



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

***Aspergillus nidulans* onddoaren
garapenaren kontrol genetikoa:
FlpA ustezko ziklinaren
identifikazioa eta ezaugarritze
funtzionala**

*Ziortza Agirrezabala, Ainara
Otamendi, Eduardo Espeso,
eta Oier Etxebeste*

103-110 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.13>



***Aspergillus nidulans* onddoaren garapenaren kontrol genetikoa: FlpA ustezko ziklinaren identifikazioa eta ezaugarritze funtzionala**

Agirrezabala, Z.¹, Otamendi, A.¹, Espeso, E.², Etxebeste, O.¹

¹*Laboratory of Biology, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, Manuel de Lardizabal 3, 20018 San Sebastian.*

²*Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.
ziortzagirrezabala@gmail.com*

Laburpena

Aspergillus nidulans onddoa modelo organismo nagusietako bat da onddo harizpitsuen ugalketa asexualaren kontrol genetiko eta molekularren azterketan. *Aspergillus* generoko onddo batzuk patogenoak izanik eta beste batzuk industria mailan hainbat aplikazio dutenez, beren garapen eta ugalketaren kontrol genetikorako mekanismoak ezagutzea garrantzitsua da. Lan honetan, *A. nidulans*-en FLIP57 andui mutante akonidialaren (espora asexualik gabekoa) genomaren azterketa bioinformatikoaz baliatuz, honen fenotipoa eragiten duen mutazioa daraman genea identifikatu (*An10640*) eta geneak kodetzen duen FlpA ustezko ziklinak konidioforoaren (ugalketa egitura asexualak) garapenean esku-hartze garrantzitsua duela frogatu da.

Hitz gakoak: onddo harizpitsu, *Aspergillus nidulans*, garapen asexual, transkripzio faktore, seinaleen transdukzio

Abstract

The fungus *Aspergillus nidulans* is one of the main species used as a reference for the study of the genetic and molecular mechanisms controlling fungal asexual development. Due to the pathogenicity of some species from the genus *Aspergillus* or the industrial value of others, it is relevant to study the mechanisms controlling their development. In this work, the genome of the *A. nidulans* aconidial mutant (lacking asexual spores) FLIP57 was sequenced, the gene (*An10640*) including the mutation causing its phenotype identified and the role played by the putative cyclin FlpA in the production of conidiophores (asexual developmental structures) characterized.

Keywords: filamentous fungi, *Aspergillus nidulans*, asexual development, transcription factor, signal transduction

1. Sarrera eta motibazioa: Onddo harizpitsuak eta *Aspergillus* generoa.

Onddoena, 2-4 milioi espezie biltzen dituen sailkapen konplexuko erreinu bat da (Hawksworth and Lücking, 2017). Horien artean, harizpi itxurako onddoen taldea desberdintzen da, hauek hifa izeneko egitura zelular tubularren arabera hazten direlako. *Aspergillus*, harizpi itxurako onddoen genero bat da, taxonomiari dagokionez, *Ascomycota* filumean, *Peizizomycotina* subfilumean eta *Eurotiomycetes* klasearen barruan sailkatzen dena. Orain arte, 350 espezie inguru barne hartzen ditu genero honek (de Vries et al., 2017). 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* edo *A. oryzae*, adibidez) (Meyer et al., 2020). *Aspergillus nidulans* aspalditik eredu organismo moduan erabili izan da hainbat prozesu zelular eta garapen prozesuak aztertzeko (Ojeda-López et al., 2018), besteak beste, laborategi mailan kultibatu eta manipulatzeko duen erraztasunagatik, patogenoa ez izateagatik, garapen prozesuak (sexuala eta asexuala; ikus aurrerago) modu erraz eta errepikakorrean eragiteko prozedurak eskura izateagatik, edo manipulazio genetikoa erreza eta merkea izateagatik (Etxebeste eta Espeso, 2020).

