

BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN HONGOS

Javier Ávalos y M. Carmen Limón



INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos no fotosintéticos que forman un reino dentro de los eucariotas y que poseen una enorme versatilidad metabólica y capacidad de adaptación a ambientes ecológicos muy diversos. En muchos casos, su metabolismo incluye la capacidad de sintetizar carotenoides, objeto de este capítulo. Los hongos se dividen en varios grupos taxonómicos, entre los que figuran los ascomicetos, que deben su nombre a la formación de ascas, los basidiomicetos, que forman basidios, y los zigomicetos, que forman zigosporas. Con independencia del grupo taxonómico, los hongos pueden desarrollarse formando filamentos (hongos filamentosos) o células individuales (levaduras). Por sus facilidades de cultivo y manipulación en el laboratorio, los investigadores prefieren estudiar algunos hongos. Además, la diversidad de su metabolismo hace de ellos organismos de gran interés biotecnológico; algunas especies se han empleado como modelos de investigación en la síntesis de carotenoides.

La síntesis de carotenoides en hongos se produce a partir del pirofosfato de geranylgeraniol (GGPP). El GGPP se sintetiza tras cuatro pasos consecutivos de condensación a partir de un precursor de cinco átomos de carbono, el pirofosfato de isopentenilo (IPP). Este compuesto se sintetiza en diferentes organismos mediante dos rutas biosintéticas diferentes. La primera deriva del hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) a través del mevalonato, y la segunda, de la condensación de la hydroxietil-tiamina y el gliceraldehído 3-fosfato, con la D-1-deoxixilulosa 1-fosfato como intermediario (Rohmer *et al.*, 1993). En los casos investigados, la síntesis de carotenoides en los hongos ocurre a través de la ruta del mevalonato.

Todos los carotenoides tienen su origen en el fitoeno, un carotenoide incoloro de 40 átomos de carbono que se sintetiza por condensación de dos unidades de GGPP a través de un intermediario en conformación *cis* (figura 1). La introducción de dobles enlaces conjugados a esta molécula aporta a los subsiguientes carotenoides la capacidad de absorber luz visible, dándoles las características pigmentaciones amarilla, anaranjada o rojiza. La ruta difiere después en distintos hongos en función de las modificaciones químicas que se introducen, que normalmente incluyen la ciclación de uno o los dos extremos de la cadena lineal (anillos ϵ o β) o la introducción de grupos oxigenados.

Aunque la capacidad de producir carotenoides es una característica frecuente en los hongos, no todos poseen esta ruta biosintética. Algunas especies muy empleadas en investigación, como *Aspergillus nidulans* o *Saccharomyces cerevisiae*, carecen de los genes para esta ruta. En este capítulo se resume el conocimiento sobre los carotenoides producidos por hongos, prestando especial atención a aquellos en los que se ha profundizado más a nivel bioquímico y genético.

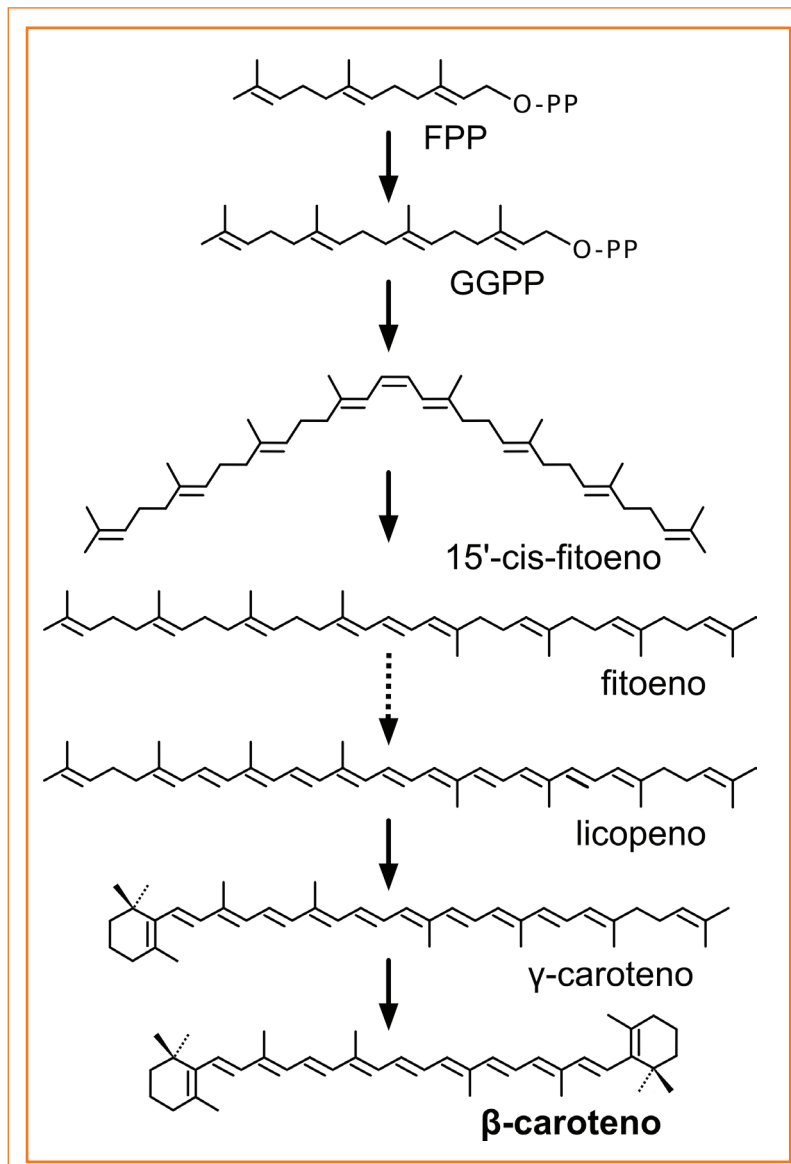


FIGURA 1. Biosíntesis del β -caroteno en hongos. La flecha discontinua resume los cuatro pasos consecutivos de desaturación, cuyos intermediarios son el fitoflueno, el ζ -caroteno y el neurosporeno (no mostrados).

PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO

El β -caroteno es uno de los carotenoides más extendidos en la naturaleza y su síntesis se lleva a cabo en diferentes hongos. La síntesis de β -caroteno a partir de fitoeno requiere cuatro pasos de desaturación, que dan como intermediario el licopeno y dos ciclaciones de tipo β (figura 1). A diferencia de otros organismos, las cuatro desaturaciones las lleva a cabo una misma desaturasa. Las dos ciclaciones las produce también una misma ciclasa.

Síntesis de β -caroteno en mucorales

En los zigomicetos, el β -caroteno parece ser el caroteno más frecuente, y se ha descrito su síntesis en varias especies del orden mucorales, como *Phycomyces blakesleeanus* (Cerdá-Olmedo, 1987), *Blakeslea trispora* (Navarro *et al.*, 1995; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 2004) y *Mucor circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Fraser *et al.*, 1996). El gen responsable de la desaturasa se ha estudiado en detalle en los tres mucorales mencionados, donde se denomina *carB* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Velayos *et al.*, 2000; Rodríguez-Saiz *et al.*, 2004). A diferencia de las enzimas de la carotenogénesis de bacterias y organismos fotosintéticos, en los hongos la actividad ciclasa se encuentra en el extremo amino de una enzima bifuncional, cuya región del extremo carboxilo lleva a cabo la síntesis de fitoeno a partir del GGPP. Esta doble actividad se descubrió inicialmente en la levadura *Xhantophyllomyces dendrorhous* (Verdoes *et al.*, 1999) y se confirmó posteriormente en los genes *carRA* de *P. blakesleeanus* (Arrach *et al.*, 2001) y *carRP* de *M. circinelloides* (Velayos *et al.*, 2000a; Sanz *et al.*, 2011). Un gen similar se ha identificado también en *B. trispora* (Rodríguez-Saiz *et al.*, 2004). En *P. blakesleeanus* se asume que los dos dominios proteicos

de CarRA se separan como proteínas independientes (Torres-Martínez, Murillo y Cerdá-Olmedo, 1980), probablemente por digestión proteolítica (Arrach *et al.*, 2001). Dicha separación física se ha demostrado recientemente en *B. trispora* mediante el reconocimiento con anticuerpos específicos para cada dominio proteico (Breitenbach, Fraser y Sandmann, 2012).

La organización genética de los dos genes de la síntesis de β -caroteno es similar en las tres especies mucorales investigadas, con ambos genes transcritos de forma divergente a partir de una única secuencia reguladora. La ruta biosintética en estos organismos se ha contrastado sólidamente por estudios genéticos y bioquímicos, alcanzando su mayor detalle en *P. blakesleeanus*. Se conocen desde hace varias décadas los mutantes albinos del gen *carB* (que acumulan fitoeno) y los mutantes del gen *carRA* que pueden ser albinos (porque no acumulan ningún carotenoide) o rojos (porque acumulan licopeno) en función del dominio enzimático afectado (Cerdá-Olmedo, 1985; 1987). Dichos mutantes se obtuvieron posteriormente en *M. circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Velayos *et al.*, 1997) y en *B. trispora* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995; Mehta, Obratzsova y Cerdá-Olmedo, 2003). El mismo resultado se obtuvo mediante el empleo de inhibidores químicos de estas enzimas, como la difenilamina para la desaturasa (Salgado, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989) o el CFTA [2-(4-clorofenil)-tiotrietilamina • HCl] para la ciclasa (Goodwin, 1980). Los mutantes *carB* de *P. blakesleeanus* acumulan el isómero 15-*cis* del fitoeno (Goodwin, 1980), pero los intermediarios posteriores tienen configuración todo-*cis*. Este hecho, unido a que todos los mutantes que poseen fitoeno están afectados en el mismo gen *carB* (Ootaki *et al.*, 1973) y que la desaturasa CarB es capaz de reconocer la forma *cis* del fitoeno (Fraser y Bramley, 1994), sugiere que la isomerización a la forma todo-*trans* la realiza

la propia desaturasa. Diferentes evidencias experimentales demuestran que en *P. blakesleeanus*, y posiblemente también en las otras especies mucorales estudiadas, las enzimas de la carotenogénesis se organizan como un complejo multimérico, formado por cuatro desaturasas y dos ciclasas, que se transfieren los sustratos entre sí (De la Guardia *et al.*, 1971; Aragón *et al.*, 1976; Candau, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1991; Sanz *et al.*, 2002). La situación es algo más compleja en *B. trispora*, donde se han encontrado evidencias de dos ciclasas diferentes, una encargada de realizar las dos ciclaciones y otra capaz de hacer sólo la primera ciclación para producir γ -caroteno.

Síntesis de β -caroteno en otros hongos

Además de los zigomicetos, algunos hongos de otros grupos taxonómicos también producen β -caroteno como caroteno predominante. Entre ellos figuran los basidiomicetos *Rhodospiridium* sp. (De Miguel *et al.*, 1997), *Sclerotinia sclerotiorum* (Georgiou *et al.*, 2001), *Sclerotium rolfsii* (Georgiou *et al.*, 2001a), *Sporidiobolus pararoseus* (Han, He y Hang, 2012), *Ustilago maydis* (Estrada *et al.*, 2010) y *Ustilago* sp. (Will, Garber y Kezdy, 1984; Will y Newland, 1985) y los ascomicetos *Leptosphaeria michotii* (Jerebzoff-Quintin y Jerebzoff, 1980), *Aspergillus giganteus* (El-Jack, Mackenzie y Bramley, 1988), *Cercospora nicotianae* (Daub y Payne, 1989), *Aschersonia aleyroides* (Van Eijk *et al.*, 1979) y *Penicillium* sp. (Han *et al.*, 2005). Los genes responsables de esta ruta han recibido escasa atención a nivel molecular en estos organismos, y sólo se ha descrito el gen de la desaturasa en *C. nicotianae* (Ehrenshaft y Daub, 1994). Como se describirá más adelante, el β -caroteno puede estar presente además como intermediario o producto lateral de la síntesis de xantofilas en otros hongos. También acumulan β -caroteno algunos mutantes de *X. dendrorhous* (Johnson, 2003) o *Rhodotorula glutinis* (Bhosale y Gadre, 2001).

PRODUCCIÓN DE NEUROSPORAXANTINA EN ASCOMICETOS

La neurosporaxantina es un apocarotenoide monocíclico de 35 átomos de carbono con un grupo carboxilo en el extremo lineal de la molécula (figura 2). Su nombre proviene de su descubrimiento en *Neurospora crassa*, donde se encontró junto con otros carotenoides (Zalokar, 1957). El análisis posterior de su estructura química reveló que se trata del ácido β -apo-4'-carotenoico (Aasen y Jensen, 1965). La neurosporaxantina es producida también por los géneros *Fusarium* (Bindl, Lang y Rau, 1970; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1986), *Verticillium* (Valadon y Mummery, 1969; Valadon *et al.*, 1982) y *Podospora* (Strobel *et al.*, 2009). En algunos hongos, la neurosporaxantina es objeto de modificaciones químicas secundarias, como la esterificación con un grupo metilo en *Verticillium agaricinum* (Valadon y Mummery, 1977) o con un grupo glucosilo en *Fusarium* sp. (Sakaki *et al.*, 2002).

