

## PORTADA

Respuestas fúngicas a señales ambientales: Funciones de las proteínas CarO, CutA y AcyA en *Fusarium fujikuroi*



# INSTITUCIONAL



## AGRADECIMIENTOS



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	19
1. Introducción .....	21
1.1 El género <i>Fusarium</i> .....	21
1.2 Ciclo de vida de <i>F. fujikuroi</i> .....	23
2. Metabolismo secundario .....	25
2.1 Metabolismo secundario en hongos filamentosos .....	25
2.2 Un regulador global: la adenilato ciclasa .....	27
2.2.1 Clases de adenilato ciclasas.....	28
2.2.2 Regulación de las adenilato ciclasas .....	30
2.2.3 Factores que modifican la concentración intracelular de AMPc .....	31
2.2.4 Dianas del AMPc.....	33
2.2.5 Adenilato ciclasas en hongos.....	34
2.3 Metabolismo secundario en <i>F. fujikuroi</i> .....	36
2.3.1 Policétidos: fusarinas y bikaverina .....	38
2.3.1.1 Bikaverina.....	38
2.3.1.2 Fusarinas .....	41
2.3.2 Terpenoides: giberelinas y carotenoides .....	43
2.3.2.1 Giberelinas.....	44
2.3.2.2 Carotenoides .....	47
2.3.2.2.1 Los carotenoides en la naturaleza .....	48
2.3.2.2.2 Los carotenoides en <i>F. fujikuroi</i> .....	50
2.3.2.2.3 Fenotipos asociados a defectos en la carotenogénesis en hongos: los fenotipos <i>carS</i> y <i>ovc</i> .....	54
3. Opsinas .....	58
3.1 Opsinas en hongos .....	60
3.2 Opsinas en <i>F. fujikuroi</i> .....	64
3.3 Usos aplicados de las rodopsinas microbianas .....	64
OBJETIVOS/AIMS.....	67
CAPÍTULO 1/CHAPTER 1: ADENYLYL CYCLASE PLAYS A REGULATORY ROLE IN DEVELOPMENT, STRESS RESISTANCE AND SECONDARY METABOLISM IN <i>Fusarium fujikuroi</i> .....	71
1. Introduction.....	73
2. Results .....	76
2.1 Generation of <i>F. fujikuroi</i> $\Delta$ <i>acyA</i> mutants: .....	76
2.2 The $\Delta$ <i>acyA</i> mutants show alterations in growth, morphology and conidiation: ..	79
2.3 The $\Delta$ <i>acyA</i> mutants are affected in stress sensitivity:.....	81
2.4 The $\Delta$ <i>acyA</i> mutants overproduce a red pigment:.....	84
2.5 The $\Delta$ <i>acyA</i> mutants exhibit changes in gibberellin and carotenoid production: ..	86

3. Discussion: .....	89
CAPÍTULO 2/CHAPTER 2: THE GENE <i>cutA</i> OF <i>Fusarium fujikuroi</i> , ENCODING A PROTEIN OF THE HALOACID DEHALOGENASE FAMILY, IS INVOLVED IN OSMOTIC STRESS AND GLYCEROL METABOLISM .....	
1. Introduction.....	97
2. Results .....	99
2.1 Identification of <i>cutA</i> , a gene of <i>Fusarium</i> orthologous to <i>cut-1</i> of <i>N. crassa</i> : .....	99
2.2 Targeted $\Delta cutA$ mutants are partially sensitive to osmotic stress:.....	101
2.3 <i>cutA</i> expression is regulated by osmotic stress and is needed for glycerol accumulation:.....	105
2.4 <i>cutA</i> is linked and co-regulated with a gene encoding a putative glycerol dehydrogenase: .....	107
2.5 <i>cutA</i> and <i>gldB</i> are upregulated by heat shock and light:.....	109
2.6 The HOG pathway gene <i>hogA</i> is regulated by light: .....	111
3. Discussion: .....	111
CAPÍTULO 3/CHAPTER 3: BIOLOGICAL ROLE OF FUNGAL RHODOPSINS: THE LIGHT DRIVEN, PROTON-PUMPING RHODOPSIN CarO OF <i>Fusarium fujikuroi</i> RETARDS GERMINATION OF LIGHT-EXPOSED CONIDIA.....	
1. Introduction.....	121
2. Results .....	125
2.1. Pumping activity of CarO .....	125
2.2 Effect of light wavelength and intensity on CarO pump activity.....	129
2.3 Ion specificity of CarO pump activity .....	131
2.4 Effect of gluconate on CarO pump activity .....	132
2.5 CarO localisation in <i>F. fujikuroi</i> .....	135
2.6 Physiological function of CarO .....	139
3. Discussion .....	145
4. Conclusion .....	152
DISCUSIÓN GENERAL/GENERAL DISCUSSION .....	155
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....	169
MATERIALES Y MÉTODOS .....	173
1. Estirpes.....	175
1.1 Otros organismos utilizados en esta tesis .....	176
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	176
1.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	176
1.1.3 Células de mamífero.....	176



2. Vectores de clonación y plásmidos .....	177
3. Oligonucleótidos .....	181
4. Soluciones, medios y condiciones de cultivo .....	182
4.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	182
4.2 Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i> .....	183
4.3 Medios de cultivo para <i>F. fujikuroi</i> .....	183
4.4 Medios de cultivo para células de mamífero .....	185
5. Condiciones de cultivo de <i>F. fujikuroi</i> .....	185
5.1 Iluminación .....	185
5.2 Cultivos para análisis de carotenoides .....	186
5.3 Cultivos para análisis de bikaverinas .....	186
5.4 Cultivos para análisis de giberelinas.....	186
5.5 Cultivos para análisis de expresión de los genes <i>car</i> .....	186
5.6 Cultivos para análisis de la expresión del gen <i>gibB</i> .....	186
5.7 Cultivos para el estudio de la respuesta a choque térmico de la expresión de los genes <i>cutA</i> y <i>gldB</i> .....	187
5.8 Cultivos para el estudio de la respuesta a choque osmótico de la expresión de los genes <i>cutA</i> y <i>gldB</i> .....	187
5.9 Cultivos para estudios de acidificación del medio por el hongo.....	188
6. Cuantificaciones de crecimiento y conidiación.....	188
6.1 Crecimiento en “tubos de carrera” .....	188
6.2 Crecimiento en medio líquido .....	188
6.3 Crecimiento en cajas de Petri .....	189
6.4 Ensayos de conidiación .....	189
7. Ensayos de crecimiento sobre materia vegetal.....	189
8. Tratamientos de estrés .....	190
8.1 Estrés térmico .....	190
8.2 Estrés por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	191
8.3 Estrés por metales pesados .....	191
9. Determinación del contenido de glicerol.....	191
10. Métodos de transformación de células.....	192
10.1 Transformación de <i>E. coli</i> .....	192
10.1.1 Preparación de células competentes .....	192
10.1.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	193
10.2 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	193
10.3 Transformación de <i>Fusarium</i> .....	194

10.3.1 Preparación de protoplastos .....	194
10.3.2 Transformación de protoplastos.....	195
11. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos .....	196
11.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña escala ( <i>miniprep</i> ) .....	196
11.2 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a gran escala ( <i>maxiprep</i> ) .....	197
11.3 Extracción de ADN genómico de <i>Fusarium</i> .....	197
11.4 Extracción de ARN total de <i>Fusarium</i> .....	199
11.5 Manipulación de ácidos nucleicos .....	199
11.5.1 Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos.....	199
11.5.2 Manipulación enzimática del ADN.....	199
11.5.3. Digestiones con enzimas de restricción .....	199
11.5.4 Rellenado de extremos uncatenarios de moléculas de ADN .....	200
11.5.5 Ligaciones .....	200
11.5.6 Desfosforilación de ADN .....	200
11.5.7 Tratamiento con ADNasa .....	200
11.5.8 Síntesis de ADN complementario.....	200
11.6 Electroforesis de ácidos nucleicos .....	201
11.6.1 Electroforesis de ADN .....	201
11.6.2 Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....	201
11.7 Detección de secuencias de ADN mediante la técnica de Southern.....	202
11.7.1 Marcaje de sondas de ADN con [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP .....	202
11.7.2 Transferencia de ADN a membranas de hibridación.....	202
11.7.3 Hibridación de ADN transferido a membrana .....	203
11.7.4 Detección.....	203
11.7.5 Deshibridación de membranas marcadas .....	203
11.8 Reacciones de PCR .....	204
11.9 PCR a tiempo real (RT-PCR).....	205
12. Extracción y manipulación de metabolitos secundarios de <i>Fusarium</i> .....	206
12.1 Extracción y análisis de carotenoides .....	206
12.1.1 Carotenoides totales.....	206
12.1.2 Separación de carotenoides polares y neutros .....	206
12.2 Extracción y análisis de giberelinas.....	207
12.2.1 Análisis mediante HPLC.....	207
12.2.2 Análisis mediante cromatografía en capa fina ( <i>TLC</i> ).....	208
12.3 Extracción y análisis de bikaverina .....	208
12.3.1 Análisis espectrofotométrico .....	208
13. Técnica de pinzamiento de membrana (“Patch-clamp”) .....	209
14. Microscopía .....	210
15. Informática .....	211
15.1 Análisis de secuencias de ADN.....	211
15.2 Análisis de secuencias a través de bases de datos.....	212
15.3 Pinzamiento de membrana.....	212

15.4 Escritura, cálculo y dibujo .....	212
BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES .....	213



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formas de reproducción asexual en <i>Fusarium fujikuroi</i>	24
<b>Figura 2.</b> Estructuras sexuales en <i>F. fujikuroi</i>	24
<b>Figura 3.</b> Comparación de adenilato ciclasas del género <i>Fusarium</i>	36
<b>Figura 4.</b> Metabolismo secundario en <i>F. fujikuroi</i>	37
<b>Figura 5.</b> Estructura química de la bikaverina	39
<b>Figura 6.</b> Agrupamiento de los genes <i>bik</i>	40
<b>Figura 7.</b> Compuestos químicos pertenecientes a la familia de las fusarinas	41
<b>Figura 8.</b> Agrupamiento génico <i>pks</i>	43
<b>Figura 9.</b> Algunas giberelinas bioactivas	45
<b>Figura 10.</b> Ruta biosintética de las giberelinas y agrupamiento génico en <i>F. fujikuroi</i>	46
<b>Figura 11.</b> Carotenoides en la naturaleza	48
<b>Figura 12.</b> Síntesis de carotenoides en <i>F. fujikuroi</i>	52
<b>Figura 13.</b> Efecto de la luz sobre los niveles de ARNm de los genes <i>car</i>	53
<b>Figura 14.</b> Fenotipo mutantes CarS	55
<b>Figura 15.</b> Comparación fenotípica entre las estirpes WT y <i>cut</i> de <i>N. crassa</i>	56
<b>Figura 16.</b> Efecto de la iluminación sobre los niveles de ARNm de <i>cut-1</i> en la estirpe silvestre (WT) y en los mutantes <i>vvd</i> , <i>wc-1</i> y <i>wc-2</i> de <i>N. crassa</i>	57
<b>Figura 17.</b> Bacteriorrodopsina de <i>H. salinarum</i>	59
<b>Figura 18.</b> Comparación entre segmentos relevantes de la BR y algunas opsinas fúngicas representativas	62
<b>Figura 19.</b> Conservación en opsinas fúngicas de residuos clave para la estructura actividad de la BR	63
<b>Figura 20.</b> Main terpenoids in <i>F. fujikuroi</i>	73
<b>Figura 21.</b> Generation of $\Delta acyA$ mutants of <i>F. fujikuroi</i>	78
<b>Figura 22.</b> Growth and conidiation of the <i>acyA</i> <sup>+</sup> and $\Delta acyA$ strains	79

<b>Figura 23.</b> Effect of cAMP addition on growth and pigmentation of the wild type and an $\Delta acyA$ strain	80
<b>Figura 24.</b> Lack of effect of the $\Delta acyA$ mutation on growth in the presence of metals	82
<b>Figura 25.</b> Effect of the $\Delta acyA$ mutation on growth or viability under heat or oxidative stress	83
<b>Figura 26.</b> Production of red pigments by the $acyA^+$ and $\Delta acyA$ strains	85
<b>Figura 27.</b> Production of gibberellins by the $acyA^+$ and $\Delta acyA$ strains	87
<b>Figura 28.</b> Production of carotenoids and $carRA/carB$ gene expression in the $acyA^+$ and $\Delta acyA$ strains	88
<b>Figura 29.</b> Sequence features of CutA	100
<b>Figura 30.</b> Generation of $\Delta cutA$ mutants of <i>F. fujikuroi</i>	103
<b>Figura 31.</b> Effect of $\Delta cutA$ mutations on growth and conidiation	104
<b>Figura 32.</b> Relation between $cutA$ and osmotic stress	106
<b>Figura 33.</b> Location and regulation of gene $gldB$	108
<b>Figura 34.</b> Effect of heat shock and light on $cutA$ and $gldB$ mRNA levels in <i>F. fujikuroi</i>	109
<b>Figura 35.</b> $cutA$ and $gldA$ mRNA levels at illumination time 0 in <i>F. fujikuroi</i>	110
<b>Figura 36.</b> Effect of light on $hogA$ mRNA levels in <i>F. fujikuroi</i>	112
<b>Figura 37.</b> Late steps of osmolyte production in fungi	115
<b>Figura 38.</b> Schematic representation of CarO::YFP and comparison between fungal rhodopsins and BR	124
<b>Figura 39.</b> NEG108-15 cells expressing CarO::YFP	125
<b>Figura 40.</b> HEK293 cells expressing CarO::YFP	126
<b>Figura 41.</b> <i>S. cerevisiae</i> cells expressing CarO::YFP	127
<b>Figura 42.</b> Electrophysiological analysis of CarO::YFP expressed in HEK293 cells	128
<b>Figura 43.</b> pH-dependent shift of the reversal potentials	129
<b>Figura 44.</b> Light dependency of CarO::YFP	130
<b>Figura 45.</b> Pump-activity of CarO::YFP at various pHs and other ion concentrations	132

<b>Figura 46.</b> Influence of weak organic acids on the pump-activity of CarO	134
<b>Figura 47.</b> Localisation of CarO::YFP in <i>F. fujikuroi</i>	136
<b>Figura 48.</b> Localization of CarO::YFP in hyphae of <i>F. fujikuroi</i>	137
<b>Figura 49.</b> Time lapse of YFP-localisation in hyphae	138
<b>Figura 50.</b> Low pH supports germination of conidia	139
<b>Figura 51.</b> Colony growth of <i>F. fujikuroi</i> CarO <sup>-</sup> and CarO <sup>+</sup> strains in the dark and under light	141
<b>Figura 52.</b> Influence of CarO on conidia germination	143
<b>Figura 53.</b> Plant tissue colonization	144
<b>Figura 54.</b> Pump characteristics of CarO in presence of gluconate	149





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Grupos de cruzamiento del complejo de especies <i>Gibberella fujikuroi</i>	22
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de las ciclasas por dominios conservados	29
<b>Tabla 3.</b> Características de los genes que constituyen el agrupamiento génico <i>pks</i>	42
<b>Tabla 4.</b> RDs y ORPs encontradas en distintos genomas de hongos	61
<b>Tabla 5.</b> Fungi with ORP-like rhodopsins and their role in phytopathology	151
<b>Tabla 6.</b> Estirpes fúngicas usadas en la presente Tesis	175
<b>Tabla 7.</b> Estirpes de <i>E. coli</i> usadas en la presente Tesis	176
<b>Tabla 8.</b> Líneas celulares de mamífero usadas en la presente Tesis	176
<b>Tabla 9.</b> Oligonucleótidos usados como cebadores en reacciones de PCR estándar	181
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos usados como cebadores en reacciones de RT- PCR	182



# INTRODUCCIÓN



## 1. Introducción

Para el estudio de los problemas biológicos que aborda esta Tesis Doctoral se han empleado dos hongos filamentosos del género *Fusarium*, *Fusarium fujikuroi* y *Fusarium proliferatum*.

Los hongos filamentosos constituyen un grupo de organismos de gran interés en investigación. Algunos son modelos extensamente empleados en la actualidad para estudiar problemas biológicos básicos. Entre ellos destaca *Neurospora crassa*, ascomiceto haploide especialmente útil en estudios de desarrollo o de fotobiología (Perkins and Davis 2000). Sin embargo, el principal interés de los hongos filamentosos radica en su impacto sobre la especie humana, tanto como fuentes de metabolitos valiosos para las industrias química o alimentaria (Lomascolo, Stentelaire et al. 1999) (Mapari, Nielsen et al. 2005), como por su capacidad para producir metabolitos tóxicos (micotoxinas) o de causar enfermedades, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Nelson, Dignani et al. 1994). Los mecanismos que controlan la producción de micotoxinas por parte de algunos de estos hongos o su actividad fitopatógena son campos de investigación potencialmente importantes. Los hongos del género *Fusarium* destacan en todos estos aspectos

### 1.1 El género *Fusarium*

El género *Fusarium* fue definido por Link en 1809 (Booth 1971) como un grupo de numerosos hongos imperfectos cuya característica común es la producción de esporas fusiformes y frecuentemente septadas, denominadas conidios. Una de las principales dificultades a la hora de clasificar las especies dentro del género *Fusarium* ha sido la falta de ciclo sexual reproducibles en el laboratorio y la carencia de estructuras morfológicas identificables. Durante muchos años se han denominado hongos imperfectos a aquellos que carecen de ciclo sexual, y que por tanto no producen las estructuras sexuales características de cada grupo taxonómico (ascas en ascomicetos, basidios en basidiomicetos, oosporas en oomicetos y zigosporas en zigomicetos).

El cultivo de diferentes estirpes de *Fusarium* permitió identificar ciclo sexual en muchos casos. Sin embargo, lo que debió ser un aspecto fenotípico adicional que contribuyera a asentar la nomenclatura, solo sirvió para complicarla debido al mal hábito de los micólogos de cambiar la denominación de las especies anamorfias o imperfectas una vez identificadas como teleomorfias o perfectas. Éste fue el caso de *Fusarium moniliforme*, cuyo teleomorfo se llamó *Gibberella fujikuroi* (orden Hypocreales, subclase Ascomycota, clase Eufungi) (Nelson, Toussoun et al. 1983). Con el paso del tiempo se observó que diferentes estirpes de esta supuesta especie formaban grupos de cruzamiento independientes, hablándose por tal motivo del “complejo de especies” *Gibberella fujikuroi*. Las estirpes de cada grupo de cruzamiento son generalmente heterotálicas, con sexos separados determinados por un locus sexual con dos alelos, MAT-1 y MAT-2 (Steenkamp, Wingfield et al. 2000) que definen el tipo sexual de cada hongo (+ o -). El complejo comprende al menos 11 grupos de cruzamiento, cada uno correspondiente a una especie diferente. A partir de los años 90 el empleo de criterios moleculares asentó la distinción de las especies y se recuperó la terminología tradicional, renombrándose cada grupo de cruzamiento como una especie diferente del género *Fusarium* (Tabla 1).

Espece	Grupo de cruzamiento	Referencia
<i>verticillioides</i>	A	O´Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>sacchari</i>	B	O´Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>fujikuroi</i>	C	O´Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>proliferatum</i>	D	O´Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>subglutinans</i>	E	O´Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>thapsinum</i>	F	O´Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>nygamai</i>	G	O´Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>circinatum</i>	H	Britz <i>et al.</i> , 1999
<i>konzum</i>	I	Zeller <i>et al.</i> , 2003
<i>gadijirii</i>	J	Phan <i>et al.</i> , 2004
<i>xylaroides</i>	K	Lepoint <i>et al.</i> , 2005

Tabla 1. Grupos de cruzamiento del complejo de especies *Gibberella fujikuroi*.

En condiciones de laboratorio, el cruzamiento se realiza añadiendo esporas de la estirpe de sexo (+) sobre micelio de la estirpe (-). Tras periodos de incubación en condiciones específicas de iluminación que abarcan generalmente varias semanas, se desarrollan los peritecios, estructuras muy pigmentadas en cuyo interior tienen lugar las meiosis y la formación tétradas de ascosporas desordenadas (Sidhu 1983) (Leslie, Summerell et al. 2005). Ciertas especies de *Fusarium*, como *F. oxysporum*, no han podido ser cruzadas hasta ahora en laboratorio, por lo que han quedado excluidas de estas confusiones taxonómicas.

Como es habitual en el género *Fusarium*, las especies pertenecientes al complejo *Gibberella fujikuroi* son fitopatógenas, normalmente específicas de único hospedador vegetal (Kuhlman 1983) (Leslie 1991) (Voigt, Schafer et al. 2005). En Estados Unidos, las pérdidas generadas por la reducción en la cantidad y calidad del grano en cultivos de cereales atacados por *Fusarium* superaron ampliamente los 1.000 millones de dólares a finales del siglo pasado (McMullen, Jones et al. 1997) (Arnold, Maynard et al. 2001). A pesar de ser eminentemente fitopatógenas, la presencia de especies del género *Fusarium* en hospitales supone graves riesgos para la salud de personas con enfermedades inmunodeprimidas o transplantadas (Austwick 1984), figurando entre los agentes causales de infecciones por hongos oportunistas, como la onicomycosis o la queratomicosis (Guarro and Gené 1992).

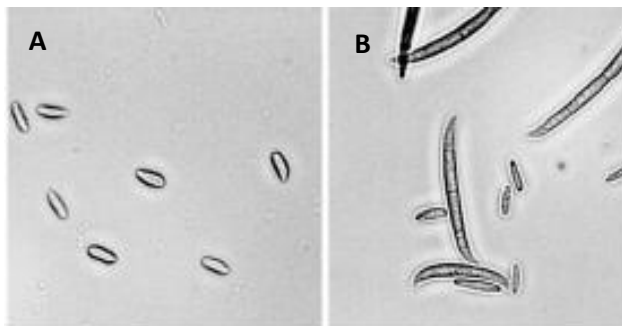
## 1.2 Ciclo de vida de *F. fujikuroi*

*F. fujikuroi* corresponde al grupo C de cruzamiento del complejo *Gibberella fujikuroi*. Como ya se ha indicado, se reproduce asexualmente mediante la formación de esporas fusiformes que reciben el nombre de conidios. Este hongo produce dos tipos de conidios: microconidios, pequeños y uninucleados (Ávalos *et al.*, 1985), y macroconidios, más alargados, de forma arqueada, tabicados y multinucleados (Kuhlman 1983) (Figura 1). *F. fujikuroi* generalmente produce microconidios, aunque bajo ciertas condiciones de cultivo también forma macroconidios. Su producción mayoritaria de microconidios uninucleados, junto con su naturaleza haploide, facilita enormemente el aislamiento en laboratorio de estirpes con mutaciones

recesivas mediante exposición a agentes mutagénicos físicos o químicos (Puhalla and Spieth 1983), (Avalos, Casadesús et al. 1985) (Koelblin, Brückner et al. 1990).

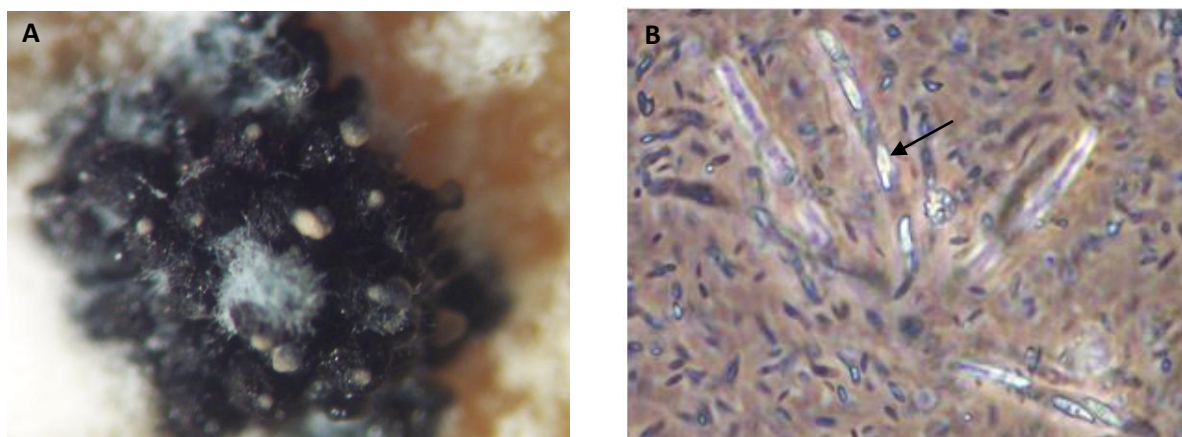
En cuanto a su reproducción sexual, *F. fujikuroi* es una especie heterotálica.

En condiciones de laboratorio, la adición de conidios de sexo (-) a micelio de una estirpe de sexo (+) previamente incubada en un medio basado en un sustrato vegetal (habitualmente zanahoria) y la incubación posterior bajo un régimen especial de iluminación da lugar a la aparición de



**Figura 1. Formas de reproducción asexual en *Fusarium fujikuroi*: microconidios (A) y mezcla de macro y microconidios (B).**

peritecios. La micromanipulación de las ascosporas contenidas en los peritecios (Figura 2) hace potencialmente posible el análisis genético por recombinación en este hongo. Se ha descrito también la generación de heterocariontes (Ming, Lin et al. 1966) (Adams, Johnson et al. 1987) (Correll, Klittich et al. 1987), aunque en muchos casos lo impiden fenómenos de incompatibilidad vegetativa o autoincompatibilidad (Puhalla and Spieth 1985) (Correll, Klittich et al. 1987).



**Figura 2. Estructuras sexuales en *F. fujikuroi*: conjunto de peritecios maduros de *Fusarium* (A) y asca conteniendo cuatro ascosporas desordenadas (B, marcado con una flecha). Las ascosporas son notablemente mayores que los microconidios, menos refringentes y azulados en la imagen.**



## 2. Metabolismo secundario

### 2.1 Metabolismo secundario en hongos filamentosos

Los metabolitos secundarios se pueden definir como moléculas producidas en ciertas etapas del ciclo de vida de un hongo, generalmente de bajo peso molecular y frecuentemente bioactivos, que se caracterizan por no desempeñar ninguna función esencial para la vida del hongo. El término secundario fue acuñado a finales del siglo XIX (Mothes 1980) para definir moléculas sin función conocida en el hongo, típicamente subproductos de rutas metabólicas primarias.

El estudio sistemático del metabolismo secundario en hongos filamentosos se inicia en 1922 con el hallazgo de más de 200 metabolitos (Howard and Raistrick 1954). Sin embargo, no será hasta la década de los años 50 del pasado siglo cuando el estudio de los metabolitos secundarios reciba un fuerte impulso de la mano de la industria farmacéutica. El papel de la penicilina, descubierta por Fleming en 1929 (Hobby 1985) (Bennett and Chung 2001) y usada masivamente en la Segunda Guerra Mundial, junto con la constatación de que numerosos metabolitos secundarios de hongos poseían actividades antibióticas, hizo avanzar con rapidez el estudio de estos compuestos.

Existen numerosas clasificaciones de metabolitos secundarios, pero las más comunes se basan en el tipo de enzima que cataliza los primeros pasos de la ruta biosintética (Keller, Turner et al. 2005). La clasificación incluye al menos cuatro grandes grupos: péptidos no ribosomales, alcaloides, policétidos y terpenoides.

Los péptidos no ribosomales son sintetizados por enzimas multidominio conocidas como NRPs, de “Nonribosomal Peptide Synthetases” (Finking and Marahiel 2004). La penicilina o la cefalosporina son antibióticos pertenecientes a este grupo. Su síntesis la lleva a cabo la enzima NRPs descrita, conocida como ACVS (Smith, Earl et al. 1990). Por su parte, los alcaloides generalmente derivan del triptófano y el dimetilalil pirofostato,

aunque es posible su síntesis a partir de otros aminoácidos distintos, como la prolina (Keller, Turner et al. 2005). Un metabolito secundario especialmente relevante en este grupo es la ergotamina, producida por *Claviceps purpurea* y otras especies relacionadas (Tudzynski, Holter et al. 1999).

Los policétidos son probablemente los metabolitos secundarios más abundantes en hongos filamentosos. Sus síntesis la empiezan enzimas multidominio conocidas como sintasas de policétido tipo I (PKS I), similares en estructura y mecanismo de acción a las sintasas de ácidos grasos de eucariotas (Staunton and Weissman 2001) (Menzella, Reid et al. 2005). Finalmente, los terpenoides son polímeros isoprenoides con estructuras muy diversas, que se clasifican en monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, tetraterpenos, y así sucesivamente según el número de unidades de las que derivan. Sus rutas biosintéticas incluyen con frecuencia la participación de ciclasas (Caruthers, Kang et al. 2000) (Rynkiewicz, Cane et al. 2001). Los policétidos y los terpenoides serán objeto de descripción detallada en secciones posteriores de esta introducción, puesto que los metabolitos secundarios más relevantes producidos en *F. fujikuroi* pertenecen a estas dos familias.

El estudio de la organización de los genes responsables de la síntesis de metabolitos secundarios en hongos durante los años 90 reveló interesantes características. Con frecuencia los genes de cada ruta se encuentran agrupados de los genomas formando “clusters” (Keller and Hohn 1997), también frecuentes en procariontes (Lawrence 1999). Este hecho facilita la transmisión de rutas metabólicas completas entre bacterias y hongos por fenómenos de transferencias horizontales. Metabolitos de la importancia de las giberelinas (Hedden, Phillips et al. 2001), penicilina (Smith, Earl et al. 1990), cefalosporina (Gutiérrez, Velasco et al. 1997) o lovastatina (Kennedy, Auclair et al. 1999) son sintetizados por enzimas codificadas en agrupamientos génicos.

Los genes que forman estos agrupamientos génicos suelen estar corregulados por factores de transcripción u otras proteínas reguladoras, que pueden ser tanto generales como específicas. Los genes reguladores específicos suelen encontrarse en el propio agrupamiento génico y

generalmente regulan de forma positiva la expresión de sus genes vecinos. Los reguladores específicos son a menudo proteínas que poseen dos núcleos  $Zn(II)_2Cys_6$ , dominios a través de los que se unen al ADN (Fernandes, Keller et al. 1998). Un ejemplo de regulador de este tipo es la proteína AflR, que controla la síntesis de aflatoxinas (Woloshuk, Foutz et al. 1994) (Chang, Ehrlich et al. 1995). Los reguladores globales son proteínas que integran respuestas del hongo frente a diferentes señales ambientales. Así, cambios en la disponibilidad de carbono, pH o nitrógeno disparan respuestas mediadas por proteínas que contienen dedos de zinc del tipo  $Cys_2His_2$  como CreA (Dowzer and Kelly 1989), AreA (Kudla, Caddick et al. 1990) y PacC (Tilburn, Sarkar et al. 1995), respectivamente. Estos reguladores globales pueden ejercer efecto reguladores positivos o negativos sobre agrupamientos génicos para la síntesis de distintos metabolitos secundarios. Otro nivel de regulación de la expresión de dichos agrupamientos génicos es mediado por enzimas modificadoras del ADN a nivel epigenético. Este es el caso de la metiltransferasa LaeA (Bok and Keller 2004) muy conservada en hongos y que actúa a nivel de reorganización de la cromatina (Lee, Teyssier et al. 2005) de forma que permita o impida la expresión de agrupamientos génicos para la síntesis de diferentes metabolitos secundarios.

Actualmente el metabolismo secundario de hongos se tiende a considerar como un proceso enormemente complejo a nivel regulatorio, que integra diferentes señales, tanto ambientales como a nivel fisiológico, o de estado de desarrollo del hongo. Un ejemplo especialmente relevante es el control de la síntesis de AMPc por la adenilato ciclasa, cuyo estudio es uno de los objetivos de esta Tesis.

## **2.2 Un regulador global: la adenilato ciclasa**

El descubrimiento del adenosín monofosfato-3',5 cíclico (AMPc) por Rall y Shuterland (Rall and Shuterland 1958) en 1958, usando hígado de perro, dio lugar al estudio de novedosos procesos de señalización intra- y extracelular. En los años sucesivos, este compuesto químico se identificó en distintos tejidos procedentes de numerosos organismos, indicando que el AMPc forma parte de un mecanismo de regulación muy conservado y extendido. Los

estudios sobre el papel de este nucleótido cíclico en diversos organismos demostraron su participación en múltiples rutas de transducción de señales, que generan diferentes respuestas incluso en organismos relacionados filogenéticamente (Gancedo, Mazón et al. 1985) (Beavo and Brunton 2002) (Francis, Blount et al. 2011).

La enzima adenilato ciclasa (**AC**) se encuentra presente en todos los principales grupos taxonómicos. Normalmente cataliza la síntesis de AMPc, aunque en plantas degrada el trifosfato de adenosina (**ATP**) en AMPc y pirofosfato (Gehring 2010). Normalmente, la concentración de AMPc depende del balance de las actividades de su síntesis y su degradación, catalizadas respectivamente por la AC y la fosfodiesterasa de AMPC (**PDE**). Los cambios en los niveles de AMPc intracelular disparan una enorme variedad de respuestas, ya que el AMPc suele participar como molécula mensajera en rutas de señalización muy diversas.

### **2.2.1 Clases de adenilato ciclasas**

Existen numerosas clases de ACs, que difieren en su función biológica, localización celular y estructura tridimensional (Gancedo 2013), encontrándose en la literatura distintas clasificaciones según los criterios que se empleen. Una clasificación típica sería aquella basada en los dominios o motivos conservados en las distintas familias de ACs (Tabla 2).

Clase	Organismos	Características
I	Bacterias	Monoméricas y solubles
II	Bacterias	Monoméricas, el sitio catalítico está entre dos dominios globulares. Toxinas bacterianas que interfieren con el metabolismo del hospedador
III	Ubicuas, excepto en plantas	Clase mayoritaria. Distintas estructuras: pseudoheterodímeros con un sitio activo de unión a ATP u homodímeros con dos sitios activos, uno de los cuales puede actuar como dominio regulador.
IV	Bacterias ( <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Yersinia pestis</i> )	Carecen de papel conocido.
V	<i>Prevotella ruminicola</i> (bacteria anaerobia)	“
VI	<i>Rhizobium etli</i>	“

**Tabla 2. Clasificación de las ciclasas por dominios conservados.** Se indican algunos organismos que las poseen y algunas de sus características más relevantes.

La clase III es enormemente diversa, y a ella pertenecen las ACs de hongos. Dentro de esta clase existen las siguientes variantes:

- a) Solubles: forman homodímeros (en bacterias) o pseudoheterodímeros (en mamíferos). A pesar de ser solubles no se encuentran distribuidas al azar en el citoplasma sino que se localizan en determinados lugares, como el núcleo (Zippin, Chen et al. 2003) (Tresguerres, Levin et al. 2011).
- b) Asociadas a la membrana: a este grupo pertenecen las ACs de hongos. Estas enzimas suelen asociarse con proteínas de membrana a través de dominios ricos en leucina (LRR) (Linder and Schultz 2003). Generalmente, para ser enzimáticamente activas, estas proteínas se asocian formando homodímeros (Hall and Muhlschlegel 2010).

b) Transmembranales: las ACs de algunos organismos, como *Dictyostelium discoideum* o *Leishmania donovani*, pertenecen a este grupo. Para su actividad se requiere la formación de heterodímeros por sus sitios catalíticos, sólo uno de los cuales será enzimáticamente activo (Shpakov and Pertseva 2008). La variedad estructural en este grupo de ACs es muy grande. En *Mycobacterium tuberculosis* existen diferentes tipos de proteínas que actúan de puente entre dos monómeros (Shenoy and Visweswariah 2006), mientras que en mamíferos el número de regiones transmembrana en un simple monómero puede alcanzar la docena (Kamenetsky, Middelhaufe et al. 2006).

### 2.2.2 Regulación de las adenilato ciclasas

La regulación de las distintas ACs es enormemente compleja, ya que son numerosos los mecanismos capaces de modular sus actividades catalíticas. Dichos mecanismos han sido especialmente estudiados en *Escherichia coli* y en eucariotas superiores, e incluyen (1) la modulación de la activación o represión de la transcripción de los genes que codifican las ACs, (2) la estabilidad de los propios ARNm y (3) la introducción de modificaciones químicas en la propia enzima. A continuación se describen ejemplos para ilustrar las tres modalidades regulatorias citadas.

- (1) En el caso de *E. coli*, la proteína CRP (“regulatory cAMP receptor protein”) forma un complejo con la molécula de AMPc y reprime la expresión del gen estructural de la AC, llamado *cya*, estableciendo un bucle de retroalimentación negativa que disminuye los niveles de AMPc intracelulares (Inada, Takahashi et al. 1996).
- (2) *E. coli* posee un segundo mecanismo regulatorio consistente en el aumento de la inestabilidad del ARNm del gen *cya* mediante el aumento de la actividad de la ribonucleasa LS. Este mecanismo de regulación post-transcripcional es particularmente relevante en cultivos en fase estacionaria (Iwamoto, Lemire et al. 2008).
- (3) La tercera forma de regulación, la introducción de modificaciones químicas en la enzima, es particularmente relevante en eucariotas

superiores. Las modificaciones mejor estudiadas son fosforilaciones, que pueden ser activadoras (principalmente llevadas a cabo por la cinasa de proteínas C [PKC], y en ocasiones por cinasas dependientes del complejo calcio-calmodulina [CaMK]), o inhibitoras (mediadas por la acción de la cinasa de proteínas A [PKA], CaMK y PKC) (Sadana and Dessauer 2009).

Las tres modalidades de regulación de la actividad adenilato ciclasa descritas arriba funcionan de forma paralela. La complejidad regulatoria es aún mayor debido a la existencia de numerosas proteínas o pequeñas moléculas que pueden interactuar directa o indirectamente con las ACs, potenciando o inhibiendo su actividad enzimática. Las proteínas G heterotriméricas (Jiang, Collins et al. 2008), la calmodulina (Sadana and Dessauer 2009), proteínas Ras (Fang and Wang 2006) y moléculas como el CO<sub>2</sub> (Klengel, Liang et al. 2005) constituyen ejemplos de lo anterior.

### 2.2.3 Factores que modifican la concentración intracelular de AMPc

Como se ha mencionado anteriormente, los niveles de AMPc dependen del balance entre síntesis y degradación del compuesto, o lo que es lo mismo, del equilibrio entre las actividades enzimáticas AC y PDE. Existen numerosos estímulos que actúan como señal para incrementar la actividad enzimática de síntesis o degradación del nucleótido cíclico. A continuación, se describen algunos de los más relevantes:

- a) Hormonas y neurotransmisores: de especial relevancia en células de mamífero, que poseen receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G triméricas activadoras (Gs) o inhibitoras (Gi) (Kristiansen 2004). Hormonas y neurotransmisores como la acetilcolina (van Koppen and Kaiser 2003), la dopamina (Civelli, Bunzow et al. 1991) o la vasopresina (Birnbaumer 2000) modifican los niveles de AMPc intracelulares por este mecanismo.
- b) Feromonas y compuestos volátiles: especialmente relevantes en vertebrados (Buck and Axel 1991). La unión de estos compuestos a sus receptores activa proteínas G específicas (G<sub>olf</sub>) que se encargan de activar a la AC (Wong, Li et al. 2000). Se ha postulado que cambios en los niveles

de AMPc están implicados en la percepción de los sabores salado y dulce (Margolskee 2002).

- c) AMPc: como hemos visto anteriormente, los niveles de AMPc están sujetos a regulación por producto final. En *E. coli* existe retroalimentación negativa mediada por la proteína CRP, mientras que en eucariotas superiores se han descrito ejemplos de retroalimentación positiva. En este último caso, altos niveles de AMPc activan la PKA que lleva a cabo la fosforilación inhibitoria de la PDE (Jackson, Mi et al. 2007).
- d) Calcio: los niveles de calcio modulan la concentración de AMPc a través de distintas rutas. Por ejemplo, en células de retina, iones  $Ca^{++}$  libres activan AC solubles e inhiben AC transmembranales mientras que el complejo calcio-calmodulina activa la PDE1 (Dunn, Wang et al. 2006).
- e) CO<sub>2</sub>, bicarbonato y otros estímulos: en eucariotas, principalmente en mitocondrias, y en algunas bacterias se han descrito respuestas mediadas por ACs ante cambios en la concentración de CO<sub>2</sub>/bicarbonato (Kobayashi, Buck et al. 2004) (Townsend, Holliday et al. 2009). En el caso de las mitocondrias, el ciclo de los ácidos tricarbónicos eleva los niveles de CO<sub>2</sub>, lo cual actúa como señal activadora para la producción de AMPc, que incrementará la eficiencia de la fosforilación oxidativa (Acín-Pérez, Salazar et al. 2009). También se han descrito respuestas a niveles de NaCl en *Pseudomonas aeruginosa* (Rietsch and Mekalanos 2006) o respuestas a luz azul en medusas (Koyanagi, Takano et al. 2008) o en el flagelado unicelular *Euglena gracilis* (Yoshikawa, Suzuki et al. 2005).
- f) Nutrientes: la presencia de nutrientes en el medio quizás sea uno de los factores mejor estudiados. En células de mamífero, los niveles de AMPc son dependientes de la presencia de glucosa en una ruta mediada por glucagón (Lavine, Voyles et al. 1975). Este descubrimiento llevó a postular que el AMPc actúa como una “señal de hambre”. Esta hipótesis que está aún en discusión (Gancedo 2013), ya que en otros organismos la glucosa afecta de distinto modo. Así, *P. aeruginosa* no varía sus niveles de AMPc en presencia de glucosa (Phillips and Mulfinger 1981), mientras que *E. coli*



reduce sus niveles intracelulares si el medio está suplementado con este azúcar (Ullmann and Danchin 1983). En *Saccharomyces cerevisiae*, la presencia de glucosa activa la AC a través de la proteína G Gpa2 y del complejo Ras1/Ras2 (Yun, Tamaki et al. 1997), mientras que en *Candida albicans* la disponibilidad de esta fuente de carbono en el medio eleva los niveles de AMPc intracelular por mecanismos aún no dilucidados (Miwa, Takagi et al. 2004) (Maidan, Thevelein et al. 2005).

#### 2.2.4 Dianas del AMPc

Como se ha visto en apartados anteriores, el AMPc tiene un papel relevante en multitud de organismos y rutas de transducción de señales. A continuación se describen algunas de las principales dianas de esta molécula y el mecanismo de acción de estas interacciones.

- a) PKA: estas cinasas contienen dos dominios de unión a AMPc, llamados CDB-A y CDB-B. Una molécula de AMPc puede unirse al dominio B promoviendo un cambio conformacional en la proteína y haciendo que el dominio A quede expuesto. La exposición del dominio A posibilitaría la entrada de una segunda molécula de AMPc, activándose la PKA mediante la disociación de sus unidades catalíticas y reguladoras (Das, Esposito et al. 2007) (Kim, Cheng et al. 2007). Una vez activada, la cinasa fosforila diversas dianas (Gancedo 2013) mediante el reconocimiento de secuencias proximales y distales al sitio de fosforilación R/K-R/K-X-S/T. Las PKA activas son capaces de reconocer y fosforilar numerosos sustratos, tales como factores de transcripción (Görner, Durchschlag et al. 2002), enzimas metabólicas (Portela, Moreno et al. 2006) o canales iónicos (Liu, Shi et al. 2004). A su vez, la propia PKA es capaz de modular su propia actividad a través de dos vías: fosforilación activadora de la PDE o autofosforilación inhibidora de las subunidades reguladoras, fenómeno muy conservado en eucariotas (Zakhary, Fink et al. 2000).
- b) Proteínas Epac: presentes en eucariotas superiores (de Rooij, Zwartkruis et al. 1998) (Kawasaki, Springett et al. 1998) se diferencian en dos familias en función del número de sitios de unión a AMPc. Cuando las proteínas Epac son activadas por su unión con una o dos moléculas de AMPc, se

localizan en la membrana plasmática donde actúan como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina asociados a proteínas Rap (Bos 2006) (Ponsioen, Gloerich et al. 2009).

- c) Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos: distintos canales que comparten la presencia de dominios CNB (cyclic nucleotide binding domains) en su región C-terminal expuesta en el citosol (Craven and Zagotta 2006), que unen AMPc disparando distintas respuestas. Estos canales no han sido encontrados hasta la fecha en hongos (Kaplan, Sherman et al. 2007).
- d) Factores de transcripción: la unión directa del AMPc a factores de transcripción es bien conocida en procariotas, siendo *E. coli* donde se descubrió por primera vez la interacción ya mencionada con la proteína CRP (Zubay, Schwartz et al. 1970). La unión de CRP con AMPc provoca cambios conformacionales que posibilitan la unión del complejo al ADN, habiéndose descrito más de 300 regiones intergénicas a las que es capaz de asociarse (Shimada, Fujita et al. 2011). En *P. aeruginosa* existe una proteína similar llamada Vfr (Suh, Runyen-Janecky et al. 2002).

### 2.2.5 Adenilato ciclasas en hongos

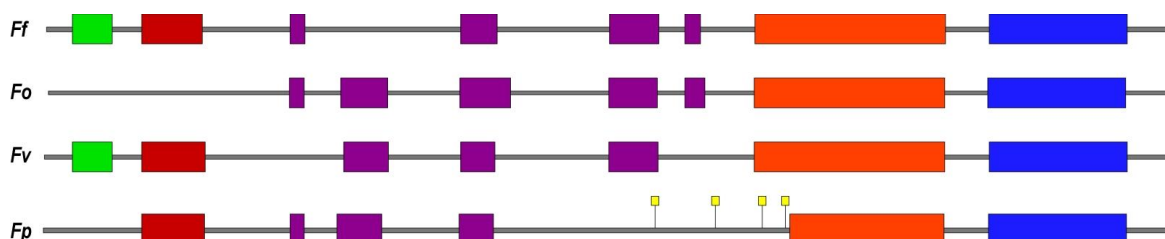
Las adenilato ciclasas de hongos juegan un papel esencial en la biología de estos organismos, habiéndose descrito una enorme variedad de fenotipos asociados a sus pérdidas de función (Lee, D'Souza et al. 2003). La mutación del gen *cr-1* de *N. crassa* produce gran variedad de cambios fenotípicos, incluyendo defectos en el patrón de conidiación en medios líquido o sólido, crecimiento anormalmente colonial y acortamiento de las hifas aéreas. De igual manera, los mutantes *cr-1* muestran defectos en la formación de peritecios al cruzar con una estirpe silvestre del sexo opuesto. Sorprendentemente, los mutantes de *N. crassa* carentes de AC funcional muestran mayor tolerancia a estrés térmico u oxidativo (Ivey, Kays et al. 2002).

La participación del AMPc en rutas de transducción de señales de hongos ha recibido especial atención en algunas especies por su papel en

patogénesis. La capacidad invasiva del patógeno humano *C. albicans* requiere una transición morfológica de su estado de levadura a su forma filamentosa. Los mutantes carentes de AC son avirulentos y más susceptibles de ser fagocitados (Rocha, Schroppel et al. 2001). La presencia de AC funcional también es necesaria para la virulencia del patógeno oportunista *Aspergillus fumigatus*, cuya carencia da lugar a la inhibición de la expresión del gen *pksP*, necesario para la patogénesis (Liebmann, Muller et al. 2004). Los estudios en hongos fitopatógenos también son abundantes en la literatura. En el basidiomiceto patógeno del maíz *Ustilago maydis*, de manera similar a lo descrito en *C. albicans*, la expresión del gen de la AC (*uac1*) afecta a la transición de su estado levaduriforme a su forma filamentosa, necesaria en las primeras etapas de la invasión de la planta (Gold, Duncan et al. 1994). Mutantes carentes de AC muestran un crecimiento filamentoso constitutivo. En otros hongos, la mutación del gen de la AC impide la formación de apresorios, generando estirpes avirulentas. Este fenómeno se ha estudiado en profundidad en *Magnaporthe grisea* (Choi and Dean 1997). Un último ejemplo es proporcionado por *Botrytis cinerea*, cuyo mutante carente de AC es capaz de penetrar las hojas de la vid, si bien el tamaño de las lesiones es menor en comparación con las que produce la estirpe silvestre y la producción de esporas *in planta* es nula (Klimpel, Gronover et al. 2002).

Las ACs de hongos dependen de un gen de copia única (Lee, D'Souza et al. 2003) y son las únicas que poseen dominios ricos en leucina (LRR) (Ivey and Hoffman 2005). Los dominios LRR son motivos estructurales formados por 20-30 residuos de aminoácidos que adoptan un plegamiento en herradura  $\alpha/\beta$  (Kobe and Deisenhofer 1994). Estos dominios forman parte de numerosas familias de receptores en casi todos los reinos eucariotas, pero son sin embargo más infrecuentes en hongos. Tanto ascomicetos como zigomicetos y basidiomicetos poseen ACs con dominios LRR y un dominio adenilato/guanilato ciclasa en la misma cadena polipeptídica, una combinación única entre las proteínas eucariotas (Soanes and Talbot 2010).

La estructura típica de una AC de hongos incluye varios dominios (Figura 3), algunos de ellos muy conservados. Todas las ACs estudiadas poseen dominios LRR y los dominios catalíticos adenilato ciclasa y fosfatasa 2C. La mayoría de las AC contienen también un dominio de unión a proteínas  $G_{\alpha}$  y otro de unión a proteínas Ras (Soanes and Talbot 2010).

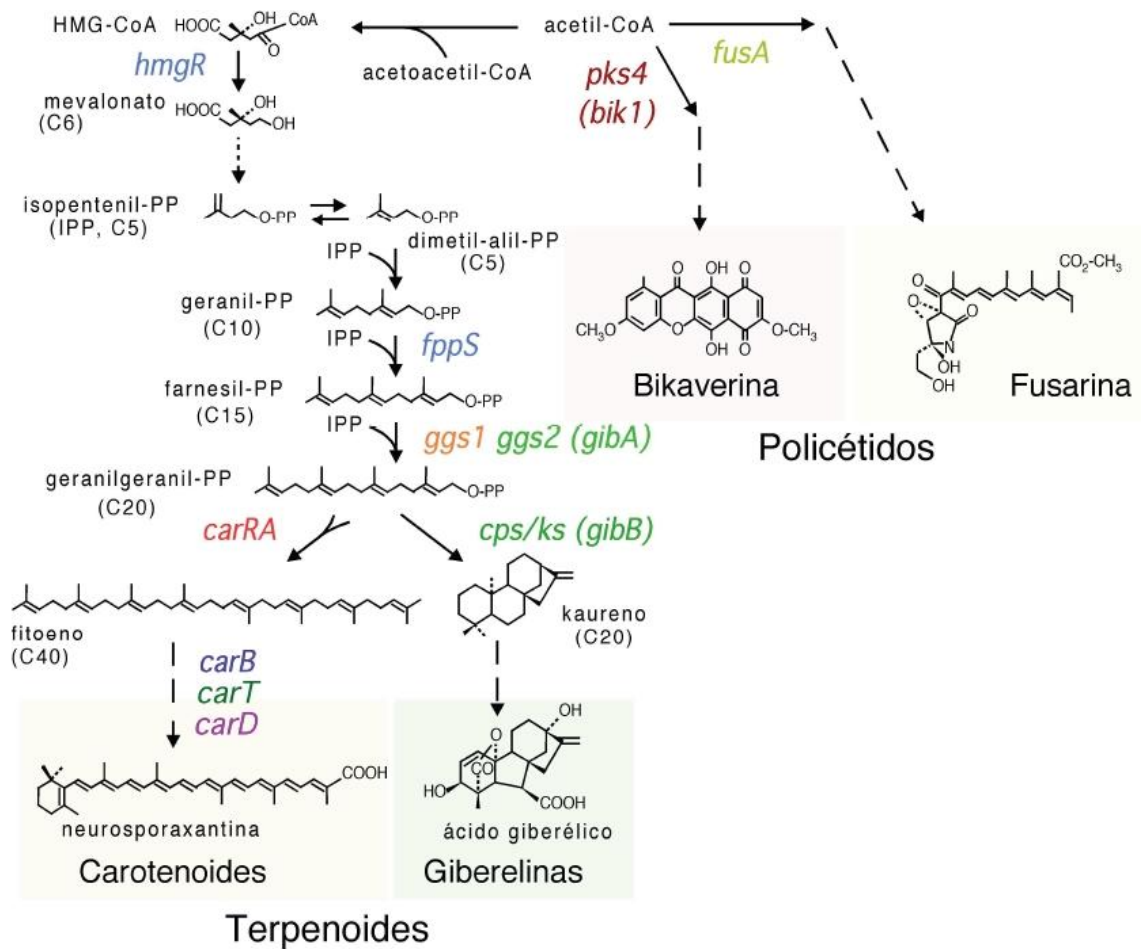


**Figura 3. Comparación de adenilato ciclasas del género *Fusarium*.** Se muestran las adenilato ciclasas de *F. fujikuro* (Ff), *F. oxysporum* (Fo), *F. verticillioides* (Fv) y *F. proliferatum* (Fp). Se muestran los dominios de unión a proteínas  $G_{\alpha}$  (verde), de unión a proteínas Ras (rojo), repeticiones ricas en leucina (violeta), fosfatasa 2C (naranja) y catalítico (azul). En el caso de *F. proliferatum*, aparecen codones de fin de lectura antes del dominio fosfatasa 2C, debido a errores de anotación de la secuencia.

### 2.3 Metabolismo secundario en *F. fujikuroi*

Las especies del género *Fusarium* tienen un enorme interés aplicado debido a la riqueza de su metabolismo secundario. Entre los numerosos metabolitos secundarios producidos por estos ascomicetos figuran micotoxinas producidas durante la infección (Gil-Serna, Mateo et al. 2013) y pueden resultar dañinas tanto para los seres humanos como para los animales que se alimentan de vegetales contaminados (Conková, Laciakova et al. 2003). Entre las micotoxinas más estudiadas figuran las fusarinas (Barrero, Sánchez et al. 1991), los tricotecenos (Desjardins, Hohn et al. 1993), las fumonisinas (Marasas 1995), el ácido fusárico (Bacon, Porter et al. 1996) o la bikaverina (Giordano, Avalos et al. 1999a).

Otros metabolitos secundarios producidos por *Fusarium* no son perjudiciales y en algunos casos tienen interés biotecnológico. Es el caso de dos grupos de terpenoides: los carotenoides (Avalos and Cerdá-Olmedo 1987) y las giberelinas (Fernández-Martín, Reyes et al. 1995) (Figura 4). En las secciones siguientes se detallan las síntesis de algunos metabolitos relevantes en este trabajo.



**Figura 4. Metabolismo secundario en *F. fujikuroi*:** se muestran dos grupos mayoritarios de metabolitos secundarios en *F. fujikuroi*. Tanto policétidos como terpenoides parten de un precursor común, el acetil-CoA. En color aparecen algunos de los genes implicados en la ruta biosintética de los distintos compuestos.

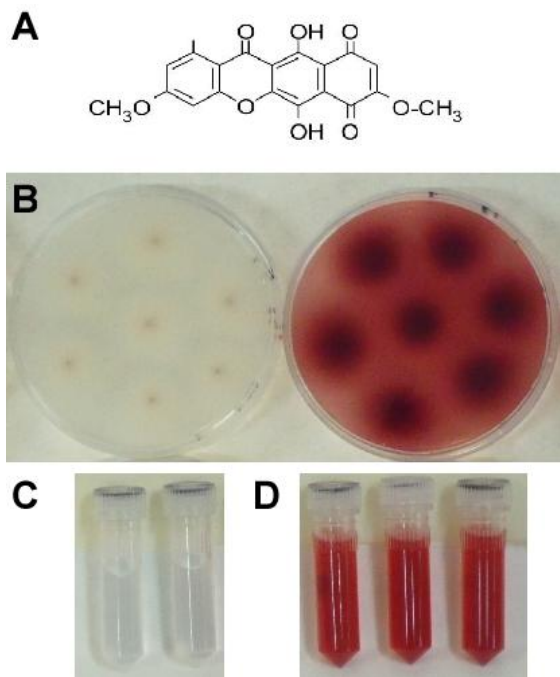
### 2.3.1 Policétidos: fusarinas y bikaverina

Los policétidos se sintetizan a partir de acetil-CoA mediante la actividad enzimática de las sintetasas de policétidos (PKSs). En bacterias se han descrito tres tipos de PKS: las de tipo I, enzimas multifuncionales de gran tamaño, de tipo II, complejos formados por enzimas monofuncionales, y de tipo III, como las de tipo I pero carentes del dominio transportador de grupos acilo. Las PKSs de tipo I son parecidas a las sintetasas de ácidos grasos eucariotas. Estas últimas llevan a cabo un paso de reducción completa del carbono  $\beta$  de sus sustratos, mientras que en el caso de las PKSs esta reducción puede ocurrir o no.

En hongos sólo han sido descritas PKSs pertenecientes a al tipo I (Staunton and Weissman 2001) (Menzella, Reid et al. 2005). El gran tamaño de estas enzimas, superior a 1000 aminoácidos, se debe a la presencia de diversos dominios. Entre ellos destacan los dominios transportador de grupos acilo (ACP), transferasa de grupos acilo (AT), de síntesis de cetoacil-CoA (KS), cetorreductasa (KR), reductasa de enoílo (ER) y deshidratasa (DH). Los tres últimos pueden estar o no presentes en las distintas PKSs, mientras que los tres primeros son indispensables para la actividad enzimática de todas ellas. La combinatoria de módulos en estas enzimas multifuncionales explica la enorme variedad de policétidos producidos por distintos hongos. *F. fujikuroi* produce diferentes policétidos, entre ellos las fusarinas (Barrero, Sánchez et al. 1991), la bikaverina (Giordano, Avalos et al. 1999a) y la fusarubina (Studt, Wiemann et al. 2012).

#### 2.3.1.1 Bikaverina

La bikaverina es un pigmento rojizo-violáceo (Figura 5) con propiedades antibióticas frente a distintos organismos. Así, se ha descrito toxicidad de este compuesto frente a nematodos (Kwon, Son et al. 2007), hongos filamentosos (Son, Kim et al. 2008) y protozoos (Balan, Fuska et al. 1970). Su actividad le proporciona a la bikaverina interés biotecnológico.



**Figura 5. A: Estructura química de la bikaverina. B: Cultivos en medio sólido: *F. fujikuroi* cultivado en medio DG con (izquierda) y sin (derecha) nitrógeno. Puede apreciarse la coloración rojiza debido a la bikaverina sólo en el medio carente de nitrógeno. C y D. Filtrados de cultivo líquido: los filtrados provienen de cultivos de *F. fujikuroi* en medio líquido con (C) y sin (D) nitrógeno.**

La síntesis de bikaverina a partir de acetil-CoA la lleva a cabo la PKS de tipo I Bik1 (Wiemann, Willmann et al. 2009), identificada en un escrutinio de genes regulados por nitrógeno y denominada anteriormente Pks4 (Linnemannstöns, Schulte et al. 2002a). La producción de mutantes carentes de copia funcional del gen *bik1*, junto con la expresión heteróloga de dicha proteína en *E. coli* (Ma, Zhan et al. 2007) demostró la función de Bik1 en la ruta de síntesis de este compuesto. Como ya sucedió con los genes para otros metabolitos secundarios en hongos, el análisis de las secuencias génicas adyacentes a *bik1* llevó a la identificación de otros genes corregulados que constituyen un agrupamiento génico responsable de la síntesis de éste policétido (Wiemann, Willmann et al. 2009) (Figura 6). El producto del gen *bik1* es suficiente para la síntesis de pre-bikaverina (Wiemann, Willmann et al. 2009) mientras que las enzimas cifradas por *bik2* y *bik3* llevan a cabo pasos oxidativos y de metilación sobre este sustrato, respectivamente. El agrupamiento génico incluye *bik4* y *bik5*, dos genes reguladores, y *bik6*, que cifra una proteína transportadora presumiblemente responsable de excretar la bikaverina al medio de cultivo. Así, mutantes carentes de Bik6 presentan menor cantidad de bikaverina en el medio de cultivo que la estirpe silvestre (Wiemann, Willmann et al. 2009).

Como es habitual en la síntesis de metabolitos secundarios, la síntesis de bikaverinas en *F. fujikuroi* es regulada por distintos factores ambientales. Entre ellos destacan la disponibilidad de nutrientes y el pH. La síntesis de bikaverina requiere una relación nitrógeno/carbono, actuando el exceso de nitrógeno en el medio de cultivo como una señal represora (Giordano, Avalos et al. 1999a). La carencia de fósforo y azufre en el medio, así como la presencia de sacarosa (Rodríguez-Ortiz, Mehta et al. 2010) o de calcio (Bell, Wheeler et al. 2003) ejercen un efecto estimulador sobre la síntesis. Respecto al pH, la síntesis de bikaverinas requiere pH ácido (Balan, Fuska et al. 1970) (Giordano, Avalos et al. 1999a).

