



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

KIMIKA FAKULTATEA  
FACULTAD DE QUÍMICA

**Euskal Herriko Unibertsitatea/Universidad del País Vasco**

**Kimika Fakultatea/Facultad de Química**

**Kimikako Gradua**

2019-2020 ikasturtea

GRADU AMAIERAKO LANA

**ANALISI TEKNIKA BIOINFORMATIKO MASIBOAK ETA  
ZELULARRAK MIKROORGANISMOEN GARAPENA ETA BERAIEN  
ARTEKO INTERAKZIOAK AZTERTZEKO**

**Egilea:** Ziortza Agirrezabala Urkia.

**Zuzendaria(k):** Oier Echeveste Juarez.

Donostia, 2020ko ekaina.

**GIPUZKOAKO CAMPUSA**  
**CAMPUS DE GIPUZKOA**  
Pº. Manuel de Lardizabal, 3  
20018 DONOSTIA-SAN SEBASTIAN  
GIPUZKOA



## LABURPENA

*Aspergillus nidulans* onddoa organismo modelo nagusietako bat da onddo harizpitsuen ugalketa asexualaren kontrol genetiko eta molekularren azterketan zein metabolito sekundarioen ikerketa eta identifikazioan. Horrenbestez, gradu amaierako lan honetan, bi ikerketa ildo jarraitu dira. Alde batetik, garapen asexuala mugatua duen FLIP57 mutantearen genomaren sekuentziazioaren azterketa bioinformatikoa egin da, ziklo asexuala kontrolatzen duten eta fenotipo horren erantzule izan litezkeen gene eta mutazio berriak identifikatzeko. Bestetik, onddo eta bakterioen artean komunikazio kimikorako mekanismoak egon litezkeen aztertzeko, *A. nidulans* eta hainbat bakterio azido-laktiko (BAL) andui elkarrekin hazi dira, lehenaren hazkuntza edo garapenean aldaketak eragin ditzaketen BAL anduiak identifikatzeko. Azterketa bioinformatikoak ustez ziklina bat kodetzen duen gene bat identifikatzera eraman gaitu. *A. nidulans*-BAL kulturei dagokionez, berriz, E11 BAL anduiak aktibitate antifungikoa izan dezakeela ondorioztatu da. Emaitza hauek *Aspergillus nidulans* onddoaren garapen asexualaren inguruan eta bere generoko patogenoen kontrako antifungiko berrien identifikaziorako ikerketa ildo berriak zabaltzen dituzte.

## ABSTRACT

The fungus *Aspergillus nidulans* is one of the main fungal species used as a reference not only for the study of the genetic and molecular mechanisms controlling asexual development, but also for the study and identification of secondary metabolites. Therefore, two research lines have been initiated in this end-of-degree project. On the one hand, and in order to identify new genes controlling asexual development, a bioinformatic analysis of the FLIP57 mutant genome was done. Asexual spore production is blocked in this mutant strain, purportedly due to a mutation in a specific gene. Multiple bioinformatic tools were used to identify that mutation. On the other hand, specific strains of *A. nidulans* and lactic-acid bacteria (BAL) were cultivated together, with the aim of observing if any of them is able to modify fungal growth and developmental patterns. That would imply the existence of a chemical communication mechanism between fungi and BAL. The bioinformatic analysis led us to identify a gene which is predicted to encode a putative cyclin. Furthermore, the *A. nidulans*-BAL co-cultivation showed that the BAL E11 strain might have some antifungal activity. Overall, results open new research lines on the genetic control of the asexual development in *A. nidulans* as well as the identification of new antifungals against pathogens of the genus *Aspergillus*.



## AURKIBIDEA

SARRERA.....	7
Harizpi itxurako onddoak eta <i>Aspergillus</i> generoa.....	7
Garapen prozesuak <i>Aspergillus</i> generoko espezieetan.....	8
Garapen asexualaren kontrola <i>A. nidulans</i> espeziean.....	9
<i>Aspergillus nidulans</i> , estres biotikoa eta bigarren mailako metabolismoa.....	11
HELBURUAK.....	13
MATERIAL ETA METODOAK.....	15
1. Erabilitako anduiak.....	15
2. Hazkuntza medio eta baldintzak.....	15
3. Espora suspentsioaren prestaketa.....	18
4. Film-en aurretratamendua.....	19
5. <i>Aspergillus nidulans</i> eta BAL anduien arteko ko-kulturak aztertzeke metodoak... 19	
5.1. <i>A. nidulans</i> -en anduien hazkuntzaren azterketa.....	19
5.2. Bakterioen hazkuntzaren azterketa.....	20
5.3. Onddo eta bakterioen arteko interakzioen azterketa.....	20
5.3.1. BAL anduiek <i>A. nidulans</i> -en hazkuntza inhibitu edo gelditu dezaketen aztertzeke prozedura.....	20
5.3.2. BAL anduiek onddoaren ernamuintzea inhibitu dezaketen ala ez aztertzeke prozedura.....	21
5.4. BAL anduien exopolisakaridoekin sintetizatutako film-etan onddo anduiak hazteke duten gaitasuna aztertzeke prozedura.....	22
6. Azterketa bioinformatikoa.....	23
EMAITZAK.....	25
1. Hazkuntza azterketak hainbat kultura mediotan.....	25
1.1. <i>A. nidulans</i> -en anduien fenotipoa MRS hazkuntza medioan.....	25
1.2. Bakterioen hazkuntzaren azterketa MRS kultura medioan.....	26
2. Mikroorganismoen arteko interakzioen azterketa.....	28
2.1. BAL anduiek <i>A. nidulans</i> -en hazkuntzan duten eraginaren azterketa.....	28
2.2. BAL anduiek onddoaren ernamuintzean duten eraginaren azterketa.....	30

3. Onddoaren hazkuntzaren azterketa BAL anduietatik erauzitako EPS-ekin ekoiztutako film-etan. ....	31
4. <i>Aspergillus nidulans</i> -en FLIP57 anduiaren azterketa bioinformatikoa. ....	32
4.1. <i>A. nidulans</i> -en ugalketa asexualaren kontrol genetikoan parte har lezakeen gene berri baten proposamena. ....	33
4.2. FlpA proteina ziklina bat izan liteke, ziklo zelularren erregulatzailer. ....	35
4.3. FlpA proteina onddo klase guztietan kontserbatuta dago. ....	37
EZTABAIDA.....	39
BAL anduien <i>A. nidulans</i> onddoarekiko aktibitate inhibitzailea. ....	39
<i>An10640</i> genearen identifikazioa FLIP57 anduiaren ustez <i>A. nidulans</i> -en ugalketa asexualaren kontrolean parte hartzen duen gene moduan. ....	40
<i>An10640</i> geneak kodetzen duen proteinaren (FlpA) ustezko funtzioa eta kontserbazioa. ....	41
ONDORIOAK.....	43
1. BAL- <i>A. nidulans</i> ko-kulturak. ....	43
2. FLIP57 anduiaren azterketa bioinformatikoa. ....	43
CONCLUSIONS .....	44
1. BAL- <i>A. nidulans</i> co-cultivation. ....	44
2. Bioinformatic analysis of FLIP57 strain. ....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45

## SARRERA

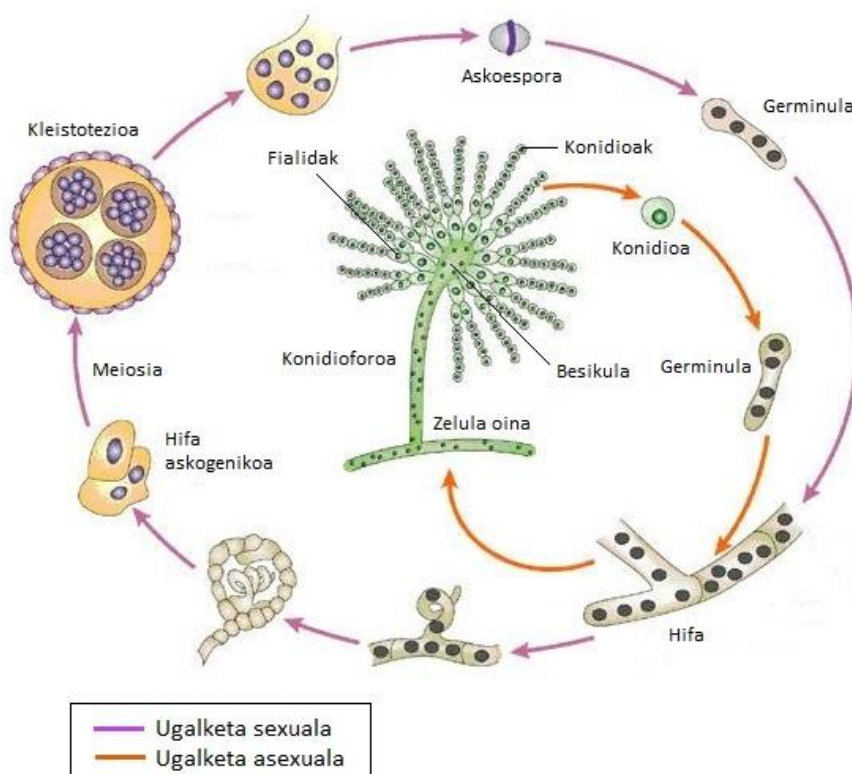
### Harizpi itxurako onddoak eta *Aspergillus* generoa.

Onddoena, 2-4 milioi espezie biltzen dituen erreinu bat da (Hawksworth and Lücking, 2017). Hainbeste espezieren sailkapena konplexua da eta desberdin daitezkeen morfologia, nitxo ekologiko, hazkuntza zein garapen mekanismoak, eta abar, oso anitzak izan daitezke. Horien artean, harizpi itxurako onddoen taldea desberdintzen da. Harizpi itxurakoak direla esaten da hifa izeneko egitura zelularren arabera hazten direlako (Ikus 1go irudia). Hifak egitura tubularrak dira, asimetrikoki hazten direnak (leku bakarretik), punta edo polaritate leku izeneko gunetik, hain zuzen. Horrela, hifen hazkuntzarako (hazkuntza begetatibo izenez ezagutzen den prozesua), mintz plasmatico eta paretak zelular berriak osatzeko beharrezko izango diren konposatuak puntara garraiatuak izan behar dira (Riquelme et al, 2018).

*Aspergillus*, harizpi itxurako onddoen genero bat da. Orain arte, genero honetako 350 espezie inguru identifikatu dira (de Vries et al., 2017). Taxonomiari dagokionez, *Ascomycota* filumean eta *Eurotiomycetes* klasearen barruan sailkatzen dira *Aspergillus* generoko espezieak (*Eukaryota* › *Fungi* › *Dikarya* › *Ascomycota* › *Pezizomycotina* › *Eurotiomycetes* › *Eurotiomycetidae* › *Eurotiales* › *Aspergillaceae* › *Aspergillus*). Garrantzia ekonomiko eta mediko handiko generoa da, espezie asko fruten, hazien, animalia edo pertsonen patogenoak baitira (*A. fumigatus* edo *A. flavus*, esaterako), beste batzuk produktu komertzialen iturri moduan erabiltzen diren bitartean (*A. niger* eta azido zitrikoa, adibidez) (Meyer et al., 2020). Mikroorganismo zelulanitzak dira eta genero honetako beste espezie batzuk, *Aspergillus nidulans* kasu, aspalditik eredu organismo moduan erabili izan dira hainbat prozesu zelular eta garapen prozesuak aztertzeko (Ojeda-López et al., 2018). Horren arrazoiak ere anitzak dira, baina, *A. nidulans*-en kasuan adibidez, laborategi mailan kultibatu eta manipulatzeko duen erraztasuna, patogenoa ez izatea, garapen prozesuak (sexuala eta asexuala; Ikus aurrerago) modu erraz eta errepikakorrean eragiteko prozedurak eskura izatea, edo manipulazio genetikoa erreza eta merkea izatea azpimarra daitezke (Etxebeste eta Espeso, 2020). Gainera, homotalikoa da, alegia, ugalketa sexuala genetikoki berdinak edo desberdinak diren bi kolonien artean gerta daiteke (heterotalikoetan, ugalketa sexuala genetikoki desberdinak diren bi kolonien artean eman behar da derrigorrean).

## Garapen prozesuak *Aspergillus* generoko espezieetan.

Ugalketari dagokionez, *Aspergillus* generoko espezieak ugalketa sexuala zein asexuala burutzeko gai dira (1.irudia). Ugalketa asexuala generoko espezie guztietan ematen dela ikusi da baina, ez da gauza bera gertatzen garapen sexualaren kasuan (Ojeda-López et al., 2018). Garapen asexuala mitosian oinarritzen den garapen zikloa da; alegia, elkarren artean genetikoki berdinak (klonak) diren milioika espora ekoizten dira. Ugalketa sexualaren bidez, ordea, generoko espezieen % 30-40a bakarrik ugaltzen dela kalkulatu da, gainontzeko % 60-70ak bere genomak ugalketa sexuarentzat geneak eduki arren. Ugalketa sexuarekin, gainera, morfologia oso desberdinak garatzen dira (ikus, adibidez, *A. nidulans*-en kleistotezio izeneko egiturak 1go irudian, euren barruan sortutako aska poltsak eta hauen barruko askosporak) eta meiosis oinarritutako garapen prozesua da, alegia, elkarren artean genetikoki desberdinak diren esporak ekoizten dira (parentalen genomak konbinazioz lortuak). Era honetan, uler daiteke garapen asexuala zabalkunderako mekanismo nagusia izatea (hortik *A. fumigatus* izena, adibidez, zeinetan espora asexualen ekoizpena masiboa den, bere kutsagarritasunaren oinarrietako bat izanik), garapen sexuala iraupenera eta trukaketa genetikora bideratua dagoen bitartean.



**1.irudia.** *Aspergillus nidulans* ondoaren ugalketa ziklo sexuala (gezi moreak) eta asexuala (gezi laranja). Ugalketa sexuala meiosi bidez sortutako askoesporen (beren artean eta



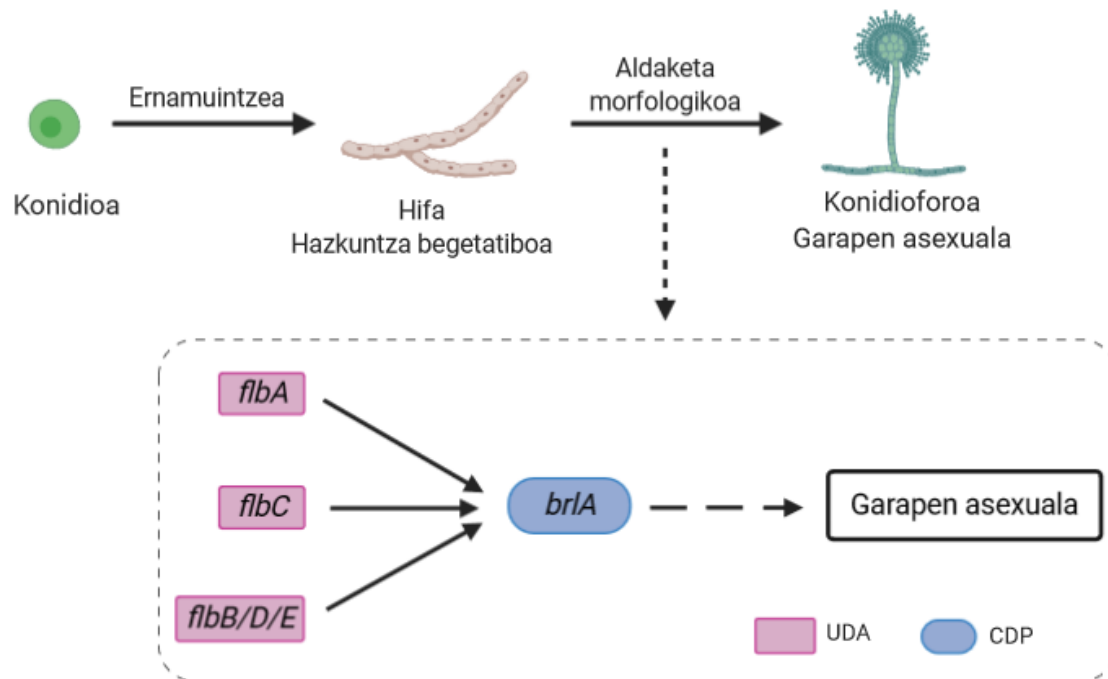
parentalekiko genetikoki ezberdinak diren espora sexualak) bitartez ematen da, zeinak kleistotezio izeneko egituratan, aska izeneko poltsa modukoaren barruan sortzen diren. Ugalketa asexualari dagokionez, berriz, mitosi bidez sortzen diren konidioen (beren zein parentalen artean genetikoki berdinak diren espora asexualak) bidez ematen da. Konidio hauek, konidioforo izeneko egituratan sortzen dira eta konidioforo bakoitzak milaka konidio ekoizten ditu (Casselton & Zolan, 2002 erreferentziatik modifikatuta).

