimiento y (—) para el de menor.

Si comparamos los cuatro compuestos antimicrobianos, la mejor correlación con la sensibilidad a PAF26 en distintos hongos se establece con CFW. Las correlaciones con SDS o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también son buenas aunque presentan excepciones significativas en cada caso. Así, la notable capacidad de *P. italicum* para crecer en presencia de SDS (Figura 39) estaría relacionada con una mayor plasticidad y capacidad de reforzamiento de sus paredes celulares frente a compuestos o situaciones de estrés que afectan la integridad de las membranas de la célula (de Groot *et al.*, 2001). Además, y debido a que *P. italicum* es marcadamente sensible a PAF26, este es un dato que indirectamente descartaría una actuación directa del péptido sobre las membranas celulares (como ocurre con el SDS).

Las diferencias cualitativas en sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también pueden argumentarse de la misma manera, y adicionalmente por la eficacia del sistema celular de señalización y/o respuesta al estrés oxidativo. En *P. digitatum* la mayor resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 39) nos sugiere que este hongo posee mecanismos más eficaces de supervivencia frente al estrés oxidativo. En otros AMP y proteínas antimicrobianas se ha demostrado la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los microorganismos susceptibles y se ha establecido una conexión con su mecanismo antimicrobiano (Lupetti *et al.*, 2002; Kaiserer *et al.*, 2003; Veerman *et al.*, 2004; Aerts *et al.*, 2007). En este sentido, durante este estudio se exploró la posible presencia de ROS en esporas y micelio de *P. digitatum* tratadas con PAF26, usando como sonda el cromóforo diaminobenzidina (DAB). En estos experimentos no detectamos la formación de precipitados de DAB en *P. digitatum* (datos no mostrados). En conjunto, estos datos indican que la acción de PAF26 sobre *P. digitatum* no está mediada por la formación de ROS.

La actividad antifúngica del CFW se debe a su afinidad por la quitina de la pared celular fúngica, de forma que mutantes de hongos con menores niveles de quitina en sus paredes muestran más resistencia al CFW (Ram y Klis, 2006). La correlación obtenida entre el perfil de sensibilidad a PAF26 y CFW en los cuatro aislados de *Penicillium* nos sugiere la posible implicación de la quitina en la susceptibilidad al péptido (Tabla 19). Este resultado se relaciona con nuestras observaciones realizadas por microscopía en donde, como hemos comentado, se producen cambios morfológicos relacionados con pared celular

y una reorganización de la quitina tras la exposición al péptido, como indica la tinción con CFW (Figura 25) y se producen alteraciones morfológicas que podrían considerarse fenocopias de mutantes de hongos en genes de biosíntesis de quitina (Madrid *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2006).

En hongos fitopatógenos hay evidencias de la implicación de la quitina en el proceso de interacción planta-patógeno (Kaku *et al.*, 2006), así como en la respuesta y susceptibilidad a los mecanismos de defensa de las plantas. Por ejemplo, se ha demostrado en el hongo *F. oxysporum* que la disrupción de un gen de una determinada quitina sintasa (*ChsV*) disminuye la patogénesis y aumenta la susceptibilidad a compuestos de defensa de plantas, como la fitoanticipina  $\alpha$ -tomatina y el peróxido de hidrógeno (Madrid *et al.*, 2003). El contenido en quitina de mutantes en el gen correspondiente era sólo ligeramente menor que la cepa silvestre. Durante el transcurso del presente trabajo se han realizado experimentos de cuantificación de la quitina de la pared celular de los cuatro aislados, siguiendo metodologías utilizadas en otros trabajos con hongos filamentosos (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos no indican diferencias relevantes en el contenido total en quitina entre los aislados de las cuatro especies utilizadas (datos no mostrados).

Por otro lado, existen ejemplos de mutantes de los hongos *F. oxysporum* y *Aspergillus oryzae* en la biosíntesis de quitina con mutaciones en los genes *ChsIII* y *ChsV* que han mostrado menor sensibilidad a la AFP de *A. giganteus* (Hagen *et al.*, 2007). Este mismo estudio mostró que el dominio N-terminal de la proteína es imprescindible para su unión a quitina, y también necesario aunque no suficiente para su actividad antimicrobiana. Por otra parte, la posible correlación de la susceptibilidad a PAF26 con el contenido o accesibilidad de la quitina podría estar relacionada con la menor susceptibilidad que hemos visto de *S. cerevisiae* a la interacción y efecto del péptido (Figura 34), al poseer la levadura en su pared celular hasta 10 veces menos quitina que los hongos filamentosos (Bulawa, 1993; Klis *et al.*, 2002).

Así pues, y dependiendo de su implicación en la actividad antimicrobiana de un compuesto dado, el mayor contenido en quitina podría estar relacionado con una menor susceptibilidad si aporta un reforzamiento de pared que impide el paso de pequeñas biomoléculas ( $\alpha$ -tomatina o  $H_2O_2$ ) o



una mayor susceptibilidad si es la diana de una proteína (AFP de *A. giganteus*) ó péptido (como proponemos para el caso de PAF26).

Hay que señalar que estudios con mutantes del hongo *A. nidulans* han demostrado la correlación entre un menor contenido en quitina y  $\beta$ -glucanos con un incremento en su sensibilidad a la temperatura restrictiva (Borgia y Dodge, 1992; Momany *et al.*, 1999). Estos mutantes, fueron capaces de crecer al añadir en el medio un osmoestabilizador como el D-sorbitol. Esta situación parece ser paralela a la observada en nuestros experimentos (Tabla 19), si es que asumimos que la mayor sensibilidad a PAF26 se pueda deber a un mayor contenido en quitina que a su vez se relacionaría con una mayor termotolerancia. En cualquier caso, la situación es evidentemente más complicada. Como hemos visto en la Introducción, la compleja pared celular de hongos filamentosos esta compuesta en su mayoría por quitina, pero también por  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucanos, unidos a glicoproteínas en una intrincada red (ver esquema en Figura 3). No podemos descartar que la cuestión relevante sea la accesibilidad a la quitina, que vendría determinada por la densidad y estructura de glucanos y proteínas acompañantes. Recientemente se ha subrayado que una mayor sensibilidad a CFW también puede deberse a alteraciones primarias en la biosíntesis de  $\beta$ -glucanos, glicoproteínas o proteínas GPI (Ram y Klis, 2006).

Como consecuencia de los resultados y conclusiones que acabamos de resumir, en nuestro grupo hemos iniciado una aproximación al estudio de los factores implicados en el efecto de PAF26 y CFW sobre *P. digitatum* y su relación con la virulencia sobre frutos, mediante la creación, aislamiento y caracterización fenotípica de una colección de mutantes del hongo con mayor resistencia a estos compuestos. El trabajo esta todavía en pleno desarrollo, pero podemos adelantar que existe una correlación general, aunque no completa, de la sensibilidad a PAF26 y CFW en distintos mutantes de *P. digitatum* (datos no mostrados)

### **3. APLICACIÓN DE AMP EN EL CONTROL DE PATOLOGÍAS POSTCOSECHA.**

Existe en la actualidad un incremento en el número de AMP con actividad *in vitro* frente a microorganismos fitopatógenos que han sido propuestos como una alternativa para el desarrollo de nuevas estrategias de protección vegetal (Jaynes *et al.*, 1987; Casteels *et al.*, 1989; Rao, 1995; van der Biezen, 2001; Montesinos, 2007). La comparación de los resultados *in vitro* de distintos AMP obtenidos en diferentes laboratorios debe realizarse con cautela. Las variaciones de cepas microbianas, condiciones de cultivo, formato de los ensayos y modificaciones en los péptidos (acetilación, amidación o síntesis con D- o L-aminoácidos), suman diferencias entre AMP que pueden hacer difícil la comparación. Además, la cuantificación *in vitro* del crecimiento de hongos filamentosos utilizando métodos espectrofotométricos puede ser imprecisa (Pryor *et al.*, 2007). En este trabajo hemos llevado a cabo la comparación paralela de la actividad de distintos péptidos a través de estudios *in vitro* y de bioensayos de control de la podredumbre sobre el propio material vegetal. Esta evaluación en paralelo permite (i) la selección AMP candidatos para su desarrollo como alternativa de control a las podredumbres de frutos cítricos causadas por *P. digitatum* y (ii) la obtención de conclusiones generales sobre la actividad *in vivo* de los péptidos en el microentorno del fruto.

#### **3.1. Eficacia de distintos AMP en condiciones de postcosecha.**

Todos los resultados previos de nuestro grupo en los bioensayos de inoculación de frutos con los péptidos PAF fueron llevados a cabo con sus D-estereoisómeros, incluyendo el caso de PAF26D (López-García *et al.*, 2000; 2002; 2003). En este trabajo, hemos demostrado por primera vez una protección significativa de los frutos con las versiones L- de los péptidos PAF26, PAF38, PAF40, y también de BM0 (Figura 46A, Figura 48 y Figura 49). El uso de L-estereoisómeros es un requisito indispensable en la producción de AMP mediante su expresión en organismos modificados genéticamente (ver apartado siguiente).

Sin embargo, la utilización de L-estereoisómeros tiene un problema potencial relacionado con su susceptibilidad a la degradación proteolítica. En la identificación de algunos péptidos como BP15 y BP76, se incluyó un criterio

de selección basado en su estabilidad frente a la degradación proteolítica (Ferre *et al.*, 2006). Nuestros resultados positivos con los estereoisómeros L- nos podrían indicar que la susceptibilidad a la degradación proteolítica no es relevante, al menos en estos péptidos y bajo nuestras condiciones de ensayo.

Varios de los péptidos evaluados tienen una actividad inhibitoria del crecimiento de *P. digitatum* similar pero difieren en su letalidad frente a conidios en estado quiescente del hongo. A diferencia de lo que ocurre con melitina, indolicidina, BP15 o BP76, hemos observado que los péptidos PAF26, PAF38, PAF40 y BM0 tienen actividad fungicida sobre conidios (Figura 46B y Figura 47). Se ha descrito que la actividad fungicida del péptido cecropina A se observa frente a micelio y conidios del hongo *Fusarium* sp., pero solo frente a micelio y no sobre conidios de *Aspergillus* sp. (De Lucca *et al.*, 1997). Investigaciones posteriores explicaron este comportamiento al encontrar en el péptido hasta 3 sitios de corte en su extremo N-terminal debidos a proteasas extracelulares de conidios del hongo *A. flavus*, lo cual explicaría la carencia de actividad del péptido frente a las esporas de este hongo (Bland y De Lucca, 1998). En base a estos resultados, de forma indirecta se podría concluir que la actividad de los péptidos PAF y BM0 frente a conidios de *P. digitatum*, a diferencia de lo que sucede en otros péptidos que hemos ensayado, es debida también a una mayor resistencia a la degradación por posibles proteasas extracelulares secretadas por el hongo. Sin embargo, anteriormente se ha mostrado que PAF19 presenta una cierta susceptibilidad a la degradación *in vitro* en presencia de un sobrenadante de *P. digitatum* crecido en medio rico PDB (López-García *et al.*, 2000). A pesar de ello, nuestros estudios de localización subcelular de FITC-PAF26 en su interacción con *P. digitatum*, muestran que el péptido (o al menos un derivado de él) es lo suficientemente estable para ser traslocado al interior celular (Figura 33C-E).

Se han encontrado diferencias importantes entre los datos de inhibición del crecimiento *in vitro* y los de experimentos de co-inoculación sobre frutos. En nuestro patosistema, la alta actividad inhibitoria de los derivados de LfcinB, melitina o los péptidos BP (Figura 17 y Figura 45A), no se corresponde con un nivel de protección significativo sobre frutos (Figura 22, Figura 46A y Figura 48). Esto demuestra que la identificación de péptidos con actividad de control de enfermedades de plantas debería incorporar bioensayos confirmatorios de

los datos obtenidos *in vitro*. En ese sentido, las enfermedades postcosecha representan un buen modelo experimental al poder realizarse el escrutinio de péptidos en un entorno relativamente estable y que refleja realmente las condiciones comerciales de almacenamiento postcosecha.

Los mejores resultados de control de las podredumbres son alcanzados al aumentar el tiempo de tratamiento de las esporas con los péptidos (Figura 46 y Tabla 16), muy probablemente debido a las diferencias observadas en la actividad de los péptidos sobre conidios. Este resultado enfatiza la importancia del diseño de los bioensayos en relación con la obtención de resultados experimentales fiables y discriminatorios de las actividades de distintos péptidos. Esta observación acerca del tiempo de aplicación y efectividad debería considerarse, además, en el desarrollo futuro de estrategias de aplicación de AMP para el control de enfermedades postcosecha. Se debe tener en cuenta que la mayoría de las infecciones fúngicas de frutos permanecen en estado quiescente o bajo una infección latente, hasta el momento de recepción de las señales oportunas que inicien el proceso de infección en el hongo (Prusky y Lichter, 2007).