Ugalketari dagokionez, *Aspergillus* generoko espezieak ugalketa sexuala zein asexuala burutzeko gai dira (Ojeda-López et al., 2018). Sexuala espezieen % 30-40an ematen dela kalkulatu da, gainontzeko % 60-70ak bere genomak ugalketa sexualerako geneak eduki arren (Dyer & O’Gorman, 2011). Garapen asexuala (ikus 1. irudia) mitosian oinarritzen da; alegia, elkarren artean genetikoki berdinak (klonak) diren milioika espora ekoizten dira. Ugalketa sexuala, berriz, meiosis oinarrituta dago eta elkarren artean genetikoki desberdinak diren esporak ekoizten dira (parentalen genomak konbinazioz lortuak). Era honetan, uler daiteke garapen asexuala zabalkunderako mekanismo nagusia izatea, garapen sexuala iraupenera eta trukaketa genetikora bideratua dagoen bitartean.

Ugalketa asexualari dagokionean, konidio izenez ezagutzen diren esporen bitartez ematen da hau (ikus 1A irudia). Konidioak, ingurune baldintzak egokiak direnean ernamuindu egiten dira, hau da, espora bakoitzetik egitura tubular bat sortzen hasten da. Egitura horri germinula deritzo eta hazten jarraituz, adarkatuz joaten dira hifa izeneko egiturak sortzeko. Azkenik, eta baldintzek hala agintzen badute (elikagaien urritasuna edo beste hainbat seinaleen presentzia edo gabezia), hifa batzuetatik konidioak sortzeko funtzioa duten konidioforo izeneko egiturak sortzen hasten dira. Azkenik, esporak ingurura zabalduz, onddoaren bizi zikloa ixten da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak: *Aspergillus nidulans* eta honen garapenaren kontrol genetikoa.

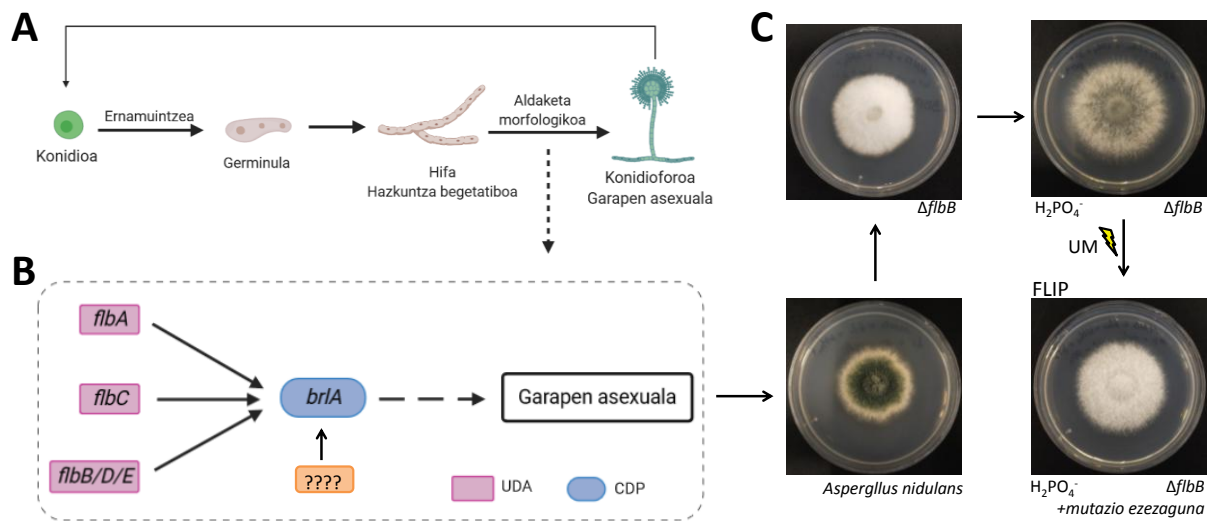
Aspergillus generoko espezieen ugalketa ziklo sexual eta asexuala aztertzeko erabiltzen den eredu organismo nagusia *Aspergillus nidulans* espeziea da (Etxebeste eta Espeso, 2020; Meyer et al., 2016). Espezie honetan identifikatu eta ezaugarritu dira orain arte ezagutzen diren bi garapen ziklo hauen kontrolean parte hartzen duten gene/proteina gehienak.