*Aspergillus* generoko espezieen ugalketa ziklo sexual eta asexuala aztertzeko erabiltzen den eredu organismo nagusia *Aspergillus nidulans* espeziea da (Etxebeste eta Espeso, 2020; Meyer et al., 2016). Bi garapen zikloen kontrolerako eta koordinaziorako beharrezkoak diren gene/proteinen artean, gehienak, *A. nidulans*-en izan dira lehen aldiz identifikatuak eta funtzionalki ezaugarrituak.

#### **Garapen asexualaren kontrola *A. nidulans* espeziean.**

Espora asexualek konidio izena dute *A. nidulans*-en eta konidioforo izeneko egituratan ekoizten dira (ikus 1go irudia). Hauen garapen eta ekoizpena, espezie honen genomak kodetuta daude, hainbat generen bitartez. Ikusi da, gene hauen erregulazioa ezinbestekoa dela eta horretarako bi bide genetiko nabarmentzen dira (Otamendi et al., 2019). Alde batetik, UDA (*Upstream Developmental Activation*) bideak konidiazioa emango den ala ez erabakitzen du, ingurune baldintzen arabera (2.irudia). Bestetik, CDP (*Central Developmental Pathway*) bide genetikoa konidioforoen garapenaz arduratzen da, beharrezko aldaketa morfologikoak baimenduz. UDA proteinek seinaleen transdukzio lanetan dihardute; hau da, zelula batean estimulu baten aurrean erantzun fisiologiko baten aktibazioa (hala nola, gene baten espresioaren aktibazioa) eragiten duten proteinak dira. UDA bidea hainbat azpibide genetikotan banatzen da. Lehena *flbA* geneak definitzen du; bigarrena *flbC*-k eta hirugarrena *flbB*, *flbD* eta *flbE*-k (2. irudia). Gene hauetako batzuk transkripzio faktoreak (TF) kodetzen dituzte, ARN mezulariaren sintesia erregulatzeko promotore izena duten eta geneen hasieren aurretik kokatzen diren ADN sekuentzia espezifikoetan lotzen diren proteinak, alegia (Latchman, 1993). Esan bezala, oinarrian, UDA proteinen funtzio nagusia konidioforoen garapena aktibatzen denentz erabakitzea da. Horretarako, CDP bide genetikoaren lehen elementua den *brlA* genearen adierazpena kontrolatzen dute. *brlA* konidioforoen sintesirako lehen gene espezifikoa da. Gene honek, aldi berean, beste TF bat kodetzen du, CDP bideko gene gehiagoren adierazpena aktibatuz eta hazkuntza begetatiboa eman beharrean

konidioforoak garatu daitezzen etapa guztien erregulazio mekanismoa martxan jarriz (Otamendi et al., 2019).



**2.irudia.** *Aspergillus nidulans* onddoaren ugalketa asexualaren erregulazioa, nagusiki, bi bide genetikoaren bidez ematen da. Alde batetik, UDA (*Upstream Developmental Activation*) bidea, zeinak konidiazioa emango den ala ez erabakiko duen. Gutxienez hiru azpibidek osatzen dute UDA bidea, hurrenez hurren, *flbA*, *flbB/D/E* eta *flbC* geneek definitutakoak, hain zuzen (arroxaz adieraziak irudian). FlbB, FlbC eta FlbD transkripzio faktoreak dira eta, beraz, hainbat generen adierazpena kontrolatzen dute. Diana horien artean *brlA* dago, CDP (*Central Developmental Pathway*) bide genetikoaren lehen elementua eta prozesuaren kontrolean funtzio ezinbestekoa jokatzen duena (urdinez irudian). BrlA-k ere, transkripzio faktorea izanik, CDP bideko hainbat generen espresioa erregulatzen du, konidiazioa emateko beharrezko aldaketa morfologikoak dagokien momentuan eta lekuetan gauza daitezzen.

Garapen asexuala *A. nidulans*-en hifak aire ingurune batean daudenean aktibatzen da nagusiki, baita uhin luzera jakineko argia dagoenean ere (Rodríguez-Romero et al., 2010; Adams et al., 1998). UDA bideko generen bat genomatik ezabatua izan denean, *brlA*-ren adierazpena inhibitu edo atzeratu egiten da. Ondorioz, mutante horiek *fluffy* (kotoitsu) deritzon fenotipo akonidiala erakusten dute. Hori gertatzen da, esaterako, FlbB TF-a kodetzen duen genea genomatik ezabatzean. Proteina hau ez badago, BrlA-ren sintesia ere ezin da eman eta, ondorioz, CDP bidea blokeatuta geratzen da, konidioforoak garatzeko eman

beharreko aldaketa morfologikoak inhibituta geratzen direlarik. Airea eta argiaz gain, badaude konidiazioa eragin dezaketen beste estimuluak ere, hala nola elikagaien agorketa, gatz edo azukreen kontzentrazio altua, beste mikroorganismoen presentzia edo metabolito espezifikoaren presentzia bezalako estres baldintzak (Etxebeste eta Espeso, 2020). Adibidez,  $\Delta flbB$  (non  $\Delta$  hizkiak delezioa adierazten duen; *flbB* genea genomatik ezabatua izan dela, alegia) mutanteak hazkuntza baldintza estandarretan erakusten duen fenotipo akonidiala atzera itzuli daiteke eta konidiazioa eragin fosfato ( $H_2PO_4^-$ ) kontzentrazio handiko medioan kultibatzen bada (Otamendi et al., 2019). Honek, *brlA*-ren indukzioarako bide genetiko alternatiboak egon daitezkeela iradokitzen du, UDA bidez gain. Ustezko bide horietan parte hartzen duten geneak identifikatzeko, Otamendi et al (2019) lanean, fosfatodun (0.65M) medio batean fenotipo akonidiala zuten  $\Delta flbB$  mutanteak isolatu ziren (FLIP, *fluffy* in phosphate, mutanteak). FLIP166-ren azterketak, konidiazioaren kontrolean parte hartzen zuten bi generen identifikazioa eta ezaugarritzea ahalbidetu zuen. Gradu amaierako lan honetan ere, FLIP57 mutantearen genoma aztertu da, konidiazioarako beharrezkoak izan daitezkeen gene gehiago identifikatzeko helburuarekin.

### ***Aspergillus nidulans*, estres biotikoa eta bigarren mailako metabolismoa.**

Onddo harizpitsuak, etorkizun hurbil batean, konposatu bioaktibo berrien iturri izan daitezkeela kontsideratzen da (Keller & Adams, 1995). Bioaktibo hitzaz organismo bizidunen mekanismo fisiologikoetan eragiten duten sustantzia kimikoak direla adierazi nahi da, antibiotikoak esaterako. Sustantzia bioaktibo hauek, baldintza jakin batzuetan bakarrik ekoizten direnez, eta maiz kontzentrazio baxuetan, metabolito sekundario (zuzenean bizidunaren hazkuntza, garapen eta ugalketan parte hartzen ez duten pisu molekular txikiko konposatu organikoak dira) izenez ezagutzen dira. Konposatu hauen sintesirako eman beharreko erreakzio metabolikoen multzoari ere bigarren mailako metabolismoa deritzo. Hauen sintesiaren erregulazioa onddoen genomak kodetuta dago, *cluster* metaboliko izeneko gene segiden bitartez. Hala ere, interes farmakologiko handia izan dezaketen konposatu bioaktibo hauen identifikazio eta karakterizazioa ez da lan erraza. Izan ere, laborategietan mikroorganismoak (kasu honetan onddoak) hazteko erabiltzen diren kultura medioak eta baldintzak optimoak dira eta, ondorioz, metabolito sekundarioen ekoizpena urria da eta, aldi berean, hauen sintesirako beharrezkoak diren entzimak kodetzen dituzten geneen adierazpena oso baxua (Keller & Adams, 1995). Esaterako, *A. nidulans* onddoa sintetizatzekeo gai izango litzatekeen bigarren mailako metabolito guztien artean, erdia baino ez dira identifikatu (Netzker et al., 2015).

Arazo horri aurre egiteko, beste metodologia batzuen artean, harizpi itxurako onddoak (*A. nidulans* eredu organismoa, kasu honetan) beste mikroorganismoekin batera hazteko esperimentuak (ko-kulturak) garatu dira; hala nola, bakterioak, eta GrAL honen kasuan bakterio azido-laktikoak (BAL), erabiliz. Mikroorganismo batengan beste mikroorganismoen presentziak eragindakoari estres biotikoa deritzo. Izan ere, bakoitzak bestearen hazkuntza inhibitzeko metabolito sekundarioak ekoitziko ditu defentsa moduan, sintesirako beharrezkoak diren entzimak kodetzen dituzten geneen adierazpena aktibatuz (Netzker et al., 2015). Beraz, onddo-bakterio kultura batean, konposatu antibakterianoak identifika litezke baina, baita bakterioek ekoiztutako konposatu antifungikoak ere, eta horien guztien akzio mekanismoak ezaugarritu litezke. GrAL honetan, bigarren ikerketa lerro bezala, aktibitate antifungikoa izan lezaketen BAL anduien identifikazioa eta ezaugarritzea hasi da.

## HELBURUAK

*A. nidulans* onddoaren erabilgarritasuna ikusita eta harizpi itxurako onddoen ugalketa asexualaren kontrol genetikoak zein mikroorganismoen arteko interakzioak aztertzeak duten garrantzia ikusirik, lan honetan bi ikerketa lerro jarraitu dira. Alde batetik, *A. nidulans*-en FLIP57 ( $\Delta flbB$  fondo genetikoa duena) mutantearen genomaren azterketa bioinformatikoa egin da, garapen asexuala kontrolatzen duten gene berriak identifikatzeko. Beste aldetik, berriz,  $\Delta flbB$  eta BD185 anduiak bost BAL anduekin batera hazi dira, euren arteko interakzio posibleak aztertu eta hauen hazkuntza eta garapena nola aldatzen diren ikusteko. Zehazki, hiru helburu hauek proposatu dira GrAL honetarako:

- ✓ Mikroorganismoen (*A. nidulans* onddo harizpitsua eta Kimika Fakultateko Biologiako laborategiko bildumako BAL andui espezifikoak) arteko interakzioen azterketa egitea, bata bestearen hazkuntzan eta garapenean duten eragina ezagutzeko.
- ✓ FLIP57 andui mutantearen genomaren azterketa bioinformatikoa egitea, onddoen garapen asexualaren kontrolean parte har lezaketen gene berriak identifikatzeko.
- ✓ Identifikatutako gene eta honek kodetzen duen proteinaren azterketa bioinformatikoa egitea, hauen funtzioaren inguruko aurretiazko informazioa eskuratzeko.



## MATERIAL ETA METODOAK

### 1. Erabilitako anduiak.

Honakoak dira GrAL honetan erabilitako onddo eta BAL anduiak.

Anduia		Genotipoa	Iturria
<i>Aspergillus nidulans</i>	FLIP57	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB;riboB2, veA1; mutazio ezezaguna</i>	(Otamendi, Espeso, & Etxebeste, 2019)
	MAD1425 (TN02A3)	<i>ΔnkuA::argB; argB2; pyrG89; pyroA4; veA1</i>	(Nayak et al., 2006)
	BD185	<i>ΔnkuA::argB; argB2; pyrG89; gfp::flbB, pyroA4; veA1</i>	(Etxebeste et al., 2008)
Anduia		Jatorria	
Bakterioak	AC1	<i>Leuconostoc carnosum</i> C <sub>UPV</sub> 411. Urdailazpiko egositik isolatua.	Biologiako laborategiko BAL andui bilduma.
	E11	<i>Lactobacillus mali</i> C <sub>UPV</sub> 271. Sagar zukutik eratorria.	Biologiako laborategiko BAL andui bilduma
	B1	Espezie ezezaguna. Sagar zukutik eratorria.	Biologiako laborategiko BAL andui bilduma
	E51	Espezie ezezaguna. Sagar zukutik eratorria.	Biologiako laborategiko BAL andui bilduma
	AST1	Espezie ezezaguna. Sagar zukutik eratorria.	Biologiako laborategiko BAL andui bilduma

**1go.taula.** Lan honetan erabilitako onddo eta bakterio anduiak biltzen dituen taula.

### 2. Hazkuntza medio eta baldintzak.

GrAL lan honetan kultura medio solidoak erabili dira. Batetik, *A. nidulans* onddoa hazteko erabiltzen den MMA medioaren prestaketarako prozedura 2-5. taulatan azaltzen da. Kultura medio hau, erabilitako onddo anduek dituzten mutazioekin lotutako elikagaiekin (ikus 1go taula; adibidez, MAD1425 anduiak, piridoxina, uridina eta uraziloa behar ditu *pyroA4* eta *pyrG89* mutazioak dituelako) osatu da. Bestetik, bakterioak hazteko eta onddo-bakterio kulturek prestatzeko MRS kultura medioa erabili da (6. taula). MRS medio hau glukosarekin edo sakarosarekin osatzen zen, esperimentoaren arabera. Izan ere, glukosak exopolisakaridoen (EPS) sintesia inhibitzen du BAL anduietan, sakarosak aktibatu egiten duen bitartean (Llomas-Arriba doktorea, komunikazio pertsonala). Prestatutako kultura medio eta disoluzioak ur destilatua erabiliz jarri dira arrasean eta autoklabean 20 minutuz 110 °C-tan edo Bunsen txiskeroaren ondoan filtratuz (filtroaren poro diametroa: 0.45 μm) esterilizatu dira.

Osagaiak	Medio litro bakoitzeko
Gatz eta traza elementuen disoluzioa (ikus 3. taula)	20 mL
Agarra	15 g
Ur destilatua	1 L arte
Doitu pH-a 6.8-ra eta esterilizatu	
Amonio tartrato disoluzioa (x100)	10 mL
Glukosa disoluzioa (x10)	100 mL

**2.taula.** MMA medio minimoa prestatzeko osagai zerrenda litro bakoitzeko.

Osagaiak	Litro bakoitzeko
KCl	26 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	76 g
Traza elementuen disoluziotik (ikus 4. taula)	50 mL
Ur destilatua	1 L arte
Esterilizatu	

**3.taula.** Gatz eta traza elementuen disoluzioa (x50) prestatzeko litro bakoitzeko erabili diren osagaiak.

Osagaiak	Litro bakoitzeko
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5 g
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.6 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.6 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.1 g
Na <sub>2</sub> EDTA	50 g
Ur destilatua	1L arte

**4.taula.** Traza elementuen disoluzioaren (x1000) osagaiak litro bakoitzeko.



Osagaiak	Prestaketa 100ml-ko	100mL-ko
Biotina ( $\times 10^4$ )	10 mg biotina (0.004 mM) Filtrazioz esterilizatua eta 4 °C-tan gordea	10 $\mu$ L
Piridoxina (pyro) ( $\times 10^3$ )	50 mg piridoxina (2.5 mM) Filtrazioz esterilizatua eta 4 °C-tan gordea	100 $\mu$ L
Azido p-aminobenzoikoa (paba) ( $\times 10^3$ )	200 mg azido p-aminobenzoikoa (14 mM) Autoklabean esterilizatu eta 4 °C-tan gorde	100 $\mu$ L
Uridina	0.122 g uridina (momentuan pisatu eta mediora zuzenean gehitu)	0.122 g
Uraziloa	0.056 g uraziloa (momentuan pisatu eta mediora zuzenean gehitu)	0.056 g

**5.taula.** Andui mutanteak kultibatzen hazte mediora gehitutako elikagai osagarriak, horien stock kontzentrazioak eta prestaketa.