El análisis de los carotenoides intermediarios detectados en *Neurospora* (Harding *et al.*, 1969; Mitzka y Rau, 1977) y en *Fusarium* (Bindl, Lang y Rau, 1970; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987), sugieren rutas biosintéticas de neurosporaxantina muy parecidas en ambas especies, con cinco desaturaciones y un paso de ciclación, aunque con diferencias en el orden en que ocurren algunas de las reacciones (figura 2). Así, entre los carotenoides encontrados en *N. crassa* figura el 3,4-didehidrolicopeno, resultado de cinco desaturaciones en la molécula de fitoeno. Sin embargo, la ciclación puede producirse en pasos anteriores, como demuestra la detección de γ -caroteno o β -zeacaroteno, procedentes de la ciclación del neurosporeno o el licopeno. Estos compuestos se encuentran también en *Fusarium*, mientras que el 3,4-didehidrolicopeno no ha sido aún descrito en este hongo (Bindl *et al.*, 1970; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987).

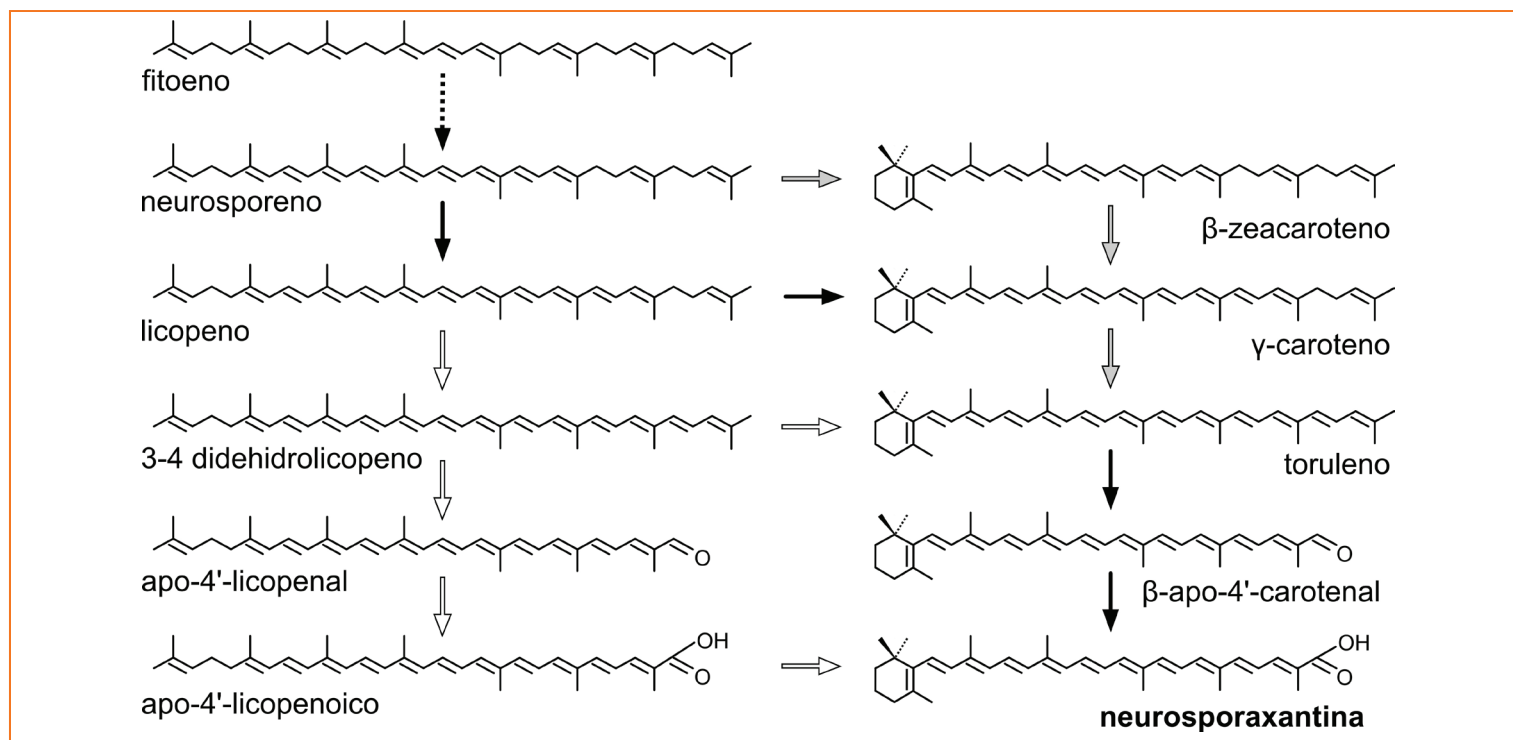


FIGURA 2. Biosíntesis de la neurosporaxantina en *Fusarium* y *Neurospora*. Los intermediarios pueden variar según el orden en que se produzcan las reacciones. De acuerdo con los intermediarios detectados en las distintas especies, los pasos indicados con flechas blancas sólo se han observado en *Neurospora*, con flechas grises sólo en *Fusarium*, y con flechas negras en ambos géneros. Como rama lateral, el γ -caroteno puede ser convertido también en β -caroteno (reacción no mostrada en la figura).

Los primeros pasos de la ruta coinciden con los de la síntesis de β -caroteno, empezando por la síntesis de fitoeno a partir de GGPP (Spurgeon, Turner y Harding, 1979). Los genes responsables de los primeros pasos se identificaron inicialmente en *N. crassa* gracias al análisis genético de mutantes albinos, denominados *al-1*, *al-2* (Huang, 1964) y *al-3* (Goldie y Subden, 1973). Sus posteriores estudios a nivel molecular mostraron que AL-1 es la desaturasa responsable de las reacciones de desaturación (Bartley *et al.*,

1990; Schmidhauser *et al.*, 1990), AL-2 la sintasa de fitoeno (Schmidhauser *et al.*, 1994) y AL-3 la transferasa de prenilo que sintetiza GGPP a partir de FPP (Sandmann *et al.*, 1993). Mientras que los mutantes nulos para los genes *al-1* y *al-2* son viables, sólo se obtienen mutantes con actividad residual de AL-3 (Barbato *et al.*, 1996), un resultado coherente con la utilización del GGPP para la síntesis de otros terpenoides esenciales. Análisis más detallados confirmaron que AL-1 es capaz de llevar a cabo las cinco desaturaciones de la ruta



(Hausmann y Sandmann, 2000) y que AL-2 posee también actividad ciclasa (Arrach, Schmidhauser y Ávalos, 2002), como ya se ha mencionado para la enzima ortóloga de otros hongos. Esta función dual de AL-2 se ha confirmado además mediante análisis de nuevos alelos mutantes del gen (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011a) y mediante ensayos enzimáticos en un sistema heterólogo (Sandmann *et al.*, 2006). Este último estudio mostró además que AL-2 lleva a cabo preferentemente una única ciclación, como cabe esperar de su participación en la síntesis de un apocarotenoide monocíclico como la neurosporaxantina. Se han identificado también genes similares a *al-1*, *al-2* y *al-3* en *Fusarium fujikuroi*, donde se han denominado respectivamente *carB*, *carRA* (Linnemannstöns *et al.*, 2002; Prado-Cabrero *et al.*, 2009) y *ggs1* (Mende, Homann y Tudzynski, 1997), habiéndose identificado también en otras especies de *Fusarium* (Jin, Lee y Lee, 2010; Ádám *et al.*, 2011; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012). En el caso de *al-2* y *carRA*, a diferencia de su homólogo de mucorales, no hay datos que

apoyen la separación física de los dominios sintasa de fitoeno y ciclasa como polipéptidos independientes.

Las cinco desaturaciones y la ciclación dan lugar al toruleno, el precursor de la neurosporaxantina. La síntesis de esta xantofila requiere dos actividades enzimáticas adicionales. Una oxigenasa de carotenoides, codificada por los genes *cao-2* en *Neurospora* (Saelices *et al.*, 2007) y *carT* en *Fusarium* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007), produce una rotura asimétrica en el extremo lineal de la molécula de toruleno para producir β -apo-4'-carotenal, que tiene 35 átomos de carbono. CAO-2 no es capaz de reconocer como sustrato al γ -caroteno, por lo cual son necesarias las cinco desaturaciones para que esta enzima pueda llevar a cabo su reacción. Sin embargo, es capaz de producir el corte oxidativo en ausencia de ciclación, como indica la introducción de la ciclación al final de la ruta en *Neurospora* cuando este hongo se incubaba a baja temperatura (Estrada *et al.*, 2008a). El β -apo-4'-carotenal es sustrato de una deshidrogenasa de aldehído, codificada por los genes *ylo-1* en *Neurospora* (Estrada *et al.*, 2008b) y *carD* en *Fusarium* (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011), y que oxida el grupo aldehído a carboxilo para generar finalmente la neurosporaxantina.

La participación de estos genes en la ruta biosintética fue confirmada por el fenotipo de sus pérdidas de función por mutación. Los mutantes albinos o carecen de caroteno (*al-2*, *al-3*, *carRA*) o acumulan fitoeno (*al-1*, *carB*), indistinguible a simple vista. Los mutantes *cao-2* (Saelices *et al.*, 2007) y *carT* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007) presentan una pigmentación rojiza, causada por la acumulación de toruleno. Finalmente, los mutantes de los genes *ylo-1* (Estrada *et al.*, 2008b) y *carD* (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011) muestran una pigmentación amarillenta, causada por una mezcla compleja de carotenoides. La carencia de la deshidrogenasa de aldehído

debería dar lugar a la acumulación de β -apo-4'-carotenal carotenal, por lo que estos mutantes deberían tener un color anaranjado, pero la inestabilidad de este carotenoide provoca la acumulación de otros derivados. En el caso del mutante *ylo-1*, en función de las condiciones de cultivo, se ha detectado apo-4'-licopenal, apo-4'-licopenol (Estrada *et al.*, 2008a), apo-4'- γ -carotenal, apo-4'- γ -carotenol, y derivados esterificados, como 4'-apolicopeno-4'-miristato o 4'-apo- γ -caroteno-4'-miristato (Sandmann, Takaichi y Fraser, 2008). La complejidad química de este mutante, conocido hace más de cuarenta años (Goldie y Subden, 1973), retrasó mucho la identificación de la actividad enzimática afectada. Sin embargo, el mutante del gen ortólogo en *Fusarium*, *carD*, presenta un color anaranjado en la fase inicial de cultivo, pero vira a un color amarillento a medida que envejece debido a la conversión del β -apo-4'-



carotenal a β -apo-4'-carotenol y, presumiblemente, a derivados esterificados (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011). La mayoría de estos genes también mutan en *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), confirmando los fenotipos observados en *F. fujikuroi* (Jin, Lee y Lee, 2010).

SÍNTESIS DE ASTAXANTINA Y OTRAS XANTOFILAS

La astaxantina es una xantofila de color rojizo producida por microalgas y bacterias, con frecuencia en ecosistemas acuáticos, en los que a través de la cadena alimentaria acaban siendo fuente de pigmentación (color "salmón") en muchos peces y crustáceos, así como en algunas aves, como los flamencos. La astaxantina es producida también por la levadura *X. dendrorhous*, anteriormente conocida como *Phaffia rhodozyma* (Johnson, 2003). Esta xantofila posee un notable interés biotecnológico, especialmente debido a su empleo en acuicultura para proporcionar pigmentación en truchas y salmones (Higuera-Ciapara, Félix-Valenzuela y Goycoolea, 2006). Su producción industrial se basa en gran medida en cultivos de *X. dendrorhous* y del alga *Haematococcus pluvialis* (Domínguez-Bocanegra, Ponce-Noyola y Torres-Muñoz, 2007).

La astaxantina se sintetiza a partir del β -caroteno mediante la introducción de grupos ceto e hidroxilo en sus anillos β (figura 3a). La síntesis de β -caroteno es llevada a cabo en *X. dendrorhous* por la desaturasa CrtI (Verdoes *et al.*, 1999a) y la sintasa de fitoeno-ciclasa CrtYB (Verdoes *et al.*, 1999). Como ya se ha indicado, el análisis bioquímico de CrtYB permitió asignar por primera vez la actividad ciclasa en hongos a la región del extremo amino de la sintasa de fitoeno. En *X. dendrorhous* la conversión de β -caroteno en astaxantina la

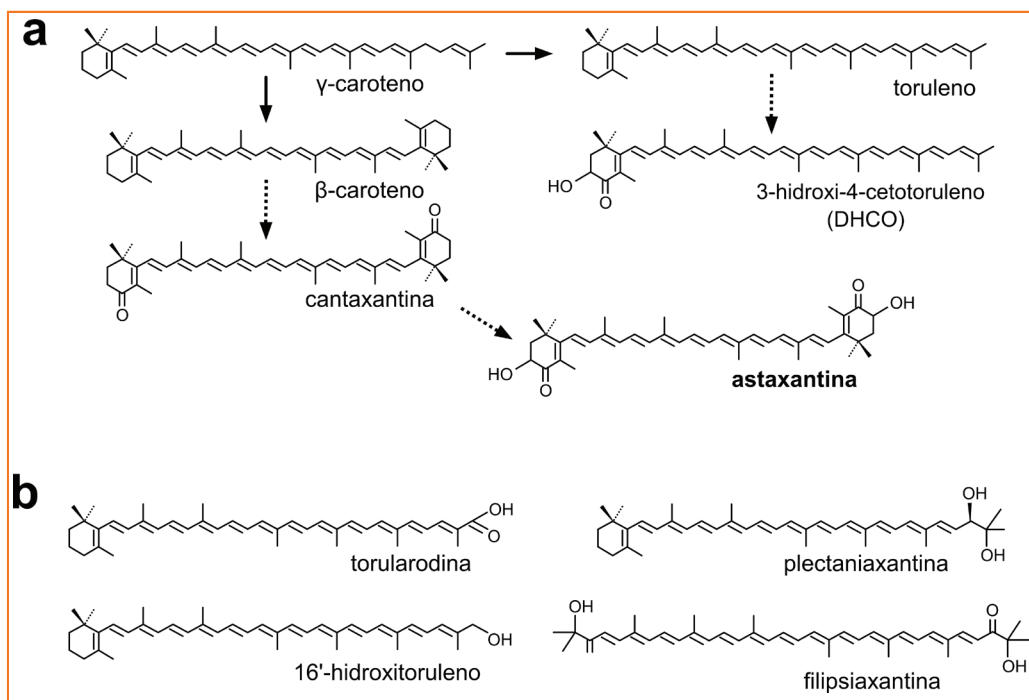


FIGURA 3. Biosíntesis de otras xantofilas en hongos: *a*) biosíntesis de la astaxantina en *X. dendrorhous*. Sólo se indican los pasos a partir del γ -caroteno. En una rama lateral, el γ -caroteno puede sufrir una quinta desaturación para producir toruleno, el cual puede ser objeto de las reacciones de hidroxilación y cetolización en el anillo β para producir 3-dihidroxi-4-cetotoruleno como producto secundario; *b*) estructura química de otras xantofilas fúngicas.

realiza una sola enzima de la familia de las oxigenasas P450 (Álvarez *et al.*, 2006; Ojima *et al.*, 2006), codificada por el gen *crtS/ast*, con la participación de al menos una reductasa de citocromo P450 para proporcionar los electrones en las reacciones de oxigenación (Alcaíno *et al.*, 2008). Este paso biosintético difiere en algas y bacterias productoras de astaxantina, donde su síntesis a partir de β -caroteno es mediada por dos enzimas independientes con actividades hidrolasa y cetolasa (Fraser, Miura y Misawa, 1997).