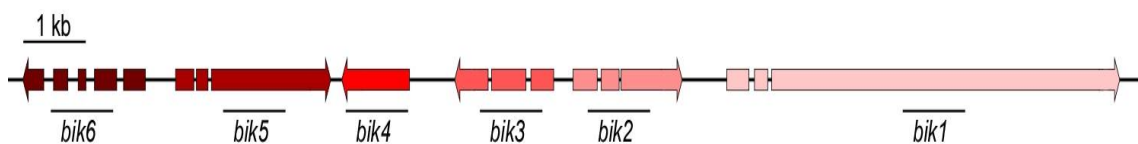


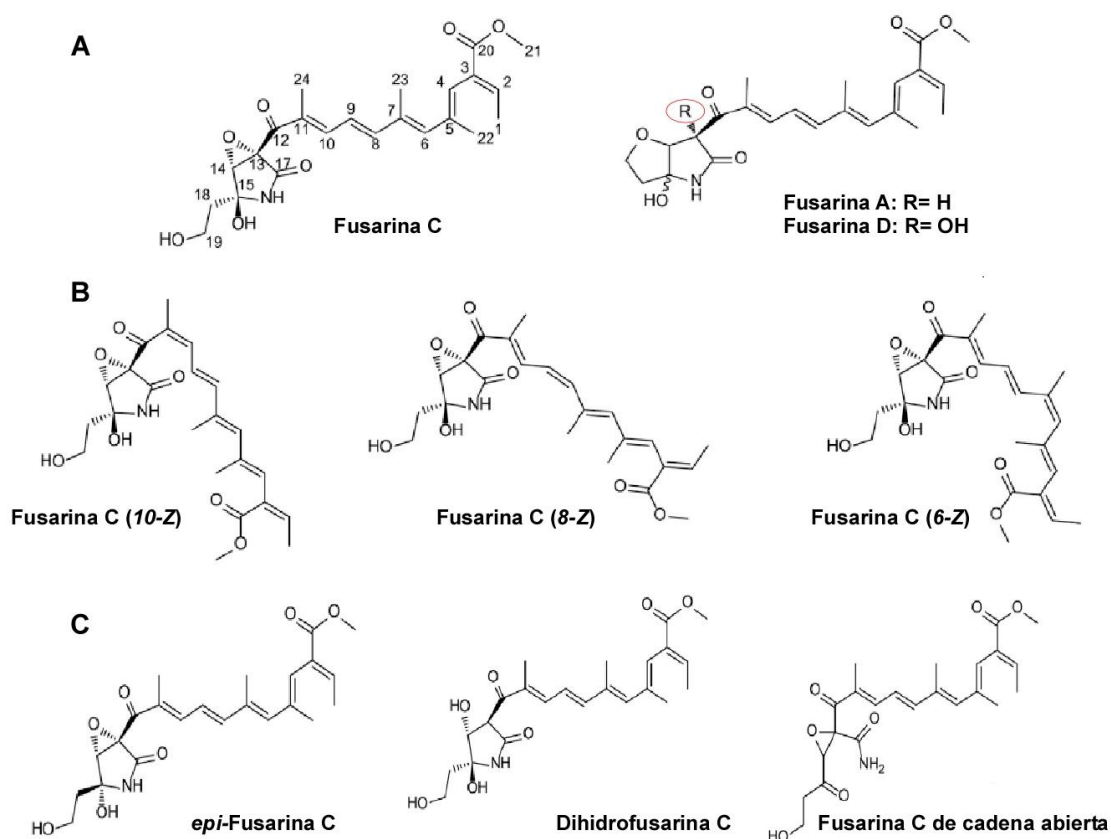
Figura 6. Agrupamiento de los genes *bik* (adaptado de (Wiemann, Willmann et al. 2009))

Respecto a las proteínas que controlan la ruta, se ha atribuido a AreA y PacC funciones en la regulación por nitrógeno y por pH, respectivamente. El mecanismo de acción de AreA es confuso, ya que aunque inicialmente se observó que su mutación aumenta la expresión del gen *bik1* (Linnemannstöns, Schulte et al. 2002a), este resultado no fue confirmado posteriormente (Wiemann, Willmann et al. 2009), por lo que deben participar también otras proteínas reguladoras. Por su parte, PacC actúa de regulador negativo, ya que su ausencia aumenta la expresión de los genes *bik* (Wiemann, Albermann et al. 2012). Esta regulación la ejerce a nivel de unión directa a los promotores de dichos genes, como indica la presencia en sus secuencias promotoras de sitios de unión similares a los previamente descritos para PacC en otros organismos (Linnemannstöns, Schulte et al. 2002a). Además de estas dos proteínas, los mutantes carentes de adenilato ciclasa *F. proliferatum* (Kohut, Olah et al. 2010) mostraron altos niveles de producción de bikaverina, lo que implica a la molécula de AMPc en la regulación de la síntesis de éste pigmento.



### 2.3.1.2 Fusarinas

Las fusarinas son producidas por distintas especies del género *Fusarium*, como *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *F. fujikuroi* (Barrero, Sánchez et al. 1991) (Song, Cox et al. 2004) a partir de la PKS FusA/FgPks10 (Gaffoor, Brown et al. 2005) (ver Figura 4). Además de los dominios habituales, esta PKS de tipo I contiene un módulo de síntesis de péptidos no ribosómicos (NRPS) adicional en su extremo C terminal, que participa en la síntesis de la pre-fusarina C (Song, Cox et al. 2004). La presencia de dominios NRPS es muy inusual en las PKSs, aunque hay otros ejemplos. Así, la mixobacteria *Melittagium lichenicola* Me 146 posee una enzima híbrida PKS/NRPS implicada en la síntesis de melitiazol.



**Figura 7. Compuestos químicos pertenecientes a la familia de las fusarinas. A:** fusarinas A, C y D. **B:** estereoisómeros de la fusarina C. **C:** Intermediarios de la fusarina C detectados en *F. fujikuroi* (modificado de (Niehaus, Kleigrew et al. 2013)).

El término fusarinas engloba una familia de compuestos con diversas variaciones estructurales (Figura 7). *F. fujikuroi* produce mayoritariamente

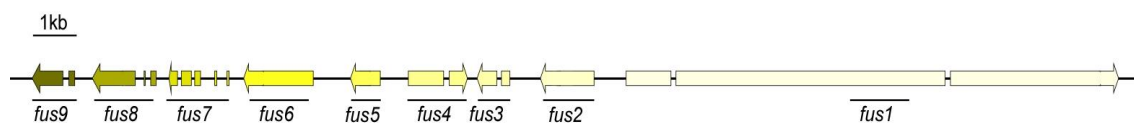
fusarina C, que posee un cromóforo poliénico con un sustituyente 2-pirrolidona que se deteriora de espontáneamente al absorber radiación UV, generando los estereoisómeros 6Z, 8Z y 10Z (Gelderblom, Thiel et al. 1983). También se han detectado otros intermediarios, como la fusarina C de cadena abierta, la dihidrofusarina y la *epi*-fusarina ((Niehaus, Kleigrewé et al. 2013). Tanto la fusarina C como sus estereoisómeros poseen propiedades mutagénicas, las cuales no se han descrito para las fusarinas A y D, producidos por distintas especies de *Fusarium*. La ausencia de actividad mutagénica se debe a la carencia del grupo epóxido en los carbonos C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub>.

Gen	Posible función	Longitud (pb)
<i>pk<sub>s</sub>1</i>	PKS	11.857
<i>pk<sub>s</sub>2</i>	α/B hidrolasa	1.260
<i>pk<sub>s</sub>3</i>	Factor de elongación	726
<i>pk<sub>s</sub>4</i>	Peptidasa A1	1.239
<i>pk<sub>s</sub>5</i>	Hidrolasa de serina	702
<i>pk<sub>s</sub>6</i>	Transportador	1.685
<i>pk<sub>s</sub>7</i>	Deshidrogenasa de aldehído	1.644
<i>pk<sub>s</sub>8</i>	Citocromo P450	1.116
<i>pk<sub>s</sub>9</i>	Transferasa de metilo	1.132

**Tabla 3. Características de los genes que constituyen el agrupamiento génico *pk<sub>s</sub>*:** en rojo aparecen marcados los genes necesarios para la síntesis de fusarina C en *F. fujikuroi*.

Recientemente se ha identificado el agrupamiento génico responsable de la síntesis de fusarinas en *F. fujikuroi* (Niehaus, Kleigrewé et al. 2013) (Figura 8). El agrupamiento contiene 9 genes, de los cuales sólo 4 son esenciales para la síntesis de estos policétidos (Tabla 3). El gen *pk<sub>s</sub>1* cifra la PKS/NRPS que sintetiza un precursor abierto de la fusarina C, mientras que los productos de *pk<sub>s</sub>2*, *pk<sub>s</sub>8* y *pk<sub>s</sub>9* participan en la formación del anillo 2-pirrolidona, la oxidación del carbono C<sub>20</sub> para formar el grupo carboxílico y la metilación del grupo hidroxilo del carbono C<sub>21</sub>, respectivamente (Kleigrewé, Aydin et al. 2012) (Niehaus, Kleigrewé et al. 2013).

La producción de fusarinas es modulada por diferentes factores ambientales. Se ha descrito que la síntesis es estimulada por carencia de zinc (Jackson, Slininger et al. 1989) y por altas concentraciones de carbono (Jackson and Freer 1991) en *F. moniliforme*, y por temperatura elevada y niveles bajos de aireación (Giordano and Domenech 1999b) así como por exceso de nitrógeno en el medio (Wiemann, Brown et al. 2010) (Díaz-Sanchez, Avalos et al. 2012) en *F. fujikuroi*. La regulación por nitrógeno ha sido objeto de estudio en varios trabajos, habiéndose investigado la expresión de los genes *fus* en mutantes carentes de genes funcionales para proteínas asociadas a la asimilación de este nutriente, como AreA, AreB, MeaB y Gln1. La carencia de las tres primeras proteínas, asociadas a la regulación por nitrógeno, no afecta a los niveles de ARNm de los genes *fus*, mientras que la ausencia de sintetasa de glutamina (mutantes  $\Delta gln1$ ) reduce la expresión de los genes que componen el agrupamiento génico (Niehaus, Kleigrew et al. 2013). Algunos experimentos parecen indicar que el complejo Velvet (VelA, VelB y LaeA), homólogo de un complejo anteriormente estudiado en *Aspergillus nidulans* implicado en el control del metabolismo secundario ((Bayram, Krappmann et al. 2008), podría ejercer un control positivo sobre la síntesis de fusarinas (Wiemann, Brown et al. 2010). El pH constituye otro importante factor modulador de la síntesis de estos compuestos, siendo ésta favorecida por el pH alcalino. Sin embargo, este efecto es independiente del factor de transcripción de respuesta a pH PacC (Niehaus, Kleigrew et al. 2013).



**Figura 8. Agrupamiento génico *pks*** (modificado de (Niehaus, Kleigrew et al. 2013))

### 2.3.2 Terpenoides: giberelinas y carotenoides

Los terpenoides constituyen un amplio grupo de compuestos químicos que tienen en común su origen a partir de una molécula de cinco átomos de carbono, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) (ver Figura 4). La ruta más conocida para síntesis de IPP usa como intermediario el mevalonato, derivado del acetyl-CoA a través de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (Goodwin

and Lijinski 1952). Durante varias décadas se creyó que esta era la única vía para sintetizar IPP, pero más tardíamente se descubrió una segunda ruta, conocida como ruta de Rohmer, que genera IPP por condensación de hidroxietilamina con gliceraldehído 3-fosfato (Rohmer, Knani et al. 1993). La ruta de Rohmer no está presente en hongos, si bien coexiste con la ruta del mevalonato en plantas y otros organismos (Eisenreich, Menhard et al. 1996) (Schwender, Seemann et al. 1996).

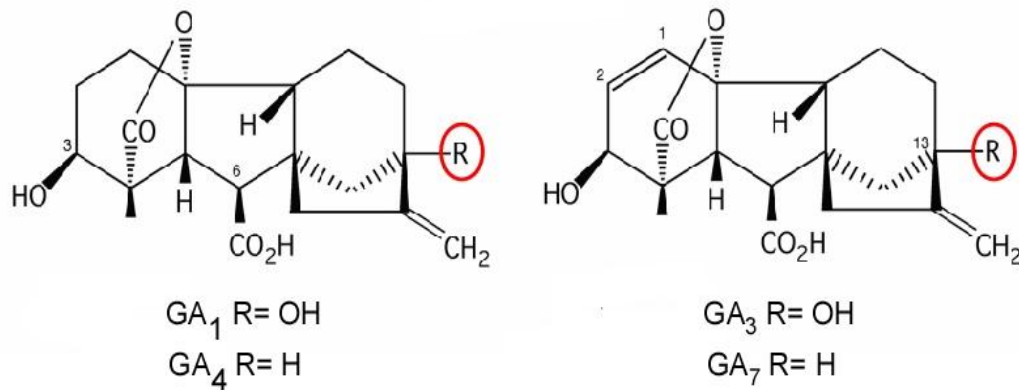
Numerosos terpenoides, tanto de plantas como de hongos u otros organismos, tienen considerable interés biológico e incluso industrial. Un grupo particularmente relevante son los esteroides, que ejercen un papel importante en el control de la fluidez de las membranas plasmáticas. Son también terpenoides de particular relevancia la ubiquinona, los dolicoles, el ácido abscísico, los carotenoides o las giberelinas. Se describen a continuación los dos últimos, de especial interés en esta Tesis por ser producidos por *F. fujikuroi*.

### 2.3.2.1 Giberelinas

Las giberelinas son hormonas promotoras del crecimiento en las plantas, participando en numerosos procesos del desarrollo vegetal, tales como la elongación del tallo, la floración o la formación del fruto (Yamaguchi 2008). Estos compuestos deben su nombre a su descubrimiento como metabolitos secundario en cultivos de ciertas estirpes del complejo *Gibberella fujikuroi* (Kawaide 2006). Su descubrimiento en las plantas fue más tardío, ya que debido a su naturaleza hormonal, se encuentran en el tejido vegetal a concentraciones extremadamente bajas.

Como las fusarinas, las giberelinas son una familia compleja de compuestos con una base estructural similar, con distintos radicales y modificaciones químicas que les confieren diferentes propiedades bioactivas. Las giberelinas pueden poseer 19 o 20 átomos de carbono, y se denominan con las letras GA seguidas de un número según el orden temporal de identificación (Sponsel and Hedden 2004) (Figura 9).

Mientras que en las plantas la síntesis de giberelinas se asume que es prácticamente universal, son muy pocos los microorganismos que las producen. De hecho, en hongos solo se han descrito en *Phaeosphaeria sp*,

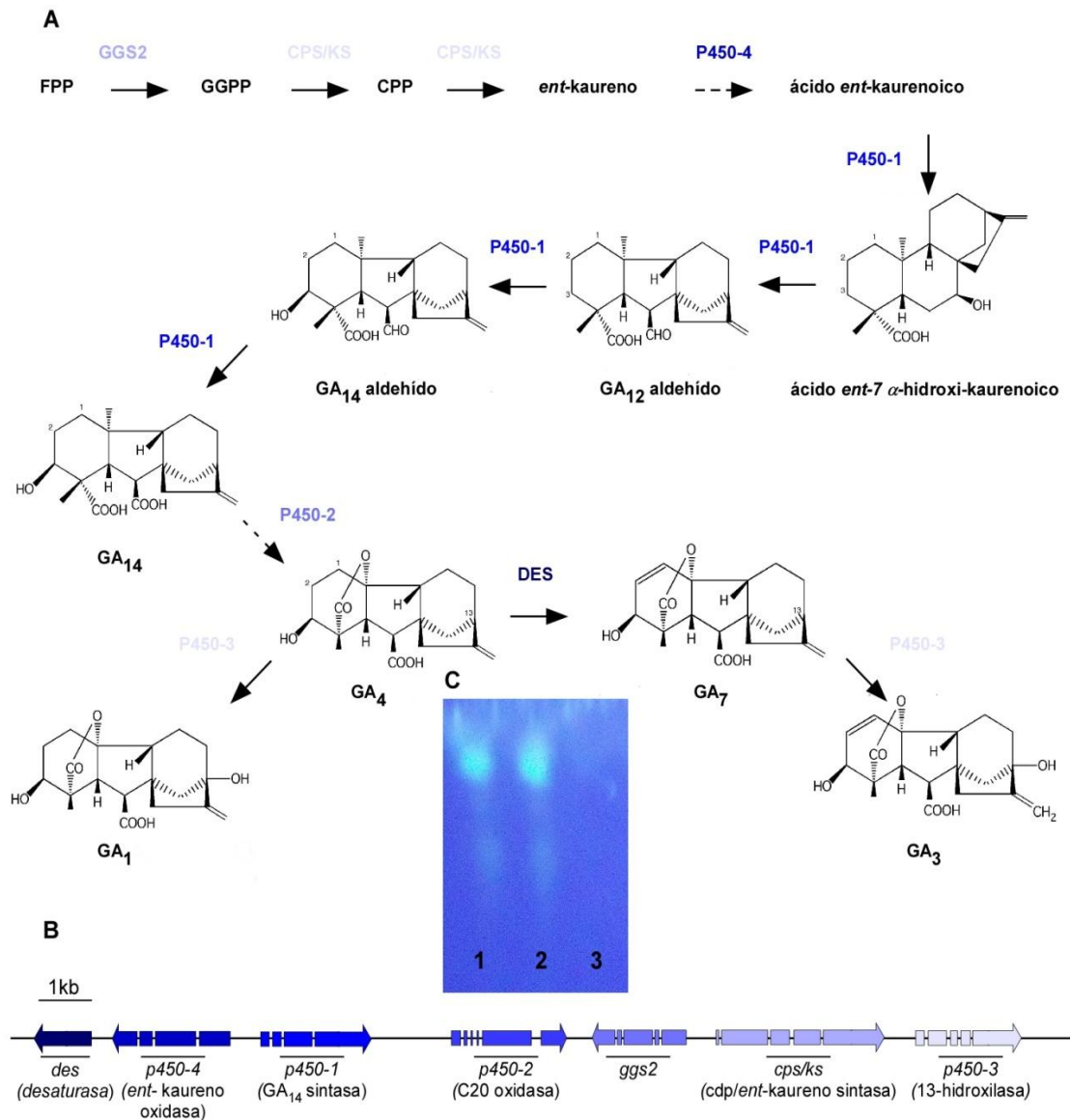


**Figura 9. Algunas giberelinas bioactivas.** Nótese los diferentes compuestos de la familia en función del radical en cada posición de la molécula.

*Sphaceloma manihoticola* y *N. crassa* además de *F. fujikuroi*. La rareza de esta ruta biosintética en hongos sugiere su origen por transferencia génica horizontal desde plantas (Chapman and Regan 1980). Sin embargo, los estudios moleculares posteriores contradicen esta teoría, ya que muestran diferencias profundas a nivel genético y bioquímico entre los procesos de síntesis en ambos grupos de organismos.

En el caso de *F. fujikuroi*, la síntesis de giberelinas parte de IPP generado por la ruta del mevalonato. Cuatro pasos de fusión de unidades de 5 átomos de carbono dan lugar sucesivamente a los pirofosfatos de geranilo (10 C), farnesilo (15 C) y geranilgeranilo (GGPP), este último precursor tanto de las giberelinas como de los carotenoides. En *F. fujikuroi* hay dos sintasas de prenilo que producen GGPP, denominadas GGS1 (Mende, Homann et al. 1997) y GGS2 (Tudzynski and Hölter 1998). Como se indica más adelante, GGS2 parece ser específica para la síntesis de giberelinas. El GGPP es sustrato de una enzima bifuncional que lo convierte en un compuesto tetracíclico, el *ent*-kaureno (Tudzynski, Kawaide et al. 1998). A partir del *ent*-kaureno se suceden diferentes reacciones, en su mayoría de oxidación, hidroxilación o desaturación, para generar el producto principal de la ruta en *F. fujikuroi*, la

giberelina GA<sub>3</sub> o ácido giberélico, Sin embargo, el hongo excreta también cantidades menores de otras giberelinas, como GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub> o GA<sub>7</sub> (Figura 10).



**Figura 10. Ruta biosintética de las giberelinas y agrupamiento génico en *F. fujikuroi*.** **A:** Ruta de síntesis y estructura química de las giberelinas más relevantes. **B:** Agrupamiento génico para las enzimas de la síntesis. **C:** Cromatografía en capa fina que muestra extractos de estirpes productoras (carriles 1 y 2) y no productora (carril 3) de giberelinas. La mancha fluorescente situada arriba corresponde a ácido giberélico.

Como ya se observó para otros metabolitos secundarios, los genes responsables de la síntesis de giberelinas se encuentran contiguos en un agrupamiento génico en el genoma de *F. fujikuroi*, sometidos a mecanismos de regulación común (revisado en (Tudzynski 2005)). El agrupamiento incluye el gen de la sintasa de GGPP (*ggs2/gibA*), ya mencionado, y otros seis genes para la enzima bifuncional con actividades sintasa de pirofosfato de *ent*-copalilo y de *ent*-kaureno (*cps/ks*), cuatro monooxigenasas de la familia P450 (P4501-4) y una desaturasa (*des*) (Figura 10). Debido a la complejidad de la terminología empleada, se ha propuesto una red denominación de los genes como *gibA-gibC*, siguiendo el orden secuencial de las reacciones en la ruta (Avalos, Cerdá-Olmedo et al. 2007).

La biosíntesis de giberelinas por *F. fujikuroi* es regulada por la disponibilidad de nutrientes, principalmente el nitrógeno (Tudzynski, Homann et al. 1999), aunque también se ha descrito una influencia de la luz (revisado por (Avalos and Estrada 2010) (Castrillo, García-Martínez et al. 2013)). El nitrógeno actúa como señal represora de la síntesis. Así, en cultivos en laboratorio, la síntesis de giberelinas tiene lugar tras varios días de incubación y solo cuando la relación nitrógeno/carbono permite que el nitrógeno se agote totalmente (Candau, Avalos et al. 1992). La regulación por nitrógeno es mediada principalmente por el factor de transcripción AreA, ya que la activación por ausencia de nitrógeno de casi todos los genes de la ruta (con la notable excepción de P450-3) no se produce en ausencia de esta proteína (Mihlan, Homann et al. 2003) (Tudzynski, Mihlan et al. 2003). La regulación por nitrógeno de los genes *gib* es sin embargo más compleja, ya que se han identificado otros genes cuyas pérdidas por mutación aumentan su expresión. Entre ellos figuran Nmr1, supuesto inhibidor de AreA, o MeaB, represor de genes regulados por nitrógeno (Mihlan, Homann et al. 2003). A su vez, la mutación de *glnA*, ya mencionada, provoca un fuerte represión de los genes *gib* (Teichert, Schönig et al. 2004).

### 2.3.2.2 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos tetraterpenoides lipófilos que contienen cadenas poliénicas alifáticas, con extremos frecuentemente

ciclados. El término carotenoides engloba a dos tipos de moléculas, los carotenos y las xantofilas. Los primeros poseen tan solo carbono y nitrógeno en su estructura, mientras que las xantofilas además presentan átomos de oxígeno. El licopeno o el  $\beta$ -caroteno son ejemplos típicos de carotenos, mientras que la luteína o la astaxantina lo pueden ser para las xantofilas.

#### 2.3.2.2.1 Los carotenoides en la naturaleza

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Figura 11), hallándose también en organismos que no son capaces de sintetizarlos, y que los ingieren en la dieta (Maiani, Castón et al. 2009). Los organismos capaces de sintetizar carotenoides incluyen las plantas y algas (Edge, McGarvey et al. 1997), así como numerosas bacterias (Armstrong 1997) y hongos filamentosos (Sandmann and Misawa 2002).



**Figura 11. Carotenoides en la naturaleza:** los carotenoides se encuentran presentes en una enorme variedad de organismos, siendo parte imprescindible de nuestra dieta.

Los carotenoides son pigmentos muy importantes en las plantas, ya que juegan un papel esencial en numerosos procesos básicos de su biología. Por ejemplo, los carotenoides son componentes esenciales de los centros de reacción fotosintéticos (Edge, McGarvey et al. 1997) y actúan además como señales en el desarrollo. Además, son responsables de una extensa gama de



colores en flores, y frutos, que va desde los tonos amarillentos a los rojizos. En las estructuras verdes estos colores son enmascarados por la clorofila, pero se ponen en evidencia en las hojas en senescencia en el otoño. La pigmentación en flores y frutos constituye un importante aspecto evolutivo, ya que contribuye a mejorar las posibilidades de dispersión de las semillas por mamíferos, pájaros e insectos. Igualmente, los carotenoides contribuyen al sabor y olor de flores y frutos (Auldridge, McCarty et al. 2006).

Con una única excepción conocida en áfidos, explicada por transferencia génica horizontal desde hongos (Moran and Jarvik 2010), los animales no son capaces de sintetizar carotenoides. Sin embargo, los carotenoides o sus derivados pueden desempeñar funciones muy importantes en estos organismos. Así, el retinol (vitamina A), cuyo principal precursor es el  $\beta$ -caroteno, desempeña un papel fundamental en la visión a través de su papel como cromóforo de las opsinas. Un derivado de éste, el ácido retinoico, es un morfógeno necesario para el correcto desarrollo embriológico e inmunológico de cordados (Rhinn and Dolle 2012). En seres humanos, el déficit de carotenoides en la dieta es causante de ceguera por un incorrecto desarrollo de la retina (West and Darnton-Hill 2008). Además, la carencia en la dieta de xantofilas como la zeaxantina y la luteína aumenta el riesgo de degeneración de la mácula del ojo, un hecho asociado a la mayoría de casos de ceguera en la tercera edad (Krinsky, Landrum et al. 2003).

En la actualidad está muy aceptado que la presencia de carotenoides en la dieta, especialmente por sus propiedades antioxidantes, es beneficiosa para la salud (Fraser and Bramley 2004). La ingesta de ciertos carotenoides, como el licopeno, abundante en el tomate o en la sandía, potencian la capacidad de respuesta inmunológica (Jyonouchi, Zhang et al. 1993) y reducen el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Nishino 1998) (Wang, Gaziano et al. 2008).

La importancia de los carotenoides no solamente se debe a sus propiedades saludables para el ser humano, sino a que se trata de pigmentos relevantes para la industria. De esta manera, los carotenoides son utilizados como aditivos precursores de vitamina A y como colorantes naturales

bioactivos en la industria alimentaria (Castillo, Fernández et al. 2005) (Mapari, Nielsen et al. 2005). En la industria cosmética es destacable el uso de los mismos como ingredientes protectores frente al daño oxidativo provocado en la piel por los radicales libres (Lademann, Schanzer et al. 2011).

La capacidad de sintetizar carotenoides es un carácter frecuente en los hongos y algunos de ellos, como *N. crassa*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor circinelloides*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* o *F. fujikuroi* han sido modelos ampliamente usados para su estudio (Avalos, Díaz-Sánchez et al. 2014). Sin embargo, los carotenoides no parecen jugar un papel importante en la biología de estos organismos, como se deduce de la existencia de hongos que carecen de ellos o de mutantes albinos en los hongos productores, perfectamente en su crecimiento. Existe actualmente cierta controversia sobre el posible papel de los carotenoides en los hongos como protectores frente a estrés oxidativo. Sin embargo, numerosos ejemplos parecen indicarlo. Por citar algunos, el hongo *Sclerotium rolfsii* produce altos niveles de  $\beta$ -caroteno en respuesta a estrés oxidativo, lo cual es suficiente por sí mismo para inducir la formación de esclerocios (Georgiou, Zervoudakis et al. 2001), y la adición de compuestos generadores de especies reactivas de oxígeno a cultivos de *X. dendrorhous* provoca un incremento de los niveles de producción de astaxantina (Liu and Wu 2006).

En ciertos zigomicetos, como *Blakeslea trispora* o *P. blakesleeanus*, el  $\beta$ -caroteno actúa como precursor de sus hormonas sexuales, los ácidos trispóricos (Austin, Bu'Lock et al. 1970) (Polaino, Herrador et al. 2010). Así, los mutantes bloqueados en pasos previos de la síntesis de  $\beta$ -caroteno son sexualmente incompetentes (Sutter 1975).

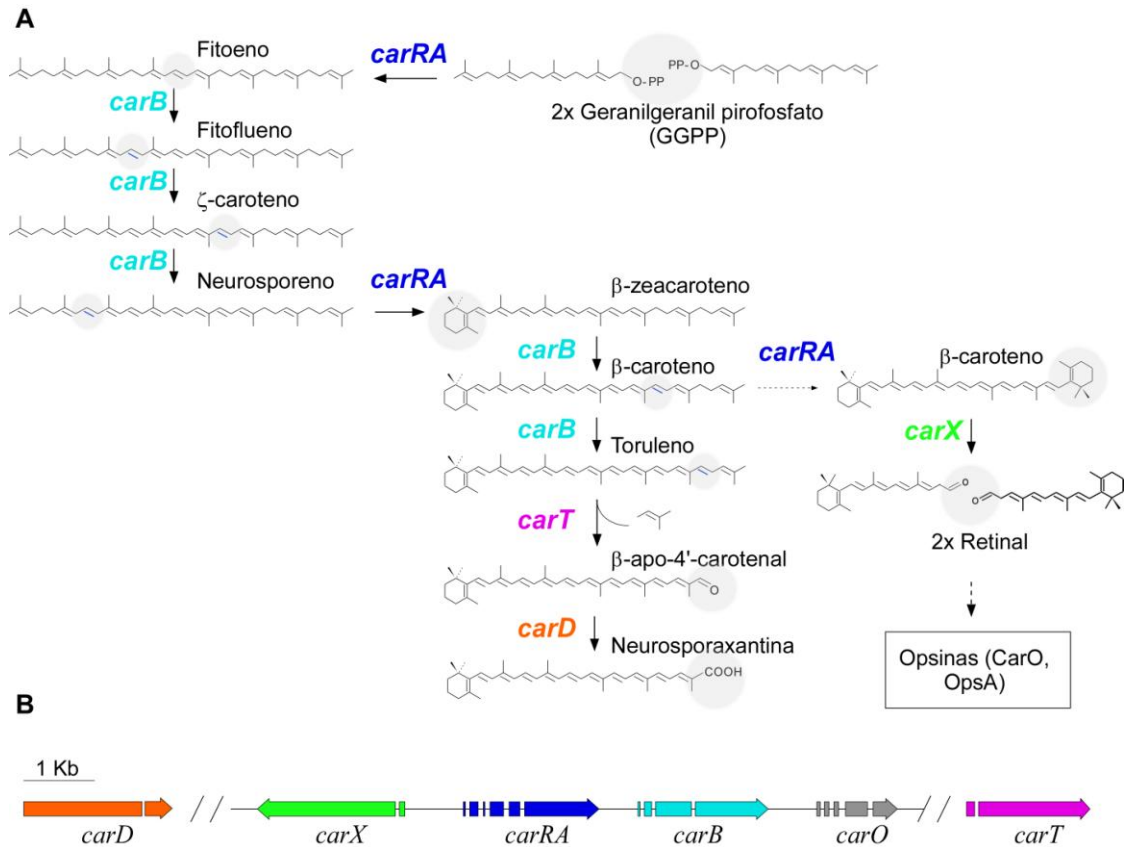
#### **2.3.2.2.2 Los carotenoides en *F. fujikuroi***

El carotenoide mayoritario en *F. fujikuroi* es la neurosporaxantina (ácido  $\beta$ -apo-4'-carotenoico), una xantofila originariamente identificada en *N. crassa* (Zalokar 1957). Los primeros pasos de su ruta biosintética (Figura 12A), similares a los de otros hongos, parten de la condensación de dos moléculas de GGPP para formar un caroteno incoloro, el fitoeno. La reacción es llevada a cabo por la enzima CarRA (Linnemannstöns, Prado et al. 2002b). La

molécula de fitoeno es objeto de cuatro desaturaciones, catalizadas por la desaturasa CarB, y de una ciclación terminal llevada a cabo por el dominio ciclasa de la enzima CarRA, que es una enzima bifuncional. El producto de la ciclación, el  $\gamma$ -caroteno (Prado-Cabrero, Schaub et al. 2009), es desaturado en una quinta posición por CarB para producir toruleno, que será cortado por la oxigenasa CarT (Prado-Cabrero, Estrada et al. 2007a) para producir  $\beta$ -apo-4' carotenal. Una última reacción enzimática llevada a cabo por la deshidrogenasa de aldehído CarD (Díaz-Sanchez, Estrada et al. 2011) genera el grupo carboxilo para producir la neurosporaxantina.

En una rama paralela a esta ruta, el  $\gamma$ -caroteno es objeto de una segunda ciclación por CarRA para producir  $\beta$ -caroteno (Avalos and Cerdá-Olmedo 1987). Este caroteno es sustrato de la oxigenasa CarX, que lo escinde en dos moléculas de retinal (Prado-Cabrero, Scherzinger et al. 2007b). La producción de retinal puede tener especial relevancia biológica en *F. fujikuroi* ya que es el cromóforo potencial de las rodopsinas que posee este ascomiceto, CarO y OpsA. El  $\beta$ -caroteno se encuentra en concentraciones relativamente bajas en el hongo, pero el retinal no es visible a simple vista y no se han podido determinar sus concentraciones.

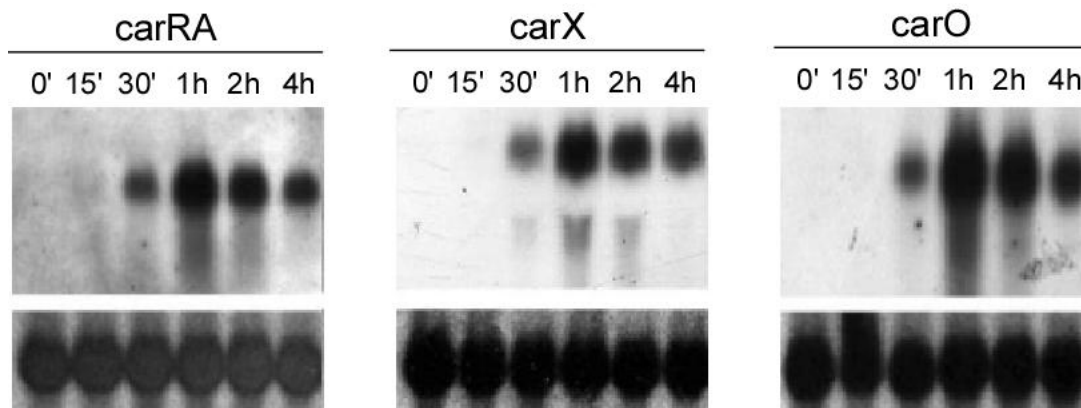
De los genes *car* citados arriba, *carRA* y *carB* son necesarios para la síntesis tanto de  $\beta$ -caroteno como de neurosporaxantina, mientras que *carT* *carD* y solo son necesarios para la síntesis de esta última. Es interesante hacer notar que *carRA* y *carB* se encuentran en el genoma en un agrupamiento génico junto a *carX* y el gen de una de las dos opsinas, *carO*. Por tanto, este agrupamiento contiene la información necesaria para la síntesis de opsina CarO fotoactiva. Sin embargo, los genes *carD* y *carT* se encuentran localizados en distintas regiones del genoma del hongo (Figura 12B).



**Figura 12. Síntesis de carotenoides en *F. fujikuroi*.** **A:** Ruta biosintética. Se indican los nombres de los genes responsables de cada paso y se resaltan en gris los lugares donde se producen las reacciones químicas. **B:** Organización genética de los genes *car*. Los huecos dentro de los genes indican intrones.

La regulación de la síntesis de carotenoides en *F. fujikuroi* ha sido objeto de especial atención en el laboratorio donde se ha desarrollado esta Tesis. En los medios sintéticos empleados habitualmente en el laboratorio, la estirpe silvestre produce en oscuridad cantidades muy bajas de carotenoides. En la luz, sin embargo presenta una pigmentación anaranjada debido a la acumulación de neurosporaxantina y cantidades menores de carotenoides precursores, como el toruleno (Avalos and Cerdá-Olmedo 1987). La exposición del hongo a la luz desencadena una rápida activación transcripcional de los genes *car* (revisado por (Avalos and Estrada 2010), con la excepción de *carD* ((Díaz-Sanchez, Estrada et al. 2011)). En las condiciones estudiadas, tras unos minutos de exposición a luz se aprecia una subida en los niveles de ARNm, que alcanzan su máximo tras unos 60 minutos de iluminación (Avalos, Bejarano et

al. 1993) (Saelices, Youssar et al. 2007) (Estrada and Avalos 2008a) (Figura 13). Posteriormente, los niveles de ARNm disminuyen, fenómeno conocido como fotoadaptación.



**Figura 13. Efecto de la luz sobre los niveles de ARNm de los genes *car*:** Niveles de ARNm de distintos genes *car* en oscuridad (tiempo 0') y a distintos tiempos de iluminación. Puede apreciarse el fenómeno de la fotoinducción, alcanzándose el máximo tras iluminar 1 hora. En el panel inferior, control de carga correspondiente a RNAr.

La búsqueda del sistema fotorreceptor encargado de la fotoinducción de los genes *car* de *Fusarium* se basó en resultados previos en *N. crassa*, donde el complejo White Collar (WC), formado por los fotorreceptores WC-1 y WC-2, es responsable de la fotoinducción de la carotenogénesis. En este hongo, los mutantes carentes de un complejo WC completo presentan micelio completamente albino en la luz (Degli-Innocenti and Russo 1984), mientras que los conidios producidos por las hifas aéreas muestran un color anaranjado debido a poseer una regulación independiente por desarrollo. El complejo WC controla también otras fotorrespuestas investigadas en *N. crassa*, como el ritmo circadiano (Russo 1988) o el desarrollo de protoperitecios (Degli-Innocenti and Russo 1984).

*F. fujikuroi* posee genes homólogos de *wc-1* y *wc-2* de *N. crassa*, por lo que se deduce que posee un complejo WC similar. Sin embargo, los mutantes carentes de una copia funcional del homólogo de *wc-1*, *wcoA*, siguen mostrando fotoinducción de la carotenogénesis (Estrada and Avalos 2008a), y un resultado similar se encontró en *F. oxysporum* (Ruiz-Roldán, Garre et al. 2008). Esto indica que el complejo WC no es el único fotorreceptor

responsable de la fotoinducción de la carotenogénesis en *Fusarium*, por lo que recientemente se ha extendido el estudio a otros posibles fotorreceptores. Así, se ha estudiado el efecto de las mutaciones de los genes *cryD* y *vvdA*, que cifran un criptocromo de tipo DASH (Castrillo, García-Martínez et al. 2013) y la flavoproteína VvdA (Castrillo and Avalos 2014), respectivamente. Los mutantes carentes de estas fotoproteínas siguen mostrando fotoinducción de la síntesis de carotenoides, pero sus cinéticas de acumulación están alteradas, mostrando además los mutantes  $\Delta wcoA$  una respuesta más lenta (Castrillo 2014). Los resultados conducen a un modelo en el que participan varios fotorreceptores de forma cooperativa, con distintos papeles en fases tempranas o tardías del proceso, con un papel central para WcoA como principal inductor transcripcional. El caso del gen *vvdA* es especialmente interesante, ya que es homólogo de *vvd* de *N. crassa*, que juega un papel relevante en el mecanismo de fotoadaptación (Schwerdtfeger and Linden 2003). Los resultados indican que en *F. fujikuroi* VvdA no participa en la fotoadaptación, pero controla posiblemente la actividad de los otros fotorreceptores, además de ejercer influencia en el desarrollo del micelio en la luz (Castrillo and Avalos 2014).

Además de la luz, otros factores ambientales modulan la producción de carotenoides en *F. fujikuroi*. Por ejemplo, la estirpe silvestre IMI58289 acumula más carotenoides si se incuba a 30°C que cuando se hace a 22°C (Avalos and Cerdá-Olmedo 1987). De igual manera, la escasez de nitrógeno en el medio ejerce de señal inductora de manera independiente y aditiva al efecto de la luz (Rodríguez-Ortiz, Limón et al. 2009).

#### **2.3.2.2.3 Fenotipos asociados a defectos en la carotenogénesis en hongos: los fenotipos *carS* y *ovc*.**

En muchos hongos se han descrito mutantes desregulados para la síntesis de carotenoides (Avalos, Díaz-Sánchez et al. 2014). Ese es el caso de los mutantes *carS* (superproductores de carotenoides) de *F. fujikuroi*, que presentan una coloración intensamente anaranjada en cualquier condición de cultivo (Figura 14A). El análisis de los genes *car* en estos mutantes indica que

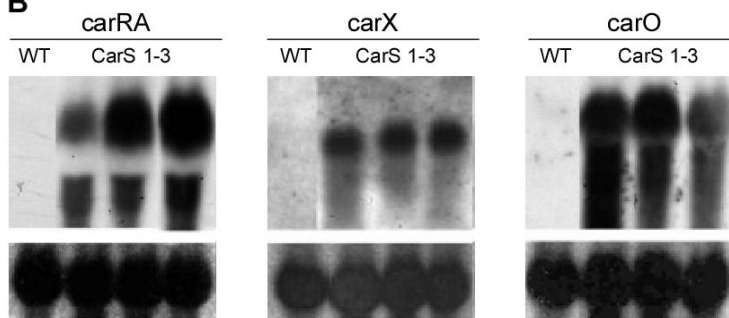
se transcriben a altos niveles tanto en luz como en oscuridad (Figura 14B) (Linnemannstöns, Prado et al. 2002b) (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004) (Thewes, Prado-Cabrero et al. 2005). Recientemente se ha identificado el gen *carS*, cuya mutación produce el fenotipo aludido tanto en *F. fujikuroi* (Rodríguez-Ortiz, Limón et al. 2013) como en *F. oxysporum* (Rodríguez-Ortiz, Michielse et al. 2012). El gen CarS cifra una proteína homóloga a CrgA de *M. circinelloides*, para la que se ha descrito actividad ligasa de ubiquitina (Nicolas-Molina, Navarro et al. 2008).

**A**



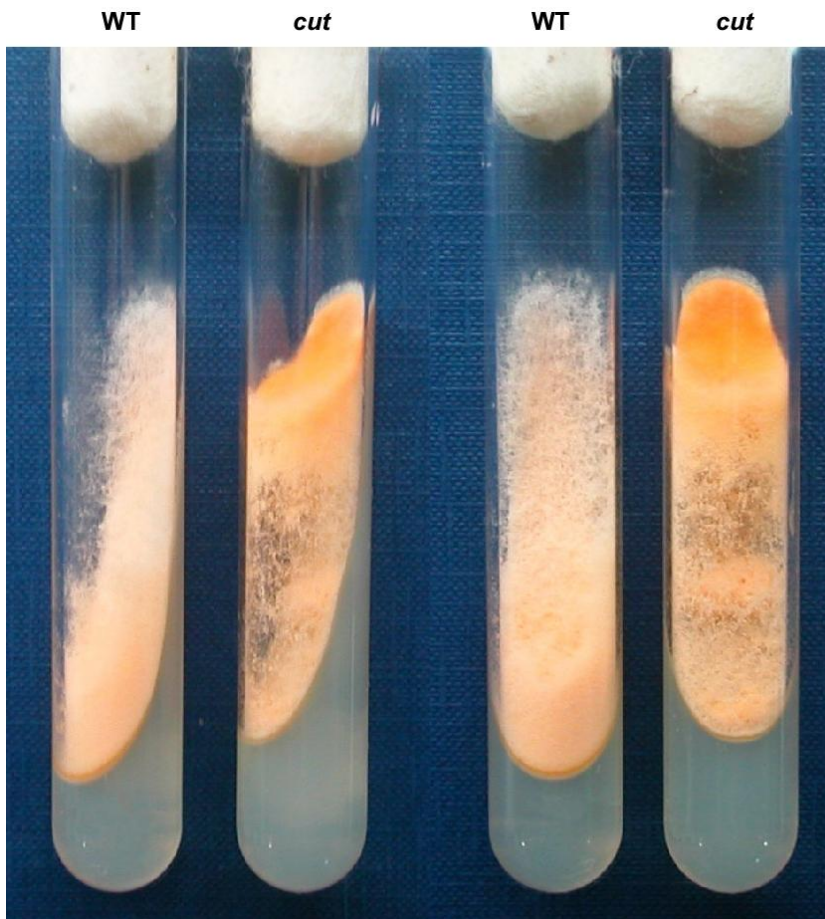
**Figura 14. Fenotipo mutantes CarS.** **A:** Mutantes CarS y WT incubados en oscuridad. El color anaranjado de los mutantes CarS se debe a la acumulación de carotenoides, mientras que la estirpe WT no los sintetiza en oscuridad. **B:** Niveles de ARNm de distintos genes *car* en oscuridad. Tanto *carRA* como *carX* y *carO* se encuentran reprimidos en oscuridad en la estirpe WT, pero inducidos en tres mutantes CarS distintos. En el panel inferior, control de carga correspondiente a RNAr.

**B**



En *N. crassa* no existen mutantes con el nivel de desregulación de la carotenogénesis independiente de la luz mostrado por los mutantes *carS* de *Fusarium*. Sin embargo, algunos mutantes muestran más carotenoides que la estirpe silvestre en la luz, como es el caso del mutante *ovc* (de

*overaccumulation of carotenoids*), si bien los niveles en oscuridad no se ven afectados (Harding, Philip et al. 1984). Además de este fenotipo, el mutante *ovc* muestra una inhibición parcial de su crecimiento en condiciones de alta presión osmótica (obtenidos suplementando el medio con 0,65 M de NaCl, KCl, NaNO<sub>3</sub> o, KNO<sub>3</sub>, así como 1,3 M de sorbitol, (Youssar, Schmidhauser et al. 2005)), y una alteración en el desarrollo en tubos de agar inclinado, consistente en una compactación del micelio en la parte alta del cultivo. Los dos últimos fenotipos son mostrados también por otro mutante, llamado *cut* (Kuwana 1953) (Figura 15), pero éste manifiesta una fotoinducción normal de la carotenogénesis.



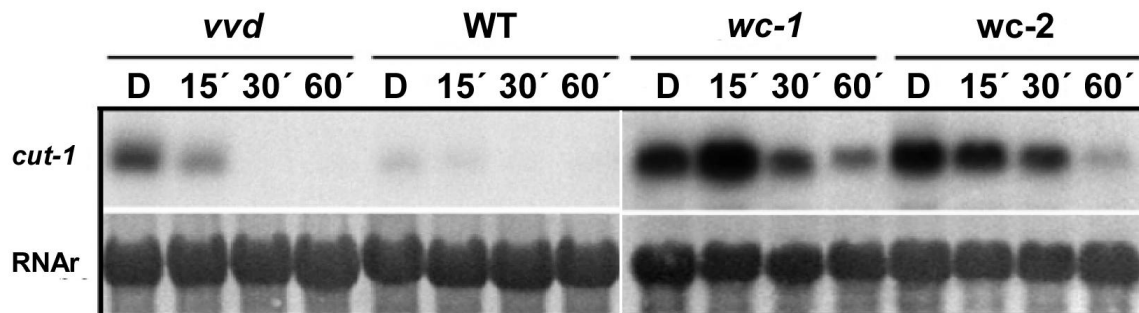
**Figura 15.** Comparación fenotípica entre las estirpes WT y *cut* de *N. crassa*: puede apreciarse la formación de un “tapón” de micelio aterciopelado en la parte superior del tubo correspondiente al mutante *cut*.

La identificación del gen *cut*, llamado *cut-1*, puso en evidencia que su mutación causa simultáneamente la sensibilidad a condiciones hiperosmóticas y la compactación micelial. Datos genéticos previos indicaron que las mutaciones *cut* y *ovc* eran alélicas (Banks, Bennett et al. 1997). Este hecho



quedó confirmado por el hallazgo en el mutante *ovc* de una delección de 77 kb que incluye el gen *cut-1*, y la constatación de que el fenotipo superproductor de carotenoides en la luz se debe al efecto sinérgico de la pérdida de otro de los genes delecionados (Youssar and Avalos 2007).

El gen *cut-1* cifra una proteína de la familia HAD (*haloacid dehalogenases*), que incluye enzimas con diferentes actividades, normalmente asociadas a reacciones de defosfatación. El estudio del gen *cut-1* reveló que su expresión se induce por alta presión osmótica, mientras que otras condiciones de estrés, como la adición al medio de cultivo de agentes oxidantes o del antifúngico fludioxonil (dispara la ruta HOG de resistencia a estrés osmótico) no produce cambios importantes en los niveles de ARNm *cut-1* (Youssar and Avalos 2006). Además de por estrés osmótico, el gen *cut-1* es regulado por luz: sus niveles de ARNm en oscuridad caen drásticamente al iluminar al hongo. Interesantemente, los mutantes de la proteína VIVID y el complejo WC, entre otros, mantienen la fotorepresión pero los niveles globales de ARNm del gen son más elevados (Youssar and Avalos 2006) (Figura 16).



**Figura 16.** Efecto de la iluminación sobre los niveles de ARNm de *cut-1* en la estirpe silvestre (WT) y en los mutantes *vvd*, *wc-1* y *wc-2* de *N. crassa*. En la estirpe silvestre los niveles de ARNm son relativamente bajos en oscuridad (D), pero desaparecen totalmente al iluminar el cultivo (Tiempos de iluminación indicados en minutos). En la regulación de la expresión del gen *cut-1* parecen participar VVD y WC-1 y WC-2, como indica los mayores niveles de ARNm en las mismas membranas. En el panel inferior, control de carga correspondiente a RNAr [adaptado de (Youssar and Avalos 2006)].

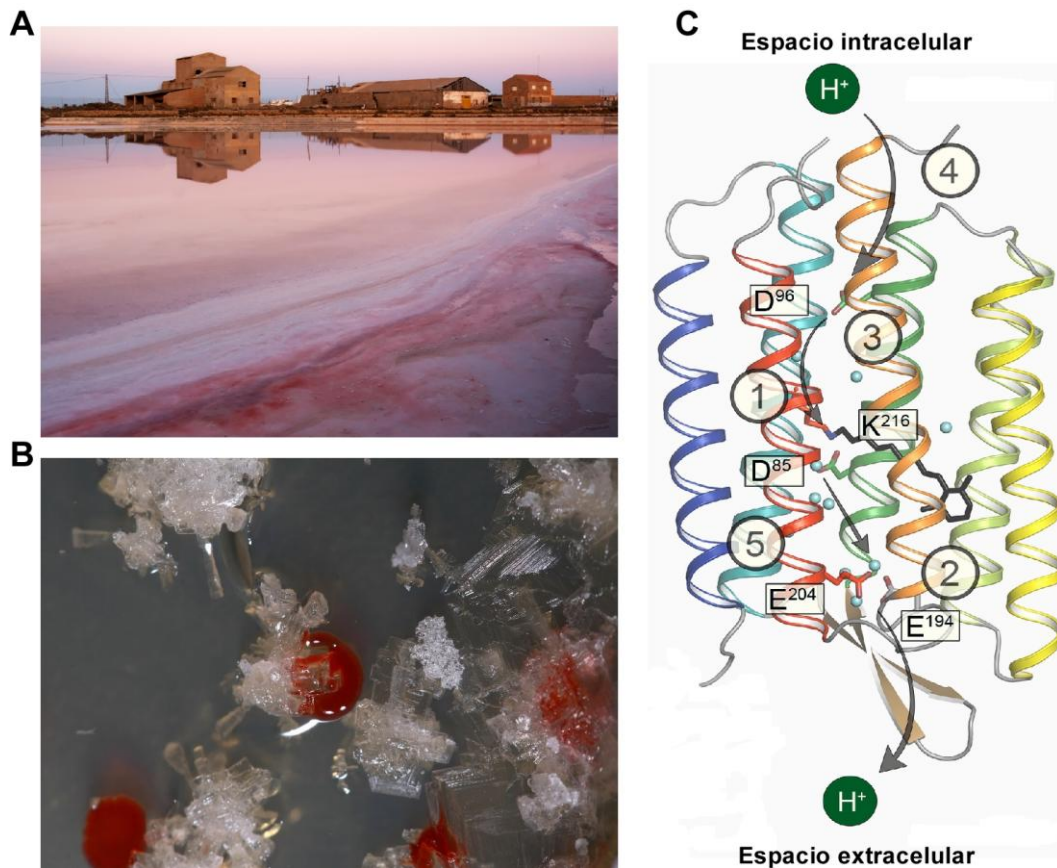
La existencia de fosfatasa en la familia HAD llevó a postular un posible papel regulador de CUT-1 en una cadena de transducción de señales (Youssar, Schmidhauser et al. 2005). La represión de la expresión de *cut-1* por luz en *N. crassa*, la desregulación de su expresión por proteínas asociadas a la fotobiología de este hongo y la posible conexión de CUT-1 con la regulación de la biosíntesis de carotenoides, llevaron a investigar su posible homólogo en *F. fujikuroi*, *cutA*, cuyo estudio constituye uno de los capítulos de esta Tesis.

### 3. Opsinas

Las opsinas constituyen una familia de fotorreceptores de membrana que usan retinal como grupo prostético (Sharma, Spudich et al. 2006). Al absorber la luz, el retinal sufre una fotoisomerización que desencadena cambios en la estructura de la proteína, que pueden detectarse con la aparición de diversos intermediarios en su fotociclo. Las modificaciones estructurales de las opsinas afectan a diferentes procesos, que van desde el transporte de iones a interacciones proteína-proteína.

Las opsinas fotoactivas se conocen como rodopsinas (RDs). La primera investigada fue la bacteriorrodopsina (BR) de la arquea *Halobacterium salinarum* (Bogomolni and Spudich 1982). El descubrimiento de la BR estimuló el estudio bioquímico o molecular de proteínas similares en otros organismos, describiéndose nuevas RDs además de arqueas en algas y eubacterias (Ridge 2002) (Jung, Trivedi et al. 2003). Dentro de esta familia hay un subgrupo de proteínas con alto parecido de secuencia con las opsinas funcionales, pero carentes del residuo de lisina al que se une el cromóforo. Estas proteínas, que presumiblemente no son fotorreactivas, se agrupan bajo el nombre de ORPs (“opsin related proteins”).

La BR ha sido estudiada en gran detalle, incluyendo su mecanismo de acción y su estructura tridimensional (Figura 17). La proteína tiene una masa de 26 kDa y consiste en 248 aminoácidos estructurados en 7 hélices transmembrana, las cuales forman un bolsillo hidrófobo donde una molécula de retinal se une a la lisina 216 de la hélice número 7 a través de una base de Schiff.



**Figura 17. Bacteriorrodopsina (BR) de *H. salinarum*.** A: Salina con tonalidades rojizas debidas al crecimiento de *H. salinarum*. B: *H. salinarum* creciendo entre cristales de sal (por Matt W. Ford). C: Estructura terciaria de la proteína BR. Pueden apreciarse las 7 hélices transmembrana (distintos colores), la molécula de retinal (negro) y la ruta de transferencia de protones desde el espacio intracelular hasta el espacio extracelular durante el fotociclo de la BR (flechas). (1) Transferencia de un protón desde la Base de Schiff (retinal-K216) protonada al aceptor primario Asp85; (2) liberación del protón al medio extracelular por el complejo liberador de protones; (3) reprotonación de la Base de Schiff por el donador primario Asp96; (4) reprotonación de Asp96 desde el citoplasma y (5) transferencia de un protón desde Asp85 al complejo liberador de protones [modificado de (Brown 2014)].

Esta opsina En *H. salinarum*, la BR expulsa protones al espacio extracelular usando luz como fuente de energía. De esta manera, se genera un gradiente electroquímico que usa la arqueobacteria para sintetizar ATP. En el proceso de bombeo de protones juegan un papel esencial ciertos residuos expuestos hacia el interior del bolsillo hidrófobo. Al recibir la energía lumínica, el retinal se desprotona, actuando la asparragina 85 como aceptor del protón. La asparragina 96 actúa reprotonando al retinal tomando un protón del citoplasma. Las rodopsinas se dividen en dos grupos: tipo I y tipo II. Esta división se realiza en base a características tales como el cromóforo que unen, el tipo de fotociclo, o el grupo de organismos donde se han encontrado.

Las rodopsinas de tipo I son fotoisomerasas que actúan principalmente como bombas de iónicas, en procesos de fototaxis y fotoadaptación, y se encuentran ampliamente distribuidas en arqueas, bacterias y eucariotas inferiores (Bieszke, Braun et al. 1999) (Beja, Aravind et al. 2000). Como cromóforo ligan una molécula de *trans*-retinal, que permanece unida a la proteína durante todo el fotociclo (Hofrichter, Henry et al. 1989), que es relativamente rápido. Por su parte, las rodopsinas de tipo II son generalmente fotorreceptores acoplados a proteínas G, y se encuentran principalmente en eucariotas superiores, donde participan en la visión (Menon, Han et al. 2001). El cromóforo, en este caso una molécula de 11-*cis*-retinal o de *trans*-retinal, es liberado del bolsillo hidrófobo durante el fotociclo, que es típicamente más lento que el observado en las rodopsinas tipo I (Brown 2004).

A pesar de compartir una estructura muy similar, con 7 dominios transmembrana, y el uso de retinal como cofactor, actualmente se piensa que ambos grupos de rodopsinas no comparten un origen evolutivo común, y constituyen un ejemplo de evolución convergente (Spudich, Yang et al. 2000).

### 3.1 Opsinas en hongos

El análisis de numerosos genomas de hongos muestra la existencia de una enorme variedad de RDs y ORPs en diversas especies (Tabla 4). Mientras que el número de genes para supuestas opsinas en basidiomicetos y

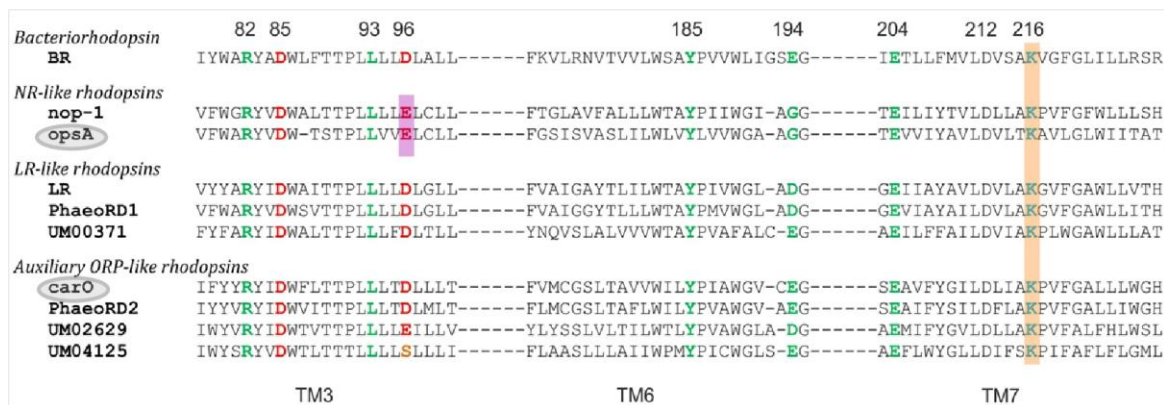
ascomicetos es variable, los genomas secuenciados de zigomicetos no contienen genes reconocibles de esta familia.

Filo	Taxón	RDs/ORPs encontradas
Ascomycota	Dothideomycetes	1/0
Ascomycota	Eurotiomycetes	0/1; 0/2
Ascomycota	Leotiomycetes	1/1
Ascomycota	Sordariomycetes	1/1; 1/0; 0/1; 2/1
Ascomycota	Chaetothyriomycetes	2/0
Ascomycota	Saccharomycetes	0/1; 0/2; 0/3; 0/7
Ascomycota	Schizosaccharomycetes	0/1
Basidiomycota	Heterobasidiomycetes	1/0
Basidiomycota	Homobasidiomycetes	0/2; 0/6
Basidiomycota	Ustilaginomycetes	2/1

**Tabla 4. RDs y ORPs encontradas en distintos genomas de hongos.** Se muestran las distintas combinaciones de RDs y ORPs existentes en cada grupo

En general, las rodopsinas fúngicas son estructuralmente más similares a la rodopsina bacteriana BR que a las rodopsinas tipo canal que aparecen en las algas verdes (Brown 2004). El alineamiento de distintas rodopsinas fúngicas con BR muestra regiones altamente conservadas (Figura 19). Todas ellas contienen el residuo de lisina de la hélice transmembrana 7 supuestamente responsable de la unión de la molécula de retinal a través de una base de Schiff. Aunque los aminoácidos clave suelen estar conservados, las diferencias en el bolsillo de unión al retinal permiten distribuir las rodopsinas fúngicas en 3 grupos: similares a la rodopsina NOP-1 de *N. crassa* (“NR-like rhodopsins”), similares a la rodopsina LR de *Leptosphaeria maculans* (“LR-like rhodopsins”) y proteínas auxiliares relacionadas con opsinas ó OLPs (“auxiliary-ORP like rhodopsins”) (Brown 2004). Las variaciones del entorno del bolsillo hidrofóbico en las rodopsinas de los tres grupos dan lugar a sus distintas propiedades electrofisiológicas. Así, las rodopsinas similares a NOP-1 presentan un fotociclo lento y no hay evidencias experimentales de que posean actividad de bombeo de protones, mientras que las rodopsinas de tipo LR y o las OLPs muestran un fotociclo rápido, y al menos las primeras (en las

segundas aún no se ha estudiado) bombean eficazmente protones (Avalos and Estrada 2010)(Figura 18).



**Figura 18. Comparación entre segmentos relevantes de la BR y algunas opsinas fúngicas representativas.** Se destacan en color los residuos implicados en el fotociclo de la proteína. En color naranja, K216 (formadora de la Base de Schiff); en violeta, el donador primario D96 (no presente en rodopsinas similares a la rodopsina NOP-1); el óvalo gris indica las opsinas cifradas en el genoma de *F. fujikuroi*. Las secuencias pertenecen a la BR de *H. salinarum* y las opsinas UM00371, UM02629 y UM04125 de *Ustilago maydis*, OpsA y CarO de *F. fujikuroi*, LR de *L. maculans* y PhaeoRD2 y PhaeoRD1 de *Phaeosphaeria nodorum*.

El número de rodopsinas estudiadas funcionalmente en hongos es muy escaso, y en ningún caso se ha podido establecer aún su función biológica (Idnurm, Verma et al. 2010). La presencia en hongos filamentosos de rodopsinas con fotociclo rápido (presumiblemente bombas de protones) junto a rodopsinas con fotociclo lento (presumiblemente proteínas fotosensoras) parece indicar que ambos tipos de proteínas juegan un papel en el control de la homeostasis del pH y en la percepción de la luz. Sin embargo, los mutantes generados carentes de alguna de estas rodopsinas no muestran alteraciones fenotípicas claras, al menos en condiciones de laboratorio. En algunos casos estudiados, la expresión de estos genes se induce por la luz (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004) (Kihara, Tanaka et al. 2009) (Estrada and Avalos 2009), lo que parece coherente con la necesidad de luz para su función.