Konposatua	Medio litro bakoitzeko
Glukosa/Sakarosa	20 g
Peptona	10 g
Haragi-estraktua	10 g
Legami-estraktua	5 g
Tween 80	1 g
Diamonio zitratoa	2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.05 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Sodio azetatoa	5 g
Agarra	20 g
Ur destilatua	1 L arte
Doitu pH-a 5.5, 6.5 edo 7.0-ra	

**6.taula.** MRS medioa prestatzeko osagai zerrenda litro bakoitzeko.

MMA medioaren pH-a 6.8ra doitu zen NaOH 4M disoluzioa erabiliz, *Aspergillus nidulans* ondoaren hazkuntza optimoa baldintza horietan ematen baita. MRS medioei dagokienez,

hainbat pH-tara doitu ziren (5.5; 6.5 eta 7.0; HCl-tan 1M zen edo NaOH-tan 4M zen disoluzioak erabiliz), BAL andui bakoitzak pH jakin batean ematen baitzuen hazkuntza optimoa. Kulturak 30 edo 37 °C-tan hazi ziren. Bakterioak hazterako garaian, anaerobikoak izanik, plakak parafilmarekin estali ziren oxigenoaren sarrera galarazteko edo CO<sub>2</sub> inkubagailu bat erabili zen (%5 CO<sub>2</sub>). Mikroorganismoak batera kultibatu zirenean, plakak 30 °C-tan eta parafilmarekin estalita hazi ziren, bakterioen hazkuntza egokia emateko baldintza horiek beharrezkoak direlako eta onddoa ere ondo hazten delako baldintza horietan.

### **3. Espora suspentsioaren prestaketa.**

GrAL honetan garatu diren onddo-BAL ko-kultura prozedura batzuetan, bakterio kolonien gainetik onddo espora suspentsioa isurtzen zen (ikus prozedura horiek ondorengo ataletan). Onddo espora suspentsioa prestatzeko MAD1425 edo BD185 anduiak erabili ziren, espora asexual ugari ekoizten dutelako. Andui hauek MMA medioan, 37 °C-tan, 48 orduz hazi ziren. Espatula baten laguntzaz, ekoiztutako espora asexualak Tween 20 detergentetan % 0.02 zen ur disoluzioaren 10 mL-tan jaso ziren, 15 mL-ko polipropilenoazko hodietan. Esporak bitan garbitu ziren giro tenperaturan, 10 minutuz eta 4000 rpm-tan zentrifugatuz. Garbiketen ondoren lortutako esporen lagina Tween 20 disoluzioaren 1 mL-tan jaso ziren.

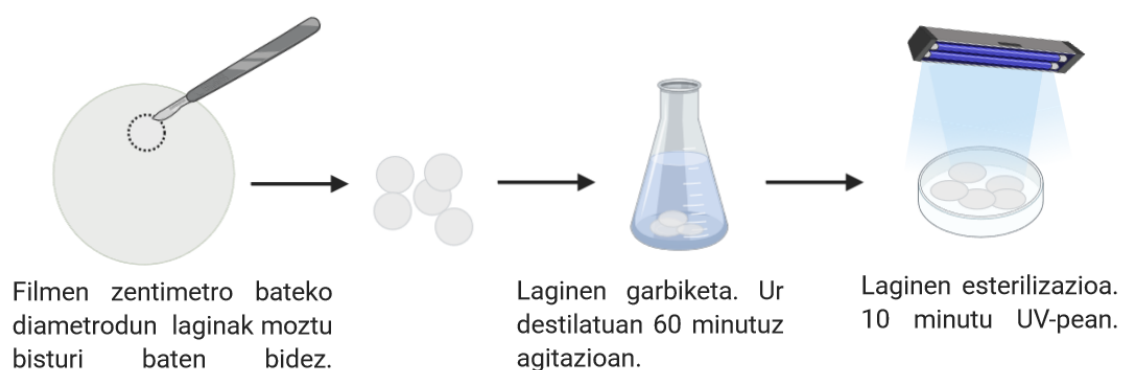
Ko-kultura plakatan onddo espora kantitate jakin bat inokulatu behar zenez, lortutako *stock* suspentsioaren espora kontzentrazioa neurtu egin behar zen. Horretarako esporen kontaketa bat egin zen (*stock*-aren 1:200 diluzio batekin) Thoma kamera izena duen porta erabiliz. Oinarrian, Thoma kamarak, orotara 1 mm<sup>2</sup>-ko azalera duen karratu bat du, 25 karratu txiagotan banatuta dagoena eta aldi berean karratu txikiago horietako bakoitza beste 25 karratutxoetan banatzen delarik. Bertan lagin tanta bat jarri eta mikroskopiaaren bidez lehenengo 25 lauki horietako bakoitzean dagoen espora kantitatea kuantifikatzen da, ondoren batazbesteko baten bidez laginaren kontzentrazioa kalkulatzeko.

Ko-kultiboetan inokulatzeko onddo espora suspentsioa prestatzeko, lehenengo kultura medio egokiaren 8 mL urtu ziren inokulatu beharreko plaka bakoitzeko, eta 15 mL-ko polipropilenoazko hodi banatan gorde ziren 50 °C-tan. Honen helburua, medioaren tenperatura nahiko baxu mantenduta, egoera likidoan mantentzea zen. Izan ere, espora suspentsio uniforme lortzeko medio likidoa behar da, baina esporak tenperatura altuko mediora gehituz gero hauek galdu egingo lirатеke eta ez lirатеke ernamuinduko. Beraz, kultura medio urtuen tenperatura 50-60 °C-ra jaitzita, 8ml medio bakoitzari, behar adina espora gehitzeko

beharrezko bolumena gehitu zitzaion esporen *stock* disoluziotik. Azkenik, espora suspentsioa ondo nahastu zen poliki eta burbuilarik ez eratzeko tentuz.

#### 4. Film-en aurretratamendua.

Film-ak erabili aurretik, garbitu, esterilizatu eta esperimenterako egokiak izan daitezen prestatu egin behar dira. Horretarako, aztergai ziren hiru film-etatik (E11, AST1 eta kontrola) 1 cm-ko diametroko behar adina zirkunferentzia moztu zen bisturi baten bidez. Ondoren, hauek ur destilatuan garbitu ziren Erlenmeyer matrizeetan, ordubetez agitazioan edukita. Azkenik, esterilizatzeko, ura kendu eta 10 minutuz UV-pean inkubatu ziren.



**3.irudia.** Film-en aurretratamenduaren azalpena. Film-ak esperimenterako prestatzeko, lehenik eta behin 1 cm-ko diametroan laginak moztu dira, denek tamaina bera izan dezaten. Ondoren, ur destilatuan garbitzen dira ordubetez agitazioan. Bukatzeko, esterilizatu egiten dira, laginak uretatik atera eta Petri plakatan 10 minutuz UV-pean inkubatuz.

#### 5. *Aspergillus nidulans* eta BAL anduien arteko ko-kulturak aztertze metodoak.

GrAL honetan *A. nidulans* edo/eta BAL anduien kulturarako hainbat prozedura erabili da. Kasu batzuetan, onddoa edo BAL anduiak bakarrik hazi dira, eta beste batzuetan elkarrekin. Ko-kulturatan ere, prozedura desbedinak jarraitu dira, batzuetan BAL anduiek *A. nidulans*-en ernamuintzean izan lezaketen eragina aztertze, eta beste batzuetan, onddoa behin hazten hasita, BAL anduiek honen hazkuntza gelditu zezaketen ala ez aztertze. Prozedura hauek guztiak banan bana azalduko dira jarraian atal desberdinetan.

##### 5.1. *A. nidulans*-en anduien hazkuntzaren azterketa.

*Aspergillus nidulans* MRS kultura medioan hazten zen ala ez aztertu nahi izan zen, gero ko-kulturak BAL anduiak hazteko egokia zen medio horretan burutu ahal izateko.

Horretarako, 10 Petri plaka prestatu ziren (5.5 cm-ko diametroan). Alde batetik, andui fungiko mutante bakoitza (BD185 eta  $\Delta flbB$ ) bina medioetan (MRS, pH=6.5 eta pH=5.5) hazi zen eta, bestetik, andui basatia MMA medio minimoan (pH=6.8). Andui/baldintza bakoitza bikoiztuta aztertu zen errepikakortasuna bermatzeko. Lehenago aipatu moduan, laginak 37 °C-tan hazi ziren eta 72 orduren ostean kulturen argazkiak hartu ziren eta onddo kolonien diametroak neurtu ziren.

## **5.2. Bakterioen hazkuntzaren azterketa.**

Bost BAL anduien hazkuntza aztertzeko, onddoekin erabilitako prozedura bera jarraitu zen. Bakoitza pH=5.5 edo pH=6.5-ra doitutako glukosadun MRS medioan inokulatu zen, hagatxo baten bidez, 5.5 cm-ko Petri plakatan. Oraingoan, launa plaka prestatu ziren (guztira 20) BAL andui eta kultura medio bakoitzeko; laukote bakoitzetik bi parafilmarekin estali ziren eta inkubagailu arruntean hazi ziren. Honekin, BAL anduiak anaerobioak izanik, parafilmak oxigenorik gabeko ingurune egokia bermatzen zuen ala ez frogatu nahi izan zen. Laukote bakoitzeko gainontzeko bi plakak, parafilmarekin estali gabe, CO<sub>2</sub> (%5) inkubagailuan sartu ziren, aurreko biek konparatzeko. Plaka guztiak 30 °C-tan hazi ziren 48 orduz eta azkenik argazkiak atera zitzaizkien.

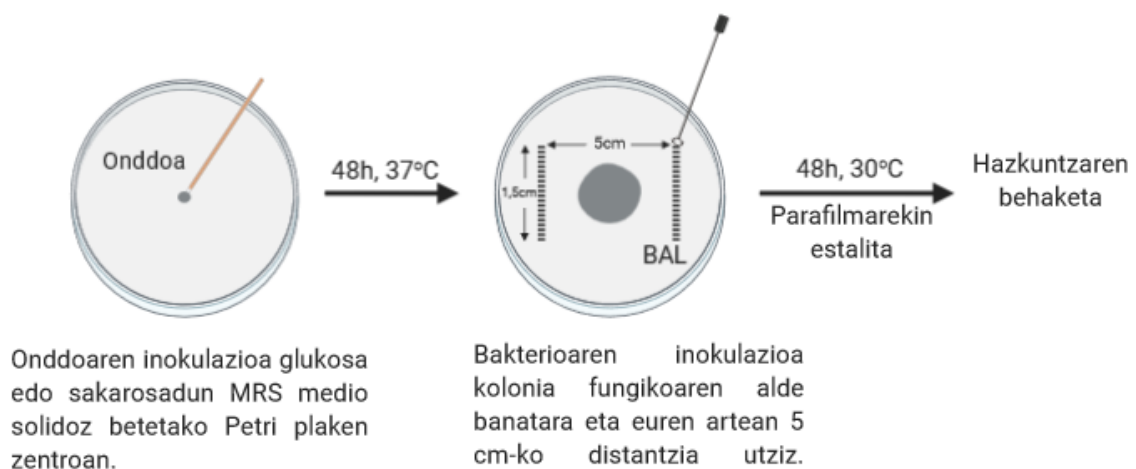
## **5.3. Onddo eta bakterioen arteko interakzioen azterketa.**

Ko-kulturen azterketak egiteko, jarraian sakonago azalduko diren bi metodologia erabili dira. Lehenengo kasuan, BAL anduiek onddoaren hazkuntza aktiboa inhibitzeko gaitasuna duten ala ez aztertu nahi izan da. Bigarrenaren kasuan berriz, BAL andui horien presentzian, onddoaren esporek ernamuintzeko duten gaitasuna aztertu da. Esperimentu hauetan erabilitako onddo eta bakterio andui guztiak, esperimentu bakoitza egin aurretik independienteki haziak izan ziren 5.5 cm-ko diametroan Petri plakatan. Horretarako, esperimentua baino 48h lehenago, pH=6.5-ra doitutako glukosadun eta sakarosadun MRS medioak erabili ziren.

### **5.3.1. BAL anduiek *A. nidulans*-en hazkuntza inhibitu edo gelditu dezaketen aztertzeko prozedura.**

Esperimentu honetarako egindako diseinuak, onddoa plakaren erdian egonik alde banatara BAL anduiak inokulatzean datza, paraleloan (Ikus 4. irudia). Lehenengo *A. nidulans* onddoaren MAD1425 andui basatia inokulatu zen pHa 6.5 eta 7.0-ra doitutako glukosadun

edo sakaroadun MRS medioetan. Onddoa 9 cm-ko diametroan plaka bakoitzaren erdian inokulatu zen zotz antzu baten bidez eta hazten utzi zen 48 orduz 37 °C-tan. Kultura denbora horren ondoren, bakterioak binaka inokulatu ziren hagatxoaren bidez, esan bezala, onddo koloniaren alde banatara (paraleloan), beren artean 5 cm-ko tartea utziz eta 1.5 cm-ko lerro bertikal bat marraztuz (4. irudia). pH=6.5-ra doitutako medioetan, AST1 eta E11 BAL anduiak erabili ziren. pH=7.0-ra doitutako medioetan, berriz, AC1 BAL anduia. Behin BAL anduiak inokulatu, Petri plakak parafilmarekin estali eta 30 °C-tan inkubatu ziren. Azkenik, plakei argazkiak atera zitzaizkien 24 orduro, hazkuntzaren eboluzioa behatu eta kolonia fungikoen hazkuntza edo garapen patroietan aldaketarik ematen zen ikusteko.

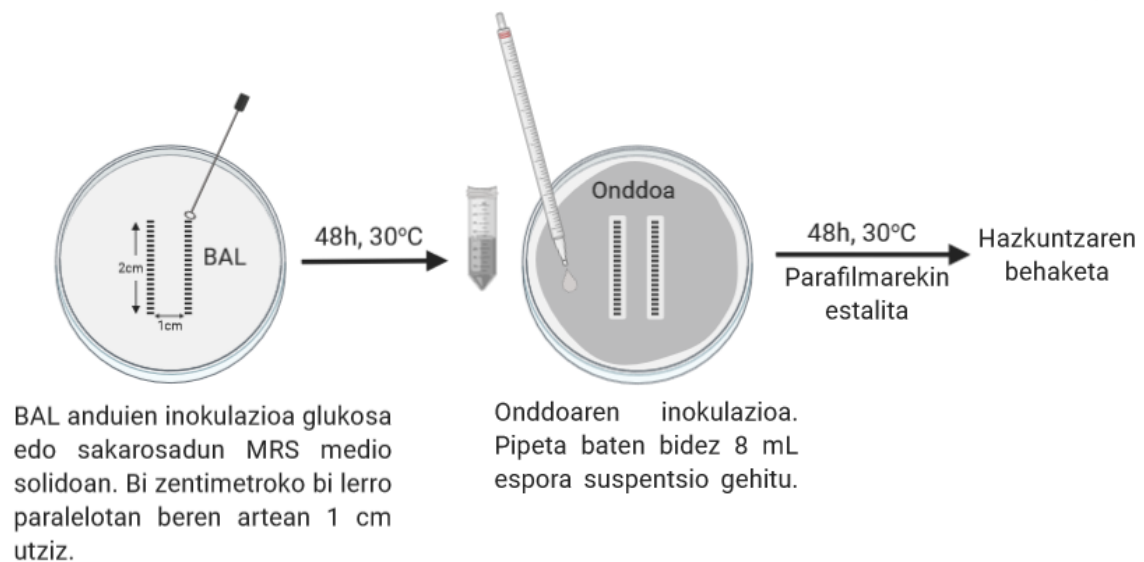


**4.irudia.** BAL anduiek *A. nidulans*-en hazkuntza inhibitu edo gelditu dezaketen aztertzeko prozedura. Onddo plakaren erdian inokulatu da zotz baten laguntzaz eta 37 °C-tan hazten uzten da 48 orduz. Onddo hazitakoan, BAL andui bat inokulatu da onddo koloniaren alde banatara, hagatxoarekin 1.5 cm-ko bi marra paralelo irudikatuz eta beren artean 5 cm-ko tartea utziz. Azkenik, plakak parafilmarekin estali eta beste 48 orduz inkubatzen dira, oraingoan 30 °C-tan. Bukatzeko, fenotipoen erregistroa egin da argazkiak atereaz.

