UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA
Facultad de Ciencias de la Salud
Grado en Biotecnología
Trabajo Fin de Grado
Curso 2025-2026

Optimización de la proteína antifúngica PeAfpA en la biofactoría *Penicillium chrysogenum*

Autor

López Serra, Alba

Tutor

Dr. Pajuelo Gámez, David (Tutor interno), Dra. Paloma María Manzanares Mir (Tutor externo), Dra. Stefani Gisel De Ovalle Presa (Tutor externo)

Valencia, 2026

Optimización de la proteína antifúngica PeAfpA en la biofactoría *Penicillium chrysogenum*

Trabajo Final de Grado, presentado por:

López Serra, Alba

Tutorizado por:

Dr. Pajuelo Gámez, David (Tutor interno)

Dra. Paloma María Manzanares Mir (Tutor externo)

Dra. Stefani Gisel De Ovalle Presa (Tutor externo)

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2025-2026

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores, tanto interno como externos, y a todo el grupo de laboratorio por haberme dado la oportunidad de aprender y crecer durante esta etapa. En especial, quiero dar las gracias a Paloma, David y, especialmente, a Stefani, por su paciencia, dedicación y por enseñarme tantas cosas con tanta cercanía. Gracias por vuestra ayuda constante y por resolver la misma duda mil veces.

A mis compañeros y amigos del grado, Andrés, Ximena, Belén, Bea y Zaira, gracias por estar siempre ahí. Por la ayuda, el apoyo y por acompañarnos entre todos en este camino. Gracias por compartir conmigo los momentos de estrés, pero también las risas, los planes y los buenos momentos. Sin vosotros, todo habría sido bastante más difícil.

A mis mejores amigas y compañeras de piso, Belén y Lucía, gracias por hacerme sentir en casa en una ciudad que al principio era desconocida para mí. Gracias por vuestro cariño, vuestro apoyo incondicional y por convertiros en esa familia no tan cerca de casa.

A mi pareja, Brando, por creer en mí siempre, por aguantarme en épocas de exámenes y por apoyarme en todo momento. Gracias por tu paciencia, tu cariño y por estar a mi lado incluso en los días más difíciles.

A mis padres y a mi hermana, por creer en mí desde el primer momento, por apoyarme en cada decisión y por darme siempre la confianza necesaria para seguir adelante. Gracias por escucharme hablar una y otra vez del temario, incluso cuando yo ya no tenía más fuerzas para hacerlo. Gracias por vuestra paciencia, vuestro cariño y por estar siempre a mi lado. Este logro también es vuestro.

Y, por último, a mi abuelo Miguel. Aunque ya no esté aquí, siento su presencia conmigo en cada paso. Me gusta pensar que estaría orgulloso de todo lo que he conseguido. Este trabajo también va por él.

Índice

Resumen y palabras clave V
Abstract and Keywords VI
1. Introducción 1
2. Hipótesis 5
3. Objetivos 5
4. Materiales y métodos 5
4.1 Secuencias *chsF* y *csmA* de *P. chrysogenum* 5
4.2 Construcción de guías CRISPR 6
4.3 Generación de cassette de transformación con resistencia terbinafina y cloranfenicol 6
4.4 Generación de protoplastos y transformación fúngica 7
4.5 Comprobación de cepas mutantes 8
4.6 Valoración fenotípica 9
4.7 Comprobación de producción de proteínas 9
4.8 Réplicas y análisis estadístico 10
4.9 Software 10
4.10 Declaración de uso de IA 10
5. Resultados y discusión 11
5.1 Secuencias de *chsF* y *csmA* de *P. chrysogenum* 11
5.2 Generación del Cassette de transformación con resistencia a terbinafina y cloranfenicol 13
5.3 Generación de protoplastos y transformación fúngica 14
5.4 Comprobación de cepas mutantes 14
5.5 Valoración fenotípica 15
5.6 Evaluación de la producción de proteínas 18
6.Conclusiones 27
7. Bibliografía 29

Índice de tablas

Tabla 1. Guías CRISPR/cas9 diseñadas para transformación 6
Tabla 2. Oligos diseñados para la secuenciación Sanger. 8
Tabla 3. Resultados del ANOVA diámetro colonial en PDA. 17
Tabla 4. Resultados del ANOVA diámetro colonial en MMA. 18
Tabla 5. Resultados del t-student en medio PcMM, Bradford. 20
Tabla 6. Ratio PeAfpA/proteína en PcMM. 21
Tabla 7. Resultados del T-student en medio YPD, Bradford 23
Tabla 8. Ratio PeAfpA/proteína en YPD 24
Tabla 9. Valores prueba t de Student en medio CM, ELISA. 26

Índice de figuras

Figura 1. Mapa del plásmido pLM-AMA15.0 7
Figura 2. Árbol maximum likelihood de proteinas 12
Figura 3. Árbol maximum likelihood de DNA 12
Figura 4. PCR de colonia 13
Figura 5. Placa de transformación MMS 14
Figura 6. Alineamiento de secuencias mutantes. 15
Figura 7. Colonias de las cepas mutantes de chsF 16
Figura 8. Ensayo de fenotipo día 6, en 2 medios de cultivo PDA y MMA 17
Figura 9. Evolución del diámetro colonial en medio PDA. 17
Figura 10. Evolución del diámetro colonial en medio MMA. 18
Figura 11. Análisis por SDS-PAGE en medio PcMM. 20
Figura 12. Producción total de proteínas en medio PcMM 20
Figura 13. Producción específica de PeAfpA en medio PcMM 21
Figura 14. Evolución del ratio PeAfpA/proteína total en medio PcMM 21
Figura 15. Análisis por SDS-PAGE en medio YPD 23
Figura 16. Producción total de proteínas en medio YPD 23
Figura 17. Producción específica de PeAfpA en medio YPD 24
Figura 18. Evolución del ratio PeAfpA/proteína total en medio YPD 24
Figura 19. Análisis por SDS-PAGE en medio CM 25
Figura 20. Producción específica de PeAfpA en medio CM 26
Figura 21. Comparación de la producción específica de PeAfpA medios de cultivo ensayados (PcMM, YPD y CM) 27

Listado de símbolos y siglas

AFPs: proteínas antifúngicas de origen fúngico
A. niger: Aspergillus niger
A. nidulans: *Aspergillus nidulans*
ANOVA: análisis de la varianza
APS: persulfato amónico
BLASTx: Basic Local Alignment Search Tool para ADN traducido frente a proteínas
BSA: albúmina sérica bovina
Cas9: endonucleasa asociada al sistema CRISPR
CLC Sequence Viewer: software de alineamiento y visualización de secuencias
CM: medio completo de *A. niger*
CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato
ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
gRNA: ARN guía
HDR: reparación dirigida por homología
IA: inteligencia artificial
LB: medio Luria-Bertani
MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
MM: medio mínimo
MMS: medio mínimo de sacarosa de *Aspergillus*
nat1: marcador de resistencia a nourseotricina
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NHEJ: unión de extremos no homólogos
nptII: marcador de resistencia a geneticina/neomicina
ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible
P. chrysogenum: Penicillium chrysogenum
P. expansum: Penicillium expansum
P. digitatum: Penicillium digitatum
PAF: proteína antifúngica de *P. chrysogenum*
PAFB: proteína antifúngica B de *P. chrysogenum*
PAFC: proteína antifúngica C de *P. chrysogenum*
PAM: *Protospacer Adjacent Motif*
PBS: tampón fosfato salino
PBST: PBS con Tween
PcMM: medio mínimo de *P. chrysogenum*
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDA: agar patata dextrosa
PDB: caldo patata dextrosa
PeAfpA: proteína antifúngica A de *P. expansum*
PEG 8000: polietilenglicol 8000
PS buffer: tampón PS
RNA: ácido ribonucleico
SC solution: solución sorbitol-cloruro cálcico
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
TAE: tampón Tris-acetato-EDTA
TEMED: N,N,N’,N’-tetrametiletilendiamina
TMB: tetrametilbencidina
TM: medio de transformación

Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano ajustado con ácido clorhídrico
WT: tipo silvestre
YPD: extracto de levadura-peptona-dextrosa

Resumen y palabras clave

Las proteínas antifúngicas de origen fúngico (AFPs) representan una alternativa prometedora frente a las infecciones fúngicas en salud, agricultura y postcosecha. Entre ellas, PeAfpA, producida de forma natural por *Penicillium expansum*, destaca por su elevada actividad antifúngica y su amplio espectro de acción. Sin embargo, el uso de *P. expansum* como biofactoría presenta importantes limitaciones, ya que se trata de una especie fitopatógena y productora de micotoxinas. Por ello, su producción heteróloga se ha trasladado a *Penicillium chrysogenum*, un hospedador más seguro y con interés biotecnológico por su elevada capacidad secretora.

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar si la modificación de genes de quitina sintasa podía constituir una estrategia útil para optimizar la capacidad productora de una cepa de *P. chrysogenum* diseñada previamente para la producción de PeAfpA. Las quitina sintasas son enzimas responsables de la síntesis de quitina, uno de los principales componentes estructurales de la pared celular fúngica. La elección de los genes *csmA* y *chsF* se basó en un estudio realizado en *Aspergillus niger*, donde su alteración se asoció con un aumento de la secreción de proteínas extracelulares. Para ello, se identificaron en *P. chrysogenum* las secuencias homólogas de *csmA* y *chsF* descritas en *A. niger*, se diseñaron guías CRISPR/Cas9 frente a ambos genes y se construyeron los vectores correspondientes. Posteriormente, se generaron transformantes mediante transformación de protoplastos y se verificaron molecularmente mediante PCR y secuenciación.

Los resultados permitieron confirmar la obtención de mutantes en el locus *chsF*, mientras que en el caso de *csmA* no se obtuvieron mutantes confirmados en las muestras analizadas. La caracterización fenotípica mostró que las cepas mutantes presentaron, en general, un crecimiento comparable al de la cepa control WT PCSO12112, sin alteraciones severas en las condiciones ensayadas, y aunque algunas colonias mostraron una coloración blanquecina, este rasgo no pudo considerarse un marcador fiable de edición. La evaluación de la producción proteica se centró en el mutante *chsF* 5.2. En PcMM, la producción total de proteínas fue comparable a la de la cepa control; en YPD se observaron cambios en la cinética de secreción, pero sin diferencias significativas entre ambas cepas; y en CM los resultados fueron variables y no permitieron extraer conclusiones firmes. En cuanto a la producción específica de PeAfpA, los datos fueron limitados y, en varios casos, solo pudieron interpretarse de forma descriptiva debido a la pérdida de réplicas biológicas. En conjunto, estos resultados sugieren que la mutación de *chsF* no produce un efecto fenotípico severo ni una mejora clara y reproducible en la producción de PeAfpA.

Estos resultados demuestran la viabilidad técnica de la edición dirigida de genes de quitina sintasa en *P. chrysogenum* mediante CRISPR/Cas9 y aportan una primera aproximación al posible efecto de la mutación en *chsF* sobre la capacidad productiva de esta biofactoría. No obstante, será necesario ampliar el análisis con más mutantes y un mayor número de réplicas biológicas para determinar con mayor solidez el potencial biotecnológico de esta estrategia.

Palabras clave: Penicillium chrysogenum, PeAfpA, CRISPR/Cas9, quitina sintasa, proteínas antifúngicas, biofactoría fúngica.

Abstract and Keywords

Fungal antifungal proteins (AFPs) represent a promising alternative to fungal infections in health, agriculture, and postharvest settings. Among them, PeAfpA, naturally produced by *Penicillium expansum*, stands out for its high antifungal activity and broad spectrum of action. However, the use of *P. expansum* as a biofactory presents important limitations, since it is a phytopathogenic species and a producer of mycotoxins. For this reason, its heterologous production has been transferred to *Penicillium chrysogenum*, a safer host with biotechnological interest due to its high secretory capacity.

In this context, the aim of this work was to evaluate whether the modification of chitin synthase genes could constitute a useful strategy to optimize the productive capacity of a *P. chrysogenum* strain previously designed for PeAfpA production. Chitin synthases are enzymes responsible for chitin synthesis, one of the main structural components of the fungal cell wall. The choice of the *csmA* and *chsF* genes was based on previous studies in *Aspergillus niger*, where alteration of these chitin synthases was associated with increased extracellular protein secretion. To this end, the homologous sequences of *csmA* and *chsF* described in *A. niger* were identified in *P. chrysogenum*, CRISPR/Cas9 guides targeting both genes were designed, and the corresponding vectors were constructed. Subsequently, transformants were generated by protoplast transformation and molecularly verified by PCR and sequencing.

The results confirmed the generation of mutants at the *chsF* locus, whereas in the case of *csmA* no confirmed mutants were obtained. Phenotypic characterization showed that the mutant strains displayed, in general, growth comparable to that of the control strain WT PCSO12112, with no severe alterations under the conditions tested, and although some colonies showed a whitish coloration, this trait could not be considered a reliable marker of editing. Protein production analysis focused on the *chsF* 5.2 mutant. In PcMM, total protein production was comparable to that of the control strain; in YPD, changes in secretion kinetics were observed, but without significant differences between the two strains; and in CM, the results were variable and did not allow firm conclusions to be drawn. Regarding the specific production of PeAfpA, the data were limited and, in several cases, could only be interpreted descriptively due to the loss of biological replicates. Overall, these results suggest that mutation of *chsF* does not produce a severe phenotypic effect or a clear and reproducible improvement in PeAfpA production.

These results demonstrate the technical feasibility of targeted chitin synthase gene editing in *P. chrysogenum* using CRISPR/Cas9 and provide a first approximation to the possible effect of the *chsF* mutation on the productive capacity of this biofactory. However, it will be necessary to extend the analysis to more mutants and a higher number of biological replicates in order to determine more robustly the biotechnological potential of this strategy

Keywords: Penicillium chrysogenum, PeAfpA, CRISPR/Cas9, chitin synthase, antifungal proteins, fungal biofactorY.

1. Introducción

Las infecciones fúngicas constituyen una amenaza creciente para la salud humana, animal y ambiental, así como para la seguridad alimentaria y la producción agrícola. Además del impacto clínico asociado a las infecciones fúngicas y a la aparición de resistencias a los antifúngicos convencionales, los hongos fitopatógenos causan pérdidas significativas en cultivos de interés económico y favorecen la contaminación por micotoxinas, lo que refuerza la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control más eficaces y sostenibles (Fisher et al., 2022; Savary et al., 2019)

En este contexto, la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos con propiedades innovadoras y mecanismos de acción alternativos resulta esencial. Entre ellos, las proteínas antifúngicas de origen fúngico (AFPs) han despertado un notable interés por su potencial aplicación tanto en el ámbito biomédico como en el agrícola (Garrigues et al., 2018).

Las AFPs son proteínas pequeñas, secretadas, básicas, catiónicas, ricas en residuos de cisteína, cuya estructura está estabilizada por múltiples puentes disulfuro (Garrigues et al., 2018; Ropero Pérez, 2026). Esta organización les confiere una elevada resistencia frente a variaciones extremas de pH, temperatura y procesos de proteólisis, lo que, junto con su actividad antifúngica a bajas concentraciones, las convierte en moléculas de gran interés biotecnológico. Además, presentan un amplio espectro antifúngico frente a patógenos de relevancia clínica, agrícola y alimentaria y, aunque su actividad se dirige preferentemente frente a hongos, también se han descrito algunos casos de actividad antibacteriana y antiviral, lo que amplía su interés como moléculas antimicrobianas de origen fúngico (Garrigues et al., 2018; Ropero Pérez, 2026).

Los hongos filamentosos poseen un repertorio diverso de genes *afp* y *afp-like*, y sus genomas suelen codificar una o varias AFPs filogenéticamente distintas. Aunque tradicionalmente estas proteínas se han agrupado en tres clases principales, A, B y C, clasificaciones más recientes incluyen una cuarta clase filogenética, la clase D (Garrigues et al., 2016; Ropero Pérez, 2026).