La metodología experimental que hemos utilizado en los bioensayos no es extrapolable a lo que sucedería en aplicaciones prácticas de péptidos antimicrobianos en una central hortofrutícola, aunque nos ha servido para destacar la relevancia de la actividad fungicida de determinados AMP. Hay que destacar que si se resuelve el problema de la producción a gran escala de péptidos (ver apartado siguiente) y se consigue distribuir el péptido por toda la superficie del fruto como en un tratamiento postcosecha convencional, la dualidad de actividad fungicida y fungiestática de los péptidos caracterizados los hace muy prometedores desde el punto de vista de aplicación práctica.

La actividad inespecífica, entendida como actividad de los AMP frente a organismos no diana, también debe ser considerada en la selección de péptidos candidatos. Los distintos perfiles de especificidad de los péptidos están relacionados en gran medida con las diferentes composiciones de las envueltas microbianas (Zasloff, 2002; Brogden, 2005; Hancock y Sahl, 2006). Como hemos visto ya, los péptidos PAF, BP y BM0 poseen distintos perfiles de especificidad antimicrobiana, siendo marcadamente más bactericidas los péptidos BP (Tabla 17). Claramente, la selección de los péptidos en cada caso

dependerá del espectro de acción necesario para cada cultivo o producto vegetal. En el caso de las podredumbres postcosecha de cítricos, los patógenos bacterianos no causan pérdidas significativas, por lo que son deseables AMP más antifúngicos. Siguiendo esta lógica, PAF40 podría ser seleccionado al tener un buen balance de actividad y especificidad (Tabla 17), mostrando más de un 50% de control de las podredumbres de frutos a concentraciones tan bajas como 2  $\mu\text{M}$  (Figura 48).

Los datos de toxicidad inespecífica son importantes en el desarrollo de péptidos de aplicación en protección vegetal. Así, para el péptido de diseño D4E1 (Tabla 4 y Tabla 5), se demostró que es más activo que AMP naturales y que no presenta un efecto tóxico sobre la germinación del polen y de las semillas de diversas especies de árboles (Jacobi *et al.*, 2000). Salvo en excepciones como ésta, la toxicidad inespecífica en la mayoría de estudios sobre AMP se ha evaluado a través de ensayos de hemólisis sobre glóbulos rojos humanos. En nuestro trabajo también hemos seguido esta aproximación sirviéndonos como control el péptido melitina. Aunque no hemos realizado ensayos de fitotoxicidad, que son relevantes en el caso de péptidos orientados a protección vegetal, hay que destacar que todos los péptidos PAF, el péptido BM0 y los derivados de la LfcinB mostraron valores de hemólisis despreciables a 100  $\mu\text{M}$  (Tabla 11 y datos no mostrados), lo que los hace potencialmente muy interesantes. Sólo la indolicidina tuvo un valor en torno a 1,5% a esa concentración. En un trabajo independiente se ha demostrado que una variante del péptido PAF26, sin acetilar y sin amidar, presenta ausencia de toxicidad frente a queratinocitos humanos, medida mediante ensayos que cuantifican su citólisis (López-García *et al.*, 2007).

Los estudios futuros sobre la utilización de péptidos PAF y relacionados en medidas de protección vegetal deberán evaluar la potencial aparición de resistencias en los microorganismos a su acción antimicrobiana. Debido al modo de acción de PAF26 que hemos postulado, que incluye distintos efectos antifúngicos sobre *P. digitatum* (inhibitorios y letales) habría que prever que el desarrollo de resistencias por mutación puntual es más improbable que en el caso de fungicidas comerciales con un modo de acción más definido, tal y como se asume de forma general para el caso de AMP (Peschel y Sahl, 2006). Pero no podemos descartar otros mecanismos de resistencia,

como hemos revisado en la Introducción (Peschel, 2002; Peschel y Sahl, 2006). En este sentido, una de las líneas futuras de investigación que creemos prioritaria es la caracterización de los cambios genéticos y moleculares en los microorganismos por exposición a péptidos antimicrobianos, y en concreto a los péptidos PAF, que nos permita aportar datos sobre las respuestas a la acción de los péptidos y sobre sus posibles mecanismos de acción molecular y celular. En el caso del organismo simbiote de alfalfa *Sinorhizobium meliloti* se ha escrutado una colección de mutantes en la búsqueda de genes que muestran mayor sensibilidad a protamina (Nogales *et al.*, 2006). Algunos de los defectos genéticos encontrados apuntan a la implicación de la biosíntesis de glucanos de pared y de transportadores ABC de membrana. Sin embargo, la implicación de otras alteraciones no está tan clara.

Nuestro trabajo revela diferencias entre los péptidos estudiados en su actividad frente a diferentes microorganismos, su efecto fungicida frente a conidios de *P. digitatum* y su control de las podredumbres de frutos alcanzado mediante co-inoculación con el hongo. Estos resultados subrayan la utilidad potencial de estos pequeños AMP catiónicos, ricos en triptofano e hidrofóbicos, como una fuente de péptidos específicos frente a hongos patógenos de plantas, y en particular de postcosecha. Ejemplos son los casos de los péptidos PAF y de BM0. Estos péptidos están dotados con actividad fungicida frente a conidios de *P. digitatum*, las estructuras de supervivencia del hongo, que deben tomarse en cuenta en el desarrollo de estrategias futuras de control basadas en el uso de AMP.

### **3.2. Estrategias de producción y utilización de AMP.**

Se pueden plantear distintas estrategias para el uso de péptidos antimicrobianos en protección vegetal, y también en el control de podredumbres postcosecha. En la Introducción ya hemos revisado exhaustivamente el creciente número de trabajos en los que se abordan la producción de AMP mediante expresión heteróloga en plantas transgénicas, de tal forma que se consigue la producción del péptido *in situ* en el tejido vegetal que debe ser protegido de la infección (ver Tabla 5) (Montesinos, 2007).

La producción por biotecnología también puede llevarse a cabo no por la planta, sino por un microorganismo de biocontrol (BCA), frente al cual el

péptido no fuera activo, y al que se le dotaría de esta forma de un mecanismo adicional en su actuación antagonista sobre el fitopatógeno. De forma análoga, se ha incrementado la capacidad de biocontrol de cepas de *Trichoderma* mediante la (sobre)expresión de enzimas con capacidad para degradar la pared celular del hongo [revisado por (Benítez *et al.*, 2004)]. Un requisito para la utilización de esta estrategia es que el péptido o proteína antimicrobiana no tenga actividad contra el microorganismo productor. La mayor actividad sobre *P. digitatum* y menor sobre bacterias y levaduras, hace posible la aplicación combinada de PAF26 y/o PAF40 con otros microorganismos que actúen de BCA (bacterias o levaduras), de forma que se potenciaría la protección de un agente en presencia del otro y viceversa. En anteriores trabajos de nuestro grupo, se comprobó que el uso de PAF26 sintético en combinación con distintas especies de levaduras BCA aisladas de la superficie de frutos cítricos, produjo mejores resultados de protección contra la podredumbre que cada método de control por separado (López-García, 2002; Veyrat *et al.*, 2004). Un trabajo muy relevante y relacionado con esta estrategia, fue la producción del undecapéptido Pep3 (ver Tabla 3) (Cavallarin *et al.*, 1998) en la levadura *S. cerevisiae* modificada genéticamente (Jones y Prusky, 2002). Aunque la levadura utilizada no era un BCA sino una cepa habitualmente utilizada en laboratorio, su co-inoculación en frutos de tomate junto con el patógeno *Colletotrichum coccodes* redujo la podredumbre causada por el hongo.

Los problemas de aceptación social a la utilización de organismos modificados genéticamente en agroalimentación hacen recomendable buscar estrategias alternativas a las ya expuestas. Una aplicación obvia sería el uso de AMP en forma de aditivos fitosanitarios, directamente en campo durante la fase de cultivo o sobre etapas posteriores al cosechado de productos (postcosecha). Sin embargo, el alto coste de los péptidos sintéticos limita su uso como tales para aplicaciones agroalimentarias, por lo que sería necesario recurrir de nuevo a aproximaciones biotecnológicas, evitando en este caso la utilización directa de organismos transgénicos.

En ese sentido, existe un alternativa interesante. Se está explorando intensamente la utilización de la agricultura en la producción de compuestos bioactivos, en especial proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico, dentro de las llamadas granjas moleculares o “*molecular farming*” (Daniell *et al.*,

2001; Twyman *et al.*, 2003). Se trata de utilizar las plantaciones como factorías de producción a gran escala y con bajos costes. La validez de la aproximación ya está demostrada y se dispone de algunos ejemplos comerciales de productos de primera generación (Twyman *et al.*, 2003). Muchas de las proteínas vegetales antimicrobianas, como es el caso de las defensinas (Thomma *et al.*, 2002), se producen y almacenan mayoritariamente en semillas, las cuales ofrecen ventajas obvias para su almacenamiento, conservación y procesado (Boothe *et al.*, 1997). Así, se ha desarrollado la expresión de la proteína lactoferrina humana en granos de arroz para su utilización en formulados de leches maternizadas (Nandi *et al.*, 2002), y también se ha conseguido extraer la proteína recombinante para su utilización nutracéutica (Nandi *et al.*, 2005).

La producción de péptidos bioactivos mediante el uso de factorías celulares de microorganismos modificados genéticamente, que produzcan los péptidos de forma continua y estable, en cantidades suficientes y costes aceptables, también merece ser considerada. Un aspecto importante es obviamente la utilización de sistemas de expresión condicionales, dadas las propiedades antimicrobianas de estos péptidos. El alto interés de esta opción ha motivado distintos estudios de optimización de las estrategias, propiedades de los péptidos y sus genes sintéticos para tal fin (Zhang *et al.*, 1998a; Ingham y Moore, 2007). Estas fábricas celulares de péptidos podrían ser microorganismos capaces de ser modificados y susceptibles de optimización para la producción a escala industrial de estas biomoléculas.

En este sentido, la levadura *Pichia pastoris* ofrece notables ventajas en cuanto a sus niveles de expresión, estabilidad y posibilidad de producir el AMP a escala industrial. Mediante este sistema se ha descrito la producción de distintas defensinas (Almeida *et al.*, 2001; Wisniewski *et al.*, 2003; Cabral *et al.*, 2003), de la LF porcina (Chen *et al.*, 2004; Pecorini *et al.*, 2005) y caprina (Chen *et al.*, 2007), o del péptido cecropina A y derivados (Jin *et al.*, 2006a; 2006b).

La expresión mediante sistemas procariotas ofrece cuantitativamente mayores capacidades de producción, y podría ser incluso aconsejable en el caso de péptidos o proteínas antifúngicas que por tanto podrían ser tóxicos para microorganismos como levaduras. En *E. coli*, y en el entorno de nuestro estudio, ya se conocen distintos trabajos de producción de indolicidina (Morin *et al.*, 2005) o de péptidos derivados de lactoferrina (Kim *et al.*, 2006; Feng *et*



*al.*, 2006). En esta bacteria se han descrito sistemas de expresión de péptidos catiónicos producidos en tandem, fusionados a un espaciador sintético y que se acumulan en cuerpos de inclusión que llegan a representar el 50% del total de proteínas celulares de la bacteria, llegando a obtener niveles de producción en torno a 1 g/L de péptidos con actividad antimicrobiana testada (Metlitskaia *et al.*, 2004). Sin embargo, la producción de AMP en algunos casos no es del todo efectiva, obteniéndose en otros trabajos rendimientos menores, entre 0,1 y 300 mg/L de cultivo (Morin *et al.*, 2005). En nuestro grupo, hemos iniciado una línea de trabajo para la producción de PAF26, LfcinB<sub>17-31</sub> e Indolicidina, utilizando microorganismos modificados genéticamente, aunque hasta la fecha no hemos obtenido resultados positivos.

Es evidente que la utilización de péptidos antimicrobianos en protección vegetal y conservación postcosecha es una alternativa prometedora y que merece continuar siendo explorada, tal y como nuestro grupo ha contribuido a poner de relieve. Pero también es cierto que la producción biotecnológica de dichos péptidos, utilizando metodologías de bajo coste y garantizando la seguridad biológica de los sistemas de producción, es uno de los cuellos de botella de estas estrategias y en los que más habremos de invertir más esfuerzos en un futuro cercano.



## **CONCLUSIONES**



1. Péptidos de seis y quince residuos de aminoácidos **derivados del dominio antimicrobiano de la lactoferrina bovina** son inhibitorios del crecimiento *in vitro* de diversos hongos fitopatógenos. Muestran una **actividad inhibitoria similar al hexapéptido PAF26**, pero sin embargo una menor capacidad fungicida sobre conidios de *Penicillium digitatum*.
2. El derivado de lactoferrina de 15 residuos (**LfcinB<sub>17-31</sub>**) a concentraciones subinhibitorias es capaz de inducir una serie de **alteraciones morfológicas** en el crecimiento del micelio de *P. digitatum*. A concentraciones más altas produce el **colapso y la desestructuración de las paredes** celulares del hongo y su permeabilización celular.
3. El estudio del **mecanismo de acción del hexapéptido PAF26** frente a *P. digitatum* ha revelado efectos sobre el **crecimiento y morfología del micelio** del hongo **no correlacionados con la permeabilización celular**, y que probablemente la anteceden.
4. **PAF26** y el péptido citolítico **melitina** presentan **diferencias significativas** en sus efectos sobre *P. digitatum*, destacando su diferente capacidad de citólisis y actividad fungicida sobre conidios.
5. El marcaje fluorescente de PAF26 y la microscopía confocal han permitido visualizar **la interacción del péptido** con las envueltas externas de *P. digitatum* y su posterior **internalización celular**, a concentraciones sub-micromolares, y sin que se produzca permeabilización. PAF26 es un péptido catiónico rico en triptófano que pertenecería a una nueva subclase de antimicrobianos para los que proponemos la denominación de **péptidos antimicrobianos tipo penetratina (“cell-penetrating antimicrobial peptides”, CP-AMP)**.