### 5.3.2. BAL anduiek onddoaren ernamuntzea inhibitu dezaketen ala ez aztertzeko prozedura.

Esperimentu hau, aurrez hazitako bakterioen gainean onddo espora suspentsio bat gehitzean oinarritzen da, espora horiek ernamuntzeko gai diren behatzeko (Magnusson & Schnürer, 2001 eta Manini et al., 2016, lanetan oinarrituta). Beraz, lehenik, BAL anduiak inokulatu ziren 9 cm-ko diametroan plaketan. Horretarako, BAL andui bereko bi inokulo paraleloan jarri ziren 2 cm-ko lerro banatan, elkarrengandik 1 cm-ra (ikus 5. irudia). Kultura guztiak pH=6.5-ra doitutako glukosadun edo sakaroadun MRS mediotan burutu ziren.

Plakak, parafilmarekin estalita, 30 °C-tan 48 orduz hazi ondoren, *A. nidulans*-en BD185 anduiaren 6 x 10<sup>5</sup> espora inguru, plakan zegoen MRS medio berdinare 8 mL-tan suspendituta, zabaldu egin ziren (esporen suspentsioa nola prestatu zen atal honetako 3. puntuan azaldu da). Era honetan, medioaren 8 mL horiek hoztutakoan, geruza uniforme eta solidoa lortu zen. Kultura plakak 30 °C-tan inkubatu ziren parafilmaz estalita eta argazkiak atera zitzaizkien 48, 72 eta 144 ordutara.

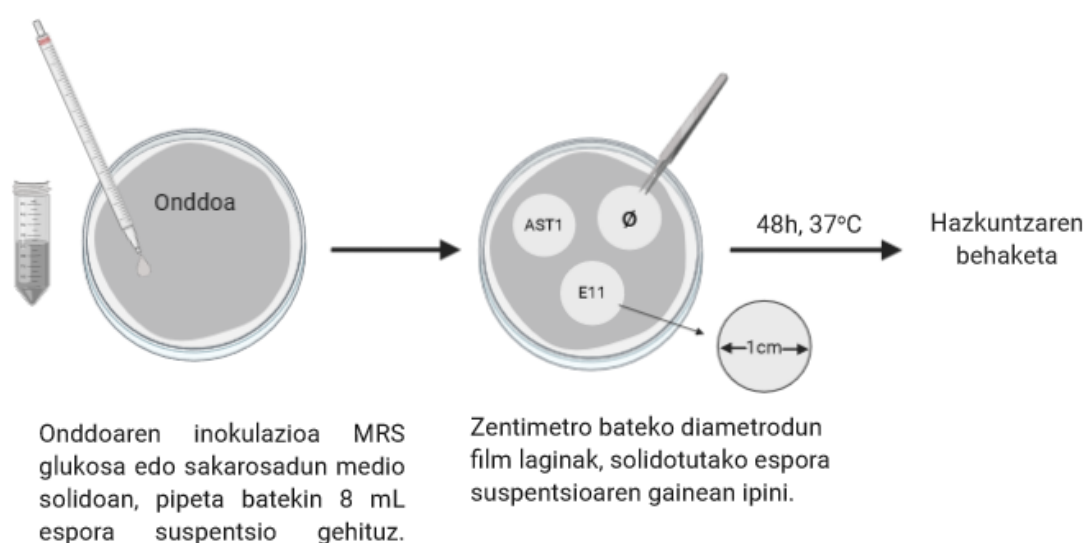


**5.irudia.** BAL anduiek *A. nidulans*-en ernamuintzea inhibitu dezaketen ala ez aztertzeko prozedura . Bakterio azido-laktikoak 2 cm-ko bi lerro paralelo irudikatuz inokulatu dira beren artean 1 cm-ko tartearekin utziz. Parafilmarekin estalita 30 °C-tan 48 orduz inokulatu ondoren, onddoaren espora suspentsioa gehitzen da plaka osoan zehar. Azkenik, parafilmarekin estali eta 30 °C-tan inkubatzen dira berriz ere, kulturen hazkuntzaren jarraipen bat egiten delarik.

#### 5.4. BAL anduien exopolisakaridoekin sintetizatutako film-etan onddo anduiak hazteko duten gaitasuna aztertzeko prozedura.

EHU-ko Koro de la Kaba eta Pedro Guerrero ikertzaileen Biomat taldeak (<http://www.sc.ehu.es/iawcacik/>), E11 eta AST1 BAL anduien EPS laginekin (Llamas-Arriba doktoreak isolatutakoak) osatutako filmak prestatu zituzten kolagenozko matrize batean (EPS gabeko film-a erabili zen kontrol moduan). Film horien ustezko aktibitate antifungikoa aztertu nahi izan zen, *A. nidulans*-en BD185 anduiaren hazkuntza edo/eta garapena mugatzeko edo inhibitzeko gaitasuna zuten ala ez neurtuz. Helburua, BAL anduiek ekoiztutako EPS horiek aktibitate antifungikoa izan dezaketenentz aztertzea izan zen, film horiek merkatuan elikagaien kontserbaziorako erabiltzeari begira.

Esperimentu hau burutzeko, lehenik, hiru medio ezberdineko plakak prestatu ziren (9 cm). Batetik, pH=6.5-ra doitutako sakaroadun edo glukosadun MRS medioak eta, bestetik, MMA medio minimoa. Ondoren, BD185 onddo anduiaren espora suspentsioaren 8 mL (ikus 3. puntua) gehitu ziren Petri plaka bakoitzaren gainean (Ikus 6. irudia). Kasu honetan, bi kontzentrazio ezberdineko espora suspentsio erabili ziren:  $6 \times 10^5$  edo  $4 \times 10^4$  konidio plakako. Guztira, 12 plaka prestatu ziren, 6 andui/baldintzak pareak bikoiztu egin baitziren. Espora suspentsio urtua hoztu eta gogortutakoan, aurrez tratatutako (atal honetako 4. puntuan azaldu da 3.irudiaren laguntzaz) filmak kokatu ziren medio solidotuen gainean. Film bakoitzetik lagin bana kokatu zen plaka bakoitzean. Plaka guztiak 37 °C-tan inkubatu ziren, 48 ordura onddoaren hazkuntza patroia erregistratuz.



**6.irudia.** Bakterio azido-laktiko anduien EPS laginekin egindako filmetan onddoaren hazkuntza aztertzeko esperimentuaren diseinua. Lehenik eta behin, aurrez prestatutako kultura medio solidoetan onddoaren inokulazioa egiten da espora suspentsio urtuaren 8 mL plakara gehituz, pipeta baten laguntzaz (kasuan kasuko kultura medioa erabiliz bai plakarako baita espora suspentsiorako ere). Hau solidotutakoan, aurrez esterilizatutako (ikus 3. atala) 1 cm-ko diametroko film laginak kokatzen dira medioaren gainean. Azkenik, plakak 48 orduz 37 °C-tan gordetzen dira, ondoren onddoaren hazkuntzaren jarraipen bat eginaz.

## 6. Azterketa bioinformatikoa.

FLIP57 mutantearen (Otamendi et al., 2019) genoma Stabvida (Caparica, Portugal) enpresan sekuentziatu zen 2019ko Azaro-Abenduan. Sekuentziazio fitxategiak Oier Etxebeste irakasleak bihurtu zituen .bam izeneko formatorra. Formatu hau zuen fitxategia IGV (*Integrative Genomics Viewer*) programa erabiliz aztertu zen, aurretik sekuentziatua zegoen FLIP166-ren

genomarekin konparatuz. Izan ere, FLIP57 eta FLIP166 mutanteek, bakoitzaren fenotipo akonidiala eragiten zuen mutazioak gene desberdinetan zeudela jakina zen (A. Otamendi, komunikazio pertsonala; argitaratu gabea). Horrela, bi mutanteetan aurkitzen ziren mutazioak FLIP57-ren fenotipoa eragiteko hautagai bezala baztertu egin ziren. Bakarrik FLIP57-ren genomatik aurkitzen ziren mutazioak hartu ziren hautagaitzat. Konparaketa hori erreferentziatzeko beste andui batzuekin ere burutu zen, irizpide bera jarraituz.

Konparaketa horretan *An10640* genea identifikatu zen FLIP57 fenotipoaren eragile izateko hautagai nagusi bezala. Gene honi zegokion proteina sekuentzian egon litezkeen eremu funtzionalak identifikatzeko Interpro web orria erabili zen (<https://www.uniprot.org/>; Consortium, 2019). *An10640* geneak kodetzen duen proteinaren kontserbazioa aztertzeko, bere sekuentzia NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) plataformako BLAST algoritmoarekin aztertu zen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). BLAST algoritmoak, oinarrian, aztertu nahi den RNA, DNA zein proteina baten sekuentzia, bere datu baseko sekuentzia kopuru handi batekin alderatzen du kontserbazio maila handieneko sekuentziak identifikatuz. Horrela, *An10640* geneak kodetzen duen proteinaren ortologo (sekuentzia oso antzekoa duten geneak, askotan arbaso komun batetik sortuak, baina eboluzioaren ondorioz aldaketak jasandakoak) zerrenda bat lortu zen. Ortologoen zerrenda filtratu ondoren, aukeratutako sekuentziak lerrokatu (sekuentzien zati antzekoak bata bestearen parean jarriz, ezberdintasunak non dauden aztertzeko) egin ziren Clustal omega webgunean (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Madeira et al., 2019). Lerrokatze honetatik abiatuz, zuhaitz filogenetikoa (hainbat espezie, genero eta izakien arteko hurbiltasun ebolutiboa adierazten duen zuhaitz itsurako eskema) eraiki zen MegaX programa erabilia (<https://www.megasoftware.net/>; Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018). Zuhaitza iTOL (*Interactive Tree Of Life*) erabiliz editatu zen (Letunic & Bork, 2019).

Azkenik, *An10640* proteinaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena egiteko Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>; Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015) eta Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>; Waterhouse et al., 2018) plataformak erabili ziren. Hortik sortutako PDB fitxategiekin, Dynamut programa erabili zen FLIP57 mutantean identifikatutako mutazioak proteina horren egituran izango lukeen eragina aztertzeko (<http://biosig.unimelb.edu.au/dynamut/>; Rodrigues, Pires, & Ascher, 2018).



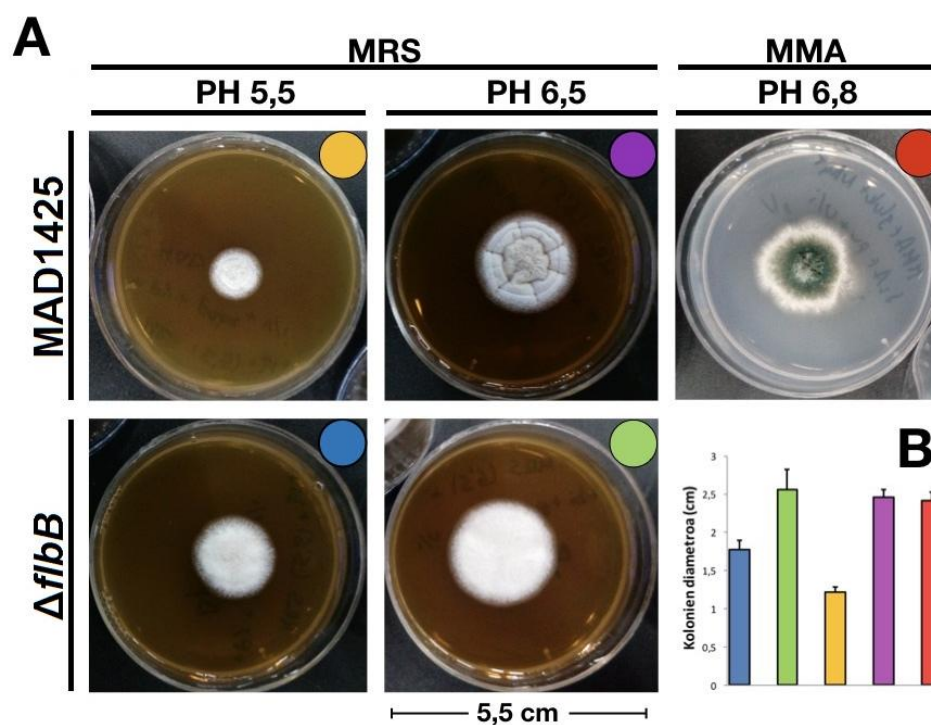
## EMAITZAK

### 1. Hazkuntza azterketak hainbat kultura mediotan.

Onddo zein bakterioen hazkuntza hainbat mediotan nolakoa izango zen aztertzeko egindako esperimentuetan lortutako emaitzak azaltzen dira hurrengo bi puntuetan (1.1. eta 1.2. puntuak). Honekin, mikroorganismoen interakzioak aztertzeko frogetan erabiltzeko kultura medio eta baldintza egokienak zeintzuk izan daitezkeen aztertu nahi izan da.

#### 1.1. *A. nidulans*-en anduien fenotipoa MRS hazkuntza medioan.

Lehenik, *A. nidulans*-en  $\Delta flbB$  eta MAD1425 (erreferentziako andui basatia) anduien fenotipoak aztertu nahi izan ziren MRS medioan, hau baita BAL anduiak hazteko Biologiako laborategian erabiltzen duten hazkuntza medioa. Emaitzak 7. irudian daude adierazita. Plakak 48 orduz 37 °C-tan hazten eduki ondoren, lortutako fenotipoak konparatzen dira (7A. irudia).



**7.irudia. A.** *Aspergillus nidulans* onddoaren  $\Delta flbB$  andui mutantea eta erreferentziako andui silbestrearen (MAD1425) fenotipoak 5.5 edo 6.5-eko pH-tara doitutako MRS hazkuntza medioan edo MMA (pH = 6.8) medioan, inokulatu eta 48 ordura (37 °C). Ikus daitekeen moduan, kultura guztiak hazi ziren arren, 6.5-eko pH-an doitutako MRS medioan hobeto hazi ziren pH = 5.5-ean baino. Gainera, espero moduan,  $\Delta flbB$  mutanteak *fluffy* itxurako fenotipo zuri eta leuna erakutsi zuen, andui basatiak MMA-n erakusten zuen kolore berde karakteristikoaren ondoan, zeinak konidioen sintesia adierazten duen. **B.** Kultura medio

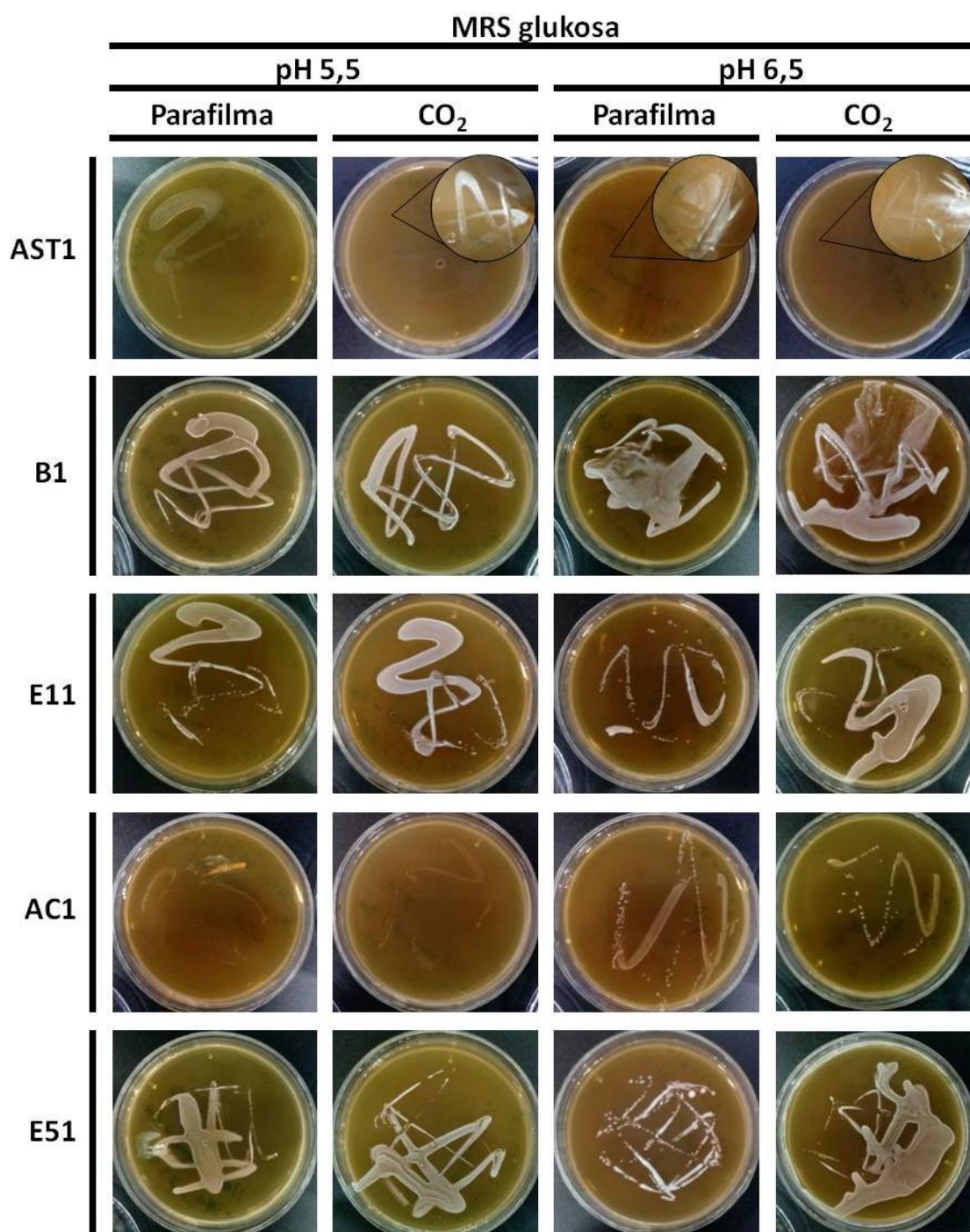
bakoitzean, 48 orduz hazi ondoren, kolonien diametroak kuantifikatzen dituen grafikoa (ardatz bertikalean kolonien diametroa adierazi da cm-tan eta koloreetan, berriz, zein plakari dagokion). Diametroari erreparatuz, baieztatu daiteke, ingurune neutroan *A. nidulans*-en andui hauen hazkuntza hobea dela.