### 3.2 Opsinas en *F. fujikuroi*

En el caso de *F. fujikuroi*, se han descrito en su genoma tres genes que cifran posibles opsinas. De estas tres proteínas, dos poseen el residuo de lisina en posición 216 necesario para la unión del retinal, por lo que podrían ser presumiblemente activas, mientras que la tercera carece de él (Figura 18). Entre las opsinas presumiblemente fotoactivas se encuentran CarO y OpsA. La primera es cifrada por el gen *carO*, mencionado en apartados anteriores y situado en el agrupamiento génico de los genes *car*. El gen *opsA*, por el contrario, se encuentra en una región distinta del genoma del hongo. La mutación dirigida de ambos genes no ha mostrado ningún fenotipo aparente bajo condiciones de laboratorio en *F. fujikuroi* (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004) (Estrada and Avalos 2009), por lo que el papel de ambas proteínas permanece sin aclarar. El estudio del papel de CarO y OpsA en la biología de *Fusarium* es uno de los objetivos de esta tesis.

La tercera opsina de *Fusarium*, HspO, carece del residuo de lisina al que se une covalentemente el retinal, por lo que no parece ser fotoactiva. HSpO es homóloga a YRO2 de *N. crassa* y a HSP30 de *S. cerevisiae*, por lo que se sospecha una posible función como chaperona (Zhai, Heijne et al. 2001).

### 3.3 Usos aplicados de las rodopsinas microbianas

El estudio de las rodopsinas microbianas ha cobrado especial relevancia en las últimas décadas. Las características electrofisiológicas de estas proteínas las hacen especialmente útiles en diversos campos. Por ejemplo, la capacidad de crear voltaje dependiente de energía lumínica por parte de las membranas que contienen rodopsinas puede ser aprovechada para construir células fotoeléctricas o retinas artificiales (Chen and Birge 1993). Por otro lado, la posibilidad de usar rodopsinas microbianas capaces de crear un gradiente de protones a través de una membrana es una característica muy interesante para procesos tan diversos como la desalinización de agua marina (Oesterhelt 1976) (Eisenbach, Weissman et al. 1977) o la producción de biofuel (Walter, Greenfield et al. 2010).



Estas posibles aplicaciones se engloban en un campo de investigación actualmente pujante, la optogenética, consistente en el uso de la tecnología del ADN recombinante para llevar a cabo transfecciones de neuronas animales con vectores virales con genes para rodopsinas microbianas (Scanziani and Hausser 2009). La expresión heteróloga de estas proteínas en neuronas animales ofrece la posibilidad de reprimir o disparar potenciales de acción a través de estímulos lumínicos. La rodopsina 2 del alga *Chlamydomonas reinhardtii*, un canal iónico, ha sido usada para disparar potenciales de acción (Nagel, Szellas et al. 2003), mientras que la halorrodopsina de *Natromonas pharaonis* es capaz de importar iones cloruro y reprimir potenciales de acción en neuronas (Han and Boyden 2007).

El uso de rodopsinas microbianas para el tratamiento de desórdenes neurológicos asociados a enfermedades de la locomoción y el aprendizaje (Szobota and Isacoff 2010) es un campo con gran futuro en la investigación biomédica, si bien existen numerosos problemas bioéticos que han de ser resueltos, tales como la necesidad de experimentación con humanos o el uso de vectores virales como herramienta para la transfección neuronal.



**OBJETIVOS**

**AIMS**



The aim of this study is to contribute to the current knowledge on the regulatory mechanisms that control the responses of fungi to environmental signals, using the model *Fusarium fujikuroi*.

In particular, this Thesis has investigated the following subjects:

1. The role of adenylyl cyclase AcyA of *F. fujikuroi* on the regulation of secondary metabolism, pathogenicity and stress responses.
2. The biological function of the Cut-1 ortholog CutA and its relation with stress responses.
3. The electrophysiological features of the CarO rhodopsin, its *in vivo* localization and its biological function.



# CHAPTER 1

**ADENYLYL CYCLASE PLAYS A REGULATORY ROLE IN  
DEVELOPMENT, STRESS RESISTANCE AND SECONDARY  
METABOLISM IN *Fusarium fujikuroi***

Jorge García-Martínez, Attila L. Ádám, Javier Avalos

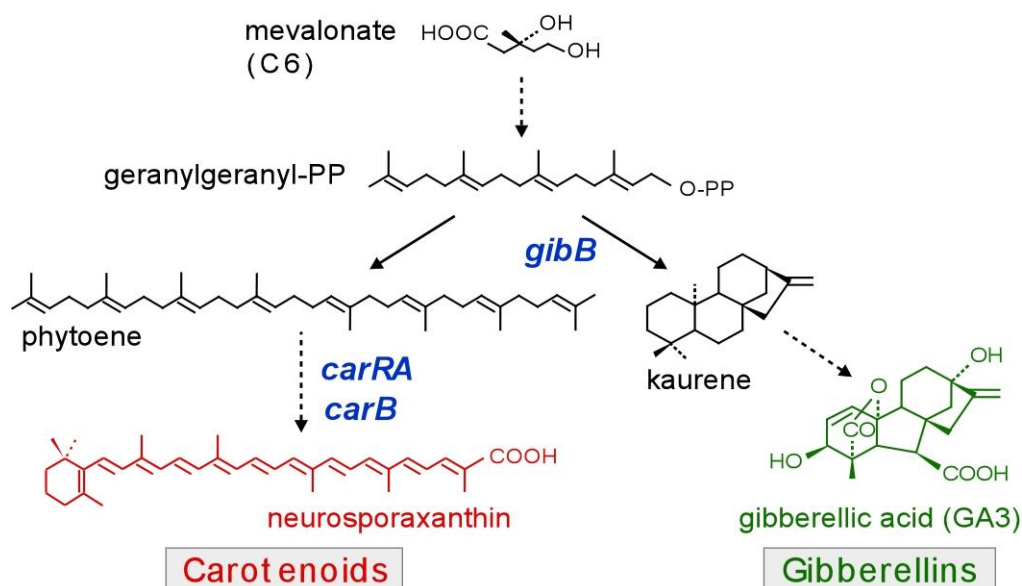
Published in PlosOne (2012)





## 1. Introduction

Some species of the ascomycete fungus *Fusarium* are useful research models for secondary metabolite production. A representative example is *Fusarium fujikuroi*, able to produce gibberellins, carotenoids or bikaverin, among other compounds of potential biotechnological interest (Avalos, Cerdá-Olmedo et al. 2007). The gibberellins are growth-promoting plant hormones with applications in agriculture (Rademacher 1997). Among them stands out for its physiological effects gibberellic acid (GA3), the major gibberellin product in this fungus. Carotenoids are fat-soluble pigments produced by photosynthetic organisms and many heterotrophic bacteria and fungi (Britton, Liaaen-Jensen et al. 1998). Both groups of compounds are called terpenoids (Fig. 20).



**Figure 20. Main terpenoids in *F. fujikuroi*:** both groups share the same precursor and possess biotechnological interest.

In plants they function as accessory pigments of the photosynthetic machinery (Telfer 2005) and in animals they are the source of physiologically important apocarotenoids, e.g., retinal and retinoic acid (Blomhoff and Blomhoff 2006). *F. fujikuroi* produces the orange apocarotenoid neurosporaxanthin ( $\beta$ -apo-49-carotenoic acid) and minor amounts of other carotenoids (Avalos and Cerdá-Olmedo 1987), including  $\beta$ -carotene and, presumably, retinal (Prado-Cabrero, Scherzinger et al. 2007b). Gibberellins and carotenoids are mevalonate-derived terpenoids produced from the same precursor, geranylgeranyl pyrophosphate, although their synthesis occurs in different cell compartments (Domenech, Giordano et al. 1996). Bikaverin is a red polyketide pigment with antibiotic properties against protozoa and fungi (Limón, Rodríguez-Ortiz et al. 2010), whose synthesis begins with the condensation of acetate units.

The biochemistry and regulation of these biosynthetic pathways has received considerable attention. The genes needed for the synthesis of gibberellins (Tudzynski 2005) and bikaverin (Wiemann, Willmann et al. 2009) are organized in clusters. The genes required for retinal synthesis also are clustered (Linnemannstöns, Schulte et al. 2002a; Thewes, Prado-Cabrero et al. 2005), but two additional genes needed for neurosporaxanthin biosynthesis are located elsewhere in the genome (Prado-Cabrero, Estrada et al. 2007a; Díaz-Sanchez, Estrada et al. 2011). The respective gene sets for gibberellin, bikaverin and carotenoid biosyntheses are subject to different coordinated regulations in response to environmental signals. The three pathways have in common their activation by nitrogen starvation, although some differences are found in their particular responses (Rodríguez-Ortiz, Limón et al. 2009). Additionally, they respond to other regulatory signals in a pathway specific manner: e.g., carotenoid biosynthesis is induced by light (Avalos and Estrada 2010) and bikaverin production requires acidic pH (Giordano, Avalos et al. 1999a). Different regulatory proteins are involved in these responses, such as AreA in nitrogen regulation (Mihlan, Homann et al. 2003), and PacC in pH regulation (Wiemann, Willmann et al. 2009). The mutation of the gene for the White Collar protein WcoA, predicted to mediate light induction of

carotenogenesis, did not impede such photoresponse, but altered the regulation of bikaverin and GA biosyntheses (Estrada and Avalos 2008a). Recent data showed the participation of other proteins in the regulation of these biosynthetic pathways, such as those from the Velvet complex (Wiemann, Brown et al. 2010), formerly identified in *Aspergillus nidulans* (Calvo 2008).

The increasing number of influential proteins points to a complex regulatory network involved in the control of secondary metabolism in *F. fujikuroi* in connection with other physiological and developmental processes. A recent example of such regulatory complexity was provided by the deregulation of bikaverin biosynthesis in mutants of adenylyl cyclase in *F. proliferatum* (Kohut, Olah et al. 2010) and *F. verticillioides* (Choi and Xu 2010). This enzyme, whose activity is regulated by the G $\alpha$  subunits of heterotrimeric G proteins in response to ligand-activated G-protein-coupled receptors, mediates the synthesis of cAMP, a chemical signal involved in the control of a diversity of fungal processes. Mutants lacking a functional adenylyl cyclase usually exhibit alterations in growth and development, but the severity of the alterations differs between different fungi. A representative example is *Neurospora crassa*, where such mutation leads to the “crispy” phenotype, externally characterized by retarded growth, reduced aerial development and premature conidiation (Ivey, Kays et al. 2002). The morphological alterations produced by lack of cAMP synthesis also involve other developmental stages of fungal life cycles: as two representative examples, mating and pathogenesis are affected in *Cryptococcus neoformans* (Alspaugh, Pukkila-Worley et al. 2002) and *Ustilago maydis* (Feldbrugge, Kamper et al. 2004). Moreover, virulence is usually diminished or abolished in pathogenic species. E.g. formation of invasive appressoria is impaired in *Magnaporthe grisea* (Choi and Dean 1997), aberrant sclerotia are formed in *Sclerotinia sclerotiorum* (Jurick and Rollins 2007) and switch from yeast to hyphal growth is severely affected in *Candida albicans* (Rocha, Schroppel et al. 2001).

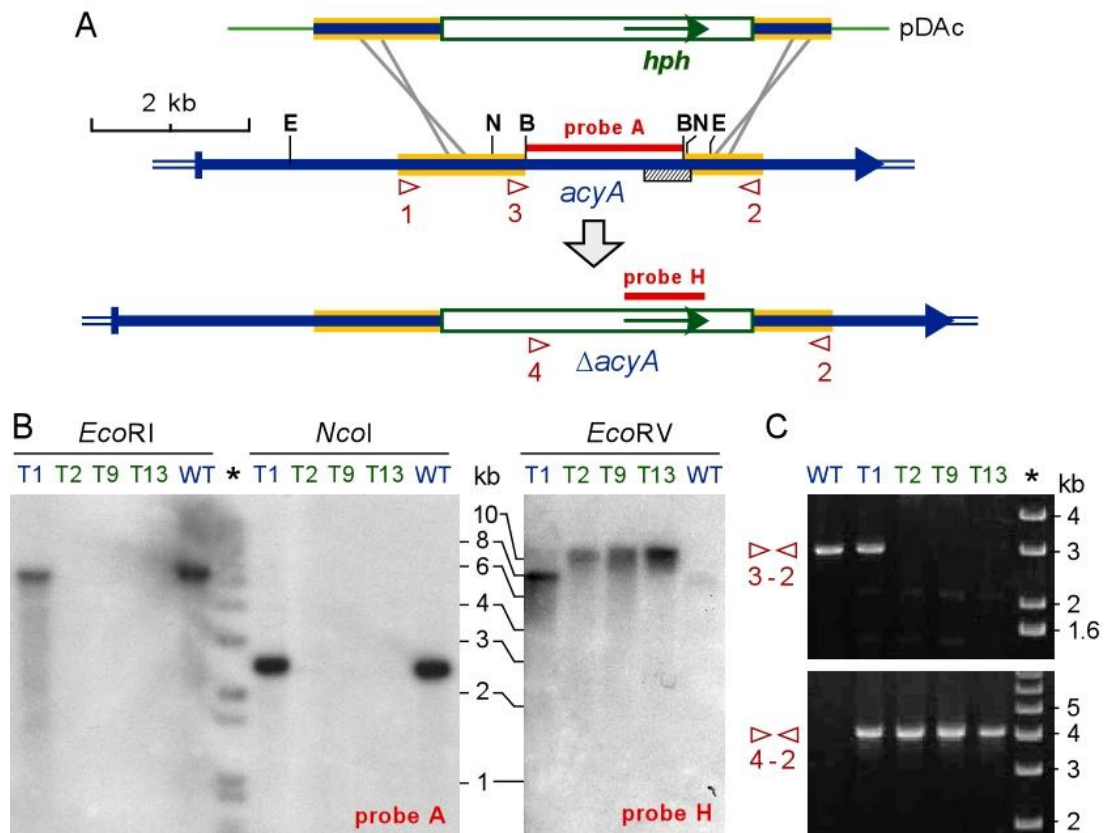
The adenylyl cyclase mutation has a highly pleiotropic phenotype in *F. proliferatum* and *F. verticillioides*. In addition to bikaverin deregulation, mutants exhibit reduced vegetative growth rate, delayed microconidia germination, alterations in micro- and macroconidia production, enhanced tolerance to abiotic conditions, such as heat shock or oxidative stress, and reduced pathogenic capacity (Choi and Xu 2010; Kohut, Olah et al. 2010). Furthermore, female fertility and vegetative self-incompatibility were suppressed in *F. proliferatum* (Kohut, Olah et al. 2010). However, in contrast to the effect on bikaverin production, lack of adenylyl cyclase produced no change in the biosynthesis of another polyketide toxic metabolite, fumonisin B1, in any of these species. Here we describe the effect of the adenylyl cyclase mutation on development, resistance to stress conditions, and secondary metabolism in *F. fujikuroi*. The mutants of the gene, that we called *acyA*, produced lower amounts of gibberellins and showed alterations in the pigmentation pattern. As expected, deletion mutants of this gene exhibited a decreased growth rate and altered conidiation, but in contrast to former *Fusarium* reports, they were more sensitive to oxidative stress and were not affected in their resistance to heavy metals or their capacity to colonize tomato fruit tissue.

## 2. Results

### 2.1 Generation of *F. fujikuroi* $\Delta$ *acyA* mutants:

BLAST queries of the FpACY1 adenylyl cyclase protein sequence from *F. proliferatum* ([23], GenBank accessionDQ067619) against the publicly available *Fusarium* genome databases, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* and *F. graminearum*, identified a single gene for this protein (FVEG01363,

FGSG01234 and FOXG00154, respectively). So, we predicted the occurrence of a single homologous gene in *F. fujikuroi*, that we named *acyA*. A primer set designed from conserved sequences of the four orthologous *Fusarium* adenylyl cyclase genes (primers 1 and 2, Fig. 21A), allowed the amplification and cloning of a 4.5 kb DNA segment of *acyA* of *F. fujikuroi*, containing the catalytic domain of the enzyme (Fig. 21A, (Kohut, Olah et al. 2010)). In support of the occurrence of a single *acyA* gene, a single hybridizing band was observed in Southern blot analysis when digested wild type *F. fujikuroi* genomic DNA was probed with an internal segment of the gene (Fig. 21B). To obtain null mutants of *acyA*, a plasmid (pDac) was constructed in which an internal BamHI 2 kb segment, containing most of the catalytic domain, was removed from the cloned 4.5 *acyA* fragment and replaced with a hygR cassette (Fig. 21A). Transformation of the wild type strain FKMC1995 with linearized pDac led to the isolation of 13 hygromycin-resistant transformants. These strains were passed three times through single conidia on hygromycin-supplemented medium to ensure homokaryosis, and 11 of them conserved the resistant phenotype. Visual inspection of the colonies revealed that 5 transformants exhibited the wild type phenotype, while 6 grew slower and became pigmented upon prolonged incubation. These alterations coincided with those formerly described for the adenylyl cyclase mutants of *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (Choi and Xu 2010; Kohut, Olah et al. 2010), and so they were suspected to have lost a functional *acyA* gene. Three of such transformants, T2, T9 and T13, were chosen for detailed molecular characterization in comparison to the wild type and a wild type-like transformant, T1. Southern blot and PCR analyses confirmed the replacement of the wild type *acyA* allele with the hph-interrupted sequence in the three altered strains (Fig. 21B and C), referred hereafter as  $\Delta$ *acyA* mutants.

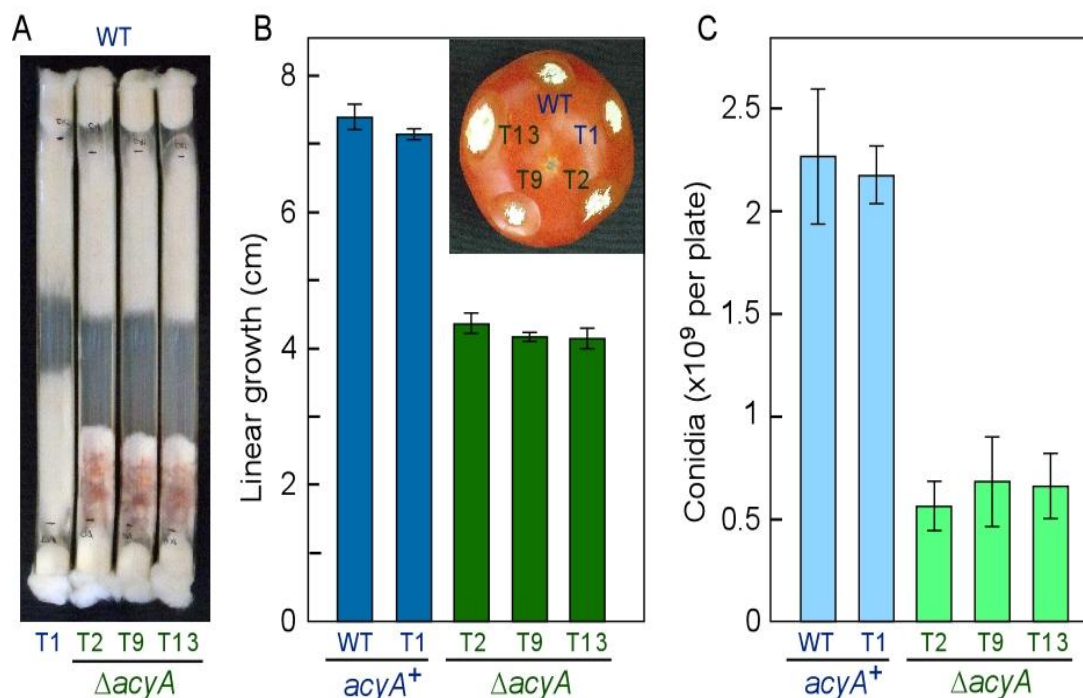


**Figure 21. Generation of  $\Delta acyA$  mutants of *F. fujikuroi*.** A: Schematic representation of the gene replacement event leading to the  $\Delta acyA$  mutation. The thick arrow represents the *acyA* gene. Segments shaded in yellow in the background, derived from the original 4.5 kb *acyA* PCR fragment, support the homologous recombinations leading to the replacement. The white box is the HygR cassette, containing the *hph* gene (green inner arrow). The *Bam*HI-delimited segment, absent in the mutants, was used as a probe in the Southern blot experiment shown below (probe A). The striped box shows the predicted location of the catalytic domain. Small arrowheads indicate the position and orientation of primers 1 and 2, used to obtain the *acyA* PCR fragment, and primers 3 and 4, used with primer 2 in the PCR experiment displayed below. B: Southern blots of genomic DNA from the wild type and four transformants digested with *Eco*RI or *Nco*I and hybridized with an internal *acyA* DNA segment (Probe A) or digested with *Eco*RV and hybridized with the *hph* gene of the hygR cassette (Probe H). Probe locations and relevant *Eco*RI (E) or *Nco*I (N) sites are indicated on the upper scheme. The represented DNA segments lack *Eco*RV sites. Here and in the right panel, the star indicates the lane of size markers; relevant sizes in kb are indicated on the right. C: Agarose gel electrophoresis of amplification products obtained by PCR from DNA samples of the same strains with the primer sets indicated on the left (see upper scheme for primer locations). Lack of 3 kb DNA segment with primers 3 and 2 reveals the absence of the wild type *acyA* gene. Amplification of the 4 kb DNA segment with primers 4 and 2 reveals the presence of a hygR-interrupted *acyA* gene.

Transformant T1 had presumably inserted ectopically the pDac DNA by non-homologous recombination, as indicated by the simultaneous detection of the wild type allele and the interrupted sequence. This transformant was used as an additional *acyA*<sup>+</sup> control in subsequent phenotypic analyses.

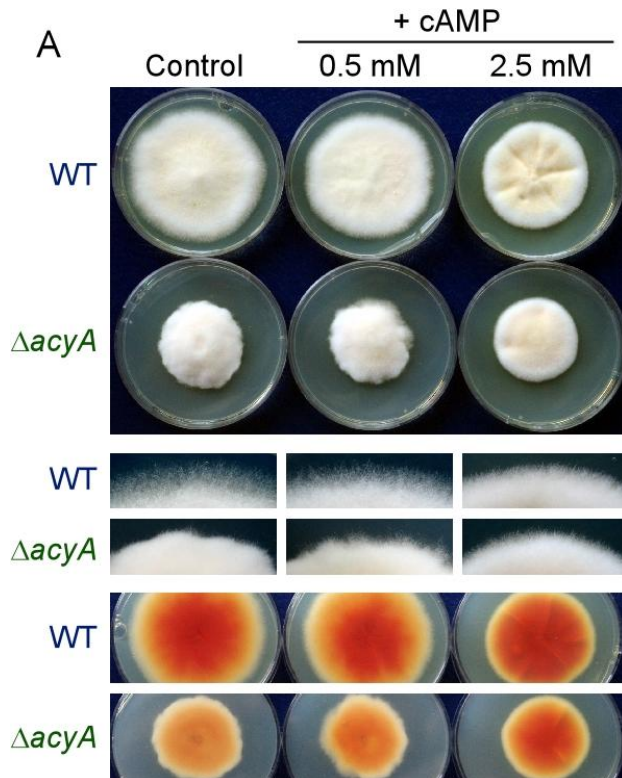
## 2.2 The $\Delta$ *acyA* mutants show alterations in growth, morphology and conidiation:

Incubation of the three  $\Delta$ *acyA* mutants under different growth conditions confirmed phenotypic alterations, not exhibited by parallel cultures of the control strains. Experiments carried out in race tubes showed a 35% reduction in linear growth compared to the strains carrying an intact *acyA* gene (Fig. 22A and B).



**Figure 22. Growth and conidiation of the *acyA*<sup>+</sup> and  $\Delta$ *acyA* strains.** A: Growth of the four transformants against the wild type in race tubes after 21 days incubation at 30°C in DGasn minimal medium. B: Average and standard deviation of linear growth of the wild type and the four transformants in race tubes after 21 days. Inner picture: ability of the five strains to colonize tomato fruit. C: Average and standard deviation of conidia production by the same strains on Petri dishes incubated for 8 days in the dark. Data from two independent experiments.

Upon aging, the  $\Delta acyA$  mutants exhibited a reddish pigmentation in the race tubes (Fig. 22A), a trait described in a later section. Additionally, surface cultures of the mutants produced fewer conidia (Fig. 22C).



**Figure 23. Effect of cAMP addition on growth and pigmentation of the wild type and an  $\Delta acyA$  strain.** A: Colonies of the wild type and the  $\Delta acyA$  mutant T9 after eight days incubation at 30°C on DGas minimal agar (5.5 cm  $\varnothing$  Petri dishes) supplemented with the indicated concentration of the cAMP analogue dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. Middle pictures: detail of colony edges from the same cultures. Below: pigmentation of the back of the colonies.

This difference cannot be attributed to the slower mycelial development, since these analyses were carried out on surface colonies that stopped their growth approximately four days before conidia determination. In a former experiment in carboxymethyl cellulose supplemented medium (Cappellini and Peterson 1965), the *acy1* mutants of *F. proliferatum* produced more conidia than the wild type (Kohut, Olah et al. 2010). However, incubation of the same strains under the culture conditions tested for *F. fujikuroi* revealed the same conidiation pattern in both species (data not shown). Thus, the *acyA* gene plays a central role in mycelial development,

including conidia formation. However, in contrast to *F. proliferatum* (Kohut, Olah et al. 2010), the reduced growth capacity did not affect the ability of the mutants to colonize tomato fruit tissue (inset picture in Fig. 22B). Addition of exogenous cAMP to agar cultures of a  $\Delta acyA$  mutant did not fully restore normal growth (Fig. 23). However, growth and morphology of the wild

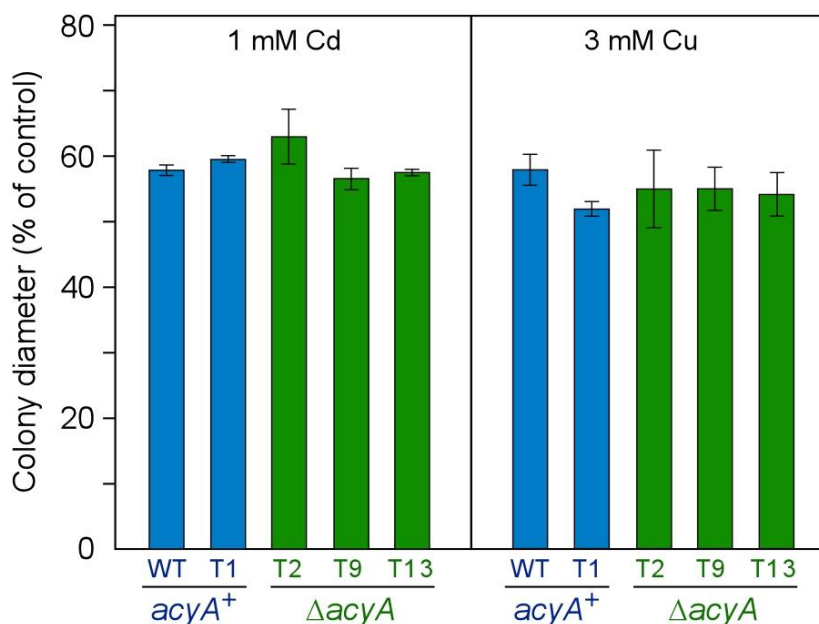


type was visibly altered at the higher cAMP concentration tested, resembling those of the  $\Delta acyA$  mutant under the same conditions. Therefore, the phenotypic differences between wild type and  $\Delta acyA$  mutant were attenuated by cAMP addition. This was particularly manifest at the colony edges, sparse in the wild type and dense in the compact  $\Delta acyA$  colonies in control plates, but with a similar aspect for both strains in the presence of 2.5 mM cAMP (Fig. 23). Furthermore, an orange pigmentation unrelated to carotenoids, manifest on the back sides of wild type colonies grown in the dark at 30°C, was much weaker in the  $\Delta acyA$  mutant but it was restored in 2.5 mM cAMP supplemented medium (Fig. 23). These observations strongly suggest that the phenotypic alterations exhibited by the  $\Delta acyA$  mutants are due to lack of cAMP synthesizing activity.

### 2.3 The $\Delta acyA$ mutants are affected in stress sensitivity:

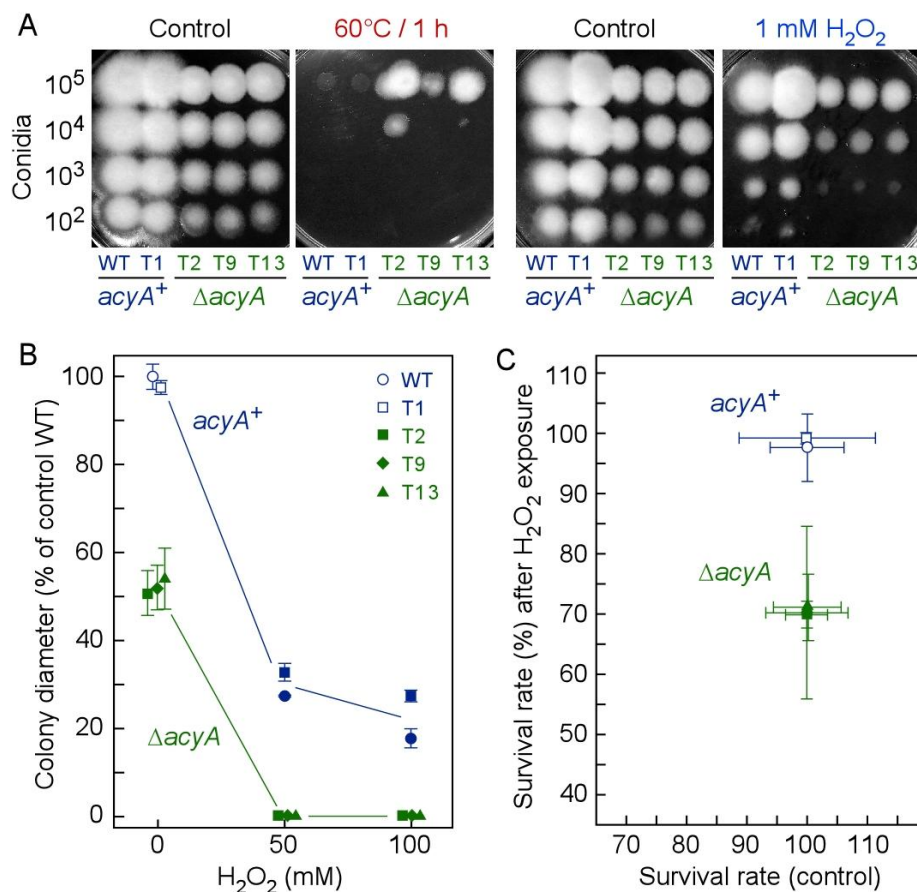
The adenylyl cyclase mutants of *F. proliferatum* and *F. verticillioides* also exhibited alterations in their responses to different stress conditions, such as heat-shock, oxidative agents, or heavy metals (Choi and Xu 2010; Kohut, Olah et al. 2010). We examined the effect of these stresses on the *F. fujikuroi* mutants compared to the control strains. First, we tested the ability of the  $\Delta acyA$  and *acyA*<sup>+</sup> strains to grow under toxic concentrations of two heavy metals, Cd and Cu. Growth inhibition, referred to control plates without the metal, was similar irrespective of the presence of a functional *acyA* gene in the tested strain (Figure 24).

One hour exposure to 42°C, 45°C or 50°C did not affect significantly the growth capacity of the  $\Delta acyA$  mutants compared to the  $acyA^+$  strains in conidia-dilution tests on DGasn agar plates. However, one hour exposure to 60°C completely abolished the growth of the control strains, while the  $\Delta acyA$  mutants were still able to grow with  $10^5$  conidia (Fig. 25A). In this experiment the cells were exposed to 60°C immediately after inoculation of the conidia drops, but similar results were obtained if the 60°C treatment was done 4 hours after inoculation, i.e., when the germination process was already triggered (data not shown). Hence, cAMP probably participates in the tolerance mechanism against heat shock in a similar manner than in other *Fusarium* species. Former studies in *F. verticillioides* and *F. proliferatum* revealed 49°C and 45°C as effective heat shock temperatures in liquid media assays, respectively. The comparison of heat shock sensitivity of wild type *F. fujikuroi* and *F. proliferatum* in conidia-dilution assays on DG agar plates (both species were sensitive to heat stress only at 55-60°C in a conidial concentration dependent fashion) suggest that this disparity is due to differences in culture conditions rather than to higher heat tolerance of *F. fujikuroi* (data not shown).



**Figure 24. Lack of effect of the  $\Delta acyA$  mutation on growth in the presence of metals.** Effect of 1 mM Cd or 3 mM Cu on radial growth of the  $acyA$  and  $\Delta acyA$  strains on DGasn agar plates.

Similar conidia-dilution tests achieved with a low (1 mM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration showed a reduction in the growing capacity of the five *F. fujikuroi* strains, but the inhibition was apparently more pronounced in the  $\Delta acyA$  mutants (Fig. 25A). Therefore, we decided to investigate in more detail the effect of this oxidative agent. Incubation of the strains on DGasn agar plates supplemented with higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations confirmed a greater sensitivity of the  $\Delta acyA$  mutants: they were not able to grow at either 50 or 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while the strains with the functional *acyA* allele still showed a significant growing capacity (Fig. 25B).



**Figure 25. Effect of the  $\Delta acyA$  mutation on growth or viability under heat or oxidative stress.** A: Serial conidia-dilution tests of the effect of heat stress (60°C/1 h) and oxidative stress (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on DGasn agar plates. Each spot was inoculated with the conidia amounts indicated on the left. B: Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (50–100 mM) on radial growth of the *acyA*<sup>+</sup> and  $\Delta acyA$  strains on DGasn agar plates. Overlapping symbols were separated for better visualization. C: Survival of conidia following 2 h incubation in liquid DGasn medium supplemented with 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

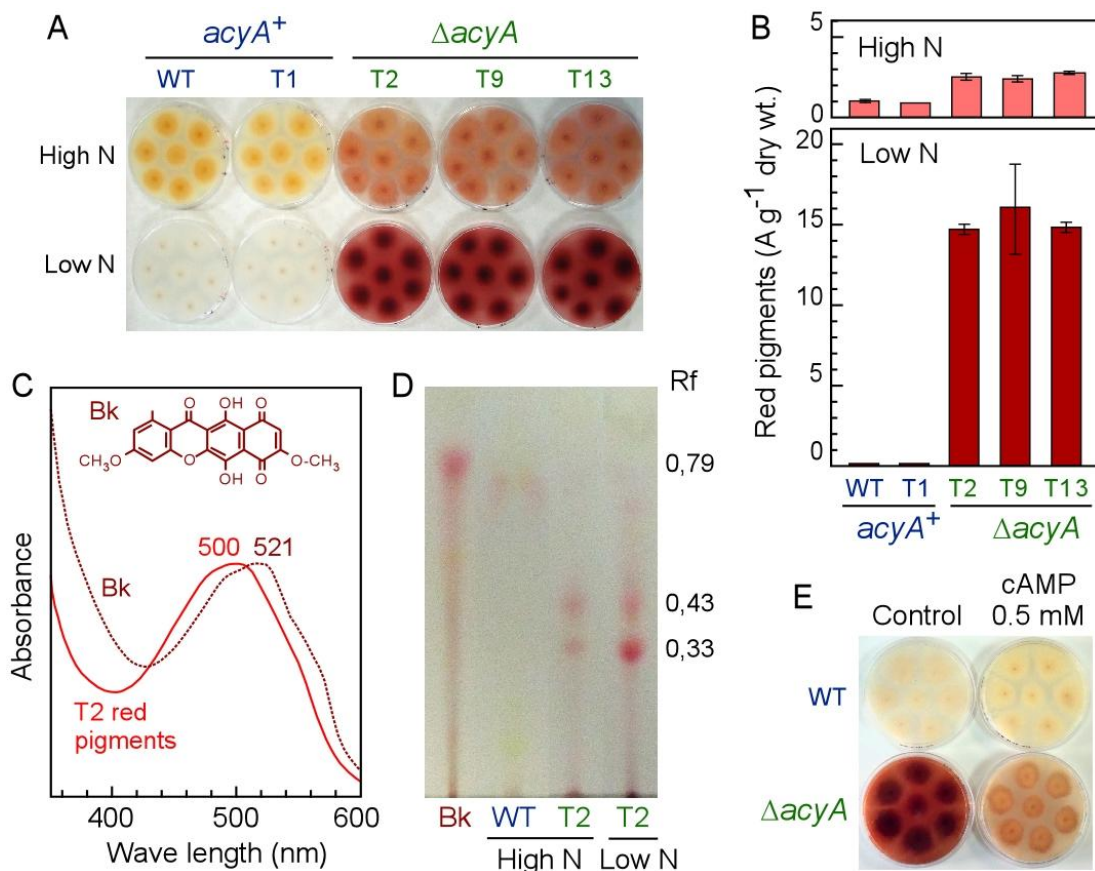
In another approach, conidia from the same strains were exposed for two hours to 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in DGasn minimal liquid medium and tested for their ability to develop colonies after plating on CM agar. As a result, the  $\Delta$ acyA mutants produced about 30% less colonies than the control strains, which were not significantly affected by this treatment (Fig. 25C). We conclude that lack of adenylyl cyclase in *F. fujikuroi* results in a weakened response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage.

#### 2.4 The $\Delta$ acyA mutants overproduce a red pigment:

As mentioned above (Fig. 22A), the  $\Delta$ acyA mutants exhibited a reddish pigmentation, absent in the control strain. This color was more apparent under nitrogen starvation, and it diffused to the culture medium (Fig. 26A), indicating that the pigment is soluble and secreted out of the cell. The enhanced reddish pigmentation fits the derepressed bikaverin production formerly found in the adenylyl cyclase mutants of *F. proliferatum* and *F. verticillioides* (Choi and Xu 2010; Kohut, Olah et al. 2010). The production of this pigment was investigated in the five strains under analysis, grown on minimal agar with either high or low nitrogen content (Fig. 26B).

According to absorption data, the two control strains produced low pigment amounts in high nitrogen agar, while the production by the three  $\Delta$ acyA mutants increased about three-fold. The difference was more noteworthy in low nitrogen agar, where the  $\Delta$ acyA mutants produced high pigment amounts while only traces were found in the cultures of the control strains. The accumulation of the pigment was drastically reduced in the presence of exogenous cAMP (Fig. 26E), providing further evidence for the lack of cAMP as the major cause for the phenotypic alterations of the  $\Delta$ acyA mutants.

The absorption spectra of the red pigments extracted from the  $\Delta acyA$  mutants differed from that of bikaverin, as deduced from comparison with a bikaverin sample produced by the strain SG1 (Rodríguez-Ortiz, Limón et al. 2009). While the latter coincided with the published bikaverin spectrum (Cornforth, Ryback et al. 1971), including maximal absorption wavelength (521 nm), the spectrum of the red pigment produced by the  $\Delta acyA$  mutants had a maximal absorption at ca. 500 nm (Fig. 26C).



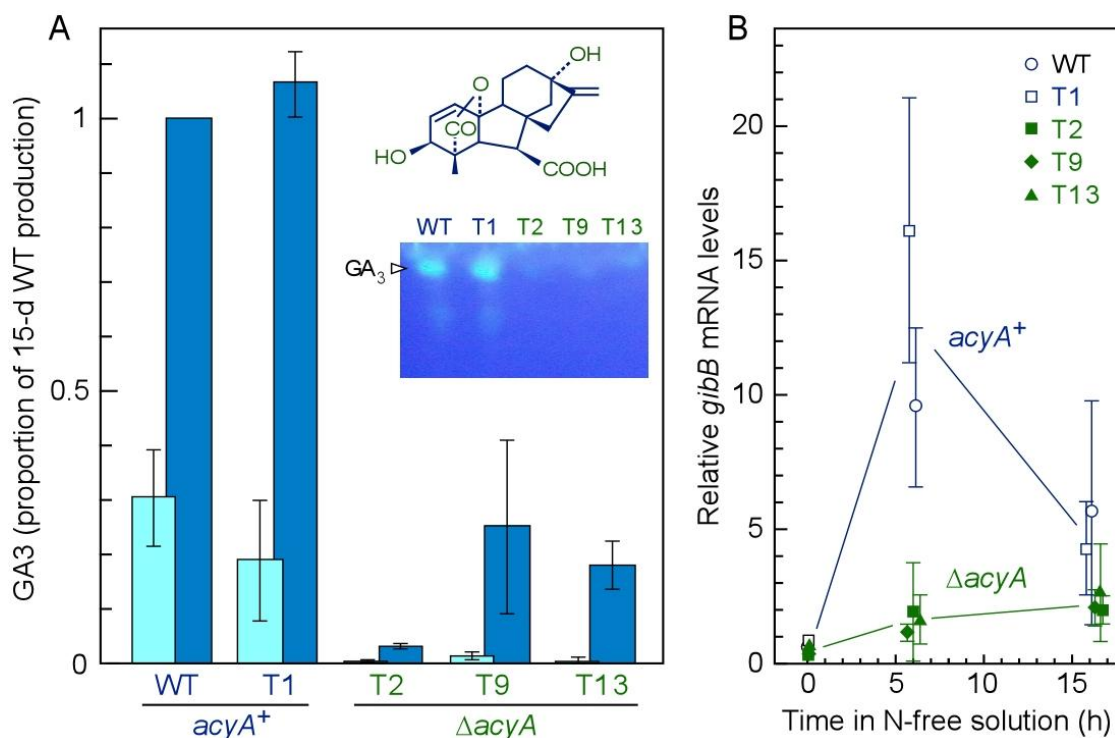
**Figure 26. Production of red pigments by the *acyA*<sup>+</sup> and  $\Delta acyA$  strains.** **A:** Agar cultures of the *acyA*<sup>+</sup> and  $\Delta acyA$  strains grown for 14 days at 30°C on high or low nitrogen medium. **B:** Concentration of red pigments in the mycelia from the plates displayed on the left picture. The data show absorption units corrected by dry weight of the samples, and referred to the absorption of the wild type grown in high nitrogen medium, which was taken as 1. **C:** Absorption spectra of the red pigments isolated from the T2 mutant grown in high nitrogen medium compared to the spectrum of our bikaverin standard (Bk, dashed line). Chemical structure of bikaverin is shown above. **D:** TLC separation of the bikaverin standard (Bk) and the red pigments produced by the wild type on high nitrogen medium and by the T2 mutant on high or low nitrogen medium. **E:** Effect of addition of 0.5 mM cAMP (dibutyryl adenosine 39,59-cyclic monophosphate) on pigmentation in agar cultures of the wild type and the  $\Delta acyA$  strain T9 grown for 14 days at 30°C on low nitrogen medium.

Absorption spectra of the pigments from the control strains, produced in much lower concentrations, were more similar to that of our bikaverin standard (result not shown). To gain more insights on the chemical difference between the pigments accumulated by control and mutant strains, the samples obtained in these analyses were separated on TLC and compared to SG1-produced bikaverin. The pigment from the  $\Delta acyA$  cultures, either in high or low nitrogen agar, showed two bands of different chromatographic properties than bikaverin (Fig. 26D). However, the absorption spectrum and chromatographic separation of the pigment produced by the wild type strain were more similar to those of bikaverin, although it run at a slightly lower position on the TLC plate and it was hardly visible because of its low concentration. The chemical nature of the red pigments produced by the  $\Delta acyA$  mutants is currently under investigation.

## 2.5 The $\Delta acyA$ mutants exhibit changes in gibberellin and carotenoid production:

The effect of the  $\Delta acyA$  mutation on gibberellin and carotenoid biosyntheses was investigated under appropriate culture conditions for each pathway. For gibberellin production, secreted GA3 levels were assayed by TLC and HPLC in shake cultures of the five strains grown in low nitrogen broth. As expected, significant GA3 amounts (about 42 mg l<sup>-1</sup> after 15 days incubation) were detected in the cultures of control *acyA*<sup>+</sup> strains, but GA3 concentration was severely reduced in the  $\Delta acyA$  cultures (Fig. 27A). To test if the  $\Delta acyA$  mutation affects negatively the induction of the *gib* genes by nitrogen starvation, mycelia of the five strains grown in high nitrogen broth were washed and transferred to a nitrogen-free solution. Upon these controlled inducing conditions, the mRNA levels of gene *gibB*, coding for the key enzyme in GA biosynthesis ent-kaurene synthase/ent-copalyl diphosphate synthase (*cps/ks* (Tudzynski and Hölter 1998)), showed a rapid and transient induction. This result, and differences in time-course patterns of gibberellin

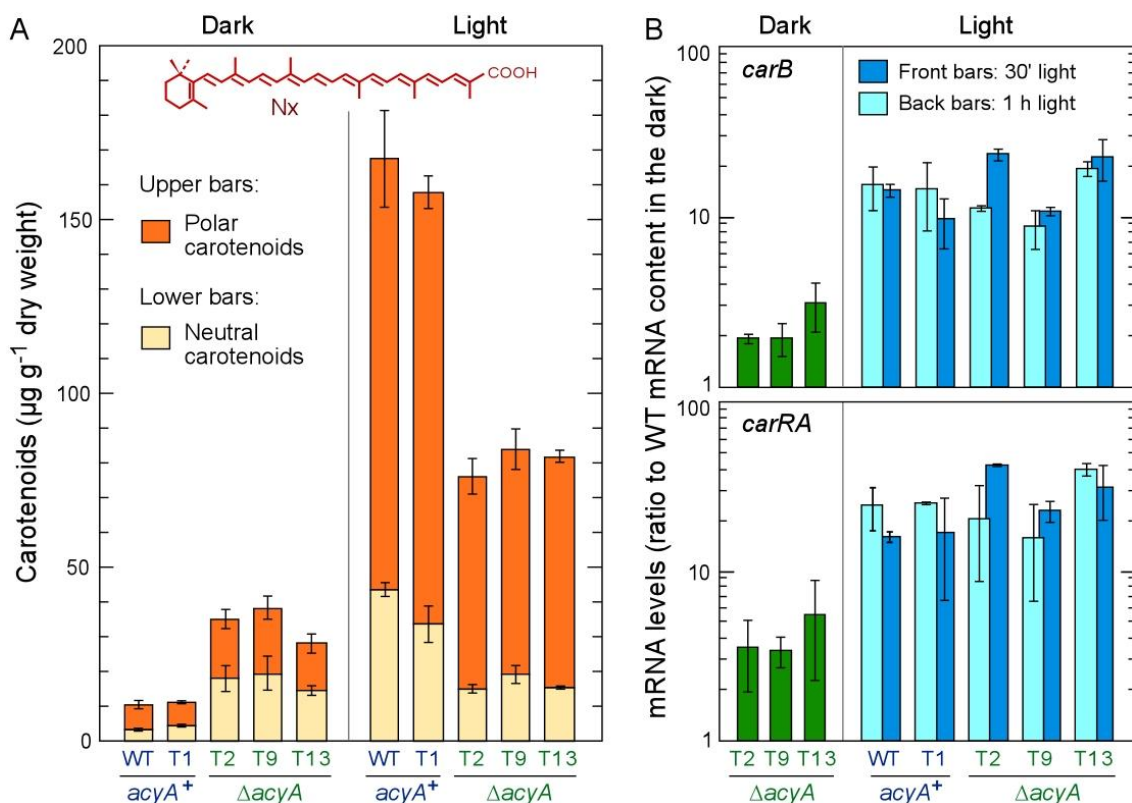
accumulation (Oller-López, Avalos et al. 2003), suggests regulatory differences with another wild type strain previously investigated, IMI58289, in which the mRNA induction under the same experimental conditions was slower and sustained (Rodríguez-Ortiz, Limón et al. 2009). In agreement with the lower GA3 production, *gibB* mRNA induction was significantly reduced in the  $\Delta acyA$  mutants compared to the *acyA*<sup>+</sup> control strains (Fig. 27B), pointing to cAMP as a positive signal in the regulation of GA biosynthesis.



**Figure 27. Production of gibberellins by the *acyA*<sup>+</sup> and  $\Delta acyA$  strains.** A: Relative GA3 contents in the filtrates of the cultures of the indicated strains after 9 days (pale front bars) and 15 days (dark back bars) incubation in low nitrogen broth in the dark. The data show average and standard deviation from two independent experiments. Inner picture: TLC separation of gibberellin samples from the five strains in a representative experiment. The fluorescent spot is GA3 (chemical formula shown above). B: Quantitative RT-PCR analyses of *gibB* mRNA levels in the five strains grown in high nitrogen medium for 3 days and incubated afterwards in 2 g l<sup>-1</sup> glucose for the time indicated in abscissas.

Because of the regulation by light of the carotenoid pathway, the production of these pigments was analyzed on surface cultures, grown either in the dark or under continuous illumination. As expected, the control strains

exhibited a marked photoinduction, with a 15-fold increase in the amount of carotenoids in illuminated cultures compared to the dark (Fig. 28A). However, the carotenoid content of the  $\Delta acyA$  mutants was increased about 3-fold in the dark and it was reduced by 50% in the light compared to the control strains. Consequently, the photoinduction rate was markedly reduced in the  $\Delta acyA$  mutants. The ratio of polar (neurosporaxanthin) to neutral carotenoids (precursors) was not significantly modified in the  $\Delta acyA$  mutants, indicating that all the enzymatic activities of the carotenoid pathway were similarly affected by the loss of functional adenylyl cyclase.



**Figure 28. Production of carotenoids and *carRA/carB* gene expression in the *acyA*<sup>+</sup> and  $\Delta acyA$  strains.** A: Carotenoid content in mycelia grown for 7 days on minimal medium in the dark or under continuous illumination. The data show average and standard deviations for the amounts of polar (upper bars) and neutral (lower bars) carotenoids in two independent experiments. The chemical formula of neurosporaxanthin (Nx) is shown above. B: mRNA levels of the enzymatic genes for the carotenoid pathway *carRA* and *carB* in the same strains grown in the dark or illuminated for 30 or 60 min. Data show average and standard deviation from two independent experiments. Relative mRNA levels are referred to the value of the wild type in the dark.



For a better understanding of the regulatory basis for the altered carotenoid accumulation, the mRNA levels of two key enzymatic genes of the carotenoid pathway, *carRA* and *carB* (Avalos, Cerdá-Olmedo et al. 2007), were determined in the *acyA*<sup>+</sup> and  $\Delta$ *acyA* strains grown in the dark and upon illumination. The dark levels were induced about 4-fold for *carRA* and 2-fold for *carB* in the  $\Delta$ *acyA* mutants compared to the wild type (Fig. 28B), fitting their corresponding carotenoid contents in vivo (Fig. 28A). In the control transformant T1, *carRA* and *carB* mRNA levels in the dark were even lower than in the wild type (not shown in the graph). However, mRNA levels in the light were similar in any of the strains tested, either after 30 min or 1 hour illumination. Therefore, in contrast to the partial deregulation in the dark, the lower carotenoid content of the  $\Delta$ *acyA* mutants in the light cannot be attributed to changes in *carB* or *carRA* expression.

### 3. Discussion:

The product of adenylyl cyclase, cAMP, is a key regulatory signal in all taxonomic groups, from bacteria (Lory, Wolfgang et al. 2004) to mammals (Hanoune and Defer 2001). Many reports have attributed biological functions to cAMP in filamentous fungi. The recent finding of the partial deregulation of bikaverin biosynthesis in adenylyl cyclase mutants of *F. proliferatum* and *F. verticillioides* led us to undertake the investigation of a possible regulatory effect on gibberellin and carotenoid production in *F. fujikuroi*. As expected, the targeted mutation of the *acyA* gene in this species also resulted in reduced growth and enhanced reddish pigmentation. However, at least under the experimental conditions tested, the red pigments produced by the  $\Delta$ *acyA* mutants of *F. fujikuroi* are not bikaverin, as indicated by the significant shift in the maximal absorption wavelength and the different behavior on thin layer chromatography. The different characteristics of these red pigments suggest a novel class of secondary metabolites, whose chemical nature remains to be elucidated.

As observed in other fungi (see, e.g., (Klimpel, Gronover et al. 2002; Choi and Xu 2010), addition of exogenous cAMP to adenylyl cyclase mutants did not lead to a total recovery of wild type growth, a result explained by the noticeable toxic effects of this compound. Experiments were done with dibutyryl-cAMP, a cell permeable cAMP analog widely used in research because of its stability and capacity to mimic cAMP activity. The recovery of wild type phenotypic characteristics by the  $\Delta acyA$  strain grown in the presence of dibutyryl-cAMP points to lack of cAMP as the major cause of the mutant phenotype. cAMP participates in a well-known signaling cascade, whose major components are highly conserved in fungi (D'Souza and Heitman 2001). A key function of this molecule is the activation of cAMP-dependent protein kinases, which in turn act on other downstream elements of the cascade. The phenotypic similarities of adenylyl cyclase and PKA mutants in *F. verticillioides* (Choi and Xu 2010) suggest the participation of cAMP and protein kinase A (PKA) in a similar regulatory cascade in *F. fujikuroi*.

Lack of adenylyl cyclase activity of *F. fujikuroi* resulted in a severe reduction in GA3 content under nitrogen starvation, i.e., the optimal conditions for its production. This is likely due to a diminished transcriptional induction of the biosynthetic genes of the pathway, as indicates the lower mRNA amounts found for gene *gibB* (*cps/ks*, (Tudzynski and Höltner 1998)), coding for the enzyme synthesizing the gibberellin precursor, ent-kaurene. A similar down-regulation effect of gibberellin production was observed in other mutants, such as those of the global nitrogen regulator AreA (Mihlan, Homann et al. 2003), the WC-1 protein WcoA (Estrada and Avalos 2008a), or the global regulator Velvet (Wiemann, Brown et al. 2010). The regulatory gene mutated in the *carS* strain SG1, playing a key role in the control of the carotenoid pathway (Rodríguez-Ortiz, Limón et al. 2009), may also be added to this list. The combination of the available data suggest a complex model in which a diversity of regulatory proteins exert specific effects, directly or indirectly, on the expression of the enzymatic genes for the biosynthesis of gibberellins and other secondary metabolites, such as the bikaverin (Wagner, Schmeinck et al. 2010). Our results support a role for cAMP signaling in the regulatory

network currently under investigation, in which the number of proteins involved is still expanding. The integration of adenylyl cyclase in this model will require more data, such as the analysis of double mutations with other participating regulatory genes.

The phenotype of the  $\Delta acyA$  mutants of *F. fujikuroi* resembles that of the *velvet* and *wcoA* mutants in their reduced conidiation rates. Alteration of sporulation is a common trait in adenylyl cyclase mutants of formerly investigated filamentous fungi. As expected, the consequence of the mutation was similar in other *Fusarium* species, such as *F. verticillioides* (Choi and Xu 2010) and *F. proliferatum*, or in taxonomically related species, as the ascomycetes *Magnaporthe grisea* (Choi and Dean 1997) and *Aspergillus fumigatus* (Liebmann, Muller et al. 2004). However, a higher conidiation activity was observed in adenylyl cyclase mutants of *N. crassa* (Ivey, Kays et al. 2002) and, under certain specific culture conditions, of *F. proliferatum* (Kohut, Olah et al. 2010). The latter case demonstrates the dependence of the  $\Delta acyA$  phenotype on the environmental conditions. Likewise, the lower conidiation exhibited by the *wcoA* mutants of *F. fujikuroi* compared to the wild type was reversed under nitrogen starvation (Estrada and Avalos 2008a).

The phenotypic similarities between the *acyA*<sup>-</sup> and the *wcoA*<sup>-</sup> mutants do not apply to carotenoid biosynthesis, which was not significantly affected in the latter (Estrada and Avalos 2008a). As the only predicted WC-1-like photoreceptor in the *Fusarium* proteome (Avalos and Estrada 2010), the WcoA protein was presumed to mediate photocarotenogenesis in this fungus. However, the *wcoA*<sup>-</sup> mutants conserved the photoinduction of the carotenoid pathway, either on carotenoid content or on mRNA levels for the enzymatic genes. Unexpectedly, carotenoid biosynthesis was significantly enhanced in the dark and reduced in the light in the  $\Delta acyA$  mutants. The lower amount of carotenoids in the light is not explained by a lower photoinduction of the *car* genes, but we cannot discard other alternative explanations, e.g., lower mRNA translation of *car* mRNAs, reduced biosynthetic activity or half-life of carotenogenic enzymes, lower capacity for carotenoid storage or higher

carotenoid degradation rate. The available information is insufficient to propose an experimentally based hypothesis. On the other hand, the correlation of the enhanced synthesis in the dark with increased mRNA levels suggests a role for cAMP in the transcriptional repression of the *car* genes under these conditions, in which the CarS regulatory protein must play a central role. The identification of the CarS protein, currently in progress, should be a significant contribution in the understanding of this regulatory connection. Interestingly, adenylyl cyclase activity is induced by light in *Trichoderma viride* (Kolarova, Haplova et al. 1992), a fungus in which conidiation is stimulated by light and by nutrient deprivation in darkness. More recently, a model was proposed in this fungus in which cAMP activates indirectly its WC complex (Blr1/Blr2) through the activation of the protein kinase PKA (Casas-Flores, Rios-Momberg et al. 2006). Such mechanism could explain the similar reduction in conidiation exhibited by the *acyA*<sup>-</sup> and *wcoA*<sup>-</sup> *F. fujikuroi* mutants. It must be noted, however, that conidiation is not stimulated by light either in *F. fujikuroi* (Estrada and Avalos 2008a) or in *F. verticillioides* (Bodor, Nagygyörgy et al. 2012).

It was formerly shown that cAMP plays a role in fungal responses against abiotic stress. In the investigated *Fusarium* species, *F. verticillioides* and *F. proliferatum*, loss of adenylyl cyclase resulted in enhanced resistance to heat shock and oxidative stress (Choi and Xu 2010; Kohut, Olah et al. 2010). In addition, the mutants of G protein subunits of *F. oxysporum* exhibited a reduced cAMP level and enhanced resistance to heat stress (Jain, Akiyama et al. 2002; Jain, Akiyama et al. 2005). We found that *F. fujikuroi* is highly resistant to heat shock; even though, the  $\Delta$ *acyA* mutants were able to survive to heat shock treatments that were lethal for the wild type. However, in contrast to *F. proliferatum* and *F. verticillioides*, the  $\Delta$ *acyA* mutants of *F. fujikuroi* became more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than the control strain. This result suggests a positive regulatory role of cAMP signaling in oxidative stress resistance in this fungus. The higher sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of the mutants could also be an indirect effect of its slower growth, but their total incapacity to grow at high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations makes this interpretation unlikely. The

disparity on oxidative stress resistance with other *Fusarium* species supports the high versatility of the cAMP signaling system, adapted in different manners by closely related fungi. The phenotypic differences are particularly striking if they apply to closely related *Fusarium* species, even more if we consider that heat shock and oxidative stress responses are controlled by at least partially overlapping signaling routes in yeast cells (Ikner and Shiozaki 2005). Experimental results in *F. verticillioides* showed that homologs of yeast HSP26 and GSY2 proteins are up-regulated in the adenylyl cyclase mutant under heat stress. However, the poor overall conservation of transcriptional regulators lying downstream of central components of cAMP-PKA pathway in filamentous species (Nikolaou, Agrafioti et al. 2009) opens the possibilities to other regulatory scenarios.

The different ability of the *F. fujikuroi* and *F. proliferatum* mutants to invade tomato fruit tissue provides another example of differences in the phenotypic effects produced by adenylyl cyclase gene mutation in closely related *Fusarium* species. In contrast to the huge information available on the pathogenicity mechanisms of the tomato pathogen *F. oxysporum*, *f. sp. lycopersici* (Ortoneda, Guarro et al. 2004), little is known on the pathogenicity process of *F. fujikuroi*. Actually, it is unclear if the growth on tomato in our test is the result of a pathogenic association or a saprotrophic interaction. *F. oxysporum* is a vascular pathogen (Michielse and Rep 2009), and tomato fruit invasion is not its usual colonization mechanism (Ortoneda, Guarro et al. 2004)[48]. Nevertheless, it has been successfully used as a fast pathogenicity test in this fungus (Di Pietro, García-Maceira et al. 2001; Ortoneda, Guarro et al. 2004). The reason is that such invasion needs the secretion of a battery of lytic enzymes, including those degrading plant cell walls. It is plausible that a similar mechanism is involved in the invasion of tomato tissue by its close relatives *F. fujikuroi* and *F. proliferatum*.

Overall, the pleiotropic nature of the cAMP-PKA pathway in closely related *Fusarium* species, i.e. *F. proliferatum*, *F. verticillioides* and *F. fujikuroi*, suggests that stress signaling has been exposed to rapid evolution to tune stress responses in a niche-specific manner, independently of

phylogenetic position of the species (Nikolaou, Agrafioti et al. 2009). Recent data showing significant variations in the resistance to different abiotic stressors by the three *Fusarium* species whose genome sequences are available (Nagygyörgy, Hornok et al. 2011) reinforce this conclusion.

## CHAPTER 2

THE GENE *cutA* OF *Fusarium fujikuroi*, ENCODING A PROTEIN OF THE HALOACID DEHALOGENASE FAMILY, IS INVOLVED IN OSMOTIC STRESS AND GLYCEROL METABOLISM

Jorge García-Martínez, Marta Castrillo, Javier Avalos

Published in Microbiology (2014)





## 1. Introduction

In nature, survival of fungi relies on their ability to deal with a changing environment. Appropriate regulatory networks are necessary to overcome variations in different physical agents such as temperature, pH or osmotic pressure. Changes in water activity in fungal ecological niches determine their capacity for growth and colonization. Fungal growth requires the maintenance of appropriate turgor pressure in their hyphae (Lew 2011), a parameter governed by an osmotic mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade. This regulatory mechanism controls the internal pressure through ion uptake and synthesis of osmolytes such as glycerol (Ellis, Grindle et al. 1991) and is also used to adapt the fungal cells to hyper-osmotic conditions. The components of the high osmolarity glycerol (HOG) regulatory cascade have been thoroughly investigated in *Saccharomyces cerevisiae* (O'Rourke, Herskowitz et al. 2002) and are widespread in filamentous fungi (Krantz, Becit et al. 2006).