6. Proponemos la implicación de la **biosíntesis de quitina** de las paredes celulares de *P. digitatum* en la **interacción** del hongo con PAF26, y/o en su **respuesta** frente a la acción del péptido. Siguiendo esta propuesta, el contenido en quitina o su accesibilidad determinaría la sensibilidad de distintos hongos filamentosos a PAF26 y probablemente a otros AMP.
  
7. Se han **identificado nuevos heptapéptidos** derivados de PAF26 con **distintos perfiles y propiedades antimicrobianas** y con **ausencia de citólisis** frente a glóbulos rojos humanos.
  
8. **El heptapéptido PAF38** mostró la mayor potencia antimicrobiana de amplio espectro; **PAF40** mostró la mejor relación entre potencia y especificidad sobre *P. digitatum*; **PAF41** y **PAF42** tuvieron una actividad destacable sobre el patógeno de arroz *Magnaporthe grisea*, que a su vez fue el que presentó particularidades más evidentes en lo que a su sensibilidad a péptidos se refiere.
  
9. La evaluación en paralelo de distintos AMP a través de bioensayos de inoculación sobre frutos cítricos ha demostrado la importancia de distintas propiedades de los péptidos en el control de las infecciones fúngicas postcosecha. **PAF38, PAF40 y BM0** han mostrado los **mejores resultados de control del desarrollo de la infección**.
  
10. La especificidad de los péptidos **PAF y relacionados**, su actividad fungicida, ausencia de hemólisis y actividades comparables de sus estereoisómeros D- y L- hacen a estos péptidos **buenos candidatos en el diseño de estrategias y aplicación de AMP en protección vegetal y en el control de patologías de postcosecha**.

## **DIFUSIÓN DE RESULTADOS**





Hasta el momento el trabajo descrito ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones referidas en el Science Citation Index (SCI):

1. **Muñoz, A., Marcos, J. F.** (2006) Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1199-1207.  
Portada en el número de Enero, 2007 – Vol 102. *J. Appl. Microbiol.*
2. **Muñoz, A., López-García, B., Marcos, J. F.** (2006) Studies on the mode of action of the antifungal hexapeptide PAF26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 3847-3855.
3. **Muñoz, A., López-García, B., Pérez-Payá, E., Marcos, J. F.** (2007) Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354: 172-177.
4. **Muñoz, A., López-García, B., Marcos, J. F.** (2007) Comparative study of antimicrobial peptides to control citrus postharvest decay caused by *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8170-8176.

Publicaciones no SCI:

1. **Marcos, J. F., Muñoz, A., López-García, B.** (2008). Capítulo 20: Identificación y diseño racional de péptidos antimicrobianos y su aplicación en protección vegetal. *En: Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*. Pallás, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P., y Marcos, J. F. (Eds.). Editorial MundiPrensa-Sociedad Española de Fitopatología, Madrid.

Comunicaciones a Congresos Científicos:

1. **Muñoz, A., López-García, B., Marcos, J. F.** El Péptido PAF26 como antifúngico frente a hongos fitopatógenos de postcosecha: estudios comparados sobre su especificidad, modo de acción y secuencia de aminoácidos. *XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología* (SEF). Girona, 2004.
2. **Muñoz, A., Marcos, J. F.** Estudio comparado de la actividad y modo de acción de distintos péptidos antimicrobianos frente a hongos fitopatógenos. *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología* (SEF). Murcia, 2006.
3. **López-García, B., Muñoz, A., Marcos, J. F.** Utilización de herramientas genómicas en el estudio del modo de acción del péptido antimicrobiano PAF26. *5ª Reunión de la Red Valenciana de Genómica y Proteómica*. Valencia 2006.
4. **Muñoz, A., López-García, B., Marcos, J. F.** Studies on the mode of action of antimicrobial peptides against the plant pathogen *P. digitatum*. *Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides*. Barga (Italia), 2007.
5. **López-García, B., Muñoz, A., Marcos, J. F.** A functional genomic approach to study the mode of action of the antifungal peptide PAF26 using as a model *S. cerevisiae*. *Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides*. Barga (Italia), 2007.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco Mosaic Virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Bammens, L., Cammue, B. P. A., Smets, B., Winderickx, J., Accardo, S., De Vos, D. E., Thevissen, K. (2006). Level of M(IP)(2)C sphingolipid affects plant defensin sensitivity, oxidative stress resistance and chronological life-span in yeast. *FEBS Lett.* 580: 1903-1907.
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Meert, E. M. K., Li, Q. T., Cammue, B. P. A., Thevissen, K. (2007). The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 243-247.
- Agrios, G. N. (2004). Plant Pathology. Academic Press, San Diego.
- Alan, A. R., Blowers, A., Earle, E. D. (2004). Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease. *Plant Cell Rep.* 22: 388-396.
- Alan, A. R. y Earle, E. D. (2002). Sensitivity of bacterial and fungal plant pathogens to the lytic peptides, MSI-99, magainin II, and cecropin B. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 701-708.
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., hl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. *et al.* (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7327-7331.
- Ali, G. S. y Reddy, A. S. (2000). Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: *in vitro* growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 847-859.
- Almeida, M. S., Cabral, K. S., de Medeiros, L. N., Valente, A. P., Almeida, F. C. L., Kurtenbach, E. (2001). cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 395: 199-207.
- Andersen, J. H., Jenssen, H., Sandvik, K., Gutteberg, T. J. (2004). Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *J. Med. Virol.* 74: 262-271.
- Andreu, D. y Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415-433.
- Aparicio, F., Vilar, M., Pérez-Payá, E., Pallás, V. (2003). The coat protein of prunus necrotic ringspot virus specifically binds to and regulates the conformation of its genomic RNA. *Virology* 313: 213-223.
- Arce, P., Moreno, M., Gutierrez, M., Gebauer, M., Dell'Orto, P., Torres, H., Acuna, I., Oligier, P., Venegas, A., Jordana, X. *et al.* (1999). Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. *Am. J. Potato Res.* 76: 169-177.

- Arras, G.** (1996). Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biol. Technol.* 8: 191-198.
- Arras, G.** (2002). Improving biocontrol activity of *Pichia guilliermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. *Biocont. Sci. Technol.* 12: 547-553.
- Asthana, N., Yadav, S. P., Ghosh, J. K.** (2004). Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin. A leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. *J. Biol. Chem.* 279: 55042-55050.
- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U. S., Xu, W. Q., Klevit, R. E., Le Moual, H., Miller, S.** (2005). Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 122: 461-472.
- Badosa, E., Ferre, R., Planas, M., Feliu, L., Besalu, E., Cabrefiga, J., Bardaji, E., Montesinos, E.** (2007). A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides* 28: 2276-2285.
- Bai, C. y Elledge, S. J.** (1997). Gene identification using the yeast two-hybrid system. *Meth. Enzymol.* 283: 141-156.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S. P.** (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.
- Balba, H.** (2007). Review of strobilurin fungicide chemicals. *J. Environ. Sci. Health* 42: 441-451.
- Ballester, A. R.** (2007). Resistencia frente a la infección por *Penicillium digitatum* durante la postcosecha de los frutos cítricos. Bases moleculares y metabolismo de fenilpropanoides. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Ballester, A. R., Lafuente, M. T., González-Candelas, L.** (2006). Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biol. Technol.* 39: 115-124.
- Barkai-Golan, R.** (2001). Postharvest diseases of fruits and vegetables. Development and control. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B.** (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58: 649-662.
- Barton, K. A., Whitley, H. R., Yang, N.-S.** (1987). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85: 1103-1109.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., Wilson, C. L.** (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25: 108-118.
- Bechinger, B.** (2004). Structure and function of membrane-lytic peptides. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23: 271-292.

- Bechinger, B. y Lohner, K.** (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1758: 1529-1539.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M.** (1992a). Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 472-479.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M.** (1992b). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1121: 130-136.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., Tomita, M.** (1993a). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.* 182: 97-105.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., Tomita, M.** (1993b). Role of cell-binding in the antibacterial mechanism of lactoferricin B. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 478-484.
- Bellamy, W., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Takase, M., Takakura, N., Shimamura, S., Tomita, M.** (1994). Antifungal properties of Lactoferricin-B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine Lactoferrin. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 230-233.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D. Q., Kim, J. J.** (1995). Preformed antifungal compounds of citrus fruit: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1062-1066.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J. J., Carmeli, S.** (1992). Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1217-1221.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7: 249-260.
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., García-Olmedo, F., Molina, A.** (2002). Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 128: 951-961.
- Bhargava, A., Osusky, M., Forward, B. S., Hancock, R. E. W., Kay, W. W., Misra, S.** (2007a). Expression of a polyphemusin variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 88: 301-312.
- Bhargava, A., Osusky, M., Hancock, R. E. W., Forward, B. S., Kay, W. W., Misra, S.** (2007b). Antiviral indolicidin variant peptides: Evaluation for broad-spectrum disease resistance in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci.* 172: 515-523.
- Bishop-Hurley, S. L., Mounter, S. A., Laskey, J., Morris, R. O., Elder, J., Roop, P., Rouse, C., Schmidt, F. J., English, J. T.** (2002). Phage-displayed peptides as developmental agonists for *Phytophthora capsici* zoospores. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3315-3320.
- Blair, A. y Zahm, S. H.** (1995). Agricultural exposures and cancer. *Environ. Health Perspect.* 103: 205-208.

- Bland, J. M. y De Lucca, A. J.** (1998). Identification of Cecropin A proteolytic cleavage sites resulting from *Aspergillus flavus* extracellular protease(s). *J. Agric. Food Chem.* 46: 5324-5327.
- Blondelle, S. E. y Houghten, R. A.** (1991). Hemolytic and antimicrobial activities of the 24 individual omission analogs of melittin. *Biochemistry* 30: 4671-4678.
- Blondelle, S. E. y Houghten, R. A.** (1996). Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. *Trends Biotechnol.* 14: 60-65.
- Blondelle, S. E., Simpkins, L. R., Pérez-Payá, E., Houghten, R. A.** (1993). Influence of tryptophan residues on melittin's hemolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1202: 331-336.
- Blondelle, S. E., Takahashi, E., Houghten, R. A., Pérez-Payá, E.** (1996). Rapid identification of compounds with enhanced antimicrobial activity by using conformationally defined combinatorial libraries. *Biochem. J.* 313: 141-147.
- Bolar, J. P., Norelli, J. L., Harman, G. E., Brown, S. K., Aldwinckle, H. S.** (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T.harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res.* 10: 533-543.
- Bonattera, A., Mari, M., Casalini, L., Montesinos, E.** (2003). Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 93-104.
- Boothe, J. G., Saponja, J. A., Parmenter, D. L.** (1997). Molecular farming in plants: Oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drup Dev. Res.* 42: 172-181.
- Borgia, P. T. y Dodge, C. L.** (1992). Characterization of *Aspergillus nidulans* mutants deficient in cell-wall chitin or glucan. *J. Bacteriol.* 174: 377-383.
- Brahmachary, M., Krishnan, S. P. T., Koh, J. L. Y., Khan, A. M., Seah, S. H., Tan, T. W., Brusic, V., Bajic, V. B.** (2004). ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucl. Acids Res.* 32: 586-589.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. G., de Kruijff, B.** (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286: 2361-2364.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F., Thevissen, K., De Samblanx, G. W., Osborn, R. W.** (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 297-323.
- Broekaert, W. F., Delaure, S. L., De Bolle, M. F. C., Cammue, B. P. A.** (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 393-416.
- Broekaert, W. F., Marien, W., Terras, F. R. G., De Bolle, M. F., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J.** (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* 31: 4308-4314.



- Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., Osborn, R. W.** (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108: 1353-1358.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., Vanderleyden, J.** (1990). An automated quantitative assay for fungal growth-inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 55-59.
- Brogden, K. A.** (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250.
- Broglic, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J., Broglic, R.** (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.
- Brown, K. L. y Hancock, R. E. W.** (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 24-30.
- Bulawa, C. E.** (1993). Genetics and molecular-biology of chitin synthesis in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 505-534.
- Cabral, K. M. S., Almeida, M. S., Valente, A. P., Almeida, F. C. L., Kurtenbach, E.** (2003). Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expr. Purif.* 31: 115-122.
- Calvo, J., Calvente, V., de Orellano, M. E., Benuzzi, D., de Tosetti, M. I. S.** (2007). Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rabnella aquatilis*. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 251-257.
- Cammue, B. P. A., Debolle, M. F. C., Terras, F. R. G., Proost, P., Vandamme, J., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Broekaert, W. F.** (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 2228-2233.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J. G., Rico, M.** (1995). NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry* 34: 3009-3021.
- Carmona, M. J., Molina, A., Fernández, J. A., López-Fando, J. J., García-Olmedo, F.** (1993). Expression of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.* 3: 457-462.
- Cary, J. W., Rajasekaran, K., Jaynes, J. M., Cleveland, T. E.** (2000). Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth *in vitro* and *in planta*. *Plant Sci.* 154: 171-181.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P.** (1989). Apidaecins - Antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8: 2387-2391.
- Casteels, P. y Tempst, P.** (1994). Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 339-345.
- Castro, M. S. y Fontes, W.** (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Peptide Lett.* 12: 13-18.