Penicillium expansum es un hongo filamentoso perteneciente al filo Ascomycota y agente causal de la podredumbre azul en frutos de pepita, además de productor de metabolitos tóxicos como la patulina (Khadiri et al., 2024). Esta especie codifica tres AFPs filogenéticamente distintas, PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC, entre las cuales PeAfpA destaca como una de las proteínas antifúngicas más potentes descritas hasta la fecha (Ropero Pérez, 2026). Diversos estudios han mostrado que presenta una elevada actividad frente a hongos filamentosos, dermatofitos y levaduras, así como efectos protectores en distintos modelos de infección vegetal y postcosecha, incluyendo *P. digitatum* en frutos de naranja, *Botrytis cinerea* en hojas y frutos de tomate, *P. expansum* en frutos de manzana, y patógenos del arroz como *Magnaporthe oryzae* y *Fusarium proliferatum* (Garrigues et al., 2018; Ropero Pérez, 2026).

En cuanto a su mecanismo de acción, las AFPs presentan en general mecanismos complejos y multifactoriales que comprenden tres etapas principales: interacción con la superficie celular fúngica, internalización y actividad intracelular. Esta naturaleza multifactorial podría dificultar la aparición de resistencias y constituye una de las razones por las que estas proteínas resultan especialmente atractivas como alternativas a los antifúngicos convencionales (Ropero Pérez, 2026). En el caso concreto de PeAfpA, este mecanismo comienza con la interacción de la proteína con componentes específicos de la superficie fúngica, especialmente de la pared celular, un paso que resulta clave para su actividad antifúngica. Esta unión inicial se ve favorecida por la naturaleza catiónica de la proteína, que promueve su atracción electrostática hacia componentes de la superficie celular con carga negativa. Posteriormente, PeAfpA se internaliza mediante un proceso dependiente de energía, aunque no sigue una vía endocítica convencional.

Una vez en el interior celular, altera varias rutas fisiológicas esenciales para la viabilidad del hongo, entre ellas la vía de integridad de la pared celular, implicada en el mantenimiento y reparación de esta estructura; la vía cAMP-PKA, relacionada con la regulación del crecimiento, el metabolismo y la respuesta al estrés; y el metabolismo del fosfatidilinositol, fundamental para la organización de membranas y la señalización intracelular. En conjunto, la alteración simultánea de estos procesos compromete la homeostasis celular y contribuye finalmente a la muerte del hongo (Giner-Llorca et al., 2024; Ropero Pérez, 2026).

A pesar de las ventajas de PeAfpA, *P. expansum* no resulta adecuado para su uso como biofactoría fúngica, ya que se trata de una especie fitopatógena y productora de micotoxinas, lo que limita de forma significativa su aplicación biotecnológica desde el punto de vista de la seguridad, la regulación y la producción a gran escala (Garrigues et al., 2018; Ropero Pérez, 2026). De hecho, la cepa *P. expansum* CMP-1 produce de forma natural hasta 125 mg/L de PeAfpA, que puede ser purificada a partir de sobrenadantes de cultivo, pero el uso de esta especie como sistema de producción no resulta deseable por su carácter micotoxigénico (Garrigues et al., 2018; Ropero Pérez, 2026; de Ovalle et al.,manuscript in preparation).

Por este motivo, la producción de PeAfpA se ha abordado mediante un sistema de expresión heteróloga en *Penicillium chrysogenum*, un hospedador bien caracterizado, históricamente utilizado en procesos industriales, con elevada capacidad de secreción proteica y un perfil de seguridad mucho más favorable. *P. chrysogenum* es un hongo filamentoso ampliamente conocido por su papel en la producción de antibióticos β-lactámicos y por su capacidad para secretar proteínas extracelulares, lo que ha favorecido su uso como biofactoría en biotecnología (Fierro et al., 2022; Jami et al., 2010). Además, en su genoma se han descrito proteínas antifúngicas representativas de distintas clases, entre ellas PAF, PAFB y PAFC, cuya caracterización ha puesto de manifiesto una notable diversidad en cuanto a niveles de producción, propiedades estructurales, espectro antifúngico y modo de acción, reflejando así la complejidad funcional de las AFPs fúngicas (Garrigues et al., 2018; Ropero Pérez, 2026).

La utilización de los elementos reguladores del gen *afpA* de *P. expansum* permitió la producción heteróloga de PeAfpA en *P. chrysogenum*, proporcionando un hospedador biotecnológico seguro para su biosíntesis. En concreto, la cepa recombinante PCMG11552 se obtuvo a partir de una cepa parental Δ*paf* que ya portaba el marcador *nat1*, un gen de resistencia a nourseotricina utilizado para la selección de transformantes. Posteriormente, mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se introdujo un casete de expresión formado por el promotor de *afpA* de *P. expansum* (PafpA), la secuencia codificante de *afpA* y su terminador transcripcional (TafpA), lo que permitió dirigir la expresión heteróloga de PeAfpA en *P. chrysogenum*. Junto a este casete se introdujo además el marcador de selección *nptII*, un gen de resistencia a antibióticos aminoglucósidos empleado para la selección de transformantes (Garrigues et al., 2018). El análisis posterior del número de copias mostró que PCMG11552 contenía una copia de nat1 y dos copias del constructo de expresión asociado a nptII, lo que permitió disponer de una cepa recombinante productora de PeAfpA en un fondo genético de *P. chrysogenum* (Gandía et al., 2022; Garrigues et al., 2018). De hecho, esta estrategia permitió obtener cepas recombinantes productoras de la proteína, aunque los niveles iniciales de producción en este hospedador fueron considerablemente inferiores a los descritos para el productor natural *P. expansum*, lo que puso de manifiesto la necesidad de seguir optimizando esta biofactoría. Posteriormente, mediante un sistema CRISPR/Cas9 reciclable, se eliminaron los marcadores de resistencia a antibióticos de la cepa productora, obteniéndose la cepa PCSO12112, adecuada desde el punto de vista regulatorio y de bioseguridad, y que además mantuvo una producción de PeAfpA comparable a la de la cepa recombinante parental. En consecuencia, PCSO12112 fue empleada como cepa receptora en el presente estudio. Sobre esta base genética, previamente optimizada para la producción de PeAfpA y libre de marcadores de resistencia, se planteó una optimización adicional mediante la modificación de genes de quitina sintasa potencialmente

implicados en la capacidad secretora del hongo (Garrigues et al., 2018; Gandía et al., 2022; Ropero Pérez, 2026, de Ovalle et al.,manuscript in preparation).

La pared celular fúngica constituye una estructura esencial que proporciona protección, regula la permeabilidad, mantiene la morfología celular y confiere resistencia frente a cambios osmóticos. Está compuesta principalmente por quitina, glucanos, mananos y proteínas, siendo la quitina uno de sus principales componentes estructurales. Este polímero está formado por cadenas lineales de N-acetilglucosamina sintetizadas por las enzimas quitina sintasas (Pacheco-Arjona et al., 2014).

En hongos filamentosos se han descrito siete clases de quitina sintasas, agrupadas en dos grandes divisiones, cuyas funciones abarcan desde el mantenimiento de la integridad de la pared celular hasta la morfogénesis y el crecimiento hifal. A diferencia de lo que ocurre en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, donde la quitina representa una proporción reducida de la pared celular, en hongos filamentosos este polímero puede alcanzar porcentajes considerablemente mayores, lo que refleja su importancia estructural en estos organismos (Gandía et al., 2012). En términos generales, las quitina sintasas de la división I, que incluyen las clases I, II y III, suelen participar en funciones más específicas relacionadas con el mantenimiento de la integridad de la pared celular, la reparación de la red de quitina o la separación celular, mientras que las de la división II desempeñan un papel más destacado en la biosíntesis de grandes cantidades de quitina (Gandía et al., 2012). Entre estas últimas, las quitina sintasas de clases V y VII presentan especial interés, ya que poseen dominios asociados a funciones de polarización celular y crecimiento apical, y su alteración se ha relacionado con cambios en la morfología, el desarrollo, la sensibilidad a antifúngicos y la patogenicidad (Gandía et al., 2014).

Desde el punto de vista biotecnológico, las quitina sintasas no solo resultan relevantes por su papel en la integridad y morfogénesis de la pared celular, sino también por su posible influencia en la capacidad secretora de los hongos filamentosos. En este contexto, chsF se corresponde con una quitina sintasa de clase III, integrada en la división I, mientras que csmA pertenece a la clase V, integrada en la división II y caracterizada por presentar un dominio motor tipo miosina y por su implicación en procesos de polarización celular, crecimiento apical y morfogénesis (Barthel et al., 2024; Gandía et al., 2012, 2014). En este sentido, (Barthel et al., 2024) llevaron a cabo un análisis funcional del repertorio completo de quitina sintasas de *Aspergillus niger* mediante la generación de mutantes por deleción para todos los genes de esta familia. Aunque todos los mutantes conservaron la capacidad de germinar, la eliminación de distintos genes produjo alteraciones tanto en las características fenotípicas como la morfología y la producción de esporas. Para evaluar su posible interés biotecnológico, los autores determinaron la cantidad total de proteína presente en el sobrenadante de cultivo tras 24 h de crecimiento en medio completo (CM) de *A. niger*. Entre todos los mutantes analizados, los correspondientes a *csmA* y *chsF* destacaron por mostrar los mayores incrementos en la secreción de proteínas, alcanzando aproximadamente el triple de proteína total en el sobrenadante con respecto a la cepa control (Barthel et al., 2024).

Posteriormente, ambos mutantes se evaluaron de nuevo en condiciones de mayor exigencia para el sistema secretor, aumentando la concentración de glucosa del medio hasta el 5 % y prolongando el cultivo hasta 48 h. Se realizó un seguimiento de la proteína total secretada cada 6 h y se cuantificó el consumo de glucosa como indicador adicional del crecimiento fúngico. En estas condiciones, el mutante en el gen *csmA* presentó una secreción proteica comparable a la de la cepa control, mientras que el mutante *chsF* mantuvo un aumento significativo de la producción (Barthel et al., 2024). En particular, a las 36 h de la inoculación, durante la fase exponencial de crecimiento, *chsF* produjo más del triple de proteína que la cepa control (Barthel et al., 2024). En conjunto, estos resultados indican que, aunque la deleción de todas las quitina sintasas permitió identificar distintos efectos fenotípicos, la modificación de *csmA* y,

especialmente, de *chsF* podría constituir una estrategia prometedora para la obtención de biofactorías fúngicas con mayor capacidad de secreción de proteínas (Barthel et al., 2024).

Para la eliminación de estas quitina sintasas se puede emplear la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9, derivada de un mecanismo de defensa natural presente en bacterias y arqueas, conocido como CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (Garrigues et al., 2022). Es un sistema que de forma natural permite a los microorganismos reconocer y eliminar ADN extraño, como el de virus bacteriófagos. Debido a su alta especificidad y eficiencia, el mecanismo ha sido adaptado como una potente tecnología para la modificación de genomas (Garrigues et al., 2022).

El sistema CRISPR/Cas9 se basa fundamentalmente en dos componentes: la endonucleasa Cas9, que actúa como una "tijera molecular", y un ARN guía (*gRNA*), cuya secuencia es complementaria a la región del ADN que se desea modificar. El ARN guía dirige a Cas9 hacia el sitio diana del genoma, donde la nucleasa induce una rotura de doble cadena que puede repararse por unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) o por reparación dirigida por homología (*homology-directed repair*, HDR) (Ropero Pérez, 2026). En hongos filamentosos, la vía de reparación predominante suele ser NHEJ, lo que favorece la aparición de inserciones o deleciones capaces de originar mutaciones de pérdida de función (Garrigues et al., 2022; Ropero Pérez, 2026). La aplicación de CRISPR/Cas9 en hongos filamentosos se describió por primera vez en 2015 en *Trichoderma reesei* y en varias especies de *Aspergillus*, y desde entonces esta herramienta se ha adaptado a numerosos hongos de interés biotecnológico (Ropero Pérez, 2026). Entre las distintas estrategias de introducción del sistema, los plásmidos autorreplicativos basados en AMA1 presentan especial interés. AMA1 es una secuencia de replicación autónoma descrita originalmente en *Aspergillus nidulans* que permite el mantenimiento extracromosómico de plásmidos en hongos filamentosos. Estos vectores resultan especialmente útiles porque mejoran la eficiencia de transformación, evitan la integración permanente de *cas9* en el genoma y pueden perderse posteriormente en condiciones no selectivas, lo que facilita el reciclaje de marcadores (Gems et al., 1991; Ropero Pérez, 2026).

El desarrollo de AFPs y su producción en biofactorías fúngicas puede relacionarse con varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de Naciones Unidas. En particular, se vincula con el ODS 3, "Salud y bienestar", al favorecer la investigación de nuevas moléculas frente a infecciones fúngicas; con el ODS 2, "Hambre cero", por su potencial para reducir pérdidas causadas por patógenos fúngicos en cultivos y postcosechas; con el ODS 12, "Producción y consumo responsables", al promover alternativas biológicas a fungicidas químicos; y con el ODS 9, "Industria, innovación e infraestructura", mediante la optimización de biofactorías fúngicas y el uso de herramientas de ingeniería genética como CRISPR/Cas9 en procesos biotecnológicos de interés sanitario y agroalimentario (Pacto Mundial Red Española, s. f.).

En este contexto, el presente trabajo aporta un componente innovador adicional, ya que plantea por primera vez en *P. chrysogenum* la modificación de genes de quitina sintasa como posible estrategia para mejorar una biofactoría fúngica productora de PeAfpA. De este modo, el proyecto no solo contribuye al desarrollo de nuevas aproximaciones para la obtención de proteínas antifúngicas, sino que también se alinea con los ODS al impulsar soluciones biotecnológicas innovadoras, más seguras y potencialmente más sostenibles para los ámbitos de la salud, la agricultura y la industria.

2. Hipótesis

Nuestra hipótesis es que la mutación mediante CRISPR/Cas9 de los genes de quitina sintasa *csmA* y *chsF* en *P. chrysogenum* podría modificar la pared celular y favorecer la secreción de proteínas extracelulares, contribuyendo así a aumentar la producción específica de PeAfpA. Esta propuesta se fundamenta en los resultados obtenidos por (Barthel et al., 2024) en *Aspergillus niger*, donde la alteración de estos genes dio lugar a un notable incremento en la secreción de proteínas extracelulares.

3. Objetivos

Objetivo general: Generar y caracterizar mutantes simples independientes de *P. chrysogenum*, en *csmA* o en *chsF*, genes que codifican quitina sintasas implicadas en la síntesis de quitina de la pared celular fúngica, mediante CRISPR/Cas9, con el fin de evaluar su efecto sobre la producción de proteínas extracelulares, en particular de PeAfpA.

- **Objetivo específico 1:** Identificar en *P. chrysogenum* las secuencias homólogas de *csmA* y *chsF* descritas en *A.niger*, y diseñar y construir los vectores CRISPR/Cas9 dirigidos a ambos genes.
- **Objetivo específico 2:** Generar cepas mutantes de *P. chrysogenum* mediante la transformación de protoplastos y verificar las mutaciones introducidas por PCR y secuenciación.
- **Objetivo específico 3:** Evaluar fenotipo de las cepas mutantes y comparar su crecimiento con la cepa WT PCSO12112.
- **Objetivo específico 4:** Cuantificar la producción de proteínas extracelulares totales y la producción específica de PeAfpA en las cepas mutantes.

4. Materiales y métodos

4.1 Secuencias *chsF* y *csmA* de *P. chrysogenum*

Las secuencias de quitina sintasas de *A.niger* se obtuvieron a partir de la base de datos NCBI. Estas secuencias se utilizaron como referencia para la identificación de homólogos en *P. chrysogenum*, mediante búsquedas BLASTx (ADN traducido frente a proteína) en la base de datos MycoCosm (Barthel et al., 2024; Van Den Berg et al., 2008).