The genes of the HOG pathway were first identified through the study of osmosensitive mutants in *Neurospora crassa* (Mays 1969). Genetic analyses of a collection of 25 mutants with reduced ability to grow on 0.68 M NaCl led to the identification of six genes. Mutants of genes *os-1*, *os-2*, *os-4* and *os-5*, which are unable to grow on 0.68 M NaCl, were found to be affected in different components of the HOG cascade: a histidine kinase, and MAP, MAPK and MAPKK kinases (Schumacher, Enderlin et al. 1997; Zhang, Lamm et al. 2002; Fujimura, Ochiai et al. 2003). Two other mutants, *cut* and *flm-2*, were partially sensitive to hyper-osmotic conditions. The *flm-2* mutation was later identified as an *os-4* allele (Perkins and Davis 2000) and the *cut* mutation affects a protein of the haloacid dehalogenase (HAD) family, called CUT-1 (Youssar, Schmidhauser et al. 2005), with no apparent function in the HOG regulatory cascade. Sensitivity of the *cut* and *os* mutants to hyper-osmotic conditions is due to their inability to accumulate glycerol to counteract this

stress. However, the *cut* mutant differs from the *os* mutants in several aspects: (i) slant cultures of the *cut* strain exhibit a sharp interruption of aerial development, the origin of the mutant denomination. This unusual morphological alteration is absent in *os* mutants. (ii) Some dicarboximide antifungals, such as fludioxonil, trigger the synthesis of glycerol in the wild-type through activation of the HOG pathway in the absence of hyper-osmotic conditions. The *os* mutants are resistant to this antibiotic (Zhang, Lamm et al. 2002; Fujimura, Ochiai et al. 2003), but the *cut* mutant is sensitive (Fujimura, Ochiai et al. 2000), suggesting that it does not participate in the regulatory HOG cascade.

The gene *cut-1* is implicated in a different mutant phenotype, called Ovc from overaccumulation of carotenoids (Harding, Philip et al. 1984). Induction of carotenogenesis by light is a widespread phenotypic trait in filamentous fungi, including *Neurospora spp.* (Avalos and Corrochano 2013). The *ovc* mutant was identified because of its higher accumulation of carotenoids in response to light, although it is similar to the wild-type in the dark (Harding, Philip et al. 1984). The only *ovc* mutant described so far contains a large DNA deletion, covering *cut-1* and 20 additional genes (Youssar and Avalos 2007); *cut-1* plays a central role in the Ovc phenotype, since reintroduction of a wild-type *cut-1* allele restores the normal carotenoid photoresponse. However, the single *cut* mutant exhibits normal carotenogenesis, indicating that the Ovc phenotype is due to the simultaneous loss of *cut-1* and at least a second unidentified gene (Youssar and Avalos 2007). Intriguingly, *cut-1* gene expression is repressed by light and is controlled by proteins involved in light regulation in *N. crassa* (Youssar and Avalos 2006), suggesting a possible link with the light-dependent phenotype of the *ovc* mutant.

The phytopathogenic fungus *Fusarium fujikuroi* is a model for the production of secondary metabolites, such as gibberellins, carotenoids, bikaverin and fusarins (Avalos, Cerdá-Olmedo et al. 2007). The biosynthesis of these compounds is subject to complex regulation involving different

environmental signals, such as nitrogen availability, pH or light (Tudzynski 2005; Avalos and Estrada 2010; Limón, Rodríguez-Ortiz et al. 2010; Díaz-Sanchez, Avalos et al. 2012). These regulatory networks are frequently interconnected and may share common elements with stress-control mechanisms, such as those involving the key regulatory signal cAMP (García-Martínez, Ádám et al. 2012; Studt, Humpf et al. 2013). Because of the down regulation of *N. crassa cut-1* expression by light and the possible regulatory connections of this gene with carotenoid biosynthesis, we analysed the function of the *cut-1* orthologue in *F. fujikuroi*, here called *cutA*. Deletion of this gene resulted in normal morphology and pigmentation but reduced tolerance to osmotic stress. *cutA* mRNA levels correlated with osmotic conditions and, in contrast to *cut-1*, were induced by light.  $\Delta cutA$  mutants did not show the increase in intracellular glycerol levels exhibited by the wild-type under hyper-osmotic conditions expected from the HOG response. Interestingly, *cutA* is linked and co-regulated with *gldB*, which encodes a putative glycerol dehydrogenase, suggesting that both genes participate in enzymic steps of glycerol metabolism.

## 2. Results

### 2.1 Identification of *cutA*, a gene of *Fusarium* orthologous to *cut-1* of *N. crassa*:

The *Fusarium* orthologues for the *N. crassa* gene *cut-1*, previously associated with the osmotic stress response (Youssar, Schmidhauser et al. 2005), were identified through BLAST analyses against the Comparative *Fusarium* genome Database (BroadInstitute). This gene, here called *cutA*, consists in *Fusarium verticillioides* of a 1485 bp continuous ORF encoding a predicted 494 aa polypeptide (FVEG\_12092), a size slightly smaller than the



CutA of *F. fujikuroi* exhibits high similarity to CUT-1 of *N.crassa*, with 66% coincident positions, rising to 84% in the HAD domain (Fig. 29A). The amino extension of CUT-1, unusual for the proteins of the HAD family, contains presumed regulatory segments, such as a PEST domain, a polyglutamine tract, and two predicted nuclear localization signals (Youssar, Schmidhauser et al. 2005).

Such elements were not found in this region of the *Fusarium spp.* CutA predicted proteins, which however did contain a 52 aa segment with 37 positions coincident with the same CUT-1 segment (Fig. 29B). This sequence is highly conserved in orthologues from other ascomycete fungi, such as *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Botryotinia fuckeliana* and *Podospora anserina* (Fig. 29C), suggesting a role in the function of this protein family.

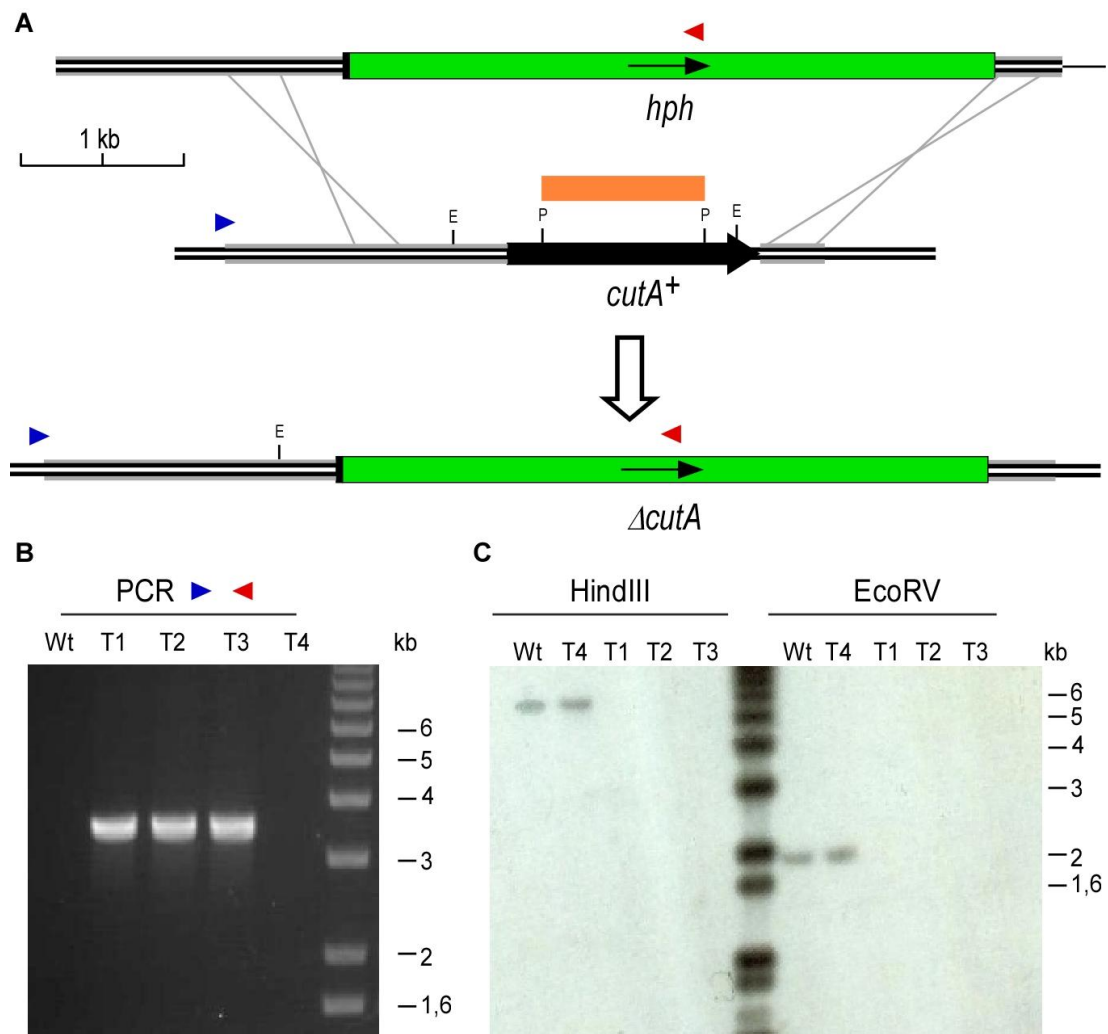
## 2.2 Targeted $\Delta cutA$ mutants are partially sensitive to osmotic stress:

The *cut-1* mutation results in enhanced sensitivity to hyper-osmotic conditions (Youssar, Schmidhauser et al. 2005). To analyse the possible biological function of *cutA* in *Fusarium spp.*, we obtained targeted knockout mutants for this gene by transformation with a plasmid in which a HygR cassette replaced the *cutA* coding sequence (Fig. 30A). After incubation of protoplasts of the wild-type strain FKMC1995 with this plasmid, 26 transformants were obtained and subcultured from uninucleate microconidia to ensure homokaryosis. Culture in medium supplemented with 0.68 M NaCl showed retarded growth of some of the transformants. Three of them (T1, T2 and T3), and one with wild-type growth, T4, were chosen for detailed molecular and phenotypic analysis. Genomic DNA samples from the wild-type and the four transformants were digested with *EcoRV* or *HindIII* and hybridized in a Southern blot with a *cutA* probe (Fig. 30C). The wild-type and the T4 samples showed a hybridizing band of the expected size but no bands could be detected in the T1, T2 and T3 samples. To confirm the replacement of *cutA*

with the HygR cassette, PCR assays were carried out combining a primer from the *cutA* DNA region not affected by the gene replacement and a primer from an internal sequence of the HygR cassette (Fig. 30B). Amplification products of the expected size were obtained only from T1, T2 and T3, indicating the occurrence of the expected *cutA* deletion in these transformants. No amplification was detected with T4 DNA, suggesting that this transformant resulted from integration of the vector through ectopic recombination.

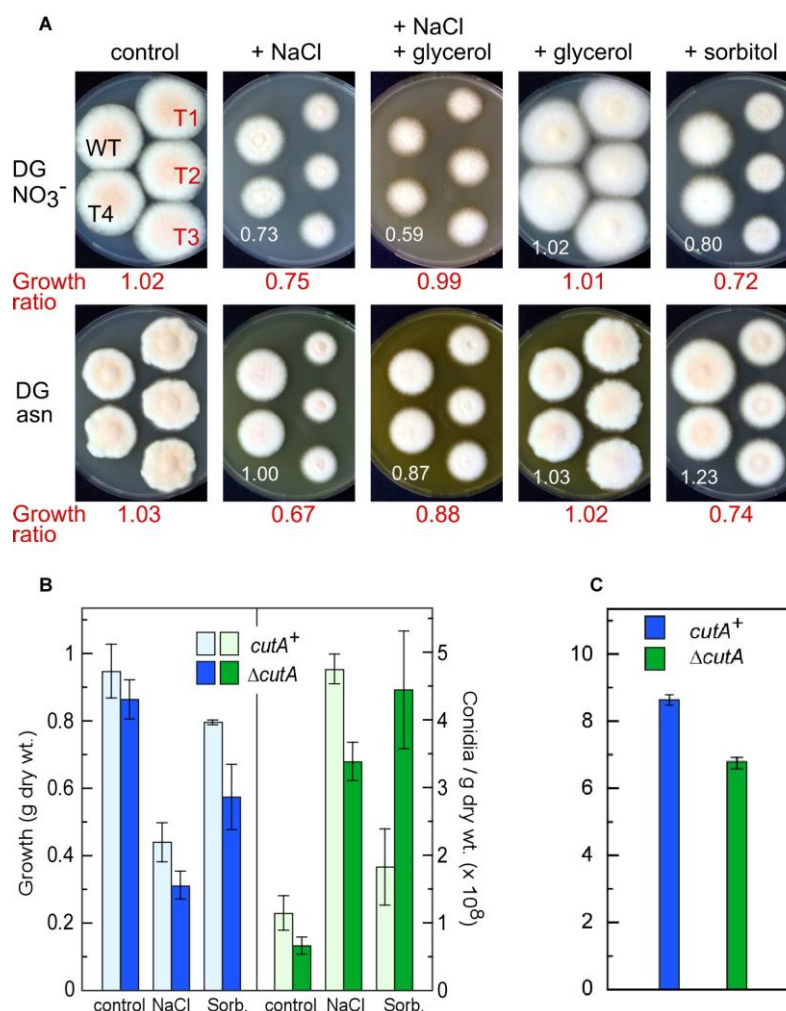
The wild-type and the four transformants exhibited similar pigmentation in the light or in the dark on DGagar, indicating that the  $\Delta cutA$  mutation does not affect the regulation of carotenogenesis. The strains then were grown on DG agar with two different nitrogen sources and checked for the effect of hyper-osmotic conditions (Fig. 31A). The colonies were slightly larger with nitrate than with asparagine in control plates, and the diameter of the  $\Delta cutA$  mutants (T1, T2 and T3) was similar to that of the *cutA*<sup>+</sup> strains (wild-type and T4) on each medium, indicating that the  $\Delta cutA$  mutation does not alter the growth of the fungus under normal culture conditions. Supplementation of the medium with 0.68 M NaCl resulted in visible diameter reductions of the  $\Delta cutA$  mutant colonies compared to those of the control strains. This growth reduction was compensated totally (in DGmedium) or partially (in DGasn medium) by the presence of 36 mM glycerol, suggesting that the mutants are affected in their mechanism of glycerol production. The sensitivity of the  $\Delta cutA$  mutants to NaCl is due to osmotic stress and not to ionic stress, as indicated by similar growth inhibition resulting from supplementation with 1.2 M sorbitol.

Experiments in race tubes with DGasn medium with 0.68 M NaCl showed



**Figure 30. Generation of  $\Delta cutA$  mutants of *F. fujikuroi*.** **A:** Schematic representation of the gene replacement event leading to the  $\Delta cutA$  mutation. The black arrow represents the *cutA* gene. Segments shaded in grey in the background, support the homologous recombinations leading to the replacement. The green box is the HygR cassette, containing the *hph* gene. The *Pst*I-delimited segment (P, orange box), absent in the mutants, was used as a probe in the Southern blot experiment shown below (C). Small arrowheads indicate the position and orientation of primers used in the PCR experiment displayed below (B). **B:** Agarose gel electrophoresis of amplification products obtained by PCR from DNA samples of the same strains with the primer sets indicated (see upper scheme for primer locations). Amplification of the DNA segment with primers reveals the presence of a *hygR*-interrupted *cutA* gene. **C:** Southern blot of genomic DNA from the wild type and four transformants digested with *EcoRV* or *Hind*III and hybridized with an internal *cutA* DNA segment (orange box). Probe locations and relevant *EcoRV* (E) or *Pst*I (P) sites are indicated on the upper scheme. The represented DNA segments lack *Hind*III sites.

only a 20% reduction in the linear growth of the  $\Delta cutA$  mutants compared to the  $cutA^+$  strains (Fig. 31C). Similar results were obtained in submerged cultures (Fig. 31B).



**Figure 31. Effect of  $\Delta cutA$  mutations on growth and conidiation.** **A:** Colonies of the  $\Delta cutA$  mutants (transformants T1, T2 and T3) and the  $cutA^+$  strains (wild-type, WT, and transformant, T4) grown for 7 days at 30 °C in the dark on DG minimal medium with either NaNO<sub>3</sub> (DGNO<sub>3</sub><sup>-</sup>) or asparagine (DGasn) as a nitrogen source. Labels in the top left image indicate positions of the strains in all plates. The medium was supplemented with 0.68 M NaCl, 0.68 M NaCl+36 mM glycerol, 36 mM glycerol or 1.2 M sorbitol, as indicated. White numbers below  $cutA^+$  strains indicate the ratio between mean diameter of the WT and T4 colonies in the supplemented plate and mean diameter in the control plate. Numbers below each picture (Growth ratio) indicate ratio between mean diameter of  $\Delta cutA$  transformants (T1, T2 and T3) and mean diameter of  $cutA^+$  strains (WT and T4) in the same culture conditions. **B:** Mycelial mass (left) and conidia density (right) in submerged cultures (open bars,  $cutA^+$ ; filled bars,  $\Delta cutA$ ) incubated for 1 week in DGasn medium, alone (Control) or supplemented with either 0.68 M NaCl or 1.2 M sorbitol (Sorb.). Values are means  $\pm$ SD from two independent biological replicates. **C:** Experiments in race tubes with DGasn medium with 0.68 M NaCl showed only a 20% reduction in the linear growth of the  $\Delta cutA$  mutants compared to the  $cutA^+$  strains

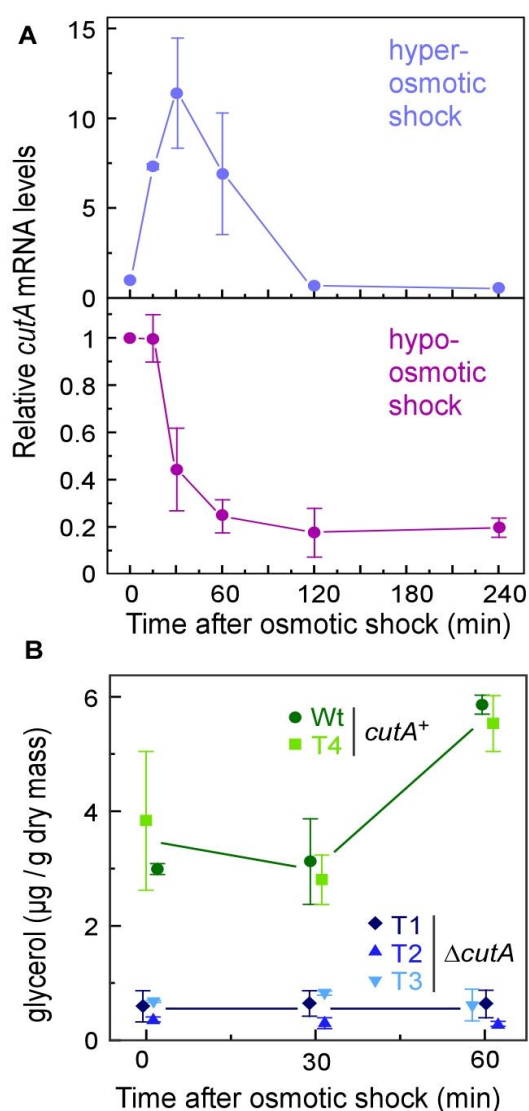


Mycelia grown in DGasn medium, supplemented with either 0.68 M NaCl or 1.2 M sorbitol, were filtered and lyophilized. The mycelial dry mass of  $\Delta cutA$  was slightly lower under hyper-osmotic conditions compared to the *cutA*<sup>+</sup> strains; all strains were more sensitive to NaCl than to sorbitol. The wild-type strain FKMC1995 produces conidia in submerged conditions. Conidiation was enhanced at least three fold in the *cutA*<sup>+</sup> strains under high NaCl concentration compared to DGasn medium alone (control), but not under high sorbitol concentration, suggesting that conidiation is stimulated by ionic stress but not by osmotic stress. Conidiation was however enhanced upon high concentration of either NaCl or sorbitol in the  $\Delta cutA$  strains compared to control values.

### **2.3 *cutA* expression is regulated by osmotic stress and is needed for glycerol accumulation:**

The phenotype of the  $\Delta cutA$  mutants indicates the participation of *cutA* in the hyper-osmotic resistance mechanism of *F. fujikuroi*. We investigated the effect of osmotic changes on the regulation of *cutA* using real-time RT-PCR. Addition of 0.68 M NaCl resulted in a rapid increase in *cutA* mRNA levels, by over ten fold 30 min after the onset of hyper-osmotic shock (Fig. 32A), followed by a subsequent return to initial levels 2 h later. To investigate the effect of hypo-osmotic stress, the fungus was grown in medium supplemented with 0.68 M NaCl and transferred to standard non-supplemented medium. Following the transfer, a rapid five fold decrease of *cutA* mRNA levels was produced in the first hour; these low levels were maintained for at least 4 h. These results show that *cutA* mRNA levels are regulated in response to external osmotic conditions.

The recovery of normal growth by the  $\Delta cutA$  mutants in 0.68 M NaCl when the medium was supplemented with 36 mM glycerol suggests a role for this gene in glycerol accumulation in *F. fujikuroi*. Therefore, we investigated the effect of adding 0.68 M NaCl to the culture on glycerol levels in the mycelia of the wild-type, T4 and the  $\Delta cutA$  mutants (Fig.32B). The *cutA*<sup>+</sup> strains contained about 3-4  $\mu\text{g}$  glycerol ( $\text{g dry mass}^{-1}$ ) under standard growth conditions. This concentration increased to approximately 6  $\mu\text{g}$  after onset of hyper osmotic shock. By contrast, glycerol content was very low in the  $\Delta cutA$  mutants [below 1  $\mu\text{g}$  ( $\text{g drymass}^{-1}$ )], and no change was detected after addition of 0.68 M NaCl, indicating that CutA is needed for glycerol synthesis in *F. fujikuroi*.



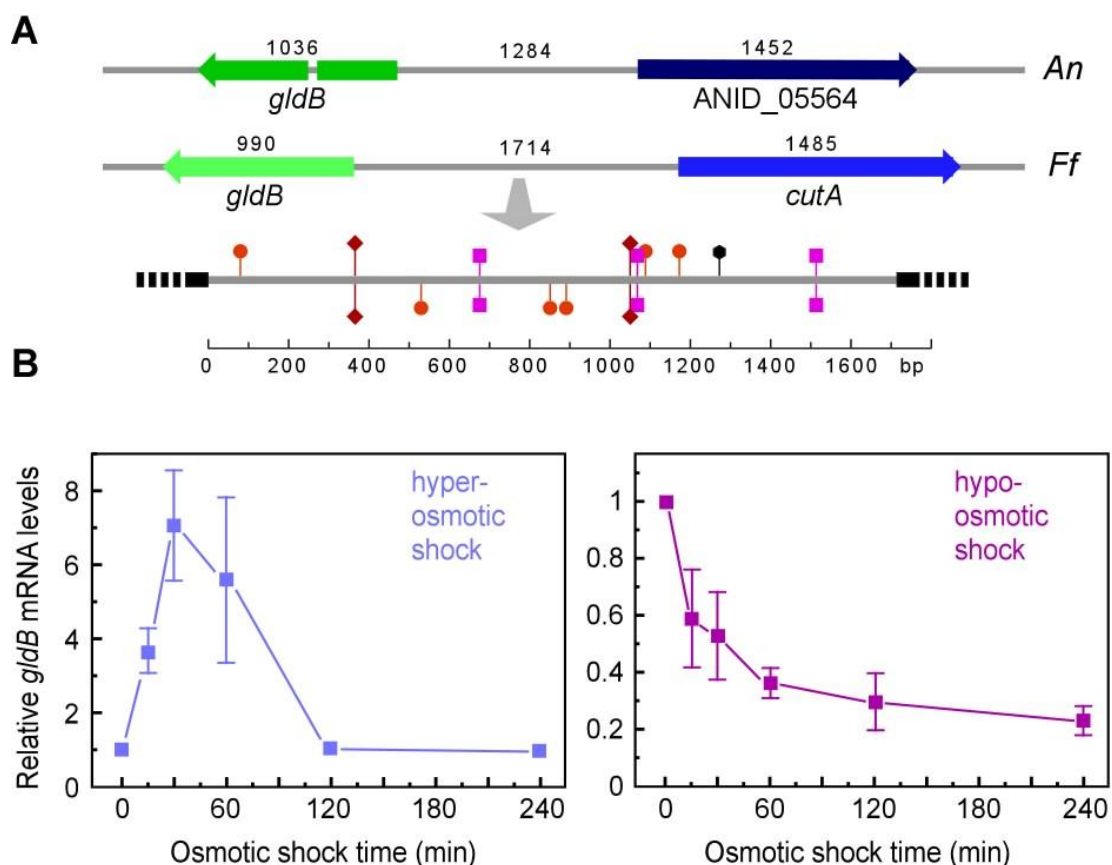
**Figure 32. Relation between *cutA* and osmotic stress.** **A:** Effect of hyper-osmotic or hypo-osmotic shock on *cutA* mRNA levels in wild-type *F. fujikuroi*. The data show results of RT-PCR of total RNA samples from mycelia grown for 3 days in normal culture conditions (time zero) and after adding 0.68 M NaCl (top graph) or from mycelia grown for 3 days in 0.68 M NaCl-supplemented medium (time zero) followed by transfer to fresh non-supplemented médium (bottom graph). Values are expressed relative to the values for each gene at time zero. The data show means  $\pm$ SD from three independent biological replicates. **B:** Internal glycerol content in the *cutA*<sup>+</sup> wild-type strains, *cutA*<sup>+</sup> transformant T4 and  $\Delta cutA$  transformants (T1, T2 and T3) grown for 3 days in normal culture conditions (time zero) and after adding 0.68 M NaCl. Values are means  $\pm$ SD from two independent biological replicates.

## 2.4 *cutA* is linked and co-regulated with a gene encoding a putative glycerol dehydrogenase:

The analysis of the sequences neighbouring *cutA* in the *Fusarium spp.* genomes revealed a divergently transcribed gene, coding for a putative NADP-dependent glycerol-2-dehydrogenase. A similar genomic organization was found in *A. nidulans*, where the *cutA* orthologue ANID\_05564 is linked and divergently transcribed with the NADP-dependent glycerol-2-dehydrogenase gene *gldB* (Fig. 33A) previously described in this species (de Vries, Flitter et al. 2003). For coherent terminology, we retain this name for the *F.fujikuroi* counterpart (locus FFUJ\_14512 in the *F. fujikuroi* database; Wiemann et al., 2013). The *cutA* and *gldB* orthologues are similarly organized in some ascomycetes, such as *N. crassa* (*cut-1* and *glc-1*, separated by 2100 bp) or *Magnaporthe grisea* (MGG\_00099 and MGG\_00097, separated by 2113 bp), but not in others (see, e.g. the *cutA* orthologues of *Botrytis cinerea* BC1G\_04790, or *Puccinia graminis* PGTG\_17701). The genes surrounding *cutA* and *gldB* in the *Fusarium spp.* genomes have no predictable relationship with glycerol metabolism.

The divergent transcription of *gldB* with *cutA* and their possible functional relationship led us to investigate the effect of osmotic changes on *gldB* regulation. The same RNA samples used for the analysis of the effect of hyperosmotic and hypo-osmotic shock on *cutA* mRNA were used to investigate the content of *gldB* mRNA. The results (Fig. 33B) showed the same regulatory pattern found for *cutA* (Fig. 32A), i.e. a rapid and transient induction in response to hyper-osmotic conditions, and a five fold reduction in response to hypo-osmotic conditions. This result suggests coordinated transcription of both genes mediated by common upstream regulatory elements. A search for conserved transcription factor binding sites carried out with the online MatInspector tool (Cartharius, Frech et al. 2005) identified numerous candidate sequences for multistress response elements in the *cutA/gldB*

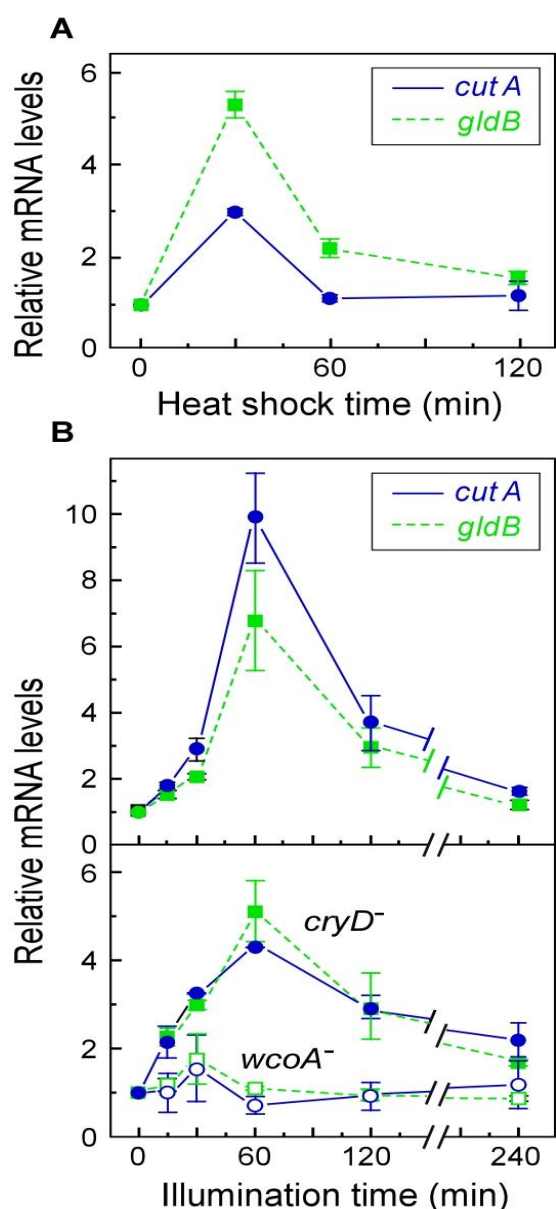
intergenic region (Fig. 33A). Those corresponding to the F\$YSTR multistress response matrix family exhibited the maximum similarity. Similar putative regulatory elements were also found in the equivalent intergenic sequences in *F. verticillioides* (1745 bp) and *F. oxysporum* 4287 (1646 bp).



**Figure 33. Location and regulation of gene *gldB*.** **A:** Physical map of the genes *cutA* and *gldB* in the *F. fujikuroi* genome (centre) and its orthologues in the *A. nidulans* genome (top). The numbers indicate the sizes (bp) of ORFs and intergenic region. Bottom: detail of the intergenic sequence and locations of conserved binding sites for transcription factors related to multistress or heat shock responses identified by the MatInspector tool. Codes for predicted binding sites:  $\uparrow$ , transcriptional activator for genes in multistress response (F\$YSTR matrix family in library version 9.0);  $\downarrow$ , stress-induced transcriptional repressor (F\$SXBP);  $\uparrow$ , heat shock factor (yeast) (F\$YHSF);  $\uparrow$ , trimeric heat shock transcription factor (F\$YHSF). Upper and lower symbols correspond to binding sites in the plus and minus strands, respectively. **B:** Effect of hyper-osmotic or hypo-osmotic shock on *gldB* mRNA levels in wild-type *F. fujikuroi*. The data show results of RT-PCR analyses of the total RNA samples from the wild-type as described in Fig. 32A. Values are expressed relative to the values for each gene at time zero. Data show means  $\pm$ SD from three independent biological replicates.

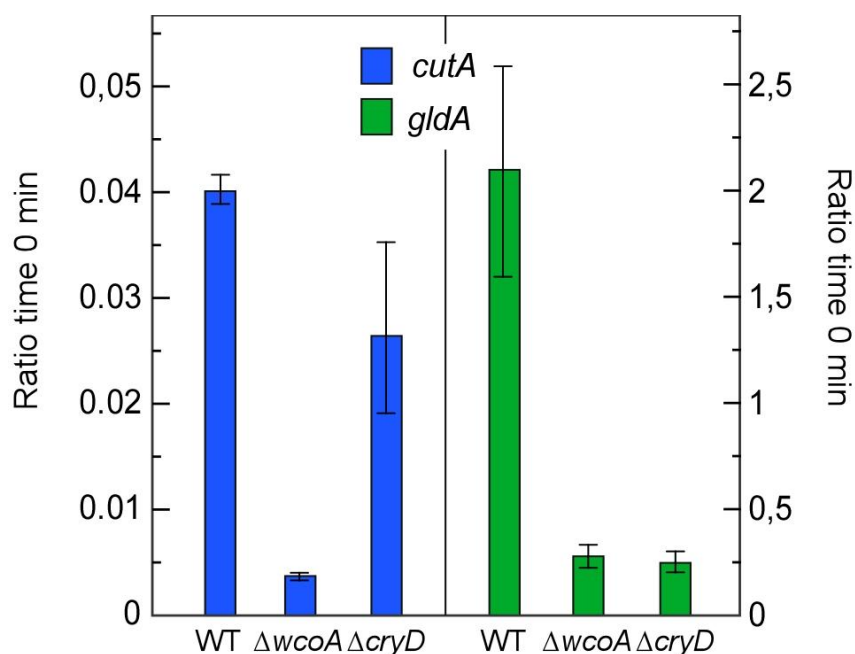
## 2.5 *cutA* and *gldB* are upregulated by heat shock and light:

The MatInspector tool identified candidate regulatory elements for heat shock (Fig. 33A). This finding, and the expected correlation between temperature and osmotic stress in natural habitats, led us to analyse the effect of heat shock on *cutA* and *gldB* mRNA levels (Fig. 34A). A sudden temperature shift from 30 °C to 42 °C resulted in a transient increase in the mRNA content of both genes, with a maximum level reached after 30 min (Fig. 34A).



**Figure 34. Effect of heat shock and light on *cutA* (solid lines) and *gldB* (broken lines) mRNA levels in *F. fujikuroi*.** **A:** Results from RT-PCR of total RNA samples from the wild-type grown for 3 days in the dark at 30°C then exposed for 30 min, 1 h or 2 h to 42 °C. **B:** Results from RT-PCR of total RNA samples from the wild-type (upper graph) and  $\Delta wcoA$  and  $\Delta cryD$  mutants (lower graph) grown for 3 days in the dark then exposed for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h or 4 h to 7 W white light m<sup>-2</sup>. Data show means  $\pm$ SD from three independent biological replicates for the wild-type, and from two independent biological replicates for two mutants ( $\Delta wcoA$ : SF225 and SF226;  $\Delta cryD$ : SF236 and SF237). Values are expressed relative to the value obtained with mycelia from the same strain collected before heat shock or before illumination (time zero).

Expression of the gene *cut-1* in *N. crassa* is downregulated by light and upregulated in the dark in mutants of the white collar (WC) complex (Youssar and Avalos 2006). To investigate a possible regulatory effect of light on *cutA* and *gldB* mRNAs, dark-grown wild-type cultures were transferred to light and the effect of illumination time was investigated. *cutA* and *gldB* mRNA levels augmented rapidly upon illumination, reached the highest values after 1 h exposure, following which they decreased, returning to close to initial levels 4 h later (Fig. 34B). Significant photoinduction was also observed in mutants of the gene *cryD*, which encodes a DASH cryptochrome photoreceptor involved in the regulation of secondary metabolism of this fungus (Castrillo, García-Martínez et al. 2013). However, photoinduction was not apparent in mutants of the WC-1 gene of *F.fujikuroi*, *wcoA* (Estrada and Avalos 2008a), indicating that this photoreceptor mediates *cutA* and *gldB* photoinduction.



**Figure 35.** *cutA* and *gldA* mRNA levels at illumination time 0 in *F. fujikuroi*. mRNA levels of both genes are reduced in the dark in the  $\Delta wcoA$  and  $\Delta cryD$  in the mutants compared to the wild-type. Values showed represent Ct *cutA*/ Ct tubulin and Ct *gldA*/ Ct tubulin.

In contrast to the regulation previously found for *cut-1* in *N. crassa*, the *cutA* mRNA levels in the dark were not raised in the  $\Delta wcoA$  mutants compared to the wild-type, but were reduced about ten fold (Fig. 35).

## 2.6 The HOG pathway gene *hogA* is regulated by light:

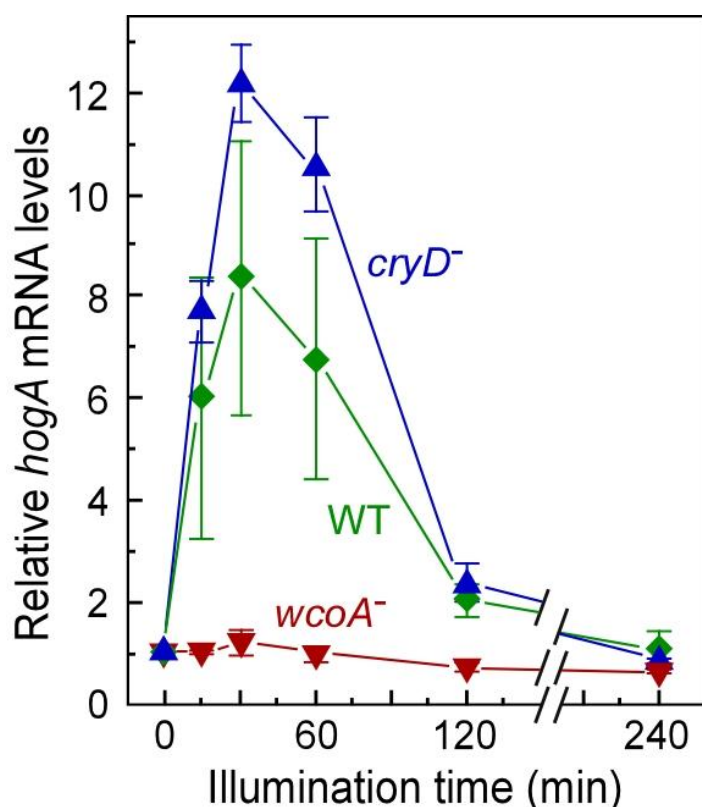
The HAD enzyme encoded by the *cutA* gene is not a component of the regulatory HOG cascade, but could be subject to regulation by this mechanism. The available *Fusarium spp.* genomes contain orthologous genes for all members of the HOG MAPK pathway. In *A. nidulans*, the HOG cascade consists of the two-component signalling proteins TcsB, YpdA and SskA, the MAPKKK SskB, the MAPKK PbsB and the MAPK HogA (Furukawa, Hoshi et al. 2005). The *Fusarium spp.* genomes contain conserved orthologues for these proteins. The orthologues and their approximate identity percentages in *F. fujikuroi* are FFUJ\_07404 (51% with TcsB), FFUJ\_09828 (42% with YpdA), FFUJ\_00926 (53% with SskB), FFUJ\_05618 (37% with SskA), FFUJ\_06204 (49% with PbsB), and FFUJ\_04484 (79% with HogA). As a first insight on a possible regulation by light of the HOG cascade, we investigated the effect of light on HogA (FFUJ\_06204) mRNA levels. The results showed a rapid increase of *hogA* mRNA in response to light, reaching a maximum after 30 min illumination and decaying afterwards (Fig. 36). As found for *cutA* and *gldB*, similar photoinduction was also present in the  $\Delta cryD$  mutants, but not in the  $\Delta wcoA$  mutants, again suggesting the participation of WcoA as a key photoreceptor in this photoresponse.

## 3. Discussion:

The available *Fusarium spp.* genomes contain a gene encoding a HAD protein orthologous to CUT-1 of *N. crassa*, here called CutA. The name of this protein family derives from the haloacid dehalogenases found in prokaryotes, but its members are mostly associated to a large group of enzymes that dephosphorylate a wide range of low and high molecular mass substrates,

with numerous examples in all taxonomic groups, from *E. coli* (Kuznetsova, Proudfoot et al. 2006) to humans (Seifried, Schultz et al. 2013). In addition to their highly conserved HAD-like catalytic domain, CutA and CUT-1 exhibit an amino extension usually absent in other proteins from the HAD family (Youssar, Schmidhauser et al. 2005).

A similar extension is found in Cut-like proteins encoded in the genomes of other ascomycetes, but not in representative zygomycete and basidiomycete species, such as *Mucor circinelloides* and *Ustilago maydis* (closest CutA relatives 87690 and UM04682 in the respective annotated genomes). The widespread occurrence of CUT-1/CutA orthologues in ascomycetes indicates a conserved functional role for this HAD subfamily in this fungal group.



**Figure 36. Effect of light on *hogA* mRNA levels in *F. fujikuroi*.** Results of RT-PCR of total RNA samples from the wild-type (◆) and  $\Delta wcoA$  (▼) and  $\Delta cryD$  (▲) mutants grown for 3 days in the dark followed by exposure to 15 min, 30 min, 1 h, 2 h or 4 h to 7 W white light  $m^{-2}$ . Data show means  $\pm$ SD from three independent biological replicates for the wild-type, and from two independent biological replicates of two independent mutants ( $\Delta wcoA$ : SF225 and SF226;  $\Delta cryD$ : SF236 and SF237). Values are expressed relative to the value obtained with mycelia from the same strain collected before illumination (time zero).



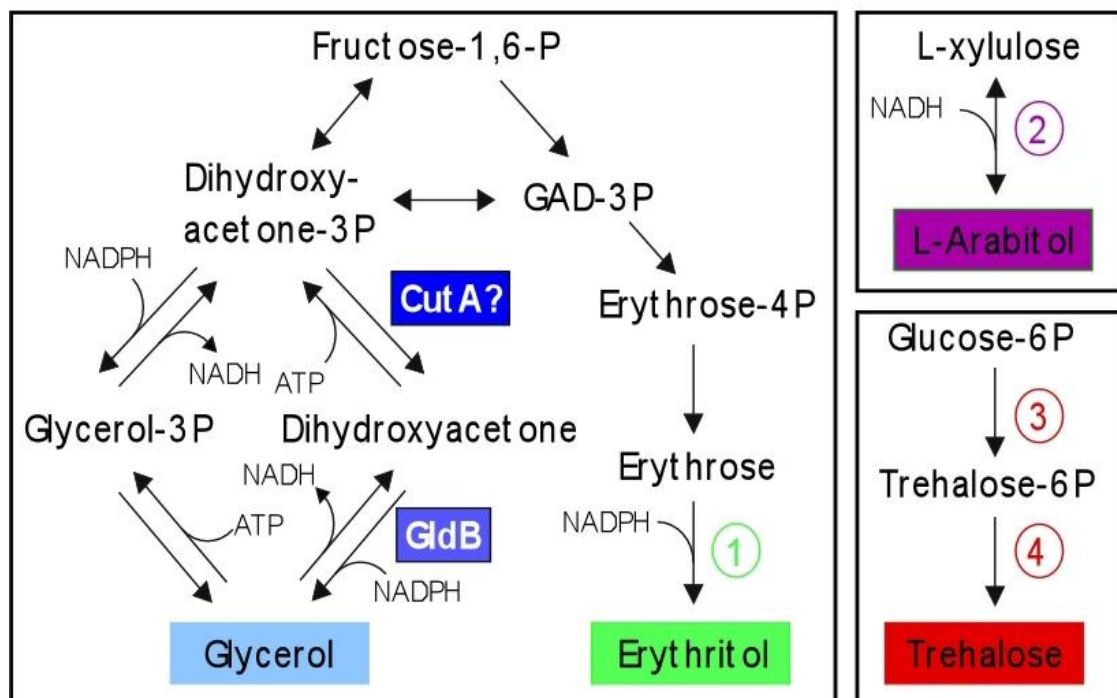
The regulation of the genes *cut-1* and *cutA* of *N. crassa* and *F. fujikuroi* by heat shock and hyper-osmotic shock and the phenotype of the respective mutants (Youssar, Schmidhauser et al. 2005) indicate a similar role of both genes in the osmotic stress response. This is further supported by the rapid reduction of *cutA* mRNA content after hypo-osmotic shock, and its transient induction by illumination. However, photoinduction of *cutA* mRNA differs strikingly from the downregulation of *cut-1* mRNA levels by light in *N. crassa* (Youssar and Avalos 2006). Moreover, *cut-1* mRNA content increases notably in the dark in different regulatory mutants involved in the light response, including those of the WC complex, an effect independent of the downregulation by light. By contrast, mutants of the orthologous *wc-1* gene of *F. fujikuroi*, *wcoA* (Estrada and Avalos 2008a), contain lower *cutA* mRNA levels in the dark than the wild-type, and have apparently lost their photoinduction. Thus, our results show different light-dependent regulations for *cut-1* in *N. crassa* and *cutA* in *F. fujikuroi*, probably reflecting different survival requirements in their respective natural habitats.

The HOG response, mediated by a signalling transduction pathway through a MAPK cascade, triggers the accumulation of glycerol inside the cell in response to external hyper-osmotic conditions. This regulatory mechanism has been investigated in detail in *S. cerevisiae* (Nevoigt and Stahl 1997), and seems to be ubiquitous in fungi (Krantz, Becit et al. 2006), including *Fusarium* species, as indicated by the occurrence of the expected HOG pathway genes in their genomes. Accordingly, exposure to 0.68 M NaCl results in a rapid increase of glycerol content in wild-type *F. fujikuroi* mycelia. However, the increase was modest compared to the proportionally higher glycerol accumulation in response to hyper-osmotic stress found in *S. cerevisiae* (Reed, Chudek et al. 1987), suggesting that glycerol is not the major osmolyte in *Fusarium spp.* The  $\Delta cutA$  mutants do not exhibit this response, and their glycerol content is very low even without osmotic stress, pointing to an enzymic role of CutA in the synthesis of glycerol. A similar reduction in glycerol content was previously found in the *cut* mutant of *N. crassa* (Lew and Levina 2007). The incapacity of these mutants to accumulate glycerol, in

either *N. crassa* or *F. fujikuroi*, had no apparent consequences on their ability to grow under standard laboratory conditions, probably because ion uptake mechanisms are sufficient to maintain appropriate turgor values (Lew and Levina 2007).

The ability of the  $\Delta cutA$  mutants to grow in hyper-osmotic conditions suggests that *F. fujikuroi* possess other mechanisms to counteract hyper-osmotic stress, such as ion uptake (Lew 2011) or production of alternative osmolytes. In *A.nidulans* and *Aspergillus oryzae*, growth under high osmotic pressure results in the accumulation of arabitol and erythritol in addition to glycerol (de Vries, Flitter et al. 2003; Ruijter, Visser et al. 2004). The *Fusarium spp.* genomes contain orthologous genes for the enzymes responsible for the last enzymic steps in the synthesis of arabitol and erythritol (Fig. 37B): FFUJ\_05626, FVEG\_0255, FGSG\_04036 and FOXG\_03675 (protein codes in the *F. fujikuroi*, *F. verticillioides*, *F. graminearum* and *F. oxysporum* genomes, respectively) exhibit approximately 40% identity with erythrose reductase of *Yarrowia lipolytica* (accession number AGG15954), the enzyme producing erythritol; on the other hand, FFUJ\_00595, FVEG\_00541, FGSG\_00655 and FOXG\_00973 exhibit approximately 52% identity with L-arabitol dehydrogenase from *Aspergillus niger* (XP001397484). The occurrence of these genes suggests that *Fusarium spp.* Are able to produce these polyalcohols in addition to glycerol. Likewise, the synthesis of other classes of osmoprotectants, such as trehalose, cannot be discounted. The *Fusarium spp.* genomes also contain orthologues for *tpsA* and *orlA* of *A.nidulans*, encoding the trehalose-6-phosphate synthase and phosphatase needed for trehalose production from glucose-6P (*F. fujikuroi* orthologues: FFUJ\_13242 and FFUJ\_13709, with approximately 77% and 43% identical positions with TpsA and OrlA, respectively). However, trehalose is not accumulated in response to osmotic stress in *A. oryzae* (Ruijter, Visser et al. 2004), and in *A. nidulans* it is rather accumulated in sexual and asexual spores (Ni and Yu 2007), pointing to arabitol and erythritol as more likely osmotic stress-induced osmolytes in *F. fujikuroi*.

The biochemical basis of glycerol production has been investigated in detail in *S. cerevisiae*, where this polyalcohol is synthesized from dihydroxyacetone phosphate through its conversion to glycerol-3-phosphate by glycerol-3-phosphate dehydrogenase, and the subsequent dephosphorylation of this product by glycerol-3-phosphatase to yield glycerol (Fig.37B). *S. cerevisiae* contains two glycerol-3-phosphatase (GPP) isoforms, with 92.4% identical positions and encoded by genes *gpp1* and *gpp2* (Pahlman, Granath et al. 2001). The *Fusarium spp.* genomes contain a single gene putatively orthologous to *gpp1* and *gpp2*, encoding a protein with only 32% and 33% coincident positions, respectively.



**Figure 37. Late steps of osmolyte production in fungi.** Glycerol, erythritol and arabitol biosynthetic steps adapted from (Diano, Bekker-Jensen et al. 2006). Trehalose biosynthetic steps adapted from Fillinger et al. (Fillinger, Chaverocche et al. 2001a). Numbers indicate enzymatic activities mentioned in the text: 1, L-arabitol dehydrogenase; 2, erythrose reductase; 3, trehalose-6-phosphate synthase; 4, trehalose-6-phosphate phosphatase. The enzymatic reactions catalysed by CutA (tentative assignment) and GdB are indicated.

Glycerol also may be produced by a parallel pathway, in which dihydroxyacetone phosphate is first dephosphorylated to dihydroxyacetone by a putative GPP, and then converted to glycerol by glycerol dehydrogenase.

This alternative pathway seems to function in *A. nidulans*, as indicated by the persistence of glycerol accumulation in mutants of the glycerol-3-phosphatedehydrogenase gene *gfdA* (Fillinger, Ruijter et al. 2001b). Moreover, the null *gfdA* mutants exhibit growth defects under standard growth conditions, but not under hyper-osmotic stress, and a role of this enzymic activity in cell wall integrity has been proposed.

In *F. fujikuroi*, *cutA* is linked and co-regulated with *gldB*, encoding the putative NADP<sup>+</sup>-dependent glycerol dehydrogenase, i.e, the enzyme converting dihydroxyacetone into glycerol. The gene *gldB* was previously investigated in *A. nidulans*, where the null mutants were totally devoid of glycerol dehydrogenase activity and exhibited impaired growth under hyper-osmotic conditions (de Vries, Flitter et al. 2003). Moreover, glycerol dehydrogenase activity was markedly enhanced under hyper-osmotic stress in the wild-type, but not that of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explaining the incapacity of the *gldB* mutant to grow under hyper-osmotic conditions. Taken together, these results are consistent with the synthesis of glycerol through dihydroxyacetone instead of glycerol-3P, suggesting that *A. nidulans* and *S. cerevisiae* have diverged in their biochemical mechanisms to produce this osmolyte. The similar regulation by osmotic stress of *gldB* in *F. fujikuroi* suggests the same biochemical scenario in this fungus.

If glycerol biosynthesis proceeds via dihydroxyacetone in filamentous fungi, the enzyme producing this precursor from dihydroxyacetone-3P remains to be identified. Recently, a HAD enzyme of *Corynebacterium glutamicum* (cgR\_2128 or HdpA) was found to catalyse the dephosphorylation of dihydroxyacetone phosphate to produce dihydroxyacetone (Jojima, Igari et al. 2012). HdpA is much shorter than CutA (274 and 494 amino acids, respectively), and as typically found in HAD enzymes, exhibits low similarity (60 coincident positions, Fig. S3). We propose that CutA catalyses the same enzymic reaction to produce dihydroxyacetone in *Fusarium spp.* (Fig. 7). Supporting this hypothesis: (i) many enzymes from the HAD family exhibit

phosphatase activities on a large variety of substrates, including among them dihydroxyacetone phosphate, and (ii) *cutA* is divergently transcribed and coregulated with *gldB*, encoding the predicted dihydroxyacetone-metabolizing enzyme. Fitting this hypothesis, and as found for the  $\Delta cutA$  mutant of *F. fujikuroi*, intracellular glycerol levels were strongly decreased in the *gldB* mutants of *A. nidulans* compared to the wild-type (de Vries, Flitter et al. 2003).

In summary, our results are consistent with *cutA/gldB* in *F. fujikuroi* as a coordinated transcriptional set in charge of dihydroxyacetone-mediated glycerol biosynthesis, responding to different environmental cues associated to osmotic stress and desiccation, such as sun exposure and elevated temperatures. The HOG regulatory cascade is likely to play a central role in this regulation, including the induction by light. Moreover, the faster WcoA-dependent photoinduction exhibited by the *hogA* gene compared to *cutA* and *gldB* is consistent with a sequential regulatory mechanism. Thus, *hogA* could be activated by light by WcoA, and *hogA* could in turn activate *cutA/gldB*. Confirmation of this hypothesis will require a deeper investigation of this regulatory system. The same genetic organization of *cutA* and *gldB* orthologues in other ascomycetes suggests a common origin from an early ancestor of this biochemical and regulatory pattern for glycerol biosynthesis.



## CHAPTER 3

**BIOLOGICAL ROLE OF FUNGAL RHODOPSINS: THE LIGHT  
DRIVEN, PROTON-PUMPING RHODOPSIN CarO OF  
*Fusarium fujikuroi* RETARDS GERMINATION OF LIGHT-  
EXPOSED CONIDIA**

Jorge García-Martínez, Michael Brunk, Javier Avalos, Ulrich Terpitz

Submitted to Nature Scientific Reports (2014)





## 1. Introduction

Light is an important environmental factor, strongly influencing the behavior of microorganisms in their natural habitats. A diversity of light sensors, able to detect blue, green, or red wavelengths in the visible spectrum (Corrochano 2007) (Bayram, Braus et al. 2010) provides filamentous fungi the ability to sense light and adapt accordingly. Among them stand out blue-light photoreceptors, such as the proteins of the White collar, Vivid and cryptochrome families (Avalos and Estrada 2010) (Idnurm, Verma et al. 2010), which absorb light by flavin chromophores. In contrast, phytochromes are red light-sensing proteins that use the chromophore biliverdin (Avalos and Estrada 2010). Analysis of mutants has revealed the participation of these photoreceptors in the modulation of a variety of physiological and morphological responses (Corrochano 2007) (Herrera-Estrella and Horwitz 2007) (Corrochano and Avalos 2010). A further class of fungal photoreceptors comprises the rhodopsins, members of the homonymous group of green light sensing microbial proteins firstly discovered in archaea (Spudich and Jung 2005) (Klare, Chizhov et al. 2008) (Grote, Engelhard et al. 2014) (Ernst, Lodowski et al. 2014). Microbial rhodopsins consist of seven transmembrane helices (TM) forming an interior pocket for the chromophore all-*trans*-retinal, which is covalently bound via a protonated Schiff's base to a lysine residue, located in the TM7. Some residues of the binding pocket are well conserved across kingdoms, whereas conservation outside the pocket is more sparse (Sharma, Spudich et al. 2006). In light-driven rhodopsin pumps a single ion is translocated per photocycle, which is triggered by light-induced all-*trans* to 13-*cis* retinal isomerization and characterized by a sequence of photointermediates responsible for ion-uptake, -transfer, -release, and chromophore-recycling.

Genes for putative rhodopsins are ubiquitous in the genomes of fungal species (Brown 2004) and they are frequently up-regulated by light (Estrada and Avalos 2009) (Estrada, Brefort et al. 2009) (Kihara, Tanaka et al. 2009). Some fungal rhodopsins have been purified and photochemically analysed, but

only sparse information is available about their physiological roles (Brown, Dioumaev et al. 2001) (Waschuk, Bezerra et al. 2005) (Fan, Solomon et al. 2011). Moreover, the analysis of their functions through targeted deletion of the encoding genes provided no clear clues so far (Idnurm, Verma et al. 2010). The few fungal rhodopsins analyzed in detail contain the TM7 lysine residue allowing for covalent retinal-binding via protonated Schiff's base, and they are therefore presumably photoactive. Though the most important amino acids required for proton pumping are strongly conserved, according to differences in the binding pocket residues three classes of fungal rhodopsins are distinguished (Brown and Jung 2006): NR-like rhodopsins (from *Neurospora* rhodopsin), LR-like rhodopsins (from *Leptosphaeria* rhodopsin), and auxiliary ORP-like rhodopsins.

The filamentous fungus *Fusarium fujikuroi*, the causing agent of the bakanae-disease in rice plants, is of economic importance as a biotechnological source of gibberellins, growth-promoting plant hormones (Rademacher 1997). This fungus is also a research model for the production of these and other metabolites (Avalos, Cerdá-Olmedo et al. 2007), including the carotenoids, and its genome has been recently sequenced (Wiemann, Sieber et al. 2013). The *Fusarium* genomes contain genes coding for two different rhodopsins, called in *F. fujikuroi* OpsA (Estrada and Avalos 2009) and CarO (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004). Based on sequence similarity OpsA is a NR-like rhodopsin, alike to Nop-1 of *N. crassa*. The photocycle of Nop-1 is very slow and proton-pump activity was not detected in electrophysiological measurements (Chow, Han et al. 2010), and similar features may be presumed for OpsA. In contrast, CarO is among the auxiliary ORP-like rhodopsins, which together with LR-like rhodopsins exhibit fast photocycles and possess all conserved amino acid residues required for proton pumping (Fig. 38B). LR is known to provide proton-pumping function, but the auxiliary ORP-like rhodopsins were not investigated in this respect (Avalos and Estrada 2010) (Fan, Solomon et al. 2011).

Fungal light-driven proton pumps may be involved in the generation of pH gradients or in pH homeostasis, but they may also have signaling functions, as acidification of some cell compartments could be used to activate certain biochemical responses (Waschuk, Bezerra et al. 2005) (Idnurm, Verma et al. 2010). Due to the above mentioned absence of clear mutant phenotypes, clarification of their biological functions remained elusive. In *F. fujikuroi*, *carO* is located in the same gene cluster with the genes needed for retinal synthesis, but the *carO*<sup>-</sup> mutant did not exhibit any visible phenotype (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004). On the other hand, *opsA* deletion mutants did not exhibit growth or morphological alterations either, but they did show minor changes in the expression of carotenoid biosynthesis genes (Avalos and Estrada 2010) , and a minor regulatory alteration of these genes was also exhibited by the mutant of the gene encoding the retinal forming enzyme CarX (Thewes, Prado-Cabrero et al. 2005).

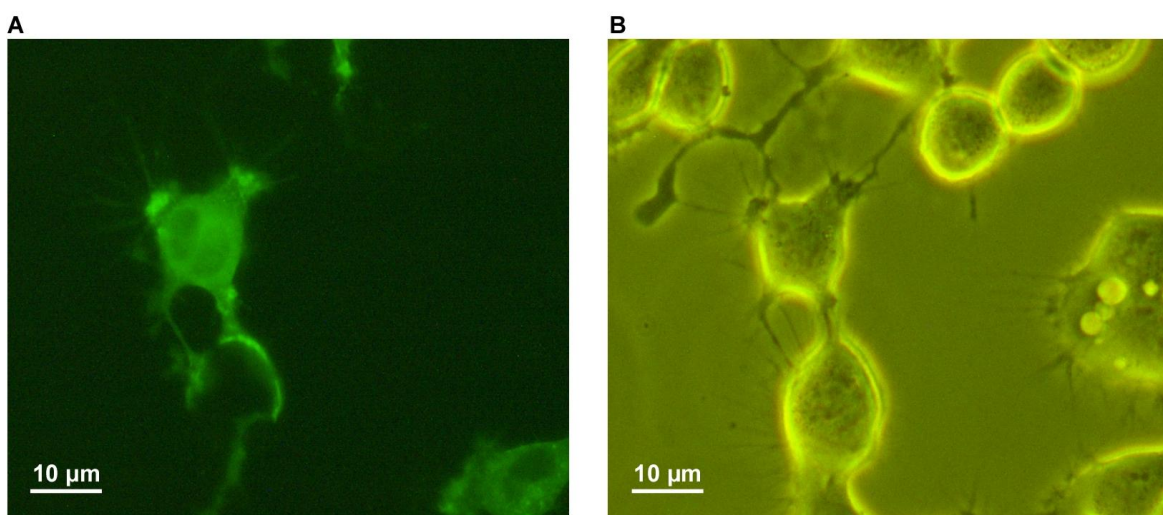
In this chapter we combined electrophysiology and fluorescence microscopy analyses to detect pump activity and cellular localization of the CarO protein of *F. fujikuroi*. In addition we analyzed the effect of light on conidia germination and growth of a *carO*<sup>-</sup> mutant and a *carO*<sup>+</sup> control strain, referred hereafter to as CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup>. We show that CarO is a green light-activated proton pump mainly distributed in the plasma membrane of conidia, slowing down spore germination and early hyphal development in this fungus.