El interés biotecnológico de las xantofilas ha justificado numerosos estudios para su búsqueda en otras levaduras. Tras la astaxantina destaca la torularodina, un derivado carboxílico del toruleno de estructura similar a la neurosporaxantina (figura 3b). La síntesis de torularodina ha recibido especial atención en el género *Rhodotorula* (Frengova y Beshkova, 2009; Moliné, Libkind y Van Broock, 2012), pero también se ha encontrado en otras levaduras, como *Peniophora* (Arpin, Lebreton y Fiasson., 1966), *Cystofilobasidium*, *Rhodospodium*, *Sporobolomyces*, y *Sporidiobolus* (Davoli, Mierau y Weber, 2004; Buzzini *et al.*, 2007; Iurkov *et al.*, 2008). También se han identificado otras xantofilas en hongos, como la cantaxantina en *Cantharellus cinnabarinus* (Haxo, 1950), el 16'-hidroxitoruleno en *Cystofilobasidium* (Herz *et al.*, 2007), la plectanixantina en *Dioszegia* sp. (Madhour *et al.*, 2005) y la filipsiixantina en *Phillipsia carminea* (Arpin y Liaen-Jensen, 1967).

La disponibilidad de herramientas moleculares permite modificar genéticamente otros hongos para producir xantofilas. La introducción en *M. circinelloides* de genes heterólogos de origen bacteriano ha permitido la producción de cantidades variables de β -criptoxantina, zeaxantina, equinenona, cantaxantina y astaxantina además de su producto habitual, el β -caroteno (Papp *et al.*, 2006; 2013; Csernetics *et al.*, 2011). Los mismos carotenoides los sintetizan estirpes de *S. cerevisiae* a las que se han introducido genes bacterianos y la levadura *X. dendrorhous* para la producción de xantofilas (Ukibe *et al.*, 2009).

REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN HONGOS

Debido al interés en las aplicaciones de los carotenoides y al uso de algunos hongos para su producción biotecnológica, la regulación de su síntesis ha recibido especial atención en estos organismos. En función de las especies, la síntesis se estimula mediante la luz o por algunas condiciones adversas de cultivo, como la escasez de nutrientes o el estrés oxidativo. En algunos casos se conocen los mecanismos de regulación asociados a determinadas etapas del desarrollo o del ciclo de vida. La existencia de proteínas reguladoras específicas se evidencia debido a la existencia de mutantes regulatorios, algunos de los cuales se han estudiados con especial detalle. Se describen a continuación los principales aspectos de los mecanismos de regulación.

Estimulación mediante la luz

La inducción por luz es un carácter frecuente en los hongos productores de carotenoides (Ávalos, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1993). Entre los casos mejor conocidos figuran la fotoinducción de la síntesis de β -caroteno en *P. blakesleeanus* (Bejarano *et al.*, 1991), *M. circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Velayos *et al.*, 1997) y *A. giganteus* (El-Jack, Mackenzie y Bramley, 1988) junto con la de neurosporaxantina en *N. crassa* (Ávalos y Corrochano, 2013) y en distintas especies de *Fusarium* (Ávalos y Estrada, 2010). También se ha descrito fotoinducción de la síntesis de astaxantina en mutantes de *X. dendrorhous* (Meyer y Du Preez, 1994). Sin embargo, la inducción por luz no es una regla general. Así, por ejemplo, la síntesis de β -caroteno no aumenta significativamente en *B. trispora* (Sutter, 1970) o en *U. maydis* (Estrada *et al.*, 2010) cuando se cultivan bajo iluminación continua.

En algunos casos la fotoinducción se ha estudiado con gran detalle. En *P. blakesleeanus*, la fotorrespuesta se limita a una etapa concreta del desarrollo, antes de la formación de los esporangióforos, estructuras en las que se desarrollan las esporas asexuales (Bejarano *et al.*, 1991). En esta fase del desarrollo, la aplicación de distintos flujos de luz al mismo tiempo permitió detectar dos niveles de sensibilidad, con distintos umbrales y rangos de respuesta. Una exposición a luz muy débil produce una pequeña estimulación que se satura a flujos mayores, hasta alcanzar un umbral capaz de producir una respuesta mucho más fuerte. Se ha encontrado también una respuesta bifásica al flujo luminoso en *N. crassa* (Schrott, 1980). La fotoinducción es particularmente eficaz en este hongo, capaz de producir un incremento sensible de la carotenogénesis después de sólo un minuto de exposición a la luz (Zalokar, 1955) o incluso menos (Rau, Lindemann y Rau-Hund, 1968), alcanzando su valor máximo aproximadamente 6-8 horas después del estímulo. Sin embargo, una vez disparada la respuesta a un pulso de luz, el hongo es insensible temporalmente a un segundo pulso (Schrott, 1981), indicando un bloqueo temporal del sistema de fotorrecepción. La respuesta es menos eficaz en *Fusarium aquaeductuum* (Bindl, Lang y Rau, 1970) y *F. fujikuroi* (Ávalos y Schrott, 1990), y en estos casos es necesario al menos una hora de iluminación para una respuesta detectable.

En los casos investigados, la inducción mediante la luz tiene lugar a nivel de transcripción de los genes estructurales. En los hongos mucorales, el incremento es particularmente fuerte en *M. circinelloides*, y es suficiente un pulso de 10 minutos de luz azul para que los niveles de ARNm de los genes *carB* y *carRA* aumenten hasta 300 veces (Velayos *et al.*, 2000; 2000a), mientras que el incremento no es tan acusado en *P. blakesleeanus* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2001;

Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008). Un estudio más detallado en este hongo mostró dos picos en la cinética de fotoinducción, uno en los primeros dos minutos y otro a los 20 minutos, y detectó la unión de un posible complejo inhibidor a la doble región promotora *carB/carRA* (Sanz *et al.*, 2010). Los ARNm de los genes *carRA* y *carB* también aumentan tras la exposición a la luz en *B. trispora*, a pesar de que sus cultivos con luz continua no acumulan más carotenoides que los incubados en la oscuridad (Quiles-Rosillo *et al.*, 2005). Esta discrepancia parece deberse a la transitoriedad de la fotorrespuesta, un fenómeno conocido como fotoadaptación, observado también en otros hongos, que permite la atenuación de la expresión de los genes de la carotenogénesis tras exposiciones prolongadas a la luz. Sin embargo, la iluminación de micelio de *B. trispora* previamente incubado en la oscuridad produce un aumento significativo en el contenido de carotenoides (Quiles-Rosillo *et al.*, 2005), lo que obliga a reconsiderar su supuesta falta de fotoinducción.

En los ascomicetos se han descrito también fotorrespuestas similares para los genes de la carotenogénesis. En *N. crassa*, los niveles de ARNm de los genes *al-1* (Schmidhauser *et al.*, 1990), *al-2* (Schmidhauser *et al.*, 1994) y *cao-2* (Saelices *et al.*, 2007) aumentan enormemente al exponer el hongo a la luz, pero no se ha detectado fotoinducción para el último gen de la ruta, *ylo-1* (Estrada *et al.*, 2008b). Como en los hongos mucorales, el aumento es transitorio, ya que disminuye a niveles casi basales unas horas después del estímulo. El mecanismo molecular de la fotoadaptación se ha estudiado en especial detalle en este hongo (He y Liu, 2005), donde implica cambios en la actividad de su complejo fotorreceptor WC. En el proceso participan otras proteínas reguladoras, y tiene un papel importante la flavoproteína VIVID (VVD) (Shrode *et al.*, 2001; Schwerdtfeger y Linden, 2003), llamada así por el mayor

contenido en carotenoides de sus mutantes en condiciones de iluminación.

Los niveles de ARNm de los genes *carRA*, *carB* (Linnemannstöns *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2004) y *carT* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007) de *F. fujikuroi* manifiestan una fotorregulación similar a la de sus ortólogos *al-1*, *al-2* y *cao-2* en *N. crassa*. Sin embargo, los del gen *carD*, ortólogo de *ylo-1*, no están influidos por la luz de forma significativa (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011). Una fotoinducción similar de *carRA* y *carB* se ha descrito en *Fusarium oxysporum* (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012) y en *Fusarium verticillioides* (Ádám *et al.*, 2011). La regulación por luz se ha estudiado también para los genes de la síntesis de GGPP, un sustrato que no es exclusivo de la síntesis de carotenoides. Los niveles de ARNm de estos genes son fotoinducibles en *N. crassa*, *al-3*, (Nelson *et al.*, 1989; Baima, Macino y Morelli, 1991), y *M. circinelloides*, *carG* (Velayos *et al.*, 2003), pero no en *F. fujikuroi*, *ggs1* (Mende, Homann y Tudzynski, 1997). En este último hongo hay un segundo gen presuntamente implicado en la síntesis de GGPP en la ruta biosintética de giberelinas, *ggs2* (Tudzynski, 2005), pero no se ha estudiado su posible regulación mediante la luz.

Fotorreceptores responsables de la inducción mediante la luz

Uno de los aspectos de mayor interés en los estudios de la regulación mediante luz es la identificación de los fotorreceptores responsables. El espectro de acción de la fotorrespuesta se ha determinado para *F. aquaeductuum* (Rau, 1967), *N. crassa* (De Fabo, Harding y Shropshire, 1976) y para los dos niveles de sensibilidad de *P. blakesleeanus* (Bejarano *et al.*, 1991). Los espectros obtenidos son comparables, teniendo en cuenta las diferencias experimentales, y compatibles con

la participación de una flavina como pigmento responsable de la absorción de luz. La mediación de una flavina quedó en evidencia en *N. crassa* por la menor fotoinducción observada en mutantes con un contenido reducido de este compuesto (Paietta y Sargent, 1981) y por la no recuperación de la respuesta por adición de análogos de la riboflavina (Paietta y Sargent, 1983).

El primer fotorreceptor se identificó en *N. crassa*, donde la respuesta es mediada por el complejo "white collar" (WC). El nombre proviene del fenotipo de sus mutantes, que en los cultivos en tubos de agar muestran un anillo blanco de micelio en la base debido a la ausencia de fotoinducción de la carotenogénesis, mientras que la masa de micelio aéreo es de color anaranjado debido a la inducción de la síntesis de carotenoides durante la conidiación. El complejo WC es un heterodímero formado por dos proteínas, llamadas WC-1 y WC-2, identificadas mediante el análisis de los mutantes afectados en los correspondientes genes, *wc-1* y *wc-2*. Los estudios moleculares mostraron que ambos mutantes habían perdido la inducción por luz de la actividad biosintética del fitoeno (Harding y Turner, 1981), así como la propia síntesis de los carotenoides (Degli-Innocenti y Russo, 1984) y la transcripción de los genes estructurales (Saelices *et al.*, 2007). Cuando detecta la luz, el complejo WC se une a los promotores de los genes diana (He y Liu, 2005), habiéndose identificado en algunos de ellos posibles elementos reguladores responsables de dicha unión (Carattoli *et al.*, 1994). Dentro del complejo, la función fotorreceptora la desempeña WC-1, que es la que contiene el cromóforo de flavina.