- Cavallarin, L., Andreu, D., San Segundo, B.** (1998). Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 218-227.
- Centeno, J. M., Burguete, M. C., Castelló-Ruiz, M., Enrique, M., Vallés, S., Salom, J. B., Torregrosa, G., Marcos, J. F., Alborch, E., Manzanares, P.** (2006). Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5323-5329.
- Chadha, P. y Das, R. H.** (2006). A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta* 225: 213-222.
- Chakrabarti, A., Ganapathi, T. R., Mukherjee, P. K., Bapat, V. A.** (2003). MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. *Planta* 216: 587-596.
- Chalutz, E. y Wilson, C. L.** (1990). Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruits by *Debaromyces hansenii*. *Plant Dis.* 74: 134-137.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., Vogel, H. J.** (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 1184-1202.
- Chen, G. H., Yin, L. J., Chiang, I. H., Jiang, S. T.** (2007). Expression and purification of goat lactoferrin from *Pichia pastoris* expression system. *J. Food Sci.* 72: M67-M71.
- Chen, H. L., Lai, Y. W., Yen, C. C., Lin, Y. Y., Lu, C. Y., Yang, S. H., Tsai, T. C., Lin, Y. J., Lin, C. W., Chen, C. M.** (2004). Production of recombinant porcine lactoferrin exhibiting antibacterial activity in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8: 141-149.
- Choi, K. C., Kim, H. R., Park, Y. S., Park, S. M., Kim, J. H.** (2002). Design and screening of in vivo expressed antimicrobial peptide library. *Biotechnol. Lett.* 24: 251-256.
- Chong, D. K. y Langridge, W. H.** (2000). Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Res.* 9: 71-78.
- Clare, D. A., Catignani, G. L., Swaisgood, H. E.** (2003). Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1239-1255.
- Coca, M., Bortolotti, C., Rufat, M., Peñas, G., Eritja, R., Tharreau, D., Martínez del Pozo, A., Messeguer, J., San Segundo, B.** (2004). Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol. Biol.* 54: 245-259.
- Coca, M., Peñas, G., Gómez, J., Campo, S., Bortolotti, C., Messeguer, J., San Segundo, B.** (2006). Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a *cecropin A* gene in transgenic rice. *Planta* 223: 392-406.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P.** (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.
- Cuomo, C. A., Guldener, U., Xu, J. R., Trail, F., Turgeon, B. G., Di Pietro, A., Walton, J. D., Ma, L. J., Baker, S. E., Rep, M. et al.** (2007). The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317: 1400-1402.

- D' 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. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 702-707.
- Damveld, R. A., Arentshorst, M., Franken, A., vanKuyk, P. A., Klis, F. M., van den Hondel, C. A. M. J., Ram, A. F. J.** (2005a). The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. *Mol. Microbiol.* 58: 305-319.
- Damveld, R. A., vanKuyk, P. A., Arentshorst, M., Klis, F. M., van den Hondel, C. A. M. J., Ram, A. F. J.** (2005b). Expression of *agsA*, one of five 1,3- $\alpha$ -D-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. *Fung. Gen. Biol.* 42: 165-177.
- Dana, M. D., Pintor-Toro, J. A., Cubero, B.** (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol.* 142: 722-730.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., Richberg, M. H.** (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.
- Daniell, H., Streatfield, S. J., Wycoff, K.** (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 6: 219-226.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Klose, J., Bienert, M.** (2004). Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides. *Biochemistry* 43: 9140-9150.
- Daubeny, H. A. y Pepin, H. S.** (1977). Evaluation of strawberry clones for fruit rot resistance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102: 431-435.
- Davidse, L. C.** (1988). Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and resistance. *Enr. Fungicide Resistance in North America*. Delp, C. J., eds. pp 25-27.
- Davies, D. R., Bindschedler, L. V., Strickland, T. S., Bolwell, G. P.** (2006). Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. *J. Exp. Bot.* 57: 1817-1827.
- de Groot, P. W. J., Ruiz, C., de Aldana, C. R. V., Dueñas, E., Cid, V. J., Del Rey, F., Rodríguez-Peña, J. M., Pérez, P., Andel, A., Caubin, J. et al.** (2001). A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp. Funct. Genom.* 2: 124-142.
- De Lucca, A. J., Bland, J. M., Grimm, C., Jacks, T. J., Cary, J. W., Jaynes, J. M., Cleveland, T. E., Walsh, T. J.** (1998). Fungicidal properties, sterol binding, and proteolytic resistance of the synthetic peptide D4E1. *Can. J. Botany* 44: 514-520.
- De Lucca, A. J., Bland, J. M., Jacks, T. J., Grimm, C., Cleveland, T. E., Walsh, T. J.** (1997). Fungicidal activity of Cecropin A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 481-483.
- De Lucca, A. J. y Walsh, T. J.** (1999). Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1-11.

- De Smet, K. y Contreras, R.** (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* 27: 1337-1347.
- De Wit, P. J. G. M.** (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* 2: 452-458.
- Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J. R., Pan, H. et al.** (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434: 980-986.
- Debono, M. y Gordee, R. S.** (1994). Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 471-497.
- DeGray, G., Rajasekaran, K., Smith, F., Sanford, J., Daniell, H.** (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol.* 127: 852-862.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., Prochiantz, A.** (1994). The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 10444-10450.
- Dixon, R. A.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Dorschner, R. A., López-García, B., Peschel, A., Kraus, D., Morikawa, K., Nizet, V., Gallo, R. L.** (2006). The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *FASEB J.* 20: 35-42.
- Droby, S., Chalutz, E., Horev, B., Cohen, E., Gaba, V., Wilson, C. L., Wisniewski, M.** (1993). Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathol.* 42: 418-424.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M., Shachnai, A.** (1998). Commercial testing of aspire: A yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control* 12: 97-101.
- Du, T., Wang, Y., Hu, Q. X., Chen, J., Liu, S., Huang, W. J., Lin, M. L.** (2005). Transgenic *Paulownia* expressing shiva-1 gene has increased resistance to *Paulownia* witches' broom disease. *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 1500-1506.
- During, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O., Gieffers, W.** (1999). The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Lett.* 449: 93-100.
- Durrant, W. E. y Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185-209.
- Dykes, G. A., Aimoto, S., Hastings, J. W.** (1998). Modification of a synthetic antimicrobial peptide (ESF1) for improved inhibitory activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 268-272.
- Eckert, J. W.** (1988). Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. *En: Fungicide resistance in North America*. Delp, C. J., eds. APS Press, St. Paul, pp 1-3.
- Eckert, J. W. y Ogawa, J. M.** (1985). The chemical control of postharvest diseases: Subtropical and tropical fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 421-454.

- Eckert, R., Qi, F. X., Yarbrough, D. K., He, J., Anderson, M. H., Shi, W. Y. (2006). Adding selectivity to antimicrobial peptides: Rational design of a multidomain peptide against *Pseudomonas* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1480-1488.
- El-Kazzaz, M. K., Sommer, N. F., Kader, J. C. (1983). Ethylene effects on *in vitro* and *in vivo* growth of certain postharvest fruit-infecting fungi. *Phytopathology* 73: 998-1001.
- Eliassen, L. T., Berge, G., Sveinbjornsson, B., Svendsen, J. S., Vorland, L. H., Rekdal, O. (2002). Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. *Anticancer Res.* 22: 2703-2710.
- Eliassen, L. T., Haug, B. E., Berge, G., Rekdal, O. (2003). Enhanced antitumour activity of 15-residue bovine lactoferricin derivatives containing bulky aromatic amino acids and lipophilic N-terminal modifications. *J. Pept. Sci.* 9: 510-517.
- Epand, R. M. y Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11-28.
- Errampalli, D., Brubacher, N. R., DeEll, J. R. (2006). Sensitivity of *Penicillium expansum* to diphenylamine and thiabendazole and postharvest control of blue mold with fludioxonil in 'McIntosh' apples. *Postharvest Biol. Technol.* 39: 101-107.
- Estruch, J. J., Carozzi, N. B., Desai, N., Duck, N. B., Warren, G. W., Koziel, M. G. (1997). Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nat. Biotechnol.* 15: 137-141.
- Falla, T. J. y Hancock, R. E. W. (1997). Improved activity of a synthetic indolicidin analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 771-775.
- Falla, T. J., Karunaratne, D. N., Hancock, R. E. W. (1996). Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* 271: 19298-19303.
- Fan, Q. y Tian, S. P. (2001). Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 341-350.
- Fang, Z. D., Laskey, J. G., Huang, S., Bilyeu, K. D., Morris, R. O., Schmidt, F. J., English, J. T. (2006). Combinatorially selected defense peptides protect plant roots from pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 18444-18449.
- Farnaud, S. y Evans, R. W. (2003). Lactoferrin - a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 40: 395-405.
- Farnaud, S., Spiller, C., Moriarty, L., Patel, A., Gant, V., Odell, E. W., Evans, R. (2004). Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 233: 193-199.
- Feng, X., Wang, J., Shan, A., Teng, D., Yang, Y., Yao, Y., Yang, G., Shao, Y., Liu, S., Zhang, F. (2006). Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 47: 110-117.
- Fernández de Caleyá, R., González-Pascual, B., García-Olmedo, F., Carbonero, P. (1972). Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. *Appl. Microbiol.* 23: 998-1000.

- Ferre, R., Badosa, E., Feliu, L., Planas, M., Montesinos, E., Bardají, E.** (2006). Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3302-3308.
- Fields, G. B. y Noble, R. L.** (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 34: 161-214.
- Fitchen, J. H. y Beachy, R. N.** (1993). Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 739-763.
- Flaishman, M. A. y Kolattukudy, P. E.** (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6579-6583.
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M., Latge, J. P.** (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* 275: 41528.
- Forment, J., Gadea, J., Huerta, L., Abizanda, L., Agusti, J., Alamar, S., Alos, E., Andres, F., Arribas, R., Beltran, J. P. et al.** (2005). Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol. Biol.* 57: 375-391.
- Francés, J., Bonaterra, A., Moreno, M. C., Cabrefiga, J., Badosa, E., Montesinos, E.** (2006). Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biol. Technol.* 39: 299-307.
- Frankel, A. D. y Pabo, C. O.** (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55: 1189-1193.
- Futaki, S., Goto, S., Sugiura, Y.** (2003). Membrane permeability commonly shared among arginine-rich peptides. *J. Mol. Recognit.* 16: 260-264.
- Ganesan, A.** (1998). Combinatorial chemistry in the hunt for medicines [letter; comment]. *Nature* 393: 727.
- Ganz, T.** (2004). Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C. R. Biol.* 327: 539-549.
- Gao, A. G., Hakimi, S. M., Mittanck, C. A., Wu, Y., Woerner, B. M., Stark, D. M., Shah, D. M., Liang, J. H., Rommens, C. M. T.** (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18: 1307-1310.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., Rodríguez-Palenzuela, P.** (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M.** (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* 3: 72-74.
- Geisen, R.** (2000). *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the paf gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 95-101.
- Gifford, J. L., Hunter, H. N., Vogel, H. J.** (2005). Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell. Molec. Life Sci.* 62: 2588-2598.

- Girgi, M., Breese, W. A., Lorz, H., Oldach, K. H.** (2006). Rust and downy mildew resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) mediated by heterologous expression of the *aff* gene from *Aspergillus giganteus*. *Transgenic Res.* 15: 313-324.
- Gonzalez, C. F., Provin, E. M., Zhu, L., Ebbole, D. J.** (2002). Independent and synergistic activity of synthetic peptides against thiabendazole-resistant *Fusarium sambucinum*. *Phytopathology* 92: 917-924.
- Goswami, R. S. y Kistler, H. C.** (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5: 515-525.
- Greenberg, J. T.** (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 525-545.
- Grover, A. y Gowthaman, R.** (2003). Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Curr. Sci.* 84: 330-340.
- Gun, L. D., Shin, S. Y., Maeng, C. Y., Jin, Z. Z., Kim, K. L., Hahm, K. S.** (1999). Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 646-651.
- Hagen, S., Marx, F., Ram, A. F., Meyer, V.** (2007). The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2128-2134.
- Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P. H., Stocker, R. H.** (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156.
- Hancock, R. E. W.** (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* 1: 156-164.
- Hancock, R. E. W. y Lehrer, R.** (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16: 82-88.
- Hancock, R. E. W. y Sahl, H. G.** (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24: 1551-1557.
- Hao, J. J., Ye, J. Q., Yang, Q., Gong, Z. Z., Liu, W. Y., Wang, E. D.** (2000). A silent antifungal protein (AFP)-like gene lacking two introns in the mould *Trichoderma viride*. *Biochim. Biophys. Acta* 1475: 119-124.
- Harris, S. D. y Momany, M.** (2004). Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fung. Gen. Biol.* 41: 391-400.
- Haug, B. E., Strom, M. B., Svendsen, J. S. M.** (2007). The medicinal chemistry of short lactoferricin-based antibacterial peptides. *Curr. Med. Chem.* 14: 1-18.
- Haug, B. E. y Svendsen, J. S.** (2001). The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide. *J. Pept. Sci.* 7: 190-196.
- Haukland, H. H., Ulvatne, H., Sandvik, K., Vorland, L. H.** (2001). The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Lett.* 508: 389-393.