## 2. Results

### 2.1. Pumping activity of CarO

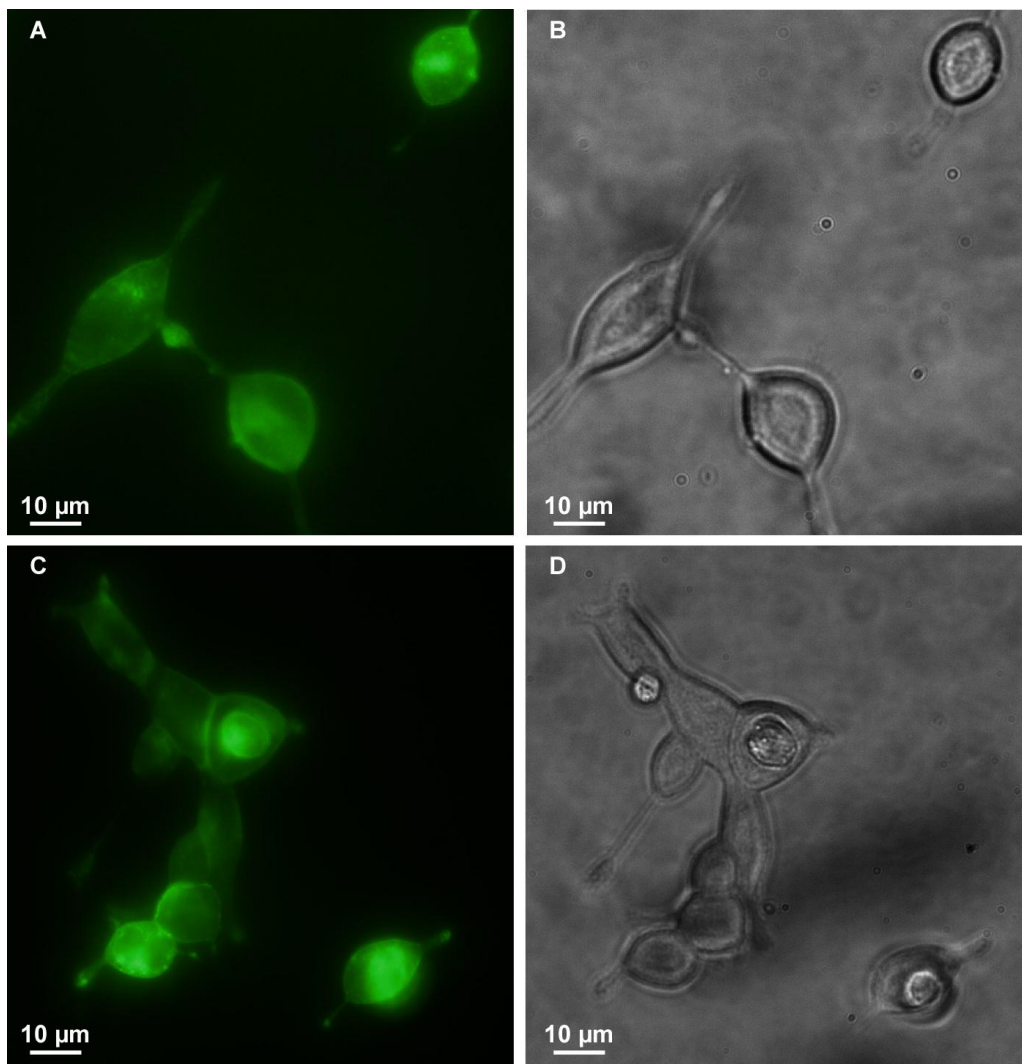
CarO was predicted to be a light-activated proton pump due to the occurrence of conserved residues, which are required for proton pumping in related microbial rhodopsins (Ernst, Lodowski et al. 2014). We modeled the amino acid sequence of CarO to the structure of BR (Fig. 38A). As other microbial rhodopsins the protein consists of 7 transmembrane domains. Most importantly the proton donor and proton acceptor analogous of BR-D96 and BR-D85 are present in CarO (D128 and D117, respectively). Also the lysine residue (BR-K216) required for covalent binding of the retinal chromophore via a protonated Schiff base is present in helixG of CarO (L246). The occurrence of *Trp146* in Helix D is characteristic for ORP-like rhodopsins, while other microbial rhodopsins typically exhibit apolar residues in this position (Fan, Solomon et al. 2011).



**Figure 39. NEG108-15 cells expressing CarO::YFP. A:** Fluorescence image. Protein mainly localizes to the plasma membrane. Note that the expression levels are heterogeneous in the cell culture. **B:** White field of the same image.

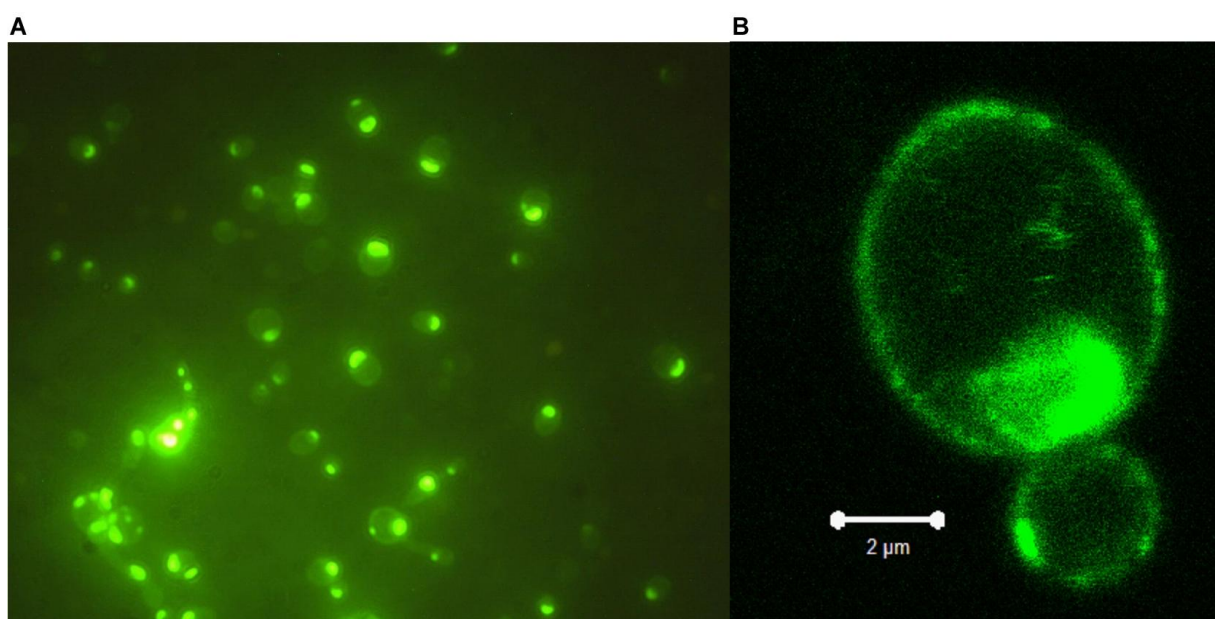
In order to test the capability of CarO to act as an ion pump, we performed electrophysiological experiments. For that purpose, we

constructed a fluorescent version of CarO C-terminally tagged with enhanced yellow fluorescent protein (CarO::YFP; Fig. 39) and we performed a transient transfection with NEG108-15 cells. Protein expression was observed, so we decided to establish a HEK293 FlpIn-T-Rex cell line heterogeneously expressing this tagged CarO protein (Fig 39). Transfection of HEK293 FlpIn-T-Rex cells allowed us to have cell cultures homogeneously expressing CarO::YFP, as needed for electrophysiology experiments. As expected, 15-24 hours after activation of the promoter by tetracycline, the HEK293 cells exhibited membrane-localized fluorescence (Fig. 40).



**Figure 40. HEK293 cells expressing CarO::YFP. A:** Fluorescence image of HEK293 CarO::YFP cells used in patch-clamp experiments. The fusion protein is mainly located in the plasma membrane but also in internal membranes. **B:** White field. White bars represent 10 μm.

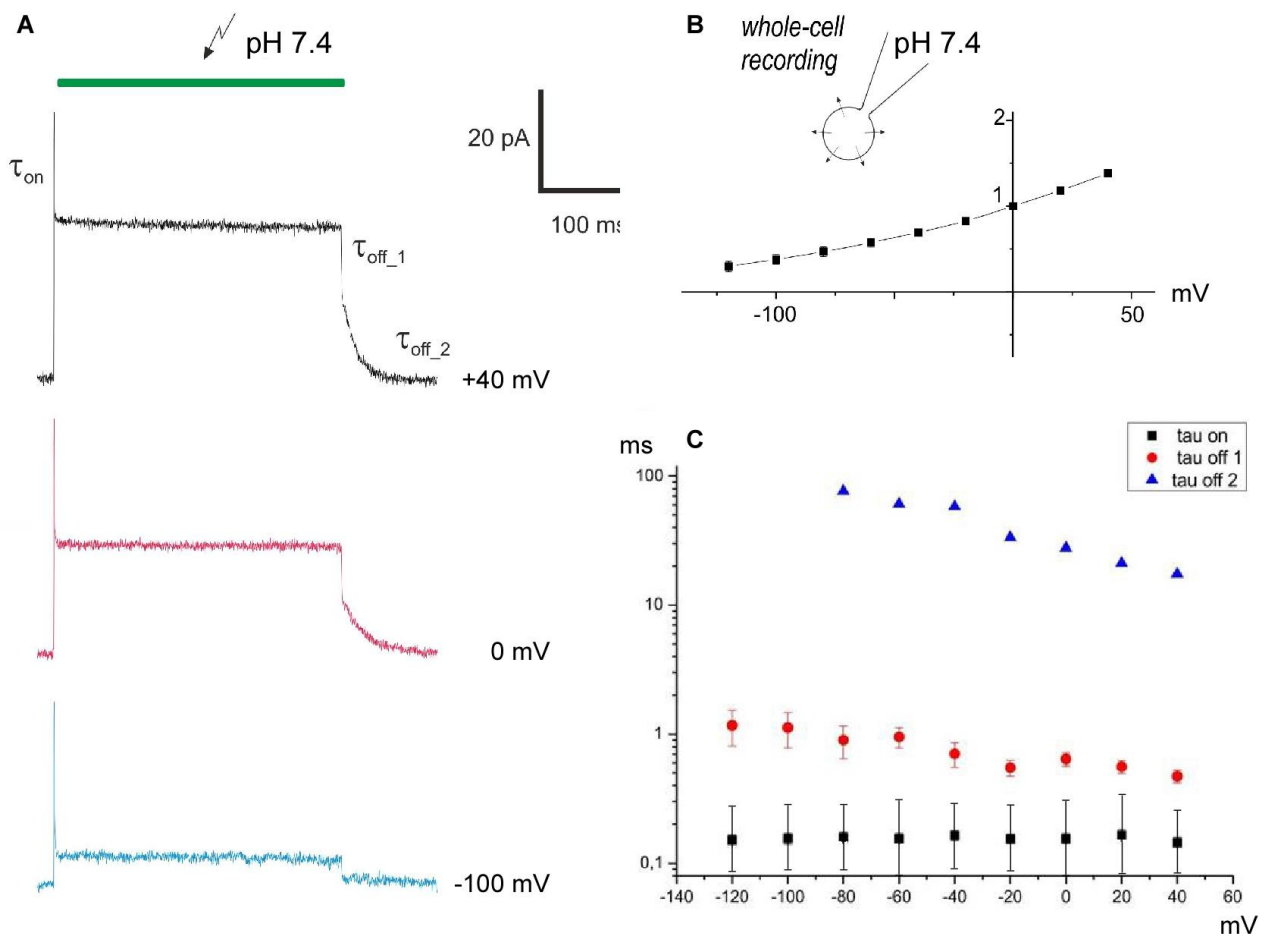
Localization of CarO::YFP in the cytoplasmic membrane was required for the subsequent electrophysiological experiments of this fungal rhodopsin. Regarding the possibility that CarO::YFP was misprocessed in mammal cells, we also proceeded to construct a *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing CarO::YFP (Fig. 41). As HEK293 cells expressed homogeneously membrane-located protein, they were chosen for subsequent experiments.



**Figure 41.** *S. cerevisiae* cells expressing CarO::YFP. **A:** Fluorescence image of a *S.cerevisiae* culture expressing CarO::YFP. **B:** Confocal fluorescence image of a budding cell. CarO::YFP is clearly located in the plasma membrane.

Patch-clamp measurements were performed in the whole-cell configuration in voltage clamp mode. Voltage steps ranging from -100 mV to +40 mV were applied. As fungal rhodopsins are known to receive green light (Idnurm, Verma et al. 2010) we illuminated the cells with green light (561 nm) emitted by a laser diode. Upon light activation CarO evoked an outward directed current, exhibiting the typical behavior of ion-pumping rhodopsin (Fig. 42A, (Ernst, Lodowski et al. 2014)). After a fast rise (transient photocurrent) characterized by a small time constant (measured at 0 mV holding potential and pH 7.4;  $\tau_{on}$   $0.3 \pm 0.1$  ms SD, n=8) the photocurrent

decreased to a positive stationary value. Upon switching off the light the pump current decayed in a biexponential manner exhibiting a fast ( $\tau_{\text{off-1}}$   $1.4 \pm 0.26$  ms SD,  $n=10$ ) and a slower time constant ( $\tau_{\text{off-2}}$   $20 \pm 3.8$  ms SD,  $n=10$ ). While in our system determination of the  $\tau_{\text{on}}$  constant was limited by the opening time of the fast shutter, the closing constants  $\tau_{\text{off-1}}$  and  $\tau_{\text{off-2}}$  were voltage-dependent (Fig. 42C).

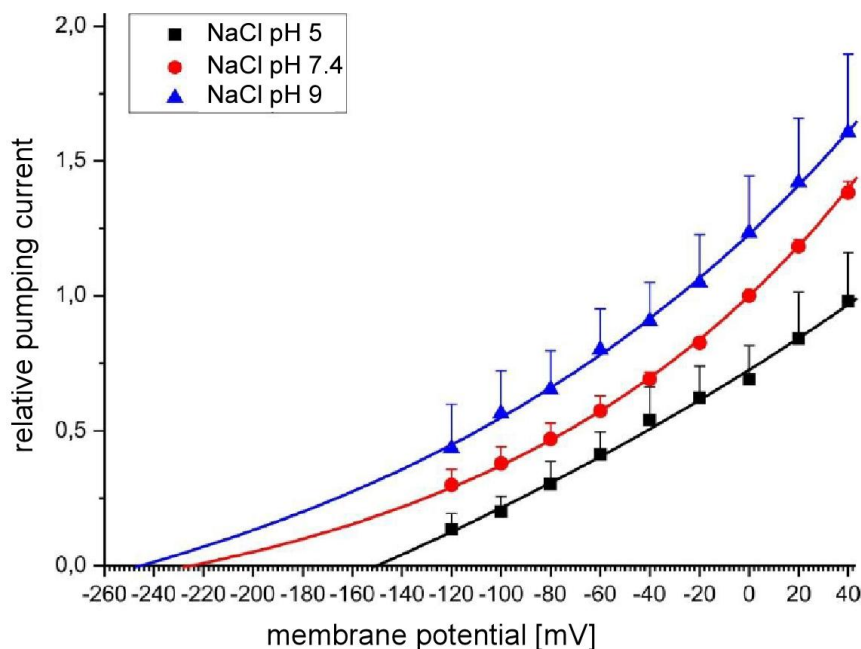


**Figure 42. Electrophysiological analysis of CarO::YFP expressed in HEK293 cells.** **A:** Typical current traces of the ion pump CarO recorded at pH 7.4 at membrane potentials of +40 mV, 0 mV, and -100 mV, respectively, as indicated. Cells were illuminated by a 561 nm diode pumped laser. The green bar represents illumination time. **B:** I-V-relationship of the light-dependent normalized pump current of CarO::YFP measured at pH 7.4 corresponding to data shown in **A**. Note, that activity of CarO is voltage-dependent. **C:** Time constants  $\tau_{\text{on}}$ ,  $\tau_{\text{off-1}}$  and  $\tau_{\text{off-2}}$ .  $\tau_{\text{on}}$  determination is limited by the opening time of the fast shutter (300  $\mu$ s), while closing constants are voltage-dependent. Photocurrent shows a fast rise, followed by a slower biphasic decay.



The photocurrent showed a clear voltage-dependency (Fig. 42B), with larger pump activity at higher membrane potentials. The outward direction of charge transfer remained even when the electrochemical gradient was contrary to the charge-transfer direction (Fig. 42B).

Accordingly, the values for the reversal potentials estimated by nonlinear fit of the I-V-plot (Fig. 43) were much more negative than those calculated by Nernst equation at intracellular pH 7.4 and extracellular pH 5 (-150 mV vs. 139 mV), pH 7.4 (-222 mV vs. 0 mV), and pH 9 (-243 mV vs. -9,3 mV).

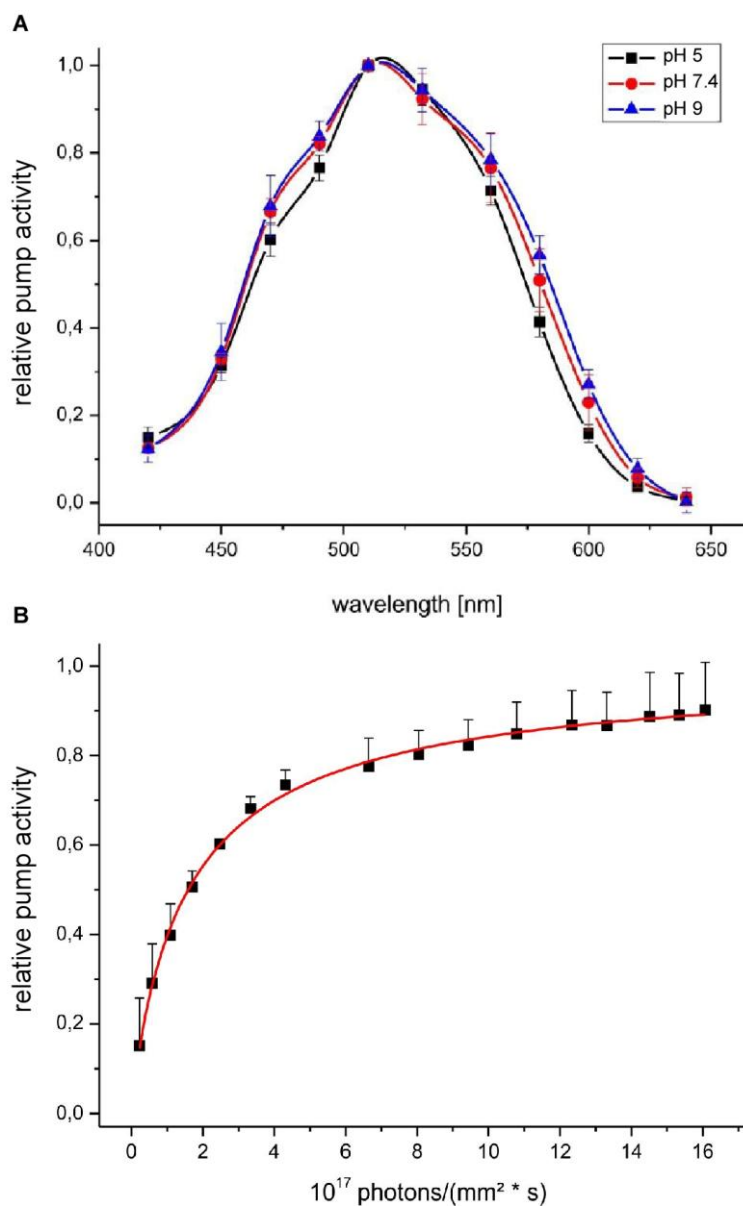


**Figure 43. pH-dependent shift of the reversal potentials.** I-V blot of normalized CarO pump current at different extracellular pHs. The reversal potential was obtained by fitting the data with an exponential growth function, which was extrapolated to give the point of intersection with the abscissae axis.

## 2.2 Effect of light wavelength and intensity on CarO pump activity

The pump activity of fungal rhodopsins depends on the light-wavelength, and according to former studies maximal efficiency is expected after activation with green light. We recorded the pump current at different wavelengths and plotted the data (action spectrum, Fig. 44A). The light emitted by a 150W-xenon lamp was filtered through narrow-band pass filters. At every wavelength the same dose of photons per time and area ( $2 \times 10^{15}$

photons  $s^{-1} mm^{-2}$ ) was used for pump activation. Values were corrected for eventually occurring loss of intensity (reference wavelength 510 nm). The action spectrum was essentially the same at different intracellular proton concentrations (pH 5, 7.4, and 9, Fig. 44A); therefore, for better signal to noise-ratio, pH of internal pipette solution was set to 5. As expected, the pumping activity of CarO::YFP was highly wavelength dependent, with highest activity at around 520 nm (green light).



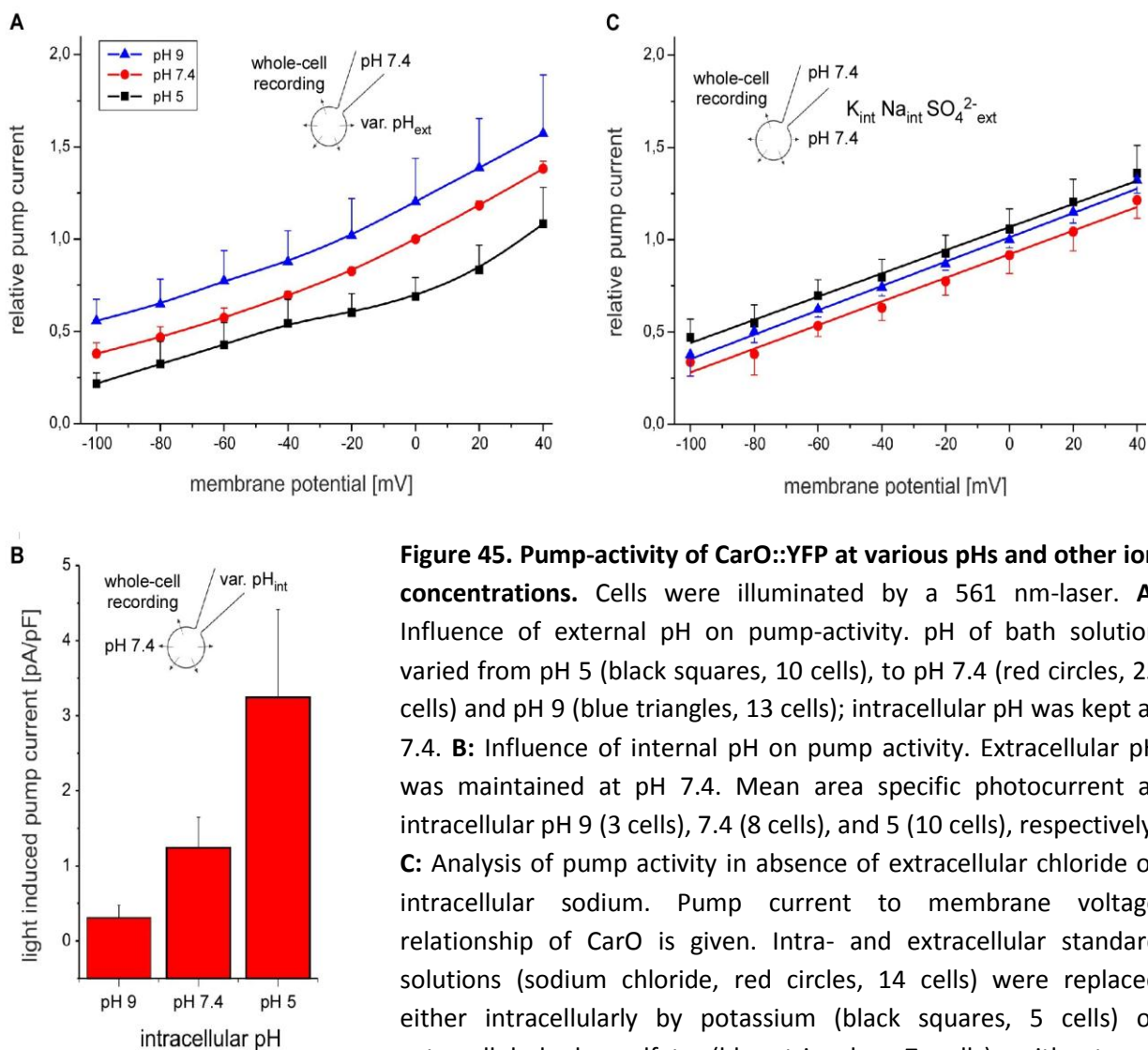
**Figure 44. Light dependency of CarO::YFP. A:** Action spectrum. Effect of light-wavelength on CarO::YFP activity (mean value and standard deviation of 7 cells). The number of photons used for excitation was set to  $2 \times 10^{15}$  photons  $s^{-1} mm^{-2}$ . In order to enhance signal-to-noise ratio, internal pH 5 was used. **B:** Dependency of pump current amplitude on photon density. Mean normalized photocurrent and corresponding standard deviation (5 cells, 3 recordings each). Data were fitted by a Hill function (red curve).

Beside the light wavelength the pump activity also depended on the light intensity. We measured the pump current at 0 mV voltage potential (1 ms illumination time) while varying the photon-density emitted by a 561 nm-DPSS-laser (Fig. 44B). The pump exhibited typical saturation behavior, which could be fitted by means of a standard Hill equation. Half maximal activity was reached at a photon density of  $1.6 \times 10^{17}$  photons  $s^{-1} mm^{-2}$ . For patch-clamp experiments photon density was adjusted to  $2.3 \times 10^{17}$  photons  $s^{-1} mm^{-2}$  providing >60% pump-activity.

### 2.3 Ion specificity of CarO pump activity

Sequence features of CarO suggested a pump function for protons (Fig. 38A, (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004; Avalos and Estrada 2010)). If CarO was an outward directed proton pump, we would expect an increase or decrease in pump activity when the amount of intracellular protons is heightened or diminished, respectively. Therefore, we varied the pH of bath (Fig. 45A) and pipette (Fig. 45B) solution, and investigated the influence of the proton gradient on the pump intensity. When the pH of the bath-solution was reduced from 9 to 5 the mean photocurrent of CarO decreased. This circumstance was more heavily pronounced when the extracellular pH was set to pH 7.4 and the intracellular pH was increased from 5 to 9. As a consequence a remarkable loss in pump activity was observed (Fig. 45B). Some microbial rhodopsins were reported to pump chloride (Bamberg, Tittor et al. 1993) or even sodium (Inoue, Ono et al. 2013) ions instead of protons. To test the possibility of such activities of CarO, we changed the ion composition of either bath or pipette solution and measured the corresponding pump current. When sodium chloride was replaced extracellularly by sodium sulfate or intracellularly by potassium chloride, we could not detect any ion species induced difference in the pump activity (Fig. 45C).

Thus, neither extracellular chloride nor intracellular sodium is required for pump activity, providing further support to CarO as a proton pump.



**Figure 45. Pump-activity of CarO::YFP at various pHs and other ion concentrations.** Cells were illuminated by a 561 nm-laser. **A:** Influence of external pH on pump-activity. pH of bath solution varied from pH 5 (black squares, 10 cells), to pH 7.4 (red circles, 25 cells) and pH 9 (blue triangles, 13 cells); intracellular pH was kept at 7.4. **B:** Influence of internal pH on pump activity. Extracellular pH was maintained at pH 7.4. Mean area specific photocurrent at intracellular pH 9 (3 cells), 7.4 (8 cells), and 5 (10 cells), respectively. **C:** Analysis of pump activity in absence of extracellular chloride or intracellular sodium. Pump current to membrane voltage relationship of CarO is given. Intra- and extracellular standard solutions (sodium chloride, red circles, 14 cells) were replaced either intracellularly by potassium (black squares, 5 cells) or extracellularly by sulfate (blue triangles, 7 cells), without any remarkable effect on pump activity.

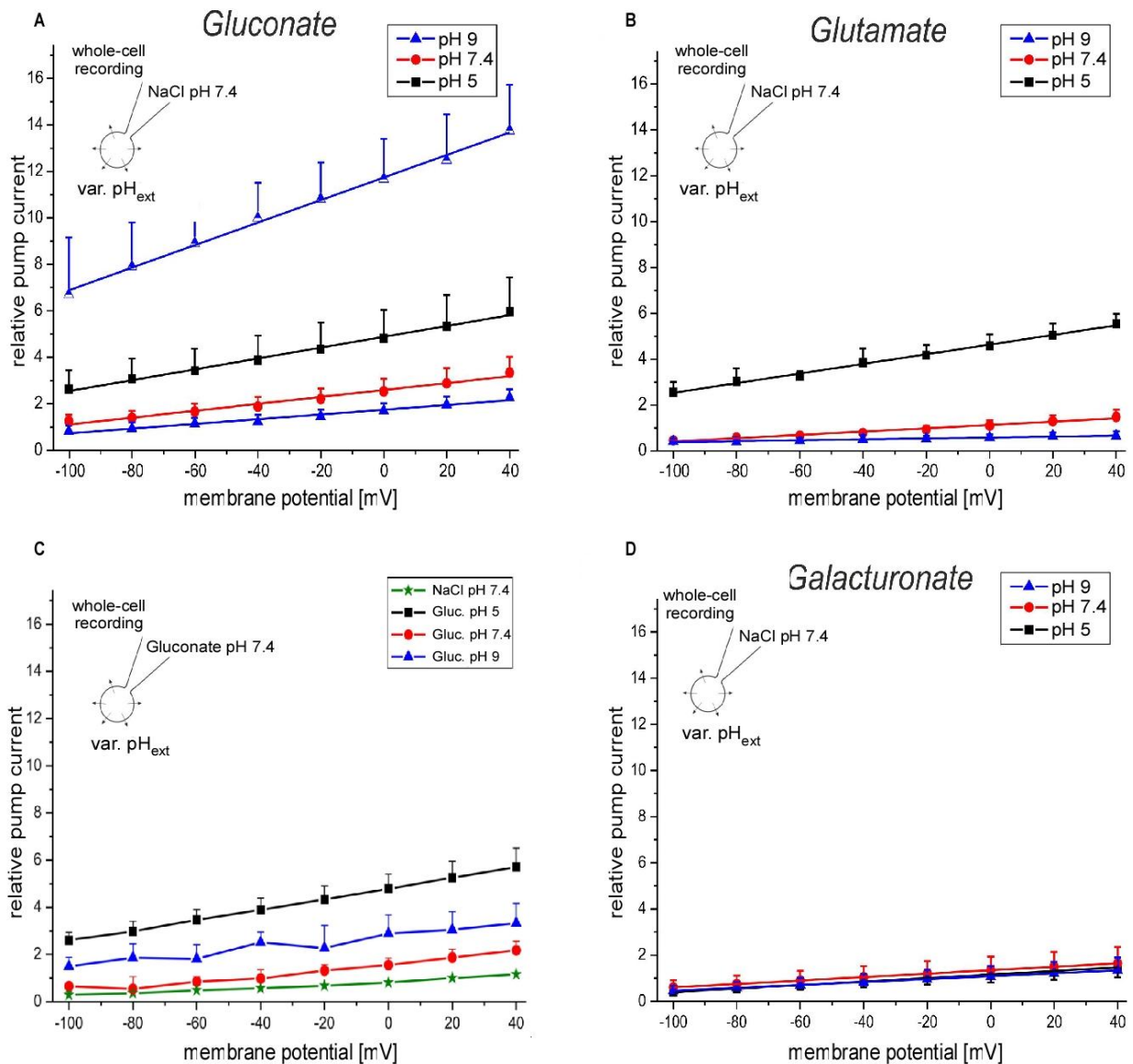
## 2.4 Effect of gluconate on CarO pump activity

Gluconate is one of the standard compounds used in electrophysiological experiments when chloride ions have to be substituted (Walz 2007). Unexpectedly, CarO pump activity was strongly influenced by gluconate (Fig.

46A). Compared to the pump activity in sodium chloride at neutral pH (7.4), in sodium gluconate at extracellular pH 5 the pump activity was about 3 fold enhanced. When the pH was suddenly increased from 5 to 9 a further transient increase (up to ten fold compared to neutral sodium chloride) in pump activity could be observed, which relaxed within 10-15 min. After relaxation the I-V-curve for gluconate pH 9 was similar as for NaCl pH 7.4. In contrast, this transient pH-dependent increase in pump activity was not observed when sodium chloride in the pipette solution was exchanged for sodium gluconate, while at pH 5 and pH 7.4 the pump activity was about the same as with sodium chloride (Fig. 46C).

In addition to gluconate we also tested the activity of CarO in the presence of other weak organic acids. With glutamate (Fig. 46B) the pump activity was noticeably increased at pH 5 compared to pH 7.4. However, no further increase was observed at pH 9; actually, the activity at pH 9 was even reduced compared to neutral pH. In contrast, the behavior of CarO in galacturonic acid (Fig. 46D) did not significantly differ from its behavior in sodium chloride.

Biological role of fungal rhodopsins: The light driven, proton-pumping rhodopsin CarO of *Fusarium fujikuroi* retards germination of light exposed conidia

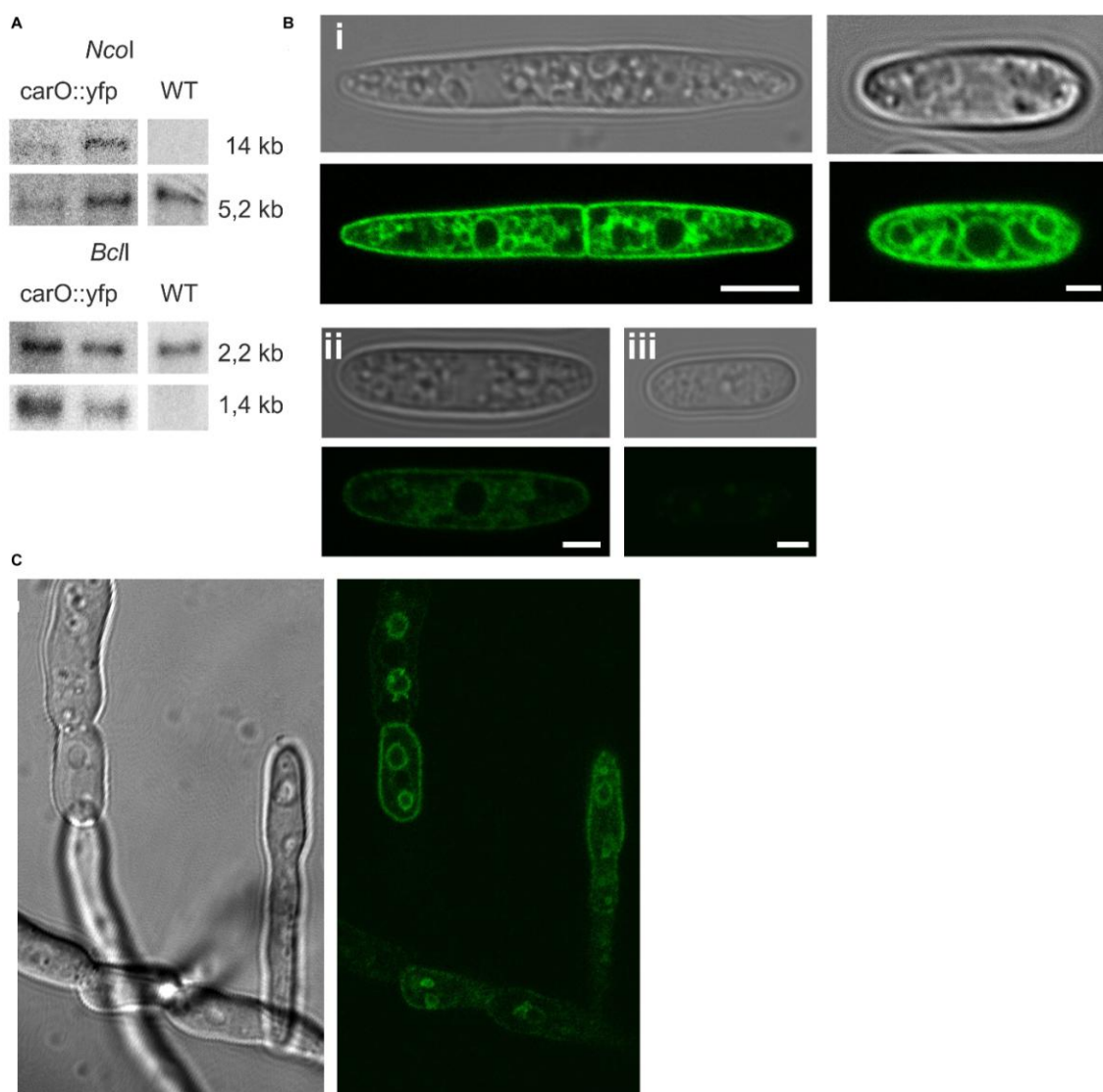


**Figure 46. Influence of weak organic acids on the pump-activity of CarO.** I-V blot of the normalized light-driven pump current (linear fit of mean values and standard deviation of measurements recorded from at least 5 different cells) at pH 5 (black squares), pH 7.4 (red circles) and pH 9 (blue triangles), respectively in extracellular presence of the weak organic acids gluconate (A), glutamate (B), and galacturonate (D). Note that in the presence of gluconate and glutamate at pH 5 the pump activity is enhanced, though the contra-directed gradient is increased. In case of gluconate at pH 9 a transient enhanced pump current (half triangles, upper part of the graph) is observed, which disappears in a time scale of over ten minutes (closed triangles). C: Similar conditions as in A, B and D were chosen, but sodium in pipette solution was substituted by sodium gluconate to test the effect of intracellular gluconate on the pump activity. For all conditions the pump showed similar behavior as before, but the transiently enhanced pump current, which was observed with intracellular sodium chloride (A), was absent.

## 2.5 CarO localisation in *F. fujikuroi*

As a rhodopsin, CarO is supposed to be membrane-located. To gain more insights on its possible biological function, we aimed to find out in which membranes of the *F. fujikuroi* conidia and hyphae CarO is mainly localized. For that reason we generated a *F. fujikuroi* strain expressing the fluorescent *carO::yfp* construct under control of its native light-regulated promoter. Successful transformation of the plasmid by protoplast electroporation and integration of the fusion gene into the *F. fujikuroi* genome was proofed by Southern blot analysis: a single band specific for *carO* was observed in wild type genomic DNA, while an additional band was present in the genomic DNA of the *carO::yfp* transformant (Fig. 47A). A hybridizing band was also found in the *carO::yfp* transformant in a Southern blot with a *yfp*-probe, absent in the wild type sample. Taken together, these results indicate that the *carO::yfp* construct was incorporated into the *F. fujikuroi* genome, but it did not replace the native *carO* gene.

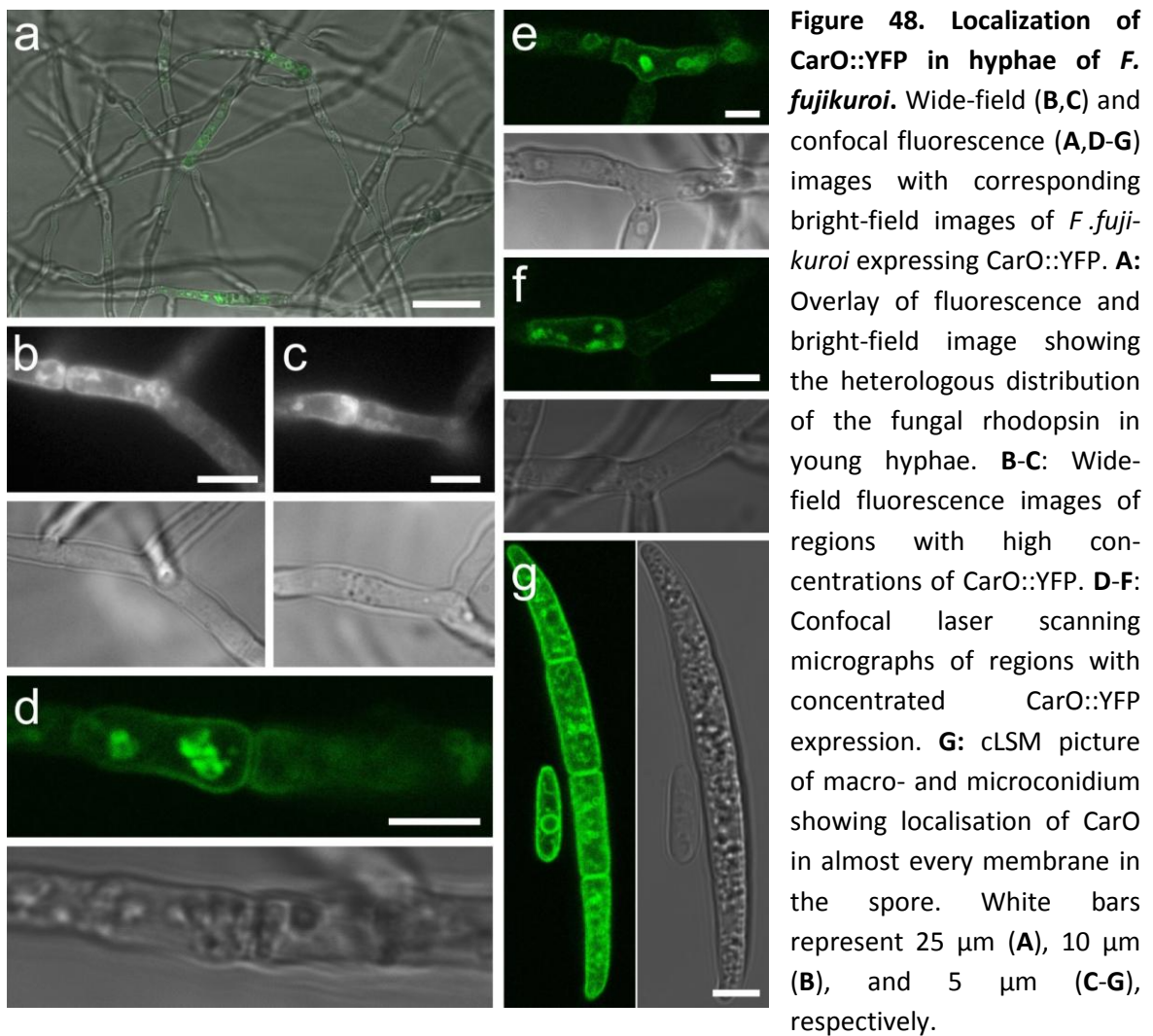
Fluorescence analysis of *F. fujikuroi carO::yfp* conidia and hyphae by confocal laser scanning microscopy confirmed the expression of CarO::YFP. The *carO::yfp* gene expression was controlled by the *carO* promoter, which is upregulated by light (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004). Accordingly, conidia produced by light-grown mycelia (abbreviated hereafter as LG conidia) exhibited strong YFD-mediated fluorescence (Fig. 47B.i), whereas the fluorescence of conidia from dark-grown mycelia (DG conidia) was notably weaker (Fig. 47B.ii). In contrast, only very weak background fluorescence was observed in wild type LG or DG conidia (light- and dark-exposed mycelia; Fig. 47B.iii). CarO::YFP was mainly located in the plasma membrane but it was also present in membranes of inner organelles, possibly corresponding to vacuoles, endoplasmic reticulum, and nuclear envelope (Figs. 47 and 48). Similar distribution was observed when *carO::yfp* cDNA was expressed in other fungal organism, as *S. cerevisiae* (Fig. 47D).



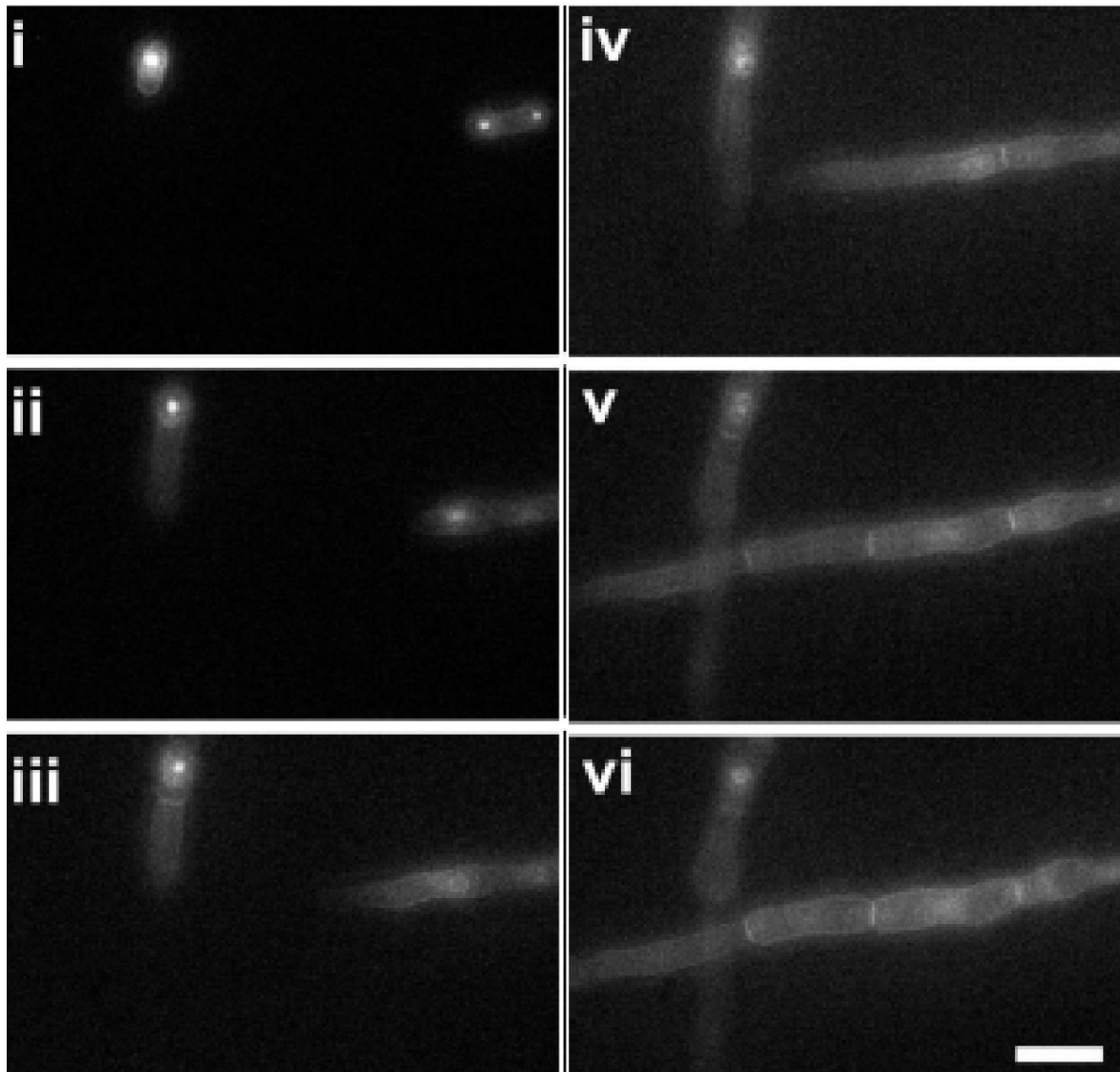
**Figure 47. Localisation of CarO::YFP in *F. fujikuroi*.** **A:** Southern blot analysis of gDNA of *F. fujikuroi* FKMC1995 transformed with pHJA2-*carO::YFP* and selected for hygromycin resistance. DNA samples were digested with *NcoI* or *BclI*. The *carO::yfp* gene was introduced into the fungal genome and the native *carO* gene was not replaced. **B:** Localization of CarO::YFP in *F. fujikuroi* conidia. The CarO::YFP fusion protein is mainly located in the plasma membrane but also in the membranes of inner organelles (vacuole, nucleus, ER). i-iii. Photomicrographs of conidia obtained by transmitted light microscopy (upper row) and corresponding confocal laser scanning microscopy (cLSM; lower row). The expression of *carO::yfp* in the conidia is induced by light. i) Light exposed (left: bicellular, right, monocellular), ii) dark exposed, iii) control (light exposed wild type). White bars represent 5  $\mu\text{m}$  (i) and 2  $\mu\text{m}$  (ii, iii), respectively. **C:** Localization of CarO::YFP in light-exposed *F. fujikuroi* hyphae 20 h after germination. The CarO::YFP fusion protein is heterogeneously distributed in the mycelia, reflecting a dynamic process. White bar represents 5  $\mu\text{m}$ .



The expression of CarO::YFP was also analyzed in young *F. fujikuroi* hyphae (<24h after germination) developed in light or dark, and germinated either from LG or DG. Overall, fluorescence intensity was lower in young mycelia (<24h after germination) than in the conidia (Fig. 49). In general, YFP-mediated fluorescence was more marked in light-grown than in dark-grown hyphae. In dark-grown hyphae the fluorescence was mainly observed in germlings resulting from LG conidia. On the other hand, light-exposed hyphae derived from the germination of DG conidia did also exhibit strong fluorescence.



Interestingly, the signal was not homogeneously distributed in the mycelia (representative example shown in Fig. 47C).



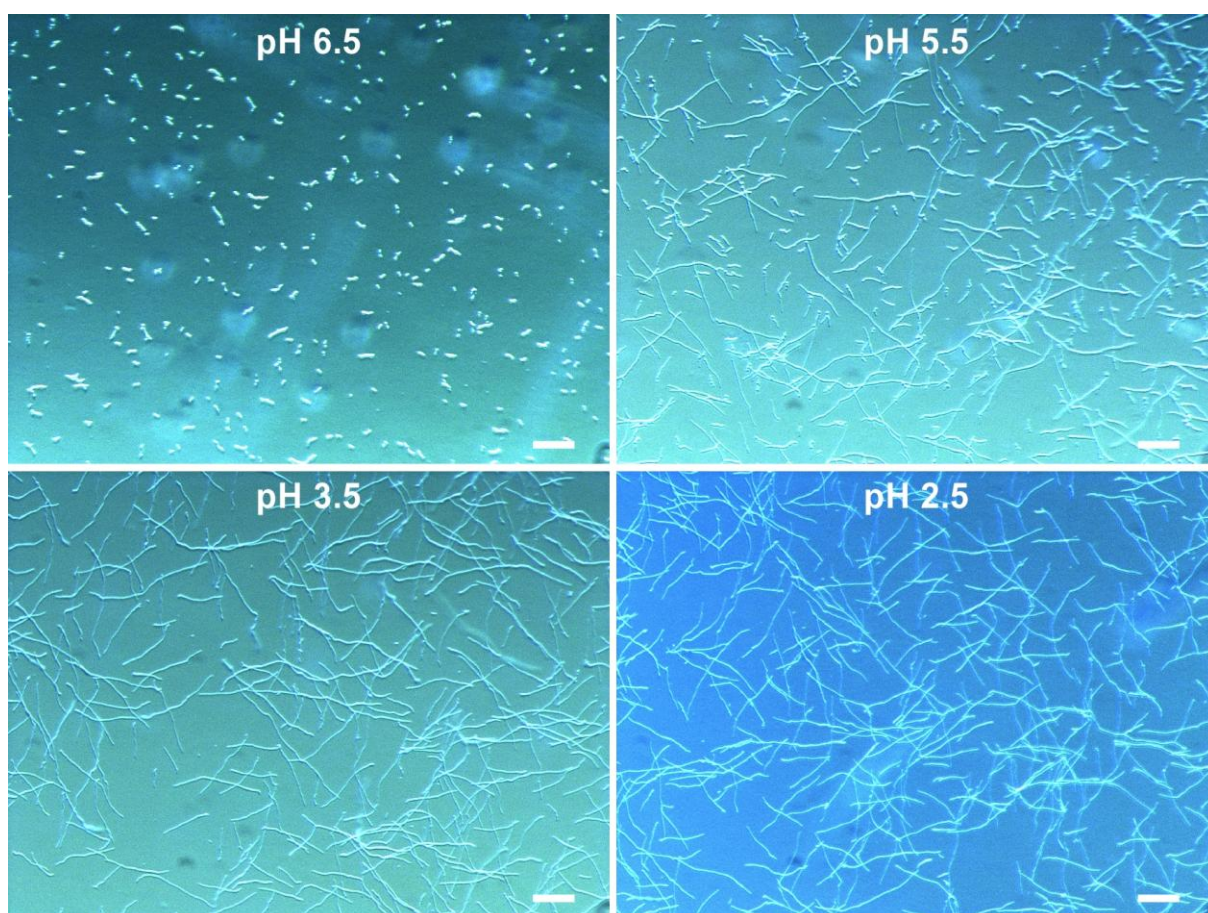
**Figure 49. Time lapse of YFP-localisation in hyphae.** Fluorescence micrographs of germinating conidia of *Fusarium fujikuroi* CarO::YFP at different time points. Pictures were taken 5 (i), 12 (ii), 13½ (iii), 15 (iv), 17½ (v), and 19 (vi) hours after seeding in liquid DG-medium, respectively. Note, that the protein is heterogeneously distributed in the hyphae. However, a highest abundance is observed in the conidia compared to the hyphae. White bar represents 10 μm.

In order to understand this heterogeneous distribution of carO::YFP in hyphae we recorded the fluorescence in young hyphae in the first 18 hours, starting 5 hours after spore seeding. We observed that *carO* is expressed and

trafficked to plasma membrane and septae behind growth regions (ca. 50-100  $\mu\text{m}$  behind the hyphal tip). Furthermore, in certain regions also the fungal vacuoles exhibit strong fluorescence in their membranes (Fig. 49).

## 2.6 Physiological function of CarO

The high expression of CarO in conidia (Fig. 47B) led us to hypothesize that this rhodopsin might play a role in spore viability or germination. We observed that germination of *F. fujikuroi* conidia is supported by low pH (Fig. 50).

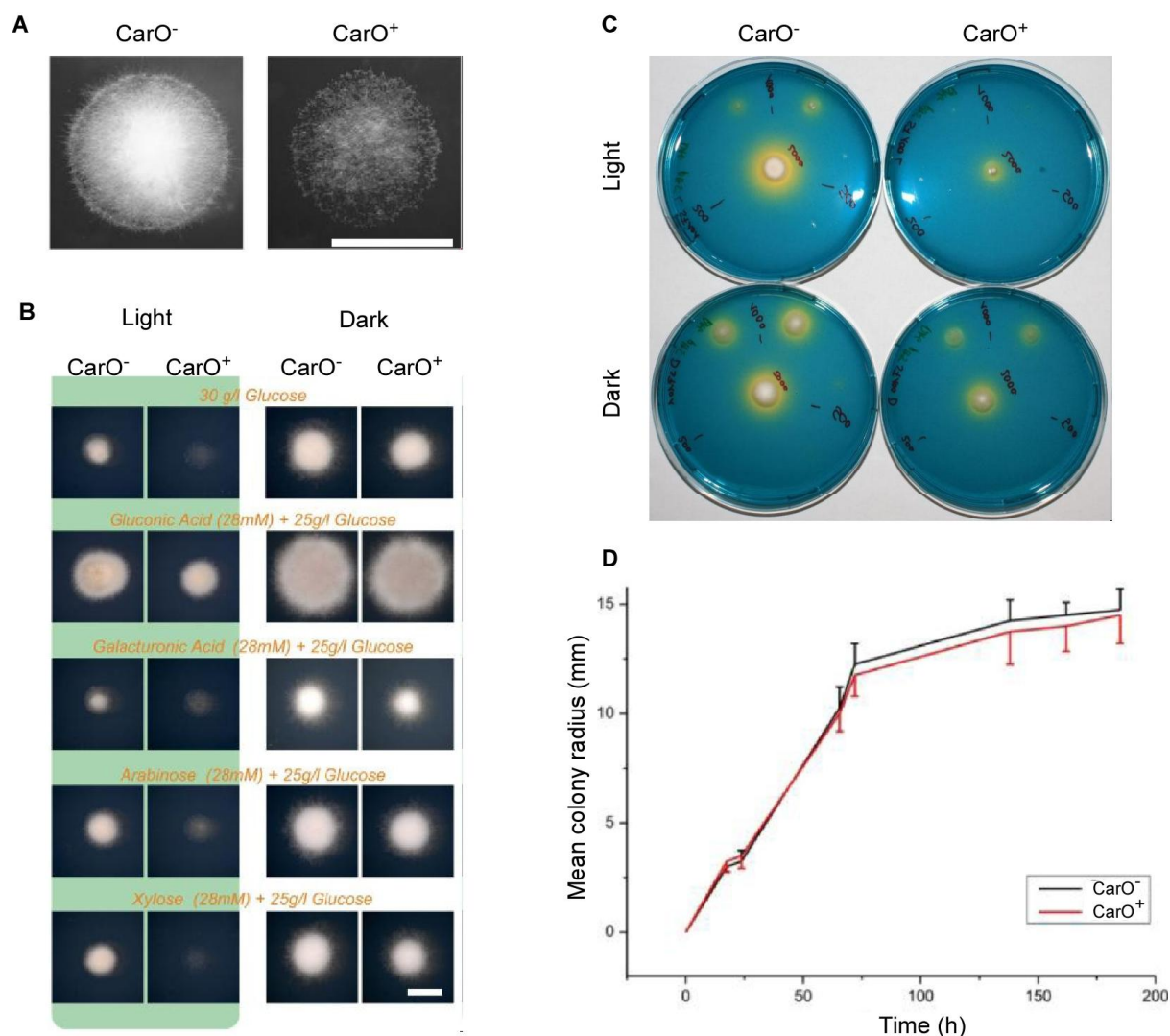


**Figure 50. Low pH supports germination of conidia.** Conidia from *F. fujikuroi* were incubated in DA minimal medium at different pHs. While germination occurred within 15 h after seeding at low pH (2,5 and 3,5), germination was partially (pH 5,5) or almost totally (pH 6,5) hampered by higher pHs. White bar represents 25  $\mu\text{m}$ .

Therefore, we wanted to find out if the proton pump CarO acidifies the medium and thereby supports spore germination. As *carO* expression is up-regulated by light, we compared the effect of light on growth and germination in different conditions of conidia from a strain with a frame shift mutation in the gene *carO* (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004) (CarO<sup>-</sup> strain), in parallel with an isogenic CarO<sup>+</sup> control strain (Fig. 51B). LG conidia were harvested and let to germinate as a spot on solid minimal media with ammonium chloride as nitrogen source and glucose as carbon source in presence and absence of light. In order to test the acidification, we used media supplemented with bromocresol green (Fig. 51C). Obviously, the degree of medium acidification depended on the amount of mycelium, i.e. the size of the colony. Taking this into consideration, we could not detect any clear differences in the acidification patterns between CarO<sup>-</sup> and CarO<sup>+</sup> strains. In another set of experiments, concentrated suspensions of conidia of both strains were grown in the dark and illuminated, and pH of the medium was monitored submerging the pH sensor in the sample. Again, no differences were identified in pH values between both strains. These results suggest that CarO is not significantly involved in the process of medium acidification.

However, when exposed to light, the mycelia of the CarO<sup>-</sup> strain grew faster than those of the CarO<sup>+</sup> control strain in all the tested conditions, while the difference was basically inexistent in darkness. Because of the stimulatory effect of gluconate described above, this organic acid was added in parallel with other carbon compounds, as galacturonic acid, arabinose and xylose. The inhibition under light was especially clear in the standard minimal medium (for detailed inspection, look at Fig. 51A) or upon addition of arabinose or xylose. Interestingly, the presence of gluconate led to a faster growth of the fungus irrespective of the *carO* mutation, making the difference in growth less apparent at the same incubation time (Fig. 51B). The stimulating effect of gluconate on growth speed was particularly noticeable in the dark.

Biological role of fungal rhodopsins: The light driven, proton-pumping rhodopsin CarO of *Fusarium fujikuroi* retards germination of light exposed conidia



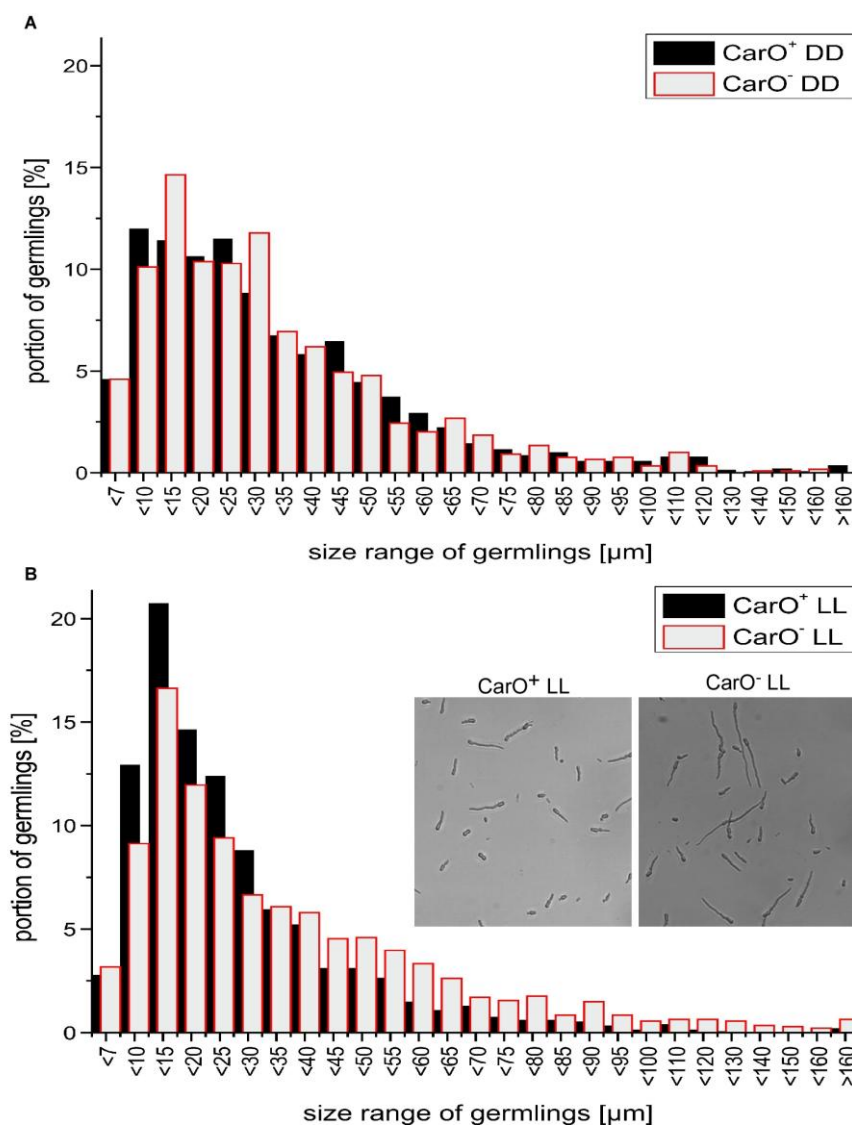
**Figure 51. Colony growth of *F. fujikuroi* CarO<sup>-</sup> and CarO<sup>+</sup> strains in the dark and under light.** **A:** CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains were spotted in standard DA minimal medium ( $10^4$  conidia per drop) and photographed after 2 days incubation under light. White bar represents 4 mm. **B:** Influence of carbon source on colony size. Inoculation was done as described in (A) but in DA media with varying additional carbon sources as indicated. Colonies were growing either in the dark or under light. White bar represents 5 mm. **C:** Visualization of medium acidification during germination of the CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strain. 200, 500, 1000, and 2000 conidia were spotted on DA + gluconate plates supplemented with  $67 \text{ mg l}^{-1}$  bromocresol green. Plates were incubated for 5 days under light at room temperature. As can be clearly seen, the occurrence of colonies strongly depended on the number of spores seeded. Note that for light-grown CarO<sup>-</sup>, 1000 conidia were sufficient for mycelia growth, while colonies were not clearly detectable with LG CarO<sup>+</sup> conidia. In contrast, both types of colonies were visible in the dark. **D:** Linear growth experiments in race tubes. CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains were grown in standard DA minimal medium ( $10^4$  conidia per drop; 11 colonies). Colony length was measured over a period of 9 days.