MRS medioetan (pH-a 5.5 edo 6.5-era doitia) bi anduek fenotipo akonidiala (*fluffy*) erakutsi zuten. Hau ohikoa da  $\Delta flbB$  mutantearen kasuan baina, ez da batere ohikoa erreferentziako andui basatiaren kasuan, zeinak MMA hazkuntza medioan kolore berdea hartzen duen konidioforoen eta konidioen sintesia dela eta. Kolonien diametroari dagokionean, berriz, argi ikus daiteke pH-a 6.5-era doitia duen MRS medioan onddo anduien hazkuntza diametroak (ikus 7B. irudia) nabarmen handiagoak izan zirela 5.5-eko pH-ra doitutako MRS kultura medioan baino. Beraz, onddoari dagokionean, ondorengo frogetarako ingurune neutroagoak erabiltzea egokiagoa izango zela ondorioztatu zen. Izatez, MMA hazkuntza medioa bera 6.8-ko pH balorean doitzen da.

## **1.2. Bakterioen hazkuntzaren azterketa MRS kultura medioan.**

Onddoetan egin zen bezala, bakterio anduien hazkuntza eta fenotipoa aztertu ziren baldintza ezberdinetan. Lehen froga batean AST1, B1, E11, AC1 eta E51 BAL anduiak inokulatu ziren 5.5 edo 6.5-eko pH-tara doitutako MRS mediodun Petri plakatan. Kasu honetan, Petri plakak glukosarekin bakarrik osagarritu ziren, nahiz eta ustez glukosak EPS-en sintesia inhibitu (ikus aurretik). Inokulatutako plakak 48 orduz 30 °C-tan eduki ziren inkubagailuan. Petri plaka guztiak bikoiztu egin ziren, andui/medio bakoitzetik bina plaka inkubagailu arruntan (parafilmaz estaliak oxigenoaren sarrera oztopatzeko) edo CO<sub>2</sub> inkubagailuan hazteko. Lortutako emaitzak 8. irudian erakusten dira. Bertan, parafilmarekin estalita edukitako plakei eta CO<sub>2</sub> kanpian gordetako plakei erreparatzen bazaie, ez da ezberdintasunik nabari. Beraz, hurrengo frogetan oxigeno iturria kentzeko metodo bat zein bestea erabili ahal izango zela ondorioztatu zen. Kultura medioen pH-ari eta hazkuntzari dagokionean, ordea, aldaketa nabariak behatu ziren andui batetik bestera. B1, E11 eta E51 anduien kasuan ikusi zen plaka guztietan hazkuntza egokia izan zutela; beraz, hauentzat bi pH-ak (5.5 edo 6.5) egokiak direla ondorioztatu zen. Ez zen gauza bera gertatzen, ordea, AST1 eta AC1 anduekin. Hauen hazkuntza mugatuagoa izan zen kultura medio guztietan. AST1 anduiaren kasuan, hazkuntza ingurune azidoagoan (pH = 5.5) hobea izan zela behatu zen eta AC1 anduiaren kasuan, berriz, ingurune neutroagoak egokiagoak hartu ziren. Horrenbestez,

AST1 eta AC1 BAL anduientzat MRS kultura medioaren pH-a 5.5 edo 6.5-ra doitzea egokiagoa izan daitekeela proposatu zen, hurrenez hurren, ondorengo esperimentuetarako.



**8.irudia.** Bakterio azido-laktiko anduiek (AST1, B1, E11, AC1 eta E51) azidotasun ezberdineko MRS medioan eta CO<sub>2</sub> kanpian zein parafilmarekin estalita (anaerobikoa) hazi ondoren erakusten zituzten fenotipoak, inokulatu eta 48 ordura 30 °C-tan hazten eduki ondoren. Bertan ikus daiteke BAL guztiak hazteko gai izan ziren arren, pH-ak eraginik izan zuela. B1, E11 eta E51

anduiantzat badirudi bi pH-ak egokiak izan daitezkeela hazkuntza egokia emateko. AST1 anduiari dagokionez, kultura medio azidoagoan hobeto hazi zela behatu zen, 6.5-eko pH-an doitutako MRS medioan bere hazkuntza oso eskasa izan baitzen. AC1 anduiaren kasuan, berriz, medio neutroagoan hazkuntza hobea izan zela ikusi zen. Oxigeno iturri ezari dagokionez, ez zen ezberdintasunik ikusi parafilmarekin estalitako eta CO<sub>2</sub> kamaran inkubatutako kulturen artean.

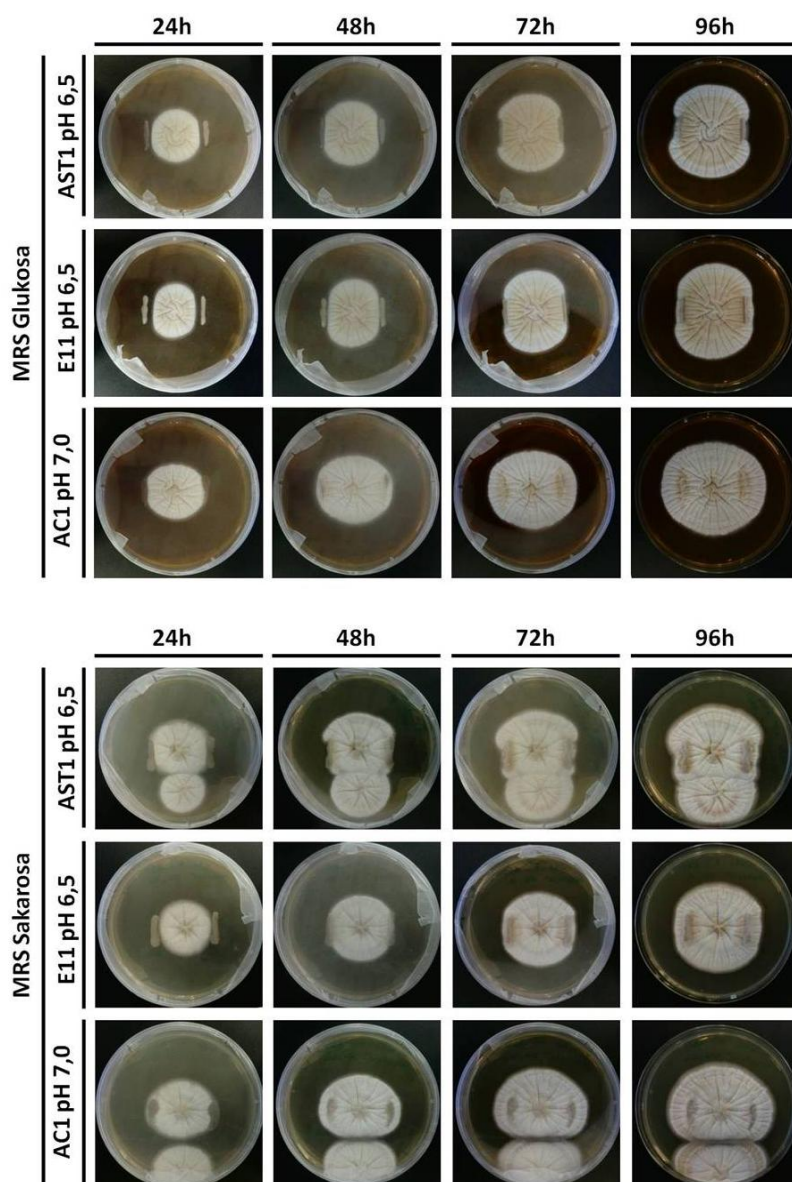
## **2. Mikroorganismoen arteko interakzioen azterketa.**

Hurrengo bi ataletan *A. nidulans* onddoaren eta zenbait BAL anduien arteko ko-kulturetan lortutako emaitzak azalduko dira. Alde batetik, 2.1. atalean, BAL anduiek *Aspergillus nidulans*-en hazkuntzan eraginik duten aztertu da. Bestetik, 2.2. atalean, berriz, onddoaren konidioak BAL anduiak dagoeneko hazten dauden kultura medioan ernamuntzeko gai diren aztertu da.

### **2.1. BAL anduiek *A. nidulans*-en hazkuntzan duten eraginaren azterketa.**

GrAL honetan aztertutako bakterio azido-laktikoek *A. nidulans* onddoaren (MAD1425) hazkuntza inhibitu edota aktibatu dezaketen ikusteko egindako esperimentuan lortutako emaitzak 9. irudian adierazi dira (ikus ere jarraitutako prozedura Material eta Metodoak ataleko 5.3.1. sekzioan). Esan beharra dago, froga preliminar bezala, lehenik Petri plaka berean bost BAL anduiak inokulatu zirela *A. nidulans*-ekin batera (ez erakutsia). Froga hauetan ikusi zen B1 eta E51 anduien eragina *A. nidulans*-en hazkuntzarengan nulua zela. Horregatik, hurrengo frogetarako andui hauek baztertzea erabaki zen.

Bederatzigarren irudian ikus daiteke glukosadun edo sakarosadun MRS kultura medioetan BAL anduien portaera antzekoa izan zela. Hala ere, sakarosadun ingurunean, denborarekin onddoa bakteriora lehenago iristen zela behatu zen. Horren arrazoia, sakarosadun medioan BAL anduiek EPS jarria (likatsuagoa ikusten da irudian) nabarmen handiagoa izatea izan zela uste da. Bakterio andui bakoitzari erreparatuz gero, AC1 anduiaren kasuan ez bezala, AST1 eta E11 anduiak onddoaren hazkuntza partzialki inhibitzeko gai izan zirela behatu zen. Erreparatu, 9. irudiko glukosadun medioetan batez ere, onddoaren hazkuntza zirkularra nola deformatu zen. AST1 eta E11 anduiek onddoaren hazkuntza moteldu zuten bitartean (obalo bertikala), AC1 anduiak onddoa erakarri egiten zuela ematen zuten (obalo horizontala).

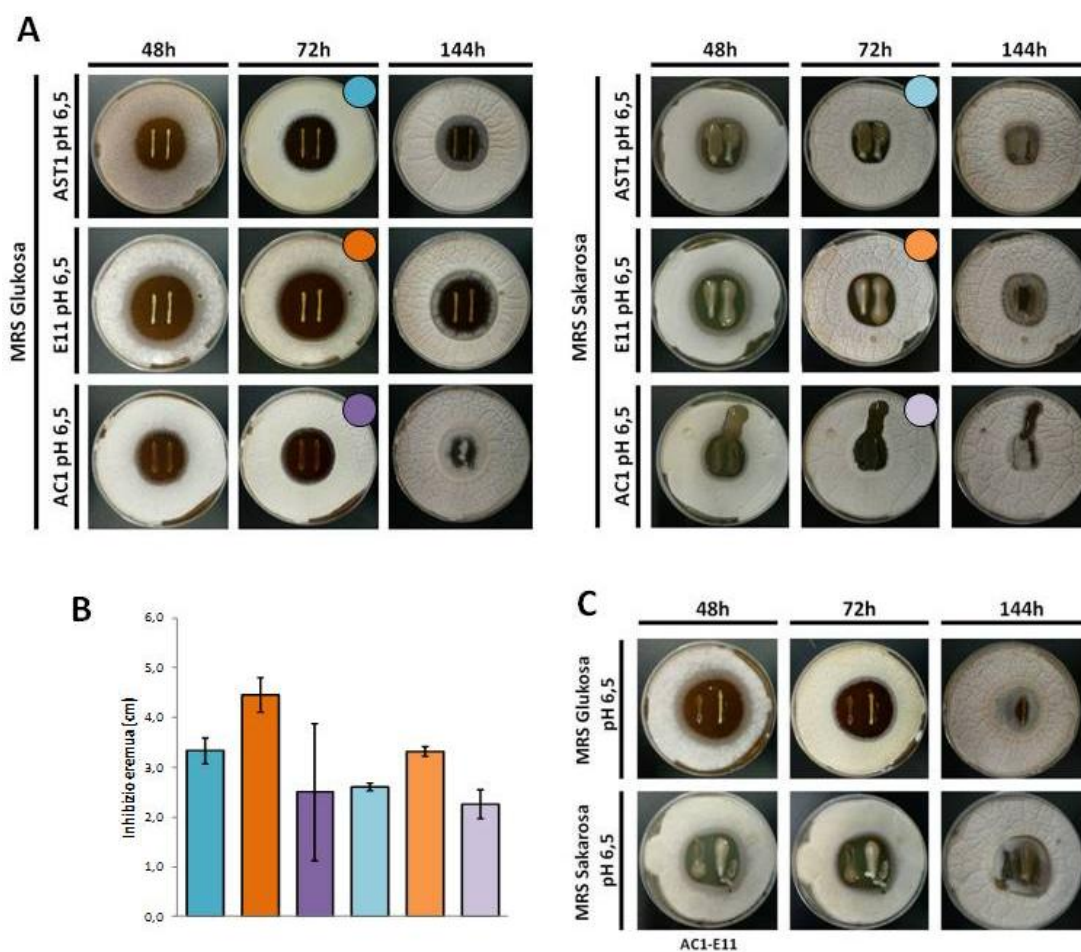


**9.irudia.** BAL andueik *A. nidulans-en* hazkuntzan izan lezaketen eragina aztertzeko egindako frogaren emaitzen irudiak, inokulaziotik 24, 48, 72 eta 96 ordura eta Petri plakak (9 cm-ko diametroa) 30 °C-tan hazi ondoren. Glukosadun edo sakarosadun MRS medioetan lortutako emaitzak antzekoak izan ziren, nahiz eta sakarosadun medioan onddoa (MAD1425) lehenago iritsi zen bakterioekin kontatua ezartzera. Hau, sakarosadun medioan BAL anduien aldetik EPS-en jariatzea eragin izanaren ondorioa izan liteke baina, frogatzeko legoke. AST1 eta E11 anduei dagokienez, ikusi zen hasiera batean behintzat onddoaren hazkuntza moteltzeko gai izan zirela, kulturaren forma zirkularri obalo bertikal itsura emanez. AC1 anduiaren kasuan, berriz, onddoa bakterioak erakarria izan zela behatu zen, oraingoan obalo forma horizontala emanez. Kasu guztietan, *A. nidulans-ek* BAL andueik ezarritako barrera fisikoa gainditzeko gaitasuna erakutsi zuen, horretarako behar izan zuen denbora aldakorra izan zen arren.