Estudios posteriores en otros hongos han identificado sistemas fotorreceptores similares. En *P. blakesleeanus*, los mutantes regulatorios *madA* y *madB* muestran una disminución en

la inducción por luz de la carotenogénesis, y los dobles mutantes *madA madB* están más fuertemente afectados en la fotorrespuesta (Jayaram, Leutwiler y Delbrück, 1980; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980). La disponibilidad de la secuencia del genoma permitió identificar los genes responsables: *madA* resultó ser homólogo de *wc-1* (Idnurm *et al.*, 2006) y *madB* de su correspondiente pareja *wc-2*, una conclusión apoyada por la capacidad de las proteínas MadA y MadB para interaccionar y formar un complejo (Sanz *et al.*, 2009). El análisis del genoma de *P. blakesleeanus* reveló la existencia de cinco genes para otras dos proteínas del tipo WC-1, que se denominaron WcoA y WcoB, y para otras tres proteínas de tipo WC-2, que se denominaron WctB, WctC y WctD (Corrochano y Garre, 2010). La existencia de esta variedad permitiría múltiples combinaciones en la formación de complejos WC, aunque hasta ahora sólo se ha demostrado la formación del complejo MadA-MadB (Sanz *et al.*, 2009). La regulación mediante luz puede implicar la participación de otras proteínas, como indica la identificación de otros mutantes con menor sensibilidad a la luz, como los afectados en los genes *picA*, *picB* (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980) y *pimA* (Flores Cerdá-Olmedo y Corrochano, 1998), cuyos productos no han sido aún identificados.

M. circinelloides posee un juego similar de genes *wc* (Corrochano y Garre, 2010). En este caso, la disponibilidad de herramientas de transformación permitió su mutagénesis dirigida, y por lo tanto el estudio de sus funciones. Así, los mutantes nulos de *mcwc-1c* (ortólogo de *wcoA*) carecen de fotoinducción de la síntesis de β -caroteno, y los de *mcwc-1a* (ortólogo de *madA*) están específicamente afectados en la respuesta a la luz del desarrollo de los esporangióforos, mientras que los mutantes de *mcwc-1b* (ortólogo de *wcoB*) carecen de fenotipo detectable (Silva, Torres-Martínez y

Garre, 2006). Sin embargo, aunque el mutante nulo de *mcwc-1a* muestre fotoinducción de la carotenogénesis, la proteína MCWC-1A participa en la inducción por luz del gen *mcwc-1c*, por lo cual la fotoinducción de la transcripción de los genes estructurales *carB* y *carRP* baja considerablemente tanto en los mutantes carentes de MCWC-1A como de MCWC-1C, implicando a ambas proteínas en su mecanismo de regulación por luz.

También se han encontrado diferencias en la función del complejo WC en el género *Fusarium*, cuyos genomas poseen un solo juego de genes de tipo *wc-1* y *wc-2* (Ávalos y Estrada, 2010). Los mutantes de *F. fujikuroi* y *F. oxysporum* carentes de proteína funcional WC-1 (llamadas WcoA y Wc1 respectivamente) muestran todavía un nivel significativo de fotocarotenogénesis (Estrada y Ávalos, 2008; Ruiz-Roldán *et al.*, 2008), sugiriendo la participación de al menos un segundo fotorreceptor. En *F. fujikuroi* se han obtenido mutantes de otros tres fotorreceptores, el criptocromo DASH CryD (Castrillo, García-Martínez y Ávalos, 2013) y las rodopsinas CarO (Prado *et al.*, 2004) y OpsA (Estrada y Ávalos, 2009), pero todos ellos conservan la capacidad de fotoinducir la fotocarotenogénesis. Sin embargo, los mutantes del gen de la adenilato ciclasa, *acyA*, de *F. fujikuroi* (García-Martínez, Ádám y Ávalos, 2012) o del gen *MAT1-2-1* del locus sexual de *F. verticillioides* (Ádám *et al.*, 2011), muestran niveles menores de fotoinducción, lo que indica la existencia de una regulación más compleja que la observada en *N. crassa* o en *P. blakesleeanus*. Datos recientes de *F. fujikuroi* indican que WcoA juega un papel similar al de WC-1 en *N. crassa* y que el criptocromo CryD es capaz de llevar a cabo una fotoinducción por un mecanismo molecular que no actúa a nivel de la transcripción (Castrillo y Ávalos, 2015).

Mutantes superproductores de carotenoides

Los mutantes afectados en genes de reguladores positivos de la carotenogénesis, como los fotorreceptores MadA y MadB en *P. blakesleeanus* o WC-1 y WC-2 en *N. crassa*, presentan caídas en las cantidades de carotenoides en la luz. La base molecular de otros mutantes con menores cantidades de carotenos, como los del gen *carC* de *P. blakesleeanus* (Revuelta y Eslava, 1983), u otros de *B. trispora* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995) o *M. circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Fraser *et al.*, 1996; Velayos *et al.*, 1997), es desconocida. Sin embargo, debido a sus implicaciones biotecnológicas, son de especial interés las mutaciones en genes de reguladores negativos de la carotenogénesis, ya que se espera que den lugar a incrementos en la producción de carotenoides. Tales tipos de mutantes se han descrito en distintos hongos. En *P. blakesleeanus* los análisis genéticos de mutantes con un mayor contenido en β -caroteno en la oscuridad los han distribuido en tres genes, *carS* (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976), *carD* (Salgado, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989) y *carF* (Mehta *et al.*, 1997). Se han descrito mutantes similares en *B. trispora* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995; Mehta, Obraztsova y Cerdá-Olmedo, 2003) y *M. circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Fraser *et al.*, 1996), pero el aumento en la producción respecto a la estirpe silvestre es sólo de tres a cuatro veces, comparado con las cien veces de diferencia que se llega a alcanzar en algunos mutantes *carS* o *carF* en *P. blakesleeanus*. Los mutantes *carS* de *P. blakesleeanus* están afectados en una enzima que utiliza el β -caroteno para la síntesis de otros compuestos no coloreados y no en una proteína reguladora. Por ese mismo motivo, los mutantes de los genes *carB* o del dominio ciclasa de *carRA* acumulan los sustratos de las correspondientes enzimas (fitoeno y licopeno, respectivamente)

en cantidades muy superiores a las de β -caroteno en la estirpe silvestre de la que proceden.

El primer gen implicado en la regulación de la síntesis de carotenoides en los hongos, ajeno a la regulación por luz, fue *crgA* de *M. circinelloides* (Navarro *et al.*, 2000), que codifica una proteína de la familia “RING finger” con un dominio LON. La pérdida de CrgA produce un incremento en los niveles de ARNm de los genes estructurales *carRA* y *carB*, aunque siguen conservando su respuesta a la luz (Navarro, Ruiz-Pérez y Torres-Martínez, 2001; Lorca-Pascual *et al.*, 2004). De acuerdo con las características de la proteína, se ha propuesto que CrgA ejerce su función interaccionando con proteínas diana y provocando su ubiquitinación, lo que puede conducir a su degradación por el proteosoma (Lorca-Pascual *et al.*, 2004). Además, se ha observado que CrgA inactiva a MCWC-1B por proteólisis independiente de ubiquitinación (Silva *et al.*, 2008). CrgA no es un regulador exclusivo de la carotenogénesis, ya que afecta también a otros procesos, como el crecimiento vegetativo y la esporulación (Quiles-Rosillo, Torres-Martínez y Garre, 2003; Murcia-Flores *et al.*, 2007). Proteínas similares a CrgA se encuentran en otros mucorales, como *B. trispora* (Quiles-Rosillo *et al.*, 2005).

En *F. fujikuroi* y *F. oxysporum* se han descrito mutantes superproductores de neurosporaxantina, genéricamente llamados *carS* (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012). Los mutantes *carS*, que acumulan cantidades elevadas de carotenoides con independencia de las condiciones de cultivo, poseen niveles anormalmente altos de los ARNm de los genes de la ruta (Prado *et al.*, 2004; Thewes *et al.*, 2005; Prado-Cabrero *et al.*, 2007a), lo que se refleja en una elevada actividad carotenogénica *in vitro* (Ávalos *et al.*, 1988). De forma similar a como se observó para los mutantes

crgA de *M. circinelloides*, los genes estructurales de la carotenogénesis de *F. fujikuroi* y *F. oxysporum* son capaces aun de responder a la luz en los mutantes *carS* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007a; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012). El fenotipo *carS* de ambas especies suele deberse a mutaciones en un gen para una proteína de la familia RING Finger, emparentada con CrgA y denominada CarS (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012; Rodríguez-Ortiz, Limón y Ávalos, 2013). El grado de similitud de CarS con CrgA no es muy alto, pero cubre toda la proteína y sus dominios principales, lo que sugiere un origen evolutivo común. A pesar de su llamativo fenotipo, no se han descrito mutantes *carS* en otras especies de *Fusarium*. En *F. fujikuroi*, los mutantes *carS* están también afectados en la producción de otros metabolitos secundarios, como las giberelinas y las bikaverinas, (Candau, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1991; Rodríguez-Ortiz, Limón y Ávalos, 2009), pero no muestran alteraciones en el desarrollo o en la esporulación.

En *N. crassa* no existen mutantes superproductores de neurosporaxantina equiparables a los mutantes *carS* de *Fusarium*, pero se han descrito mutantes con patrones parcialmente desregulados en la oscuridad o en la luz. Los mutantes *ccb-1* y *cbb-2* poseen niveles de carotenoides ligeramente desregulados en la oscuridad, aunque no muestran más cantidad de ARNm de los genes estructurales (Linden, Rodríguez-Franco y Macino, 1997). De ellos, sólo *ccb-2* acumula más cantidad de carotenoides también en la luz, en este caso con un aumento apreciable de los niveles de ARNm. Otros mutantes no muestran cambios en la oscuridad pero producen más carotenoides en la luz. A esta clase pertenecen los mutantes *ovc* (Harding *et al.*, 1984) y *vvd*, este último ya mencionado por su participación en el mecanismo de fotoadaptación. El mutante *ovc* es más complejo, ya que presenta además alteraciones del desarrollo y en la sensibilidad

al estrés osmótico (Youssar *et al.*, 2005) y se debe a una delección que abarca una veintena de genes (Youssar y Ávalos, 2007). Entre ellos se encuentra el gen *cut-1*, responsable de las alteraciones adicionales e indirectamente también de la superproducción de carotenoides. También se puede aumentar la producción de carotenoides en *Neurospora* al mejorar la provisión de sustrato mediante el incremento de la actividad biosintética de mevalonato a partir del HMG-CoA (Wang y Keasling, 2002), o sometiendo el hongo a estrés oxidativo.

Activación química de la carotenogénesis

En los hongos mucorales *P. blakesleeanus* y *B. trispora*, la presencia de algunos compuestos químicos aumenta la producción de la síntesis de β -caroteno. En el caso de *P. blakesleeanus* hay al menos dos familias de compuestos químicos inductores con distintos mecanismos de acción: los retinoides y los fenoles (Bejarano *et al.*, 1988). Los retinoides, como el retinol y la β -ionona (Eslava, Álvarez y Cerdá-Olmedo, 1974), tienen en común la presencia de un anillo β y pueden actuar compitiendo con el β -caroteno para unirse a alguna enzima o proteína reguladora. Por otra parte, los compuestos fenólicos poseen una eficacia muy variable y no se ha identificado una característica química común que esté ausente en los fenoles inactivos y que se pueda, por lo tanto, asociar a su actividad (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986). Los más eficientes son el veratrol y el ftalato de dimetilo, cuya acción independiente de los retinoides se pone de manifiesto por el efecto aditivo producido en presencia de ambos tipos de activadores (Bejarano *et al.*, 1988).

Debido al uso biotecnológico de *B. trispora* para la producción de carotenoides, la activación química de la carotenogénesis ha recibido una atención muy considerable en esta especie.

El retinol ejerce también un efecto activador (Choudhari, Ananthanarayan y Singhal, 2008), aunque no es tan eficaz como en *P. blakesleeanus* (Bejarano *et al.*, 1988), y los fenoles carecen de efecto. Una búsqueda sistemática de activadores de la carotenogénesis en *B. trispora* encontró un efecto estimulador en la β -ionona así como en una gran diversidad de compuestos químicos, entre los que figuran amidas, imidas, lactamas, hidrazidas y derivados de las piradinas (Ninet, Renaut y Tissier, 1969). Más recientemente, se han encontrado también efectos inductores en el uso de surfactantes, como el monolaureato de sorbitano (Choudhari, Ananthanarayan y Singhal, 2008), el ácido araquidónico (Hu, Sun *et al.*, 2012) y el fungicida ketoconazol (Dong *et al.*, 2008), cada uno de ellos atribuible a distintos mecanismos de acción.

Un caso especialmente relevante de activación química de la carotenogénesis es el llevado a cabo en los mucorales por los ácidos trispóricos, hormonas sexuales sintetizadas tras la interacción entre estirpes de sexo contrario (Sutter, Harrison y Galasko, 1974; Sutter, 1987). En algunas especies, dichas hormonas provocan una fuerte activación en la acumulación de β -caroteno (Blakeslee, 1904). En *P. blakesleeanus*, los cultivos conjuntos de dos estirpes de sexo opuesto (cultivos "mixtos") contienen cinco veces más carotenoides que los cultivos individuales (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986), un aumento debido a un mayor nivel de expresión de los genes *carRA* y *carB* (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008), y al consiguiente incremento en actividad enzimática (Salgado *et al.*, 1991). La estimulación es producida también por la adición de las hormonas o de moléculas análogas a éstas a los cultivos individuales tanto de *P. blakesleeanus* (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) como de otros mucorales (Sahadevan *et al.*, 2013). En *P. blakesleeanus* la estimulación sexual de la carotenogénesis en los cultivos mixtos es aún mayor en los

heterocariontes sexuales, es decir, aquellos con núcleos de ambos sexos en el mismo citoplasma, muy especialmente si los núcleos llevan mutaciones en el gen *carS* (Murillo *et al.*, 1978).