Las secuencias genómicas completas de las quitina sintasas de *A. niger* se compararon con las secuencias correspondientes de *P. chrysogenum*. La selección de secuencias homólogas se realizó en base a tres parámetros principales: el e-value, que indica la probabilidad de que la similitud observada en el alineamiento se deba al azar, de modo que valores más próximos a 0 reflejan una mayor significación; el porcentaje de identidad, que expresa la proporción de posiciones idénticas entre ambas secuencias alineadas; y el score de alineamiento, que representa la calidad global del alineamiento, de manera que valores más altos indican una mayor similitud entre las secuencias comparadas.

Posteriormente, las secuencias obtenidas se alinearon mediante el algoritmo ClustalW implementado en MEGA (versión 12), tanto a nivel de nucleótidos como de proteínas. A partir de estos alineamientos, se construyeron árboles filogenéticos utilizando el método de Maximum Likelihood, con el fin de analizar las relaciones evolutivas e identificar las secuencias de interés *chsF* y *csmA*.

4.2 Construcción de guías CRISPR

El diseño de las guías se realizó mediante la plataforma Geneious Prime (versión 11.0.4). Las secuencias diana se seleccionaron de acuerdo con los criterios de diseño proporcionados por el propio software, teniendo en cuenta una longitud de 20 nucleótidos, presencia de secuencias PAM adyacentes, localización en exones y minimización de cortes fuera de diana (off-targets). Las secuencias PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) son motivos cortos de ADN necesarios para el reconocimiento de la región diana por la nucleasa Cas9; en el caso de la Cas9, corresponden a la secuencia 5'-NGG-3', donde N puede ser cualquier nucleótido (Sander & Joung, 2014).

Para cada gen de quitina sintasa *csmA* y *chsF*, se diseñaron dos guías, con el fin de disponer de una alternativa en caso de que alguna de ellas no presentara la eficacia esperada.

Tabla 1. Guías CRISPR/cas9 diseñadas para transformación de *P.chrysogenum*

Primer ID	Uso	Secuencia (5'-3')	organismo	Descripción
OJM1026	F	ATGGTCTCACCGAGTTCACCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAG	*P.chrysogenum*	Construcción gRNA
OJM1027	R	ATGGTCTCTAAACCCGATCAAGGTGGGGTTCACGACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCA	*P.chrysogenum*	Construcción gRNA
OJM1028	F	ATGGTCTCACCGAATATGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAG	*P.chrysogenum*	Construcción gRNA
OJM1029	R	ATGGTCTCTAAACTTGGTCGCTGATGTATATGTGACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCA	*P.chrysogenum*	Construcción gRNA
OJM1030	F	ATGGTCTCACCGAATGGCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAG	*P.chrysogenum*	Construcción gRNA
OJM1031	R	ATGGTCTCTAAACCGTTGTAGTATGTGATGGCAGACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCA	*P.chrysogenum*	Construcción gRNA
OJM1032	F	ATGGTCTCACCGAGGATGGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAG	*P.chrysogenum*	Construcción gRNA
OJM1033	R	ATGGTCTCTAAACTGTTGGGTATCGACGGATGGGACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCA	*P.chrysogenum*	Construcción gRNA

4.3 Generación de cassette de transformación con resistencia terbinafina y cloranfenicol

Las guías para CRISPR diseñadas se clonaron en el plásmido pLM-AMA15.0 (Figura 1) el cual confiere resistencia a cloranfenicol en *Escherichia coli* (25 µg/mL) y a terbinafina en *P. chrysogenum* (25 µg/mL).

Las secuencias guía fueron previamente amplificadas por PCR utilizando el kit NZYTaq (NZYtech) y posteriormente purificadas con el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

El ensamblaje de las guías se llevó a cabo mediante una reacción de restricción-ligación tipo Golden Gate, utilizando los sitios de restricción BsaI (*Thermo Fisher Scientific*) y la ADN ligasa T4 (Promega), con una relación vector: inserto de 1:100. (Engler *et al.*, 2009; Garrigues *et al.*, 2022).

Los plásmidos recombinantes se transformaron en *E.coli* mediante choque térmico. Las células se sembraron en placas de LB suplementado con cloranfenicol (25 µg/mL) e incubaron a 37 °C. Tras el crecimiento de las colonias, la correcta inserción de las guías se confirmó mediante PCR de colonia utilizando NZYTaq (NZYtech), y posteriormente se aislaron los plásmidos utilizando el kit NZYMiniprep (NZYTech) (Garrigues et al., 2022; Ropero Pérez, 2026).

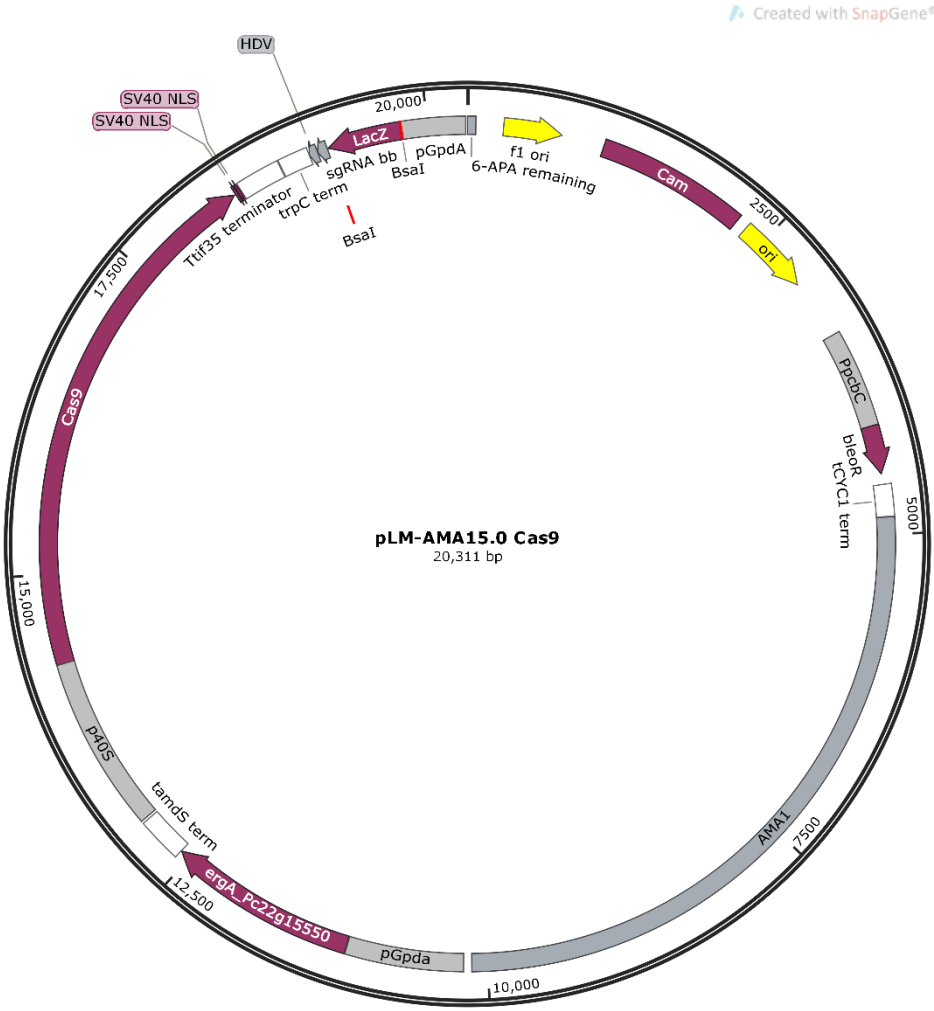


Figura 1. Mapa del plásmido pLM-AMA15.0 Cas9 utilizado para la transformación de protoplastos de *P. chrysogenum*. El vector contiene los elementos necesarios para la edición génica mediante CRISPR/Cas9, incluyendo la nucleasa Cas9, el módulo de sgRNA, la secuencia AMA1 y marcadores de selección bacteriana. Figura adaptada de *(Mózsik et al., 2021)*.

4.4 Generación de protoplastos y transformación fúngica

Los protoplastos de *P. chrysogenum*, es decir, células fúngicas sin pared celular obtenidas por digestión enzimática del micelio, se generaron a partir de una suspensión de 1×10^6 conidios/mL, que se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 2 L con 200 mL de medio de transformación de *Aspergillus* (TM). El cultivo se incubó a 25 °C y 200 rpm durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, el cultivo se filtró a través de Miracloth estéril, el micelio se lavó con 0,6 M $MgSO_4$ y posteriormente se secó.

A continuación, el micelio se resuspendió en tampón PS en una proporción de 6,5 mL de PS por gramo de micelio, junto con el preparado enzimático Vinotaste Pro (Novozymes), empleado a una concentración de 0,5 g de enzima por gramo de micelio, previamente disuelto en 15 mL de

tampón PS. Una vez homogeneizada la mezcla, esta se transfirió a matraces Erlenmeyer de 100 mL y se incubó durante 45 minutos a 30 °C y 80 rpm, con el objetivo de obtener los protoplastos.

Para detener la incubación, las suspensiones se colocaron en hielo y se filtraron de nuevo a través de Miracloth estéril. En frío, se añadió la disolución SC hasta alcanzar un volumen final de 45 mL. Posteriormente, los protoplastos se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm y 4 °C, y se lavaron con 10 mL de solución B. Tras ello, se realizó una nueva centrifugación durante 10 minutos a 2000 rpm y 4 °C. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en solución B hasta obtener una concentración final de 1×10^7 protoplastos/mL.

Para la transformación se utilizaron 200 µL de suspensión de protoplastos, 50 µL de solución C y 3 µg del plásmido CRISPR/Cas9 en cada una de las transformaciones dirigidas a *csmA* y *chsF*. Este procedimiento se realizó de forma independiente para cada una de las quitina sintasas analizadas, incluyendo en cada caso el correspondiente control. Como control, se emplearon protoplastos no transformados, es decir, protoplastos sometidos al mismo procedimiento de obtención y manipulación, pero sin la adición del plásmido CRISPR/Cas9. La mezcla de transformación se incubó en hielo durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 2 mL de disolución C a temperatura ambiente y se incubó durante 5 min en las mismas condiciones. Finalmente, se añadieron 2 mL de disolución B a la suspensión de protoplastos antes de su siembra en medio selectivo.

Finalmente, las suspensiones se sembraron en placas cuadradas con medio mínimo de sacarosa de *Aspergillus* (MMS) suplementado con terbinafina. Como controles, se inocularon protoplastos no transformados en placas selectivas y no selectivas, es decir placas que contenían o no contenían terbinafina. Las placas se incubaron a 30 °C durante 4 - 7 días.

Para la purificación de los transformantes, se realizaron inicialmente dos estrías consecutivas en placas de PDA selectivo, es decir, suplementado con terbinafina, seguidas de otras dos estrías consecutivas en placas de PDA no selectivo es decir, sin terbinafina. Sin embargo, debido a la baja eficacia observada en la edición mediante CRISPR-Cas9, se decidió repetir el procedimiento en un medio en el que las colonias tuvieran un crecimiento más lento. En este caso, se llevaron a cabo dos estrías consecutivas en medio mínimo (MM) selectivo, seguidas de al menos cuatro estrías consecutivas en medio mínimo no selectivo, con el fin de optimizar el proceso de transformación. Finalmente, para confirmar la pérdida del plásmido en los mutantes verificados, estos se sembraron de nuevo en placas selectivas (Garrigues et al., 2022; Ropero Pérez, 2026).

4.5 Comprobación de cepas mutantes

Dado que la aparición de colonias transformantes tras la transformación no garantiza necesariamente la edición correcta del locus diana, fue necesario llevar a cabo una verificación molecular de las cepas candidatas a mutantes. Para ello, se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos para los genes *chsF* y *csmA*, destinados a la amplificación y posterior secuenciación de las regiones genómicas de interés, incluyendo las zonas diana correspondientes a las guías CRISPR empleadas. El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante la herramienta Primer-BLAST de NCBI, seleccionando aquellas secuencias que presentaban las características más adecuadas para la amplificación específica de cada locus.

Tabla 2. Oligos diseñados para la secuenciación por Sanger válidos tanto para guías 1y 2 de *csmA* y las guías 1 y 2 de *chsF*.

Primer ID	Uso	Secuencia (5'-3')	organismo	Descripción
OJM1037	F	CTCGCAAGCCGGTATGAAGA	*P.chrysogenum*	Sequencing
OJM1038	R	GTGGGATGACCGAGATAGCG	*P.chrysogenum*	Sequencing
OJM1039	F	TCCACTCGGCCAATTCTTCT	*P.chrysogenum*	Sequencing
OJM1040	R	TCATCACGCCGTCTTGGAAA	*P.chrysogenum*	Sequencing

Para la extracción de ADN genómico, las posibles cepas mutantes se cultivaron en medio líquido PDB e incubaron durante 3-5 días a 25 °C y 180 rpm. Una vez obtenido suficiente crecimiento micelial, el ADN genómico se extrajo empleando un kit comercial de Jena Bioscience, siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del ADN extraído, se realizaron reacciones de PCR para amplificar las regiones genómicas correspondientes. La correcta amplificación de los fragmentos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa, llevada a cabo a 120 V durante 20 min. Posteriormente, los productos de PCR se purificaron con reactivo ExoSAP antes de ser enviados para su secuenciación por el método de Sanger (Ropero Pérez, 2026).

4.6 Valoración fenotípica

Para la caracterización fenotípica de los mutantes y de la cepa control, se prepararon suspensiones conidiales a partir de cultivos en placas de PDA. Se añadieron 5 mL de agua estéril a cada placa y la biomasa fúngica se recuperó mediante raspado con espátula estéril. Las suspensiones obtenidas se filtraron a través de Miracloth para eliminar fragmentos miceliales. Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 para el recuento de conidios y se ajustó la concentración de cada muestra a 500 conidios por inóculo. Se depositaron 10 µL de cada suspensión en el centro de placas de PDA y MMA, realizando dos réplicas por mutante y por medio de cultivo. El crecimiento de las colonias se evaluó mediante la medición del diámetro colonial y se comparó con el de la cepa control WT PCSO12112.

4.7 Comprobación de producción de proteínas

Con la finalidad de evaluar la producción proteica, los controles, que consistían en la cepa WT PCSO12112 y las cepas mutantes fueron cultivados en diferentes medios de cultivo: medio mínimo de *P. chrysogenum* (PcMM), medio completo de *A. niger* (CM) y medio yeast potato dextrosa (YPD).

Para comparar la producción de proteínas, se realizaron cultivos durante un periodo de entre 5 y 13 días, dependiendo del medio empleado. Cada mutante se cultivó en 25 mL de medio PcMM, en matraces Erlenmeyer de 100 mL, incubados a 30 °C y 200 rpm. Se realizó una réplica biológica por mutante y se recogieron muestras en los días 2, 5, 7 y 13. En el caso de los medios CM e YPD, los cultivos fueron más cortos, recogiéndose muestras en los días 2, 4 y 7, siguiendo la misma metodología de cultivo empleada para PcMM. Las muestras obtenidas se utilizaron posteriormente para los análisis de cuantificación proteica y detección específica de PeAfpA.

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo mediante el método de Bradford. Para ello, se emplearon placas de 96 pocillos, donde se añadieron 20 µL de cada muestra y de los estándares. Las muestras se analizaron por triplicado, mientras que la curva estándar (BSA: 0–1 mg/mL) se realizó por duplicado. Posteriormente, se añadieron 80 µL de reactivo de Bradford (Bio-rad) a cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 595 nm.

Para la detección específica de la proteína AFpA, se realizó un ELISA competitivo. Las placas se recubrieron con 100 µL de proteína PeAfpA purificada previamente en laboratorio diluida en tampón de recubrimiento y se incubaron durante 24 horas. Tras el lavado con buffer, se añadieron 50 µL de muestras, controles y curva de calibración (PBS), junto con 50 µL de anticuerpo anti-PeAfpA (1:100.000). Todas las condiciones se analizaron por triplicado, y las muestras se evaluaron en diluciones seriadas (1:50, 1:100, 1:200 y 1:300).

Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadieron 100 µL del anticuerpo secundario (GAR-HRP), preparado a través del tampón PBST y suero fetal bovino. Tras 30 minutos de incubación, la placa se lavó y se añadieron 100 µL del reactivo enzimático TMB, la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µL de H_2SO_4 1 M. La absorbancia se midió a 405 nm (de Ovalle et al., manuscript in preparation).

4.8 Réplicas y análisis estadístico

En los ensayos de cuantificación de proteínas extracelulares mediante el método de Bradford, se partió de dos réplicas biológicas por condición experimental (cepa WT PCSO12112 y mutante *chsF 5.2*). A partir de cada réplica biológica se realizaron tres réplicas técnicas, y en cada ensayo se incluyó una curva de calibración por duplicado.

En la cuantificación específica de PeAfpA mediante ELISA competitivo, se emplearon las mismas réplicas biológicas que en el ensayo de Bradford. Cada muestra se analizó por triplicado técnico y en cuatro diluciones seriadas (1:50, 1:100, 1:200 y 1:300), incluyendo en cada ensayo una curva de calibración por triplicado.

Para el tratamiento estadístico, se utilizaron las medias de las réplicas técnicas correspondientes a cada réplica biológica, de modo que cada réplica biológica quedó representada por un único valor.

En el ensayo de caracterización fenotípica se emplearon dos réplicas biológicas por cepa y medio de cultivo. El diámetro colonial se comparó entre la cepa control WT y las cepas mutantes de forma independiente para cada día y cada medio ensayado mediante ANOVA de un factor, seguido de comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey.

En los ensayos de producción de proteínas, las comparaciones entre la cepa control WT y el mutante chsF 5.2 se realizaron mediante la prueba t de Student para muestras independientes en cada tiempo de muestreo. En aquellos casos en los que se descartó alguna réplica biológica y no se dispuso de un número suficiente de réplicas válidas, no se realizaron análisis estadísticos inferenciales, y los resultados se interpretaron únicamente de forma descriptiva. En todos los casos, se consideró significación estadística cuando $p < 0,05$.

4.9 Software

Para el análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación de Sanger se utilizó el software SnapGene Viewer, mientras que los alineamientos de secuencias empleados para la comprobación de mutantes se realizaron con CLC Sequence Viewer 8.0. En los ensayos de producción de proteínas y en la caracterización fenotípica, la organización de los datos y la elaboración de tablas y gráficas se llevaron a cabo mediante Microsoft Excel. La lectura y el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA se realizaron con el software SoftMax. Por su parte, el análisis estadístico de los datos se efectuó con el programa Jamovi.

4.10 Declaración de uso de IA

Durante la preparación de este Trabajo Fin de Grado se recurrió a herramientas de inteligencia artificial como apoyo para la revisión de la redacción, la corrección lingüística y la organización de algunos contenidos. La toma de decisiones, el análisis de la información y la elaboración final del trabajo han sido responsabilidad exclusiva del estudiante.

5. Resultados y discusión

5.1 Secuencias de *chsF* y *csmA* de *P. chrysogenum*

Con el fin de identificar en *P. chrysogenum* las secuencias homólogas a los genes de quitina sintasas *csmA* y *chsF* de *A. niger*, se realizaron búsquedas comparativas en mycocosm a partir de las secuencias de referencia obtenidas en NCBI. La selección de las secuencias candidatas se basó en los valores de porcentaje de identidad, *score* y *e-value* obtenidos en los análisis BLASTx, un análisis que se realizó dado que comparar secuencias de ADN traducidas frente a proteínas resulta adecuado para identificar homólogos funcionales entre especies. La secuencia homóloga a *csmA* en *P. chrysogenum* presentó un 77,1 % de identidad proteica, un *score* de 6630 y un *e-value* de 0.0, mientras que la homóloga a *chsF* mostró un 76 % de identidad proteica, un *score* de 3346 y un *e-value* de 0.0. Estos valores indican una elevada similitud entre las secuencias analizadas y apoyan su identificación como las secuencias homólogas a las quitina sintasas de interés.

Con el objetivo de respaldar esta asignación, las secuencias seleccionadas se alinearon y se utilizaron para construir árboles filogenéticos mediante el método de Maximum Likelihood, tanto a nivel de ADN como de proteínas. Como se observa en la (Figuras 2 y 3), tanto en el árbol de proteínas como en el de ADN, las secuencias de *P. chrysogenum* seleccionadas se agruparon próximas a *csmA* y *chsF* de *A. niger*, lo que respalda su identificación como las homólogas más probables. Los parámetros de similitud de secuencia y el análisis filogenético aporta solidez a la selección realizada.

Desde un punto de vista experimental, la correcta identificación de estas secuencias fue fundamental para el desarrollo del trabajo, ya que permitió seleccionar los genes diana para el diseño de las guías CRISPR/Cas9. Además, el hecho de que ambas secuencias mostraran porcentajes de identidad elevados y valores de *e-value* nulos sugiere una conservación significativa, compatible con una posible conservación funcional. Este aspecto resultaba especialmente relevante para el proyecto, ya que la similitud con las secuencias de *A. niger* podría indicar que las homólogas identificadas en *P. chrysogenum* desempeñan funciones similares. En consecuencia, su mutación podría generar efectos fenotípicos comparables, lo que justificó la selección de las homólogas de *csmA* y *chsF* en *P. chrysogenum* para los experimentos posteriores de edición genética.

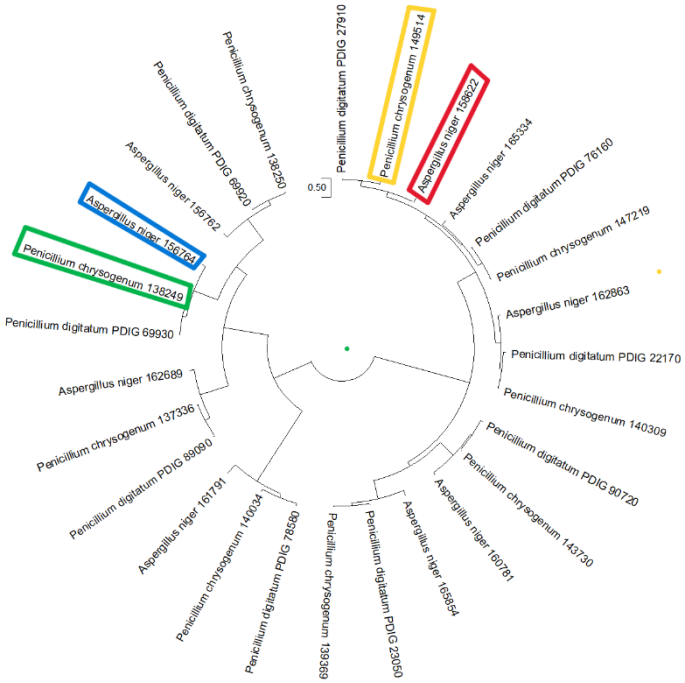


Figura 2. Árbol maximum likelihood de proteinas comparando la totalidad de las quitina sintasas de *A.niger* y *P. chrysogenum* con el objetivo de detectar las secuencias homologas CsmA y ChsF de *A.niger*. Marcada en rojo la secuencia de ChsF y en amarillo su homóloga en *P.chrysogenum*, Marcada en azul la secuencia CsmA y en verde su homóloga *P.chrysogenum*.

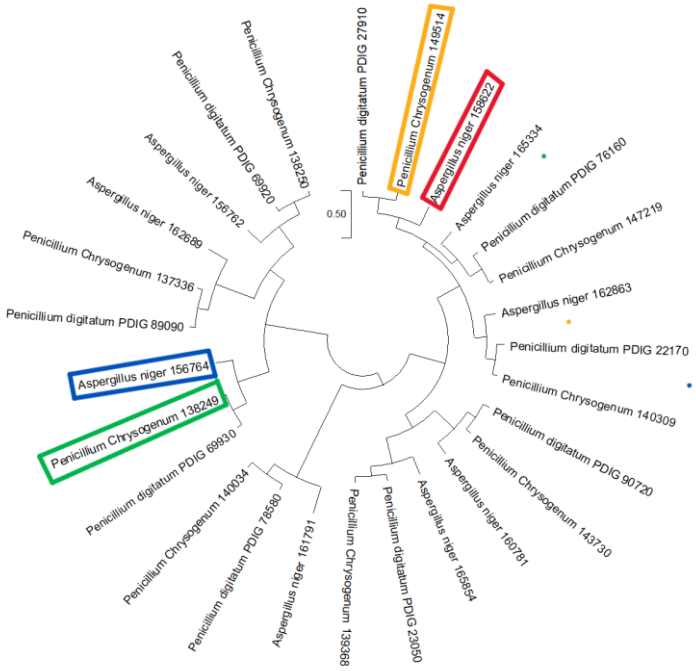


Figura 3. Árbol maximum likelihood de DNA comparando la totalidad de las quitina sintasas de *A.niger* y *P. chrysogenum* con el objetivo de detectar las secuencias homologas *csmA* y *chsF* de *A.niger*, en *P.chrysogenum*. Marcada en rojo la secuencia de *chsF* y en amarillo su homóloga en *P.chrysogenum*, Marcada en azul la secuencia *csmA* y en verde su homóloga *P.chrysogenum*.

5.2 Generación del Cassette de transformación con resistencia a terbinafina y cloranfenicol

Para comprobar la correcta inserción de las guías CRISPR en el plásmido pLM-AMA15.0 (Mózsik et al., 2021), se realizó una PCR de colonia de los transformantes obtenidos. Como control negativo se utilizó agua, mientras que como control positivo se empleó el plásmido sin el inserto. Las construcciones correspondientes a *chsF* guía 1, *csmA* guía 1, *csmA* guía 2 y *chsF* guía 2 mostraron un patrón de amplificación compatible con la presencia del inserto en comparación con los controles, lo que indicó que las guías habían sido introducidas en el plásmido de interés (Figura 4). Cabe señalar que la construcción *chsF* guía 1 presentó una banda de menor intensidad que el resto, lo que podría deberse a una menor cantidad de ADN plasmídico en la muestra o a una menor eficiencia de amplificación. En conjunto, estos resultados confirmaron que el ensamblaje de las guías en el plásmido PLM-AMA15.0 (Mózsik et al., 2021) se habían llevado a cabo de forma satisfactoria, permitiendo identificar que colonias bacterianas contenían las construcciones plasmídicas recombinantes. La obtención de estos plásmidos constituyó un paso fundamental para continuar con el procedimiento experimental, ya que permitió su posterior aislamiento plasmídico y su empleo en los ensayos de transformación de protoplastos en *P.chrysogenum*. De este modo, la verificación de las construcciones aseguró que las transformaciones fúngicas se realizaran con los vectores adecuados para dirigir la edición a los loci *csmA* y *chsF* mediante el sistema CRISPR/Cas9.

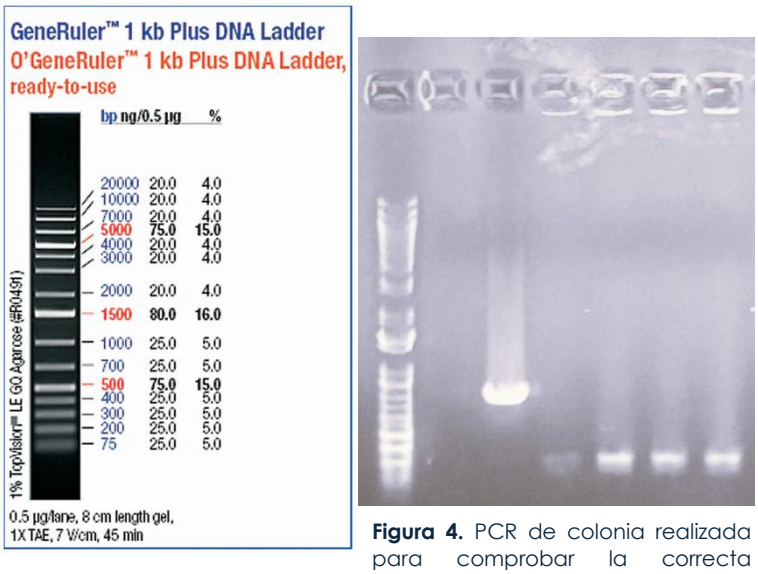


Figura 4. PCR de colonia realizada para comprobar la correcta inserción de las guías CRISPR en el plásmido *pLM-AMA15.0*. Carriles: 1, marcador de peso molecular; 2, control negativo; 3, control con plásmido sin insertar; 4, *chsF* guía 1; 5, *csmA* guía 1; 6, *csmA* guía 2; 7, *chsF* guía 2.

5.3 Generación de protoplastos y transformación fúngica

Tras la transformación de protoplastos de *P. chrysogenum* con el plásmido CRISPR/Cas9, las suspensiones se sembraron en medio MMSA suplementado con terbinafina para la selección de transformantes. Como se observa en la Figura 5, la placa correspondiente al control positivo, constituida por protoplastos no transformados sembrados en medio no selectivo, es decir, sin terbinafina, mostró un crecimiento confluente. Esto indica que los protoplastos conservaron su viabilidad tras el procedimiento de obtención y manipulación.

En las placas selectivas de transformación, que contenían terbinafina y en las que se sembraron protoplastos transformados con los plásmidos de interés, se observaron colonias aisladas compatibles con transformantes resistentes. Por el contrario, en el control negativo, constituido por protoplastos no transformados sembrados en medio selectivo, no se detectó crecimiento apreciable. Estos resultados confirman que la selección fue efectiva y que las colonias obtenidas tras la transformación se debieron a la incorporación del plásmido (Garrigues et al., 2022).

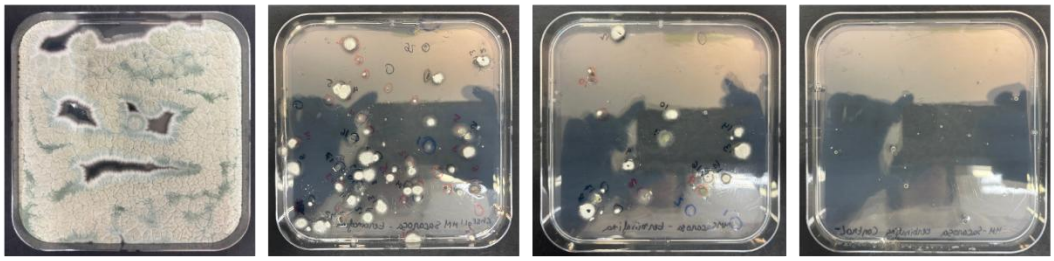


Figura 5. Placa de transformación en MMSA suplementado con terbinafina con crecimiento de los hongos transformantes.

5.4 Comprobación de cepas mutantes

La obtención de colonias transformantes en medio selectivo no permite confirmar por sí sola la presencia de mutantes, por lo que fue necesario llevar a cabo una verificación molecular mediante secuenciación Sanger. Esta técnica permitió determinar si las colonias analizadas presentaban mutaciones en el locus diana.

Tal y como se indicó en la metodología, en una primera aproximación los pases de purificación se realizaron en medio PDA, tanto selectivo como no selectivo. Tras este procedimiento, se enviaron a secuenciar DNA genómico de 13 mutantes en el gen *csmA* y 10 mutantes en el gen *chsF*, Los resultados de secuenciación mostraron que ninguno de los potenciales mutantes *csmA* era correcto, mientras que para *chsF*, solo el mutante 5.2, presentó la mutación esperada. En este caso, la proporción de mutantes obtenidos para *chsF* fue cercana al 10 % (Garrigues et al., 2022; Ropero Pérez, 2026), un valor compatible con eficiencias previamente descritas para sistemas CRISPR/Cas9 similares. Sin embargo, en *csmA* no se obtuvo ningún mutante confirmado.