## 2.2. BAL anduiek onddoaren ernamuintzean duten eraginaren azterketa.

Bakterio azido-laktiko anduiek dagoeneko hazten dauden ingurunean *A. nidulans* onddoaren BD185 anduiaren esporak ernamuintzeko gai diren ala ez aztertzeko egindako esperimentuan lortutako emaitzak 10. irudian erakusten dira. Orokorrean, inokulatutako BAL bakterioek onddoaren ernamuintzea eragotzi lezaketela behatu zen, inhibizio eremu bat eratuz euren buruen inguruan (ikus 10A. irudia). Esperimentuan erabilitako BAL anduien artean, E11, AST1 eta AC1 izan ziren, hurrenez hurren, inhibizio eremu handiena eman zutenak, 10B. irudiko diagraman ikusten den moduan. Gainera, sakaroadun MRS kultura medioan, inhibizio eremuak txikiagoak zirela ikusi zen. Berritoki ere, honen eragilea EPS kantitate handiagoaren jarioa izan zitekeela proposatu da eta hau frogatu gabe dagoen arren, zenbait EPS-k onddoen hazkuntza estimulatu dezaketela iradokiko luke. Azkenik, kontrol moduan inokulatutako Petri plakatan, non AC1 eta E11 bata bestearen ondoan inokulatu ziren, aurretik deskribatutako patroia bera errepikatu zen, non E11 anduiek eragindako inhibizio eremua AC1-ena baino handiagoa zen (10C. irudia).



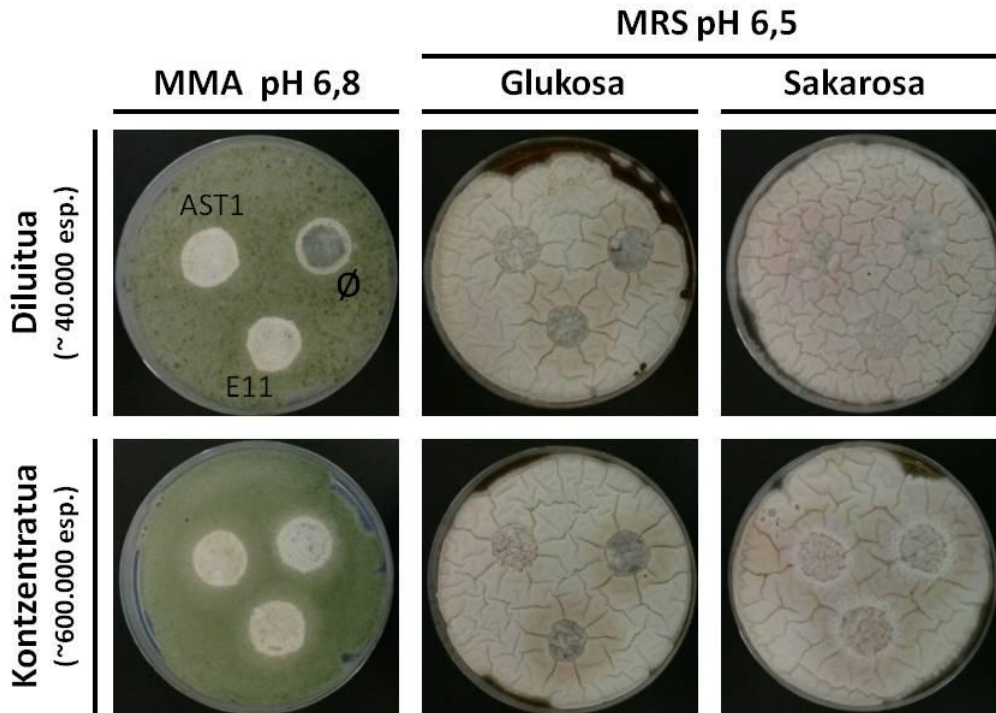
**10.irudia.** BAL anduiek onddoaren ernamuintzean duten eragina aztertzeko burututako frogaren emaitzak. **A.** Glukosadun (ezker) zein sakaroadun (esku) MRS (pH = 6.5) kultura

medioan inokulatutako AST1, E11 eta AC1 anduien presentzian *A. nidulans*-en BD185 anduia nola hazi zen erakusten duen irudia, inokulaziotik 48, 72 edo 144 ordura, eta 30 °C-tan hazi eta gero. Argi ikus daiteke hiru kasuetan onddoaren ernamuintzea inhibitua izan dela kultura medio guztietan. Hala ere, inhibizio eremu handiena E11 anduiak erakutsi zuen, AST1 anduiak ondoren eta AC1 anduiak azkenik (txikiena). Kultura medioei dagokienez, sakaroadun medioan inhibizio eremu txikiagoak aurkitu ziren, ustez, EPS-ek onddoa erakar lezaketelakoan. **B.** BAL andui bakoitzak kultura medio bakoitzean, inokulaziotik 72 ordura, eragindako inhibizio eremuaren diametroak adierazten dituen diagrama. Kolore bakoitzak A. paneleko zein kulturari dagokion adierazten du eta y ardatzean diametroen balioak datoz emanda, cm-tan. **C.** Kontrol moduan egindako froga, non AC1 eta E11 anduiak inokulatu ziren plaka berean, bata bestearen ondoan. Beren inhibizio eremuen ezberdintasuna nabaria da (E11-k handiagoa AC1-ek baino).

### **3. Onddoaren hazkuntzaren azterketa BAL anduietatik erauzitako EPS-ekin ekoiztutako film-etan.**

Aurreko esperimentuetan ikusi da E11 eta AST1 BAL anduiak nolabaiteko aktibitate antifungikoa izan dezaketela. Aldi berean, sakaroadun MRS kultura medioan BAL anduiak EPS gehiago ekoizten dute, eta izandako emaitzen arabera, honek onddoaren hazkuntza bultzatu lezakeela proposatu da. Esperimentu honetan ikusi nahi izan da *A. nidulans* onddoaren BD185 anduia EHU-ko Koro de la Kaba eta Pedro Guerrero ikertzaileen Biomat taldeak, E11 eta AST1 BAL anduien EPS laginekin (Llamas-Arriba doktoreak isolatutakoak) kolagenozko matrize batean prestatutako film-etan hazteko gai izango litzatekeen edo ez. EPS gabeko film-a erabili zen kontrol moduan. Horretarako, material eta metodoen ataleko 5.4. sekzioan deskribatutako prozedura jarraitu zen.

Esperimentu honetan izandako emaitzak 11. irudian ikus daitezke. Bertan ikus daiteke, kualitatiboki bada ere, eta MMA kultura medioan nagusiki, EPS gabeko film laginean (kontrolean) onddoari gehiago kosta zitzaioela haztea. Hala ere, argi dago onddoa E11 eta AST1 anduien EPS laginekin sintetizatutako film-etan arazorik gabe hazi zela. Inokulatutako espora kantitateari erreparatuz, eta prestatutako espora suspentsio kontzentratuak diluituak baino 15 aldiz espora gehiago zituela kontuan hartuta ( $6 \times 10^5$  eta  $4 \times 10^4$  konidio plakako), ez zen diferentzia handirik nabaritu. Espora suspentsio diluituaren kasuan, agian, onddoa motelago hazi zela esan genezake, baina ez zuen eraginik izan film-etan hazterako garaian.



**11.irudia.** E11 eta AST1 BAL anduietatik erazitako EPS-ekin ekoiztutako film-etan *A. nidulans* onddoaren hazkuntza aztertzeko egindako esperimentuaren emaitzak. Kolagenozko matrizean prestatutako film hauek EHU-ko Biomat taldeko kideen eskutik jaso ziren (EPS gabeko film bat ere erabili zen kontrol moduan). Inokulatutako espora kantitatea plaka kontzentratuetan ( $6 \times 10^5$  espora) diluituetan ( $4 \times 10^4$  espora) baino 15 aldiz handiagoa izan zela kontuan hartuta, espora kantitateak onddoaren hazkuntzaren abiaduran bakarrik eragin zuela ikusi zen; zenbat eta kontzentratuagoa, orduan eta azkarragoa hazkuntza. Horrez gain, E11 eta AST1 anduien EPS-ekin prestatutako laginetan onddoak hazteko aparteko arazorik eduki ez zuen arren, kontrol moduan erabilitako EPS-rik gabeko film-etan hazkuntza mugatu egiten zela zirudien, MMA kultura medioan batez ere.

Hauek izan ziren *A. nidulans* onddoaren eta bakterio azido-laktidoekin egindako frogak. Lortutako emaitzak borobiltze aldera, bi ondorio nagusi atera dira. Alde batetik, E11 eta AST1 BAL anduiak aktibitate antifungikoa izan lezaketela eta bestetik BAL-ek jariatzen dituzten EPS-ek hein batean onddoaren hazkuntzan lagunduko luketela.

#### 4. *Aspergillus nidulans*-en FLIP57 anduiaren azterketa bioinformatikoa.

Lan honen sarreran azaldu den moduan, *Aspergillus nidulans* onddoaren ugalketa asexuala bi bide genetikok erregulatzen dute nagusiki. UDA bideak konidiazioa emango den ala



ez erabakitzen du. CDP bideak, aldiz, kondioforoaren garapenaz arduratzen da. Kontrol genetiko honetan parte hartzen duten gene ugari identifikatuak eta funtzionalki ezaugarrituak dauden arren, beste askok identifikatzeko jarraitzen dute (Otamendi et al., 2019). Testuinguru honetan, Ainara Otamendi doktorego ikasleak fosfatodun (0.65M) MMA hazkuntza medio batean akonidialak ziren  $\Delta flbB$  mutanteak isolatu zituen (FLIP deiturikoak: *fluffy in phosphate*). Horrenbestez, GrAL honetan, *A. nidulans* onddoaren FLIP57 izeneko mutantearen azterketa bioinformatikoa egin zen, honen fenotipo akonidiala eragiten zuen mutazioa identifikatu eta mutazio horri dagokion geneak kodetzen duen proteinaren ezaugarritze bioinformatikoa egiteko asmoz. Horretarako material eta metodoen 6. atalean azaldutako tresna eta prozedurak erabili eta jarraitu ziren.

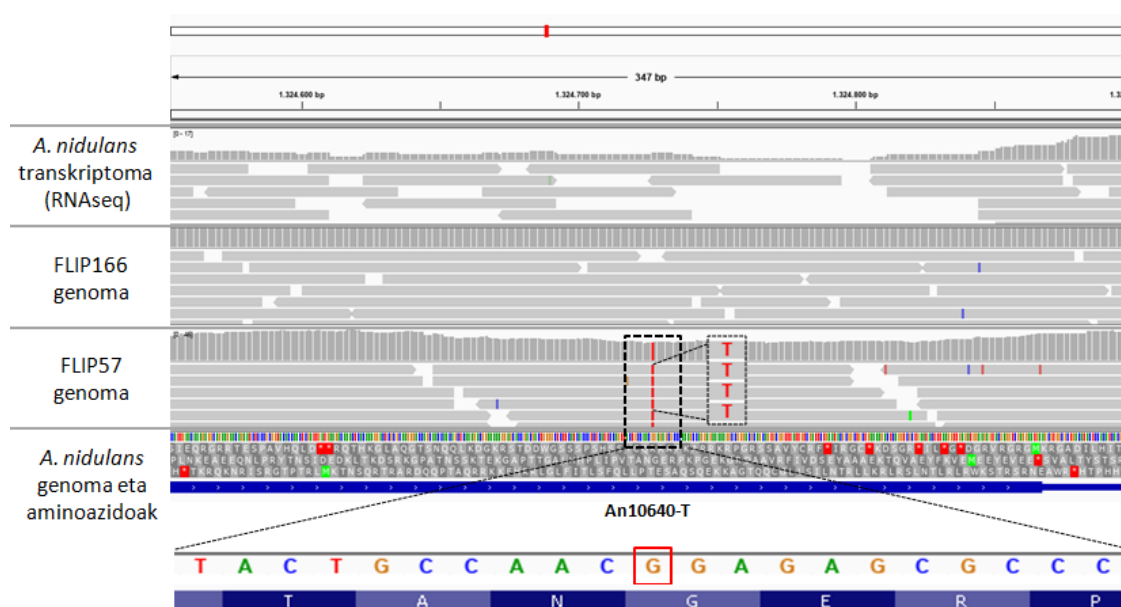
FLIP57 anduiaren azterketa bioinformatikoaren inguruko emaitzak bi ataletan aztertuko dira. Alde batetik, FLIP57 fenotipoa eragiten duen mutazioa identifikatzea, eta bestetik, dagokion gene horrek kodetzen duen proteinaren ezaugarritze informatikoa.

#### **4.1. *A. nidulans*-en ugalketa asexualaren kontrol genetikoan parte har lezakeen gene berri baten proposamena.**

*Aspergillus nidulans* onddoaren FLIP57 mutantearen ( $\Delta flbB$  fondo genetikoa) genoma Stabvida enpresan (Caparica, Portugal) sekuentziatu zen. Sekuentziazioaren emaitzak 72 nukleotidotako milioika sekuentzia dira. Hauetako bakoitzari *read* izena ematen zaio eta bakoitza aztertzen ari den genomaren eremu espezifiko bati dagokio. *Read* hauek aztertzen ari den genomaren dagokien lekuetan “mapeatzen” dutela esaten da. Programa informatikoek “mapeo” hauek burutzen eta irudikatzen dituzte, eta gainera, aurrez sekuentziatutako erreferentziazko genoma (DNA) edo transkriptoma (RNA) batekin konparatzeko aukera ematen dute (Ikus 12. Irudia). Hauxe egin zen, hain zuzen, FLIP57-ren genomaren *read*-ekin. Kasu honetan, *A. nidulans*-en genomaren erreferentziazko bertsioaz gain (12. irudia; laugarren lerroa), konparaketa aurretik sekuentziatutako FLIP166-ren genomarekin (Otamendi et al., 2019) eta *A. nidulans*-en transkriptoma batekin (Oartzabal-Arano et al., 2015, Genetics aldizkarian) burutu zen.

FLIP57 mutantearen genomako 5. kromosoman dagoen mutazio bat identifikatu zen (ikus 12.irudia). Mutazio hau, *An10640* genean dagoela ikusi zen eta konparaketarako erabili ziren gainontzeko sekuentzietan azaltzen ez zela argi ikusi zen. Gainera, exoi batean zegoenez, geneak kodetzen duen proteinaren sekuentzia aldarazi zezakeela kontsideratu zen.

Ordezkapenezko mutazioa zela ikusi zen, hau da nukleotido (G) bat beste batengatik (T) ordezkatuta zectorrela (ikus 12. irudia). Nukleotido honen aldaketak, kodoi (proteinaren sintesirako aminoazidoak determinatzen dituzten nukleotido hirukoteak) baten aldaketa dakar beti, eta horrek kasu honetan, aminoazido baten aldaketa. GGA kodoiak Glizina aminoazidoa kodetzen du. FLIP57-ren kasuan, 347. posizioko GGA kodoi hori TGA bihurtzen da, stop seinalea alegia, proteinaren sintesiaren amaiera determinatzen duen kodoia. Beraz, *A. nidulans*-en FLIP57 anduiaren 5. kromosomako *An10640* geneak kodetzen duen proteinari (FlpA izendatua; *fluffy* in phosphate A; 392 aminoazido dituena) azken 135 nukleotidoek kodetutako 45 aminoazido faltako zitzaizkiola ikusi zen.



**12.irudia.** *A. nidulans*-en erreferentziako genoma eta transkriptometikiko FLIP57-ren genomak duen mutazioaren irudikapena, IGV programaren bitartez (ikus Material eta Metodoak atala). *A. nidulans*-en andui basatiaren transkriptoma eta genoma, FLIP166 mutantearen genoma eta FLIP57 mutantearen genomak alderatu eta mutazioa azaltzen da irudian. FLIP57-aren genomatik beste genomatik agertzen ez zen mutazio bat (kolore gorriaz) identifikatu zen. FLIP57 eta FLIP166 anduiaren fenotipo akonidialaren erruduna zen mutazioa gene ezberdinetan zegoela jakinik (Ainara Otamendi, argitaratu gabea) eta, mutazio hori *An10640* genearen exoi batean zegoela ikusirik, kodetzen duen proteinaren eragina izan zezakeela kontsideratu zen. Hau, irudian koadro ez jarriaren bidez adierazten da. Bertan ikusten den marra gorriak timina (T) baten sarrera adierazten du, beheko erreferentziako genomaren guanina (G) bat ordezkatuz. Honek, 347. kodoian GGA(Gly)-TGA(stop) ordezkapena eragiten zuen, proteinaren azken 45 aminoazidoak galtzea eragingo lukeelarik.