La estimulación de la producción de β -caroteno en los cultivos mixtos es particularmente eficaz en *B. trispora* (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 2004), una circunstancia aprovechada por la industria para su producción a gran escala. Como en *P. blakesleeanus*, la estimulación es una consecuencia del fuerte incremento en los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* (Schmidt *et al.*, 2005) y de las consiguientes actividades enzimáticas (Breitenbach, Fraser y Sandmann, 2012). La estimulación es aún mayor si los cultivos mixtos se realizan con mutantes con mayor contenido de caroteno, tanto empleando cultivos mixtos como heterocariontes (Mehta, Obraztsova y Cerdá-Olmedo, 2003). Los mismos métodos de cultivo permiten usar *B. trispora* para la producción de licopeno en lugar de β -caroteno bloqueando la actividad ciclasa por medios químicos o genéticos (Mehta, Obraztsova y Cerdá-Olmedo, 2003; Choudhari, Ananthanarayan y Singhal, 2008). La existencia del mismo mecanismo de estimulación sexual haría de *P. blakesleeanus* un organismo igualmente propicio para la producción industrial de carotenoides, y sus mutantes superproductores alcanzan niveles de carotenoides mayores que sus equivalentes en *B. trispora*. Sin embargo, la síntesis de carotenoides en *P. blakesleeanus* es particularmente eficaz en cultivos en superficie, pero no tanto en cultivos sumergidos (Lilly, Barnett y Krause, 1960), usualmente preferidos por la industria fermentativa.

Regulación a nivel de desarrollo

Los hongos poseen distintas etapas de desarrollo en sus ciclos de vida, en algunos casos asociados a la regulación

de la síntesis de carotenoides. Como ya se mencionó, en *P. blakesleeanus* el micelio se vuelve insensible a la fotoinducción de la síntesis de β -caroteno cuando se inicia la formación de los esporangióforos (Bejarano *et al.*, 1991). Por el contrario, en *Sclerotinia sclerotiorum*, el contenido en β -caroteno aumenta en la fase de diferenciación, en la que se forman los esclerocios (Georgiou *et al.*, 2001a).

En *N. crassa*, la producción de neurosporaxantina está asociada a la producción de conidios de forma independiente a la presencia de luz. Ambos tipos de regulación se ponen en evidencia en los mutantes *wc-1*, incapaces de fotoinducir la síntesis de esta xantofila en las hifas, pero capaces de acumularla en las esporas tanto en presencia de luz como en oscuridad. La conidiación está reprimida en los cultivos sumergidos y se estimula en las hifas aéreas. A las 16 horas de exposición al aire se induce la expresión de los genes *al-1* y *al-2*, aunque el micelio esté en la oscuridad (Li y Schmidhauser, 1995). Dicha inducción no se observa en los mutantes *fluffy* o *fluffyoid*, los cuales están bloqueados en la inducción del proceso de conidiación. La regulación independiente por luz y desarrollo es especialmente patente en el caso del gen *al-3*, para el que se han encontrado transcritos específicos para cada activación debidos a sitios distintos de inicio de la transcripción (Arpaia, Carattoli y Macino, 1995; Li, Sachs y Schmidhauser, 1997), lo que implica mecanismos reguladores independientes. Además de los diferentes sitios de inicio de la transcripción, se han encontrado indicios de sitios alternativos de inicio de la traducción en el mismo gen, que podrían indicar también diferencias regulatorias (Vittorioso *et al.*, 1994). No se han detectado transcritos de *al-3* en los conidios maduros, lo que sugiere que los carotenoides se acumulan durante su proceso de desarrollo, pero el gen conserva la capacidad para responder a la luz en el conidio (Baima *et al.*, 1992).

El AMP cíclico (AMPc) es una importante señal en el desarrollo de los hongos. Las mutaciones en el gen de la ciclasa de adenilato en algunas especies dan lugar a alteraciones en el desarrollo y el crecimiento y a cambios en la síntesis de carotenoides. Así, los mutantes de dicho gen, *cr-1* en *N. crassa* (Kritsky *et al.*, 1982) y *acyA* en *F. fujikuroi* (García-Martínez, Ádám y Ávalos, 2012), contienen más carotenoides en la oscuridad. En *F. fujikuroi*, además, da lugar a una menor respuesta a la luz, mientras que en *N. crassa* los niveles de AMPc aumentan durante la fotoinducción de la carotenogénesis y la fotorrespuesta se reduce en presencia de AMPc exógeno (Harding, 1973). También se han observado conexiones regulatorias en otros genes asociados a la señalización por AMPc. La sobreexpresión del gen *gna-1* de *N. crassa*, que codifica la proteína G α de un complejo G heterotrimérico, da lugar a hifas aéreas más largas y a una reducción en el desarrollo de conidios y en la producción de carotenoides (Yang y Borkovich, 1999). Por otra parte, la mutación del gen *dcc-1*, que codifica una quinasa de histidina, produce un aumento tanto de la conidiación como de la producción de carotenoides, y este efecto es revertido por adición de AMPc exógeno (Barba-Ostria, Lledias y Georgellis, 2011).

Regulación por condiciones ambientales

Las condiciones de cultivo pueden afectar a la producción de carotenoides de forma distinta en diferentes hongos. Un ejemplo significativo se encuentra en el efecto de la temperatura. La síntesis de neurosporaxantina en respuesta a la luz se reduce en *F. aquaeductuum* cuando disminuye la temperatura (Rau, 1962), sin embargo, en *N. crassa* se observa el efecto contrario: la fotoinducción es tanto más eficiente cuanto más baja es la temperatura a la que se ilumina el cultivo, alcanzado la respuesta óptima entre 6 y 12 °C

(Harding, 1974). Este efecto requiere síntesis de proteínas *de novo*, ya que no tiene lugar en presencia de cicloheximida. Es interesante resaltar que la iluminación de *N. crassa* a baja temperatura no sólo produce la síntesis de mayores cantidades de carotenoides, sino que la proporción de neurosporaxantina en la mezcla de carotenoides es mayor. Esta circunstancia ha facilitado el estudio de mutantes en pasos tardíos de la ruta, como los afectados en los genes *cao-2* (Saelices *et al.*, 2007) e *ylo-1* (Estrada *et al.*, 2008b), que acumulan así el carotenoide intermediario de forma más limpia. Además, en *N. crassa* se ha observado que la temperatura determina el orden en el que se producen las reacciones (Estrada *et al.*, 2008a): a baja temperatura la ciclación por AL-2 se produce en último lugar y CAO-2 lleva a cabo la rotura oxidativa sobre el 3,4-didehidrolicopeno en lugar de sobre el toruleno. De esta forma, los precursores inmediatos de la neurosporaxantina son el apo-4'-licopenal y el ácido apo-4'-licopenoico (figura 2). Por el contrario, a alta temperatura el 3,4-didehidrolicopeno es reconocido preferentemente por el dominio ciclasa de AL-2 para producir toruleno.

En *F. fujikuroi*, la síntesis de neurosporaxantina es estimulada por la escasez de nitrógeno, una señal nutricional que controla la síntesis de otros metabolitos, como las giberelinas o la bikaverina. Este efecto a nivel de carotenogénesis se descubrió inicialmente en cultivos con micelio inmovilizado, en los que se observó que la mayor producción de carotenoides en escasez de nitrógeno decae si se añade este nutriente (Garbayo *et al.*, 2003). Resultados similares se encontraron en experimentos de intercambio del micelio inmovilizado entre condiciones de presencia o ausencia de nitrógeno. En otros experimentos se observó que la síntesis de carotenoides, tanto de la estirpe silvestre como de mutantes superproductores, es mayor en medio con una baja relación N/C, y que la inducción

por escasez de nitrógeno es independiente y aditiva con la inducción por la luz (Rodríguez-Ortiz, Limón y Ávalos, 2009). Además, la transferencia del micelio de un medio con nitrógeno a una solución de glucosa produce un aumento rápido aunque transitorio de los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB*. La carotenogénesis también es reprimida por nitrógeno en *N. crassa*, como indican los mayores niveles de ARNm de los genes *al-1* y *al-2* en condiciones de escasez de este nutriente (Sokolovsky *et al.*, 1992). Este efecto se observa también en los mutantes del complejo WC, indicando que también en *N. crassa* la inducción por escasez de nitrógeno es independiente de la inducción por luz.

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS CAROTENOIDES EN LOS HONGOS

En los organismos fotosintéticos, los carotenoides desempeñan papeles importantes en la fotosíntesis, como por ejemplo en la captación de luz y en la fotoprotección de la maquinaria fotosintética, entre otros procesos (Domonkos *et al.*, 2013). Además, en las plantas superiores, los carotenoides proporcionan colores llamativos a muchas flores y frutos, ayudando a su ciclo de vida mediante la atracción de insectos para la polinización y la dispersión de las semillas. En los animales, los carotenoides ingeridos en la dieta sirven de fuente de retinoides, con importantes papeles en la visión (vitamina A) y en el desarrollo (ácido retinoico) (Blomhoff y Blomhoff, 2006), además de proporcionar pigmentación en algunos casos. En lo que respecta a los hongos, los carotenoides no desempeñan funciones vitales. Así lo indica tanto la ausencia de estos pigmentos en algunas especies como la viabilidad de los mutantes albinos, como los descritos en *F. fujikuroi* (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987),

P. blakesleeanus (Cerdá-Olmedo, 1987) o *X. dendrorhous* (Johnson, 2003). Sin embargo, la frecuencia de la síntesis de carotenoides en los hongos sugiere funciones biológicas relevantes. Se resumen a continuación las funciones mejor conocidas.

El β -caroteno como precursor de las hormonas sexuales en los mucorales

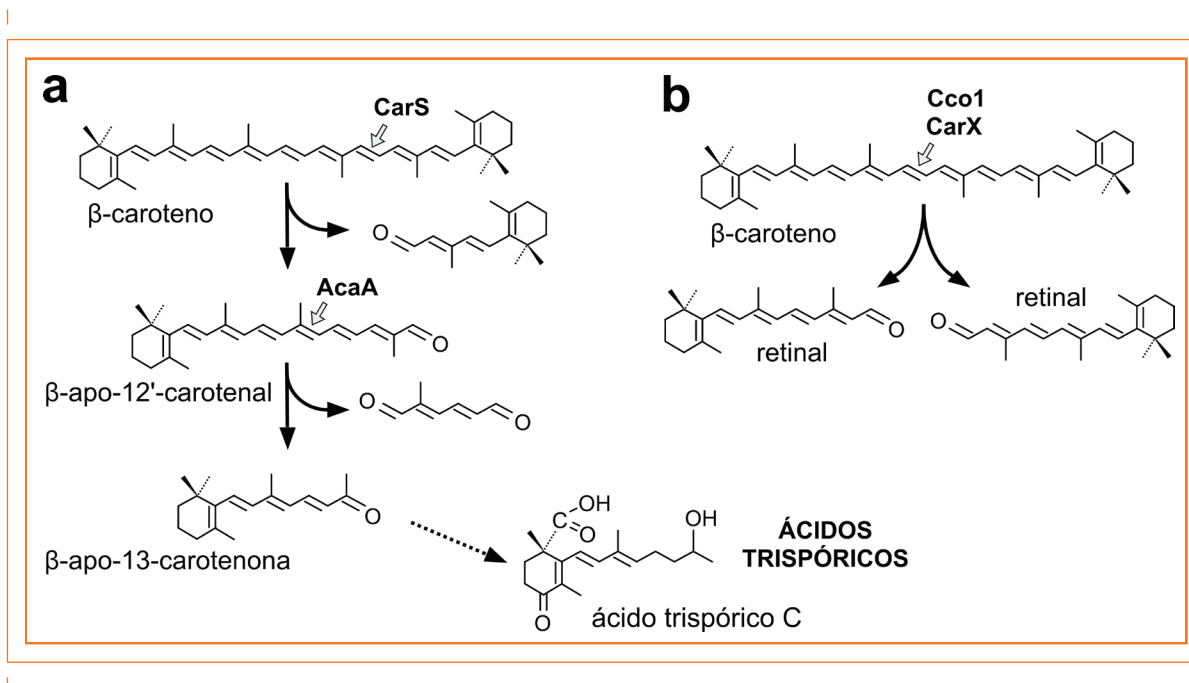
Los ácidos trispóricos, hormonas sexuales de los mucorales mencionadas antes, se sintetizan a partir de β -caroteno, y ésta es posiblemente la principal función de este caroteno en dicho grupo taxonómico. Estos compuestos pertenecen a una familia químicamente compleja (Austin, Bu'Lock y Winstanley, 1969; Austin, Bu'Lock y Drake, 1970), denominada trisporoides. En función de diferentes modificaciones químicas, los ácidos trispóricos se clasifican en varios tipos, denominados por las letras A, B, C, D y E (Caglioti *et al.*, 1966; Austin, Bu'Lock y Winstanley, 1969; Sutter *et al.*, 1989). La síntesis de estas hormonas se ha estudiado en detalle en *B. trispora*, en cuyos cultivos se encuentran diferentes derivados del metabolismo del β -caroteno, incluyendo trisporoides de 18 carbonos, ciclofarnesoides de 15 carbonos y metilhexanoides de siete carbonos (Barrero *et al.*, 2011). Compuestos parecidos se han identificado en los cultivos de *P. blakesleeanus* (Polaino *et al.*, 2012).