Ante estos resultados, se decidió modificar el procedimiento de purificación de transformantes y sustituir los pases en PDA por pases en MMA, una estrategia que ya había sido empleada previamente en *P. digitatum* y que se asoció con una mejora en la recuperación de mutantes editados (Ropero Pérez, 2026). Tras este cambio, se secuenció 7 mutantes de *chsF*, de las cuales 5 presentaron la mutación esperada. En el caso de *csmA*, únicamente pudieron analizarse 2 mutantes más, debido a la baja cantidad de DNA obtenido y a la falta de amplificación del DNA genómico en las PCR realizadas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el uso de MMA durante los pases de purificación podría favorecer la recuperación de transformantes editados, posiblemente debido a que un crecimiento más lento facilite la acción del sistema CRISPR/Cas9. No obstante, esta hipótesis requeriría estudios adicionales, incluyendo el análisis de un mayor número de transformantes, la realización de más réplicas biológicas independientes y la comparación controlada entre pases en PDA y MMA. Las mutaciones detectadas en el locus *chsF* fueron, en general, las esperadas (Figura 6). De forma llamativa, todas las cepas mutantes analizadas presentaron exactamente la misma modificación, consistente en la inserción de un nucleótido de adenina en un sitio específico de la secuencia. La única excepción fue la cepa mutante 24.2.1, que además de esta inserción presentaba una deleción adicional de tres nucleótidos. En cuanto a la proteína *CsmA*, la ausencia de mutantes confirmados no permite concluir de forma definitiva que la guía utilizada sea ineficaz, ya que el número de muestras analizadas fue limitado. Por ello, serían necesarios ensayos adicionales, incluyendo el análisis de más colonias y la evaluación de guías alternativas, para determinar si la falta de mutantes en este locus se debe a una baja eficiencia de edición o a otros factores experimentales.

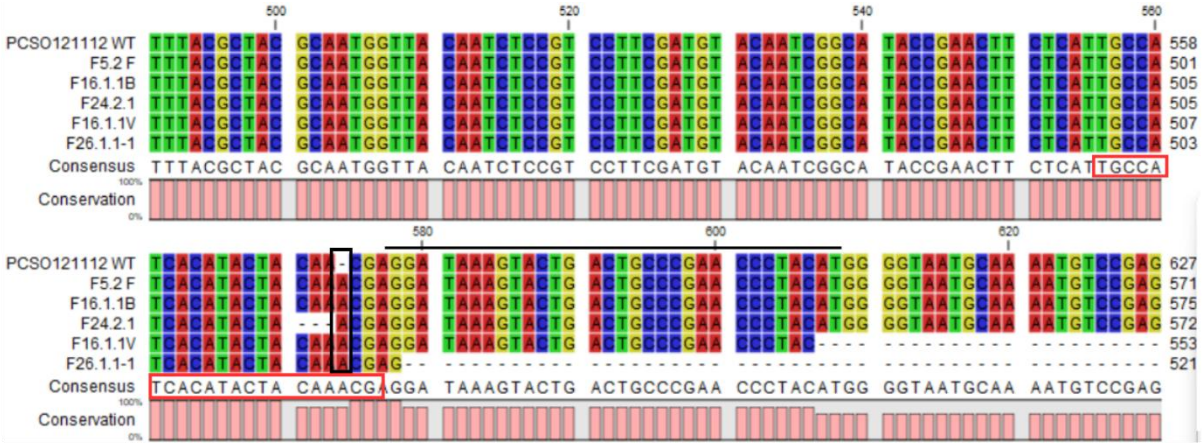


Figura 6. Alineamiento de secuencias obtenidas a partir de las cepas mutantes frente a la *WT* PCSO12112. La región reconocida por la guía se indica en rojo. El recuadrado en negro señala la inserción de adenina detectada en las cepas mutantes, compatible con la reparación por NHEJ tras el corte inducido por Cas9.

5.5 Valoración fenotípica

Tal y como se describe en la metodología, la purificación de las cepas transformantes se realizó inicialmente mediante pases sucesivos en medio PDA y, posteriormente, se ensayó el uso de MMA con el fin de evaluar si este medio podía favorecer la recuperación de mutantes editados por CRISPR/Cas9. Como consecuencia, la verificación molecular de las cepas se llevó a cabo en dos tandas: una primera a partir del ADN extraído de colonias procedentes de pases en PDA y una segunda a partir del ADN obtenido de colonias purificadas mediante pases en MMA.

Durante los pases de purificación en MMA, se observó que algunas colonias mantenían una coloración blanquecina, mientras que, de forma habitual, las colonias de *P. chrysogenum* adquieren una tonalidad verdosa tras la esporulación. Esta observación llevó inicialmente a plantear que dicho fenotipo podría estar asociado a la presencia de mutaciones generadas por el sistema CRISPR/Cas9. Sin embargo, esta hipótesis no se confirmó de forma consistente, ya que el primer mutante validado por secuenciación presentó un fenotipo muy similar al de la cepa control WT PCSO12112. Posteriormente, al secuenciar una segunda tanda de cepas, concretamente *chsF* 16.1.1B, *chsF* 16.1.1V, *chsF* 16.2.1B, *chsF* 24.2.1 y *chsF* 26.1.1, se comprobó que algunas colonias con aspecto blanquecino también correspondían a mutantes editados (Figura 7). No obstante, la comparación de las secuencias no mostró diferencias claras en el tipo de edición detectada entre los mutantes procedentes de colonias blanquecinas y aquellos obtenidos a partir de colonias con fenotipo similar al de la WT. En conjunto, estos

resultados sugieren que la coloración observada durante los pases no puede considerarse, por sí sola, un marcador fiable de la presencia de la mutación.

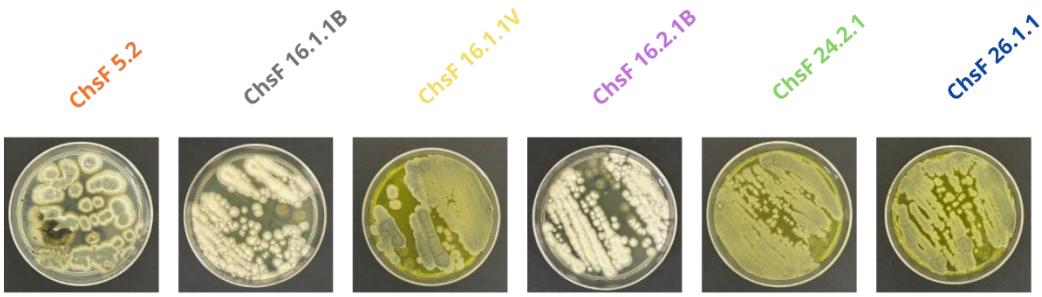


Figura 7. Colonias de las cepas mutantes de *chsF* obtenidas tras el proceso de purificación. La cepa *chsF* 5.2 corresponde a un mutante aislado tras pases en PDA, mientras que el resto de las cepas mostradas (*chsF* 16.1.1B, *chsF* 16.1.1V, *chsF* 16.2.1B, *chsF* 24.2.1 y *chsF* 26.1.1) proceden de pases sucesivos en MMA.

Con el fin de evaluar si las cepas mutantes presentaban alteraciones fenotípicas más allá de esta observación inicial, se realizó un ensayo de caracterización fenotípica estandarizado mediante la inoculación de 500 conidios por placa en medios PDA y MMA, y el crecimiento de las colonias se siguió durante los días 4, 5 y 6 mediante la medición del diámetro colonial (Figura 8).

En PDA, la evolución del crecimiento fue muy similar entre la cepa control y las cepas mutantes a lo largo de todo el ensayo (Figura 9). Esta observación quedó respaldada por el análisis estadístico, ya que las comparaciones múltiples entre la WT y cada una de las cepas mutantes no revelaron diferencias significativas en ninguno de los días analizados (Tabla 3). En conjunto, estos resultados indican que, en este medio, el crecimiento radial de las cepas mutantes fue comparable al de la cepa control.

En MMA, el patrón general de crecimiento también mostró un aumento progresivo del diámetro colonial en todas las cepas analizadas a lo largo del experimento (Figura 10). Sin embargo, a diferencia de lo observado en PDA, las comparaciones estadísticas indicaron que en el día 6 la cepa *chsF* 5.2 presentó una diferencia significativa con respecto a la WT ($p = 0{,}011$), mientras que en los días 4 y 5 no se detectaron diferencias significativas entre la cepa control y ninguna de las cepas mutantes (Tabla 4). Además, las cepas 16.2.1B y 26.1.1 mostraron en el día 6 valores próximos al umbral de significación ($p = 0{,}059$), aunque sin alcanzar significación estadística (Tabla 4). No obstante, esta diferencia significativa debe interpretarse con cautela, ya que el análisis se basó únicamente en dos réplicas biológicas por cepa, un número reducido que limita la solidez de las conclusiones y no permite considerar estos resultados como completamente concluyentes.

En conjunto, los resultados indican que las mutaciones analizadas no provocaron alteraciones fenotípicas generalizadas y claramente reproducibles en el crecimiento colonial bajo las condiciones estudiadas. En PDA, todas las cepas mutantes mostraron un crecimiento comparable al de la WT durante todo el ensayo, mientras que en MMA únicamente la cepa *chsF* 5.2 presentó una diferencia significativa en el día 6, aunque este resultado debe valorarse con prudencia debido al bajo número de réplicas biológicas. Aunque algunas colonias presentaron una coloración más blanquecina que la observada habitualmente en la cepa control (Figuras 7 y 8), este rasgo no mostró una relación consistente con la presencia de la mutación ni con un tipo concreto de edición. Por ello, la coloración de la colonia no puede considerarse, por sí sola, un indicador fiable de mutación. Para aclarar si este fenotipo está realmente relacionado con la modificación genética introducida, serían necesarios análisis adicionales, como la secuenciación completa del genoma de las cepas mutantes.

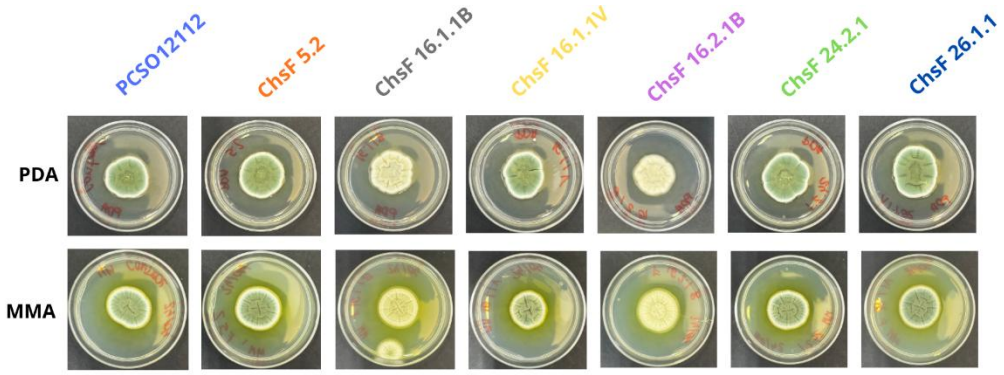


Figura 8. Crecimientos de las diferentes cepas mutantes en comparación con la cepa WT PCSO12112, en 2 medios de cultivo PDA y MMA tras 6 días de incubación.

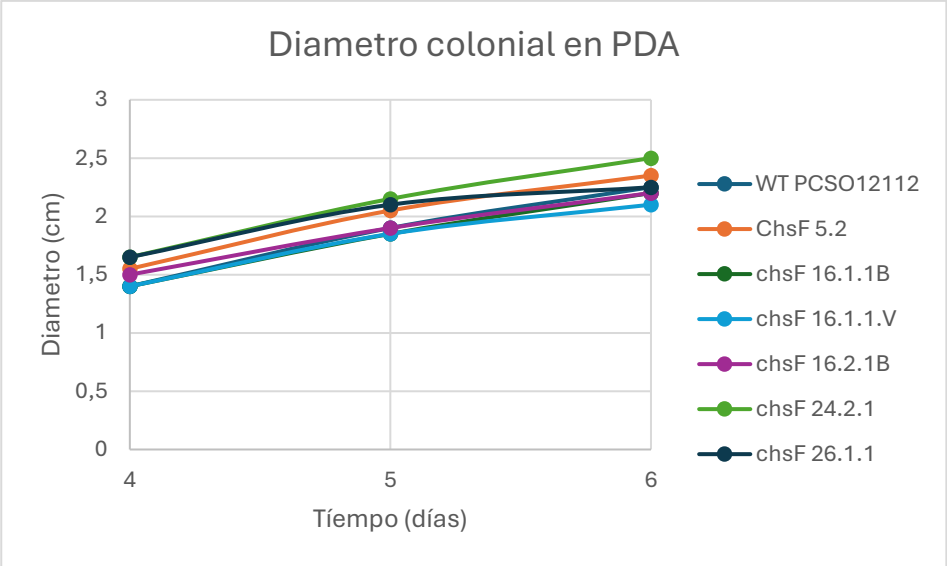


Figura 9. Evolución del diámetro colonial de la cepa control *WT* PCSO12112 y de las cepas mutantes crecidas en medio PDA durante los días 4, 5 y 6 de cultivo.

Tabla 3. Valores de p de las comparaciones múltiples (Tukey) entre la cepa control WT PCSO12112 y las cepas mutantes en medio PDA durante los días 4, 5 y 6 de cultivo.

Comparación	Día 4 p (Tukey)	Día 5 p (Tukey)	Día 6 p (Tukey)
WT vs 16.2.1B	0,900	1,000	0,999
WT vs 24.2.1	0,196	0,601	0,509
WT vs 26.1.1	0,196	0,781	1,000
WT vs chsF_16.1.1B	1,000	1,000	0,999
WT vs chsF_16.1.1V	1,000	1,000	0,886
WT vs chsF_5.2	0,640	0,922	0,980

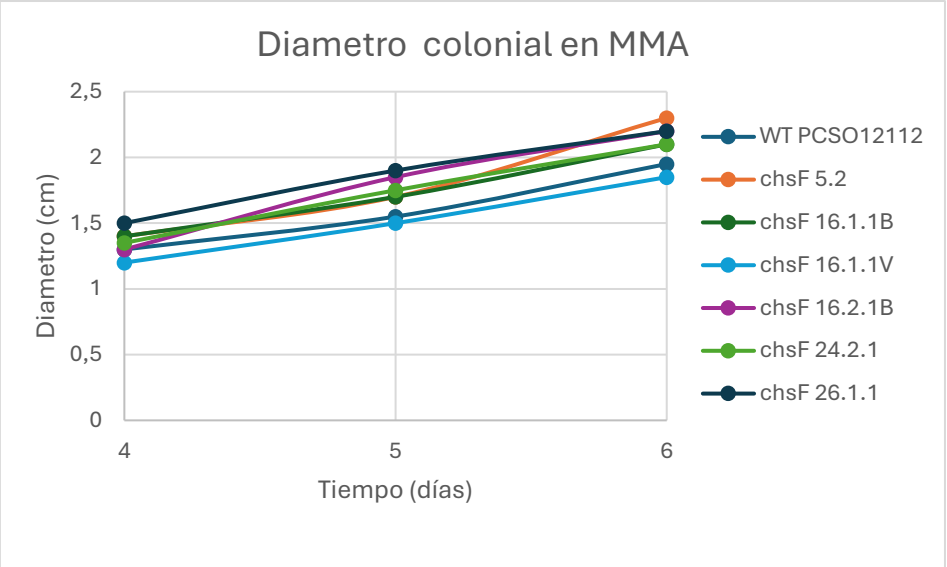


Figura 10. Evolución del diámetro colonial de la cepa control WT PCSO12112 y de las cepas mutantes crecidas en medio MMA durante los días 4, 5 y 6 de cultivo.

Tabla 4. Valores de p de las comparaciones múltiples (Tukey) entre la cepa control WT PCSO12112 y las cepas mutantes en medio MMA durante los días 4, 5 y 6 de cultivo.