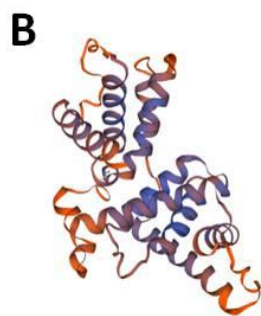
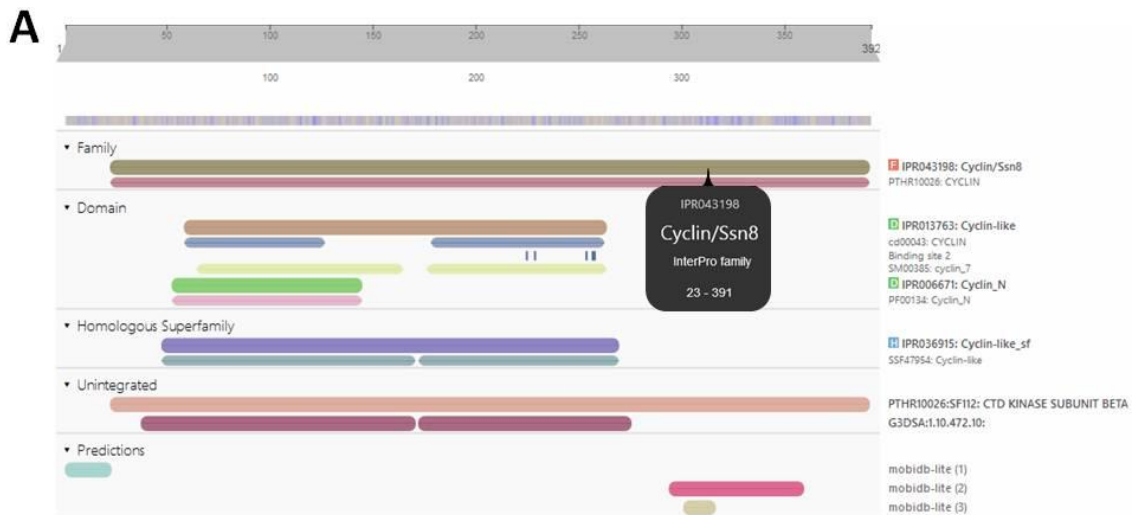
#### 4.2. FlpA proteina ziklina bat izan liteke, ziklo zelularraren erregulatzailea.

Aurreko atalean identifikatutako *An10640* geneak kodetzen duen proteinak (FlpA) betetzen dituen funtzioak zeintzuk izan daitezkeen ikusteko egindako azterketaren emaitzak azalduko dira atal honetan. Lehenik eta behin, InterPro izeneko plataforman egindako bere aminoazido sekuentziaren azterketaren arabera, FlpA proteina ziklina (IPR043198 eremua; 23 eta 391. aminoazidoen artean kokatua) bat izan daitekeela ikusi zen (ikus 13A. irudia). Ziklinak, ziklo zelularraren erregulazioan parte hartzen duten proteinak dira (Paolillo, Jenkinson, Horio, & Oakley, 2018). Hauek ziklinen menpeko kinasa (CDK; *Cyclin-Dependent Kinases*) izeneko entzimekin elkartuz konplexu batzuk osatzen dituzten, kinasa horiek fosforilazioz aktibatuz edo desaktibatuz.

Horrez gain, 13B. irudian Swiss-model plataformaren bitartez lortutako FlpA proteinaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena ikus daiteke. Egituraren aurreikuspena proteina homologoen arteko antzekotasunen bidez osatu zenez, kasu honetan, ez zen aminoazidoen sekuentziaren aurreikuspena bere osotasunean egitea lortu. Izan ere, proteina homologoen artean ez baitzen FlpA-ren sekuentziaren azken zatiarekin bat zetorrenik lortu. Horrenbestez, lortutako egitura, FlpA-ren aminoazido sekuentziaren 32-268. aminoazidoei dagokie; eta FlpA proteina 392 aminoazidok osatzen dutela kontuan hartuz (ikus 13C. irudia), proteinaren zati handi bat (azken 124 aminoazidoak) eredian jaso gabe geratuko lirakeela ondorioztatu zen.

*An10640* geneak kodetzen duen proteinaren ustezko egitura aztertu ondoren, FLIP57 anduian identifikatutako mutazioak honengan izango lukeen eragina aztertu zahi izan zen DynaMut plataformaren bitartez. Kasu honetan, ordea, bi arazorekin egin zen topo. Lehenengoa, DynaMut plataforma aminoazido bat beste batengatik ordezkaturakoan sor daitezkeen aldaketak aurrerako dagoela prestatuta da; ez ordea aminoazido bat stop batekin ordezkatzeko kasuaren aurreikuspen bat emateko. Horrenbestez, FLIP57 anduiaren mutazioak Glizina (GGA kodoia) bat legokeen tokian proteinari amaiera ematen dioenez (TGA amaierako kodoia delako), beste aldaketa batek nola eragingo liokeen aztertzea proposatu zen. Horretarako, hidrofobikoa den Glizina, honekiko izaera oso ezberdina zuen aminoazido batekin ordezkatu zen; kasu honetan, positiboki kargatutako Lisina aminoazidoa. Ondorioz, oraingoan, 347. posizioan Gly-Lys mutazioa aztertu nahi izan zen. Zoritxarrez, DynaMut plataforma ez zen gai izan mutazioren eragina aurrerako. Izan ere, azterketa egiteko PDB artxiboa Swiss-Model webgunean aztertutako andui basatiaren

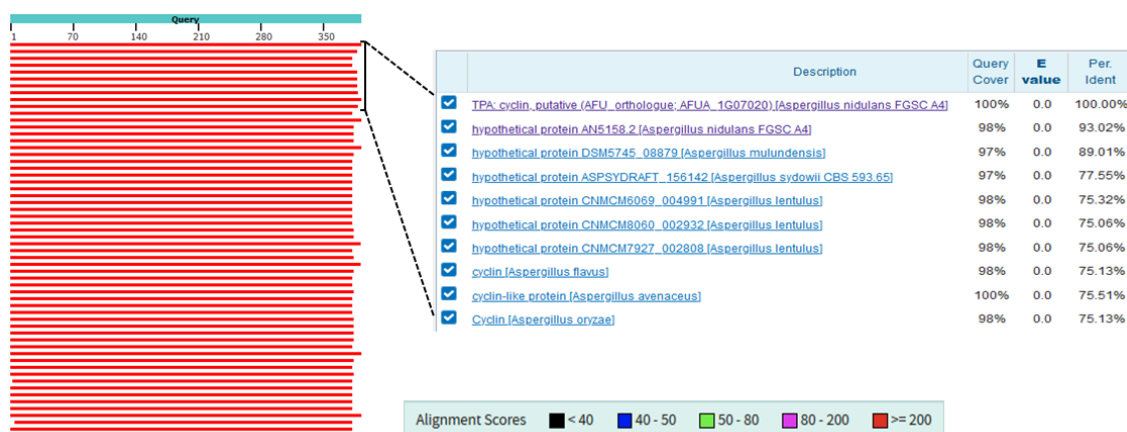
egitura tridimentsionalaren aurreikuspenarekin sortu baitzen. Ondorioz, lehen aipatu moduan (eta ikus 13C. irudian markatuta agertzen den 347 posizioko Glizina), F1pA-ren egituraren aurreikuspenak 32-268 aminoazidoak bakarrik modelatzen zituenez (ziklina eremua, alegia), plataformak ezin izan zuen, PDB egituraren ageri ez zen 347. posizioko mutazio baten eragina aurrean.



**13.irudia. A.** *Aspergillus nidulans* ondoaren *An10640* geneak kodetzen duen F1pA proteinaren sekuentziaren azterketa InterPro plataforman. Bertan ikus daiteke F1pA proteina ziklina (ziklo zelularren erregulazioan parte hartzen duten proteinak) bat izan daitekeela, zeintzuek ziklinen menpeko kinasa (CDK; Cyclin Dependant Kinase) izeneko entzimekin elkartuz azken hauen aktibitatea erregulatzen duten fosforilazioaren bidez. **B.** Swiss-Model plataformaren bidez egindako F1pA proteinaren egitura tridimentsionalaren aurreikuspena. **C.** Swiss-Model web-orrian egindako F1pA proteinaren egituraren aurreikuspenak F1pA-ren sekuentzia basatiaren zein eremu “estaltzen” duen adierazten duen irudia. Egituraren hurbilpena egiteko proteina ortologoak erabiltzen direnez, kasu honetan ikus daiteke lortutako egiturak aminoazido kate osotik (392 aminoazido) 32-268 aminoazido tartea bakarrik estaltzen duela. Honen ondorioz, eta FLIP57 anduian mutazioak 347 aminoazidoari eragiten diola jakinda, ezin izan zen DynaMut plataforman mutazioak proteinaren egiturari nola eragingo liokeen aurrean.

### 4.3. FlpA proteina ondo klase guztietan kontserbatuta dago.

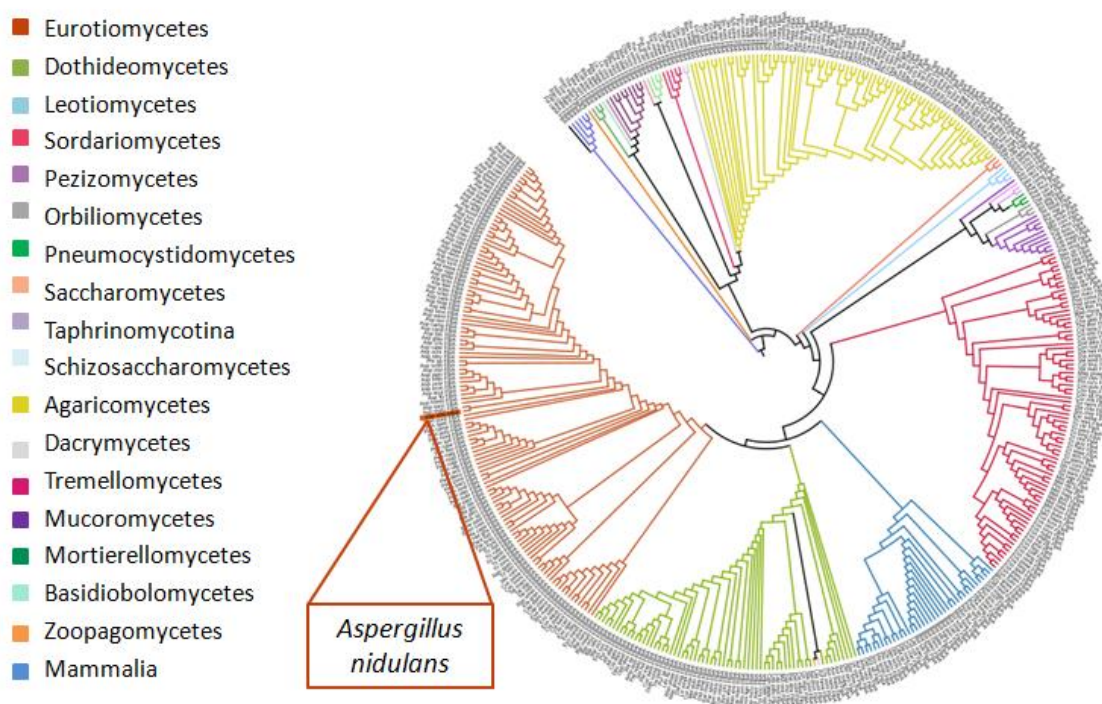
Tresna bioinformatikoen proteina bat zein espezieetan kontserbatua dagoen aurreikusteko aukera ematen dute. Honek azterketa ebolutiboak ahalbidetzen ditu. Hauxe da, hain zuzen, FlpA proteinarekin egin zena lan honetan. Lehenik eta behin, FlpA-ren aminoazido sekuentzia hartuta BLAST bat burutu zen. BLAST bat, proteina baten aminoazido sekuentziaren antzeko sekuentzia duten beste hainbat ortologoren bilaketa da (ikus 14. Irudia). Honela, kontserbazio maila handieneko sekuentziak sailkatzen dira (kontserbazio maila altuenetik, kolore gorritz, baxuenera, kolore beltzez).



**14. irudia.** FlpA-ren aminoazido sekuentziarekin egindako BLASTa. Bertan ikus daitezke, lortu diren kontserbazio handiena duten ortologoak (marra bakoitza ezkerreko irudian edo lerro bakoitza eskuinekoan). Zenbat eta beherago zerrendan, kontserbazio maila txikitzen doa.. Marra bakoitzak ortologo bat adierazten du, non bere luzera eta kontserbazio maila (kolorearen arabera) adierazten diren. Kasu honetan, erakutsitako marra guztiak gorriak dira, kontserbazio maila oso altuaren adierazle.

BLAST bidez lortutako ortologoen sekuentziak deskargatu egin ziren eta filtratu ondoren zuhaitz filogenetikoak eraiki zen material eta metodoen ataleko 6. puntuan azaldu den moduan (ikus 15. irudia). Zuhaitz filogenetikoak DNA edo proteina multzo baten sekuentzien kontserbazioa adierazten du zuhaitz formako irudikapen bidez. Zuhaitz horren adarrek aztertutako sekuentzien arteko dibergentzia irudikatzen dute; alegia, bi sekuentzien artean desberdintasunak zenbat eta handiagoak izan, zuhaitz filogenetikoan beraien arteko banaketa lehenago azalduko da. Osatutako zuhaitz filogenetikoak hurrengo irudian ikus daitezke (15. irudia). Bertan ikus daitezkeenez, FlpA proteinaren kontserbazioa oso zabala da ondoetan, ondoen klase guztietan edo ia guztietan identifikatu baitziren FlpA-ren

ortologoak. Horrenbestez, kontserbazio maila handia dela eta, proteina honek funtzio garrantzitsu bat izan dezakeela pentsa liteke. Gainera, 15. irudiari erreparatuz, zuhaitz filogenetikoaren adar nagusietako bakoitza ondo klase bat adierazten duela ikusten da (koloreekin adierazita). Honek, aldi berean, fungi erreinuko ondo klaseen eboluzioa erakusten dela esan nahiko luke.



**15.irudia.** *Aspergillus nidulans* ondoaren An10640 geneak kodetzen duen F1pA proteinaren kontserbazioa adierazten duen zuhaitz filogenetikoa. Bertan ikus daiteke proteinaren kontserbazio maila oso handia izan dela fungi erreinuko ondo klase guztietan. Gainera, proteina honen kontserbazioak ondo klase ezberdinen eboluzioa ere adierazten du aldi berean. Zuhaitz filogenetikoan agertzen den kolore bakoitzak genero ezberdin bat adierazten du (eskuinean).

## EZTABAIDA

### **BAL anduien *A. nidulans* onddoarekiko aktibitate inhibitzailea.**

Gaur arte egin izan diren mikroorganismoen arteko ko-kultura esperimenduek erakutsi duten moduan, hauek bata bestearekin kontaktuan jarritakoan, ondoko organismoaren hazkuntza inhibitu eta biziraute aldera, bigarren mailako metabolitoen sintesia aktibatzen dute hainbat generen espresioa eraginez (Netzker et al., 2015). Gradu amaierako lan honetan, bakterio azido-laktiko eta onddoen arteko interakzioek hauen garapenean izan lezaketen eragina aztertzeko egindako ko-kulturen esperimenduetan, BAL andui zehatzek (E11 eta AST1) *Aspergillus nidulans* onddoaren hazkuntza hein batean eta germinazioa neurri handiago batean inhibitzeko gai direla ikusi da. Horrenbestez, BAL andui horiek nolabaiteko aktibitate antifungikoa dutela ondorioztatzera iritsi da. Hala ere, hau ez da onddo-BAL interakzioak aztertu diren lehen lana izan. Esaterako, *Microorganisms* aldizkarian argitaratutako lan batean ere ama oretik isolatutako hainbat BAL anduik onddo patogeno espezifikoen ernamuintzea inhibi zezaketela deskribatu da berriki (Bartkiene et al., 2019). *A. nidulans*-ekin frogarik egin ez zuten arren, ebolutiboki gertu dauden onddo patogeno batzuk aztertu zituzten, lan honetan lortutakoan antzeko emaitzak lortuz BAL andui espezifikoekin. Esan beharra dago, GrAL honetan jarraitutako ko-kulturatako prozedura lan horretan erabilitakoaren berdina dela, biak Magnusson & Schnürer (2001) eta Manini et al., (2016) lanetan oinarrituak daudelarik.