La ruta biosintética de los ácidos trispóricos comienza con la rotura oxidativa del β -caroteno, un tipo de reacción llevada a cabo por enzimas de la familia de las oxigenasas de carotenoides. La enzima a cargo de esta reacción se identificó por primera vez en *Rhizopus oryzae* y *B. trispora*, y se denominó Tsp3 (Burmester *et al.*, 2007). El gen *tsp3* se activa en los cultivos mixtos en ambas especies y en el caso

de *B. trispora*, mediante su expresión heteróloga en una estirpe de *E. coli* productora de β -caroteno, se demostró la capacidad de la enzima Tsp3 para cortar dicha molécula. Posteriormente, el análisis químico de los apocarotenoides presentes en cultivos mixtos de *P. blakesleeanus*, muy especialmente el hallazgo de derivados de siete átomos de carbono, llevó a postular la existencia de dos reacciones de corte consecutivas sobre los dobles enlaces 11',12' y 12,13 de la molécula (Polaino *et al.*, 2010) (figura 4). El gen *tsp3* de *P. blakesleeanus* resultó ser *carS*, ya mencionado, y el fenotipo superproductor de β -caroteno de los mutantes de este gen se debe por lo tanto a la ausencia de su rotura enzimática (Tagua *et al.*, 2012). La identidad del gen se confirmó tanto por el hallazgo de mutaciones en varios mutantes *carS* independientes como por la capacidad de producir β -apo-12'-carotenal cuando se expresa en *E. coli*

modificada para producir β -caroteno (Medina, Cerdá-Olmedo y Al-Babili, 2011). Posteriormente se confirmó la misma reacción enzimática para Tsp3 en *B. trispora* (Sahadevan *et al.*, 2013). En *P. blakesleeanus*, el β -apo-12'-carotenal es objeto de una nueva reacción de corte, llevada a cabo por una segunda oxigenasa de carotenoides, AcaA, para producir un apocarotenoide de 18 átomos de carbono, la β -apo-13-carotenona (Medina, Cerdá-Olmedo y Al-Babili, 2011), que es objeto de nuevas reacciones químicas para dar lugar a los ácidos trispóricos. El otro apocarotenoide resultante de esta serie de reacciones posee 15 átomos de carbono, y es el precursor de los ciclofarnesoides, una familia de compuestos químicos cuya función es desconocida. Reacciones similares muy probablemente se producen en otros mucorales, como *B. trispora*.

FIGURA 4. Metabolismo del β -caroteno como intermediario en la síntesis de otros compuestos: a) primeros pasos del corte oxidativo del β -caroteno para la síntesis de los ácidos trispóricos. Se muestra el ácido trispórico B como ejemplo representativo de esta familia. Se indican con flechas grises los sitios de corte reconocidos por las oxigenasas CarS y AcaA en *P. blakesleeanus*; b) producción de retinal tras el corte simétrico del β -caroteno realizado por las enzimas CarX de *F. fujikuroi* y Cco1 de *U. maydis*.



Los genes y enzimas responsables de los pasos posteriores en la ruta de los ácidos trispóricos son actualmente objeto de investigación. Entre las enzimas figura la deshidrogenasa de 4-dihidrometiltrisporato, Tsp1, purificada de cultivos de *Mucor mucedo* estimulados por ácidos trispóricos (Czempinski *et al.*, 1996). El análisis del gen *tsp1* mostró que la estimulación sexual se produce a nivel de actividad enzimática y no de transcripción (Schimek *et al.*, 2005). Experimentos similares permitieron identificar también *tsp2*, el gen de la deshidrogenasa de 4-dihidrotrisporina, en este caso regulado tanto a nivel de transcripción como de actividad enzimática (Wetzel *et al.*, 2009). Genes similares se encuentran en *P. blakesleeanus* (Polaino, 2009) y en otros mucorales (Schimek y Wöstemeyer, 2009).

El β -caroteno como precursor de retinal

El retinal es un apocarotenoide de 20 átomos de carbono, procedente normalmente de la rotura simétrica del β -caroteno (figura 4b) (Von Lintig, 2012). Además del precursor de otros apocarotenoides, el retinal es el cromóforo de las opsinas, una extensa familia de fotorreceptores de membrana con diferentes funciones en los principales grupos taxonómicos, tanto en bacterias y arqueas como en eucariotas (Ernst *et al.*, 2014). En los animales, las opsinas desempeñan un papel fundamental en la visión, ya que son responsables de la detección de luz en la retina. Muchos hongos poseen también proteínas de la familia de las opsinas, supuestamente dependientes de retinal para ejercer su función (Brown, 2004). Entre ellas han recibido especial atención NOP-1 en *N. crassa* (Bieszke *et al.*, 1999; 1999a), OPS en *Leptosphaeria maculans* (Waschuk *et al.*, 2005) y CarO (Prado *et al.*, 2004) y OpsA (Estrada y Ávalos, 2009) en *F. fujikuroi*. La presencia de opsinas sugiere la existencia en estos hongos de una oxigenasa de carotenoides capaz de

formar retinal. Aunque la neurosporaxantina es el carotenoide acumulado mayoritariamente en *F. fujikuroi* y *N. crassa*, en estos hongos se han detectado pequeñas cantidades de γ -caroteno (Mitzka y Rau, 1977; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987), lo que implica que sus ciclasas pueden introducir un segundo anillo en la molécula de γ caroteno. En el caso de *N. crassa*, estudios *in vitro* mostraron que la desaturasa AL-1 no reconoce el γ -caroteno como sustrato para producir toruleno (Hausmann y Sandmann, 2000), lo que indica que la neurosporaxantina se sintetiza a través del 3,4-didehidrolicopeno y que el destino del γ -caroteno es su acumulación o su conversión a β -caroteno. A diferencia de *N. crassa* y *F. fujikuroi*, no hay información sobre síntesis de carotenoides en *L. maculans*, aunque la síntesis de β -caroteno en *L. michotii* (Jerebzoff-Quintín y Jerebzoff, 1980) sugiere una actividad biosintética similar en el primero.

La primera oxigenasa de carotenoides identificada en hongos capaz de producir retinal fue CarX en *F. fujikuroi* (Thewes *et al.*, 2005; Prado-Cabrero *et al.*, 2007a). En este hongo, la función de la carotenogénesis para producir retinal se pone en evidencia por la organización genética del gen *carX* formando un agrupamiento génico (*cluster*) con los dos genes necesarios para producir β -caroteno, *carRA* y *carB*, y con el gen de la opsina CarO. Los cuatro genes del *cluster* están sujetos a un mismo mecanismo de regulación por luz, bajo control del producto del gen *carS*. El basidiomiceto *U. maydis* posee tres genes para opsinas, y una enzima capaz también de producir retinal a partir de β -caroteno (Estrada *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha identificado aún la enzima responsable de la síntesis de retinal en *N. crassa*.

El papel del β -caroteno como precursor de retinal traslada su función biológica al papel que desempeñan las opsinas en los hongos. Sin embargo, los intentos por averiguar el papel

biológico de opsinas fúngicas mediante experimentos de mutagénesis dirigida no han dado resultados (Bieszke *et al.*, 1999a; Prado *et al.*, 2004; Estrada y Ávalos, 2009), ya que los mutantes muestran fenotipo silvestre en las condiciones de cultivo en laboratorio.

Los carotenoides como antioxidantes

Una característica especialmente conocida de los carotenoides es su potencial como agentes protectores frente al estrés oxidativo (Edge, McGarvey y Truscott, 1997; Young y Lowe, 2001). Como todos los seres vivos, los hongos poseen enzimas destinadas a contrarrestar las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas por el metabolismo normal de la célula. Entre ellas han recibido especial atención las catalasas y las dismutasas de superóxido (SOD) (Gessler, Sokolov y Belozerskaya, 2002; Hansberg, Salas-Lizana y Domínguez, 2012). Sin embargo, numerosas pruebas indirectas apoyan un papel auxiliar de los carotenoides como protectores del estrés oxidativo en hongos de diferentes grupos taxonómicos. En muchos casos se ha observado una correlación positiva entre los niveles de estrés oxidativo y la acumulación de carotenoides. Como ejemplos representativos, la presencia de peróxido de hidrógeno en los cultivos incrementa la producción de β -caroteno en *B. trispora* (Jeong *et al.*, 1999), astaxantina en *X. dendrorhous* (Liu y Wu, 2006) 2 y neurosporaxantina en *N. crassa* (ligusa, Yoshida y Hasunuma, 2005) y en *F. aquaeductuum* (Bindl, Lang y Rau, 1970). Un efecto parecido se observa en las estirpes afectadas en su capacidad de actuar contra las ROS, como los mutantes carentes de la enzima SOD-1 (Yoshida y Hasunuma, 2004) o de la catalasa CAT-3 (Michán, Lledías y Hansberg, 2003) en *N. crassa*. En *B. trispora* varios indicios asocian el estrés oxidativo al contenido en β -caroteno: el aumento de oxígeno en el cultivo (Nanou y

Roukas, 2011) o la adición de hydroxitolueno butilado (Nanou y Roukas, 2010) aumentan los niveles tanto de catalasa y SOD como de β -caroteno. Sin embargo, dichas actividades enzimáticas son menores en los cultivos mixtos que en los cultivos individuales, mientras que la adición de inhibidores de actividad SOD produce un aumento en el contenido en β -caroteno (Gessler, Sokolov y Belozerskaya, 2002). Un resultado especialmente concluyente es el aumento en la resistencia al peróxido de hidrógeno manifestado por estirpes de *S. cerevisiae* a las que se han introducido artificialmente genes para la producción de carotenoides (Ukibe *et al.*, 2009).

La inducción de la síntesis de carotenoides por la luz puede estar asociada a un aumento de la oxidación. En *N. crassa*, la luz produce un efecto negativo sobre la respiración, tanto en micelio como en preparaciones de mitocondrias, y este efecto es más acusado en los mutantes albinos que en los controles silvestres (Ramadan-Talib y Prebble, 1978). En consonancia con su efecto perjudicial, la luz aumenta los niveles de catalasas y de SOD (Gessler, Sokolov y Belozerskaya, 2002), y además los efectos del estrés oxidativo sobre la síntesis de carotenoides son sólo patentes en estas condiciones (Yoshida y Hasunuma, 2004; ligusa, Yoshida y Hasunuma, 2005). Los efectos pueden ser especialmente acusados en el caso de la radiación UV. Como ya se ha indicado, los conidios de *N. crassa* acumulan carotenoides con independencia de la iluminación. Es muy significativo que los conidios albinos sean más sensibles que los pigmentados a la exposición a luz blanca en presencia de agentes fotosensibilizadores, como el azul de metileno, o la radiación UV-A en ausencia de estos compuestos. En consonancia con este resultado, se ha encontrado una correlación entre el contenido en carotenoides de diferentes estirpes silvestres de *Neurospora* y la latitud a la que se aislaron (Luque *et al.*, 2012). Las estirpes procedentes

de latitudes más altas producen menos carotenoides y sus conidios son más sensibles a la radiación UV. Resultados parecidos se han obtenido en otros hongos. Así, las células de *Wangiella dermatidis* que contienen carotenoides son más resistentes a la radiación UV que las no pigmentadas (Geis y Szaniszlo 1984), y las estirpes naturales de *Sporobolomyces*

ruberrimus y *Cystofilobasidium capitatum* son tanto más resistentes a la radiación UV-B cuanto mayor es su contenido en carotenoides (Moliné *et al.*, 2009). Considerados en su conjunto, estos y otros datos publicados respaldan un efecto protector de la carotenoides frente a daños producidos por la luz visible y por la radiación UV.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de los coautores ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (proyectos BIO2006-01323, y BIO2009-11131, BIO2012- 39716) y la Junta de Andalucía (proyectos P07-CVI-02813 y CTS-6638).

REFERENCIAS

- Aasen, A.J. y Jensen, S.L. 1965. *Acta Chem. Scand.*, 19: 1843-1853.
- Ádám, A.L., García-Martínez, J., Szücs, E.P., Ávalos, J., Hornok, L. 2011. *FEMS Microbiol. Lett.*, 318: 76-83.
- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., et al. 2008. *BMC Microbiol.*, 8: 169.
- Almeida, E.R. y Cerdá-Olmedo, E. 2008. *Curr. Genet.*, 53: 129-137.
- Álvarez, V., Rodríguez-Sáiz, M., De la Fuente, J.L., Gudina, E.J., Godio, R.P., Martín, J.F., et al. 2006. *Fungal Genet. Biol.*, 43: 261-272.
- Aragón, C.M., Murillo, F.J., De la Guardia, M.D., Cerdá-Olmedo, E. 1976. *Eur. J. Biochem.*, 63: 71-75.
- Arpaia, G., Carattoli, A., Macino, G. 1995. *Dev. Biol.*, 170: 626-635.
- Arpin, N., Lebreton, P., Fiasson, J.L. 1966. *Bull. Soc. Mycol. Fr.*, 82: 450-459.
- Arpin, N. y Liaaen-Jensen, S. 1967. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 49: 527-536.
- Arrach, N., Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E., Ávalos, J. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 1687-1692.
- Arrach, N., Schmidhauser, T.J., Ávalos, J. 2002. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 914-921.
- Austin, D.G., Bu'Lock, J.D., Winstanley, D.J. 1969. *Biochem. J.*, 113: 34P.
- Austin, D.J., Bu'Lock, J.D., Drake, D. 1970. *Experientia*, 26: 348-349.
- Ávalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. 1986. *Phytochemistry*, 25: 1837-1841.
- Ávalos, J., Cerdá-Olmedo, E. 1987. *Curr. Genet.*, 25: 1837-1841.
- Ávalos, J., Mackenzie, A., Nelki, D.S., Bramley, P.M. 1988. *Biochim. Biophys. Acta*, 966: 257-265.
- Ávalos, J., Schrott, E.L. 1990. *FEMS Microbiol. Lett.*, 66: 295-298.
- Ávalos, J., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1993. *Methods Enzymol.*, 214: 283-294.
- Ávalos, J., Cerdá-Olmedo, E. 2004. En D.K. Arora (ed.). *Handbook of Fungal Biotechnology*, pp. 367-378. Nueva York: Marcel Dekker.
- Ávalos, J. y Estrada, A.F. 2010. *Fungal Genet. Biol.*, 47: 930-938.
- Ávalos, J. y Corrochano, L.M. 2013. En D.P. Kasbekar y K. McCluskey (eds.). *Neurospora: Genomics and Molecular Biology* pp. 227-241. Norfolk: Caister Academic Press.