The inhibiting effect under light became less apparent after more prolonged incubation, suggesting that the effect is achieved at the start of mycelial development, possibly at the level of conidia germination. Therefore we performed linear growth experiments and recorded the differences in colony size between CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> over a period of 9 days (Fig. 51D). LG CarO<sup>-</sup> colonies appeared earlier than LG CarO<sup>+</sup> colonies, but no significant difference could be observed afterwards in the growth rate of both strains. These results support that the differences in the colonies in Fig. 51A are due to differences in the spore to germling transition and not in the subsequent mycelial growth.

Since the difference in growth under light between the CarO<sup>-</sup> and CarO<sup>+</sup> strains was only noticeable in short-term incubations, we wanted to know if CarO photoactivity delays the spore germination or if it slows down germling development. We harvested conidia from CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains and let them to germinate in parallel either in the dark or under illumination. For this purpose the conidia were spread in 24-well plates (3 wells per strain) coated with Poly-D-Lysin and growth of hyphae was documented by microscopy (Fig. 52; 3 pictures/well, data were pooled for analysis).

The size of fresh conidia was similar for CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains irrespective of light exposition of the mycelia (CarO<sup>+</sup> LG  $9 \pm 2.7 \mu\text{m}$ , n=62; CarO<sup>+</sup> DG  $8.3 \pm 2.7 \mu\text{m}$ , n=175; CarO<sup>-</sup> LG  $8.1 \pm 2.9 \mu\text{m}$ , n=224; CarO<sup>-</sup> DG  $7.5 \pm 3 \mu\text{m}$ , n=231). Germlings produced by conidia from LG mycelia exhibited faster growth than those from DG mycelia. When conidia from DG mycelia were used in germination experiments, after 12 hours there was no clear difference in size of hyphae between CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains, but light exposed conidia (CarO<sup>+</sup> mean length  $23.2 \mu\text{m}$ , n=1147 vs. CarO<sup>-</sup>  $25 \mu\text{m}$ , n=1225) germinated slower than dark exposed conidia (CarO<sup>+</sup>  $31.9 \mu\text{m}$ , n=1392 vs. CarO<sup>-</sup>  $30.4 \mu\text{m}$ , n=1196).

The same effect was observed with spores from LG mycelia. In contrast to the former ones, the latter revealed clear differences between CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains. CarO<sup>+</sup> germlings exhibited smaller size than CarO<sup>-</sup> germlings (light exposed: 25.5  $\mu\text{m}$ , n=1476 vs. 34.4  $\mu\text{m}$ , n=1413; dark exposed: 31.9  $\mu\text{m}$ , n=1253 vs. 39.5  $\mu\text{m}$ , n=1168, respectively). The variance of hyphal length was quite high. In the same field of view we could find conidia <7  $\mu\text{m}$  and hyphae >160  $\mu\text{m}$ . However, the distribution of germling lengths differed between CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains and longer hyphae were found in CarO<sup>-</sup> strain (Fig. 52).



**Figure 52. Influence of CarO on conidia germination.** Conidia from light and dark exposed mycelia of the CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains were seeded in liquid DA media adjusted to pH 5 and germination was observed. Data from one single representative experiment are shown, but similar results were obtained in four independent experiments. **A:** Length of germlings of CarO<sup>+</sup> DD (n=1392) and CarO<sup>-</sup> DD (n=1196) conidia as indicated. Only slight difference was observed between both strains incubated in the dark. **B:** Length of germlings of CarO<sup>+</sup> LL (n=1476) and CarO<sup>-</sup> LL (n=1413) conidia as indicated. The percentage of germlings >40  $\mu\text{m}$  is higher in CarO<sup>-</sup> LL than in CarO<sup>+</sup> LL, while the opposite was found for germlings <30  $\mu\text{m}$ . In the upper part of the graph, we show representative images of light exposed strains.

We also analyzed the spore germination rate after 9 hours and found that the percentage of germinated conidia (>10 $\mu$ m) was almost double for CarO<sup>-</sup> strain (64.9%) than for CarO<sup>+</sup> strain (34.2%). Taking all data together, the results suggest a faster germination of CarO<sup>-</sup> conidia under light compared to those of the control CarO<sup>+</sup> strain.

Another possible role for a proton pump as CarO is contributing to the acidification of fungal environment. It is well known that pH is regulated during plant invasion by many fungi (Prusky and Yakoby 2003). We decided to check whether CarO<sup>-</sup> strains were impaired in its capability to invade plant fruit tissues. For that purpose, we obtained fresh conidia from CarO<sup>-</sup>, CarO<sup>+</sup>, FKMC1995 (wild type), SF134 (CarS mutant, carotenoids overproducer) and SF223 (OpsA<sup>-</sup>). In sterility conditions, apple slices were cut, inoculated with 2.5x10<sup>5</sup> conidia from each strain and incubated during 4 days (Fig. 53). No differences were observed between the different strains, suggesting that rhodopsins are not involved in plant tissue invasion in *F. fujikuroi*.



**Figure 53. Plant tissue colonization.** Apples were cleaned with soap and water, and washed with distilled water. Slices (0.8 cm width) were cut with a sterile scalpel and placed in sterile Petri dishes. For inoculation, 5  $\mu$ l of a 5x10<sup>7</sup> conidia ml<sup>-1</sup> suspension were drop on the surface of the slice. Slices were incubated for 4 days under 100% humidity at 30°C in the dark or light. No obvious difference in growth was observed between the different strains. SF223 strain [obtained by Estrada and Avalos (Estrada and Avalos 2009)] was OpsA<sup>-</sup> and SF134 was a CarS mutant (Estrada and Avalos 2009).



### 3. Discussion

Fungal rhodopsins are widespread in the fungal kingdom (Brown 2004; Idnurm, Verma et al. 2010), but their biological functions, particularly how their light-dependent functions affect fungal growth and physiology, remain unknown. In this chapter we investigate the possible biological role of the auxiliary ORP-like rhodopsin CarO of the filamentous fungus *F. fujikuroi*. For this purpose, we used three different experimental approaches (a) the study of pump activity of heterologously expressed CarO through patch-clamp experiments, (b) the identification of *in vivo* location of YFP-tagged CarO, and (c) the phenotypic comparison of a targeted CarO<sup>-</sup> mutant and an isogenic CarO<sup>+</sup> strain. Taken together, the results provide solid clues on a possible role of CarO as a proton pump associated to germination of conidia. Beside this role, CarO may also participate in the maintenance of the proton gradient, which is used for nutrient uptake. Typically, an H<sup>+</sup>-ATPase is responsible for the maintenance of this gradient (Hesse, Ruijter et al. 2002). Thus, a light-driven pump would save energy contributing to this task.

A first goal was to determine if CarO is an ion pump rather than a photosensor, as strongly suggested by the conservation of residues needed for proton pumping in other rhodopsins (Fig. 38). While pumps must have rather fast photochemical cycles to maintain transmembrane ion gradients, the photosensors are characterized by their relatively slow turnover-rates, which allow the signaling states for efficient interaction with their transducers. The photocycle of CarO has not been investigated, but recently the photocycle of another auxiliary ORP-like rhodopsin, PhaeoRD2 from *Phaeosphaeria nodorum*, was analysed in detail (Fan, Solomon et al. 2011). This fungal rhodopsin exhibits a very fast photocycle, hence providing support to a role of auxiliary ORP-like rhodopsins as proton pumps. However, to our knowledge, no electrophysiology studies are available on auxiliary ORP-like rhodopsins.

To facilitate the generation of reliable electrophysiological data, we carried out patch-clamp experiments in mammalian cells expressing

CarO::YFP. This method has advantages on the use of fungal protoplasts. *F. fujikuroi* protoplasts are only obtained in a narrow time window, about 12 hours after inoculation, and digestion efficiency strongly depends on quality of cell wall lytic enzymes and growth rate, while patch-clamp experiments require clean membrane surfaces, special perfusion chambers, and highly experienced experimenters (Garrill and Davies 1994; Terpitz, Raimunda et al. 2008; Terpitz, Letschert et al. 2012). In contrast, the use of a stable CarO::YFP-expressing mammal cell line allowed us to record abundant and reproducible data. The fusion protein was sufficiently expressed, targeted to plasma membranes, and therefore accessible by the patch-clamp pipette. Considering that the expression pattern was similar in *F. fujikuroi* hyphae, baker yeast, and HEK293 cells (Fig. 40 and fig. 47), we expect the same biochemical activity for the protein in different eukaryotic host systems, as was shown in former reports on other microbial rhodopsins (Nagel, Mockel et al. 1995; Terpitz, Raimunda et al. 2008; Ernst, Lodowski et al. 2014).

Our results provide solid support to the activity of the ORP-like rhodopsin CarO as an outwardly directed, light-driven proton pump. CarO was activated by green light and exhibited maximal activity at around 520 nm (Fig. 44A). The action spectrum showed a bell shape, similar to that found for other microbial rhodopsins in previous electrophysiological investigations (Nagel, Szellas et al. 2003; Kleinlogel, Terpitz et al. 2011). The reversal potentials, estimated by nonlinear fit of the respective I-V-curves, were clearly shifted to negative values when compared with the values calculated for passive transport by Nernst equation, and therefore an active ion transport occurred against the electrochemical gradient. Outward directed light-induced pump current rose with increasing proton gradient, a result consistent with the fact of protons as the transported ion species (Fig. 45A and B). Furthermore, neither chloride nor sodium ions were required for pump activity (Fig.45C), thus narrowing down transportable ion species to protons.

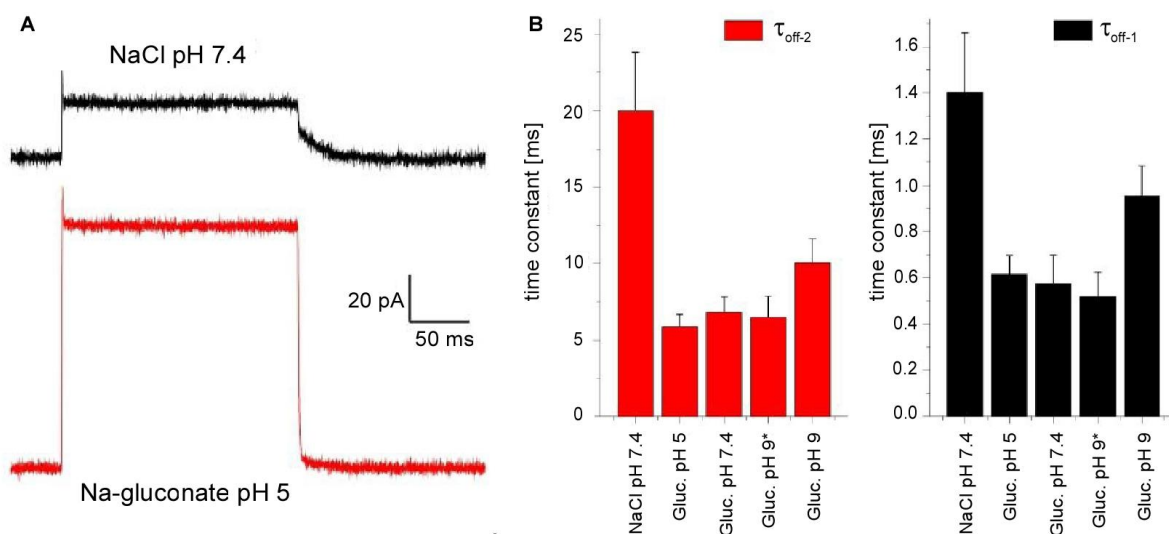
In general, CarO pump characteristics were similar to those described for BR. As observed for BR and other microbial proton pumps (Nagel, Mockel

et al. 1995), pump activity increased with rising membrane potentials. In BR this voltage-dependent behavior is due to the M decay, which is slowed down at negative membrane potentials, and represents the rate-limiting step of the pump cycle (Geibel, Lorinczi et al. 2013). Our data on CarO reflect a similar situation, as the photocurrent of CarO decayed in a biexponential manner upon switching off the light. While the fast closing time constant  $\tau_{\text{off-1}}$  of CarO at 0 mV ( $1.4 \pm 0.26$  ms, 13 cells) was in the same range with BR [1-2 ms (Geibel, Lorinczi et al. 2013)], the slow closing time constant ( $\tau_{\text{off-2}}$ ) was smaller in CarO ( $20 \pm 3.8$  ms) than in BR ( $27.2 \pm 2.2$  ms). Furthermore, we observed that the  $\tau_{\text{off-2}}$  was voltage-dependent with highest values at negative membrane potentials. In our system the rise time constant ( $0.3 \pm 0.1$  ms) was limited by the opening time of the fast shutter (around 300  $\mu$ s). Thus we could not determine if CarO is activated more rapidly than BR, but the whole CarO photocycle was faster than that of BR, a result that fits flash-photolysis data from the auxiliary ORP-like Rhodopsin PhaeoRD2 (Fan, Solomon et al. 2011). In PhaeoRD2 deprotonation of the Schiff base occurred very fast, resulting in reduced accumulation of the late red-shifted intermediate, and thus in a very fast photocycle. Fast photocycling of CarO is also supported by the observation that, in comparison to other rhodopsins, pump function saturated at very high light intensities (half maximal activity at  $1.6 \times 10^{17}$  photons  $\text{s}^{-1} \text{mm}^{-2}$ ; 561 nm; Fig. 44B).

While CarO behaved as a typical proton pump when the bath solution was based on the anions chloride, sulfate, or galacturonate, atypical behavior was observed in the presence of the weak organic acids (WOAs) gluconate or glutamate (Fig. 46). In this case the outward directed current was increased at pH 5 compared to neutral pH. At first glance, this is a very surprising result, as the pump worked against the proton gradient; hence, we would expect better pump function at pH 7.4. This may suggest that CarO possesses additional anion pump functions besides its proton pump ability, i.e. gluconate and glutamate could be transferred into the cell. However, the pump activity was similar independently of the intracellular presence of

gluconate (Fig. 46C), though the gradient was considerably changed, therefore contradicting this hypothesis. A more reliable explanation could be inferred from the proton transfer mechanism of BR and other microbial rhodopsins. Once the proton has been transferred from the Schiff base to the proton acceptor BR-D85, it is guided to the extracellular space via a cascade of proton acceptors with different pKas to the well conserved proton releasing site (Dencher, Sass et al. 2000; Lanyi 2006). A fast pumping activity is expected to generate a “proton traffic jam”, which occurs when many other protons surround the releasing site and thus slow down proton liberation to the extracellular medium (Kikukawa, Toamogami et al. 2012). The substances producing enhanced CarO pump activity exhibit pKa values around 4 (sodium gluconate pKa 3.86, sodium glutamate second pKa 4.07). Thus, at pH 5 those WOAs may act as buffers, supporting the release of protons from the pumping CarO protein. This would avoid proton traffic jam, and would lead to a faster photocycle and thus to more efficient pump activity, as indicated by smaller time constants (Fig. 54) and higher current amplitudes (Fig. 46).

Among the investigated WOAs, gluconate exhibited an additional extraordinary effect in response to pH change. When the protein had been subjected to gluconate solution at pH 5 and the pH gradient was turned to pH 9, the pump activity transiently increased to about 10-fold of the pump intensity in standard bath solution. Seemingly the supporting activity of gluconate transiently remained at pH 9, which in turn resulted - now in combination with the driving force of the outward directed proton gradient - in a temporary faster photocycle (Fig. 54). Within a time scale of about 10 minutes the supporting effect of gluconate disappeared, as the pump intensity was in a similar range as observed in standard bath solution.



**Figure 54. Pump characteristics of CarO in presence of gluconate.** **A:** Typical whole cell measurement of CarO::YFP at 0 mV in whole cell configuration. Note that the pump current in presence of extracellular sodium gluconate pH5 is enhanced 4-5 fold compared to standard conditions, though the proton gradient is acting against the pump activity. **B:** Mean and standard deviation of the time constants describing the bi-exponential current decay after switching off the light for NaCl pH 7.4 (n=11), gluconate pH 5 (n=6), gluconate pH 7.4 (n=7), gluconate pH 9 directly after pH jump (\*, n=5) and 10 min after (n=4) the pH-jump. Small time constants result in increased pump activity. At pH 9 we observed a transient increase in pump activity, which is accompanied by small time constants at pH 9\*. After several minutes the pump current relaxes to less intense currents, which is also seen in the increase of the time constants.

Strong pH-dependency of the photocycle was also observed in the related auxiliary ORP-like rhodopsin PhaeoRD2, where the photocycle was considerably faster at pH 5 than at neutral or basic pH (Fan, Solomon et al. 2011). Auxiliary ORP-like rhodopsins are presumed to interact with transducer proteins (Fan, Solomon et al. 2011). So, we may also speculate that gluconate could affect CarO conformation, or its interaction capacity. Interestingly gluconate does not only influence the pump activity of CarO: its presence results in a remarkable stimulation of mycelial growth of *F. fujikuroi* on solid medium (Fig.51B). This behavior is independent of the presence of a functional CarO protein and it is also noticeable in the dark, and therefore has no connection with the stimulatory effect of gluconate on CarO pump activity. The ecological relevance of gluconate in the *F. fujikuroi* natural habitat is not

clear. The *bakanae* disease is seed born and it is known that root associated bacteria produce gluconic acid (Rodríguez, González et al. 2004). Such bacteria were present in ten different rice root samples (Hardoim, Andreote et al. 2011), thus this compound might play a role as a chemical attractant supporting fungal growth.

Under standard laboratory conditions no visible phenotype was observed for the CarO<sup>-</sup> mutant (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004). Our fluorescence assays (Fig. 47, fig. 48 and fig. 49) with a CarO::YFP fusion protein expressed under control of the *carO* promoter showed that the protein is accumulated mainly in conidia produced by light-exposed mycelia and predominantly in the cytoplasmic membrane. In young hyphae the expression was rather irregular, with higher amounts in particular locations, and highly dynamic, with fluorescence appearing transiently in the cytoplasmic membrane in regions behind the hyphal tip and septae, or in the vacuoles. Since the protein is located not only in plasma membrane but also in inner organelles, CarO might be involved in pH dependent signaling and pH homeostasis (Bagar, Altenbach et al. 2009). So, CarO activity could provoke external and internal changes in pH, predictably affecting hyphal development. Proton-gradients were reported to be involved in cell polarity pH-gradient based cell polarity (Hesse, Ruijter et al. 2002; Bagar, Altenbach et al. 2009; Valkonen, Penttila et al. 2014). However, the prevalence of CarO in the conidia suggests that it might play a role in germination, possibly through the generation of a proton gradient. In support to this hypothesis, under certain culture conditions the formation of mycelia from conidial spots on the agar surface was delayed by illumination in minimal medium with ammonium chloride; this effect was mitigated in the absence of a functional CarO protein (Fig. 51A and B). It is known that ambient pH stress reduces spore germination rates and germ tube lengths in the phytopathogen *Penicillium expansum* (Li, Lai et al. 2010). It seems plausible that CarO may play a role in fungal pathogenesis and/or plant interaction.

**Table 5. Fungi with ORP-like rhodopsins and their role in phytopathology.**

SPECIES	DATABASE ENTRY	PHYTOPHAT./ENDOPHYT
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	keq66642, keq73330, keq61603	(+)
<i>Aureobasidium pullans</i>	keq89333, keq89333	(+)
<i>Aureobasidium subglaciale</i>	keq96811	(+)
<i>Baudoinia compniacensis</i>	xp007674357	Saprophytic
<i>Bipolaris maydis</i>	emd90083	+
<i>Bipolaris oryzae</i>	xp007685632	+
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	xp007698250	+
<i>Bipolaris victoriae</i>	eun31652	+
<i>Bipolaris zeicola</i>	xp007712526	+
<i>Botrytis cinerea</i>	xp001547284	+
<i>Capronia coronata</i>	xp007719813	(+)
<i>Cladophialophora yegresii</i>	xp007758501	+
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	xp007591714	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	xp007287120	+
<i>Coniosporium apollinis</i>	eon66253	rock inhabiting
<i>Cyphellophora europaea</i>	ETN45976	+
<i>Dothistroma septosporum</i>	eme38958, eme42627	+
<i>Eutypa lata</i>	xp007798926	+
<i>Exophiala aquamarina</i>	KEF61142	fish path
<i>Exophiala dermatitidis</i>	EHY58312, ehy54696	human path
<i>Fusarium fujikuroi</i>	CAD97459	+
<i>Fusarium graminearum</i>	ESU10217	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	FOVG17056	+
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	EKJ77664	+
<i>Fusarium verticilloides</i>	FVEG10716	+
<i>Glarea lozoyensis</i>	xp008088280, ehk97458	? (+)
<i>Leptosphaeria maculans</i>	xp003838475	+
<i>Marssonina brunnea</i>	xp007288546	+
<i>Nectria haematococca</i>	xp003042779	+
<i>Neofusicoccum parvum</i>	xp007586513	+
<i>Penicillium oxalicum</i>	EPS29498	+
<i>Pestalotiopsis fici</i>	xp007841943	+
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	xp001791031	+
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	xp 007922601, xp007927292	+
<i>Pyrenophora teres</i>	xp003299029	+
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	xp001937696	+
<i>Sclerotinia borealis</i>	ESZ89976	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	xp001594532	+
<i>Setosphaeria turcica</i>	xp008030750	+
<i>Spaerulina musiva</i>	emf08052	+
<i>Verticillium dahliae</i>	EGY21409	+

It is suggestive that green light should be predominant in internal tissues of thin aerial plant structures, filtered by chlorophyll. Furthermore, phytopathogenic ascomycetes frequently possess several fungal rhodopsins including a CarO counterpart, with highly conserved pumping residues, while some well-known non-pathogenic fungal models, as *Neurospora crassa*, do not (Table 5). Moreover, the vast majority of fungi with ORP-like rhodopsin orthologues in their genome are either plant pathogens or endophytes.

Our plant tissue invasion assays in apple (Fig. 53) revealed no significant difference between the CarO<sup>+</sup> and CarO<sup>-</sup> strains, but situation might be different in rice, its natural host. The use of xylose and other sugars for the drop experiments shown in figure 51A was due to the fact that these compounds are part of the plant cell wall. CarO activity is not stimulated in the presence of these compounds, suggesting that CarO is not playing a role in host sensing by the fungus. A pH regulatory network mediated by the specific transcription factor PacC plays a decisive role in phytopathogenesis by *Fusarium oxysporum* (Caracuel, Roncero et al. 2003), and a similar PacC protein is involved in pH control of transcriptional regulation in *F. fujikuroi* (Wiemann, Willmann et al. 2009). A possible connection between CarO activity and PacC regulation and/or phytopathogenesis cannot be discarded, and should be object of future investigation in more suitable phytopathogenic models, e.g. *F. oxysporum*.

#### 4. Conclusion

The ORP-like fungal rhodopsin CarO from the filamentous fungus *F. fujikuroi* is a functional green-light driven proton pump, which is highly accumulated in the cytoplasmic membrane of conidia. In the presence of ammonium chloride, the CarO deficient strain exhibited a faster germination under light compared to the control strain. This represents the first relevant phenotypic alteration observed for a rhodopsin mutant in a fungus. CarO orthologues are predominant in phytopathogenic fungi, which inhabit niches



where green light might be particularly abundant. CarO provides a fast photocycle, saturates at high light intensities and can enhance the proton gradient used for nutrient supply, thus provides optimal features to save energy in the light. A potential role of this protein in phytopathogenesis remains to be investigated.



**DISCUSIÓN GENERAL**

**GENERAL DISCUSSION**



## 1. General Discussion

*Fusarium fujikuroi* is an interesting experimental model for several reasons. First, it is methodologically easy to handle in the laboratory, mutants are readily obtained by standard mutagenesis procedures (Avalos, Casadesús et al. 1985) and it exhibits high rates of homologous recombination that make it amenable for targeted transformation experiments (Fernández-Martín, Cerdá-Olmedo et al. 2000). From the biological point of view, its major interest derives from its capacity to produce a vast array of secondary metabolites and the possible connections of this chemical versatility with its role as plant pathogen. Moreover, some of the different compounds produced by this fungus (Avalos, Cerdá-Olmedo et al. 2007) have applications in the pharmaceutical or food industries (Rademacher 1997; Castillo, Fernández et al. 2005).

In chemical terms, all major secondary metabolites produced by *F. fujikuroi* derive from a common precursor, acetyl-CoA, implying sophisticated spatial and temporal regulatory mechanisms. Thus, some classes of terpenoids are produced in different cellular compartments (e.g., carotenoids and gibberellins, (Domenech, Giordano et al. 1996)), others are produced in different growth stages or are typically regulated by different environmental signals, as temperature, pH, aeration or the presence of nitrogen or carbon sources in the culture medium (Giordano and Domenech 1999b; Wiemann, Brown et al. 2010; Niehaus, Kleigrewé et al. 2013). The group where this work has been carried out has paid special attention to the regulation of secondary metabolism in *F. fujikuroi*. The identification of gene clusters for the biosyntheses of different metabolites, as fusarins (Niehaus, Kleigrewé et al. 2013), bikaverins (Wiemann, Willmann et al. 2009), carotenoids (Avalos, Díaz-Sánchez et al. 2014) and gibberellins (Tudzynski 2005), has facilitated the investigation of the mechanisms that control their expression.

This Thesis has paid attention to mechanisms underlying two major regulatory signals in *F. fujikuroi* biology: stress conditions and light. In the

first chapter, the attention was focused on the role of cAMP, a regulatory signal widespread in all taxonomic groups. The cAMP producing enzyme, adenylyl cyclase, is a large protein usually coded by a single long gene (Lee, D'Souza et al. 2003), found to play relevant roles in fungal growth, development and pathogenesis (Adachi and Hamer 1998; Liebmann, Muller et al. 2004; Kohut, Olah et al. 2010). Taking advantage of the easy generation of null mutants by targeted gene disruption, we investigated the effect of the mutational loss of the adenylyl cyclase gene of *F. fujikuroi*, that we called *acyA*. As expected, the mutation resulted in a pleiotropic phenotype, which included alterations in growth and conidiation. The reduced growth is a typical feature of other equivalent fungal mutants, as those of *N. crassa* (Rosenberg and Pall 1979) and *T. atroviridae* (Zeilinger, Reithner et al. 2005). Loss of virulence is other common characteristic of these mutants. E.g. adenylyl cyclase mutants of *T. atroviridae* lost their mycoparasitic behaviour (Zeilinger, Reithner et al. 2005), and similar results were obtained for *B. cinerea* lacking BAC adenylyl cyclase (Klimpel, Gronover et al. 2002). Also, the *M. grisea*, *mac1* gene is needed for apresoria formation during plant penetration (Adachi and Hamer 1998). Interestingly, *F. fujikuroi*  $\Delta$ *acyA* mutants maintained its capability to colonize tomato tissues, a result that could be explained by the fact that that tomato is not its natural host. During pathogenesis, germinating conidia are expected to penetrate rice plant roots, a process that has not been investigated in the tomato fruit assays.

Tolerance assays to different chemical and physical stressors showed that  $\Delta$ *acyA* mutants were able to grow at high temperatures while wild type was completely unable to germinate. The enhanced thermotolerance is consistent with previous observations (Iida 1988; Ivey, Kays et al. 2002). For example, the conidia of *F. proliferatum*  $\Delta$ *Fpacy1* exhibited a higher survival after exposure to 45°C for 1 hour (Kohut, Olah et al. 2010). In *N. crassa* there are three classes of crispy mutants, *cr-1*, *cr-2* and *cr-3*, but only those of the adenylate cyclase gene, *cr-1*, show lower cAMP levels and increase resistance to high temperature, and this phenotype was reverted by cAMP addition to the culture medium (García-Martínez, Ádám et al. 2012). We could

hypothesize that cAMP acts as a negative regulator for the synthesis of heat shock proteins (HSPs). In *S. cerevisiae*, lower protein cAMP-dependent phosphorylations are needed to trigger the heat-shock response (Shin, Matsumoto et al. 1987).

In fungi, different reports associate adenylyl cyclase activity with the regulation of secondary metabolism. *T. virens*  $\Delta tac1$  show a decreased production of viridiol and other polar metabolites in PDA medium (Mukherjee, Mukherjee et al. 2007). In *A. nidulans*, deletion of *fdaA* gene, coding for a  $G_{\alpha}$  subunit, an upstream component of the cAMP-PKA pathway, leads to an increase of sterigmatocystin synthesis (Hicks, Yu et al. 1997). In the case of *Cryptococcus neoformans*, mutagenesis of *Gpa1*  $G_{\alpha}$  subunit yields a strain unable to accumulate melanin, phenotype that can be reverted by adding exogenous cAMP (Alspaugh, Perfect et al. 1997). The melanin molecule seems to have a role as an oxidative stress protectant (Jacobson and Tinnell 1993), a fact that could be related with the higher sensitivity of the *F. fujikuroi*  $\Delta acyA$  mutants to  $H_2O_2$ . Aflatoxin biosynthesis in *A. parasiticus* is also regulated by the cAMP-PKA pathway, with intracellular cAMP levels as the major signaling factor (Roze, Beaudry et al. 2004). In overall, these observations are consistent with the alterations in secondary metabolism exhibited by the  $\Delta acyA$  mutants, such as the severe reduction in GA3 production under nitrogen starvation or the synthesis of a reddish compound. These metabolites were not identified when the  $\Delta acyA$  experiments were achieved, but recent data suggest that they are fusarubins (Studt, Humpf et al. 2013).

It is unknown how cAMP exerts its regulatory role on secondary metabolism. As a possible explanation, since the synthesis of these compounds share common chemical precursors [i.e., all PK enzymes start from acetyl-CoA, (Keller, Turner et al. 2005)], alterations in production or sensing of such precursors could modify the bioavailability of substrates for the different enzymes leading to the production of secondary metabolites. The transmembrane G protein-coupled receptor Gpr1 of *S. cerevisiae*, that senses the presence of glucose via cAMP-PKA pathway (Pan, Harashima et al. 2000) or the Flo11p protein from the same yeast, involved in physiological

changes in response to nitrogen levels in a cAMP-dependent manner (Hamann, Brust et al. 2008), provides good examples. At this respect it is suggestive the regulation by nitrogen of many secondary metabolites. In fact, it is widely accepted that cAMP is a cell nutritional status marker (Suo, Kimura et al. 2006; Huynh, McDougald et al. 2012).

An intriguing result in this Thesis is the negative effect of the  $\Delta$ *acyA* mutation on carotenoids biosynthesis. Although *carB* and *carRA* mRNA levels are slightly increased in the dark, photoinduction levels are apparently unchanged. Interestingly, the  $\Delta$ *acyA* mutants accumulate about 4-fold more carotenoids than the wild type in the dark but their carotenoid content is patently reduced under light. Former studies suggested an inverse correlation between carotenoids content and cAMP levels in *N. crassa* (Kristky, Sokolovsky et al. 1982). Thus, cAMP levels increased about 60% upon illumination (Kristky, Sokolovsky et al. 1982),  $\Delta$ *gna1* mutant shows a higher carotenoids content than the wild type (Yang and Borkovich 1999), and addition of high amounts of cAMP (ca. 1 mM) reduced carotenoid photoinduction (Harding 1973). This correlation could explain the higher accumulation of carotenoids by the  $\Delta$ *acyA* mutants of *F. fujikuroi* in the dark, but not the opposite pattern under light. The lower carotenoid levels in the light could have other causes, such as substrates pool variations or morphological alterations. The former could be limiting in the  $\Delta$ *acyA* mutants, and the latter could potentially affect membrane architecture where carotenoids are presumably accumulated (Daub and Payne 1989).

More than 40 years ago, a mutant of *N. crassa* was isolated on the basis of its deeper pigmentation under illumination compared to the wild type (Harding, Philip et al. 1984). The mutant, called *ovc* from its ability to overproduce carotenoids, turned out to be osmosensitive, and exhibited an unusual developmental alteration, consisting in a sharp interruption in the formation of aerial mycelia in slant cultures. Osmosensitivity and interruption of aerial development were also exhibited by the *N. crassa* *cut* mutant, formerly isolated (Kuwana 1953). The *ovc* and *cut* mutations were found to be allelic (Banks, Bennett et al. 1997), but the *cut* mutant has no alterations in



the regulation of carotenogenesis. Recently, the gene responsible of the *cut* phenotype was identified (*cut-1*), and found to code for a protein of the haloacid dehalogenase (HAD) family (Youssar, Schmidhauser et al. 2005). On the other hand, the *ovc* mutant holds a 77 kb deletion, which includes *cut-1* and 20 additional ORFs, at least one of them also implicated in the *ovc* phenotype (Youssar and Avalos 2007). Expression of *cut-1* is regulated by osmotic stress and light, and the HAD protein family includes phosphatases for different substrates. At the start of this work, the biological role of CUT-1 remained unknown, but it was postulated a possible regulatory role in the MAP kinases of the HOG pathway that control the osmotic stress response in fungi, possibly restoring dephosphorylated states of chain components. The occurrence of a clear *cut-1* ortholog in the *F. fujikuroi* genome, and the possibility of being a regulatory protein related with the control of osmotic stress, and possibly also with that of carotenogenesis, aimed us to undertake its study, described in Chapter 2.

The regulatory pathway known as HOG (from high osmolarity glycerol) mediates the synthesis of osmolytes to compensate external high osmotic pressure in many fungi (Krantz, Becit et al. 2006). The components of this route have been well studied in *S. cerevisiae* (O'Rourke, Herskowitz et al. 2002) and are conserved in other lower eukaryotes, such as *A. nidulans* and *N. crassa*. The pathway comprises at least a transmembrane sensor (two in *S. cerevisiae*) and a MAPK cascade, of which the last MAPK member is a transcription factor (Hog1p in *S. cerevisiae*) that is phosphorylated and translocated into the nucleus, where it triggers transcriptional responses to overcome osmotic stress conditions (Krantz, Becit et al. 2006). The HOG pathway is well known for its central role in the control of osmotic stress (Brewster, de Valoir et al. 1993), but some data point to its participation in the adaptation to heat shock (Winkler, Arkind et al. 2002) or to certain antifungal agents (Aguilera, Rodríguez-Vargas et al. 2005). Actually, further studies have reinforced the role of the HOG pathway in *S. cerevisiae* as a multistress response mechanism, as reveals its participation in oxidative and thermal stress resistance (Bilsland, Molin et al. 2004), and the interplay with

cell wall integrity (CWIS) pathways (Rodríguez-Peña, García et al. 2010). Another example is found in *C. neoformans*, whose HOG pathway is also needed for differentiation and virulence (Ko, Yu et al. 2009).

Although there are some differences between fungal species, the main core of the HOG pathway is well conserved (Krantz, Becit et al. 2006). In *N. crassa*, the sensor protein is OS-1, and the MAPK cascade consists of OS-4 (MAPKKK), OS-5 (MAPKK) and the Hog1p-like effector OS-2 (MAPK) (Miller, Renault et al. 2002; Lamb, Finch et al. 2012). Similar proteins are found in the genome of *F. fujikuroi*. In fact, the *hog1/os-2* counterpart gene has been investigated in this Thesis, and found to be regulated by light and heat shock in addition to osmotic stress, providing further support to the multistress-response nature of this regulatory pathway.

A major contribution of this Thesis has been the assignation of a plausible biological role to the CUT-1/CutA HAD enzyme. Several dicarboximide drugs, e.g. fludioxonil, trigger the HOG pathway in fungi, leading to the internal accumulation of glycerol and provoking cells death under low osmotic conditions. This effect explains the use of these chemicals as efficient antifungals in agriculture. Interestingly, the *os-1*, *os-2*, *os-4* and *os-5* mutants of *N. crassa* are unable to grow under high osmolarity conditions (Perkins and Davis 2000) but they are resistant to the dicarboximide antifungals (Zhang, Lamm et al. 2002); however, the *cut* mutants are only partially sensitive to osmotic stress (Youssar, Schmidhauser et al. 2005) and are highly sensitive to those chemicals (Fujimura, Ochiai et al. 2003), suggesting that CUT-1 plays a HOG-independent role, albeit associated to osmotic stress resistance.

Because of the taxonomic proximity between *N. crassa* and *F. fujikuroi*, the study of *cutA* was carried out with the assumption of being functionally orthologous to *cut-1*, as supported the partial sensitivity to hyperosmotic conditions exhibited by the  $\Delta cutA$  mutants. An important clue for the understanding of *cutA* function was the low glycerol content of their mutants and its coregulation with a gene for a putative glycerol dehydrogenase, called

*gldB* from its *A. nidulans* counterpart, divergently transcribed from *cutA*. The predicted biochemical activity of GldB, the conversion of dihydroxyacetone phosphate to glycerol-3-phosphate, and the characteristic phosphatase activities of HAD enzymes, are very suggestive of a role for this gene tandem in the synthesis of glycerol through dihydroxyacetone. Thus, CutA, and presumably also CUT-1, would be a phosphatase enzyme recognizing glycerol-3-phosphate as substrate. This pathway was already described in *A. nidulans* (Fillinger, Ruijter et al. 2001b), whose *gldB* mutants are impaired in glycerol accumulation under osmotic stress (de Vries, Flitter et al. 2003) but its *cutA* ortholog has not been investigated. In contrast, glycerol biosynthesis is achieved through glycerol-3-phosphate dehydrogenase and glycerol-3-phosphatase activities in *S. cerevisiae* (Pahlman, Granath et al. 2001), indicating evolutionary variations in the synthesis of this osmolyte in fungi.

Different fungi may have developed different systems to adapt their internal osmolarity. E.g., an ion exchange mechanism with the environment seems to operate in *N. crassa* (Lew and Levina 2007), similar to that found in *Arabidopsis thaliana* (Shabala and Lew 2002). Alternatively, other polyalcohols, as erythritol, arabitol, or mannitol, or sugars, as trehalose, may be used as osmolytes in addition to glycerol (de Vries, Flitter et al. 2003; Ruijter, Visser et al. 2004). This is the case of *A. nidulans* and *N. crassa*, which may accumulate erythritol (Beever and Laracy 1986) and mannitol (Ellis, Grindle et al. 1991), respectively, besides glycerol in response to osmotic stress. The significant growth of the  $\Delta cutA$  mutants of *F. fujikuroi* under hyperosmotic conditions suggests the occurrence of a similar alternative compensating mechanism in this fungus.

The assignation of an enzymatic activity to CutA in glycerol biosynthesis makes unlikely a regulatory role for this protein. Even more, neither the *cut* mutants of *N. crassa* nor the *cutA* mutant of *F. fujikuroi* are visibly affected in the regulation of carotenoid biosynthesis, indicating that the carotenoid overproducing phenotype of the *ovc* mutant is only indirectly related with the loss of *cut-1*. The biological role of carotenoids in fungi remains an unsolved issue. Albino mutants of *F. fujikuroi* or of other fungi exhibit a normal growth

capacity, indicating that they are totally dispensable (Avalos, Díaz-Sánchez et al. 2014). However, the routine manipulation of *F. fujikuroi* in the laboratory shows a noticeable reduction of colony diameters under light compared to dark conditions. Carotenoids have been associated to oxidative stress (see, e.g., (Schröder and Johnson 1993; Ukibe, Hashida et al. 2009) and light has damaging effects that can be overcome by carotenoids. Thus,  $\beta$ -carotene and astaxanthin were found to protect against photosensitized oxidation of phospholipid bilayers (Oshima, Ojima et al. 1993). This explains the stimulatory effect of light on carotenoid biosynthesis in different fungi (Avalos, Díaz-Sánchez et al. 2014), including *F. fujikuroi*.

In some fungi, carotenoids are also used as a source for biologically active by-products. This is the case of Mucorales fungi, as *Blakeslea trispora* or *Phycomyces blakesleanus*. This species produce  $\beta$ -carotene, which is used as precursor for their sexual hormones, the trisporic acids (Austin, Bu'Lock et al. 1970; Polaino, Herrador et al. 2010). In *F. fujikuroi*, a biosynthetic pathway leading to the formation of retinal occurs in parallel to that of the formation of its more apparent carotenoid, neurosporaxanthin (Avalos, Díaz-Sánchez et al. 2014). Interestingly, the genes needed to produce retinal are clustered with that for a rhodopsin, CarO. The aim to investigate genes or proteins of *F. fujikuroi* playing a role in the control of stress conditions and the possible connections with secondary metabolism led to address our attention to this rhodopsin.

Sequence similarities of the predicted CarO polypeptide with the well-known archaeal bacteriorhodopsin formerly led to propose a light-dependent proton pumping activity for this protein (Prado, Prado-Cabrero et al. 2004), a prediction that have been fully confirmed in this Thesis by the experiments described in Chapter 3. The data solidly demonstrate that CarO is a light-driven proton pump activated by green light, and exhibiting a fast photocycle, features that remind those of the auxiliary ORP-like rhodopsin PhaeoRD2 (Fan, Solomon et al. 2011). Rhodopsins were first identified in haloarchaea (Oesterhelt and Stoekenius 1973), but nowadays, genome sequencing projects are uncovering a growing number of these proteins in different

organisms, including green algae as *Chlamydomonas reinhardtii* or *Acetabularia acetabulum* (Sineshchekov, Jung et al. 2002; Tsunoda, Ewers et al. 2006) and fungi as *Allomyces* (Saranak and Foster 1997), *Leptosphaeria maculans* (Idnurm and Howlett 2001) or *U. maydis* (Estrada, Brefort et al. 2009) among many others (Brown 2004). Microbial rhodopsins are grouped in two functional categories, transporters and light sensors (Sharma, Spudich et al. 2006). Transporter rhodopsins use light to create a proton electrochemical gradient [*i.e.* in *L. maculans*(Idnurm and Howlett 2001)] or to pump chloride anions [*i.e.* in *Salinibacter ruber* (Mongodin, Nelson et al. 2005)], whereas light-sensing rhodopsins are involved in diverse regulatory phenomena as phototaxis [*i.e.* in *C. reinhardtii* (Sineshchekov, Jung et al. 2002)] or photoadaptation [*i.e.* in *Anabaena* PCC7120 (Jung, Trivedi et al. 2003)].

The results derived from the investigation of the CarO rhodopsin convey possible implications on ecological aspects of *F. fujikuroi* biology. The unexpected effects of gluconate on CarO activity, tentatively explained by a proton buffering effect, and the CarO-independent stimulation of *F. fujikuroi* growth by gluconate, are consistent with a relevant signaling role for this chemical in natural *F. fujikuroi* habitats. This fungus colonizes rice plants via root invasion, and it has been demonstrated that several rice cultivars are associated to gluconate-producing bacteria (Rodríguez, González et al. 2004; Hardoim, Andreote et al. 2011), thus this compound might play a role as a fungal growth promoting chemical attractant. It must be also noted that gluconate is an oxidized glucose derivative, and fungi can convert it to pyruvate and glyceraldehyde through the action of glucokinase, gluconate dehydrogenase and KDG aldolase enzymatic activities (Ramachandran, Fontanille et al. 2006). Actually, industrial production of gluconate is based in cultures of *A. niger* or *Penicillium luteum* (Curie, Kane et al. 1931), emphasizing the natural occurrence of this compound in fungi.

Although visual opsins have evolved to detect different wavelengths, CarO and other microbial rhodopsins absorb light mostly from the green region of the visible spectrum (Folta and Maruhnich 2007). Fungal photoresponses are usually triggered by blue light via flavin-containing photoreceptors

[reviewed by(Herrera-Estrella and Horwitz 2007)] or to a lesser extent by red light via phytochromes (Blumenstein, Vienken et al. 2005). However, green light rather than blue light plays a role in the regulation of vegetative development in plants (Folta and Maruhnich 2007), possibly because photosynthetic tissues less absorb it. Thus, the prevalence of opsins in phytopathogenic fungi is very suggestive: the predominance of green light in plant tissues might be used a signal of plant invasion by attacking fungi. This could be the case of *F. fujikuroi*, which could efficiently use CarO (or OpsA) in the plant. In this aspect it would be interesting to investigate if gibberellins biosynthesis is regulated by green light.

In addition to the participation of CarO as a restraining factor of conidia germination under light, the proton pumping activity of CarO could have other pH-dependent effects. Although *F. fujikuroi* acidifies the medium in a carO-independent manner, it might contribute to acidification under natural conditions. It is known that pH inhibits growth of microorganisms by affecting enzymatic activities, cell wall remodelling and nutrients availability (Schmidt, Walker et al. 2008). In fungi as *P. expansum*, spore germination is severely influenced by ambient pH (Li, Lai et al. 2010). In *Bacillus magaterium* dormant spores germination is affected by pH (Setlow and Setlow 1980). In addition to the proton-pumping activity of CarO, other possible regulatory functions cannot be discarded and remain to be explored. Arrestins are a family of small proteins participating in different signaling processes. Some arrestins were shown to regulate visual rhodopsins in mammals (Shenoy and Lefkowitz 2005). *A. nidulans* possesses an arrestin-related protein called PalF, that is necessary for pH signal transduction (Herranz, Rodriguez et al. 2005).

Microbial rhodopsins have potential biotechnological interest in a novel area of applied research, optogenetics. This application field combines optical and genetics methods to rapidly control activation or silencing of neurons in a reversible manner (Han, Chow et al. 2011). *C. reinhardtii* ChR-2 has been used for neural activation experiments (Boyden, Zhang et al. 2005) whereas *Natromonas pharaonis* NpHR is an useful rhodopsin for neural silencing by

pumping chloride ions into the cell (Han and Boyden 2007). High intensity proton current and a fast photocycle make CarO a desirable candidate for further optogenetics applications.





**CONCLUSIONES**

**CONCLUSIONS**



## 1. Conclusions

- 1) The genome of *Fusarium fujikuroi* contains a single gene, that we called *acyA*, encoding a predicted adenylyl cyclase enzyme. The targeted mutation of this gene results in a pleiotropic phenotype that reveals the participation of the AcyA protein in the control of development, secondary metabolism and multistress response in this fungus.
- 2) The regulatory role of AcyA is presumably achieved through the synthesis of cAMP. The role of this molecule as a regulatory signal is evidenced by the partial recovery of the mutant phenotype by external addition of a cAMP analogue.
- 3) The comparison of the *F. fujikuroi acyA* mutant phenotype with that formerly reported for mutants of adenylyl cyclase genes from other fungi suggests that cAMP-mediated signaling has been subject of rapid evolution in different species, allowing adaptation to different stressing conditions in their respective ecological niches.
- 4) The *F. fujikuroi* genome contains a gene orthologous of *cut-1* of *N. crassa*, encoding a protein from the haloacid dehalogenase family, known as HAD. This gene, that we called *cutA*, is divergently transcribed from *gldB*, encoding a glycerol dehydrogenase. Both genes share a common transcriptional regulation by osmotic stress, heat shock, and illumination.
- 5) The loss of the gene *cutA* results in a partial sensitivity to osmotic stress and a drastic reduction of intracellular glycerol concentration. The predominance of phosphatase activities in the enzymes of the HAD family, and the coregulation of *cutA* and *gldB*, strongly suggest a role of CutA as a phosphatase converting dihydroxyacetone phosphate to dihydroxyacetone, which in turn would be converted by GldB to glycerol.
- 6) The significant growth exhibited by the null *cutA* mutants under high osmotic conditions suggests that glycerol is not the only osmolyte used by *F. fujikuroi* to tolerate hyperosmotic conditions.

- 7) As formerly suggested by its sequence features, the *F. fujikuroi* CarO rhodopsin is a green light-driven proton pump. It exhibits a fast photo-cycle and provokes an outward directed proton current upon illumination with green light, making it an interesting model for optogenetics studies.
- 8) Expression and visualization of a fusion CarO-YFP protein in *F. fujikuroi* showed an heterogeneous distribution in hyphae grown under illumination, with a higher presence in regions close to septa and hyphal tips, and a noticeable accumulation in conidia.
- 9) Conidia from a CarO deficient strain germinated faster under light than those of a control strain, providing the first relevant phenotypic alteration for a rhodopsin mutant in a fungus.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Estirpes

Las estirpes usadas en esta Tesis, así como su origen y fenotipo, se describen en las tablas que se muestran a continuación. La estirpe *Fusarium fujikuroi* FKMC1995 (*Gibberella fujikuroi* grupo de cruzamiento C) fue cedida amablemente por el Dr. J.F. Leslie (colección de la Universidad Kansas State, Manhattan, KS, EEUU).

**Tabla 6. Estirpes fúngicas usadas en la presente Tesis.**

Estirpe	Origen	Fenotipo	Referencia
SF236	FKMC1995 MD	$\Delta cryD$	(Castrillo, García-Martínez et al. 2013)
SF237	FKMC1995 MD	$\Delta cryD$	(Castrillo, García-Martínez et al. 2013)
SF225	FKMC1995 MD	$\Delta wcoA$	(Estrada and Avalos 2008a)
SF226	FKMC1995 MD	$\Delta wcoA$	(Estrada and Avalos 2008a)
AcyA T1	FKMC1995 IE	WT	Esta Tesis, (García-Martínez, Ádám et al. 2012)
AcyA T2	FKMC1995 MD	$\Delta acyA$	(García-Martínez, Ádám et al. 2012)
AcyA T9	FKMC1995 MD	$\Delta acyA$	(García-Martínez, Ádám et al. 2012)
AcyA T13	FKMC1995 MD	$\Delta acyA$	(García-Martínez, Ádám et al. 2012)
SF1	FKMC1995 RE	$\Delta niaD$	(Prado, Prado-Cabrero et al. 2004)
SF100	SF1 MD	$\Delta niaD \Delta carO$	(Prado, Prado-Cabrero et al. 2004)
SF101	SF1 MD	$\Delta niaD$	(Prado, Prado-Cabrero et al. 2004)
SF223	FKMC 1995 MD	$\Delta opsA$	(Estrada and Avalos 2009)
SF134	FKMC1995 NG	<i>carS</i>	(Avalos, Casadesús et al. 1985)
CutA T1	FKMC1995 MD	$\Delta cutA$	Esta Tesis(García-Martínez, Castrillo et al. 2014)
CutA T2	FKMC1995 MD	$\Delta cutA$	Esta Tesis, (García-Martínez, Castrillo et al. 2014)

CutA T3	FKMC1995 MD	$\Delta cutA$	Esta Tesis, (García-Martínez, Castrillo et al. 2014)
CutA T4	FKMC1995 IE	WT	Esta Tesis (García-Martínez, Castrillo et al. 2014)
CarO-YFP	FKMC1995 IE	caro::YFP	Esta Tesis

## 1.1 Otros organismos utilizados en esta Tesis

### 1.1.1 Escherichia coli

Tabla 7. Estirpes de *E. coli* usadas en la presente Tesis.

Estirpe	Genotipo	Uso
DH5- $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta lacU169</math> (<math>\emptyset 80 lacZ \Delta M15</math>) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Clonaciones
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F proAB lacI<sup>q</sup>Z <math>\Delta M15</math> Tn10(Tet<sup>r</sup>)]</i>	Clonaciones

### 1.1.2 Saccharomyces cerevisiae

Para la expresión heteróloga de la proteína de fusión CarO::YFP descrita en el Capítulo 3, se utilizó la estirpe *S. cerevisiae* DSY-5 (*MATa leu2 trp1 ura3-52 his3 pep4 prb1*).

### 1.1.3 Células de mamífero

Tabla 8. Líneas celulares de mamífero usadas en la presente Tesis.

Línea celular	Origen	Uso
HEK293 FlipIn-TRex	Células embrionarias humanas de riñón	Establecimiento de una línea celular estable para la expresión de CarO::YFP
NG108-15	Híbrido de neuroblastoma de ratón y glioma de rata	Expresión transitoria de la proteína de fusión CarO::YFP



## 2. Vectores de clonación y plásmidos

A continuación se describen los plásmidos y vectores, comerciales o cedidos por otros investigadores, que han sido usados durante la realización de esta Tesis.

- **pGEM-T Easy (Promega):** Plásmido que contiene el gen de resistencia a ampicilina y que está digerido con *EcoRV*. Contiene una timina añadida en sus extremos 3' para facilitar la clonación de productos de PCR. El sitio de clonación interrumpe el gen *lacZ* ( $\beta$ -galactosidasa) que permite la selección de colonias con el plásmido recombinante por color en cajas de Petri suplementadas con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido) e IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido).
- **pBLuescript® KS+ (Stratagene):** Vector derivado de pUC19 que lleva el gen de resistencia a ampicilina. Contiene un sitio de clonación múltiple que interrumpe el gen *lacZ* ( $\beta$ -galactosidasa) que permite la selección de colonias con el plásmido recombinante por color en cajas de Petri suplementadas con X-gal e IPTG.
- **ClonepJET1.2/blunt (Thermo Scientific):** Vector de clonación comercial lineal que lleva el gen de resistencia a ampicilina. Contiene un sitio de clonación múltiple que interrumpe un gen que confiere una enzima de restricción letal (*Eco47IR*) de forma que sólo las colonias con plásmido recombinante pueden crecer en cajas de Petri con medio selectivo.
- **pKS1-ST KickStart™ Protein Expression System (Dualsystems Biotech):** Vector comercial para expresión de proteínas en *S. cerevisiae*. Contiene un sitio de clonación múltiple bajo el control del promotor reprimible por glucosa *ADH2* y genes que confieren resistencia a ampicilina y a G418. La presencia en el plásmido de la secuencia que cifra la etiqueta *Strep-tag* incrementa los niveles de expresión de proteína heteróloga.
- **pcDNA™5/FRT/TO (Invitrogen):** Vector comercial para expresión de proteínas en el sistema de mamíferos Flp-In™ T-REx™. Contiene un sitio

de clonación múltiple situado entre el promotor CMV (promotor del citomegalovirus) inducible por tetraciclina y una secuencia de poliadenilación BGH. Además, el plásmido contiene genes que confieren resistencia a ampicilina y a higromicina. Este último gen carece del codón de inicio ATG, que se encuentra integrado en el genoma de células Flp-In™ T-REx™, lo que permite la selección por resistencia a higromicina de clones que hayan integrado correctamente en su genoma el vector de expresión.

- **pAN7-1 (Punt et al., 1987):** plásmido que contiene el gen de resistencia a higromicina de *E. coli* (*hph*) fusionado al promotor del gen *gpd* en el extremo 5' y al terminador del gen *trpC* en el extremo 3', ambos de *Aspergillus nidulans*. El *cassette* completo se puede sacar mediante digestión con las enzimas *HindIII* y *BglII*. También lleva el gen de resistencia a ampicilina.
- **pChR2::YFP (Cedido por el doctor Ulrich Terpitz):** plásmido que contiene el gen de la rodopsina tipo canal 2 del alga *Chlamydomonas reinhardtii* fusionado a una secuencia espaciadora y al gen *yfp*. Se utilizó para obtener por PCR la secuencia génica para la proteína YFP.
- **pHJA2: (Fernández-Martín et al, 2000):** plásmido derivado de pAN7-1 (Punt, Oliver et al. 1987) y pBluescript® II KS + (Stratagene). Contiene el *cassette* de resistencia a higromicina B del primero y el sitio de clonación múltiple del segundo. Una digestión completa con *XbaI* y parcial con *EcoRI* de pAN7-1 dio permiti6 obtener una banda de 4,06 Kb con el *cassette* de resistencia a higromicina. Este se clon6 en la diana *NaeI* de pBluescript® II KS + tras un tratamiento con la polimerasa Klenow para hacer romos sus extremos.
- **pSCDcarO:** plásmido de encargo (Gene Art, Life Technologies) derivado del vector pMA-RQ, que contiene un gen de resistencia a ampicilina. En el sitio de clonación *SfiI* la empresa insert6 un fragmento de ADN generado por sntesis con la secuencia sin intrones del gen *carO*, carente de cod6n stop y fusionada a una secuencia espaciadora de 21 pb seguida de la secuencia sin intrones que cifra la prote6na YFP. La digesti6n de este plásmido con *XhoI* libera del vector (2,3 kb) la

secuencia sintetizada (1,7 kb), que se utilizó para construir los plásmidos pCDNA/FR/TO-CDcarO::YFP y pKS1-ST-CDcarO::YFP.

- **pScarO:** plásmido de encargo (Gene Art, Life Technologies) derivado del vector pMA-RQ, que contiene un gen de resistencia a ampicilina. En el sitio de clonación *SfiI* la empresa insertó un fragmento de ADN generado por síntesis con la secuencia del gen *carO* incluyendo unas 500 pb pertenecientes a las regiones promotora y terminadora del gen. La secuencia completa del gen *carO* carece de codón stop y está fusionado a una secuencia espaciadora de 21 pb y a la secuencia sin intrones que cifra la proteína YFP. La digestión de este plásmido con *XbaI* liberaba del vector (2,3 kb) la secuencia sintetizada (3,2 kb), que se utilizó para construir el plásmido pHJA2-carO::YFP.
- **pSCDopsA:** plásmido de encargo (Gene Art, Life Technologies) derivado del vector pMA-RQ, que contiene un gen de resistencia a ampicilina. En el sitio de clonación *SfiI* la empresa insertó un fragmento de ADN generado por síntesis que contiene la secuencia sin intrones del gen *opsA*, carente de codón stop y fusionada a una secuencia espaciadora de 21 pb seguida por la secuencia sin intrones que cifra la proteína YFP. La digestión de este plásmido con *XhoI* libera del vector (2,3 kb) la secuencia sintetizada (1,6 kb), que se utilizó para construir el plásmido pCDNA/FR/TO-CDopsA::YFP.

A continuación se describen los plásmidos y vectores de expresión construidos durante el desarrollo de esta Tesis derivados de los anteriormente descritos.

- **pDAc:** plásmido utilizado para generar los mutantes carentes de adenilato ciclasa funcional utilizados en el Capítulo 1. Para construirlo, se amplificó mediante PCR con los cebadores Acf-1F/1R un fragmento de 4,5 kb que contiene el dominio catalítico de la adenilato ciclasa. Este fragmento fue clonado en pGEM-T Easy, y el plásmido resultante se digirió con *BamHI*. La digestión con esta enzima de restricción libera un fragmento de 1,98 kb del plásmido que incluye la mayor parte del dominio catalítico de la adenilato ciclasa de *Fusarium*. Este fragmento

fue sustituido por un *cassette* de resistencia a higromicina obtenido por digestión del plásmido pAN7-1, generando pDac.

- **pDCut:** plásmido utilizado para generar por recombinación homóloga las estirpes *cutA* utilizadas en el Capítulo 2. Para obtener este plásmido, se amplificó mediante PCR con los cebadores CutA-4F/4R un fragmento de 3,7 kb que contiene el gen *cutA* así como aproximadamente 1 kb de la región promotora y 1 Kb de la región terminadora. Este fragmento se clonó en pGEM-T Easy, utilizando el plásmido resultante como molde para llevar a cabo PCR inversa con los cebadores CutA-1F/1R. Esta PCR generó un fragmento de ADN con las secuencias flanqueantes del gen, pero carente de 1.433 de las 1.499 pb del marco de lectura de *cutA*. Este producto de PCR se ligó con un fragmento de ADN de 4 kb que contiene un *cassette* de resistencia a higromicina obtenido mediante digestión del plásmido pAN7-1 con *HindIII* y *BglII*. El producto de ligación se denominó pDCut.
- **pCDNA/FR/TO-CDcarO::YFP:** plásmido utilizado para expresar en células de mamífero la proteína de fusión CarO::YFP (Capítulo 3). Para obtener este plásmido, se digirió pSCDcarO con la enzima *XhoI*. El fragmento de 1,7 kb resultante se ligó con pCDNA/FR/TO previamente linearizado con la misma enzima.
- **pKS1-ST-CD-CDcarO::YFP:** plásmido utilizado para expresar la proteína de fusión CarO::YFP en *S. cerevisiae* (Capítulo 3). Para obtener este plásmido, se digirió pSCDcarO con la enzima *XhoI*. El fragmento de 1,7 kb resultante se ligó con pCDNA/FR/TO previamente linearizado con la misma enzima.
- **pHJA2-carO::YFP:** plásmido utilizado para expresar la proteína de fusión CarO::YFP en *F. fujikuroi* bajo control de su propio promotor (Capítulo 3). Para obtener este plásmido, se digirió pScarO con la enzima de restricción *XbaI*. El fragmento de 3,2 kb resultante se ligó con pHJA2 previamente linearizado con la misma enzima.
- **pCDNA/FR/TO-CDopsA::YFP:** plásmido utilizado para expresar la proteína de fusión OpsA::YFP en células de mamífero (Capítulo 3). Para

obtener este plásmido, se digirió pSCDcarO con la enzima *Xho*I. El fragmento de 1,6 kb resultante se ligó con pCDNA/FR/TO previamente linearizado con la misma enzima.