BAL-onddo ko-kultura hauetan lortutako emaitzek ikerketa lerro berria zabaldu dute harrera laborategian, onddoen kontrako konposatu aktiboen identifikazioarena, alegia. Konposatu hauek baliogarriak izan daitezke etorkizun batean, batez ere elikagaien industrian, onddoen hazkuntzaren zein ernamuintzearen kontrolerako. Elikagaietan onddoen eta hauek jariatzen dituzten konposatu toxikoen (mikotoxinak) presentziaren kontrolaren inguruan hainbat ikerketa egin izan dira (Sadiq et al., 2019) eta BAL anduiek konposatu antifungikoen edo fungistatikoen iturri izan daitezkeela proposatu da. Honetatik abiatuz, hurrengo lana konposatu horiek zeintzuk diren eta beraien sintesirako beharrezko diren entzimak zein genek kodetzen dituzten identifikatzea izango litzateke. Horretarako, BAL anduien genomaren (DNA) zein transkriptomaren (RNA) sekuentziazioa egin beharko lirateke, ondoren konposatu hauen ekoizpena eta jariatzea zein genek kontrolatzen dituzten identifikatu eta ezaugarritzeko. Azkenik, baina are konplexuagoa, konposatuak isolatzea eta onddoekin testatzea geratuko litzateke (Bartkiene et al., 2019).

BAL andui batzuk *A. nidulans* onddoarekiko erakusten zuten aktibitate inhibitzailea argia zen arren, sakaroadun mediotan, ustez bakterio hauen EPS jario oparoa zela eta, onddoaren hazkuntza bultzatzen zela ere proposatu da. Izan ere, sakaroadun medioan bakterio azido-laktikoen EPS produkzioa areagotzen dela jakina da (Llamas-Arriba et al., 2019). Aldiz, GrAL honen emaitza preliminarren arabera, behatutako aktibitatea *A. nidulans*-en kontra ez litzateke EPS-ek eragindakoa, edo ez litzateke EPS-en sintesia eragiten duten hazkuntza baldintzapean aktibatuko. Are gehiago, ematen du medio honetan *A. nidulans*-en hazkuntza bultzatu egiten dela. Baliteke, *A. nidulans*-ek karbohidratoen prozesaketarako jariatzen dituen entzima ugarien artean (Flipphi et al., 2009) batzuk EPS horiek degradatu eta horietatik elikagaiak lortzeko gaitasuna edukitzea. Biomat taldeko ikertzaileek osatutako EPS/kolagenozko film-ekin lortutako emaitzek ere era honetako hipotesiekin bat datoz.

**An10640 genearen identifikazioa FLIP57 anduien ustez *A. nidulans*-en ugalketa asexualaren kontrolean parte hartzen duen gene moduan.**

*Aspergillus nidulans* espeziea harizpi itsurako onddoen garapen asexuala aztertzeko eredu organismo nagusia izanik, prozesu hau kontrolatzen duten gene gehienek identifikazioa eta lehen ezaugarritze funtzionala espezie honekin burutu da. Ugalketa asexual hau bi bide genetiko nagusik kontrolatzen dutela sarreran azaldu da (UDA eta CDP) eta beharrezkoa den kontrol mekanismoa oso konplexua da. Hori horrela, ikerlari askok dihardute gene horiek identifikatzeko lanean. Otamendi et al., 2019 lanean, esate baterako, *Aspergillus nidulans*-en  $\Delta flbB$  fondo genetikoko FLIP166 mutantearen azterketa genetikoa egin zen. FLIP mutantea izanda, fosfatodun MMA medioan fenotipo akonidiala erakusten zuen,  $\Delta flbB$  anduiak ez bezala. Honen FLIP fenotipoaren eragilea mutazio ezezagun bat zela jakinda, mutaziorik gabeko beste andui baten genomarekin alderatuz konidiazioaren kontrolean parte hartzen zuen beste gene baten identifikazioa eta ezaugarritzea egin zen (Otamendi et al., 2019). Egia da gene hori, pmtC, aurretik konidiaziorako garrantzitsua zela deskribatua zegoela baina (Kriangkripipat & Momany, 2014), egileek mutazio horren eragina azaldu eta proteinaren kokapen subzelularra finkatu zuten. Gainera, mutaziorik ez zeraman beste gene baten gainadierazpenak ere (An8501/socA) FLIP166 fenotipoa itzularazten zuela deskribatu zuten gure taldean, eta gene horren ezaugarritze funtzionala preliminarra egin zuten. GrAL honetan, *Aspergillus nidulans* onddoaren FLIP57 andui mutatuaren fenotipo akonidiala zein generen mutazioak (*An10460*) eragiten zuen aztertzeko egindako azterketa bioinformatikoak lan horretako estrategia bera jarraitu du.



### **An10640 geneak kodetzen duen proteinaren (FlpA) ustezko funtzioa eta kontserbazioa.**

“Cyclins in aspergilli: Phylogenetic and functional analyses of group I cyclins” artikuluan An10640 geneak kodetzen duen proteinaren karakterizazioa egitera iritsi ez ziren arren, hau hirugarren taldeko ziklina bat zela aurrean zuten (Paolillo et al., 2018). Ziklinak ziklo zelularraren erregulazioan parte hartzen duten proteinak dira. Horrenbestez, FlpA proteinaren funtzioa ere halakoa izango litzateke, non ziklinen menpeko kinasa izeneko entzimen aktibitatea erregulatuko duen kinasa hauen fosforilazioz (Karagiannis & Balasubramanian, 2007). Hau, zenbait proteinen aktibitatea behar den unean pizteko zelulek erabiltzen duten mekanismo nagusienetako bat da. Gradu amaierako lan honetan, Interpro web-orrian gene honek erakusten zituen ustezko eremu funtzionalak aztertu ziren (<https://www.uniprot.org/>; Consortium, 2019). FungiBD datu basearen arabera (Stajich et al., 2012), badirudi FlpA proteina *Schizosaccharomyces pombe* onddoan Lsk1 motako kinasarekin lotzen den Lsc1 ziklinaren ortologoa dela. Lsk1, beraz, CDK bat da (Cyclin-dependent kinase), zeinak RNA polimerasa II-aren fosforilazioa burutzen duen honen C-terminal ertzean, CTD (Carboxy-Terminal Domain) deritzon gunean (Coudreuse et al., 2010; Karagiannis & Balasubramanian, 2007). Gune hori zazpi aminoazidoz osatzen da eta hauen artean dauden hiru serinatik (bigarren, bostarren eta zazpigarren posizioetan) lehenengo bietan eman daiteke CDK-RNA polimerasa II lotura, konplexu bat osatu eta DNA katearen transkripzioaren hasiera eta elongazio prozesua kontrolatzeko. Transkripzioaren mailan funtzio orokor bat izango luke, beraz, Lsc1 proteinak.

FlpA, ustezko ziklina honek funtzio garrantzitsua beteko lukeela bere kontserbazio zabalak ere babesten du. Izan ere, lan honetan FlpA proteina fungi erreinuko klase guztietan kontserbatua egongo litzatekeela ikusi da, ziklinen kontserbazioari buruzko beste hainbat ikerketatan ere hala baieztatu den bezala (Paolillo et al., 2018). Etorkizun hurbilean funtzio horiek zeintzuk diren, eta garapen asexualaren kontrolean zuzenean edo zeharka parte hartzen duen zehaztu beharko da.



## ONDORIOAK

Gradu amaierako lan honetan elkarren artean ikusteko ezer gutxi duten bi ildo jarraitu direnez, ondorioen atala ere bitan banatuta emango da. Alde batetik, bakterio azido-laktiko eta *A. nidulans*-en andui desberdinen interakzioak aztertzeko esperimentuetatik ateratako ondorioak azalduko dira; bestetik, *A. nidulans* onddoaren FLIP57 andui mutantearen azterketa bioinformatikotik ateratakoak.

### 1. BAL-A. *nidulans* ko-kulturak.

- E11 eta AST1 bakterio azido-laktiko anduek *Aspergillus nidulans* onddoaren ernamuintzea eta, neurri batean, hazkuntza mantsotzeko edo inhibitzeko gai zirela erakutsi zutenez, aktibitate antifungikoa izan zezaketela proposatzen da. Gainera, E11 anduiaren inhibizio gaitasuna AST1-ena baino handiagoa dela ere ikusi zen.
- Bigarrenez, eta aurreko ondorioarekin kontraesanean dagoela dirudien arren, BAL bakterio espezifikoek sakarosadun medioan (batez ere) jariatuko lituzketen EPS-ek onddoaren hazkuntza estimulatu dezaketela proposatzen da.
- Aktibitate hauek zein genek edo/eta EPS-ek eragiten dituzten zehaztu beharko da esperimentalki etorkizunean.

### 2. FLIP57 anduiaren azterketa bioinformatikoa.

- *Aspergillus nidulans*-en FLIP57 anduiaren fenotipo akonidiala ziurrenik *An10640* genean dagoen G-T mutazioak (Gly347Stop) eragiten du.
- *An10640/flpA* geneak ziklina bat kodetuko luke, horrela bere funtzioa ziklo zelularraren kontrolarekin lotuz.
- Ziklina hau kontserbatua legoke onddo erreinuko klase guztietan, bere funtzioaren garrantziaren erakusle.

## CONCLUSIONS

As the two research lines followed in this work have little to do with each other the conclusions will be given in two sections. On the one hand, conclusions drawn on the experiments carried out with lactic-acid bacteria and *A. nidulans* co-cultures are given. In the other hand, those ones obtained from the bioinformatic analysis of the *A. nidulans* FLIP57 mutant will be described.

### 1. BAL-*A. nidulans* co-cultivation.

- E11 and AST1 BAL strains are able to slow down or inhibit the growth and germination of the fungus *A. nidulans*. The inhibitory activity of the E11 strains seems to be stronger. A putative antifungal activity is proposed for these BAL strains.
- EPS production by specific lactic-acid bacterial strains may stimulate fungal growth.
- Those genes or/and EPS responsible for the above-mentioned activities, must be identified and characterized in future experiments.

### 2. Bioinformatic analysis of FLIP57 strain.

- The aconidial phenotype of the *Aspergillus nidulans* strain FLIP57 is likely to be caused by the G-T (Gly347Stop) mutation on the gene *An10640*.
- The function of the protein coded by the gene *An10640/flpA*, which is deduced to be a cyclin, is connected to the control of the cell cycle.
- The wide conservation of this protein in the fungal kingdom suggests a functional importance.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), 35-54.
- Bartkiene, E., Lele, V., Ruzauskas, M., Domig, K. J., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., . . . Rocha, J. M. (2019). Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation. *Microorganisms*, 8(1). doi:10.3390/microorganisms8010064
- Casselton, L., & Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature Reviews Genetics*, 3(9), 683-697. doi:10.1038/nrg889
- Consortium, U. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D506-D515. doi:10.1093/nar/gky1049
- Coudreuse, D., van Bakel, H., Dewez, M., Soutourina, J., Parnell, T., Vandenhoute, J., . . . Hermand, D. (2010). A gene-specific requirement of RNA polymerase II CTD phosphorylation for sexual differentiation in *S. pombe*. *Curr Biol*, 20(12), 1053-1064. doi:10.1016/j.cub.2010.04.054
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., . . . Grigoriev, I. V. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol*, 18(1), 28. doi:10.1186/s13059-017-1151-0
- Etxebeste, O., & Espeso, E. A. (2020). *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *International Microbiology*, 23(1), 5-22. doi:10.1007/s10123-019-00064-6
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N. J., Fischer, R., Yu, J. H., . . . Ugalde, U. (2008). Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 7(1), 38-48. doi:10.1128/ec.00207-07
- Flipphi, M., Sun, J., Robellet, X., Karaffa, L., Fekete, E., Zeng, A. P., & Kubicek, C. P. (2009). Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genet Biol*, 46 Suppl 1, S19-s44. doi:10.1016/j.fgb.2008.07.018
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr*, 5(4). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016
- Karagiannis, J., & Balasubramanian, M. K. (2007). A Cyclin-Dependent Kinase that Promotes Cytokinesis through Modulating Phosphorylation of the Carboxy Terminal Domain of the RNA Pol II Rpb1p Sub-Unit. *PLOS ONE*, 2(5), e433. doi:10.1371/journal.pone.0000433
- Keller, N. P., & Adams, T. H. (1995). Analysis of a mycotoxin gene cluster in *Aspergillus*

nidulans. *SAAS Bull Biochem Biotechnol*, 8, 14-21.

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858. doi:10.1038/nprot.2015.053

Kriangkripiat, T., & Momany, M. (2014). Aspergillus nidulans Pmts form heterodimers in all pairwise combinations. *FEBS Open Bio*, 4, 335-341. doi:10.1016/j.fob.2014.03.006

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, 35(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096

Latchman, D. S. (1993). Transcription factors: an overview. *International journal of experimental pathology*, 74(5), 417-422.

Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W256-W259. doi:10.1093/nar/gkz239

Llamas-Arriba, M. G., Puertas, A. I., Prieto, A., López, P., Cobos, M., Miranda, J. I., . . . Dueñas, M. T. (2019). Characterization of dextrans produced by Lactobacillus mali CUPV271 and Leuconostoc carnosum CUPV411. *Food Hydrocolloids*, 89, 613-622. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.053

Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., . . . Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, 47(W1), W636-W641. doi:10.1093/nar/gkz268

Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol*, 67(1), 1-5. doi:10.1128/AEM.67.1.1-5.2001

Manini, F., Casiraghi, M. C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., & Plumed-Ferrer, C. (2016). Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 275-283. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045

Meyer, V., Andersen, M. R., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Caddick, M. X., Cairns, T. C., . . . Head, R. M. (2016). Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3(1), 6. doi:10.1186/s40694-016-0024-8

Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G. H., Caddick, M. X., Csukai, M., . . . Wösten, H. A. B. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol*, 7, 5. doi:10.1186/s40694-020-00095-z

- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., . . . Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, *172*(3), 1557-1566. doi:10.1534/genetics.105.052563
- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D. J., König, C. C., Valiante, V., . . . Brakhage, A. A. (2015). Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Front Microbiol*, *6*, 299. doi:10.3389/fmicb.2015.00299
- Ojeda-López, M., Chen, W., Eagle, C. E., Gutiérrez, G., Jia, W. L., Swilaiman, S. S., . . . Dyer, P. S. (2018). Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Stud Mycol*, *91*, 37-59. doi:10.1016/j.simyco.2018.10.002
- Otamendi, A., Espeso, E. A., & Etxebeste, O. (2019). Identification and Characterization of *Aspergillus nidulans* Mutants Impaired in Asexual Development under Phosphate Stress. *Cells*, *8*(12). doi:10.3390/cells8121520
- Paolillo, V., Jenkinson, C. B., Horio, T., & Oakley, B. R. (2018). Cyclins in aspergilli: Phylogenetic and functional analyses of group I cyclins. *Stud Mycol*, *91*, 1-22. doi:10.1016/j.simyco.2018.06.002
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., . . . Fischer, R. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiol Mol Biol Rev*, *82*(2). doi:10.1128/MMBR.00068-17
- Rodrigues, C. H., Pires, D. E., & Ascher, D. B. (2018). DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res*, *46*(W1), W350-W355. doi:10.1093/nar/gky300
- Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S., & Fischer, R. (2010). Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol*, *64*, 585-610. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134000
- Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(5), 1403-1436. doi:10.1111/1541-4337.12481
- Stajich, J. E., Harris, T., Brunk, B. P., Brestelli, J., Fischer, S., Harb, O. S., . . . Roos, D. S. (2012). FungiDB: an integrated functional genomics database for fungi. *Nucleic Acids Res*, *40*(Database issue), D675-681. doi:10.1093/nar/gkr918
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., . . . Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, *46*(W1), W296-w303. doi:10.1093/nar/gky427