- Henriques, S. T., Melo, M. N., Castanho, M. A. R. B.** (2006). Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem. J.* 399: 1-7.
- Hill, T. W., Loprete, D. M., Momany, M., Ha, Y., Harsch, L. M., Livesay, J. A., Mirchandani, A., Murdock, J. J., Vaughan, M. J., Watt, M. B.** (2006). Isolation of cell wall mutants in *Aspergillus nidulans* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Mycologia* 98: 399-409.
- Hilpert, K., Elliott, M. R., Volkmer-Engert, R., Henklein, P., Donini, O., Zhou, Q., Winkler, D. F. H., Hancock, R. E. W.** (2006). Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. *Chem. Biol.* 13: 1101-1107.
- Hilpert, K., Volkmer-Engert, R., Walter, T., Hancock, R. E. W.** (2005). High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat. Biotechnol.* 23: 1008-1012.
- Hipskind, J. D. y Paiva, N. L.** (2000). Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 551-562.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A. B.** (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313-1318.
- Hofstein, R., Fridlender, B., Chalutz, E., Droby, S.** (1994). Large scale production and pilot testing of biological control agents for postharvest diseases. *Enr. Biological control of postharvest diseases - Theory and practice.* Wilson, C. L. y Wisniewski, M., eds. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 89-100.
- Holmes, G. J. y Eckert, J. W.** (1999). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89: 716-721.
- Hong, S. Y., Oh, J. E., Kwon, M. y., Choi, M. J., Lee, J. H., Lee, B. L., Moon, H. M., Lee, K. H.** (1998). Identification and characterization of novel antimicrobial decapeptides generated by combinatorial chemistry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2534-2541.
- Horiuchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, S., Ohta, A., Takagi, M.** (1999). Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *esmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 181: 3721-3729.
- Hristova, K., Selsted, M. E., White, S. H.** (1997). Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *J. Biol. Chem.* 272: 24224-24233.
- Hsu, S. T. D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M. A. G., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M. J. J., van Nuland, N. A. J.** (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 963-967.
- Huang, H. W.** (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39: 8347-8352.
- Huang, Y., Nordeen, R. O., Di, M., Owens, L. D., McBeath, J. H.** (1997). Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Phytopathology* 87: 494-499.



- Ibeas, J. I., Lee, H., Damsz, B., Prasad, D. T., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Narasimhan, M. L. (2000). Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *Plant J.* 23: 375-383.
- Ingham, A. B. y Moore, R. J. (2007). Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 047: 1-9.
- Jacobi, V., Plourde, A., Charest, P. J., Hamelin, R. C. (2000). *In vitro* toxicity of natural and designed peptides to tree pathogens and pollen. *Can. J. Botany* 78: 455-461.
- Janisiewicz, W. J. y Jeffers, S. N. (1997). Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection* 16: 629-633.
- Janisiewicz, W. J. y Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 411-441.
- Jarvis, W. R. (1962). The infection of strawberry and raspberry fruits by *Botrytis cinerea* Fr. *Ann. Appl. Biol.* 50: 569-575.
- Jaynes, J. M., Nagpala, P., Destefanobeltran, L., Huang, J. H., Kim, J. H., Denny, T., Cetiner, S. (1993). Expression of a cecropin-B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Sci.* 89: 43-53.
- Jaynes, J. M., Xanthopoulos, K. G., Destefanobeltran, L., Dodds, J. H. (1987). Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing antibacterial genes from insects. *Bioessays* 6: 263-270.
- Jeon, J., Park, S. Y., Chi, M. H., Choi, J., Park, J., Rho, H. S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S., Choi, J. *et al.* (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nat. Genet.* 39: 561-565.
- Jin, F., Xu, X., Wang, L., Zhang, W., Gu, D. (2006a). Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* 50: 147-156.
- Jin, F., Xu, X., Zhang, W., Gu, D. (2006b). Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 49: 39-46.
- Joliot, A., Pernelle, C., agostini-Bazin, H., Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1864-1868.
- Joliot, A. y Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature Cell Biology* 6: 189-196.
- Jones, R. W., Ospina-Giraldo, M. D., Clemente, T. (2004). Prosystemin-antimicrobial-peptide fusion reduces tomato late blight lesion expansion. *Mol. Breeding* 14: 83-89.
- Jones, R. W. y Prusky, D. (2002). Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: A new approach for biological control of the postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. *Phytopathology* 92: 33-37.

- Jung, H. J., Park, Y., Hahm, K. S., Lee, D. G.** (2006). Biological activity of Tat (47-58) peptide on human pathogenic fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 222-228.
- Kader, J. C.** (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 627-654.
- Kahmann, R. y Basse, C.** (2001). Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 374-380.
- Kaiserer, L., Oberparleiter, C., Weiler-Gorz, R., Burgstaller, W., Leiter, E., Marx, F.** (2003). Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch. Microbiol.* 180: 204-210.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Kimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *PNAS* 103: 11086-11091.
- Kalfa, V. C., Jia, H. P., Kunkle, R. A., Mccray, P. B., Tack, B. F., Brogden, K. A.** (2001). Congeners of SMAP29 kill ovine pathogens and induce ultrastructural damage in bacterial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3256-3261.
- Kamysz, W., Krolicka, A., Bogucka, K., Ossowski, T., Lukasiak, J., Lojkowska, E.** (2005). Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic *Pectobacterium* species. *J. Phytopathol.* 153: 313-317.
- Kang, J. H., Shin, S. Y., Jang, S. Y., Lee, M. K., Hahm, K. S.** (1998). Release of aqueous contents from phospholipid vesicles induced by cecropin A (1-8) magainin 2 (1-12) hybrid and its analogues. *J. Pept. Res.* 52: 45-50.
- Kankanala, P., Czymmek, K., Valent, B.** (2007). Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* 19: 706-724.
- Kavanagh, J. A. y Wood, R. K. S.** (1967). The role of wounds in the infection of oranges by *Penicillium digitatum* Sacc. *Ann. Appl. Biol.* 60: 375-383.
- Khan, J. A. y Vulfson, E. N.** (2003). Combinatorial chemistry in food research. *Comb. Chem. High T. Scr.* 6: 569-574.
- Kim, H. K., Chun, D. S., Kim, J. S., Yun, C. H., Lee, J. H., Hong, S. K., Kang, D. K.** (2006). Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 330-338.
- Kim, J. J., Ben, Y. S., Shapiro, B., Henis, Y., Carmeli, S.** (1991). Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiol.* 97: 880-885.
- Klis, F. M., Boorsma, A., de Groot, P. W. J.** (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 185-202.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S.** (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 239-256.
- Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., Powell, K. A., Schulz, M. A., Spinks, C. A., Worthington, P. A. et al.** (1997).

- Rationale and perspectives in the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 349-372.
- Knogge, W.** (1996a). Fungal infection of plants. *Plant Cell* 8: 1711-1722.
- Knogge, W.** (1996b). Molecular basis of specificity in host/fungus interactions. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 807-816.
- Kobayashi, S., Chikushi, A., Tougu, S., Imura, Y., Nishida, M., Yano, Y., Matsuzaki, K.** (2004). Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry* 43: 15610-15616.
- Kombrink, E. y Somssich, I. E.** (1995). Defense responses of plants to pathogens. *En. Advances in Botanical Research*. Andrews, J. H. y Tommerup, I. C., eds. Academic Press, pp 1-34.
- Koo, J. C., Chun, H. J., Park, H. C., Kim, M. C., Koo, Y. D., Koo, S. C., Ok, H. M., Park, S. J., Lee, S. H., Yun, D. J. et al.** (2002). Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 50: 441-452.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A.** (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16: 945-960.
- Kragol, G., Hoffmann, R., Chattergoon, M. A., Lovas, S., Cudic, M., Bulet, P., Condie, B. A., Rosengren, K. J., Montaner, L. J., Otvos, L. Jr.** (2002). Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrolicoricin. *Eur. J. Biochem.* 269: 4226-4237.
- Krishnamurthy, K., Balconi, C., Sherwood, J. E., Giroux, M. J.** (2001). Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1255-1260.
- Kristian, S. A., Timmer, A. M., Liu, G. Y., Lauth, X., Sal-Man, N., Rosenfeld, Y., Shai, Y., Gallo, R. L., Nizet, V.** (2007). Impairment of innate immune killing mechanisms by bacteriostatic antibiotics. *FASEB J.* 21: 1107-1116.
- Kristyanne, E. S., Kim, K. S., Stewart, J. M.** (1997). Magainin 2 effects on the ultrastructure of five plant pathogens. *Mycologia* 89: 353-360.
- Kurtzman, C. P. y Droby, S.** (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *System. Appl. Microbiol.* 24: 395-399.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Patino, B., Campos-Olivas, R., Vazquez, C., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J. M., Oñaderra, M., Gavilanes, J. G.** (1995). Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 324: 273-281.
- Lafuente, M. T., Martínez-Téllez, M. A., Zacarías, L.** (1997). Abscisic acid in the response of Fortune mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. *J. Sci. Food Agr.* 73: 494-502.

- Lamb, C. y Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.
- Lebaron, P., Catala, P., Parthuisot, N. (1998). Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2697-2700.
- Leckband, G. y Lorz, H. (1998). Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1004-1012.
- Lee, D. G., Hahm, K. S., Shin, S. Y. (2004). Structure and fungicidal activity of a synthetic antimicrobial peptide, P18, and its truncated peptides. *Biotechnol. Lett.* 26: 337-341.
- Lee, D. G., Kim, H. K., Kim, S. A., Park, Y., Park, S. C., Jang, S. H., Hahm, K. S. (2003a). Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 305-310.
- Lee, O. S., Lee, B., Park, N., Koo, J. C., Kim, Y. H., Prasad, T., Karigar, C., Chun, H. J., Jeong, B. R., Kim, D. H. *et al.* (2003b). Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry* 62: 1073-1079.
- Lee, T. J., Coyne, D. P., Clemente, T. E., Mitra, A. (2002). Partial resistance to bacterial wilt in transgenic tomato plants expressing antibacterial lactoferrin gene. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 127: 158-164.
- Lehrer, R. I. (2004). Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 727-738.
- Leifert, J. A. y Whitton, J. L. (2003). 'Translocatory proteins' and 'Protein transduction domains': A critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms. *Mol. Ther.* 8: 13-20.
- Leiter, E., Szappanos, H., Oberparleiter, C., Kaiserer, L., Csernoch, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Posci, I., Salvenmoser, W., Marx, F. (2005). Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2445-2453.
- Li, A., Lee, P. Y., Ho, B., Ding, J. L., Lim, C. T. (2007a). Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of sushi peptides on gram negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 411-418.
- Li, M., Lai, Y. P., Villaruz, A. E., Cha, D. J., Sturdevant, D. E., Otto, M. (2007b). Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *PNAS* 104: 9469-9474.
- Li, Q. S., Lawrence, C. B., Davies, H. M., Everett, N. P. (2002). A tridecapeptide possesses both antimicrobial and protease-inhibitory activities. *Peptides* 23: 1-6.
- Li, Q. S., Lawrence, C. B., Xing, H. Y., Babbitt, R. A., Bass, W. T., Maiti, I. B., Everett, N. P. (2001). Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. *Planta* 212: 635-639.
- Li, Y., Geng, Y. F., Song, H. H., Zheng, G. Y., Huan, L. D., Qiu, B. S. (2004). Expression of a human lactoferrin N-lobe in *Nicotiana benthamiana* with potato virus X-based agroinfection. *Biotechnol. Lett.* 26: 953-957.