Comparación	Día 4 p (Tukey)	Día 5 p (Tukey)	Día 6 p (Tukey)
WT vs 16.2.1B	1,000	0,412	0,059
WT vs 24.2.1	0,993	0,769	0,358
WT vs 26.1.1	0,286	0,278	0,059
WT vs chsF_16.1.1B	0,856	0,916	0,358
WT vs chsF_16.1.1V	0,856	1,000	0,725
WT vs chsF_5.2	0,856	0,916	0,011

5.6 Evaluación de la producción de proteínas

Debido a limitaciones de tiempo, el ensayo de producción proteica se llevó a cabo únicamente con el primer mutante confirmado, *chsF* 5.2, comparándolo con la cepa control WT PCSO12112. Para evaluar su comportamiento, se analizaron tanto la proteína total secretada al medio mediante el método de Bradford como la producción específica de PeAfpA mediante ensayo ELISA competitivo, utilizando como medio de cultivo PcMM, que es el empleado convencionalmente para la producción de PeAfpA. Como análisis complementario, los sobrenadantes de cultivo también se evaluaron mediante SDS-PAGE.

En primer lugar, el análisis por SDS-PAGE mostró una acumulación progresiva de proteínas extracelulares en ambas cepas a lo largo del cultivo, especialmente en los días 5 y 7, observándose perfiles proteicos globalmente similares entre la WT y el mutante (Figura 11). Aunque este análisis no permitió identificar diferencias evidentes entre ambas cepas ni tampoco una banda inequívoca atribuible a PeAfpA, sí puso de manifiesto un incremento general de la proteína extracelular en los sobrenadantes conforme avanzó el cultivo.

Esta tendencia fue coherente con la cuantificación de proteína total mediante Bradford, que mostró que ambas cepas incrementaron su producción extracelular a lo largo del cultivo en PcMM

(Figura 12). En el día 5, la producción proteica del mutante fue superior a la observada en la WT, mientras que en el día 7 ambas cepas presentaron valores similares, con valor ligeramente superior en la WT. Finalmente, en el día 13, la cepa mutante volvió a mostrar una concentración proteica ligeramente superior. Sin embargo, las comparaciones estadísticas entre ambas cepas realizadas de forma independiente para cada día de cultivo mediante t de Student no revelaron diferencias significativas en ninguno de los tiempos analizados (día 2: $p = 0,423$; día 5: $p = 0,264$; día 7: $p = 0,441$; día 13: $p = 0,398$) (Tabla 5). En conjunto, estos resultados indican que la mutación en *chsF* no comprometió la secreción global de proteínas y tampoco produjo cambios significativos en este parámetro bajo las condiciones ensayadas.

En cuanto a la producción específica de PeAfpA, el análisis por ELISA competitivo mostró un comportamiento diferente entre ambas cepas (Figura 13). Aunque en el día 5 los valores fueron similares, a partir del día 7 la cepa control presentó valores de PeAfpA superiores a los del mutante, tendencia que se mantuvo hasta el final del cultivo. En el día 13, la concentración observada en la WT fue mayor que la detectada en el mutante *chsF 5.2* Cabe señalar que, aunque PeAfpA presenta un peso molecular aproximado de 6 kDa, el análisis por SDS-PAGE no permitió identificar de forma inequívoca una banda diferencial atribuible a esta proteína (Figura 11), lo que refuerza la utilidad del ELISA como técnica más sensible para su detección específica.

Con el fin de evaluar la proporción de PeAfpA dentro de la proteína extracelular total producida por cada cepa, se calculó la ratio PeAfpA/proteína total (Figura 14; Tabla 6). Este análisis mostró que en el día 5 el mutante *chsF 5.2* presentó un valor ligeramente superior al de la WT, mientras que en los días 7 y 13 la cepa control mostró ratios más elevados. Sin embargo, dado que no se dispuso de suficientes réplicas biológicas válidas, estos resultados solo pueden interpretarse de forma descriptiva.

En conjunto, los resultados obtenidos en PcMM indican que la mutación en *chsF* no altera significativamente la producción total de proteínas extracelulares y, al mismo tiempo, no permiten establecer conclusiones firmes sobre su efecto en la producción específica de PeAfpA. Por ello, aunque la cepa mutante mantiene una buena capacidad secretora general, será necesario ampliar el análisis con un mayor número de réplicas biológicas y de mutantes independientes para determinar con mayor solidez el impacto de esta modificación genética sobre la producción de la proteína de interés.

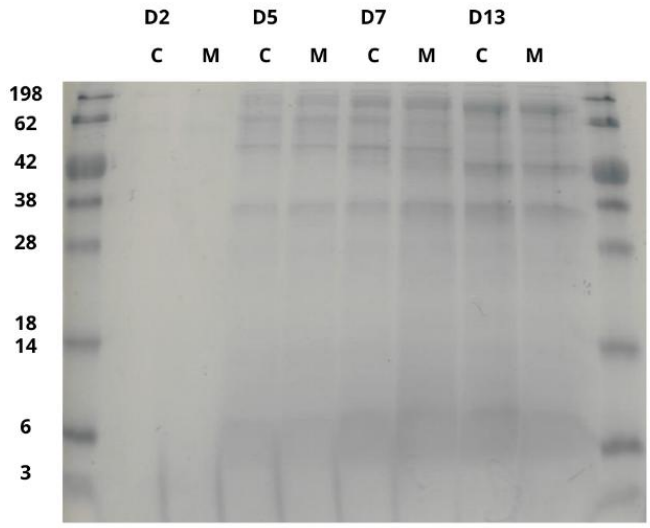


Figura 11. Análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo de la cepa control WT PCSO12112 (C) y del mutante *chsF* 5.2 (M) en medio PcMM, correspondientes a los días 2. 5, 7 y 13 de cultivo.

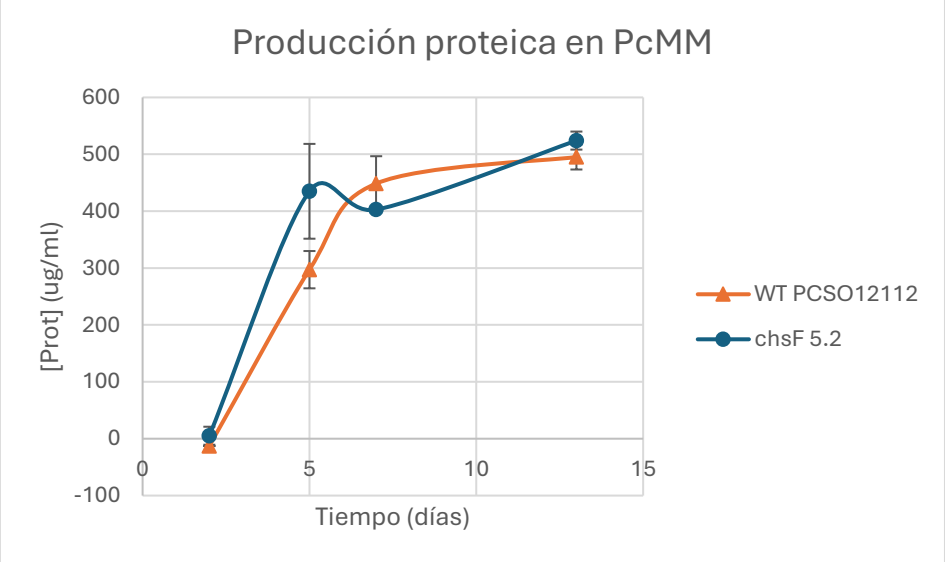


Figura 12. Producción total de proteínas de la cepa control WT PCSO12112 y del mutante *chsF* 5.2 cultivados en PcMM, determinada mediante el método de Bradford.

Tabla 5. Resultados de la prueba t de Student para muestras independientes para la producción de proteínas extracelulares en medio PcMM, determinada mediante el método de Bradford, en la cepa WT PCSO12112 y el mutante *chsF* 5.2.

Día	p-valor
2	0,423
5	0,264
7	0,441
13	0,398

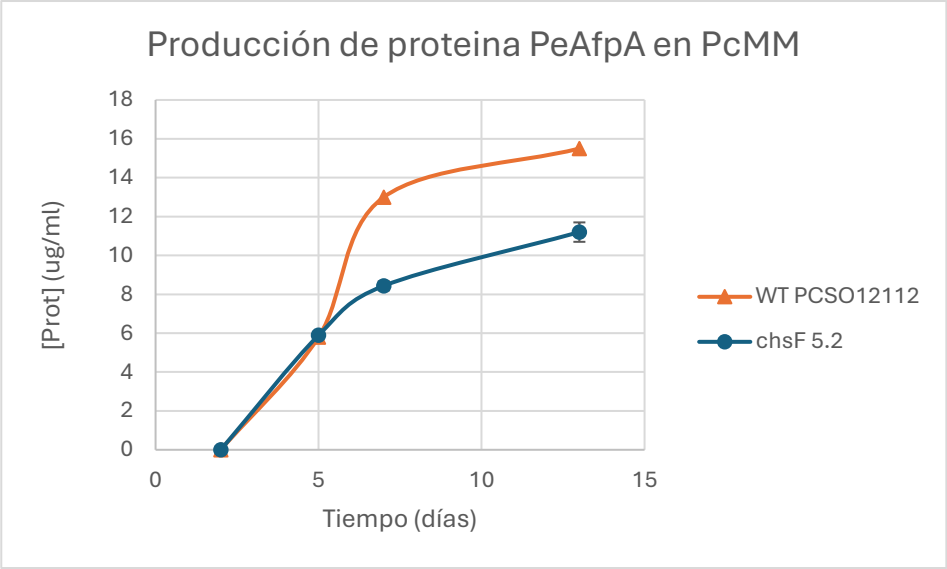


Figura 13. Producción específica de PeAfpA de la cepa control WT PCSO12112 y del mutante *chsF* 5.2 en medio PcMM, cuantificada mediante ELISA competitivo

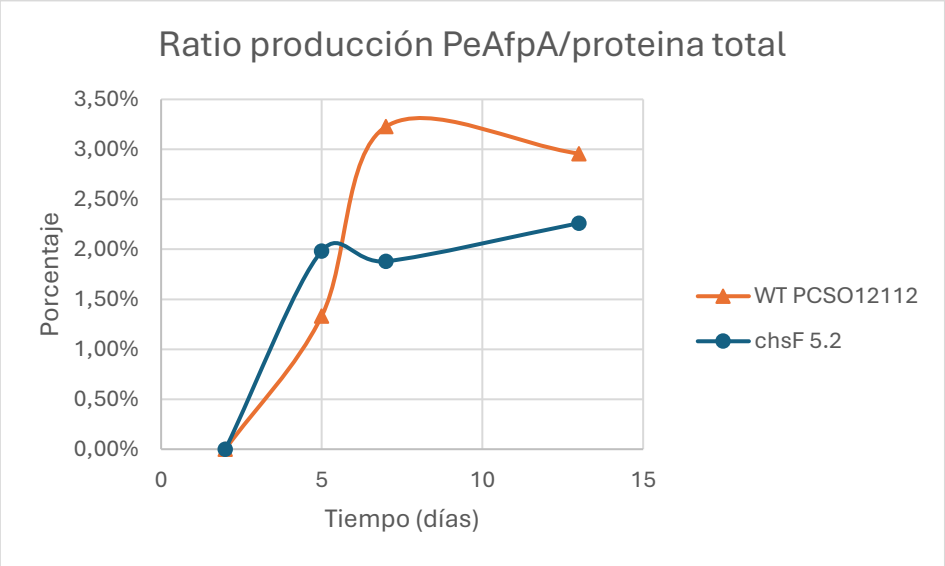


Figura 14. Evolución del ratio PeAfpA/proteína total en la cepa control WT PCSO12112 y en el mutante *chsF* 5.2 cultivados en medio PcMM. El ratio se calculó a partir de los valores obtenidos por ELISA competitivo y Bradford, y se expresó en porcentaje.

Tabla 6. Ratio entre la producción específica de PeAfpA y la proteína extracelular total en la cepa control WT PCSO12112 y el mutante *chsF* 5.2 cultivados en PcMM.

Día de cultivo	WT PCSO12112 (%)	chsF 5.2 (%)
2	0,00	0,00
5	1,33	1,98
7	3,23	1,88
13	2,96	2,26

A partir de los resultados obtenidos en PcMM, se decidió evaluar otros medios de cultivo con el fin de comprobar si podían favorecer una mayor producción de PeAfpA. Para ello, se seleccionó el medio YPD, ya que había sido utilizado previamente en estudios del grupo como un medio adecuado para la producción de esta proteína, así como el medio CM, empleado en el trabajo de referencia en el que se basa este estudio (Barthel et al., 2024).

En el caso del medio YPD, el análisis de los sobrenadantes mediante SDS-PAGE mostró una acumulación progresiva de proteínas extracelulares en ambas cepas a lo largo del cultivo, especialmente en los días 4 y 7, con perfiles proteicos globalmente similares entre la cepa control WT PCSO121112 y el mutante *chsF* 5.2 (Figura 15). No obstante, el gel no permitió identificar diferencias claras y consistentes entre ambas cepas ni tampoco una banda inequívoca atribuible a PeAfpA, lo que pone de manifiesto la necesidad de recurrir a técnicas más sensibles y específicas para evaluar la producción de esta proteína.

La cuantificación de proteína total mediante Bradford mostró diferencias en la dinámica de producción entre ambas cepas (Figura 16). En los primeros tiempos de cultivo, concretamente en los días 2 y 4, el mutante presentó concentraciones de proteína total superiores a las observadas en la WT. Sin embargo, en el día 7, la cepa control alcanzó valores más elevados, mientras que en el mutante se observó una estabilización o ligero descenso de la producción. No obstante, las comparaciones estadísticas entre ambas cepas realizadas de forma independiente para cada día de cultivo mediante t de Student no revelaron diferencias significativas en ninguno de los tiempos analizados (día 2: $p = 0{,}209$; día 4: $p = 0{,}229$; día 7: $p = 0{,}188$) (Tabla 7). En conjunto, estos resultados indican que en YPD la mutación en *chsF* no alteró significativamente la producción total de proteínas extracelulares, aunque sí parece modificar de forma descriptiva su cinética a lo largo del cultivo.

En cuanto a la producción específica de PeAfpA, el análisis por ELISA competitivo mostró un comportamiento relativamente similar entre ambas cepas (Figura 17). Tanto el mutante como el control incrementaron la producción de PeAfpA entre los días 2 y 4, alcanzando valores máximos en torno a los días 4–7. Sin embargo, las diferencias observadas entre ambas cepas fueron reducidas y, además, se detectó variabilidad entre las muestras. A ello se suma que una de las réplicas biológicas correspondientes al mutante tuvo que ser descartada, por lo que no se dispuso de un número suficiente de réplicas biológicas válidas para realizar un análisis estadístico robusto. En consecuencia, estos resultados solo pueden interpretarse de forma descriptiva y no permiten afirmar de forma concluyente la existencia de diferencias reales en la producción específica de PeAfpA entre la WT y el mutante en este medio.

Con el fin de valorar la producción relativa de PeAfpA respecto a la proteína extracelular total, se calculó además el ratio entre la concentración de PeAfpA determinada por ELISA y la proteína total cuantificada mediante Bradford (Figura 18; Tabla 8). Este cociente mostró que la cepa control presentó una ratio superior al del mutante en los días 2 y 4, mientras que en el día 7 el mutante alcanzó un valor más alto. Estos resultados sugieren que, aunque la secreción total de proteínas y la producción específica de PeAfpA fueron globalmente comparables entre ambas cepas, la proporción relativa de PeAfpA con respecto a la proteína total varió a lo largo del cultivo y no siguió una tendencia claramente favorable para ninguna de las dos cepas. No obstante, este análisis debe interpretarse exclusivamente de forma descriptiva, ya que se calculó a partir de datos para los que no se dispuso de un número suficiente de réplicas biológicas válidas como para realizar un análisis estadístico inferencial.