REFERENCIAS

- Baima, S., Macino, G., Morelli, G. 1991. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 11: 107-115.
- Baima, S., Carattoli, A., Macino, G., Morelli, G. 1992. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 15: 233-238.
- Barba-Ostria, C., Lledias, F., Georgellis, D. 2011. *Eukaryot. Cell*, 10: 1733-1739.
- Barbato, C., Calissano, M., Pickford, A., Romano, N., Sandmann, G., Macino, G. 1996. *Mol. Gen. Genet.*, 252: 353-361.
- Barrero, A.F., Herrador, M.M., Arteaga, P., Gil, J., González, J.A., Alcalde, E., *et al.* 2011. *Org. Biomol. Chem.*, 9: 7190-7195.
- Bartley, G.E., Schmidhauser, T.J., Yanofsky, C., Scolnik, P.A. 1990. *J. Biol. Chem.*, 265: 16020-16024.
- Bejarano, E.R., Parra, F., Murillo, F.J., Cerdá-Olmedo, E. 1988. *Arch. Microbiol.*, 150: 209-214.
- Bejarano, E.R., Ávalos, J., Lipson, E.D., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Planta*, 183: 1-9.
- Bhosale, P.B. y Gadre, R. V. 2001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55: 423-427.
- Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O., Orkovich, K.A. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 8034-8039.
- Bieszke, J.A., Spudich, E.N., Scott, K.L., Borkovich, K.A., Spudich, J.L. 1999a. *Biochemistry*, 38: 14138-14145.
- Bindl, E., Lang, W., Rau, W. 1970. *Planta*, 94: 156-174.
- Blakeslee, A.F. 1904. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, 40: 205-319.
- Blasco, J.L., Roessink, D., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., Galland, P. 2001. *J. Plant Res.*, 114: 25-31.
- Blomhoff, R. y Blomhoff, H.K. 2006. *J. Neurobiol.*, 66: 606-630.
- Breitenbach, J., Fraser, P.D., Sandmann, G. 2012. *Phytochemistry*, 76: 40-45.
- Brown, L.S. 2004. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3: 555-565.
- Burmester, A., Richter, M., Schultze, K., Voelz, K., Schachtschabel, D., Boland, W., *et al.* 2007. *Fungal Genet. Biol.*, 44: 1096-1108.
- Buzzini, P., Innocenti, M., Turchetti, B., Libkind, D., van Broock, M., Mulinacci, N. 2007. *Can. J. Microbiol.*, 53: 1024-1031.
- Caglioti, L., Cainelli, G., Camerino, B., Mondelli, R., Prieto, A., Quilico, A., *et al.* 1966. *Tetrahedron*, 22: 175-187.
- Candau, R., Ávalos, J., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3378-3382.

REFERENCIAS

- Candau, R., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4936-4940.
- Carattoli, A., Cogoni, C., Morelli, G., Macino, G. 1994.. *Mol. Microbiol.*, 13: 787-795.
- Castrillo, M., García-Martínez, J., Ávalos, J. 2013. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 2777-2788.
- Castrillo, M. y Ávalos, J. 2015. *PLoS One* 10: e0119785.
- Cerdá-Olmedo, E. 1985. *Methods Enzymol.*, 110: 220-243.
- Cerdá-Olmedo, E. y Hüttermann, A. 1986. *Angew. Bot.*, 60: 59-70.
- Cerdá-Olmedo, E. 1987. En E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson (eds.). *Phycomyces*, pp. 199-222. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Choudhari, S.M., Ananthanarayan, L., Singhal, R.S. 2008. *Bioresour. Technol.*, 99: 3166-3173.
- Corrochano, L.M. y Garre, V. 2010. *Fungal Genet. Biol.*, 47: 893-899.
- Csérnetics, A., Nagy, G., Iturriaga, E.A., Szekeres, A., Eslava, A.P., Vágvölgyi, C., et al. 2011. *Fungal Genet. Biol.*, 48: 696-703.
- Czempinski, K., Kruft, V., Wöstemeyer, J., Burmester, A. 1996. *Microbiology*, 142: 2647-2654.
- Daub, M.E. y Payne, G.A. 1989. *Phytopathology*, 79: 180-185.
- Davoli, P., Mierau, V., Weber, R.W.S. 2004. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 40: 392-397.
- De Fabo, E.C., Harding, R.W., Shropshire Jr., W. 1976. *Plant Physiol.*, 57: 440-445.
- De la Guardia, M.D., Aragón, C.M., Murillo, F.J., Cerdá-Olmedo, E. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 2012-2015.
- De Miguel, T., Calo, P., Díaz, A., Villa, T.G. 1997. *Microbiologia*, 13: 67-70.
- Degli-Innocenti, F. y Russo, V.E. 1984. *J. Bacteriol.*, 159: 757-761.
- Díaz-Sánchez, V., Estrada, A.F., Trautmann, D., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2011. *FEBS J.*, 278: 3164-3176.
- Díaz-Sánchez, V., Estrada, A.F., Trautmann, D., Limón, M.C., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2011a. *PLoS One*, 6: e21948.
- Domínguez-Bocanegra, A.R., Ponce-Noyola, T., Torres-Muñoz, J.A. 2007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75: 783-791.
- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z., Ughy, B. 2013. *Prog. Lipid Res.*, 52: 539-561.

REFERENCIAS

- Dong, W., Tang, X., Yu, Y., Nilsen, R., Kim, R., Griffith, J., et al. 2008. *PLoS One*, 3: e3105.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. 1997. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 41: 189-200.
- Ehrenshaft, M. y Daub, M.E. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2766-2771.
- El-Jack, M., Mackenzie, A., Bramley, P.M. 1988. *Planta*, 174: 59-66.
- Ernst, O.P., Lodowski, D.T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L.S., Kandori, H. 2014. *Chem. Rev.*, 114: 126-163.
- Eslava, A.P., Álvarez, M.I., Cerdá-Olmedo, E. 1974. *Eur. J. Biochem.*, 48: 617-623.
- Estrada, A.F. y Ávalos, J. 2008. *Fungal Genet. Biol.*, 45: 705-718.
- Estrada, A.F., Maier, D., Scherzinger, D., Ávalos, J., Al-Babili, S. 2008a. *Fungal Genet. Biol.*, 45: 1497-1505.
- Estrada, A.F., Youssar, L., Scherzinger, D., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2008b. *Mol. Microbiol.*, 69: 1207-1220.
- Estrada, A.F. y Ávalos, J. 2009. *J. Mol. Biol.*, 387: 59-73.
- Estrada, A.F., Brefort, T., Mengel, C., Díaz-Sánchez, V., Alder, A., Al-Babili, S., et al. 2010. *Fungal Genet. Biol.*, 46: 803-813.
- Flores, R., Cerdá-Olmedo, E., Corrochano, L.M. 1998. *Phycomyces. Photochem. Photobiol.*, 67: 467-472.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 1994. *Biochim. Biophys. Acta*, 1212: 59-66.
- Fraser, P.D., Ruiz-Hidalgo, M.J., López-Matas, M.A., Álvarez, M.I., Eslava, A.P. Bramley, P.M. 1996. *Biochim. Biophys. Acta*, 1289: 203-208.
- Fraser, P.D., Miura, Y., Misawa, N. 1997. *J. Biol. Chem.*, 272: 6128-6135.
- Frengova, G.I. y Beshkova, D.M. 2009. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 163-180.
- Garbayo, I., Vilchez, C., Nava-Saucedo, J.E., Barbotin, J.N. 2003. *Enzyme Microb. Technol.*, 33: 629-634.
- García-Martínez, J., Ádám, A.L., Ávalos, J. 2012. *PLoS One*, 7: e28849.
- Geis, P.A. y Szaniszló, P.J. 1984. *Mycologia*, 76: 268-273.
- Georgiou, C.D., Tairis, N., Polycratis, A. 2001. *Mycol. Res.*, 105: 1110-1115.
- Georgiou, C.D., Zervoudakis, G., Tairis, N., Kornaros, M. 2001a. *Fungal Genet. Biol.*, 34: 11-20.
- Gessler, N.N., Sokolov, A. V, Y., B. V, Belozerskaya, T.A. 2002. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38: 205-209.
- Goldie, A.H. y Subden, R.E. 1973. *Biochem. Genet.*, 10: 275-284.

REFERENCIAS

- Goodwin, T.W. 1980. *The Biochemistry of the Carotenoids*, Londres: Chapman & Hall.
- Govind, N.S., Cerdá-Olmedo, E. 1986. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2775-2780.
- Han, J.R., Zhao, W.J., Gao, Y.Y., Yuan, J.M. 2005. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 412-417.
- Han, M., He, Q., Hang, W.G. 2012. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 42: 293-303.
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., Domínguez, L. 2012. *Arch. Biochem. Biophys.*, 525: 170-180.
- Harding, R.W., Huang, P.C., Mitchell, H.K. 1969. *Arch. Biochem. Biophys.*, 129: 696-707.
- Harding, R.W. 1973. *Neurospora Newsl.*, 20: 20-21.
- Harding, R.W. 1974. *Plant Physiol.*, 54: 142-147.
- Harding, R.W. y Turner, R. V. 1981. *Plant Physiol.*, 68: 745-749.
- Harding, R.W., Philip, D.Q., Drozdowicz, B.Z., Williams, N.P. 1984. *Neurospora Newsl.*, 31: 23-25.
- Hausmann, A. y Sandmann, G. 2000. *Fungal Genet. Biol.*, 30: 147-153.
- Haxo, F. 1950. *Bot. Gaz.*, 112: 228-232.
- He, Q. y Liu, Y. 2005. *Genes Dev.*, 19: 2888-2899.
- Herz, S., Weber, R.W., Anke, H., Mucci, A., Davoli, P. 2007. *Phytochemistry*, 68: 2503-2511.
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M. 2006. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46: 185-196.
- Hu, X., Sun, J., uan, Q. 2012. *Biotechnol. Lett.*, 34: 2107-2111.
- Huang, P.C. 1964. *Genetics*, 49: 453-469.
- Idnurm, A., Rodríguez-Romero, J., Corrochano, L.M., Sanz, C., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., et al. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 4546-4551.
- Iigusa, H., Yoshida, Y., Hasunuma, K. 2005. *FEBS Lett.*, 579: 4012-4016.
- Iurkov, A.M., Vustin, M.M., Tiaglov, B. V, Maksimova, I.A., Sineokii, S.P. 2008. *Mikrobiologija*, 77: 5-10.
- Jayaram, M., Leutwiler, L., Delbrück, M. 1980. *Photochem. Photobiol.*, 32: 241-245.
- Jeong, J.C., Lee, I.Y., Kim, S.W., Park, Y.H. 1999. *Biotechnol. Lett.*, 21: 683-686.
- Jerebzooff-Quintin, S. y Jerebzooff, S. 1980. *Protoplasma*, 104: 43-54.
- Jin, J.M., Lee, J., Lee, Y.W. 2010. *FEMS Microbiol. Lett.*, 302: 197-202.

REFERENCIAS

- Johnson, E.A. 2003. *Int. Microbiol.*, 6: 169-174.
- Kritsky, M.S., Sokolovsky, V.Y., Belozerskaya, T.A., Chernysheva, E.K. 1982. *Arch. Microbiol.*, 133: 206-208.
- Li, C. y Schmidhauser, T.J. 1995. *Dev. Biol.*, 169: 90-95.
- Li, C., Sachs, M.S., Schmidhauser, T.J. 1997. *Fungal Genet. Biol.*, 21: 101-108.
- Lilly, V.G., Barnett, H.L., Krause, R.F. 1960. *Bull. West Virginia Agric. Exp. Stn.*, 441T: 1-80.
- Linden, H., Rodríguez-Franco, M., Macino, G. 1997. *Mol. Gen. Genet.*, 254: 111-118.
- Linnemannstöns, P., Prado, M.M., Fernández-Martín, R., Tudzynski, B., Ávalos, J. 2002. *Mol. Genet. Genomics*, 267: 593-602.
- Liu, Y.S. y Wu, J.Y. 2006. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73: 663-668.
- López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. 1980. *Planta*, 150: 134-139.
- Lorca-Pascual, J.M., Murcia-Flores, L., Garre, V., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R.M. 2004. *Mol. Microbiol.*, 52: 1463-1474.
- Luque, E.M., Gutiérrez, G., Navarro-Sampedro, L., Olmedo, M., Rodríguez-Romero, J., Ruger-Herreros, C., *et al.* 2012. *PLoS One*, 7: e33658.
- Madhour, A., Anke, H., Mucci, A., Davoli, P., Weber, R.W.S. 2005. *Phytochemistry*, 66: 2617-2626.
- Medina, H.R., Cerdá-Olmedo, E., Al-Babili, S. 2011. *Mol. Microbiol.*, 82: 199-208.
- Mehta, B.J. y Cerdá-Olmedo, E. 1995. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 836-838.
- Mehta, B.J., Salgado, L.M., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3657-3661.
- Mehta, B.J., Obratsova, I.N., Cerdá-Olmedo, E. 2003. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4043-4048.
- Mende, K., Homann, V., Tudzynski, B. 1997. *Mol. Gen. Genet.*, 255: 96-105.
- Meyer, P.S. y Du Preez, J.C. 1994. *Syst. Appl. Microbiol.*, 17: 24-31.
- Michán, S., Lledías, F., Hansberg, W. 2003. *Eukaryot. Cell*, 2: 798-808.
- Mitzka, U. y Rau, W. 1977. *Arch. Microbiol.*, 111: 261-263.
- Moliné, M., Libkind, D., Diéguez, M.C., Van Broock, M. 2009. *J. Photochem. Photobiol. B*, 95: 156-161.
- Moliné, M., Libkind, D., Van Broock, M. 2012. *Methods Mol. Biol.*, 898: 275-283.