- Liang, H. Y., Catranis, C. M., Maynard, C. A., Powell, W. A. (2002). Enhanced resistance to the poplar fungal pathogen, *Septoria musiva*, in hybrid poplar clones transformed with genes encoding antimicrobial peptides. *Biotechnol. Lett.* 24: 383-389.
- Lindell, S. D. y Scherkenbeck, E. (2005). Prospects for combinatorial chemistry in the agrosociences. *Comb. Chem. High T. Scr.* 8: 555-562.
- Lindgren, M. E. (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends in pharmacological sciences* 21: 99-103.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., Egorov, T. (2005). An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry* 66: 2426-2431.
- Liu, B., Hibbard, J. K., Urwin, P. E., Atkinson, H. J. (2005). The production of synthetic chemodisruptive peptides *in planta* disrupts the establishment of cyst nematodes. *Plant Biotechnol. J.* 3: 487-496.
- Liu, Q., Ingersoll, J., Owens, L., Salih, S., Meng, R., Hammerschlag, F. (2001). Response of transgenic Royal Gala apple (*Malus × domestica* Borkh.) shoots carrying a modified cecropin MB39 gene, to *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Rep.* 20: 306-312.
- Liu, Z., Zeng, M., Dong, S., Xu, J., Song, H., Zhao, Y. (2007). Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvested strawberries. *Postharvest Biol. Technol.* 46: 95-98.
- Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P. (2005). Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: Involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes. *J. Bacteriol.* 187: 2157-2162.
- Lobo, D. S., Pereira, I. B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L. N., Cabral, L. M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R. C., Linden, R., Kurtenbach, E. (2007). Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46: 987-996.
- Lohner, K. y Blondelle, S. E. (2005). Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb. Chem. High T. Scr.* 8: 241-256.
- Loose, C., Jensen, K., Rigoutsos, I., Stephanopoulos, G. (2006). A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. *Nature* 443: 867-869.
- López-García, B. (2002). Diseño y caracterización de péptidos antifúngicos con actividad frente a fitopatógenos. Aplicación a la conservación post-cosecha. Tesis doctoral. Universitat de València.
- López-García, B., González-Candelas, L., Pérez-Payá, E., Marcos, J. F. (2000). Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 837-846.
- López-García, B., Marcos, J. F., Abad, C., Pérez-Payá, E. (2004). Stabilisation of mixed peptide/lipid complexes in selective antifungal hexapeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1660: 131-137.

- López-García, B., Pérez-Payá, E., Marcos, J. F. (2002). Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2453-2460.
- López-García, B., Ubhayasekera, W., Gallo, R. L., Marcos, J. F. (2007). Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356: 107-113.
- López-García, B., Veyrat, A., Pérez-Payá, E., González-Candelas, L., Marcos, J. F. (2003). Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 163-170.
- Lopez-Ochoa, L., Rarnirez-Prado, J., Hanley-Bowdoin, L. (2006). Peptide aptamers that bind to a geminivirus replication protein interfere with viral replication in plant cells. *J. Virol.* 80: 5841-5853.
- López-Solanilla, E., García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P. (1998). Inactivation of the *sapA* to *sapF* locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell* 10: 917-924.
- Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A. *et al.* (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7860-7865.
- Lupetti, A., Paulusma-Annema, A., Senesi, S., Campa, M., van Dissel, J. T., Nibbering, P. H. (2002). Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1634-1639.
- Mader, J. S., Salsman, J., Conrad, D. M., Hoskin, D. W. (2005). Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 4: 612-624.
- Madrid, M. P., Di Pietro, A., Roncero, M. I. G. (2003). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol. Microbiol.* 47: 257-266.
- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., Cameron, R. K. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 399-403.
- Mangoni, M. L., Papo, N., Barra, D., Simmaco, M., Bozzi, A., Di Giulio, A., Rinaldi, A. (2004). Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane and viability of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 380: 859-865.
- Marcos, J. F., Beachy, R. N., Houghten, R. A., Blondelle, S. E., Pérez-Payá, E. (1995). Inhibition of a plant virus infection by analogs of melittin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12466-12469.
- Marcos, J. F., 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. *J. Exp. Bot.* 56: 2183-2193.

- Marcos, J. F., Muñoz, A., Pérez-Payá, E., Misra, S., López-García, B. (2008). Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu. Rev. Phytopathol.* doi:10.1146/annurev.phyto.121307.094843.
- Marcos, J. F., Vilar, M., Pérez-Payá, E., Pallás, V. (1999). *In vivo* detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle carmovirus (CarMV). *Virology* 255: 354-365.
- Martín-Udíroz, M., Madrid, M. P., Roncero, M. I. G. (2004). Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150: 3175-3187.
- Martínez del Pozo, A., Lacadena, V., Mancheño, J. M., Olmo, N., Oñaderra, M., Gavilanes, J. G. (2002). The antifungal protein AFP of *Aspergillus giganteus* is an oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) fold-containing protein that produces condensation of DNA. *J. Biol. Chem.* 277: 46179-46183.
- Martínez-Jávega, J. M., Cuquerella, J., Del Río, M. A., Navarro, P. (1994). High temperature conditioning of Fortune mandarins to reduce chilling injury during low temperature storage. *En: Proceedings Contribution du Froid a la Preservation de la Qualite des Fruits, Legumes et Produits Halieutiques*. Bennani, L. y Messaho, P., eds. Institut International du Froid. Actes du Symposium, pp 87-92.
- 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.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., Miyajima, K. (1995). Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry* 34: 6521-6526.
- Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Miyajima, K. (1997). Pore formation and translocation of melittin. *Biophys. J.* 73: 831-838.
- Meincken, A., Holroyd, D. L., Rautenbach, M. (2005). Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4085-4092.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr. Med. Chem.* 12: 1905-1919.
- Mentag, R., Luckevich, M., Morency, M. J., Seguin, A. (2003). Bacterial disease resistance of transgenic hybrid poplar expressing the synthetic antimicrobial peptide D4E1. *Tree Physiol.* 23: 405-411.
- Metlitskaia, L., Cabralda, J. E., Suleman, D., Kerry, C., Brinkman, J., Bartfeld, D., Guarna, M. M. (2004). Recombinant antimicrobial peptides efficiently produced using novel cloning and purification processes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39: 339-345.
- Miguel, E., Poza-Carrión, C., López-Solanilla, E., Aguilar, I., Llama-Palacios, A., García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P. (2000). Evidence against a direct antimicrobial role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 421-429.

- Mills, D., Hammerschlag, F. A., Nordeen, R. O., Owens, L. D.** (1994). Evidence for the breakdown of cecropin-B by proteinases in the intercellular fluid of peach leaves. *Plant Sci.* 104: 17-22.
- Mitra, A. y Zhang, Z. Y.** (1994). Expression of a human Lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant Physiol.* 106: 977-981.
- Mitsuhara, I., Matsufuru, H., Ohshima, M., Kaku, H., Nakajima, Y., Murai, N., Natori, S., Ohashi, Y.** (2000). Induced expression of sarcotoxin IA enhanced host resistance against both bacterial and fungal pathogens in transgenic tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 860-868.
- Miyashita, M., Otake, Y., Oda, M., Miyagawa, H.** (2007). Development of a high-throughput screening method using a cell-based, lawn format assay for the identification of novel plant defense activators from combinatorial peptide libraries. *J. Agric. Food Chem.* 55: 806-811.
- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y.** (1989). Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe-crab hemocytes, Tachyplesin-II, and Polyphemusin-I and Polyphemusin-II. Chemical structures and biological-activity. *J. Biochem.* 106: 663-668.
- Molina, A., Ahl-Goy, P., Fraile, A., Sánchez-Monge, R., García-Olmedo, F.** (1993). Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. *Plant Sci.* 92: 177.
- Molina, A. y García-Olmedo, F.** (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J.* 12: 669-675.
- Momany, M.** (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 580-585.
- Momany, M.** (2005). Growth control and polarization. *Med. Mycol.* 43 Suppl 1: S23-S25.
- Momany, M., Westfall, P. J., Abramowsky, G.** (1999). *Aspergillus nidulans* *sv0* mutants show defects in polarity establishment, polarity maintenance and hyphal morphogenesis. *Genetics* 151: 557-567.
- Monk, B. C., Niimi, K., Lin, S., Knight, A., Kardos, T. B., Cannon, R. D., Parshot, R., King, A., Lun, D., Harding, D. R. K.** (2005). Surface-active fungicidal D-peptide inhibitors of the plasma membrane proton pump that block azole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 57-70.
- Monroc, S., Badosa, E., Besalú, E., Planas, M., Bardají, E., Montesinos, E., Feliu, L.** (2006a). Improvement of cyclic decapeptides against plant pathogenic bacteria using a combinatorial chemistry approach. *Peptides* 27: 2575-2584.
- Monroc, S., Badosa, E., Feliu, L., Planas, M., Montesinos, E., Bardají, E.** (2006b). De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria. *Peptides* 27: 2567-2574.
- Montesinos, E.** (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 1-11.



- Moreno, A. B., Martínez del Pozo, A., Borja, M., San Segundo, B.** (2003). Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 93: 1344-1353.
- Moreno, A. B., 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*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 883-895.
- Moreno, A. B., Peñas, G., Rufat, M., Bravo, J. M., Estopà, M., Messeguer, J., San Segundo, B.** (2005). Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 960-972.
- Morin, K., Arcidiacono, S., Beckwitt, R., Mello, C.** (2005). Recombinant expression of indolicidin concatamers in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G.** (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 19: 1173-1176.
- Muñoz, A., López-García, B., Pérez-Payá, E., Marcos, J. F.** (2007). Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 172-177.
- Munro, C. A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M., Brown, A. J. P., Bulawa, C. E., Gow, N. A. R.** (2001). *Cbs1* of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol. Microbiol.* 39: 1414-1426.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sonksen, C. P., Ludvigsen, S., Raventos, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L. et al.** (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437: 975-980.
- 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*. *Eur. J. Biochem.* 193: 31-38.
- Nandi, S., Suzuki, Y. A., Huang, J. M., Yalda, D., Pham, P., Wu, L. Y., Bartley, G., Huang, N., Lonnerdal, B.** (2002). Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Sci.* 163: 713-722.
- Nandi, S., Yalda, D., Lu, S., Nikolov, Z., Misaki, R., Fujiyama, K., Huang, N.** (2005). Process development and economic evaluation of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain. *Transgenic Res.* 14: 237-249.
- Narasimhan, M. L., Coca, M. A., Jin, J. B., Yamauchi, T., Ito, Y., Kadowaki, T., Kim, K. K., Pardo, J. M., Damsz, B., Hasegawa, P. M. et al.** (2005). Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Mol. Cell* 17: 171-180.
- Narasimhan, M. L., Damsz, B., Coca, M. A., Ibeas, J. I., Yun, D. J., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A.** (2001). A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol. Cell* 8: 921-930.

- Narayanasamy, P.** (2006). Postharvest pathogens and disease management. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Nguyen, L. T., Schibli, D. J., Vogel, H. J.** (2005). Structural studies and model membrane interactions of two peptides derived from bovine lactoferricin. *J. Pept. Sci.* 11: 379-389.
- Nikawa, H., Fukushima, H., Makihira, S., Hamada, T., Samaranayake, L. P.** (2004). Fungicidal effect of three new synthetic cationic peptides against *Candida albicans*. *Oral Dis.* 10: 221-228.
- Nogales, J., Muñoz, S., Olivares, J., Sanjuán, J.** (2006). *Sinorhizobium meliloti* genes involved in tolerance to the antimicrobial peptide protamine. *FEMS Microbiol. Lett.* 264: 160-167.
- Nordeen, R. O., Sinden, S. L., Jaynes, J. M., Owens, L. D.** (1992). Activity of Cecropin SB37 against protoplasts from several plant-species and their bacterial pathogens. *Plant Sci.* 82: 101-107.
- Nori, A., Jensen, K. D., Tijerina, M., Kopeckova, P., Kopecek, J.** (2003). Tat-conjugated synthetic macromolecules facilitate cytoplasmic drug delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjug. Chem.* 14: 44-50.
- Nunes, C., Usall, J., Manso, T., Torres, R., Olmo, M., García, J. M.** (2007). Effect of high temperature treatments on growth of *Penicillium* spp. and their development on 'Valencia' oranges. *Food Sci. Technol. Inter.* 13: 63-68.
- Oard, S., Rush, M. C., Oard, J. H.** (2004). Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *J. Appl. Microbiol.* 97: 169-180.
- Obagwu, J. y Korsten, L.** (2003). Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biol. Technol.* 28: 187-194.
- Odds, F. C., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R.** (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11: 272-279.
- Oerke, E. C.** (1999). The importance of Disease Control in Modern Plant Production. *Er: Modern Fungicides and Antifungal Compounds II*. Lyr, H., Russell, P. E., Dehne, H. W., Sisler, H. D., eds. Germany, pp 11-17.
- Oh, H., Hedberg, M., Wade, D., Edlund, C.** (2000). Activities of synthetic hybrid peptides against anaerobic bacteria: aspects of methodology and stability. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 68-72.
- Oita, S., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T.** (2000). Binding of barley and wheat alpha-thionins to polysaccharides. *Biosci. Biotech. Bioch.* 64: 958-964.
- Oldach, K. H., Becker, D., Lorz, H.** (2001). Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 832-838.
- Oren, Z. y Shai, Y.** (1997). Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry* 36: 1826-1835.
- Orsi, N.** (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *BioMetals* 17: 189-196.