### 3. Oligonucleótidos

**Tabla 9. Oligonucleótidos usados como cebadores en reacciones de PCR estándar.**

Cebador	Secuencia 5'-3'	Uso
Acf-1F; 1	ACCCTTACTCATGCAGAAGC	Capítulo 1
Acf-1R; 2	ACAACCTCTTGCTCTGTGTCG	Capítulo 1
Acf-2F; 3	GATTCTGGGATGTCATCAAGG	Capítulo 1
Hph-1R; 4	TATTCCTTTGCCCTCGGACG	Capítulo 1
Hph-1F	TGCCTGAACTCACCGCGACG	Capítulo 1
CutA-4F; 1	GTGGGTATGTGAGTAGGTGA	Capítulo 2
CutA-4R; 2	CAGGTACAAGGCACAGTG	Capítulo 2
CutA-1F; 3	GCACCCTCCGCAAGATGTC	Capítulo 2
CutA-1R; 4	CTTAGACGACAGCGGCGG	Capítulo 2
Hph-1R; 5	TATTCCTTTGCCCTCGGACG	Capítulo 2
CutA-3F; 6	CCTCATCTTCATACCGACTG	Capítulo 2
CutA-3R; 7	GATTCTATCGCTGGTCTATG	Capítulo 2
GFPORF-1F	GGTGAGCAAGGGCGAGGA	Capítulo 3
GFPORF-1R	CAGCTCGTCCATGCCGTG	Capítulo 3
pJET1.2-1F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Capítulo 3
pJET1.2-1R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Capítulo 3
CarOORF-1F	GTCAACCGTGAGCCATATCAG	Capítulo 3
CarOORF-1R	GGGAAGATGCGCTCGTCAATG	Capítulo 3

**Tabla 10. Oligonucleótidos usados como cebadores en reacciones de RT-PCR.**

Cebador	Secuencia 5'-3'	Uso
CarB-1F	TCGGTGTTCGAGTACCGTCTCT	Capítulo 1
CarB-1R	TGCCTTGCCGGTTGCTT	Capítulo 1
CarRA-1F	CAGAAGCTGTTCCCGAAGACA	Capítulo 1
CarRA-1R	TGCGATGCCCATTTCTTGA	Capítulo 1
GibB-1F	TGTCAGCGAATCTGCTCCAA	Capítulo 1
GibB-1R	GACGCATAACGGATGAAATGAG	Capítulo 1
TubA-1F	CCGGTGCTGGAAACAACCTG	Capítulo 1
TubA-1R	CGAGGACCTGGTTCGACAAGT	Capítulo 1
CutA-1F	GCATCAAGATCCCTCACATC	Capítulo 2
CutA-1R	AGAGCTGCGCGCAGCGA	Capítulo 2
GldA-1F	CCTTGCCGCTAGCATAAATCT	Capítulo 2
GldA-1R	CGTCATCAAGAAGGATCTCAC	Capítulo 2
HogA-1F	CGAGGTCTGAAGTACGTGCATT	Capítulo 2
HogA-1R	GAGGATATTGCTGGGTTTGAGATC	Capítulo 2

## 4. Soluciones, medios y condiciones de cultivo

### 4.1 Medios de cultivo para *E. coli*

**Medio Luria-Bertani (LB).** Contiene litro es 5 g de extracto de levadura (Pronadisa), 10 g de peptona hidrolizada enzimáticamente (USB) y 5 g de NaCl (Sambrook and Russell 2001).

Para obtener plásmidos recombinantes se utilizaron las estirpes de *E. coli* DH5- $\alpha$  o XL1-Blue. Los transformantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina y, cuando era posible, los clones positivos se identificaron por color (azul/blanco). La ampicilina se utilizó a una concentración de 100 mg l<sup>-1</sup>. En su caso se añadió también X-gal e IPTG a concentraciones de 40 mg l<sup>-1</sup> y 20 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Medio de almacenamiento y transformación (TSS).** Medio de cultivo utilizado para producir células competentes, consistente en medio LB al que se añade

PEG 8000 al 10% (p/v), DMSO al 5% (v/v) y  $\text{MgSO}_4$  o  $\text{MgCl}_2$  a una concentración final de 50 mM. El pH se ajustó a 6,5.

**Medio SOB.** Para producción de células competentes de *E. coli* (Inoue, Nojima et al. 1990). Contiene por litro 5 g de extracto de levadura, 20 g de triptona, 0,5 g NaCl y 10 ml de una solución de KCl 250 mM. Tras autoclavar se añade  $\text{MgCl}_2$  a una concentración final de 10 mM.

**Medio SOC.** Para producción de células competentes de *E. coli* (Inoue, Nojima et al. 1990). Su composición es la del medio SOB añadiendo glucosa tras autoclavar a una concentración final de 20 mM.

#### 4.2 Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

**YPD.** Contiene por litro 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 20 g de glucosa y 10 g de agar. Para seleccionar las estirpes de *S. cerevisiae* DSY-5 transformadas con el plásmido pKS1-ST-carO::YFP se añadió al medio YPD el antibiótico G-418 (PAA, Pasching, Austria) a una concentración final de 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### 4.3 Medios de cultivo para *F. fujikuroi*

Salvo indicación expresa, todos los medios sólidos utilizados en esta Tesis para el cultivo de *Fusarium* contienen 16 g  $\text{l}^{-1}$  de agar.

**Medio mínimo (DG).** Contiene por litro 30 g de glucosa, 3 g de  $\text{NaNO}_3$ , 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de KCl y 2 ml de una solución de microelementos (10 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 20 mg de  $\text{FeCl}_3$ , 20 mg de  $\text{NaMoO}_4$  y 2 mg de  $\text{ZnSO}_4$ ) (Avalos et al., 1985).

En algunos casos los 3 g de  $\text{NaNO}_3$  se reemplazaron con 3g de L-asparragina (medio DGasn) o de L-glutamina (medio DGgln).

En los experimentos de cuantificación de bikaverinas descritos en el Capítulo 1, el medio DGasn es llamado “high nitrogen agar”, mientras que el medio “low nitrogen agar” contiene por litro 0,3 g de L-asparragina.

**Medio DA.** Medio DG con 2 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en lugar de los 3 g de  $\text{NaNO}_3$ . En algunos casos se añadieron otras fuentes de carbono a la concentración

indicada. Para ajustar el pH, se usó la cantidad apropiada de tampón 0.1 M citrato/0.2 M NaHPO<sub>4</sub>.

**Medio de esporulación (CG).** Contiene por litro 10 g de glucosa, 0,1 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

**Medio alto en nitrógeno (*high-N medium*)** ["ICI medium", (Geissman, Verbiscar et al. 1966)]. Contiene por litro 80 g de glucosa, 4,8 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 2 ml de una solución de microelementos (2 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 300 µg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 3,22 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 200 µg de MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 200 µg de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O).

**Medio bajo en nitrógeno (*low-M medium*)** "[10%ICI medium", (Geissman, Verbiscar et al. 1966)]. Igual que el medio alto en nitrógeno pero con solo el 10% de la fuente de nitrógeno (0,48 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>).

**Solución libre de nitrógeno.** Contiene por litro 20 g de glucosa y 2 ml de la solución de microelementos del medio alto en nitrógeno.

**Medio YPED-2G.** Medio de cultivo utilizado para germinar los conidios para la preparación de protoplastos. Contiene por litro 3 g de extracto de levadura, 10 g de peptona y 10 g de glucosa.

**Medio de regeneración de protoplastos.** Contiene por litro 274 g de sacarosa (0,8 M), 1 g de extracto de levadura, 1 g de N-Z amina A® (hidrolizado de caseína de leche bovina, Sigma) y 18 g de agar. Para evitar fenómenos de caramelización, la sacarosa se añade estéril tras autoclavar el resto de componentes del medio.

**Medio de cobertera para la regeneración de protoplastos.** Su composición es igual a la del medio de regeneración de protoplastos pero en lugar de 18 g de agar contiene 10 g de agarosa.

**Medio selectivo.** Para selección de transformantes, el medio DG se suplementó con 100 mg l<sup>-1</sup> de higromicina B (Roche) o con 200 mg l<sup>-1</sup> de geneticina (G-418 disulfato, Sigma) según el método de selección empleado.



#### 4.4 Medios de cultivo para células de mamífero

Las líneas celulares objeto de estudio en esta Tesis se cultivaron en un medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (PAA, alta-glucosa, con GlutaMax) suplementado con FCS (10%), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U ml<sup>-1</sup>), estreptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>), zeocina (100 µg ml<sup>-1</sup>) y blasticidina (15 µg ml<sup>-1</sup>). Las transfecciones se realizaron según los manuales proporcionados por el suministrador de las líneas celulares. Para seleccionar las líneas celulares transfectadas se utilizó higromicina (100 µg ml<sup>-1</sup>) y blasticidina (15 µg ml<sup>-1</sup>).

Para los experimentos de pinzamiento de membrana (“*patch-clamp*”), el día anterior al experimento se colocaron las células en la superficie de cubreobjetos de vidrio y se indujo la expresión de CarO::YFP añadiendo tetraciclina (2.5 µg ml<sup>-1</sup>) y *trans*-retinal (1 nM).

### 5. Condiciones de cultivo de *F. fujikuroi*

Salvo indicación expresa, los cultivos se realizaron a 30°C. Para la obtención de conidios, las incubaciones se realizaron a 22°C.

Para asegurar en su caso condiciones de oscuridad, los matraces con medio líquido se mantuvieron envueltos en papel de aluminio y forrados de plástico negro para evitar posible roturas del papel de aluminio por roce con los adaptadores del incubador orbital. Las cajas de Petri con medio sólido se mantuvieron en el interior de cajas de cartón debidamente forradas con papel de aluminio.

#### 5.1 Iluminación

Los cultivos se iluminaron con 5W m<sup>-2</sup> (~300 lux) de luz blanca procedente de una batería de cuatro lámparas fluorescentes (Philips TL-D 18W/840) situadas a una distancia de 58 cm. El flujo luminoso se midió con un fotodiodo de silicio PIN-10DP/SB (United Detector Technology, Hawthorne, California, EEUU) conectado a un picoamperímetro 485 (Keithley Instruments, Cleveland, Ohio, EEUU).

## 5.2 Cultivos para análisis de carotenoides

Las estirpes se sembraron en cajas de Petri con medio DGasn y se iluminaron en las condiciones descritas anteriormente. Las cajas se mantuvieron durante 7 días a 30°C. Para lograr micelios lo más homogéneo posibles, se hicieron con palillos estériles siete pinchazos equidistantes, distribuidos simétricamente sobre el agar.

## 5.3 Cultivos para análisis de bikaverinas

Las estirpes se sembraron en cajas de Petri con 25 ml de medio sólido DGasn o DGasn con sólo 0.3 g l<sup>-1</sup> de L-asparagina. La siembra se realizó mediante 7 pinchazos (sección 5.2), y las cajas se mantuvieron a 30 °C durante 14 días en ambiente de alta humedad para prevenir la desecación del medio de cultivo y en oscuridad para minimizar la biosíntesis de carotenoides que pudiesen enmascarar la presencia de bikaverinas.

## 5.4 Cultivos para análisis de giberelinas

Las estirpes se incubaron en matraces de 500 ml con 250 ml de medio “alto en nitrógeno” o “bajo en nitrógeno” (sección 4.3), inoculados con 10<sup>6</sup> esporas y mantenidos a 30°C en un agitador orbital a 150 rpm. A los 9 y 15 días se extrajeron alícuotas de los cultivos, que se emplearon para las determinaciones químicas.

## 5.5 Cultivos para análisis de expresión de los genes *car*

Las estirpes se incubaron en cajas de Petri de 15 cm de diámetro con 80 ml de medio DGasn líquido, inoculadas con 10<sup>6</sup> esporas recién recogidas. Las cajas se mantuvieron a 30°C en oscuridad durante 3 días, periodo tras el cual se expusieron a la luz durante los tiempos que se indiquen.

## 5.6 Cultivos para análisis de la expresión del gen *gibB*

Las estirpes se incubaron en matraces de 500 ml con 250 ml de medio “alto en nitrógeno” inoculado con 10<sup>6</sup> esporas frescas. Los matraces se mantuvieron durante 3 días a 30°C en un agitador orbital a 150 rpm. A continuación los cultivos se pasaron por un filtro estéril de papel Whatman, el

micelio retenido en los filtros se lavó con agua destilada estéril y se resuspendió en 250 ml del medio “solución libre de nitrógeno”.

Las estirpes *acy*<sup>-</sup> presentaron una velocidad de crecimiento menor que la estirpe control *acy*<sup>+</sup>. Para equiparar las densidades de sus micelios en el experimento, en el caso de los mutantes se filtró el contenido de tres matraces y se pasó a un solo matraz de “solución libre de nitrógeno”. Con esta medida correctora, la densidad de micelio obtenida en los matraces correspondientes a los mutantes *acy*<sup>-</sup> fue similar a la observada en los matraces de las estirpes *acy*<sup>+</sup>.

### **5.7 Cultivos para el estudio de la respuesta a choque térmico de la expresión de los genes *cutA* y *gldB***

Las estirpes se incubaron en cajas de Petri de 15 cm de diámetro con 80 ml de medio líquido DGasn, inoculadas con 10<sup>6</sup> esporas frescas. Las cajas se mantuvieron en oscuridad a 30°C durante tres días, tras lo cual se pasaron a un baño de agua a 42°C durante 30, 60 y 120 minutos. El choque térmico se llevó a cabo en oscuridad para evitar la fotoinducción de los genes estudiados.

### **5.8 Cultivos para el estudio de la respuesta a choque osmótico de la expresión de los genes *cutA* y *gldB***

Se investigó el efecto tanto del choque hiper- como hipoosmótico. En ambos casos las estirpes se incubaron a 30°C en cajas de Petri de 15 cm de diámetro con 80 ml de medio líquido DGasn, inoculadas con 10<sup>6</sup> esporas frescas. Las incubaciones se realizaron en oscuridad para evitar la fotoinducción de los genes objeto de estudio.

En el caso de choque hiperosmótico, a los tres días de incubación se añadieron 12,4 ml de una solución al 30% de NaCl (concentración final de 0,68 M), y se recogieron muestras a los 15, 30, 60, 120 y 240 minutos de la adición de NaCl.

En el caso de choque hipoosmótico, el medio DGasn contenía desde el principio NaCl a una concentración final de 0,68 M. A los 3 días de incubación se retiró el medio y se sustituyó por DGasn fresco sin NaCl, y se tomaron muestras a los 15, 30, 60, 120 y 240 minutos del cambio de medio.

## 5.9 Cultivos para estudios de acidificación del medio por el hongo

Estos experimentos, descritos en el Capítulo 3, se llevaron a cabo con medio DA suplementado con gluconato sódico a una concentración de 23 mM. Se ajustó el pH a 5 y se añadieron 67 mg l<sup>-1</sup> de verde bromocresol previamente esterilizado por filtración. Las estirpes se inocularon depositando gotas de 4 µl con 200, 500, 1.000, and 2.000 conidios y las cajas de Petri se mantuvieron durante 4 días a 30°C, en luz u oscuridad.

## 6. Cuantificaciones de crecimiento y conidiación

### 6.1 Crecimiento en “tubos de carrera”

Se utilizaron “tubos de carrera” de vidrio, similares a los utilizados en con *N. crassa* (ver por ej. (Cheng, Yang et al. 2001). Los tubos, de 17 cm de longitud por 1,6 cm de luz interna, se rellenaron con 15 ml de medio de cultivo sólido y taponados en sus extremos con algodón estéril. Los tubos se sembraron en sus extremos con fragmentos de micelio de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> de micelio y se mantuvieron a 30°C en un ambiente de alta humedad para prevenir la desecación del medio de cultivo.

En los experimentos con estos tubos descritos en el capítulo 1 se utilizó medio DGasn y la incubación duró 24 días. En los experimentos descritos en el capítulo 2 se utilizó medio DGasn suplementado con NaCl a una concentración final de 0,68 M y las incubaciones duraron 31 días.

### 6.2 Crecimiento en medio líquido

Se utilizaron matraces de 250 ml con 100 ml de medio DGasn líquido. Cuando así se indica, el medio se suplementó con NaCl o sorbitol a concentraciones finales de 0,68 M o 1,2 M respectivamente. Los matraces se inocularon con 10<sup>6</sup> esporas frescas y los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm durante 7 días a 30°C, tras lo cual se filtró el contenido del matraz a través de papel Whatman. Los micelios se lavaron con agua destilada, se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron antes de ser pesados.

### 6.3 Crecimiento en cajas de Petri

Se utilizaron cajas de Petri de 15 cm de diámetro con 100 ml del medio sólido indicado. En el capítulo 2 se usaron medios DG, DGasn y DGasn suplementado con uno de los siguientes osmolitos: NaCl (concentración final 0,68 M), sorbitol (1,2 M) y glicerol (0,036 M). Las estirpes se inocularon mediante siete pinchazos (ver sección 5.2), se incubaron 7 días en oscuridad a 30°C y se midió el diámetro de las colonias.

### 6.4 Ensayos de conidiación

Se utilizaron dos métodos. En el capítulo 1, las estirpes se sembraron con palillos mediante 50 pinchazos equidistantes en cajas de Petri con medio DGasn sólido, y se incubaron a 22°C durante 7 días bajo iluminación. Tras este tiempo, se añadió a cada caja 12 ml de glicerol 15%, se restregó cuidadosamente la superficie del micelio con una espátula, y se pasó la mezcla resultante a un tubo Falcon de 50 ml. A continuación se llevaron a cabo dos lavados con 8 ml de agua destilada estéril, añadiéndose el volumen recogido al recolectado en el paso anterior. Finalmente, se homogenizó la muestra, se anotó el volumen de la misma y se pasó una alícuota de 10 µl a un una cámara de Bürker para estimar la concentración de conidios.

En el capítulo 2, las estirpes se incubaron en matraces de 250 ml con 100 ml de medio DGasn líquido. En algunos casos el medio se suplementó con NaCl o sorbitol a una concentración final de 0,68 M o 1,2 M, respectivamente. Los matraces se inocularon con 10<sup>6</sup> esporas recién obtenidas y los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm durante 7 días a 30°C. Transcurridos este periodo, se tomó una alícuota de 1 ml y se procedió como se ha indicado arriba para estimar la concentración de conidios por medio de una cámara de Bürker.

## 7. Ensayos de crecimiento sobre materia vegetal

Se realizaron ensayos para estudiar la capacidad de distintas estirpes de *Fusarium* de colonizar tanto tomates como manzanas.

Para los experimentos con tomates, se eligieron frutos que presentaban un tamaño y estado de maduración similares, así como una piel sana. Antes de

inocularlos se eliminaron posibles restos de tierra frotando la superficie con papel empapado en etanol de 96°. Posteriormente se sumergieron durante 2-3 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 0,7% y se enjuagaron con agua destilada estéril. Desde este momento, todas las manipulaciones se llevaron a cabo en una campana de esterilidad. Para las inoculaciones, se realizaron pequeñas incisiones de unos 2 mm de profundidad con una punta amarilla estéril, sobre las cuales se depositaron  $10^5$  esporas de cada estirpe a ensayar. Los tomates se mantuvieron durante una semana en el interior de vasos de precipitados estériles y sellados, en un ambiente húmedo y a 30°C. Cuando fue necesario, los vasos de precipitados se introdujeron en cajas para incubaciones en oscuridad o se iluminaron en las condiciones descritas en el apartado 5.1.

Para los ensayos con manzanas, los frutos se lavaron con agua y jabón y se enjuagaron con agua destilada estéril. Se cortaron rodajas de diámetro similar y de un grosor de 0,8 cm con un cuchillo previamente esterilizado con alcohol y llama. Cada rodaja se colocó en una caja de Petri, y se inocularon 5  $\mu$ l de un stock de esporas frescas a una concentración de  $5 \times 10^7$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ . Las incubaciones se llevaron a cabo de manera análoga a lo descrito para los frutos de tomate, pero durante 4 días.

## **8. Tratamientos de estrés**

### **8.1 Estrés térmico**

Para el estudio del efecto del estrés térmico se realizaron ensayos de diluciones seriadas de esporas. Se sembraron alícuotas de 5  $\mu$ l de con  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  conidios recién recogidos alineadas en ese orden en cajas de Petri con medio DGasn. El choque térmico se provocó sumergiendo la parte inferior de las cajas durante 1 hora en un baño a 42°C, 45°C, 55°C o 60°C. Las incubaciones a alta temperatura se realizaron inmediatamente después de inocular o tras un periodo de pre-germinación de 4 horas a 25°C, obteniéndose resultados similares con ambos métodos. Las cajas se fotografiaron tras 3 días de incubación a 25°C.

## 8.2 Estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se usaron tres métodos distintos para estudiar la sensibilidad de los mutantes *acy<sup>-</sup>* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (1) El primer método consistió en sembrar diluciones seriadas de conidios recién recogidos, según el protocolo descrito en el apartado anterior, en medio sólido DGasn suplementado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 1 mM. (2) El segundo método consistió en incubar esporas frescas sin germinar (a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml) en medio DGasn líquido, suplementado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 5 mM, durante 2 horas a 25°C o en medio DGasn sin suplementar (control). Posteriormente, se sembraron alícuotas en medio CM (igual al CMC pero sin carboxicelulosa), se incubaron en las cajas de Petri durante 2 días a 25°C, y finalmente se contaron las colonias. El porcentaje de supervivencia se calculó dividiendo el número de colonias obtenidas tras el tratamiento entre el número de colonias aparecidas en las cajas control. (3) El tercer método consistió en cortar pequeños bloques de agar de tamaño similar que contenían micelio de cada una de las estirpes incubadas en medio CM sólido durante 2 días. Los bloques se transfirieron a cajas de Petri con medio DG suplementado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 50 o 100 mM o a cajas de Petri con medio CM sin suplementar (control). Las cajas se incubaron durante 3 días a 25°C, y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial dividiendo el diámetro de la colonia crecida en medio suplementado entre el diámetro de la colonia crecida en el medio control.

## 8.3 Estrés por metales pesados

Se empleó el método (3) descrito en el apartado anterior, salvo que en este caso los ensayos se realizaron en cajas de Petri suplementadas con CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a una concentración final de 3 mM o CdSO<sub>4</sub>·8/3H<sub>2</sub>O a una concentración final de 1 mM.

## 9. Determinación del contenido de glicerol

Las estirpes se incubaron en matraces de 250 ml con 100 ml de medio DGasn líquido, inoculados con 10<sup>7</sup> conidios recién recogidos. Las incubaciones se realizaron a 30°C en un agitador orbital a 150 rpm durante 3

días. Transcurrido este tiempo, se tomó del cultivo una alícuota de 15 ml (tiempo 0), se filtró con papel Whatman estéril y el micelio retenido en el filtro se lavó abundantemente con agua estéril para eliminar restos de medio de cultivo, tras lo cual se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A los 85 ml de cultivo restantes cultivo se les añadió 33,3 ml de NaCl al 30% (concentración final de 0,68 M) y se tomaron muestras de 15 ml de cultivo a los 30 y 60 minutos. Las muestras se trataron de la misma forma y se almacenaron igualmente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para determinar el contenido de glicerol, los micelios congelados se liofilizaron y se trituraron muestras de 10 mg en un mortero añadiendo nitrógeno líquido. De esta forma se obtuvo un polvo fino y homogéneo que se disolvió en 1 ml de agua doblemente destilada. Las muestras se calentaron a  $96^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y se utilizaron para el análisis espectrofotométrico del contenido en glicerol utilizando el kit comercial Glycerol Enzymic Bio Analysis Kit (Boehringer Mannheim/R-Biopharm AG) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **10. Métodos de transformación de células**

### **10.1 Transformación de *E. coli***

#### **10.1.1 Preparación de células competentes**

Se utilizaron células DH5- $\alpha$  y XL1-Blue. En el caso de DH5- $\alpha$ , las células se sometieron al protocolo descrito por Inoue (Inoue, Nojima et al. 1990). Se inocularon 200 ml de medio SOC en un matraz de 1 l con 1 ml de cultivo de *E. coli* en fase estacionaria, se mantuvo en agitación a  $22^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0,5 y se enfrió en hielo durante 10 min. Las células se centrifugaron a 2.500 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se resuspendieron en 80 ml de tampón ITB (PIPES 10 mM,  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  55 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  15 mM y KCl 250 mM, pH 6,7) enfriado en hielo y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Las células se recogieron manteniendo el frío y se resuspendieron en 20 ml de ITB preenfriado en hielo. Finalmente se añadieron 1,5 ml de DMSO y se repartieron en alícuotas de 0,2 ml, las cuáles se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



En el caso de las células XL1-Blue, se utilizó el protocolo descrito por Chung (Chung, Niemela et al. 1989). Las células se incubaron en medio LB hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,4 y se centrifugaron a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C. A continuación se resuspendieron en 1/10 del volumen original del cultivo en solución de almacenamiento y transformación (TSS) a 4°C. Finalmente las células se alicuotaron y se usaron directamente o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### **10.1.2 Transformación de células competentes de *E. coli***

Se añadieron entre 1 y 5  $\mu$ l de la solución de ADN procedente de una ligación estándar o 1  $\mu$ l de plásmido purificado a 100  $\mu$ l de células competentes y se incubaron 30 min en hielo. Posteriormente, la mezcla se sometió a un choque térmico de 42°C durante 45 s y se transfirió inmediatamente a hielo durante 2 min. A continuación se añadió 1 ml de LB, se agitó por inversión y se incubó a 37°C durante una hora para permitir la expresión el gen de resistencia, y se sembraron en dos cajas de Petri con el medio selectivo adecuado. En la primera se sembraron 100  $\mu$ l del volumen total de la transformación, y en la segunda se sembraron el resto de las células tras ser concentradas por centrifugación.

#### **10.2 Transformación de *S. cerevisiae***

La estirpe DSY-5 se incubó en un matraz de 100 ml con 50 ml de YPD, inoculado con varias colonias tomadas con un asa de siembra de una caja de Petri de menos de 2 semanas de antigüedad. La incubación se realizó a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{546}$  entre 0,6 y 0,8. En caso de superar la  $DO_{546}$  de 0,8 se diluyó hasta una  $DO_{546}$  de 0,2 y se volvió a incubar. A continuación se centrifugaron las células durante 5 min a 2.500 g, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 25 ml de H<sub>2</sub>O. Tras una nueva centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2,5 ml de H<sub>2</sub>O. A continuación se prepararon 720  $\mu$ l de mezcla PEG/LiCl master mix, que contienen PEG 4000 al 50%, 108  $\mu$ l de LiCl 1M y 75  $\mu$ l de ADN de esperma de salmón 2mg/ml. A 300  $\mu$ l de esta solución se añadieron 1,5  $\mu$ g del plásmido y se agitó en vórtex. Tras homogenizar la mezcla, se añadieron 100  $\mu$ l de las células previamente resuspendidas en agua, y se volvió a agitar

en vórtex para asegurar una mezcla homogénea. Posteriormente se incubó a 42°C durante 45 min, se centrifugaron las células a 700 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500 µl de YPD y se incubaron a 30°C durante 90 min en agitación (200 rpm). Finalmente, se centrifugaron los cultivos a 700 g durante 5 min, se resuspendieron las células en 500 µl de NaCl al 0,9% y se sembraron 100 µl en cajas de Petri con medio YPD suplementado con el antibiótico adecuado. Las cajas se mantuvieron durante 3 días a 30°C hasta obtener transformantes que mostraran un crecimiento robusto.

### 10.3 Transformación de *Fusarium*

#### 10.3.1 Preparación de protoplastos

Se inocularon  $10^8$ - $10^9$  conidios en 100 ml de medio YPED-2G en matraces de 500 ml y se incubaron a 25°C en agitación. El tiempo de germinación osciló entre 11 y 15 horas dependiendo de la estirpe. Tras 10 horas de incubación, se controló la germinación hasta que las germínulas alcanzaron una longitud entre cinco y siete veces superior al tamaño del conidio. Las germínulas se filtraron a través de un embudo con papel Whatman previamente humedecido con NaCl 0,7 M en un quitasato conectado a un sistema de vacío. Las germínulas se recogieron con una espátula esterilizada con alcohol y llama, se depositaron sobre una caja de Petri y se mezclaron con 5 ml de solución enzimática (10 g l<sup>-1</sup> de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*, 25 g l<sup>-1</sup> de Driselasa de basidiomicetos y 50 mg l<sup>-1</sup> de quitinasa de *Streptomyces griseus* en NaCl 0,7 M, todas las enzimas obtenidas de Sigma-Aldrich). Las germínulas se disolvieron tomando y soltando volumen con la pipeta, se recogieron los 5 ml en un matraz de 100 ml estéril tapado con algodón y se repitió el proceso dos veces para lavar la caja de Petri recogiendo el máximo número de germínulas en el matraz de 100 ml. El matraz se incubó a 30°C en agitación suave (40 rpm) durante 30-60 min. Pasado este tiempo se comprobó la aparición de protoplastos mediante observación al microscopio, prolongándose la incubación durante 30 minutos adicionales en caso de no observarse en número suficiente.

Los protoplastos se separaron de las hifas pasando la mezcla a través de dos filtros de borosilicato humedecido con NaCl 0,7 M, en primer lugar con un filtro de tamaño de poro 0 y después con uno de tamaño 1 (Robu borosilicat 3,3, 50 ml). El último filtrado se pasó a un tubo Falcon de 50 ml y se completó con NaCl 0,7 M hasta un volumen de 50 ml. Los protoplastos se centrifugaron en una balanza basculante (Cencom, JP Selecta) a 1.500 rpm durante 10 min a 20°C. El sobrenadante se eliminó con una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío, se añadieron 50 ml de NaCl 0,7 M y se volvió a centrifugar durante otros 10 min. Tras eliminar de nuevo el sobrenadante, los protoplastos se resuspendieron en 50 ml de solución STC 1X (Sorbitol 1,2 M, Tris HCl 10 mM pH 8 y CaCl<sub>2</sub> 50 mM) y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El sobrenadante se eliminó con una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío y el precipitado se resuspendió en 200 µl de STC 1X. Los protoplastos se contaron en una cámara de Bürker y se diluyeron a una concentración de  $2 \times 10^8$  protoplastos ml<sup>-1</sup>. Aunque la solución se puede almacenar a -80°C hasta su uso añadiendo DMSO y PEG 30% (concentraciones finales de 0,1% y 0,01% v/v, respectivamente), en el desarrollo de esta Tesis se transformaron protoplastos recién preparados.

### 10.3.2 Transformación de protoplastos

Para transformar protoplastos, se preparó un tubo de 1,5 ml con 50 µl de STC 2X, se añadieron 20-40 µg de ADN plasmídico y se completó con H<sub>2</sub>O hasta 100 µl. A esta solución se le añadieron 100 µl de protoplastos diluidos a una concentración de  $2 \times 10^8$  protoplastos ml<sup>-1</sup>. En paralelo, se preparó un tubo control al que se añadieron 100 µl de STC 1X y 100 µl de protoplastos. Para minimizar el daño físico a los protoplastos, las manipulaciones con pipeta se llevaron a cabo con puntas desechables cuyo extremo se cortó con anterioridad a su autoclavado. A las mezclas obtenidas se les añadieron 50 µl de PEG 30%, se mezclaron por inversión y se mantuvieron durante 20 min a temperatura ambiente. Mientras tanto se preparó agar de cobertera para regeneración de los protoplastos y se mantuvo a 50°C para facilitar el proceso de siembra posterior. La mezcla de transformación se pasó a un tubo de 10 ml y se añadieron 2 ml de PEG 30%, se mezcló por inversión y se mantuvo durante

5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 4 ml de STC 1X, se mezcló cuidadosamente y se centrifugó 5 min a 1.800 rpm. El sobrenadante se eliminó con una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío, dejando aproximadamente 200  $\mu$ l para mezclar el precipitado cuidadosamente con una pipeta. Se añadieron 100  $\mu$ l de la mezcla de transformación a 4 ml de agar de cobertera, se mezcló bien y se esparció sobre el medio de regeneración. A cada una de las cajas de Petri, incluyendo un control sometido al mismo proceso pero sin ADN, se le añadieron 4 ml de agar de cobertera con 140  $\mu$ l de higromicina (50 mg ml<sup>-1</sup>) o 30  $\mu$ l de geneticina G-418 (200 mg ml<sup>-1</sup>) y se incubaron 12 horas para permitir la expresión de los genes de resistencia al antibiótico. Como control de regeneración de los protoplastos, éstos se sembraron en un medio al que se añadió agar de cobertera sin antibiótico.

## 11. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

### 11.1 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala (*miniprep*)

Para la obtención de pequeñas cantidades de ADN se utilizaron dos métodos. El primero se basó en el protocolo de Stephen *et al.* (Stephen, Jones et al. 1990) derivado del método de lisis alcalina (Sambrook and Russell 2001). Se inocularon entre 2 y 4 ml de LB suplementado con el antibiótico adecuado con una colonia de la estirpe correspondiente de *E. coli* y se incubaron a 37°C durante una noche. Se centrifugaron 1,5 ml del cultivo en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200  $\mu$ l de una solución de Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y 10 mg l<sup>-1</sup> ARNasa (solución I), previamente enfriada en hielo. Las células se lisaron añadiendo 200  $\mu$ l de una solución de NaOH 0,2 M y 10 g l<sup>-1</sup> SDS (solución II). E invirtiendo el tubo varias veces hasta aclarar la suspensión. A continuación se añadieron 200  $\mu$ l de acetato potásico 1,32 M, pH 4,8 (solución III), se homogenizó la mezcla y se centrifugó durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf procurando no arrastrar restos sólidos. Para precipitar el ADN se añadieron 450  $\mu$ l de isopropanol, se mezcló y se centrifugó durante 5 min. Para lavar el precipitado se añadieron

200 µl de etanol 70 % a -20°C y se centrifugó durante 5 min. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se secó el precipitado y se resuspendió el ADN en 18-20 µl de agua milliQ.

En caso de necesidad de ADN plasmídico de mayor pureza se utilizó el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems de PROMEGA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **11.2 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* a gran escala (*maxiprep*)**

En caso de necesidad de cantidades elevadas de DNA, se utilizó este protocolo, que permite obtener cantidades de ADN superiores a 500 µg. Todos los pasos de este protocolo se llevaron a cabo en frío.

Se inocularon cultivos de 50 ml de LB con la estirpe de interés, se incubaron durante una noche a 37°C en agitación y se centrifugaron en tubos Falcon a 4.500 rpm durante 5 min. El precipitado se resuspendió en 1,6 ml de solución I (ver apartado anterior) y se mantuvo en hielo durante 5 min. Se añadieron 3,2 ml de solución II, se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 5 min. Para neutralizar, se añadieron 2,4 ml de solución III, mezclando por inversión y centrifugando a 4500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se filtró a un tubo Falcon pasándolo por papel Whatman estéril y se añadieron 6,4 ml de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar los restos orgánicos, se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 4.500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio de 50 ml y el ADN se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol 96% frío y manteniendo la preparación a -80°C durante 1 h. Posteriormente se centrifugó la muestra, y se lavó el precipitado con etanol 70% frío. Tras una última centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el ADN durante 2 h a 37°C y se resuspendió en 100-1000 µl de H<sub>2</sub>O milliQ en hielo.

### **11.3 Extracción de ADN genómico de *Fusarium***

En los casos en los que se necesitó ADN poco concentrado pero de gran pureza, tales como reacciones de PCR, se utilizó el kit Gen Elute Plant Genomic DNA miniprep (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la obtención de ADN a gran escala se siguió un protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (Sambrook and Russell 2001). Las estirpes se incubaron a 30°C en agitación a 150 rpm durante 3 días en matraces de 250 ml con 100 ml de medio líquido DGasn, inoculados con 10<sup>6</sup> conidios. Transcurrido este tiempo, el micelio se recogió por filtración, se lavó con agua destilada estéril y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. El micelio congelado se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Sin permitir su descongelación, el polvo se resuspendió inmediatamente en 7 ml de solución de extracción (Tris-HCl 50 mM y EDTA 20 mM, pH 7,5 en hielo) en un tubo Falcon, se añadieron 0,5 ml de SDS 10%, y se mezcló por inversión. A continuación se incubó durante 30 min a 65°C, se añadieron 2 ml de solución neutralizante (acetato potásico 5 M), se enfrió la mezcla en hielo durante 60 min y se centrifugó 10 min a velocidad máxima en una centrífuga a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de 50 ml, al que se añadieron 2 volúmenes de etanol 96° y se mantuvo durante 1 hora a -80°C para acelerar la precipitación del ADN. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó durante 20 min a velocidad máxima a 4°C, se lavó el precipitado con 1 volumen de etanol 70% frío y se resuspendió el ADN en 3 ml de agua. Para mejorar la calidad del ADN obtenido, la muestra se trató con ARNasa para eliminar el ARN. Para ello se añadieron 5 µl de ARNasa (20 µg ml<sup>-1</sup>) y se incubó a 37°C durante 30 min. Tras el tratamiento con ARNasa se volvió a precipitar el ADN con 1 volumen de isopropanol, se lavó con etanol 70% y se resuspendió el precipitado en 3 ml de H<sub>2</sub>O. Con el fin de eliminar restos de proteínas y restos orgánicos, se añadieron 5 ml de fenol, se mezcló, se centrifugó para separar las dos fases y se recuperó la fase superior. La muestra recuperada se lavó con 1 volumen de cloroformo, se volvió a centrifugar y se recuperó de nuevo la fase superior tras la centrifugación. Finalmente se precipitó el ADN añadiendo 2 volúmenes de etanol 96° frío, se centrifugó, se lavó con etanol 70% frío y tras centrifugar se dejó secar el precipitado a 37°C. Finalmente se añadieron entre 50 y 500 µl de H<sub>2</sub>O milliQ, se resuspendió el ADN se determinó su concentración espectrofotométricamente y se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### **11.4 Extracción de ARN total de *Fusarium***

Se extrajo ARN total usando el RNeasy mini Kit (QUIAGEN), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

#### **11.5 Manipulación de ácidos nucleicos**

##### **11.5.1 Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos**

Para cuantificar las concentraciones de oligonucleótidos, plásmidos, ADN genómico y ARN total, las medidas espectrofotométricas se hicieron con un equipo Nanodrop 3.0.1 (Coleman Technologies Inc., Orlando, Florida, EEUU). Las concentraciones de fragmentos de ADN disueltos en pequeños volúmenes se estimaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y tinción con bromuro de etidio (Sambrook and Russell 2001). La fluorescencia de las bandas de ADN, separadas en el gel, se comparó con la de bandas de una cantidad conocida de ADN del fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*.

##### **11.5.2 Manipulación enzimática del ADN**

Las enzimas empleadas para digerir ADN, rellenar extremos cohesivos de fragmentos lineales o ligarlos, se adquirieron a las compañías Amersham Biosciences, New England BioLabs, Fermentas, Takara y Roche.

##### **11.5.3. Digestiones con enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las recomendaciones, protocolos y tampones proporcionados por el propio fabricante. Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron en volúmenes de 20  $\mu$ l incubadas durante 1-2 h a la temperatura recomendada para cada enzima. Para los ensayos de hibridación de Southern se digirieron muestras de unos 10  $\mu$ g de ADN genómico con aproximadamente 20 unidades de enzima durante una noche en un volumen final de 200  $\mu$ l. Antes de su separación por electroforesis, las muestras se inactivaron por alta temperatura. Cuando la inactivación no era posible, se precipitó el ADN añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol 96%. Posteriormente se centrifugaron a velocidad máxima en frío, se lavaron con 200 ml de etanol 70% frío, se secaron y se resuspendieron en un volumen adecuado de agua milliQ (normalmente 50  $\mu$ l) para su carga en un gel de electroforesis.

#### **11.5.4 Rellenado de extremos uncatenarios de moléculas de ADN**

A fin de obtener moléculas con extremos romos, los fragmentos de restricción con extremos 3' uncatenarios protuberantes y los productos de las reacciones de PCR se trataron con el fragmento Klenow de la polimerasa de ADN (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **11.5.5 Ligaciones**

Las ligaciones de fragmentos de ADN se realizaron en volúmenes de 20 µl utilizando 1 µl de ligasa de T4 y un tampón “quinasa” comercial con ATP 3 mM (Sambrook and Russell 2001). Las ligaciones se llevaron a cabo durante una noche a 16°C entre fragmentos con extremos cohesivos y a temperatura ambiente entre fragmentos con extremos romos.

#### **11.5.6 Desfosforilación de ADN**

Para desfosforilar fragmentos de ADN, principalmente plásmidos digeridos con enzimas de restricción para su uso posterior para clonación, se utilizó fosfatasa alcalina (Takara Bio Inc, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante. A 17 µl de ADN se añadieron 10 unidades de fosfatasa alcalina y 2 µl del tampón 10x proporcionado por el fabricante. La desfosforilación se llevó a cabo durante al menos 1 h a 37°C.

#### **11.5.7 Tratamiento con ADNasa**

Para eliminar ADN contaminante de muestras de ARN se utilizó el kit rDNase I RNase-Free (USB) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN se mezcló con 2 u de ADNasa I, tampón comercial 10x y H<sub>2</sub>O en un volumen final de 18 µl. Esta mezcla se incubó durante 15 min a 25°C. Para inactivar la enzima, se añadieron 2 µl de solución de parada y se incubó 10 min a 65°C.

#### **11.5.8 Síntesis de ADN complementario**

Las muestras de ADNc se prepararon a partir de ARN total con la enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, 1 µg de ARN se mezcló con H<sub>2</sub>O, oligómeros dT16 y dNTPs en un volumen final de 13 µl. La mezcla se incubó 5 min a 65°C, se enfrió en hielo 1 min, y finalmente se añadieron el tampón comercial (10x), ditioneitol (DTT), inhibidor de ARNasa y enzima transcriptasa inversa. La retrotranscripción se llevó a cabo incubando la mezcla a 50°C durante 50 min, y la reacción se detuvo incubando 15 min a 70°C.



## 11.6 Electroforesis de ácidos nucleicos

### 11.6.1 Electroforesis de ADN

Las muestras de ADN se cargaron en geles de agarosa de baja electroendo-ósmosis (Agarosa D1 baja EEO, Pronadisa). La concentración de agarosa fue de 0,8% ó 1% (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, de acuerdo con las recomendaciones de Sambrook *et al.* (2001).

Los geles de agarosa se prepararon con tampón TAE (Sambrook *et al.*, 2001) y las electroforesis se realizaron en el mismo tampón en cubetas de electroforesis (Ecogen, Barcelona) conectadas a una fuente de alimentación (Pharmacia, modelo EPS 200). Como marcadores de tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III o un marcador comercial de 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). Las bandas de ADN se visualizaron con bromuro de etidio presente en el propio gel de agarosa o, en algunos casos, sumergiendo el gel en una solución de 5 mg l<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. Los geles teñidos se expusieron a radiación ultravioleta en un transiluminador (UVP) y se fotografiaron mediante un equipo de análisis de imagen ImageStore 5000 (UVP), dotado de una impresora UP-895MD/LE (Sony). Los fragmentos destinados a la secuenciación o a la construcción de vectores de expresión se visualizaron con una fuente de mano de radiación UV de longitud de onda larga (312 nm) para evitar mutaciones en la secuencia de ADN.

### 11.6.2 Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Con anterioridad al protocolo de aislamiento, se cargó en un gel de agarosa una pequeña alícuota de la solución de ADN a purificar para comprobar su integridad, concentración y tamaño mediante visualización en transiluminador. El resto del volumen de la muestra se cargó en un nuevo gel, los fragmentos de ADN de interés se visualizaron con la lámpara UV de mano, se separaron cortando pequeños bloques de agarosa con una cuchilla limpia y se extrajo el ADN de los mismos mediante kits comerciales. Se emplearon para este fin dos kits distintos, basados en el uso de columnas de purificación, siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) se usó para protocolos rápidos y

cantidades pequeñas de ADN, mientras que el kit GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) se utilizó para cantidades mayores de ADN.

## **11.7 Detección de secuencias de ADN mediante la técnica de Southern**

### **11.7.1 Marcaje de sondas de ADN con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP**

Para la preparación de sondas se emplearon 100 ng de ADN aislado y purificado a partir de un gel de agarosa. Las muestras se marcaron con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP mediante la técnica de cebadores aleatorios (*random priming*) con una mezcla de desoxinucleótidos ([ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP, dATP, dTTP, dGTP 0,5 mM), hexanucleótidos aleatorios y el fragmento Klenow. Cada vez que se marcó una sonda, se marcaron en paralelo 50 ng de escalera 1kb Plus DNA Ladder del fago  $\lambda$  como referencia del tamaño de las bandas.

### **11.7.2 Transferencia de ADN a membranas de hibridación**

Tras proceder a la digestión enzimática de las muestras de ADN a transferir, inactivar las digestiones y correr las muestras en un gel de agarosa, éste se sumergió sucesivamente 10 min en HCl 0,25 M, o hasta que la banda azul correspondiente al tampón de carga virase a un color amarillento, dos veces durante 15 min en una solución desnaturalizante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) y una vez durante 15 min en una solución neutralizante (Tris 1 M pH 8, NaCl 1,5 M). Antes de pasar el gel a cada una de las soluciones, se sumergió en agua destilada para asegurar la ausencia de restos de las soluciones anteriores. Finalmente, el ADN se transfirió a un filtro de nailon Hybond (Amersham) por capilaridad empleando una solución SSC 20X (SSC: NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM, pH7; (Sambrook and Russell 2001). La transferencia se llevó a cabo durante una noche, asegurando que la cubeta contuviera en todo momento solución de transferencia. Una vez transferido el ADN, se fijó a la membrana irradiando su superficie durante 30-45 s con 700 J m<sup>-2</sup> de radiación UV con un equipo cross-linker RPN 2500 (Amersham). La membrana fijada se almacenó hasta su uso envuelta en papel de aluminio a 4°C. El tiempo de almacenamiento fue siempre inferior a 2 semanas.

### 11.7.3 Hibridación de ADN transferido a membrana

Las membranas Hybond previamente fijadas se incubaron durante 30 min en un horno a 65°C con 25 ml de solución de prehibridación ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,5 M y SDS 7%, pH 7), igual a la de hibridación pero sin sonda. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de prehibridación y se añadieron otros 20 ml de la misma solución, precalentada en un horno a 65°C. Al mismo tiempo, las sondas marcadas radiactivamente se hirvieron a 100°C durante 5 minutos, se añadieron a la solución de prehibridación con la membrana y se dejó hibridando a 65°C una noche. Tras la hibridación, se retiró la solución de hibridación y se eliminaron los restos de sonda libre añadiendo 20 ml de solución de lavado (SSPE al 0,1 %, SDS al 0,5 % y EDTA 5 mM) precalentada a 55°C e incubando durante 5 minutos a 65°C. A continuación se eliminó la solución de lavado y se repitió este paso, incubando en este caso a 65°C durante 1 hora. Finalmente se dejó secar la membrana, se comprobó la presencia de radiactividad con un contador Geiger, se protegió con un *film* transparente y dos láminas de acetato, se introdujo en un *cassette* de exposición y se guardó a -80°C hasta su revelado.

### 11.7.4 Detección

La hibridación se detectó en el *cassette* exponiendo la membrana a película Kodak Biomax MS Scientific Imaging Film (Kodak). Durante la exposición, el *cassette* se mantuvo durante el tiempo necesario a -80°C envuelto en plástico oscuro para evitar la entrada de luz. Los tiempos de exposición dependieron de la intensidad del marcaje de la película, fluctuando entre 5 y 24 h. Para el revelado de la película, ésta se sumergió sucesivamente en soluciones de revelado, lavado y fijación siguiendo protocolos estándar de fotografía. El revelado se mantuvo bajo luz roja hasta la aparición de bandas.

### 11.7.5 Deshibridación de membranas marcadas

Para reutilizar las membranas fijadas y marcadas radiactivamente, estas se lavaron dos veces durante 20 min y una vez durante 60 min con solución de deshibridación (composición por litro: 5 ml de SSPE 20X, 10 ml de

SDS 10% y 985 ml de H<sub>2</sub>O), previamente llevada a ebullición). Tras un lavado final con agua para retirar los restos de solución, la membrana se secó con papel Whatman, se comprobó la ausencia de radiactividad con un contador Geiger y se almacenó en frío para futuros usos.

### 11.8 Reacciones de PCR

Para amplificar ADN genómico o plasmídico se utilizaron varias polimerasas de ADN dependiendo del uso posterior de las secuencias amplificadas. Así, para las reacciones de exigían mayor fidelidad de replicación, se empleó la enzima Expand High Fidelity PCR system (Roche), y para el resto de reacciones se utilizó la polimerasa EcoTaq (Ecogen, Barcelona). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 20 µl con 15-50 ng de ADN, dNTPs 0,2 mM, 2 µl de tampón comercial con MgCl<sub>2</sub> 15 mM, 1 µM de cada cebador y 0,2-1 U de polimerasa. La mezcla de reacción se incubó a 94°C durante 2 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización (30 s a 94°C), hibridación (30 s a 45-65°C, dependiendo de la temperatura de fusión de los cebadores) y polimerización (72°C durante un tiempo dependiente del tamaño del fragmento a amplificar, teniendo en cuenta una velocidad de la polimerasa de 1kb/min). Finalmente se realizó un paso de polimerización 5 min a 72°C. Para fragmentos mayores de 3 kb, se usó 68°C como temperatura de polimerización, y se modificó la concentración de MgCl<sub>2</sub> siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima.

Para comprobar transformaciones de *E. coli*, se utilizó el protocolo descrito arriba pero utilizando cultivo bacteriano como fuente de ADN. Para ello, una vez preparada la mezcla de PCR se tocó la colonia a comprobar con un palillo de dientes estéril, replicándola previamente en una caja de Petri con medio selectivo, y se sumergió la punta del palillo en la mezcla de PCR para liberar biomasa.

En algunos casos, la técnica de PCR se utilizó para comprobaciones preliminares de posibles transformantes de *Fusarium*. En estos casos, en el protocolo de PCR se utilizó como ADN molde una alícuota de una solución de ADN genómico del hongo. Para obtener esta solución, se tomó un fragmento (aproximadamente 1-2 mm<sup>2</sup>) de micelio de una colonia del hongo con pinzas

esterilizadas con alcohol y llama, se añadió a 40  $\mu\text{l}$  de solución SPZ (composición por ml: 600  $\mu\text{l}$  sorbitol 2 M, 125  $\mu\text{l}$  zymoliasa 20  $\text{mg ml}^{-1}$ , 100  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1M y 175  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ), y se incubó durante 30 min a 37°C. A continuación la muestra se hirvió a 100°C en un termobloque durante 10 min, se enfrió 5 min en hielo y se centrifugó durante 1 min en una microcentrífuga a velocidad máxima. Para la reacción de PCR se utilizaron 5  $\mu\text{l}$  del sobrenadante.

### 11.9 PCR a tiempo real (RT-PCR)

Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron con el sistema en dos pasos de Roche. La síntesis de ADNc se llevó a cabo como se describe en la sección 11.4.8. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en un equipo Light Cycler 480 (Roche) con el kit Light Cycler 480 SYBR Green Master I, en volúmenes de 10  $\mu\text{l}$ . A cada pocillo se añadieron 50 ng de ARN (2  $\mu\text{l}$  de una solución de 25  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ), 0,4  $\mu\text{M}$  de oligonucleótidos cebadores (0,4  $\mu\text{l}$  de una solución 10  $\mu\text{M}$ ), 5  $\mu\text{l}$  de 1X SYBR Green I Master Hot Start PCR Mix (contiene FastStart ADN Polimerasa Taq, tampón de reacción, mezcla de dNTPs, SYBR Green y  $\text{MgCl}_2$ ) y 2,6  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. Se utilizó el programa de amplificación recomendado por el fabricante, consistente en un paso de preincubación de 5 min a 95°C, 45 ciclos de amplificación y cuantificación (10 s a 95°C, 10 s a 60°C, y 10 s a 72°C). Una vez terminada la reacción se llevó a cabo un paso de disociación para analizar la curva y constatar la amplificación de un solo producto. Los cebadores utilizados se diseñaron con el programa *Primer Express*<sup>TM</sup> V2.0.0 (Applied Biosystems) se obtuvieron comercialmente en grado HPLC (StabVida, Oeiras, Portugal). El gen de la  $\beta$ -tubulina de *F. fujikuroi* se utilizó como control de expresión constitutiva. La expresión relativa de cada gen se calculó con el método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ .

## 12. Extracción y manipulación de metabolitos secundarios de *Fusarium*

### 12.1 Extracción y análisis de carotenoides

#### 12.1.1 Carotenoides totales

Las muestras de micelio se separaron del medio, se congelaron, se liofilizaron, se pesaron y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su extracción. Las extracciones se realizaron con muestras de aproximadamente 50 mg, que se pasaron a tubos de 2 ml con tapón de rosca con una pequeña cantidad de arena de playa (suficiente para cubrir el cono inferior del tubo) y 500  $\mu\text{l}$  de acetona. Las muestras se rompieron en un homogeneizador de células (Fastprep-24, Biomedicals), sometiendo los tubos a dos pulsos de 30 s a máxima velocidad ( $6,5 \text{ m s}^{-1}$ ), se centrifugaron durante 1 min a 13.000 rpm y se recogió la acetona que contenía el pigmento. Se repitió este proceso hasta la pérdida completa de color del micelio y la acetona en la extracción. La muestra de acetona así obtenida se secó en una centrífuga de vacío (Speedvac, Eppendorf) a una temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ . Los extractos se resuspendieron en n-hexano y se determinaron sus espectros de absorción entre 350 y 650 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640, (Beckman Coulter, Follerton, California, EEUU). La concentración de carotenoides totales se calculó a partir de los espectros de absorción en n-hexano, utilizando el valor de absorbancia máxima y un coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  medio de  $250 \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ l}$ .

#### 12.1.2 Separación de carotenoides polares y neutros

Las muestras de carotenoides totales se pasaron por óxido de aluminio, el cual absorbe la fracción de carotenoides polares. Para ello se introdujo en una punta desechable de 1 ml un pequeño fragmento de papel de celulosa, de aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$ . A continuación se lavó con éter de petróleo y sin dejar que éste cayera totalmente se añadió  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , previamente activado y sumergiéndolo en éter de petróleo, hasta alcanzar aproximadamente una altura de 0,5 cm. Cuando el volumen de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  estuvo perfectamente asentado sobre el cierre de celulosa en la punta, se añadió la muestra de caroteno total

resuspendida en n-hexano. A partir de este momento se recogió todo el eluyente de la columna. Una vez absorbida la muestra en la capa de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , se lavaron los carotenos neutros con éter dietílico, quedando los carotenoides polares atrapados en la superficie de la muestra de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . El eluyente se recogió en un tubo Eppendorf y se secó en la centrífuga de vacío Speedvac a una temperatura de  $45^\circ\text{C}$ .

Los extractos neutros se resuspendieron en el mismo volumen de n-hexano en el que se midió la absorbencia de la muestra original y se determinaron sus espectros de absorción entre 350 y 650 nm en el espectrofotómetro Beckman, DU 640. La concentración de carotenoides neutros se estimó a partir de sus espectros de absorción en n-hexano utilizando el valor de absorbancia máxima y un coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  medio de  $250 \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ l}$ . El contenido de carotenoides polares se estimó restando del valor obtenido para carotenoides totales el valor calculado para carotenoides neutros.

## **12.2 Extracción y análisis de giberelinas**

### **12.2.1 Análisis mediante HPLC**

Las determinaciones de giberelinas se llevaron a cabo directamente del medio de cultivo. Para ello, los cultivos se filtraron para separar el micelio del medio líquido, se acidificaron a pH 2,5 con HCl 10 M y se pasaron alícuotas de 1 ml a tubos de polipropileno de 10 ml. Para extraer las giberelinas se añadieron 1,5 volúmenes de acetato de etilo, se mezclaron por agitación en Vortex durante 30 s, y se centrifugaron a velocidad máxima durante 1 minuto para separar las dos fases. La fase de acetato de etilo se pasó a otro tubo y el proceso de extracción se repitió 3 veces.

Una vez extraída la muestra, se añadió a la fracción de acetato de etilo un volumen equivalente a unos 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sólido, se agitó intensamente, se centrifugó a velocidad máxima durante 1 min para precipitar el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se pasó el sobrenadante a un tubo limpio evitando arrastrar precipitado. La muestra resultante se filtró a través de un filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ , se secó en la centrífuga de vacío Speedvac y se resuspendió en 60  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo grado HPLC. Se inyectaron volúmenes de 10  $\mu\text{l}$  de muestra en un equipo de HPLC Hewlett Packard Series 1100 (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA) equipado con un desgasificador G1322A, una bomba cuaternaria G1311 y un diodo detector G1315A. La separación se llevó en una columna ProntoSIL Spheribond ODS octadecyl-silyl (tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm; Bischoff Chromatography, Leonberg, Alemania). Como fase móvil se utilizó una mezcla 60:40 de acetonitrilo grado HPLC y una solución de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 0,01%, con un flujo de 0,6  $\text{ml min}^{-1}$ . Los contenidos de giberelinas se estimaron a partir de los picos de máxima absorbencia a 206 nm, usando como referencia soluciones de GA3 (Sigma) de concentración conocida.

### **12.2.2 Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC)**

Las giberelinas se extrajeron de muestras de 500  $\mu\text{l}$  de cultivo acidificado, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Las muestras extraídas y secas se resuspendieron en 2  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo y se cargaron en placas de capa fina de Silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemania), junto con un patrón de una solución de GA3 (Sigma). Como fase móvil se utilizó una mezcla 60:30:10 de benceno:alcohol n-butílico:ácido acético. La capa fina se dejó correr 5 minutos, se secó al aire y se roció con una mezcla de etanol:ácido sulfúrico concentrado (95:5). Posteriormente, se introdujo la placa en un horno a 80°C durante 5 min. Las giberelinas se visualizaron irradiando la placa con una lámpara UV a 254 nm (UVP).

## **12.3 Extracción y análisis de bikaverina**

### **12.3.1 Análisis espectrofotométrico**

Las extracciones se realizaron a partir de muestras de 50 mg de micelio previamente liofilizado. Se utilizaron cultivos incubados en oscuridad para evitar la presencia de carotenoides que pueden interferir con las medidas de bikaverina. Las muestras se extrajeron con cloroformo con el equipo Fastprep-24 ya descrito (sección 12.1.1) utilizando dos pulsos de 30 s a máxima velocidad (6,5 m/s) y se centrifugaron durante 1 min a 13.000 rpm, recogiendo en cada paso el cloroformo que contiene el pigmento. El procedimiento se repitió hasta la pérdida completa de color del micelio y el cloroformo en la extracción. El volumen resultante se secó en la centrífuga de vacío Speedvac a una temperatura de 45°C y los extractos se resuspendieron



en un volumen de cloroformo apropiado para la determinación su espectro de absorción en el espectrofotómetro Beckman DU 640, utilizándose para los cálculos un  $\epsilon_{521}$  de  $8.400 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

Para el análisis de bikaverina mediante cromatografía en capa fina, las muestras secadas en la centrífuga de vacío Speedvac, descritas en el apartado anterior, se resuspendieron en  $2 \mu\text{l}$  de cloroformo y se cargaron en una placa de TLC Silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemania). Como referencia se cargó en paralelo una muestra de bikaverina extraídas de la estirpe SG1 (Rodríguez-Ortiz et al, 2010). Como fase móvil se utilizó una mezcla 84:15:1 de cloroformo:acetona:ácido fórmico, y la TLC corrió durante 5 min.

### 13. Técnica de pinzamiento de membrana (“Patch-clamp”)

Los experimentos se llevaron a cabo sobre una mesa atenuadora de vibraciones (TMC, Peabody, EE. UU.). Para activar la rodopsina, se empleó como fuente de luz un láser de 561 nm (150 mW, Changchun New Industries Optogenetics Tech, Co., Ltd.). El haz de láser se acopló a un microscopio de fluorescencia invertido (Axiovert200, Zeiss, Jena, Alemania) y el tiempo de iluminación se controló a través de un obturador electrónico rápido (S3ZM2-NL, Vincent associates, Rochester, EE. UU.). El área iluminada por el haz ( $A_i$ ) se calculó mediante la fórmula:  $A_i = [(\text{campo de visión}/\text{magnificación})/2]^2 * \pi.$ , y se utilize un objetivo 63X con un campo de visión de 23 mm.

Para obtener los espectros de acción se utilizó una lámpara de XBO de 150 W iluminando a distintas longitudes de onda con una exposición constante de  $2 \times 10^5 \text{ fotones s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ . Las diferentes longitudes de onda se obtuvieron con filtros de interferencia de banda estrecha (420, 450, 470, 490, 510, 532, 560, 580, 600, 620 y 640 nm, ancho de banda de 10 nm, Andovor Corporation, Salem, EE. UU.) en combinación con filtros de densidad neutra. La energía lumínica se midió con un potenciómetro láser (Coherent Labmax, Power Max PS10Q). El orden de los filtros varió aleatoriamente durante las medidas para evitar que una cierta longitud de onda pudiera influir sobre la reacción de la proteína frente a la siguiente longitud de onda, lo que podría dar lugar a un espectro distorsionado.

Los datos obtenidos corresponden a corrientes de una célula íntegra, obtenidos con un amplificador Axopatch 200B acoplado a un interfaz DigiData 1440 (Molecular Devices Corporation, Union City, EE. UU.). Los experimentos se llevaron a cabo en una cámara de perfusión similar a la descrita por Terpitz *et al.* (Terpitz, Raimunda *et al.* 2008).

Para penetrar en las células, se usaron pipetas de vidrio con una apertura de 1.5  $\mu\text{m}$  (GB150F-8P, Scientific-Instruments, Hofheim, Alemania), que mostraron una resistencia de 3-5  $\text{M}\Omega$  en solución estándar. Se utilizó un protocolo estándar, que incluía voltajes desde -140 a +40 mV. Las células se situaron en una solución de NaCl 140 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM y HEPES 10 mM, pH 7.4. Para experimentos que implicaban un cambio de pH, se utilizó TRIS o MES en lugar de HEPES, y el pH se ajustó a 5 o 9 utilizando HCl, ácido acético o el hidróxido del catión correspondiente. En su caso, el NaCl fue sustituido por la misma cantidad de gluconato sódico, glutamato sódico, galacturonato sódico o por sulfato sódico 90 mM. El interior de la pipeta contenía una solución de NaCl 110 mM o gluconato sódico 110 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, EGTA 10 mM y HEPES 10 mM, pH 7.4. En algunos experimentos el pH se ajustó a 5 o 9 usando MES o TRIS respectivamente.