En conjunto, los resultados obtenidos en YPD indican que el perfil temporal de producción proteica en este medio es diferente del observado en PcMM, probablemente como consecuencia de la distinta composición nutricional de ambos medios. No obstante, estos resultados no permiten concluir de forma clara que la mutación en *chsF* mejore la producción específica de PeAfpA. Por ello, sería necesario ampliar el análisis con un mayor número de réplicas biológicas

y mutantes independientes para determinar si las tendencias observadas responden a un efecto biológico real o a la variabilidad propia del sistema.

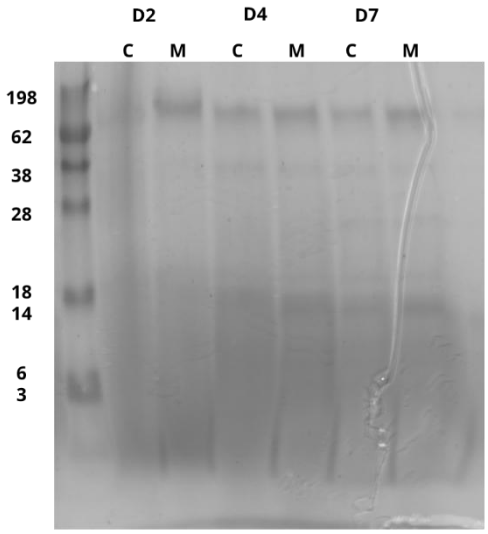


Figura 15. Análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo de la cepa control WT PCSO12112 (C) y del mutante *chsF 5.2* (M) en medio YPD, correspondientes a los días 2, 4 y 7 de cultivo.

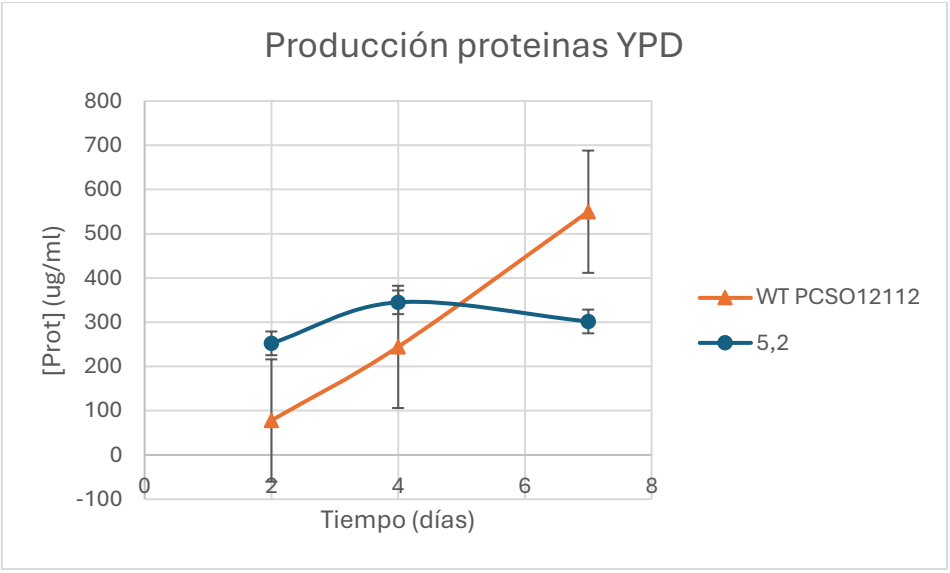


Figura 16. Producción total de proteínas de la cepa control WT PCSO12112 y del mutante *chsF 5.2* cultivados en YPD, determinada mediante el método de Bradford.

Tabla 7. Resultados de la prueba t de Student para muestras independientes para la producción de proteínas extracelulares en medio YPD, determinada mediante el método de Bradford, en la cepa WT PCSO12112 y el mutante *chsF 5.2*.

Día	p-valor
2	0,209
4	0,229
7	0,188

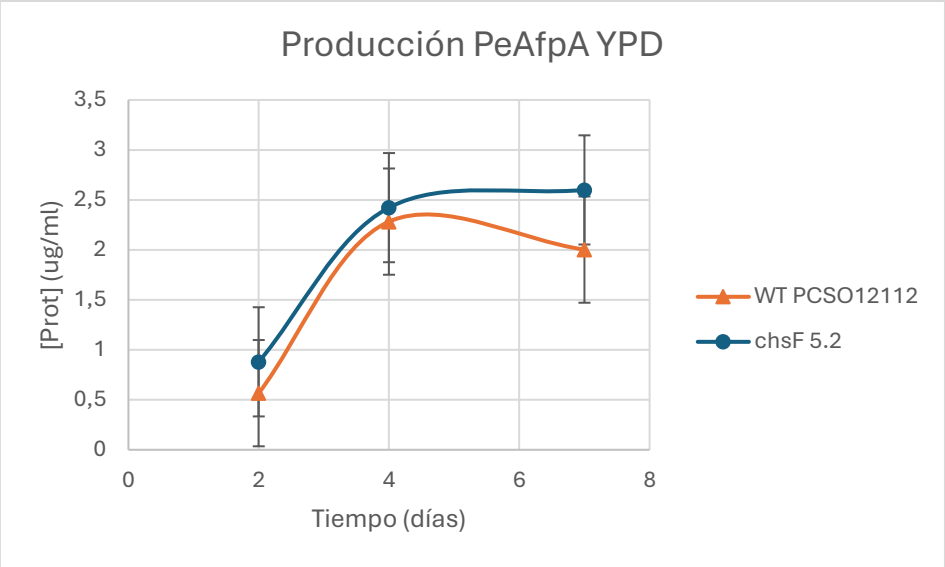


Figura 17. Producción específica de PeAfpA de la cepa control WT PCSO12112 y del mutante *chsF* 5.2 en medio YPD, cuantificada mediante ELISA competitivo.

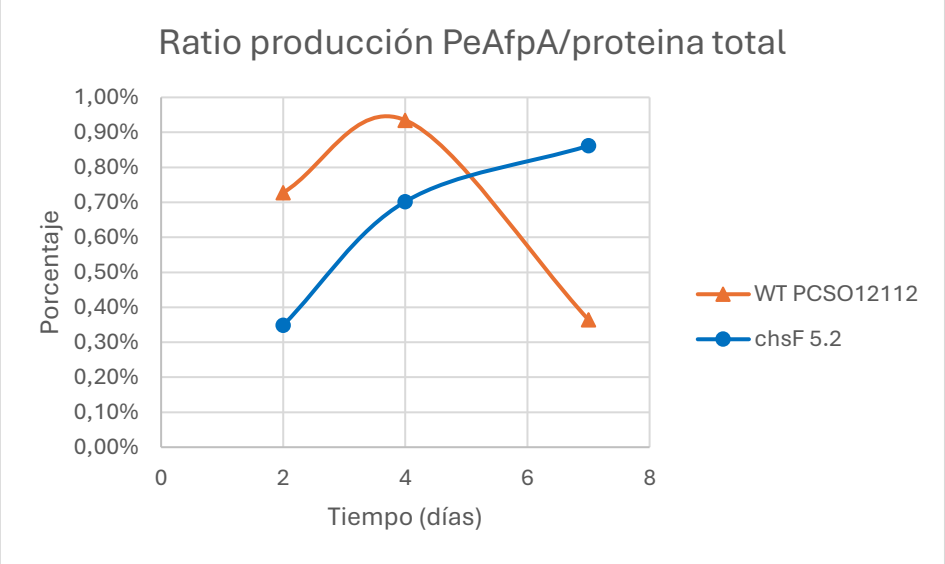


Figura 18. Evolución del ratio PeAfpA/proteína total en la cepa control WT PCSO12112 y en el mutante *chsF* 5.2 cultivados en medio YPD. El ratio se calculó a partir de los valores obtenidos por ELISA competitivo y Bradford, y se expresó en porcentaje.

Tabla 8. Ratio entre la producción específica de PeAfpA y la proteína extracelular total en la cepa control WT PCSO12112 y el mutante *chsF* 5.2 cultivados en YPD.

Día de cultivo	WT PCSO121112 (%)	chsF 5.2 (%)
2	0,73	0,35
4	0,93	0,70
7	0,36	0,86

Con el fin de evaluar si el medio CM, empleado en el trabajo de referencia de (Barthel et al., 2024), podía favorecer la producción proteica en la cepa mutante *chsF* 5.2, se analizaron los sobrenadantes de cultivo mediante SDS-PAGE y la producción específica de PeAfpA mediante ELISA competitivo. En primer lugar, el análisis por SDS-PAGE mostró perfiles proteicos muy tenues y con escasa definición a lo largo del cultivo, observándose únicamente bandas débiles en ambas cepas (Figura 19). Esta observación sugirió que la cantidad total de proteína extracelular presente en los sobrenadantes era muy baja. Por este motivo, no se consideró adecuado realizar su cuantificación mediante Bradford, ya que, debido a su menor sensibilidad, en estas condiciones probablemente no se detectarían proteínas de forma fiable.

Al analizar específicamente la producción de PeAfpA mediante ELISA competitivo, se observó un comportamiento diferente entre ambas cepas (Figura 20). La cepa control mantuvo niveles bajos y relativamente estables a lo largo del cultivo, mientras que el mutante *chsF* 5.2 mostró un incremento más acusado, especialmente a partir del día 4, alcanzando los valores más altos en el día 7. No obstante, esta aparente diferencia debe interpretarse con cautela. La comparación entre la cepa control y el mutante en cada día de cultivo mediante la prueba t de Student no detectó diferencias significativas en ninguno de los tiempos analizados (día 2: $p = 0,426$; día 4: $p = 0,184$; día 7: $p = 0,293$) (Tabla 9). Por tanto, los datos obtenidos no permiten afirmar que exista una mejora significativa en la producción específica de PeAfpA asociada a la mutación en *chsF* en este medio.

Además, en este medio no fue posible calcular el ratio entre la producción de PeAfpA y la proteína extracelular total, ya que dicho análisis requería disponer de los valores de proteína total obtenidos mediante Bradford, y esta determinación no se llevó a cabo debido al bajo nivel de proteínas observado.

En conjunto, los resultados obtenidos en CM no muestran una mejora significativa en la producción específica de PeAfpA en el mutante analizado. No obstante, la tendencia observada sugiere que CM podría considerarse un medio de interés para futuros ensayos, siempre que se amplíe el número de réplicas biológicas para confirmar si existe un efecto productivo real asociado a la mutación en *chsF*.

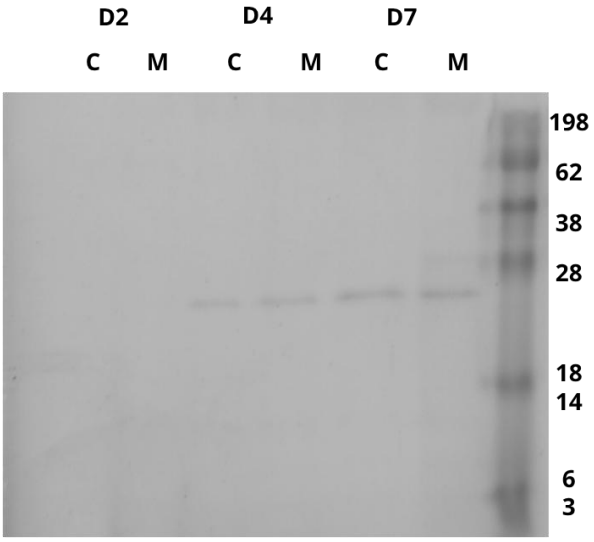


Figura 19. Análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo de la cepa control WT PCSO12112 (C) y del mutante *chsF* 5.2 (M) en medio CM, correspondientes a los días 2, 4 y 7 de cultivo.

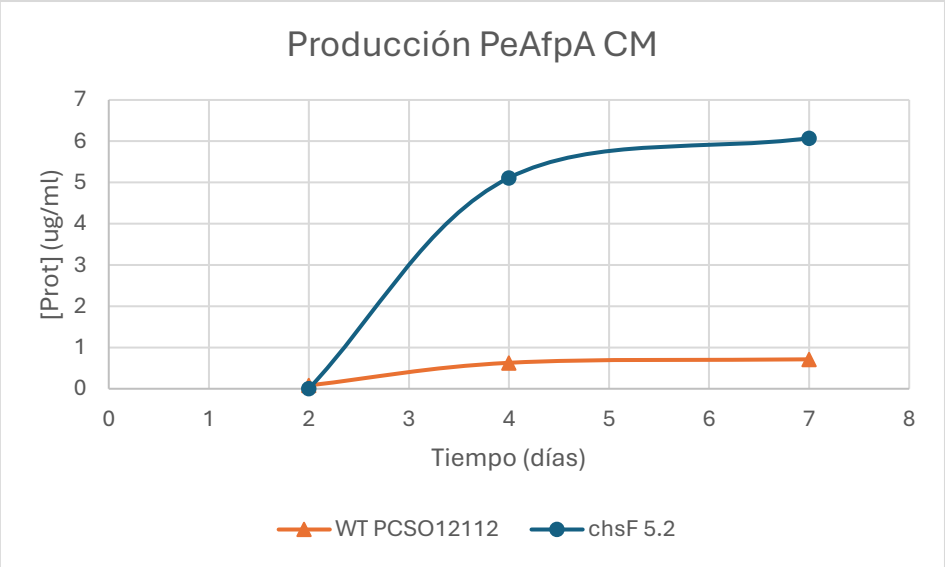


Figura 20. Producción específica de PeAfpA de la cepa control WT PCSO12112 y del mutante *chsF* 5.2 en medio CM, cuantificada mediante ELISA competitivo.

Tabla 9. Valores de significación obtenidos mediante la prueba t de Student para la comparación de la producción específica de PeAfpA entre la cepa control WT PCSO12112 y el mutante *chsF* 5.2 en medio CM.

Día	p-valor
2	0,426
4	0,184
7	0,293

Finalmente, se comparó la producción específica de PeAfpA del mutante *chsF* 5.2 en los distintos medios de cultivo ensayados, observándose que PcMM seguía siendo el medio más favorable para la acumulación de la proteína de interés. En este medio, la concentración de PeAfpA aumentó progresivamente a lo largo del cultivo, alcanzando los valores más elevados en el último punto analizado. Por el contrario, en YPD y CM la producción fue inferior y mostró una tendencia más limitada, con una estabilización temprana o una mayor variabilidad entre réplicas.

Estos resultados indican que, al menos para el mutante analizado, el cambio de medio de cultivo no mejoró la producción específica de PeAfpA con respecto a las condiciones convencionales de cultivo. De hecho, PcMM, que ya había sido descrito como un medio adecuado para la producción de esta proteína, continuó siendo la condición más eficiente. Esto sugiere que, aunque medios como YPD o CM pueden modificar la cinética de secreción o favorecer la acumulación de otras proteínas extracelulares, no necesariamente resultan más apropiados para maximizar la producción específica de PeAfpA.

Un aspecto adicional que conviene considerar al interpretar en conjunto estos resultados es que la mutación en *chsF* podría haber influido no solo en la capacidad secretora del hospedador, sino también en su respuesta frente a la propia PeAfpA producida. El gen *chsF* codifica a una quitina sintasa de clase III, y este grupo se ha relacionado principalmente con funciones más específicas de mantenimiento de la integridad de la pared celular, reparación de la red de quitina o separación celular, más que con la síntesis masiva de pared, que recae en mayor medida en otras quitina sintasas, especialmente las de la división II. Por ello, aunque la alteración de *chsF* podría modificar la organización de la pared celular y afectar indirectamente a la secreción, no necesariamente cabría esperar un efecto tan marcado como el derivado de la modificación de

quitina sintasas más directamente implicadas en la biosíntesis mayoritaria de quitina. Además, dado que PeAfpA actúa sobre la superficie fúngica y altera rutas relacionadas con la integridad de la pared celular, la mutación en *chsF* pudo haber modificado la pared del hospedador y, con ello, reducir su capacidad para tolerar la propia AFP producida. Aunque esta posibilidad no se analizó de forma específica en el presente trabajo, podría haber contribuido, al menos en parte, a la ausencia de una mejora clara y reproducible en la producción específica de PeAfpA observada en los distintos medios de cultivo.