- Orth, A. B.** (1999). New targets for fungicide discovery. *En: Modern fungicides and antifungal compounds II*. Lyr, H., Russell, P. E., Dehne, H. W., Sisler, H. D., eds. Germany, pp 19-29.
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Mayayo, E., Di Pietro, A.** (2004). *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect. Immun.* 72: 1760-1766.
- Osapay, K., Tran, D., Ladokhin, A. S., White, S. H., Henschen, A. H., Selsted, M. E.** (2000). Formation and characterization of a single Trp-Trp cross-link in indolicidin that confers protease stability without altering antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* 275: 12017-12022.
- Osusky, M., Osuska, L., Hancock, R. E. W., Kay, W. W., Misra, S.** (2004). Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Res.* 13: 181-190.
- Osusky, M., Osuska, L., Kay, W., Misra, S.** (2005). Genetic modification of potato against microbial diseases: *in vitro* and *in planta* activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theor. Appl. Genet.* 111: 711-722.
- Osusky, M., Zhou, G., Osuska, L., Hancock, R. E. W., Kay, W. W., Misra, S.** (2000). Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nat. Biotechnol.* 18: 1162-1166.
- Otvos, L. Jr.** (2000). Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.* 6: 497-511.
- Owens, L. D. y Heutte, T. M.** (1997). A single amino acid substitution in the antimicrobial defense protein cecropin B is associated with diminished degradation by leaf intercellular fluid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 525-528.
- Paiva, N. L.** (2002). Engineering resveratrol glucoside accumulation into alfalfa: Crop protection and nutraceutical applications. *ACS Symp. Ser.* 829: 118-130.
- Palm, C., Netzerea, S., Hallbrink, M.** (2006). Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides* 27: 1710-1716.
- Palou, L., Usall, J., Smilanick, J. L., Aguilar, M. J., 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 Manag. Sci.* 58: 459-466.
- Park, C., Bennion, B., François, I. E. J. A., Ferket, K. K. A., Cammue, B. P. A., Thevissen, K., Levery, S. B.** (2005). Neutral glycolipids of the filamentous fungus *Neurospora crassa*: altered expression in plant defensin-resistant mutants. *J. Lipid Res.* 46: 759-768.
- Park, C. B., Kim, H. S., Kim, S. C.** (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 253-257.
- Park, C. B., Kim, M. S., Kim, S. C.** (1996). Novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 408-413.

- Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., Kim, S. C.** (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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8245-8250.
- Parra-López, C., Baer, M. T., Groisman, E. A.** (1993). Molecular-genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* 12: 4053-4062.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C. A.** (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase-inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.
- Pecorini, C., Savazzini, F., Martino, P. A., Fusi, E., Fogher, C., Baldi, A.** (2005). Heterologous expression of biologically active porcine lactoferrin in *Pichia pastoris* yeast. *Veter. Res. Commun.* 29: 379-382.
- Pellegrini, A.** (2003). Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1225-1238.
- Penninckx, I. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Metraux, J. P., Manners, J. M., Broekaert, W. F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Pérez-Payá, E., Houghten, R. A., Blondelle, S. E.** (1994). Determination of the secondary structure of selected melittin analogues with different haemolytic activities. *Biochem. J.* 299: 587-591.
- Peschel, A.** (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 10: 179-186.
- Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W. F., Jung, G., Tarkowski, A. et al.** (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* 193: 1067-1076.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., Gotz, F.** (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274: 8405-8410.
- Peschel, A. y Sahl, H. G.** (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 529-536.
- Peschen, D., Li, H. P., Fischer, R., Kreuzaler, F., Liao, Y. C.** (2004). Fusion proteins comprising a *Fusarium*-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. *Nat. Biotechnol.* 22: 732-738.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., Gullino, M. L.** (1997). Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 11: 131-140.

- Piers, K. L., Brown, M. H., Hancock, R. E. W.** (1994). Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2311-2316.
- Pohland, A. E.** (1993). Mycotoxins in review. *Food Addit. Contam* 10: 17-28.
- 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. *J. Horticul. Sci. Biotechnol.* 77: 441-445.
- Porat, R., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E., Droby, S.** (2003). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by beta-aminobutyric acid. *Eur. J. Plant Patbol.* 109: 901-907.
- Powell, A. L., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L. C., Bennett, A. B., Labavitch, J. M.** (2000a). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 942-950.
- Powell, W. A., Catranis, C. M., Maynard, C. A.** (1995). Synthetic antimicrobial peptide design. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 792-794.
- Powell, W. A., Catranis, C. M., Maynard, C. A.** (2000b). Design of self-processing antimicrobial peptides for plant protection. *Let. Appl. Microbiol.* 31: 163-168.
- Powers, J. P. S. y Hancock, R. E. W.** (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681-1691.
- Powers, J. P. S., Martin, M. M., Goosney, D. L., Hancock, R. E. W.** (2006). The antimicrobial peptide polyphemusin localizes to the cytoplasm of *Escherichia coli* following treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1522-1524.
- Pringle, J. R.** (1991). Staining of bud scars and other cell-wall chitin with calcofluor. *Meth. Enzymol.* 194: 732-735.
- Prochiantz, A.** (2000). Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 400-406.
- Prochiantz, A.** (2007). For protein transduction, chemistry can win over biology. *Nat. Meth.* 4: 119-120.
- Prusky, D. y Lichter, A.** (2007). Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiol. Lett.* 268: 1-8.
- Pryor, S. W., Gibson, D. M., Bergstrom, G. C., Walker, L. P.** (2007). Minimization of between-well sample variance of antifungal activity using a high-throughput screening microplate bioassay. *Biotechniques* 42: 168-172.
- Rajasekaran, K., Cary, J. W., Jaynes, J. M., Cleveland, T. E.** (2005). Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Plant Biotechnol. J.* 3: 545-554.

- Rajasekaran, K., Stromberg, K. D., Cary, J. W., Cleveland, T. E.** (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity *in vitro* of the synthetic peptide D4E1. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2799-2803.
- Ram, A. F. J. y Klis, F. M.** (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat Protoc.* 1: 2253-2256.
- Ram, A. F. J., Wolters, A., Ten, H. R., Klis, F. M.** (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* 10: 1019-1030.
- Ramamoorthy, V., Zhao, X. H., Snyder, A. K., Xu, J. R., Shah, D. M.** (2007). Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Cell. Microbiol.* 9: 1491-1506.
- Rao, A., Chopra, S., Ram, G., Gupta, A., Ranganathan, A.** (2005). Application of the "codon-shuffling" method - Synthesis and selection of *de novo* proteins as antibacterials. *J. Biol. Chem.* 280: 23605-23614.
- Rao, A. G.** (1995). Antimicrobial peptides. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 6-13.
- Raventós, D., Taboureau, O., Mygind, P. H., Nielsen, J. D., Sonksen, C. P., Kristensen, H. H.** (2005). Improving on nature's defenses: Optimization & high throughput screening of antimicrobial peptides. *Comb. Chem. High T. Scr.* 8: 219-233.
- Reed, J. D., Edwards, D. L., Gonzalez, C. F.** (1997). Synthetic peptide combinatorial libraries: A method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 537-549.
- Regente, M. C., Giudici, A. M., Villalaín, J., de la Canal, L.** (2005). The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 183-189.
- Ribeiro, S. F. F., Agizzio, A. P., Machado, O. L. T., Neves-Ferreira, A. G. C., Oliveira, M. A., Fernandes, K. V. S., Carvalho, A. O., Perales, J., Gomes, V. M.** (2007). A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. *Scientia Horticul.* 111: 399-405.
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., Lebleu, B.** (2003). Cell-penetrating peptides - A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278: 585-590.
- Rioux, D., Jacobi, V., Simard, M., Hamelin, R. C.** (2000). Structural changes of spores of tree fungal pathogens after treatment with the designed antimicrobial peptide D2A21. *Can. J. Botany* 78: 462-471.
- Rodov, V., Ben, Y. S., Kim, J. J., Shapiro, B., Ittah, Y.** (1992). Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 117: 788-792.
- Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C., Durán, A.** (1988a). Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170: 1945-1949.

- Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C., Durán, A. (1988b). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to calcofluor white. *J. Bacteriol.* 170: 1950-1954.
- Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., Millard, P. J. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2421-2431.
- Rozek, A., Powers, J. P. S., Friedrich, C. L., Hancock, R. E. W. (2003). Structure-based design of an indolicidin peptide analogue with increased protease stability. *Biochemistry* 42: 14130-14138.
- Rudolph, C., Schreier, P. H., Uhrig, J. F. (2003). Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4429-4434.
- Rydlo, T., Miltz, J., Mor, A. (2006). Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. *J. Food Sci.* 71: R125-R135.
- Salmon, V., Legrand, D., Slomianny, M. C., El Yazidi, I., Spik, G., Gruber, V., Bournat, P., Olagnier, B., Mison, D., Theisen, M. *et al.* (1998). Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein Expr. Purif.* 13: 127-135.
- Salzman, R. A., Koiwa, H., Ibeas, J. I., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (2004). Inorganic cations mediate plant PR5 protein antifungal activity through fungal Mnn1- and Mnn4-regulated cell surface glycans. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 780-788.
- Saugar, J. M., Rodríguez-Hernández, M. J., de la Torre, B. G., Pachón-Ibañez, M. E., Fernández-Reyes, M., Andreu, D., Pachón, J., Rivas, L. (2006). Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: Molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1251-1256.
- Schaaper, W. M. M., Posthuma, G. A., Plasman, H. H., Sijtsma, L., Fant, F., Borremans, F. A. M., Thevissen, K., Broekaert, W. F., Meloen, R. H., van Amerongen, A. (2001). Synthetic peptides derived from the  $\beta$ 2- $\beta$ 3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site. *J. Pept. Res.* 57: 409-418.
- Schäfer, W. (1994). Molecular Mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 461-477.
- Schibli, D. J., Epand, R. F., Vogel, H. J., Epand, R. M. (2002). Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. *Biochem. Cell Biol.* 80: 667-677.
- Schibli, D. J., Hwang, P. M., Vogel, H. J. (1999). The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles. *FEBS Lett.* 446: 213-217.
- Schirra, M., D'Aquino, S., Palma, A., Marceddu, S., Angioni, A., Cabras, P., Scherm, B., Migheli, Q. (2005). Residue level, persistence, and storage performance of citrus fruit treated with fludioxonil. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6718-6724.

- Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F. *et al.* (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* 2: 1133-1137.
- Schmidtchen, A., Frick, I. M., Andersson, E., Tapper, H., Bjorck, L. (2002). Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* 46: 157-168.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., Dowdy, S. F. (1999). *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285: 1569-1572.
- Seebah, S., Suresh, A., Zhuo, S., Choong, Y. H., Chua, H., Chuon, D., Beuerman, R., Verma, C. (2007). Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucl. Acids Res.* 35: D265-D268.
- Segura, A., Moreno, M., García-Olmedo, F. (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett.* 332: 243-246.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., García-Olmedo, F. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 16-23.
- Selitreñnikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2883-2894.
- Selitreñnikoff, C. P. y Nakata, M. (2003). New cell wall targets for antifungal drugs. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4: 200-205.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 55-70.
- Sharma, A., Sharma, R., Imamura, M., Yamakawa, M., Machii, H. (2000). Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Lett.* 484: 7-11.
- Silhol, M. (2002). Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur. J. Biochem.* 269: 494-501.
- Silverstein, K. A. T., Moskal, W. A., Wu, H. C., Underwood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D., VandenBosch, K. A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* 51: 262-280.
- Skamnioti, P. y Gurr, S. J. (2007). *Magnaporthe grisea* Cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell* 19: 2674-2689.
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Margosan, D. A., Gabler, F. M., Goodwine, W. R. (2005). Influence of pH and NaHCO<sub>3</sub> on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. *Plant Dis.* 89: 640-648.



- Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Mlikota, F., Usall, J., Michael, I. F. (1999). Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Dis.* 83: 139-145.
- Smilanick, J. L., Michael, L. F., Mansour, M. F., Mackey, B. E., Margosan, D. A., Flores, D., Weist, C. F. (1997). Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax. *Plant Dis.* 81: 1299-1304.
- Smilanick, J. L. y Sorenson, D. (2001). Control of postharvest decay of citrus fruit with calcium polysulfide. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 157-168.
- Smith, G. P. y Scott, J. K. (1993). Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Meth. Enzymol.* 217: 228-257.
- Soltani, S., Keymanesh, K., Sardari, S. (2007). In silico analysis of antifungal peptides: Determining the lead template sequence of potent antifungal peptides. *Expert Opin. Drug Discov.* 2: 837-847.
- Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M. L. (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 Biol. Technol.* 33: 141-151.
- Spadaro, D. y Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 185-194.
- Specht, C. A., Liu, Y., Robbins, P. W., Bulawa, C. E., Iartchouk, N., Winter, K. R., Riggle, P. J., Rhodes, J. C., Dodge, C. L., Culp, D. W. *et al.* (1996). The *chsD* and *chsE* Genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fung. Gen. Biol.* 20: 153-167.
- Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., Hänssler, G., Mühlbach, H. P., Thomzik, J. E. (1997). Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 16: 668-673.
- Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, A., Sahl, H. G., Peschel, A., Gotz, F., Garbe, C., Schitteck, B. (2006). Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2608-2620.
- Steiner, H., Andreu, D., Merrifield, R. B. (1988). Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. *Biochim. Biophys. Acta* 939: 260-266.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of 2 anti-bacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248.
- Stone, R. (1994). Environmental estrogens stir debate. *Science* 265: 308-310.
- Strange, R. N. y Scott, P. R. (2005). Plant Disease: A threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 83-116.
- Strom, M. B., Haug, B. E., Rekdal, O., Skar, M. L., Stensen, W., Svendsen, J. S. (2002). Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochem. Cell Biol.* 80: 65-74.