REFERENCIAS

- Murcia-Flores, L., Lorca-Pascual, J.M., Garre, V., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R.M. 2007. *J. Biol. Chem.*, 282: 15394-15403.
- Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. 1976. *Mol. Gen. Genet.*, 148: 19-24.
- Murillo, F.J., Calderón, I.L., López-Díaz, I., Cerdá-Olmedo, E. 1978. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 639-642.
- Nanou, K. y Roukas, T. 2010. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 2415-2423.
- Nanou, K. y Roukas, T. 2011. *Bioresour. Technol.*, 102: 8159-8164.
- Navarro, E., Sandmann, G., Torres-Martínez, S. 1995. *Exp. Mycol.*, 19: 186-190.
- Navarro, E., Ruiz-Pérez, V.L., Torres-Martínez, S. 2000. *Eur. J. Biochem.*, 267: 800-807.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J.M., Quiles-Rosillo, M.D., Nicolás, F.E., Garre, V., Torres-Martínez, S., *et al.* 2001. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 463-470.
- Nelson, M.A., Morelli, G., Carattoli, A., Romano, N., Macino, G. 1989. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1271-1276.
- Ninet, L., Renaut, J., Tissier, R. 1969. *Biotechnol. Bioeng.*, 11: 1195-1210.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., *et al.* 2006. *Mol. Genet. Genomics*, 275: 148-158.
- Ootaki, T., Crafts-Lighty, A., Delbrück, M., Hsu, W.J. 1973. *Mol. Gen. Genet.*, 121: 57-70.
- Paietta, J., Sargent, M.L. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78: 5573-5577.
- Paietta, J., Sargent, M.L. 1983. *Plant Physiol.*, 72: 764-766.
- Papp, T., Velayos, A., Bartok, T., Eslava, A.P., Vagvolgyi, C., Iturriaga, E.A. 2006. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 526-531.
- Papp, T., Csernetics, A., Nagy, G., Bencsik, O., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., *et al.* 2013. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97: 4937-4950.
- Polaino, S. 2009. Tesis doctoral Universidad de Sevilla.
- Polaino, S., Herrador, M.M., Cerdá-Olmedo, E., Barrero, A.F. 2010. *Org. Biomol. Chem.*, 8: 4229-4231.
- Polaino, S., González-Delgado, J.A., Arteaga, P., Herrador, M.M., Barrero, A.F., Cerdá-Olmedo, E. 2012. *Org. Biomol. Chem.*, 10: 3002-3009.
- Prado, M.M., Prado-Cabrero, A., Fernández-Martín, R., Ávalos, J. 2004. *Curr. Genet.*, 46: 47-58.

REFERENCIAS

- Prado-Cabrero, A., Estrada, A.F., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2007. *Mol. Microbiol.*, 64: 448-460.
- Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Ávalos, J., Al-Babili, S. 2007a. *Eukaryot. Cell*, 6: 650-657.
- Prado-Cabrero, A., Schaub, P., Díaz-Sánchez, V., Estrada, A.F., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2009. *FEBS J.*, 276: 4582-4597.
- Quiles-Rosillo, M.D., Torres-Martínez, S., Garre, V. 2003. *Fungal Genet. Biol.*, 38: 122-132.
- Quiles-Rosillo, M.D., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S. Garre, V. 2005. *Fungal Genet. Biol.*, 42: 141-153.
- Ramadan-Talib, Z., Prebble, J. 1978. *Biochem. J.*, 176: 767-775.
- Rau, W. 1962. *Planta*, 59: 123-137.
- Rau, W. 1967. *Planta*, 72: 14-28.
- Rau, W., Lindemann, I., Rau-Hund, A. 1968. *Planta*, 80: 309-316.
- Revuelta, J.L. y Eslava, A.P. 1983. *Mol. Gen. Genet.*, 192: 225-229.
- Rodríguez-Ortiz, R., Limón, M.C., Ávalos, J. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 405-413.
- Rodríguez-Ortiz, R., Michielse, C., Rep, M., Limón, M.C., Ávalos, J. 2012. *Fungal Genet. Biol.*, 49: 684-696.
- Rodríguez-Ortiz, R., Limón, M.C., Ávalos, J. 2013. *Mol. Genet. Genomics*, 288: 157-173.
- Rodríguez-Saiz, M., Paz, B., De La Fuente, J.L., López-Nieto, M.J., Cabri, W., Barredo, J.L. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5589-5594.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H. 1993. *Biochem. J.*, 15: 517-524.
- Ruiz-Hidalgo, M.J., Benito, E.P., Sandmann, G., Eslava, A.P. 1997. *Mol. Gen. Genet.*, 253: 734-744.
- Ruiz-Roldán, M.C., Garre, V., Guarro, J., Mariné, M., Roncero, M.I. 2008. *Eukaryot. Cell*, 7: 1227-1230.
- Saelices, L., Youssar, L., Holdermann, I., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2007. *Mol. Genet. Genomics*, 278: 527-537.
- Sahadevan, Y., Richter-Fecken, M., Kaerger, K., Voigt, K., Boland, W. 2013. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 7466-7475.
- Sakaki, H., Kaneno, H., Sumiya, Y., Tsushima, M., Miki, W., Kishimoto, N., et al. 2002. *J. Nat. Prod.*, 65: 1683-1684.
- Salgado, L.M., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1989. *Exp. Mycol.*, 13: 332-336.
- Salgado, L.M., Ávalos, J., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Phytochemistry*, 30: 2587-2591.

REFERENCIAS

- Sandmann, G., Misawa, N., Wiedemann, M., Vittorioso, P., Carattoli, A., Morelli, G., *et al.* 1993. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 18: 245-251.
- Sandmann, G., Zhu, C., Krubasik, P., Fraser, P.D. 2006. *Biochim. Biophys. Acta*, 1761: 1085-1092.
- Sandmann, G., Takaichi, S., Fraser, P.D. 2008. *Phytochemistry*, 69: 2886-2890.
- Sanz, C., Álvarez, M.I., Orejas, M., Velayos, A., Eslava, A.P., Benito, E.P. 2002. *Eur. J. Biochem.*, 269: 902-908.
- Sanz, C., Rodríguez-Romero, J., Idnurm, A., Christie, J.M., Heitman, J., Corrochano, L.M., *et al.* 2009. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 7095-7100.
- Sanz, C., Benito, E.P., Orejas, M., Álvarez, M.I., Eslava, A.P. 2010. *Fungal Genet. Biol.*, 47: 773-781.
- Sanz, C., Velayos, A., Álvarez, M.I., Benito, E.P., Eslava, A.P. 2011. *PLoS One*, 6: e23102.
- Schimek, C., Petzold, A., Schultze, K., Wetzels, J., Wolschendorf, F., Burmester, A., *et al.* 2005. *Fungal Genet. Biol.*, 42: 804-812.
- Schimek, C. y Wöstemeyer, J. 2009. *Phytochemistry*, 70: 1867-1875.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Russo, V.E., Yanofsky, C. 1990. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 5064-5070.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V.E., Yanofsky, C. 1994. *J. Biol. Chem.*, 269: 12060-12066.
- Schmidt, A.D., Heinekamp, T., Matuschek, M., Liebmann, B., Bollschweiler, C., Brakhage, A.A. 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67: 549-555.
- Schrott, E.L. 1980. *Planta*, 150: 174-179.
- Schrott, E.L. 1981. *Planta*, 151: 371-374.
- Schwerdtfeger, C. y Linden, H. 2003. *EMBO J.*, 22: 4846-4855.
- Shrode, L.B., Lewis, Z.A., White, L.D., Bell-Pedersen, D., Ebbole, D.J. 2001. *Fungal Genet. Biol.*, 32: 169-181.
- Silva, F., Torres-Martínez, S., Garre, V. 2006. *Mol. Microbiol.*, 61: 1023-1037.
- Silva, F., Navarro, E., Peñaranda, A., Murcia-Flores, L., Torres-Martínez, S., Garre, V. 2008. *Mol. Microbiol.*, 70: 1026-1036.
- Sokolovsky, V.Y., Lauter, F.R., Müller-Röber, B., Ricci, M., Schmidhauser, T.J., Russo, V.E.A. 1992. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2045-2049.
- Spurgeon, S.L., Turner, R. V., Harding, R.W. 1979. *Arch. Biochem. Biophys.*, 195: 23-29.
- Strobel, I., Breitenbach, J., Scheckhuber, C.Q., Osiewacz, H.D., Sandmann, G. 2009. *Curr. Genet.*, 55: 175-184.

REFERENCIAS

- Sutter, R.P. 1970. *Gen. Microbiol.*, 64: 215-221.
- Sutter, R.P., Harrison, T.L., Galasko, G. 1974. *J. Biol. Chem.*, 249: 2282-2284.
- Sutter, R.P. 1987. En E. Cerdá-Olmedo y E.D. Lipson (eds.). *Phycomyces*, pp. 317-336. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sutter, R.P., Dadok, J., Bothner-By, A.A., Smith, R.R., Mishra, P.K. 1989. *Biochemistry*, 28: 4060-4066.
- Tagua, V.G., Medina, H.R., Martín-Domínguez, R., Eslava, A.P., Corrochano, L.M., Cerdá-Olmedo, E., *et al.* 2012. *Fungal Genet. Biol.*, 49: 398-404.
- Thewes, S., Prado-Cabrero, A., Prado, M.M., Tudzynski, B., Ávalos, J. 2005. *Mol. Genet. Genomics*, 274: 217-228.
- Torres-Martínez, S., Murillo, F.J., Cerdá-Olmedo, E. 1980. *Genet. Res.*, 36: 299-309.
- Tudzynski, B. 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66: 597-611.
- Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., Takagi, H. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 7205-7211.
- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S. 1969. *Microbios*, 1A: 3-8.
- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S. 1977. *Phytochemistry*, 16: 613-614.
- Valadon, L.R.G., Osman, M., Mummery, R.S., Jerebzooff-Quintin, S., Jerebzooff, S. 1982. *Physiol. Plant.*, 56: 199-203.
- Van Eijk, G.W., Mummery, R.S., Roeymans, H.J., Valadon, L.R. 1979. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 45: 417-422.
- Velayos, A., López-Matas, M.A., Ruiz-Hidalgo, M.J., Eslava, A.P. 1997. *Fungal Genet. Biol.*, 22: 19-27.
- Velayos, A., Blasco, J.L., Álvarez, M.I., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P. 2000. *Planta*, 210: 938-946.
- Velayos, A., Eslava, A.P., Iturriaga, E.A. 2000a. *Eur. J. Biochem.*, 267: 5509-5519.
- Velayos, A., Papp, T., Aguilar-Elena, R., Fuentes-Vicente, M., Eslava, A.P., Iturriaga, E.A., *et al.* 2003. *Curr. Genet.*, 43: 112-120.
- Verdoes, J.C., Krubasik, P., Sandmann, G., Van Ooyen, A.J.J. 1999. *Mol. Gen. Genet.*, 262: 453-461.
- Verdoes, J.C., Misawa, N., Van Ooyen, A.J.J. 1999a. *Biotechnol. Bioeng.*, 63: 750-755.
- Vittorioso, P., Carattoli, A., Londei, P., Macino, G. 1994. *J. Biol. Chem.*, 269: 26650-26654.
- Von Lintig, J. 2012. *Am. J. Clin. Nutr.*, 96: 1234S-1244S.
- Wang, G.Y. y Keasling, J.D. 2002. *Metab. Eng.*, 4: 193-201.
- Waschuk, S.A., Bezerra Jr., A.G., Shi, L., Brown, L.S. 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 6879-6883.

REFERENCIAS

- Wetzell, J., Scheibner, O., Burmester, A., Schimek, C., Wöstemeyer, J. 2009. *Eukaryot. Cell*, 8: 88-95.
- Will, O.H., Garber, E.D., Kezdy, F.J. 1984. *Curr. Microbiol.*, 10(2): 57-63.
- Will, O.H. y Newland, N.A. 1985. *Bot. Gaz.*, 146: 204-207.
- Yang, Q. y Borkovich, K.A. 1999. *Genetics*, 151: 107-117.
- Yoshida, Y. y Hasunuma, K. 2004. *J. Biol. Chem.*, 279: 6986-6993.
- Young, A.J. y Lowe, G.M. 2001. *Arch. Biochem. Biophys.*, 385: 20-27.
- Youssar, L. y Ávalos, J. 2007. *Curr. Genet.*, 51: 19-30.
- Youssar, L., Schmidhauser, T.J., Ávalos, J. 2005. *Mol. Microbiol.*, 55: 828-838.
- Zalokar, M. 1955. *Arch. Biochem. Biophys.*, 56: 318-325.
- Zalokar, M. 1957. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70: 568-571.