No obstante, dado que este análisis se realizó únicamente con el mutante *chsF* 5.2, sería necesario ampliar el estudio a otros mutantes y a un mayor número de réplicas para confirmar si esta tendencia se mantiene de forma general.

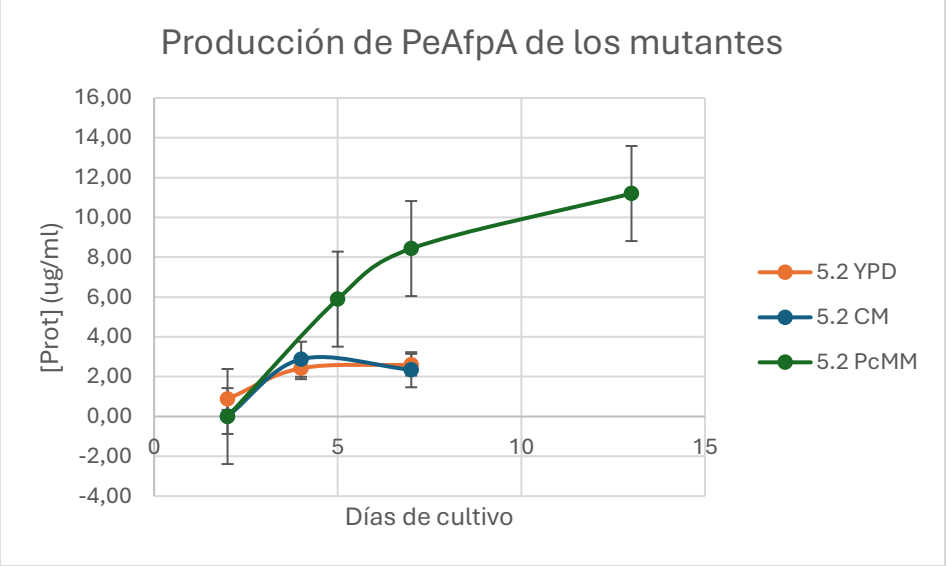


Figura 21. Comparación de la producción específica de PeAfpA del mutante *chsF* 5.2 en los distintos medios de cultivo ensayados (PcMM, YPD y CM) a lo largo del tiempo, determinada mediante ELISA competitivo.

6.Conclusiones

1. En este trabajo se identificaron en *P. chrysogenum* las secuencias homólogas de *csmA* y *chsF* descritas previamente en *A. niger*, lo que permitió diseñar guías CRISPR/Cas9 dirigidas a ambos genes y construir los vectores correspondientes. La comprobación de la inserción de las guías en el plásmido confirmó que las construcciones obtenidas eran adecuadas para su posterior uso en los ensayos de transformación, validando así la estrategia molecular planteada.

2. La transformación de protoplastos de *P. chrysogenum* con estos vectores permitió obtener colonias transformantes, cuya verificación molecular mediante PCR y secuenciación confirmó la generación de mutantes en el locus *chsF*. Las mutaciones detectadas fueron, en general, las esperadas y compatibles con eventos de reparación por NHEJ tras el corte inducido por Cas9. En cambio, en el caso de *csmA* no se obtuvieron mutantes confirmados en las muestras analizadas, aunque el número de colonias estudiadas fue limitado, por lo que no puede descartarse la funcionalidad de las guías ni excluir la influencia de otros factores experimentales. En este sentido, los resultados obtenidos demuestran que el sistema CRISPR/Cas9 constituye una herramienta útil para la edición dirigida de genes de quitina sintasa en *P. chrysogenum*.

3. La caracterización fenotípica mostró que el mutante analizado con mayor profundidad, *chsF* 5.2, mantuvo un crecimiento comparable al de la cepa control WT PCSO12112, sin alteraciones severas en las condiciones ensayadas. Asimismo, aunque durante los pases de purificación algunas colonias mostraron una coloración blanquecina, este fenotipo no se correlacionó de

forma consistente con un patrón de mutación concreto, por lo que no puede considerarse un marcador fiable de edición. El análisis estadístico del crecimiento indicó que en medio PDA no existieron diferencias significativas entre cepas, mientras que en medio MMA sí se detectaron diferencias globales entre ellas, aunque estas no se tradujeron en diferencias significativas entre la WT y las cepas mutantes tras las comparaciones múltiples.

4. Desde el punto de vista de producción de proteínas, la cuantificación mostró que la mutación en *chsF* no comprometió la secreción global de proteínas extracelulares, pero tampoco se tradujo en una mejora clara y reproducible en la producción específica de PeAfpA. En el mutante *chsF* 5.2, la producción total de proteínas fue comparable a la de la cepa control, mientras que la producción específica de PeAfpA no superó de forma consistente a la de la cepa WT. La comparación entre medios de cultivo indicó además que PcMM siguió siendo la condición más favorable para la acumulación de esta proteína, mientras que CM mostró resultados de interés que justifican su estudio adicional. En este contexto, no puede descartarse que la mutación en *chsF*, al alterar una quitina sintasa implicada en la organización de la pared celular, pudiera haber influido también en la tolerancia del hospedador frente a la propia PeAfpA producida, lo que podría haber limitado una posible mejora productiva.

En conjunto, los resultados obtenidos confirman la viabilidad técnica de la estrategia planteada y aportan una primera aproximación al efecto de la modificación de genes de quitina sintasa sobre la fisiología y la capacidad de producción de proteínas de *P. chrysogenum*. No obstante, dado que el análisis se realizó con un número reducido de réplicas y únicamente con uno de los mutantes obtenidos, estas conclusiones deben considerarse preliminares. Por ello, como continuación de este trabajo, será necesario evaluar el resto de mutantes generados en los medios más prometedores, especialmente PcMM y CM, así como ensayar las guías alternativas diseñadas, sobre todo en el caso de *csmA*, con el fin de determinar con mayor solidez el potencial biotecnológico de esta estrategia para optimizar la producción de proteínas, especialmente de PeAfpA en *P. chrysogenum*.

7. Bibliografía

- Barthel, L., Cairns, T., Duda, S., Müller, H., Dobbert, B., Jung, S., Briesen, H., & Meyer, V. (2024). Breaking down barriers: Comprehensive functional analysis of the Aspergillus niger chitin synthase repertoire. *Fungal Biology and Biotechnology*, *11*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s40694-024-00172-7

- Fierro, F., Vaca, I., Castillo, N. I., García-Rico, R. O., & Chávez, R. (2022). Penicillium chrysogenum, a Vintage Model with a Cutting-Edge Profile in Biotechnology. Microorganisms, 10(3), 573. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030573

- Fisher, M. C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J., Bicanic, T., Bignell, E. M., Bowyer, P., Bromley, M., Brüggemann, R., Garber, G., Cornely, O. A., Gurr, Sarah. J., Harrison, T. S., Kuijper, E., Rhodes, J., Sheppard, D. C., Warris, A., White, P. L., Xu, J., Zwaan, B., & Verweij, P. E. (2022). Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(9), 557-571. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1

- Gandía, M., Harries, E., & Marcos, J. F. (2012). Identification and characterization of chitin synthase genes in the postharvest citrus fruit pathogen Penicillium digitatum. *Fungal Biology*, *116*(6), 654-664. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.03.005

- Gandía, M., Harries, E., & Marcos, J. F. (2014). The myosin motor domain-containing chitin synthase PdChsVII is required for development, cell wall integrity and virulence in the citrus postharvest pathogen Penicillium digitatum. *Fungal Genetics and Biology*, *67*, 58-70. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.002

- Gandía, M., Moreno-Giménez, E., Giner-Llorca, M., Garrigues, S., Ropero-Pérez, C., Locascio, A., Martínez-Culebras, P. V., Marcos, J. F., & Manzanares, P. (2022). Development of a FungalBraid *Penicillium expansum* -based expression system for the production of antifungal proteins in fungal biofactories. *Microbial Biotechnology*, *15*(2), 630-647. https://doi.org/10.1111/1751-7915.14006

- Garrigues, S., Gandía, M., Castillo, L., Coca, M., Marx, F., Marcos, J. F., & Manzanares, P. (2018). Three Antifungal Proteins From Penicillium expansum: Different Patterns of Production and Antifungal Activity. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2370. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02370

- Garrigues, S., Manzanares, P., & Marcos, J. F. (2022). Application of recyclable CRISPR/Cas9 tools for targeted genome editing in the postharvest pathogenic fungi Penicillium digitatum and Penicillium expansum. *Current Genetics*, *68*(3-4), 515-529. https://doi.org/10.1007/s00294-022-01236-0

- Gems, D., Johnstone, I. L., & Clutterbuck, A. J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms Aspergillus nidulans at high frequency. Gene, 98(1), 61–67. https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90104-j

- Giner-Llorca, M., Ropero-Pérez, C., Garrigues, S., Thomson, D. D., Bignell, E. M., Manzanares, P., & Marcos, J. F. (2024). Dynamics of interaction and internalisation of the antifungal protein PeAfpA into Penicillium digitatum morphotypes. International journal of biological macromolecules, 282(Pt 5), 136980. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136980

- Jami, M. S., García-Estrada, C., Barreiro, C., Cuadrado, A. A., Salehi-Najafabadi, Z., & Martín, J. F. (2010). The Penicillium chrysogenum extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. Molecular & cellular proteomics : MCP, 9(12), 2729–2744. https://doi.org/10.1074/mcp.M110.001412

- Khadiri, M., Boubaker, H., Farhaoui, A., Ezrari, S., Radi, M., Ezzouggari, R., Mokrini, F., Barka, E. A., & Lahlali, R. (2024). In Vitro Assessment of Penicillium expansum Sensitivity to Difenoconazole. Microorganisms, 12(11), 2169. https://doi.org/10.3390/microorganisms12112169

- Marcet-Houben, M., Ballester, A. R., de la Fuente, B., Harries, E., Marcos, J. F., González-Candelas, L., & Gabaldón, T. (2012). Genome sequence of the necrotrophic fungus Penicillium digitatum, the main postharvest pathogen of citrus. BMC genomics, 13, 646. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-646

- Mózsik, L., Hoekzema, M., De Kok, N. A. W., Bovenberg, R. A. L., Nygård, Y., & Driessen, A. J. M. (2021). CRISPR-based transcriptional activation tool for silent genes in filamentous fungi. *Scientific Reports*, *11*(1), 1118. https://doi.org/10.1038/s41598-020-80864-3

- Ropero Pérez, C. (2026). *Transcriptomic and genetic insights into the function and mechanism of the antifungal proteins PeAfpA and PdAfpB* [Universitat Politècnica de València]. https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/233617

- Pacheco-Arjona, J. R., & Ramirez-Prado, J. H. (2014). Large-scale phylogenetic classification of fungal chitin synthases and identification of a putative cell-wall metabolism gene cluster in Aspergillus genomes. PloS one, 9(8), e104920. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104920

- Pacto Mundial Red Española. (s. f.). 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Recuperado 11 de mayo de 2025, de https://www.pactomundial.org/que-puedes-hacer-tu/ods

- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, *32*(4), 347-355. https://doi.org/10.1038/nbt.2842

- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, *3*(3), 430-439. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y

- Van Den Berg, M. A., Albang, R., Albermann, K., Badger, J. H., Daran, J.-M., M Driessen, A. J., Garcia-Estrada, C., Fedorova, N. D., Harris, D. M., Heijne, W. H. M., Joardar, V., W Kiel, J. A. K., Kovalchuk, A., Martín, J. F., Nierman, W. C., Nijland, J. G., Pronk, J. T., Roubos, J. A., Van Der Klei, I. J., … Bovenberg, R. A. L. (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus Penicillium chrysogenum. *Nature Biotechnology*, *26*(10), 1161-1168. https://doi.org/10.1038/nbt.1498

Anexo 1. Medios de cultivo y soluciones

• Medios de cultivo

LB (Luria-Bertani)

- 10 g/l triptona
- 5 g/l extracto de levadura
- 10 g/l NaCl
- 15 g/l agar
- Autoclave 121 ºC 20 min

MM (Medio mínimo de *A.niger)*

- 6 g/l NaNO3
- 1.5 g/l KH2PO4
- 0.5 g/l KCl
- 0.5 g/l $MgSO_4$ x 7H2O
- 15 g/l agar
- Autoclave 121 ºC 20 min
- 1% glucosa
- 0.2 ml/l Vishniac

MMS (Medio mínimo sacarosa *A.niger*)

- 6 g/l NaNO3
- 1.5 g/l KH2PO4
- 0.5 g/l KCl
- 0.5 g/l $MgSO_4$ x 7H2O
- 15 g/l agar
- 325 g/l sacarosa
- Autoclave 121 ºC 20 min
- 0.2 ml/l Vishniac

CM (Medio completo de *A.niger*)

- MM
- 2 g/l triptona
- 1 g/l casaminoacidos
- 1 g/l extracto de levadura
- 0.5 g/l ácidos ribonucleicos de levadura

PcMM (Medio mínimo de *P.chrysogenum*)

- 3 6 g/l NaNO3
- 0.5 g/l KCl
- 0.5 g/l $MgSO_4$ x 7 H_2O
- 0.05 g/l FeSO4 x 7 H_2O
- 20 g/l sacarosa
- Autoclave 121 ºC 20 min
- 25 ml tampón K2HPO4
- 1 ml elementos traza

YPD (Yeast peptona Dextrosa)

- 10 g/l extracto de levadura
- 20 g/l peptona
- 20 g/l glucosa
- Autoclave 121 ºC 20 min

- **Medios y soluciones para transformación**

MgSO4 0.6 M (500ml)

- 73.9 g $MgSO_4$ x 7 H_2O

SC solución (Sorbitol Calcium Chloride)

- 182.2 g/l sorbitol
- 7.35 g/l $CaCl_2$ x 2 H_2O
- Autoclave 121 ºC 20 min

PS buffer

- 0.2 M Tampón fosfato sódico
- 0.8 M D- sorbitol
- Autoclave 121 ºC 20 min

Solución B

- 1 M D-sorbitol (91.1g en 500ml)
- 50 mM $CaCl_2$(3.67g $CaCl_2$ x H_2O)
- 10mM Tris-HCl (0.6g TRIS base añadir HCl pH)
- pH 7,5 Autoclave 121 ºC 20 min

Solución C

- 25% PEG 8000 (125g en 500ml)
- 50 mM $CaCl_2$(3.67g $CaCl_2$ x H_2O)
- 10mM Tris-HCl (0.6g TRIS base añadir HCl hasta alcanzar pH 7.5)
- pH 7,5 Autoclave 121 ºC 20 min

TM (medio de transformación)

- MM
- 0.5% extracto de levadura
- 0.2% casamino ácidos
- pH 6 Autoclave 121 ºC 20 min
- 2% glucosa esterilizada por filtración

- **Antibióticos y antimicóticos**

- Terbinafina 0.5 ug/ml

- **Geles de proteínas**

Gel resolving 16%

- 2.5ml 1.5M Tris – HCl pH 8.8 0.4% SDS
- 5.34 ml 30% acrilamida: bisacrilamida
- 2.06 ml H_2O
- 100 µl APS 10%
- 4ul TEMED (campana de extracción)

Gel stacking

- 1ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS
- 0.66 ml 30% acrilamida: bisacrilamida
- 2.34 ml H_2O
- 100 µl APS 10%
- 4ul (campana de extracción)

- **Gel de agarosa para DNA**

- 100ml TAE
- 1% Agarosa

Anexo 2. Herramientas utilizadas en la elaboración del TFG

- **Redacción académica**

- Herramienta: chat GPT 5.4
- Funciones: mejora de la redacción

- **Gestión de referencias**

- Herramienta: Zotero
- Funciones: gestión, organización y edición de referencias bibliográficas, así como inserción de citas y generación automática de la bibliografía conforme a la normativa APA 7.ª edición. Esta herramienta facilitó la recopilación y el formateo de las fuentes empleadas, contribuyendo a una presentación más ordenada del trabajo.