- Subbalakshmi, C., Nagaraj, R., Sitaram, N.** (1999). Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Lett.* 448: 62-66.
- Subbalakshmi, C. y Sitaram, N.** (1998). Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* 160: 91-96.
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P. A., Evans, I. J., Osborn, R. W., Ray, J. A., Rees, S. B., Broekaert, W. F.** (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.* 272: 24480-24487.
- Takase, K., Hagiwara, K., Onodera, H., Nishizawa, Y., Ugaki, M., Omura, T., Numata, S., Akutsu, K., Kumura, H., Shimazaki, K.** (2005). Constitutive expression of human lactoferrin and its N-lobe in rice plants to confer disease resistance. *Biochem. Cell Biol.* 83: 239-249.
- Talbot, N. J.** (2007). Fungal genomics goes industrial. *Nat. Biotechnol.* 25: 542-543.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., van Kan, J. A. L.** (1998). The endopolygalacturonase gene Bcp1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1009-1016.
- Terras, F. R. G., Schoofs, H. M., De Bolle, M. F., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F.** (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 15301-15309.
- Terry, L. A. y Joyce, D. C.** (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biol. Technol.* 32: 1-13.
- Terwillinger, T. C. y Eisenberg, D.** (1982). The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *J. Biol. Chem.* 257: 6016-6022.
- Theis, T., Marx, F., Salvenmoser, W., Stahl, U., Meyer, V.** (2005). New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Res. Microbiol.* 156: 47-56.
- Theis, T., Wedde, M., Meyer, V., Stahl, U.** (2003). The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 588-593.
- Thevissen, K., Ferket, K. K. A., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A.** (2003). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* 24: 1705-1712.
- Thevissen, K., Idkowiak-Baldys, J., Im, Y. J., Takemoto, J., François, I. E. J. A., Ferket, K. K. A., Aerts, A. M., Meert, E. M. K., Winderickx, J., Roosen, J. et al.** (2005). SKN1, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis. *FEBS Lett.* 579: 1973-1977.
- Thevissen, K., Terras, F. R. G., Broekaert, W. F.** (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5451-5458.

- Thevissen, K., Warnecke, D. C., François, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahringer, U., Thomma, B. P. H. J., Ferkel, K. K. A., Cammue, B. P. A.** (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* 279: 3900-3905.
- Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A., Thevissen, K.** (2002). Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.
- Thomzik, J. E., Stenzel, K., Stocker, R., Schreier, P. H., Hain, R., Stahl, D. J.** (1997). Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 265-278.
- Titarenko, E., López-Solanilla, E., García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P.** (1997). Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *J. Bacteriol.* 179: 6699-6704.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K.** (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74: 4137-4142.
- Tomita, M., Takase, M., Bellamy, W., Shimamura, S.** (1994a). A review: the active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatr. Jpn.* 36: 585-591.
- Tomita, M., Takase, M., Wakabayashi, H., Bellamy, W.** (1994b). Antimicrobial peptides of lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 357: 209-218.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H.** (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell Biol.* 80: 109-112.
- Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A.** (2000). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55: 4-30.
- Tossi, A., Tarantino, C., Romeo, D.** (1997). Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *Eur. J. Biochem.* 250: 549-558.
- Tripathi, P. y Dubey, N. K.** (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 32: 235-245.
- Turrini, A., Sbrana, C., Pitto, L., Castiglione, M. R., Giorgetti, L., Briganti, R., Bracci, T., Evangelista, M., Nuti, M. P., Giovannetti, M.** (2004). The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dablia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 163: 393-403.
- Tuset, J. J.** (1987). Podredumbres de los frutos cítricos. Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca, Valencia.
- Tuset, J. J.** (1999). Perspectivas del control de las podredumbres en la postcosecha de cítricos. *Levante Agrícola* : 272-280.

- Tuset, J. J., Hinarejos, C., Mira, J. L.** (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, J. J., Hinarejos, C., Mira, J. L., Martínez, J. M.** (1996). Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la postrecolección. *Levante Agrícola* 337: 342-347.
- Twyman, R. M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Fischer, R.** (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 21: 570-578.
- Ueta, E., Tanida, T., Osaki, T.** (2001). A novel bovine lactoferrin peptide, FKRRWQWRM, suppresses *Candida* cell growth and activates neutrophils. *J. Pept. Res.* 57: 240-249.
- Ulrich, S., Wolter, F., Stein, J. M.** (2005). Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 452-461.
- Ulvatne, H., Samuelsen, O., Haukland, H. H., Kramer, M., Vorland, L. H.** (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 377-384.
- Usall, J., Pons, J., Palou, L., Viñas, I., Smilanick, J. L.** (1999). Alternativas a los productos químicos de síntesis en post-cosecha de cítricos en España y EEUU. *PHYTOMA* 110: 58-64.
- van Berkel, P. H. C., Welling, M. M., Geerts, M., van Veen, H. A., Ravensbergen, B., Salaheddine, M., Pauwels, E. K. J., Pieper, F., Nuijens, J. H., Nibbering, P. H.** (2002). Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat. Biotechnol.* 20: 484-487.
- van der Biezen, E. A.** (2001). Quest for antimicrobial genes to engineer disease-resistant crops. *Trends Plant Sci.* 6: 89-91.
- van der Kraan, M. I. A., van Marle, J., Nazmi, K., Groenink, J., Van't Hof, W., Veerman, E. C. I., Bolscher, J. G. M., Amerongen, A. V. N.** (2005). Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Peptides* 26: 1537-1542.
- van Kan, J. A. L.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11: 247-253.
- van Kan, J. A. L., van't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A., Dees, D. C., van der Vlugt-Bergmans CJ.** (1997). Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 30-38.
- Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- Veerman, E. C. I., Nazmi, K., van Hof, W., Bolscher, J. G. M., den Hertog, A. L., Amerongen, A. V. N.** (2004). Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Biochem. J.* 381: 447-452.

- Veronese, P., Ruiz, M. T., Coca, M. A., Hernandez-Lopez, A., Lee, H., Ibeas, J. I., Damsz, B., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. *et al.* (2003). In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiol.* 131: 1580-1590.
- Veyrat, A., López-García, B., Marcos, J. F., González-Candelas, L. Biocontrol de la podredumbre verde de cítricos mediante nuevos aislados de levaduras, solos o en combinación con pequeños péptidos antimicrobianos. *XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lloret de Mar, Girona. 2004.
- Vidal, J. R., Kikkert, J. R., Malnoy, M. A., Wallace, P. G., Barnard, J., Reisch, B. I. (2006). Evaluation of transgenic 'Chardonnay' (*Vitis vinifera*) containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew. *Transgenic Res.* 15: 69-82.
- 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. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1327-1331.
- Vila-Perelló, M., Sánchez-Vallet, A., García-Olmedo, F., Molina, A., Andreu, D. (2005). Structural dissection of a highly knotted peptide reveals minimal motif with antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* 280: 1661-1668.
- Vila-Perelló, M., Tognon, S., Sánchez-Vallet, A., García-Olmedo, F., Molina, A., Andreu, D. (2006). A minimalist design approach to antimicrobial agents based on a thionin template. *J. Med. Chem.* 49: 448-451.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V. (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 40: 9-16.
- Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272: 16010-16017.
- Vogel, H. J., Schibli, D. J., Jing, W., Lohmeier-Vogel, E. M., Epand, R. F., Epand, R. M. (2002). Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochem. Cell Biol.* 80: 49-63.
- Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G., Merrifield, R. B. (1990). All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4761-4765.
- Wakabayashi, H., Abe, S., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Yamaguchi, H. (1998). Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1587-1591.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J.* 16: 1241-1251.
- Wang, Z. y Wang, G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucl. Acids Res.* 32: D590-D592.

- Ward, P. P., Piddington, C. S., Cunningham, G. A., Zhou, X. D., Wyatt, R. D., Conneely, O. M.** (1995). A system for production of commercial quantities of human Lactoferrin - A broad-spectrum natural antibiotic. *Bio-Technology* 13: 498-503.
- Weinberg, E. D.** (2007). Antibiotic properties and applications of lactoferrin. *Curr. Pharm. Des.* 13: 801-811.
- Wessolowski, A., Bienert, M., Dathe, M.** (2004). Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization. *J. Pept. Res.* 64: 159-169.
- Williamson, B., Tudzynsk, B., Tudzynski, P., van Kan, J. A. L.** (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8: 561-580.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., Joyce, D.** (1998). Pathology. *Enr*: Postharvest. An introduction to the physiology and handling. eds. CAB International, New York, pp 144-158.
- Wilson, C. L. y Wisniewski, M.** (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 441.
- Wilson, C. L. y Wisniewski, M.** (1994). Biological control of postharvest diseases. CRC Press, Boca Raton.
- Winter, M. D., McPherson, M. J., Atkinson, H. J.** (2002). Neuronal uptake of pesticides disrupts chemosensory cells of nematodes. *Parasitology* 125: 561-565.
- Wisniewski, M. E., Bassett, C. L., Artlip, T. S., Webb, R. P., Janisiewicz, W. J., Norelli, J. L., Goldway, M., Droby, S.** (2003). Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. *Physiol. Plant.* 119: 563-572.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R. E. W.** (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38: 7235-7242.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., Conway, W. S., Sams, C. E.** (2005). Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3888-3894.
- King, H. Y., Lawrence, C. B., Chambers, O., Davies, H. M., Everett, N. P., Li, Q. Q.** (2006). Increased pathogen resistance and yield in transgenic plants expressing combinations of the modified antimicrobial peptides based on indolicidin and magainin. *Planta* 223: 1024-1032.
- Xu, J. R., Peng, Y. L., Dickman, M. B., Sharon, A.** (2006). The dawn of fungal pathogen genomics. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 337-366.
- Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., Huang, H. W.** (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81: 1475-1485.
- Yeaman, M. R. y Yount, N. Y.** (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55: 27-55.

- Yevtushenko, D. P. y Misra, S.** (2007). Comparison of pathogen-induced expression and efficacy of two amphibian antimicrobial peptides, MsrA2 and temporin A, for engineering wide-spectrum disease resistance in tobacco. *Plant Biotechnol. J.* 5: 720-734.
- Yevtushenko, D. P., Romero, R., Forward, B. S., Hancock, R. E. W., Kay, W. W., Misra, S.** (2005). Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. *J. Exp. Bot.* 56: 1685-1695.
- Yi, J. Y., Seo, H. W., Yang, M. S., Robb, E. J., Nazar, R. N., Lee, S. W.** (2004). Plant defense gene promoter enhances the reliability of shiva-1 gene-induced resistance to soft rot disease in potato. *Planta* 220: 165-171.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K. S., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X. et al.** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* 296: 79-92.
- Yun, D. J., Zhao, Y., Pardo, J. M., Narasimhan, M. L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L. R., Durzo, M. P., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A.** (1997). Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7082-7087.
- Zasloff, M.** (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5449-5453.
- Zasloff, M.** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
- Zhang, H. Y., Zheng, X. D., Xi, Y. F.** (2005). Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. *Biocontrol* 50: 331-342.
- Zhang, L., Falla, T., Wu, M., Fidai, S., Burian, J., Kay, W., Hancock, R. E. W.** (1998a). Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 674-680.
- Zhang, L., Scott, M. G., Yan, H., Mayer, L. D., Hancock, R. E. W.** (2000). Interaction of Polyphemus I and structural analogs with bacterial membranes, lipopolysaccharide, and lipid monolayers. *Biochemistry* 39: 14504-14514.
- Zhang, Z. Y., Coyne, D. P., Vidaver, A. K., Mitra, A.** (1998b). Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. *Phytopathology* 88: 730-734.
- Zhao, H. X., Mattila, J. P., Holopainen, J. M., Kinnunen, P. K. J.** (2001). Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophys. J.* 81: 2979-2991.
- Zheng, X. D., Zhang, H. Y., Sun, P.** (2005). Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 353-357.
- Zhu, W. L., Lan, H. L., Park, I. S., Kim, J. I., Jin, H. Z., Hahm, K. S., Shin, S. Y.** (2006). Design and mechanism of action of a novel bacteria-selective antimicrobial peptide from the cell-penetrating peptide Pep-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 769-774.

- Zhu, Y. J., Agbayani, R., Moore, P. H.** (2007). Ectopic expression of *Dablia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. *Planta* 226: 87-97.





Este estudio se enmarca en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, en concreto en la utilización de péptidos antimicrobianos en protección vegetal.

A lo largo de este trabajo se han identificado y caracterizado distintos péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana frente a hongos fitopatógenos de interés agronómico, obteniéndose variaciones en su actividad antifúngica, modo de acción, especificidad de microorganismo, citotoxicidad, así como diferencias en su capacidad de control de las podredumbres postcosecha de frutos cítricos causadas por el hongo *Penicillium digitatum*.