## 14. Microscopía

El análisis microscópico de las hifas descrito en el Capítulo 3 se realizó en cubreobjetos de vidrio colocados en cámaras Labtek II de 8 pocillos. Para asegurar la adhesión de las hifas a la superficie de los cubreobjetos, estos se trataron en el propio pocillo con NaOH 0,5 N durante 4 horas y se incubaron con 125  $\mu\text{l}$  de poli-D-lisina al 0.01% durante 24 horas. Posteriormente se lavaron los pocillos tres veces con agua destilada estéril y se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de medio DGgln líquido. Los pocillos se inocularon con  $5 \times 10^3$  esporas frescas de la estirpe a estudiar y la cámara de cultivo se incubó a 28°C durante unas 17 horas en iluminación continua. Transcurrido este periodo, las muestras se fijaron añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de formaldehído al 4% en PBS pH 7 y se almacenaron en PBS a 4°C protegidas de la luz hasta su uso. El análisis de las muestras se llevó a cabo con un microscopio confocal (Leica SP2, Wetzlar, Alemania) o con

un microscopio de fluorescencia (Olympus IX71, Hamburg, Alemania) equipado con una cámara EMCCD (Andor, Belfast, Reino Unido).

Los ensayos de germinación se llevaron a cabo en cámaras de 24 pocillos con cubreobjetos de vidrio tratados de manera análoga a lo descrito en el párrafo. Se inocularon  $5 \times 10^4$  conidios frescos en cada pocillo, a los que previamente se añadieron 500  $\mu$ l de medio DA líquido con pH ajustado a 5. Para documentar el desarrollo de la germinación de conidios de las estirpes objeto de estudio se utilizó un microscopio invertido (Axiovert200, Zeiss, Alemania) equipado con una cámara CMOS (Zyla 5.5, Andor, Belfast, Reino Unido). Los conidios se observaron inmediatamente tras la siembra y tras 3, 7, 9 y 12 horas de incubación bajo luz. Las esporas incubadas en oscuridad se fijaron tras 12 horas de incubación añadiendo paraformaldehído al 4%. La longitud de las germínulas se determinó utilizando el programa ImageJ (1.49b).

Los análisis dinámicos de distribución de la proteína CarO durante la germinación se llevaron a cabo en las cámaras Labtek II de ocho pocillos, provistas de cubreobjetos de vidrio, según se ha descrito anteriormente. Para excitar la proteína YFP se utilizó una lámpara HBO de 100 W (Zeiss, Götingen, Alemania) utilizando un filtro XF104 (Omega opticals, Brattleboro, EE. UU.). El hardware se controló a través del programa Micromanager (University of California, SF, EE. UU.). Cada 2-5 minutos se tomó una imagen, que fue procesada con el programa ImageJ.

## **15. Informática**

### **15.1 Análisis de secuencias de ADN**

Los mapas de restricción, las fases abiertas de lectura y las secuencias complementarias de las secuencias de ADN se analizaron con los programas Vector NTI (Invitrogen) y GENTle (GENTle v 1.9.4, Magnus Manske, University of Cologne, released under GPL 2003)

## 15.2 Análisis de secuencias a través de bases de datos

Las secuencias de ADN y la información sobre los genomas de las especies de *Fusarium* se obtuvieron por medio del servidor *web* del Broad Institute ([www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org); Cambridge, Massachusetts, EEUU). Las comparaciones de secuencias se llevaron a cabo mediante BLAST en el servidor *web* del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)). Los análisis de BLASTP se realizaron contra la base de datos Swiss-Prot no redundante. Las comparaciones de secuencias se llevaron a cabo con el programa ClustalW2 (Centro Nacional de Informática y Biotecnología, Maryland, EEUU).

Durante la realización de esta Tesis, el grupo de investigación en el que se realizó el trabajo obtuvo un borrador del genoma de la estirpe IMI58289 de *F. fujikuroi* con un sistema de secuenciación genómica Roche 454 (454 Life Science Corp; Brandford, CT) en la Unitat de Genòmica (CCiT) de la Universidad de Barcelona. El ensamblaje del genoma se hizo a partir de lecturas de 339 Mb con un tamaño medio de lectura de 267 pb.

La identificación de sitios de unión para factores de transcripción se realizó con el programa MatInspector (Genomatix Software, Cartharius *et al.*, 2005), utilizando una base de datos específica para hongos.

## 15.3 Pinzamiento de membrana

La grabación de los datos se controló con el programa Clampex 10.3 (Molecular Devices Corporation, Union City, EE. UU.), y el análisis de los mismos se realizó con los programas Clampfit 10.3 (Molecular Devices Corporation, Union City, EE. UU.) y 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, EE. UU.).

## 15.4 Escritura, cálculo y dibujo

Para el tratamiento de datos se utilizó el procesador de textos Word y la hoja de cálculo Excel 2011 de Microsoft (Microsoft Corp., Redmond, Washington, EEUU). Las gráficas e imágenes fueron realizadas con el programa Canvas X (Deneba Software, Miami, Florida, EEUU).

**BIBLIOGRAFÍA**

**REFERENCES**



- Acín-Pérez, R., E. Salazar, et al. (2009). "Modulation of mitochondrial protein phosphorylation by soluble adenylyl cyclase ameliorates cytochrome oxidase defects." EMBO Mol Med **1**(8-9): 392-406.
- Adachi, K. and J. E. Hamer (1998). "Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*." Plant Cell **10**(8): 1361-1374.
- Adams, G., N. Johnson, et al. (1987). "Heterokaryons of *Gibberella zeae* formed following hyphal anastomosis or protoplast fusion." Experimental Mycology **11**: 339-353.
- Aguilera, J., S. Rodríguez-Vargas, et al. (2005). "The HOG MAP kinase pathway is required for the induction of methylglyoxal-responsive genes and determines methylglyoxal resistance in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Microbiol **56**(1): 228-239.
- Alspaugh, J. A., J. R. Perfect, et al. (1997). "*Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP." Genes Dev **11**(23): 3206-3217.
- Alspaugh, J. A., R. Pukkila-Worley, et al. (2002). "Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*." Eukaryot Cell **1**(1): 75-84.
- Armstrong, G. A. (1997). "Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale." Annu Rev Microbiol **51**: 629-659.
- Arnold, A. E., Z. Maynard, et al. (2001). "Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity." Mycological research **105**(12): 15021-11507.
- Auldridge, M. E., D. R. McCarty, et al. (2006). "Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products." Curr Opin Plant Biol **9**(3): 315-321.
- Austin, D. J., J. D. Bu'Lock, et al. (1970). "The biosynthesis of trisporic acids from beta-carotene via retinal and trisporol." Experientia **26**(4): 348-349.
- Austwick, P. K. C. (1984). "*Fusarium* infections in man and animals." The applied Mycology of Fusarium Cambridge University Press (M O Moss and J E Smith): 129-140.
- Avalos, J., E. R. Bejarano, et al. (1993). "Photoinduction of carotenoid biosynthesis." Methods in Enzymology **214**: 283-294.
- Avalos, J., J. Casadesús, et al. (1985). "*Gibberella fujikuroi* mutants obtained with UV radiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine." Appl Environ Microbiol **49**(1): 187-191.
- Avalos, J. and E. Cerdá-Olmedo (1987). "Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*." Current Genetics **11**(6-7): 505-511.
- Avalos, J., E. Cerdá-Olmedo, et al. (2007). "Gibberellins and other metabolites of *Fusarium fujikuroi* and related fungi." Curr. Org. Chem. **11**: 721-737.
- Avalos, J. and L. M. Corrochano (2013). Carotenoid biosynthesis in *Neurospora*. Neurospora: Genomics and Molecular Biology. D. P. Kasbekar and K. McCluskey. Norfolk, Caister Academic Press: 227-241.
- Avalos, J., V. Díaz-Sánchez, et al. (2014). Carotenoids. Fungal Biology. Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites. J. F. e. a. E. Martín: 148-185.
- Avalos, J. and A. F. Estrada (2010). "Regulation by light in *Fusarium*." Fungal Genet Biol **47**(11): 930-938.
- Bacon, C. W., J. K. Porter, et al. (1996). "Production of fusaric acid by *Fusarium* species." Appl Environ Microbiol **62**(11): 4039-4043.
- Bagar, T., K. Altenbach, et al. (2009). "Live-Cell imaging and measurement of intracellular pH in filamentous fungi using a genetically encoded ratiometric probe." Eukaryot Cell **8**(5): 703-712.

- Balan, J., J. Fuska, et al. (1970). "Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikoi*, effective against *Leishmania brasiliensis*." Folia Microbiol (Praha) **15**(6): 479-484.
- Bamberg, E., J. Tittor, et al. (1993). "Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 639-643.
- Banks, C. W., S. N. Bennett, et al. (1997). "Allelism of the mutants *ovc* and *cut* of *Neurospora crassa*." Fungal Genet Newslett **44**: 10.
- Barrero, A. F., J. F. Sánchez, et al. (1991). "Fusarin C and 8Z-fusarin C from *Gibberella fujikuroi*." Phytochemistry **30**(7): 2259-2263.
- Bayram, O., G. H. Braus, et al. (2010). "Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems." Fungal Genet Biol **47**(11): 900-908.
- Bayram, O., S. Krappmann, et al. (2008). "VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism." Science **320**(5882): 1504-1506.
- Beavo, J. A. and L. L. Brunton (2002). "Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 710-718.
- Beever, R. E. and E. P. Laracy (1986). "Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*." J Bacteriol **168**(3): 1358-1365.
- Beja, O., L. Aravind, et al. (2000). "Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea." Science **289**(5486): 1902-1906.
- Bell, A. A., M. H. Wheeler, et al. (2003). "United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f sp *vasinfectum* potential target for disease control." Pest. Manag. Sci. **59**: 736-747.
- Bennett, J. W. and K. T. Chung (2001). "Alexander Fleming and the discovery of penicillin." Adv Appl Microbiol **49**: 163-184.
- Biasini, M., S. Bienert, et al. (2014). "SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information." Nucleic Acids Res **42**(Web Server issue): W252-258.
- Bieszke, J. A., E. L. Braun, et al. (1999). "The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8034-8039.
- Bilsland, E., C. Molin, et al. (2004). "Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance." Mol Microbiol **53**(6): 1743-1756.
- Birnbaumer, M. (2000). "Vasopressin receptors." Trends Endocrinol Metab **11**(10): 406-410.
- Blomhoff, R. and H. K. Blomhoff (2006). "Overview of retinoid metabolism and function." J Neurobiol **66**(7): 606-630.
- Blumenstein, A., K. Vienken, et al. (2005). "The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light." Curr Biol **15**(20): 1833-1838.
- Bodor, Á. M., E. D. Nagygyörgy, et al. (2012). "Inactivation of the *mat1-2-1* mating type gene results in reduced asexual sporulation and *con10* expression in *Fusarium verticillioides*." Acta Phytopathol Entomol Hung **47**.
- Bogomolni, R. A. and J. L. Spudich (1982). "Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(20): 6250-6254.
- Bok, J. W. and N. P. Keller (2004). "LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp." Eukaryot Cell **3**(2): 527-535.
- Booth, C. (1971). "The genus *Fusarium*." Commonwealth Mycological Institute Kew.
- Bos, J. L. (2006). "Epac proteins: multi-purpose cAMP targets." Trends Biochem Sci **31**(12): 680-686.
- Boyden, E. S., F. Zhang, et al. (2005). "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity." Nat Neurosci **8**(9): 1263-1268.
- Brewster, J. L., T. de Valoir, et al. (1993). "An osmosensing signal transduction pathway in yeast." Science **259**(5102): 1760-1763.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, et al. (1998). Carotenoids. Basel: Birkhäuser.



- Brown, L. S. (2004). "Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions." *Photochem Photobiol Sci* **3**(6): 555-565.
- Brown, L. S. (2014). "Eubacterial rhodopsins - unique photosensors and diverse ion pumps." *Biochim Biophys Acta* **1837**(5): 553-561.
- Brown, L. S., A. K. Dioumaev, et al. (2001). "Photochemical reaction cycle and proton transfers in *Neurospora* rhodopsin." *J Biol Chem* **276**(35): 32495-32505.
- Brown, L. S. and K. H. Jung (2006). "Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: the extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism." *Photochem Photobiol Sci* **5**(6): 538-546.
- Buck, L. and R. Axel (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition." *Cell* **65**(1): 175-187.
- Calvo, A. M. (2008). "The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi." *Fungal Genet Biol* **45**(7): 1053-1061.
- Candau, R., J. Avalos, et al. (1992). "Regulation of Gibberellin Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*." *Plant Physiol* **100**(3): 1184-1188.
- Cappellini, R. and J. L. Peterson (1965). "Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*." *Mycologia* **57**: 962-966.
- Caracuel, Z., M. I. Roncero, et al. (2003). "The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*." *Mol Microbiol* **48**(3): 765-779.
- Cartharius, K., K. Frech, et al. (2005). "MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites." *Bioinformatics* **21**(13): 2933-2942.
- Caruthers, J. M., I. Kang, et al. (2000). "Crystal Structure Determination of Aristolochene Synthase from the Blue Cheese Mold, *Penicillium roqueforti*." *Journal of Biological Chemistry* **275**: 25533-25539.
- Casas-Flores, S., M. Rios-Momberg, et al. (2006). "Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway." *Eukaryot Cell* **5**(3): 499-506.
- Castillo, R., J. A. Fernández, et al. (2005). "Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives." *Plant Physiol* **139**(2): 674-689.
- Castrillo, M. and J. Avalos (2014). "Light-mediated participation of the VIVID-like protein of *Fusarium fujikuroi* VvdA in pigmentation and development." *Fungal Genet Biol* **71C**: 9-20.
- Castrillo, M., J. García-Martínez, et al. (2013). "Light-dependent functions of the *Fusarium fujikuroi* CryD DASH cryptochrome in development and secondary metabolism." *Appl Environ Microbiol* **79**(8): 2777-2788.
- Civelli, O., J. R. Bunzow, et al. (1991). "Molecular biology of the dopamine receptors." *Eur J Pharmacol* **207**(4): 277-286.
- Conková, E., A. Laciakova, et al. (2003). "Fusarial toxins and their role in animal diseases." *Vet J* **165**(3): 214-220.
- Cornforth, J. W., G. Ryback, et al. (1971). "Isolation and characterization of a fungal vacuolation factor (bikaverin)." *J Chem Soc Perkin 1* **16**: 2786-2788.
- Correll, J. D., C. J. R. Klittich, et al. (1987). "Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests." *Phytopathology* **77**: 1640-1646.
- Corrochano, L. M. (2007). "Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour." *Photochem Photobiol Sci* **6**(7): 725-736.
- Corrochano, L. M. and J. Avalos (2010). *Light Sensing. Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. K. Borkovich and D. J. Ebbole, ASM Press.
- Craven, K. B. and W. N. Zagotta (2006). "CNG and HCN channels: two peas, one pod." *Annu Rev Physiol* **68**: 375-401.
- Curie, J. N., J. H. Kane, et al. (1931). "Process for producing gluconic acid by fungi." *Chem. Abstr.*

- Chang, P. K., K. C. Ehrlich, et al. (1995). "Increased expression of *Aspergillus parasiticus* *afIR*, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis." Appl Environ Microbiol **61**(6): 2372-2377.
- Chapman, D. J. and M. A. Regan (1980). "Evolution of a biochemical pathway: evidence from comparative biochemistry." Annu. Rev. Plant Physiol. **31**: 639-645.
- Chen, Z. and R. R. Birge (1993). "Protein-based artificial retinas." Trends Biotechnol **11**(7): 292-300.
- Cheng, P., Y. Yang, et al. (2001). "Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7408-7413.
- Choi, W. and R. A. Dean (1997). "The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development." Plant Cell **9**(11): 1973-1983.
- Choi, Y. E. and J. R. Xu (2010). "The cAMP signaling pathway in *Fusarium verticillioides* is important for conidiation, plant infection, and stress responses but not fumonisin production." Mol Plant Microbe Interact **23**(4): 522-533.
- Chow, B. Y., X. Han, et al. (2010). "High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps." Nature **463**(7277): 98-102.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, et al. (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-2175.
- D'Souza, C. A. and J. Heitman (2001). "Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence." FEMS Microbiol Rev **25**(3): 349-364.
- Das, R., V. Esposito, et al. (2007). "cAMP activation of PKA defines an ancient signaling mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 93-98.
- Daub, M. E. and G. A. Payne (1989). "The role of carotenoids in resistance of fungi to cercosporin." Physiology and Biochemistry **79**: 180-185.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, et al. (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." Nature **396**(6710): 474-477.
- de Vries, R. P., S. J. Flitter, et al. (2003). "Glycerol dehydrogenase, encoded by *gldB* is essential for osmotolerance in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **49**(1): 131-141.
- Degli-Innocenti, F. and V. E. Russo (1984). "Isolation of new white collar mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia." J Bacteriol **159**(2): 757-761.
- Dencher, N. A., H. J. Sass, et al. (2000). "Water and bacteriorhodopsin: structure, dynamics, and function." Biochim Biophys Acta **1460**(1): 192-203.
- Desjardins, A. E., T. M. Hohn, et al. (1993). "Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance." Microbiol Rev **57**(3): 595-604.
- Di Pietro, A., F. I. García-Maceira, et al. (2001). "A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis." Mol Microbiol **39**(5): 1140-1152.
- Diano, A., S. Bekker-Jensen, et al. (2006). "Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism." Biotechnol Bioeng **94**(5): 899-908.
- Díaz-Sánchez, V., J. Avalos, et al. (2012). "Identification and regulation of *fusA*, the polyketide synthase gene responsible for fusarin production in *Fusarium fujikuroi*." Appl Environ Microbiol **78**(20): 7258-7266.
- Díaz-Sánchez, V., A. F. Estrada, et al. (2011). "The gene *carD* encodes the aldehyde dehydrogenase responsible for neurosporaxanthin biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*." FEBS J **278**(17): 3164-3176.

- Domenech, C. E., W. Giordano, et al. (1996). "Separate compartments for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*." Eur J Biochem **239**(3): 720-725.
- Dowzer, C. E. and J. M. Kelly (1989). "Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression." Curr Genet **15**(6): 457-459.
- Dunn, T. A., C. T. Wang, et al. (2006). "Imaging of cAMP levels and protein kinase A activity reveals that retinal waves drive oscillations in second-messenger cascades." J Neurosci **26**(49): 12807-12815.
- Edge, R., D. J. McGarvey, et al. (1997). "The carotenoids as anti-oxidants--a review." J Photochem Photobiol B **41**(3): 189-200.
- Eisenbach, M., C. Weissman, et al. (1977). "Bacteriorhodopsin-loaded charged synthetic membranes utilization of light energy to generate electrical current." FEBS Lett **81**: 77-80.
- Eisenreich, W., B. Menhard, et al. (1996). "Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6431-6436.
- Ellis, S. W., M. Grindle, et al. (1991). "Effect of osmotic stress on yield and polyol content of dicarboximide-sensitive and -resistant strains of *Neurospora crassa*." Mycol. Res. **95**: 457-464.
- Ernst, O. P., D. T. Lodowski, et al. (2014). "Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms." Chem Rev **114**(1): 126-163.
- Estrada, A. F. and J. Avalos (2008a). "The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis, but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation." Fungal Genet Biol **45**(5): 705-718.
- Estrada, A. F. and J. Avalos (2009). "Regulation and targeted mutation of *opsA*, coding for the NOP-1 opsin orthologue in *Fusarium fujikuroi*." J Mol Biol **387**(1): 59-73.
- Estrada, A. F., T. Brefort, et al. (2009). "*Ustilago maydis* accumulates beta-carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase." Fungal Genet Biol **46**(10): 803-813.
- Fan, Y., P. Solomon, et al. (2011). "Photochemical characterization of a novel fungal rhodopsin from *Phaeosphaeria nodorum*." Biochim Biophys Acta **1807**(11): 1457-1466.
- Fang, H. M. and Y. Wang (2006). "RA domain-mediated interaction of Cdc35 with Ras1 is essential for increasing cellular cAMP level for *Candida albicans* hyphal development." Mol Microbiol **61**(2): 484-496.
- Feldbrugge, M., J. Kamper, et al. (2004). "Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*." Curr Opin Microbiol **7**(6): 666-672.
- Fernandes, M., N. P. Keller, et al. (1998). "Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis." Mol Microbiol **28**(6): 1355-1365.
- Fernández-Martín, R., E. Cerdá-Olmedo, et al. (2000). "Homologous recombination and allele replacement in transformants of *Fusarium fujikuroi*." Mol Gen Genet **263**(5): 838-845.
- Fernández-Martín, R., F. Reyes, et al. (1995). "Gibberellins biosynthesis in *gib* mutants of *Gibberella fujikuroi*." J. Biol. Chem. **270**: 14970-14974.
- Fillinger, S., M. K. Chaveroche, et al. (2001a). "Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*." Microbiology **147**(Pt 7): 1851-1862.
- Fillinger, S., G. Ruijter, et al. (2001b). "Molecular and physiological characterization of the NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **39**(1): 145-157.
- Finking, R. and M. A. Marahiel (2004). "Biosynthesis of nonribosomal peptides1." Annu Rev Microbiol **58**: 453-488.

- Folta, K. M. and S. A. Maruhnich (2007). "Green light: a signal to slow down or stop." J Exp Bot **58**(12): 3099-3111.
- Francis, S. H., M. A. Blount, et al. (2011). "Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions." Physiol Rev **91**(2): 651-690.
- Fraser, P. D. and P. M. Bramley (2004). "The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids." Prog Lipid Res **43**(3): 228-265.
- Fujimura, M., N. Ochiai, et al. (2000). "Sensitivity to phenylpyrrole fungicides and abnormal glycerol accumulation in os and cut mutant strains of *Neurospora crassa*." J Pestic Sci **25**: 31-36.
- Fujimura, M., N. Ochiai, et al. (2003). "Putative homologs of SSK22 MAPKK kinase and PBS2 MAPK kinase of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by *os-4* and *os-5* genes for osmotic sensitivity and fungicide resistance in *Neurospora crassa*." Biosci Biotechnol Biochem **67**(1): 186-191.
- Furukawa, K., Y. Hoshi, et al. (2005). "Aspergillus nidulans HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress." Mol Microbiol **56**(5): 1246-1261.
- Gaffoor, I., D. W. Brown, et al. (2005). "Functional analysis of the polyketide synthase genes in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*)." Eukaryot Cell **4**(11): 1926-1933.
- Gancedo, J. M. (2013). "Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life." Biol Rev Camb Philos Soc **88**(3): 645-668.
- Gancedo, J. M., M. J. Mazón, et al. (1985). "Biological roles of cAMP: similarities and differences between organisms." Trends in Biochemical Sciences **10**(5): 210-212.
- García-Martínez, J., A. L. Ádám, et al. (2012). "Adenylyl cyclase plays a regulatory role in development, stress resistance and secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*." PLoS One **7**(1): e28849.
- García-Martínez, J., M. Castrillo, et al. (2014). "The gene *cutA* of *Fusarium fujikuroi*, encoding a protein of the haloacid dehalogenase family, is involved in osmotic stress and glycerol metabolism." Microbiology **160**(Pt 1): 26-36.
- Garrill, A. and J. M. Davies (1994). "Patch clamping fungal membranes: A new perspective on ion-transport." Mycol. Res. **98**: 257-263.
- Gehring, C. (2010). "Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling - past and present." Cell Commun Signal **8**: 15.
- Geibel, S., E. Lorinczi, et al. (2013). "Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin mutants with altered lifetime of the M intermediate." PLoS One **8**(9): e73338.
- Geissman, T. A., A. J. Verbiscar, et al. (1966). "Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*." Phytochemistry **5**: 933-947.
- Gelderblom, W. C., P. G. Thiel, et al. (1983). "A mutagen produced by *Fusarium moniliforme*." Toxicol **21**(4): 467-473.
- Georgiou, C. D., G. Zervoudakis, et al. (2001). "beta-Carotene production and its role in sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfii*." Fungal Genet Biol **34**(1): 11-20.
- Gil-Serna, J., E. M. Mateo, et al. (2013). "Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess **30**(2): 372-380.
- Giordano, W., J. Avalos, et al. (1999a). "Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*." FEMS Microbiol Lett **173**(2): 389-393.
- Giordano, W. and C. E. Domenech (1999b). "Aeration affects acetate destination in *Gibberella fujikuroi*." FEMS Microbiol Lett **180**(1): 111-116.

- Gold, S., G. Duncan, et al. (1994). "cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*." *Genes Dev* **8**(23): 2805-2816.
- Goodwin, T. W. and W. Lijinski (1952). "Carotene production by *Phycornyces blakesleeanus*. The effect of different amino acids when used in media containing low concentrations of glucose." *Biochem J.* **50**: 268-273.
- Görner, W., E. Durchschlag, et al. (2002). "Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor." *EMBO J* **21**(1-2): 135-144.
- Grote, M., M. Engelhard, et al. (2014). "Of ion pumps, sensors and channels - perspectives on microbial rhodopsins between science and history." *Biochim Biophys Acta* **1837**(5): 533-545.
- Guarro, J. and J. Gené (1992). "*Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species." *Mycoses* **35**: 109-114.
- Gutiérrez, S., J. Velasco, et al. (1997). "Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**(5): 606-614.
- Hall, R. A. and F. A. Muhlschlegel (2010). "A multi-protein complex controls cAMP signalling and filamentation in the fungal pathogen *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **75**(3): 534-537.
- Hamann, A., D. Brust, et al. (2008). "Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing." *Trends Microbiol* **16**(6): 276-283.
- Han, X. and E. S. Boyden (2007). "Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution." *PLoS One* **2**(3): e299.
- Han, X., B. Y. Chow, et al. (2011). "A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex." *Front Syst Neurosci* **5**: 18.
- Hanoune, J. and N. Defer (2001). "Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 145-174.
- Harding, R. W. (1973). "Inhibition of conidiation and photoinduced carotenoid biosynthesis by cyclic AMP." *Neurospora newsletter* **20**: 20-21.
- Harding, R. W., D. Q. Philip, et al. (1984). "A *Neurospora crassa* mutant which overaccumulates carotenoid pigments." *Neurospora newsletter* **31**: 23-25.
- Hardoim, P. R., F. D. Andreote, et al. (2011). "Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars." *FEMS Microbiol Ecol* **77**(1): 154-164.
- Hedden, P., A. L. Phillips, et al. (2001). "Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: A case of convergent evolution?" *Journal of Plant Growth Regulation* **20**(4): 319-331.
- Herranz, S., J. M. Rodriguez, et al. (2005). "Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12141-12146.
- Herrera-Estrella, A. and B. A. Horwitz (2007). "Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception." *Mol Microbiol* **64**(1): 5-15.
- Hesse, S. J., G. J. Ruijter, et al. (2002). "Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungus *Aspergillus niger*." *Eur J Biochem* **269**(14): 3485-3494.
- Hicks, J. K., J. H. Yu, et al. (1997). "*Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G $\alpha$  protein-dependent signaling pathway." *The EMBO Journal* **16**(16): 4916-4923.
- Hobby, G. (1985). "Penicillin: meeting the challenge." *New Haven: Yale University Press.*
- Hofrichter, J., E. R. Henry, et al. (1989). "Photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane studied by time-resolved absorption spectroscopy." *Biophys J* **56**(4): 693-706.

- Howard, B. H. and H. Raistrick (1954). "Studies in the biochemistry of micro-organisms. 91. The colouring matters of *Penicillium islandicum* Sopp. Part 3. Skyrin and flavoskyrin." Biochem J. Jan **56**(1): 56-65.
- Huynh, T. T., D. McDougald, et al. (2012). "Glucose starvation-induced dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is cAMP and energy dependent." PLoS One **7**(8): e42874.
- Idnurm, A. and B. J. Howlett (2001). "Characterization of an opsin gene from the ascomycete *Leptosphaeria maculans*." Genome **44**(2): 167-171.
- Idnurm, A., S. Verma, et al. (2010). "A glimpse into the basis of vision in the kingdom Mycota." Fungal Genet Biol **47**(11): 881-892.
- Iida, H. (1988). "Multistress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* is generated by insertion of retrotransposon *Ty* into the 5' coding region of the adenylate cyclase gene." Molecular and Cellular Biology **8**: 5555-5560.
- Ikner, A. and K. Shiozaki (2005). "Yeast signaling pathways in the oxidative stress response." Mutat Res **569**(1-2): 13-27.
- Inada, T., H. Takahashi, et al. (1996). "Down regulation of cAMP production by cAMP receptor protein in *Escherichia coli*: an assessment of the contributions of transcriptional and posttranscriptional control of adenylate cyclase." Mol Gen Genet **253**(1-2): 198-204.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.
- Inoue, K., H. Ono, et al. (2013). "A light-driven sodium ion pump in marine bacteria." Nat Commun **4**: 1678.
- Ivey, F. D. and C. S. Hoffman (2005). "Direct activation of fission yeast adenylate cyclase by the Gpa2 Galpha of the glucose signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(17): 6108-6113.
- Ivey, F. D., A. M. Kays, et al. (2002). "Shared and independent roles for a Galpha(i) protein and adenyl cyclase in regulating development and stress responses in *Neurospora crassa*." Eukaryot Cell **1**(4): 634-642.
- Iwamoto, A., S. Lemire, et al. (2008). "Post-transcriptional control of Crp-cAMP by RNase LS in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **70**(6): 1570-1578.
- Jackson, E. K., Z. Mi, et al. (2007). "The pancreatohepatorenal cAMP-adenosine mechanism." J Pharmacol Exp Ther **321**(2): 799-809.
- Jackson, M. A. and S. N. Freer (1991). "The influence of carbon and nitrogen nutrition on fusarin C biosynthesis by *Fusarium moniliforme*." FEMS Microbiol Lett **66**(3): 323-328.
- Jackson, M. A., P. J. Slininger, et al. (1989). "Effects of zinc, iron, cobalt, and manganese on *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 growth and fusarin C biosynthesis in submerged cultures." Appl Environ Microbiol **55**(3): 649-655.
- Jacobson, E. S. and S. B. Tinnell (1993). "Antioxidant function of fungal melanin." J Bacteriol **175**(21): 7102-7104.
- Jain, S., K. Akiyama, et al. (2002). "Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*." Curr Genet **41**(6): 407-413.
- Jain, S., K. Akiyama, et al. (2005). "Signaling via the G protein alpha subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*." FEMS Microbiol Lett **243**(1): 165-172.
- Jiang, L. I., J. Collins, et al. (2008). "Regulation of cAMP responses by the G12/13 pathway converges on adenyl cyclase VII." J Biol Chem **283**(34): 23429-23439.
- Jojima, T., T. Igari, et al. (2012). "Identification of a HAD superfamily phosphatase, HdpA, involved in 1,3-dihydroxyacetone production during sugar catabolism in *Corynebacterium glutamicum*." FEBS Lett **586**(23): 4228-4232.
- Jung, K. H., V. D. Trivedi, et al. (2003). "Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria." Mol Microbiol **47**(6): 1513-1522.

- Jurick, W. M., 2nd and J. A. Rollins (2007). "Deletion of the adenylate cyclase (*sac1*) gene affects multiple developmental pathways and pathogenicity in *Sclerotinia sclerotiorum*." Fungal Genet Biol **44**(6): 521-530.
- Jyonouchi, H., L. Zhang, et al. (1993). "Studies of immunomodulating actions of carotenoids. II. Astaxanthin enhances in vitro antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation." Nutr Cancer **19**(3): 269-280.
- Kamenetsky, M., S. Middelhaufe, et al. (2006). "Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems." J Mol Biol **362**(4): 623-639.
- Kaplan, B., T. Sherman, et al. (2007). "Cyclic nucleotide-gated channels in plants." FEBS Lett **581**(12): 2237-2246.
- Kawaide, H. (2006). "Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi." Biosci Biotechnol Biochem **70**(3): 583-590.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, et al. (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." Science **282**(5397): 2275-2279.
- Keller, N. P. and T. M. Hohn (1997). "Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi." Fungal Genet Biol **21**(1): 17-29.
- Keller, N. P., G. Turner, et al. (2005). "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics." Nat Rev Microbiol **3**(12): 937-947.
- Kennedy, J., K. Auclair, et al. (1999). "Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis." Science **284**(5418): 1368-1372.
- Kihara, J., N. Tanaka, et al. (2009). "Cloning and expression analysis of two opsin-like genes in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*." FEMS Microbiol Lett **295**(2): 289-294.
- Kikukawa, T., J. Toamogami, et al. (2012). Photo-induced proton transfers of microbial rhodopsins. Molecular photochemistry. S. Saha.
- Kim, C., C. Y. Cheng, et al. (2007). "PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation." Cell **130**(6): 1032-1043.
- Klare, J. P., I. Chizhov, et al. (2008). "Microbial rhodopsins: scaffolds for ion pumps, channels, and sensors." Results Probl Cell Differ **45**: 73-122.
- Kleigrewe, K., F. Aydin, et al. (2012). "Structure elucidation of new fusarins revealing insights in the rearrangement mechanisms of the *Fusarium mycotoxin* fusarin C." J Agric Food Chem **60**(21): 5497-5505.
- Kleinlogel, S., U. Terpitz, et al. (2011). "A gene-fusion strategy for stoichiometric and co-localized expression of light-gated membrane proteins." Nat Methods **8**(12): 1083-1088.
- Klengel, T., W. J. Liang, et al. (2005). "Fungal adenylyl cyclase integrates CO<sub>2</sub> sensing with cAMP signaling and virulence." Curr Biol **15**(22): 2021-2026.
- Klimpel, A., C. S. Gronover, et al. (2002). "The adenylate cyclase (BAC) in *Botrytis cinerea* is required for full pathogenicity." Mol Plant Pathol **3**(6): 439-450.
- Ko, Y. J., Y. M. Yu, et al. (2009). "Remodeling of global transcription patterns of *Cryptococcus neoformans* genes mediated by the stress-activated HOG signaling pathways." Eukaryot Cell **8**(8): 1197-1217.
- Kobayashi, M., J. Buck, et al. (2004). "Conservation of functional domain structure in bicarbonate-regulated "soluble" adenylyl cyclases in bacteria and eukaryotes." Dev Genes Evol **214**(10): 503-509.
- Kobe, B. and J. Deisenhofer (1994). "The leucine-rich repeat: a versatile binding motif." Trends Biochem Sci **19**(10): 415-421.
- Koelblin, R. I., B. Brückner, et al. (1990). "Activity of mutagens in the fungus *Gibberella fujikuroi*." J Basic Microbiol **30**: 675-677.
- Kohut, G., B. Olah, et al. (2010). "Adenylyl cyclase regulates heavy metal sensitivity, bikaverin production and plant tissue colonization in *Fusarium proliferatum*." J Basic Microbiol **50**(1): 59-71.

- Kolarova, N., J. Haplova, et al. (1992). "Light-activated adenyl cyclase from *Trichoderma viride*." FEMS Microbiol Lett **72**(3): 275-278.
- Koyanagi, M., K. Takano, et al. (2008). "Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-G(s) cascade." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15576-15580.
- Krantz, M., E. Becit, et al. (2006). "Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi." Curr Genet **49**(3): 137-151.
- Krinsky, N. I., J. T. Landrum, et al. (2003). "Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye." Annu Rev Nutr **23**: 171-201.
- Kristiansen, K. (2004). "Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function." Pharmacol Ther **103**(1): 21-80.
- Kristky, M. S., V. Y. Sokolovsky, et al. (1982). "Relationship between cyclic cAMP level and accumulation of carotenoid pigments in *Neurospora crassa*." Arch. Microbiol. **113**: 206-208.
- Kudla, B., M. X. Caddick, et al. (1990). "The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger." EMBO J **9**(5): 1355-1364.
- Kuhlman, E. G. (1983). "Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*." Mycologia **74**.
- Kuwana, H. (1953). "Studies on morphological mutant "cut" in *Neurospora crassa*." Cytologia **18**(3): 235-239.
- Kuznetsova, E., M. Proudfoot, et al. (2006). "Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family." J Biol Chem **281**(47): 36149-36161.
- Kwon, H., R., S. W. Son, et al. (2007). "Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*." Plant Pathol. J. **21**: 179-183.
- Lademann, J., S. Schanzer, et al. (2011). "Interaction between carotenoids and free radicals in human skin." Skin Pharmacol Physiol **24**(5): 238-244.
- Lamb, T. M., K. E. Finch, et al. (2012). "The *Neurospora crassa* OS MAPK pathway-activated transcription factor ASL-1 contributes to circadian rhythms in pathway responsive clock-controlled genes." Fungal Genet Biol **49**(2): 180-188.
- Lanyi, J. K. (2006). "Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle." Biochim Biophys Acta **1757**(8): 1012-1018.
- Lavine, R. L., N. Voyles, et al. (1975). "The effect of fasting on tissue cyclic cAMP and plasma glucagon in the obese hyperglycemic mouse." Endocrinology **97**(3): 615-620.
- Lawrence, J. (1999). "Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes." Curr Opin Genet Dev **9**(6): 642-648.
- Lee, D. Y., C. Teyssier, et al. (2005). "Role of protein methylation in regulation of transcription." Endocr Rev **26**(2): 147-170.
- Lee, N., C. A. D'Souza, et al. (2003). "Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi." Annu Rev Phytopathol **41**: 399-427.
- Leslie, J. F. (1991). "Mating population in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*)." Phytopathology **81**: 1058-1060.
- Leslie, J. F., B. A. Summerell, et al. (2005). "Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*." Mycologia **97**(3): 718-724.
- Lew, R. R. (2011). "How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi." Nat Rev Microbiol **9**(7): 509-518.
- Lew, R. R. and N. N. Levina (2007). "Turgor regulation in the osmosensitive *cut* mutant of *Neurospora crassa*." Microbiology **153**(Pt 5): 1530-1537.



- Li, B., T. Lai, et al. (2010). "Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding: a proteomic-based study." J Proteome Res **9**(1): 298-307.
- Liebmann, B., M. Muller, et al. (2004). "The cyclic AMP-dependent protein kinase a network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*." Infect Immun **72**(9): 5193-5203.
- Limón, M. C., R. Rodríguez-Ortiz, et al. (2010). "Bikaverin production and applications." Appl Microbiol Biotechnol **87**(1): 21-29.
- Linder, J. U. and J. E. Schultz (2003). "The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules." Cell Signal **15**(12): 1081-1089.
- Linnemannstöns, P., M. M. Prado, et al. (2002b). "A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*." Mol Genet Genomics **267**(5): 593-602.
- Linnemannstöns, P., J. Schulte, et al. (2002a). "The polyketide synthase gene *pkS4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin." Fungal Genet Biol **37**(2): 134-148.
- Liu, G., J. Shi, et al. (2004). "Assembly of a Ca<sup>2+</sup>-dependent BK channel signaling complex by binding to beta2 adrenergic receptor." EMBO J **23**(11): 2196-2205.
- Liu, Y. S. and J. Y. Wu (2006). "Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*." Appl Microbiol Biotechnol **73**(3): 663-668.
- Lomascolo, A., C. Stentelaire, et al. (1999). "Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry." Trends Biotechnol **17**(7): 282-289.
- Lory, S., M. Wolfgang, et al. (2004). "The multi-talented bacterial adenylate cyclases." Int J Med Microbiol **293**(7-8): 479-482.
- Ma, S. M., J. Zhan, et al. (2007). "Enzymatic synthesis of aromatic polyketides using PKS4 from *Gibberella fujikuroi*." J Am Chem Soc **129**(35): 10642-10643.
- Maiani, G., M. J. P. Castón, et al. (2009). "Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans." Molecular Nutrition and Food Research **53**: 194-218.
- Maidan, M. M., J. M. Thevelein, et al. (2005). "Carbon source induced yeast-to-hypha transition in *Candida albicans* is dependent on the presence of amino acids and on the G-protein-coupled receptor Gpr1." Biochem Soc Trans **33**(Pt 1): 291-293.
- Mapari, S. A., K. F. Nielsen, et al. (2005). "Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants." Curr Opin Biotechnol **16**(2): 231-238.
- Marasas, W. F. (1995). "Fumonisin: their implications for human and animal health." Nat Toxins **3**(4): 193-198; discussion 221.
- Margolskee, R. F. (2002). "Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction." J Biol Chem **277**(1): 1-4.
- Mays, L. L. (1969). "Isolation, characterization, and genetic analysis of *osmotic* mutants of *Neurospora crassa*." Genetics **63**(4): 781-794.
- McMullen, M., R. Jones, et al. (1997). "Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact." **8**(12): 1340-1348.
- Mende, K., V. Homann, et al. (1997). "The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: Isolation and expression." Mol Gen Genet **255**(1): 96-105.
- Menon, S. T., M. Han, et al. (2001). "Rhodopsin: structural basis of molecular physiology." Physiol Rev **81**(4): 1659-1688.
- Menzella, H. G., R. Reid, et al. (2005). "Combinatorial polyketide biosynthesis by de novo design and rearrangement of modular polyketide synthase genes." Nat Biotechnol **23**(9): 1171-1176.

- Michielse, C. B. and M. Rep (2009). "Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*." Mol Plant Pathol **10**(3): 311-324.
- Mihlan, M., V. Homann, et al. (2003). "AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR." Mol Microbiol **47**(4): 975-991.
- Miller, T. K., S. Renault, et al. (2002). "Molecular dissection of alleles of the *osmotic-1* locus of *Neurospora crassa*." Fungal Genet Biol **35**(2): 147-155.
- Ming, Y. N., P. C. Lin, et al. (1966). "Heterokaryosis in *Fusarium fujikuroi*." Wr Scientia Sinica **15**: 371-378.
- Miwa, T., Y. Takagi, et al. (2004). "Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*." Eukaryot Cell **3**(4): 919-931.
- Mongodin, E. F., K. E. Nelson, et al. (2005). "The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18147-18152.
- Moran, N. A. and T. Jarvik (2010). "Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids." Science **328**(5978): 624-627.
- Mothes, K. (1980). "Nebenwege des stoffwechsels bei pflanze, tier und mikrobe." Mitt Chem Ges(27): 2-10.
- Mukherjee, M., P. K. Mukherjee, et al. (2007). "cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*." Microbiology **153**(Pt 6): 1734-1742.
- Nagel, G., B. Mockel, et al. (1995). "Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H<sup>+</sup> pumping." FEBS Lett **377**(2): 263-266.
- Nagel, G., T. Szellas, et al. (2003). "Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13940-13945.
- Nagygyörgy, E. D., L. Hornok, et al. (2011). Role of MAP kinase signaling in secondary metabolism and adaptation to abiotic/fungicide stress in *Fusarium*. Fungicides. N. Thajuddin. Rijeka, Croatia, TechWeb.
- Nelson, P. E., M. C. Dignani, et al. (1994). "Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species." Clin Microbiol Rev **7**(4): 479-504.
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun, et al. (1983). "*Fusarium* species. An illustrated manual for identification." Pennsylvania State University Press.
- Nevoigt, E. and U. Stahl (1997). "Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." FEMS Microbiol Rev **21**(3): 231-241.
- Ni, M. and J. H. Yu (2007). "A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*." PLoS One **2**(10): e970.
- Nicolas-Molina, F. E., E. Navarro, et al. (2008). "Lycopene over-accumulation by disruption of the negative regulator gene *crgA* in *Mucor circinelloides*." Appl Microbiol Biotechnol **78**(1): 131-137.
- Niehaus, E. M., K. Kleigrewe, et al. (2013). "Genetic manipulation of the *Fusarium fujikuroi* fusarin gene cluster yields insight into the complex regulation and fusarin biosynthetic pathway." Chem Biol **20**(8): 1055-1066.
- Nikolaou, E., I. Agrafioti, et al. (2009). "Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi." BMC Evol Biol **9**: 44.
- Nishino, H. (1998). "Cancer prevention by carotenoids." Mutat Res **402**(1-2): 159-163.
- O'Rourke, S. M., I. Herskowitz, et al. (2002). "Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response." Trends Genet **18**(8): 405-412.
- Oesterhelt, D. (1976). "Bacteriorhodopsin as a light-drive ion exchanger?" FEBS Lett **64**: 20-22.

- Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius (1973). "Functions of a new photoreceptor membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(10): 2853-2857.
- Oller-López, J. L., J. Avalos, et al. (2003). "Improved GA<sub>1</sub> production by *Fusarium fujikuroi*." Appl Microbiol Biotechnol **63**(3): 282-285.
- Ortoneda, M., J. Guarro, et al. (2004). "*Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals." Infect Immun **72**(3): 1760-1766.
- Oshima, S., F. Ojima, et al. (1993). "Inhibitory effect of beta-carotene and astaxanthin on photosensitized oxidation of phospholipid bilayers." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **39**(6): 607-615.
- Pahlman, A. K., K. Granath, et al. (2001). "The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress." J Biol Chem **276**(5): 3555-3563.
- Pan, X., T. Harashima, et al. (2000). "Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Opin Microbiol **3**(6): 567-572.
- Perkins, D. D. and R. H. Davis (2000). "*Neurospora* at the millennium." Fungal Genet Biol **31**(3): 153-167.
- Phillips, A. T. and L. M. Mulfinger (1981). "Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* during induction and carbon catabolite repression of histidase synthesis." J Bacteriol **145**(3): 1286-1292.
- Polaino, S., M. M. Herrador, et al. (2010). "Splitting of beta-carotene in the sexual interaction of *Phycomyces*." Org Biomol Chem **8**(19): 4229-4231.
- Ponsioen, B., M. Gloerich, et al. (2009). "Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP." Mol Cell Biol **29**(10): 2521-2531.
- Portela, P., S. Moreno, et al. (2006). "Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a protein kinase A substrate, and specificity of the phosphorylation site sequence in the whole protein." Biochem J **396**(1): 117-126.
- Prado-Cabrero, A., A. F. Estrada, et al. (2007a). "Identification and biochemical characterization of a novel carotenoid oxygenase: elucidation of the cleavage step in the *Fusarium* carotenoid pathway." Mol Microbiol **64**(2): 448-460.
- Prado-Cabrero, A., P. Schaub, et al. (2009). "Deviation of the neurosporaxanthin pathway towards beta-carotene biosynthesis in *Fusarium fujikuroi* by a point mutation in the phytoene desaturase gene." FEBS J **276**(16): 4582-4597.
- Prado-Cabrero, A., D. Scherzinger, et al. (2007b). "Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*." Eukaryot Cell **6**(4): 650-657.
- Prado, M. M., A. Prado-Cabrero, et al. (2004). "A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*." Curr Genet **46**(1): 47-58.
- Prusky, D. and N. Yakoby (2003). "Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?" Mol Plant Pathol **4**(6): 509-516.
- Puhalla, J. E. and P. T. Spieth (1983). "Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*." Exp Mycol **7**: 328-335.
- Puhalla, J. E. and P. T. Spieth (1985). "A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*)." Exp Mycol **9**: 39-47.
- Punt, P. J., R. P. Oliver, et al. (1987). "Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*." Gene **56**(1): 117-124.
- Rademacher, W. (1997). Gibberellins. Fungal Biotechnology. T. Anke, Chapmann and Hall.
- Rall, T. W. and E. W. Shuterland (1958). "Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles." J Biol Chem **232**: 1077-1091.

- Ramachandran, S., P. Fontanille, et al. (2006). "Gluconic acid: Properties, applications and microbial production." Food Technology and Biotechnology **44**(2): 185-195.
- Reed, R. H., J. A. Chudek, et al. (1987). "Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts." Appl Environ Microbiol **53**(9): 2119-2123.
- Rhinn, M. and P. Dolle (2012). "Retinoic acid signalling during development." Development **139**(5): 843-858.
- Ridge, K. D. (2002). "Algal rhodopsins: phototaxis receptors found at last." Curr Biol **12**(17): R588-590.
- Rietsch, A. and J. J. Mekalanos (2006). "Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **59**(3): 807-820.
- Rocha, C. R., K. Schroppel, et al. (2001). "Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*." Mol Biol Cell **12**(11): 3631-3643.
- Rodríguez-Ortiz, R., M. C. Limón, et al. (2009). "Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wild-type *Fusarium fujikuroi* and carotenoid-overproducing mutants." Appl Environ Microbiol **75**(2): 405-413.
- Rodríguez-Ortiz, R., M. C. Limón, et al. (2013). "Functional analysis of the *carS* gene of *Fusarium fujikuroi*." Mol Genet Genomics **288**(3-4): 157-173.
- Rodríguez-Ortiz, R., B. J. Mehta, et al. (2010). "Stimulation of bikaverin production by sucrose and by salt starvation in *Fusarium fujikuroi*." Appl Microbiol Biotechnol **85**(6): 1991-2000.
- Rodríguez-Ortiz, R., C. Michielse, et al. (2012). "Genetic basis of carotenoid overproduction in *Fusarium oxysporum*." Fungal Genet Biol **49**(9): 684-696.
- Rodríguez-Peña, J. M., R. García, et al. (2010). "The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes." Yeast **27**(8): 495-502.
- Rodríguez, H., T. González, et al. (2004). "Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.*" Naturwissenschaften **91**: 552-555.
- Rohmer, M., M. Knani, et al. (1993). "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate." Biochem J **295 ( Pt 2)**: 517-524.
- Rosenberg, G. and M. L. Pall (1979). "Properties of two cyclic nucleotide-deficient mutants of *Neurospora crassa*." J Bacteriol **137**(3): 1140-1144.
- Roze, L. V., R. M. Beaudry, et al. (2004). "Regulation of aflatoxin synthesis by FadA/cAMP/protein kinase A signaling in *Aspergillus parasiticus*." Mycopathologia **158**(2): 219-232.
- Ruijter, G. J., J. Visser, et al. (2004). "Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation." Microbiology **150**(Pt 4): 1095-1101.
- Ruiz-Roldán, M. C., V. Garre, et al. (2008). "Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*." Eukaryot Cell **7**(7): 1227-1230.
- Russo, V. E. (1988). "Blue light induces circadian rhythms in the *bd* mutant of *Neurospora*: double mutants *bd,wc-1* and *bd,wc-2* are blind." J Photochem Photobiol B **2**(1): 59-65.
- Rynkiewicz, M. J., D. E. Cane, et al. (2001). "Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade." PNAS **98**(24): 13543-13548.
- Sadana, R. and C. W. Dessauer (2009). "Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies." Neurosignals **17**(1): 5-22.

- Saelices, L., L. Youssar, et al. (2007). "Identification of the gene responsible for torulene cleavage in the *Neurospora* carotenoid pathway." Mol Genet Genomics **278**(5): 527-537.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). New York, NY (USA).
- Sandmann, G. and N. Misawa (2002). "Fungal carotenoids." In the Mycota X Industrial Applications (Osiewacz, H.D. ed), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg: 247-262.
- Saranak, J. and K. W. Foster (1997). "Rhodopsin guides fungal phototaxis." Nature **387**(6632): 465-466.
- Scanziani, M. and M. Hausser (2009). "Electrophysiology in the age of light." Nature **461**(7266): 930-939.
- Schmidt, P., J. Walker, et al. (2008). "Proteomic analysis of the pH response in the fungal pathogen *Candida glabrata*." Proteomics **8**(3): 534-544.
- Schröder, W. A. and E. A. Johnson (1993). "Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*." Microbiology **136**(5): 907-912.
- Schumacher, M. M., C. S. Enderlin, et al. (1997). "The *osmotic-1* locus of *Neurospora crassa* encodes a putative histidine kinase similar to osmosensors of bacteria and yeast." Curr Microbiol **34**(6): 340-347.
- Schwender, J., M. Seemann, et al. (1996). "Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*." Biochem J **316** ( Pt 1): 73-80.
- Schwerdtfeger, C. and H. Linden (2003). "VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation." EMBO J **22**(18): 4846-4855.
- Seifried, A., J. Schultz, et al. (2013). "Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease." FEBS J **280**(2): 549-571.
- Setlow, B. and P. Setlow (1980). "Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 2474-2476.
- Shabala, S. N. and R. R. Lew (2002). "Turgor regulation in osmotically stressed *Arabidopsis* epidermal root cells. Direct support for the role of inorganic ion uptake as revealed by concurrent flux and cell turgor measurements." Plant Physiol **129**(1): 290-299.
- Sharma, A. K., J. L. Spudich, et al. (2006). "Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility." Trends Microbiol **14**(11): 463-469.
- Shenoy, A. R. and S. S. Visweswariah (2006). "Mycobacterial adenyl cyclases: biochemical diversity and structural plasticity." FEBS Lett **580**(14): 3344-3352.
- Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2005). "Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin." Sci STKE **2005**(308): cm10.
- Shimada, T., N. Fujita, et al. (2011). "Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources." PLoS One **6**(6): e20081.
- Shin, D. Y., K. Matsumoto, et al. (1987). "Heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in cyclic AMP-dependent protein phosphorylation." Mol. Cell. Biol. **7**(1): 244-250.
- Shpakov, A. O. and M. N. Pertseva (2008). "Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution." Int Rev Cell Mol Biol **269**: 151-282.
- Sidhu, G. S. (1983). "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. III. Significance of heterokaryosis in naturally occurring corn isolates." Can J Bot **61**: 3320-3325.
- Sineshchekov, O. A., K. H. Jung, et al. (2002). "Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8689-8694.
- Smith, D. J., A. J. Earl, et al. (1990). "The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton

- protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases." EMBO J **9**(9): 2743-2750.
- Soanes, D. M. and N. J. Talbot (2010). "Comparative genome analysis reveals an absence of leucine-rich repeat pattern-recognition receptor proteins in the kingdom Fungi." PLoS One **5**(9): e12725.
- Son, S. W., H. Y. Kim, et al. (2008). "Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*." J Appl Microbiol **104**(3): 692-698.
- Song, Z., R. J. Cox, et al. (2004). "Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*." ChemBiochem **5**(9): 1196-1203.
- Sponsel, V. M. and P. Hedden (2004). Gibberellin biosynthesis and inactivation. Dordrecht, The Netherlands.
- Spudich, J. L. and K. H. Jung (2005). Microbial rhodopsins: phylogenetic and functional diversity. In: Handbook of photosensory receptors. W. R. Briggs and J. L. Spudich, VILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaG.
- Spudich, J. L., C. S. Yang, et al. (2000). "Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 365-392.
- Staunton, J. and K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." Nat Prod Rep **18**(4): 380-416.
- Steenkamp, E. T., B. D. Wingfield, et al. (2000). "PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex." Appl Environ Microbiol **66**(10): 4378-4382.
- Stephen, D., C. Jones, et al. (1990). "A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing." Nucleic Acids Res **18**(24): 7463-7464.
- Studt, L., H. U. Humpf, et al. (2013). "Signaling governed by G proteins and cAMP is crucial for growth, secondary metabolism and sexual development in *Fusarium fujikuroi*." PLoS One **8**(2): e58185.
- Studt, L., P. Wiemann, et al. (2012). "Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia." Appl Environ Microbiol **78**(12): 4468-4480.
- Suh, S. J., L. J. Runyen-Janecky, et al. (2002). "Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **148**(Pt 5): 1561-1569.
- Suo, S., Y. Kimura, et al. (2006). "Starvation induces cAMP response element-binding protein-dependent gene expression through octopamine-Gq signaling in *Caenorhabditis elegans*." J Neurosci **26**(40): 10082-10090.
- Sutter, R. P. (1975). "Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeianus*." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(1): 127-130.
- Szobota, S. and E. Y. Isacoff (2010). "Optical control of neuronal activity." Annu Rev Biophys **39**: 329-348.
- Teichert, S., B. Schönig, et al. (2004). "Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism." Mol Microbiol **53**(6): 1661-1675.
- Telfer, A. (2005). "Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre." Photochem Photobiol Sci **4**(12): 950-956.
- Terpitz, U., S. Letschert, et al. (2012). "Dielectric analysis and multi-cell electrofusion of the yeast *Pichia pastoris* for electrophysiological studies." J Membr Biol **245**(12): 815-826.
- Terpitz, U., D. Raimunda, et al. (2008). "Electrofused giant protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel system for electrophysiological studies on membrane proteins." Biochim Biophys Acta **1778**(6): 1493-1500.
- Thewes, S., A. Prado-Cabrero, et al. (2005). "Characterization of a gene in the *car* cluster of *Fusarium fujikuroi* that codes for a protein of the carotenoid oxygenase family." Mol Genet Genomics **274**(3): 217-228.

- Tilburn, J., S. Sarkar, et al. (1995). "The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH." *EMBO J* **14**(4): 779-790.
- Townsend, P. D., P. M. Holliday, et al. (2009). "Stimulation of mammalian G-protein-responsive adenylyl cyclases by carbon dioxide." *J Biol Chem* **284**(2): 784-791.
- Tresguerres, M., L. R. Levin, et al. (2011). "Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase." *Kidney Int* **79**(12): 1277-1288.
- Tsunoda, S. P., D. Ewers, et al. (2006). "H<sup>+</sup>-pumping rhodopsin from the marine alga *Acetabularia*." *Biophys J* **91**(4): 1471-1479.
- Tudzynski, B. (2005). "Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology." *Appl Microbiol Biotechnol* **66**(6): 597-611.
- Tudzynski, B. and K. Höltter (1998). "Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster." *Fungal Genet Biol* **25**(3): 157-170.
- Tudzynski, B., V. Homann, et al. (1999). "Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*." *Mol Gen Genet* **261**(1): 106-114.
- Tudzynski, B., H. Kawaide, et al. (1998). "Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene." *Curr Genet* **34**(3): 234-240.
- Tudzynski, B., M. Mihlan, et al. (2003). "Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: *des* and *P450-3* encode GA4 desaturase and the 13-hydroxylase, respectively." *J Biol Chem* **278**(31): 28635-28643.
- Tudzynski, P., K. Holter, et al. (1999). "Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*." *Mol Gen Genet* **261**(1): 133-141.
- Ukibe, K., K. Hashida, et al. (2009). "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance." *Appl Environ Microbiol* **75**(22): 7205-7211.
- Ullmann, A. and A. Danchin (1983). "Role of cyclic AMP in bacteria." *Adv Cyclic Nucleotide Res* **15**: 1-53.
- Valkonen, M., M. Penttila, et al. (2014). "Intracellular pH responses in the industrially important fungus *Trichoderma reesei*." *Fungal Genet Biol* **70**: 86-93.
- van Koppen, C. J. and B. Kaiser (2003). "Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling." *Pharmacol Ther* **98**(2): 197-220.
- Voigt, C. A., W. Schafer, et al. (2005). "A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals." *Plant J* **42**(3): 364-375.
- Wagner, D., A. Schmeinck, et al. (2010). "The bZIP transcription factor MeaB mediates nitrogen metabolite repression at specific loci." *Eukaryot Cell* **9**(10): 1588-1601.
- Walter, J. M., D. Greenfield, et al. (2010). "Potential of light-harvesting proton pumps for bioenergy applications." *Curr Opin Biotechnol* **21**(3): 265-270.
- Walz, W. (2007). *Patch-clamp analysis: advances techniques, 2nd edn.*, Humana Press.
- Wang, L., J. M. Gaziano, et al. (2008). "Associations of plasma carotenoids with risk factors and biomarkers related to cardiovascular disease in middle-aged and older women." *Am J Clin Nutr* **88**(3): 747-754.
- Waschuk, S. A., A. G. Bezerra, Jr., et al. (2005). "*Leptosphaeria rhodopsin*: bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(19): 6879-6883.
- West, K. J. and I. Darnton-Hill (2008). *Vitamin A deficiency*.
- Wiemann, P., S. Albermann, et al. (2012). "The Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase Ppt1 of *Fusarium fujikuroi* controls development, secondary metabolism and pathogenicity." *PLoS One* **7**(5): e37519.

- Wiemann, P., D. W. Brown, et al. (2010). "FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence." Mol Microbiol.
- Wiemann, P., C. M. Sieber, et al. (2013). "Deciphering the cryptic genome: genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites." PLoS Pathog **9**(6): e1003475.
- Wiemann, P., A. Willmann, et al. (2009). "Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation." Mol Microbiol **72**(4): 931-946.
- Winkler, A., C. Arkind, et al. (2002). "Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress." Eukaryot Cell **1**(2): 163-173.
- Woloshuk, C. P., K. R. Foutz, et al. (1994). "Molecular characterization of *afIR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis." Appl Environ Microbiol **60**(7): 2408-2414.
- Wong, A. O., W. S. Li, et al. (2000). "Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish." Biochem Cell Biol **78**(3): 329-343.
- Yamaguchi, S. (2008). "Gibberellin metabolism and its regulation." Annu Rev Plant Biol **59**: 225-251.
- Yang, Q. and K. A. Borkovich (1999). "Mutational activation of a Galphai causes uncontrolled proliferation of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in *Neurospora crassa*." Genetics **151**(1): 107-117.
- Yoshikawa, S., T. Suzuki, et al. (2005). "Kinetic analysis of the activation of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor for photomovements of *Euglena*." Photochem Photobiol Sci **4**(9): 727-731.
- Youssar, L. and J. Avalos (2006). "Light-dependent regulation of the gene *cut-1* of *Neurospora*, involved in the osmotic stress response." Fungal Genet Biol **43**(11): 752-763.
- Youssar, L. and J. Avalos (2007). "Genetic basis of the *ovc* phenotype of *Neurospora*: identification and analysis of a 77 kb deletion." Curr Genet **51**(1): 19-30.
- Youssar, L., T. J. Schmidhauser, et al. (2005). "The *Neurospora crassa* gene responsible for the *cut* and *ovc* phenotypes encodes a protein of the haloacid dehalogenase family." Mol Microbiol **55**(3): 828-838.
- Yun, C. W., H. Tamaki, et al. (1997). "G-protein coupled receptor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Biophys Res Commun **240**(2): 287-292.
- Zakhary, D. R., M. A. Fink, et al. (2000). "Selectivity and regulation of A-kinase anchoring proteins in the heart. The role of autophosphorylation of the type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **275**(52): 41389-41395.
- Zalokar, M. (1957). "Isolation of an acidic pigment in *Neurospora*." Arch Biochem Biophys **70**(2): 568-571.
- Zeilinger, S., B. Reithner, et al. (2005). "Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride*." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1591-1597.
- Zhai, Y., W. H. M. Heijne, et al. (2001). "Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: structural and functional predications for a putative fungal chaperone protein." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1511**(2): 206-223.
- Zhang, Y., R. Lamm, et al. (2002). "Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue." Appl Environ Microbiol **68**(2): 532-538.
- Zippin, J. H., Y. Chen, et al. (2003). "Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains." FASEB J **17**(1): 82-84.
- Zubay, G., D. Schwartz, et al. (1970). "Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(1): 104-110.