Aspergillus nidulans-en espora asexualak konidio izenez ezagutzen dira eta konidioforo izeneko egituratan ekoizten dira. Egitura hauen garapena eta ekoizpena bi bide genetikok erregulatzen dute nagusiki (ikus 1B irudia). Alde batetik, UDA (*Upstream Developmental Activation*) bidea, zeinak inguruko baldintzen arabera konidiazioa emango den ala ez erabakiko duen. Gutxienez hiru azpibidek osatzen dute UDA bidea, hurrenez hurren, *flbA*, *flbB/D/E* eta *flbC* geneek definitutakoek, hain zuzen (arrozaz adieraziak irudian). FlbB, FlbC eta FlbD transkripzio faktoreak (TF) dira eta, beraz, hainbat generen adierazpena kontrolatzen dute. Diana horien artean *brlA* genea dago, konidioforoen garapena kontrolatzen duen CDP (*Central Developmental Pathway*) bide genetikoko 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 dagozkien momentuan eta lekuetan gauza daitezten.

1. irudia. *Aspergillus nidulans* onddoaren hazkuntza eta garapen asexualaren kontrol genetikoa. A)

Onddoaren bizitza zikloaren eskema sinplifikatua, hazkuntza vegetatiboa eta garapen asexualaren oinarri diren hifa eta konidioforoak erakusten direlarik. B) Konidioforoen garapenaren kontrol genetikoen eskema sinplifikatua, UDA (arroxaz) eta CDP (urduinez) bideen erregulatuak nagusiak erakusten direlarik. C) Konidioak sortzeko arazoa duten mutante batzuk (*flbB* genea faltan duen anduia, esaterako), $H_2PO_4^-$ -dun (0.65M) hazkuntza medioan fenotipoa itzularazi eta konidioak ekoitz ditzakete, gatz honen presentzia garapen asexualaren eragile izan daitekeela iradokiz. Ezaugarri fenotipiko hau, $\Delta flbB$ anduitik abiatuz eta argi ultramorearen bidez sortu ziren mutante berrien artean, baldintza horietan akonidialak ziren mutanteak (FLIP adieradunak) isolatzeko erabili zen. Horrek, konidiazioaren kontrolean parte hartuko luketen gene/proteina berriak identifikatu/ezaugarritzeko aukera emango luke (laranjaz B atalean).



UDA bideko generen bat genomatik ezabatzen bada, *brlA*-ren adierazpena inhibitu edo atzeratu egiten da. Ondorioz, mutante horiek *fluffy* (kotoitsu) deritzon fenotipo akonidiala erakusten dute. Honen adibide da $\Delta flbB$ mutantea, *flbB* genea genomatik ezabatuta duena (1C irudia). *FlbB* transkripzio faktorerik egon ezean, *brlA* genearen espresioa ezin izango da aktibatu eta, ondorioz, CDP bide genetikoa blokeatuta geratzen da, konidioforoak garatzeko eman beharreko aldaketa morfologikoak inhibituta geratzen direlarik. Hala ere, ikusi da badaudela hainbat estimulu (elikagaien agorketa, argia, edo gatz edo karbohidrato espezifikoaren kontzentrazio altuak, besteak beste) ugalketa asexuala bultzatzen dutenak (Etxebeste eta Espeso, 2020). $\Delta flbB$ mutantearen kasuan, adibidez, ikusi zen hazkuntza baldintza estandarretan erakusten duen fenotipo akonidiala atzera itzuli daitekeela eta konidiazioa eragin fosfato ($H_2PO_4^-$; 0.5-0.65M) kontzentrazio handiko medioan hazten bada (1C irudia) (Otamendi et al., 2019). Honek, UDA bidez gain, *brlA*-ren indukzioarako bide genetikoko alternatiboak egon daitezkeela iradokitzen du (laranjaz 1go irudiko B atalean).

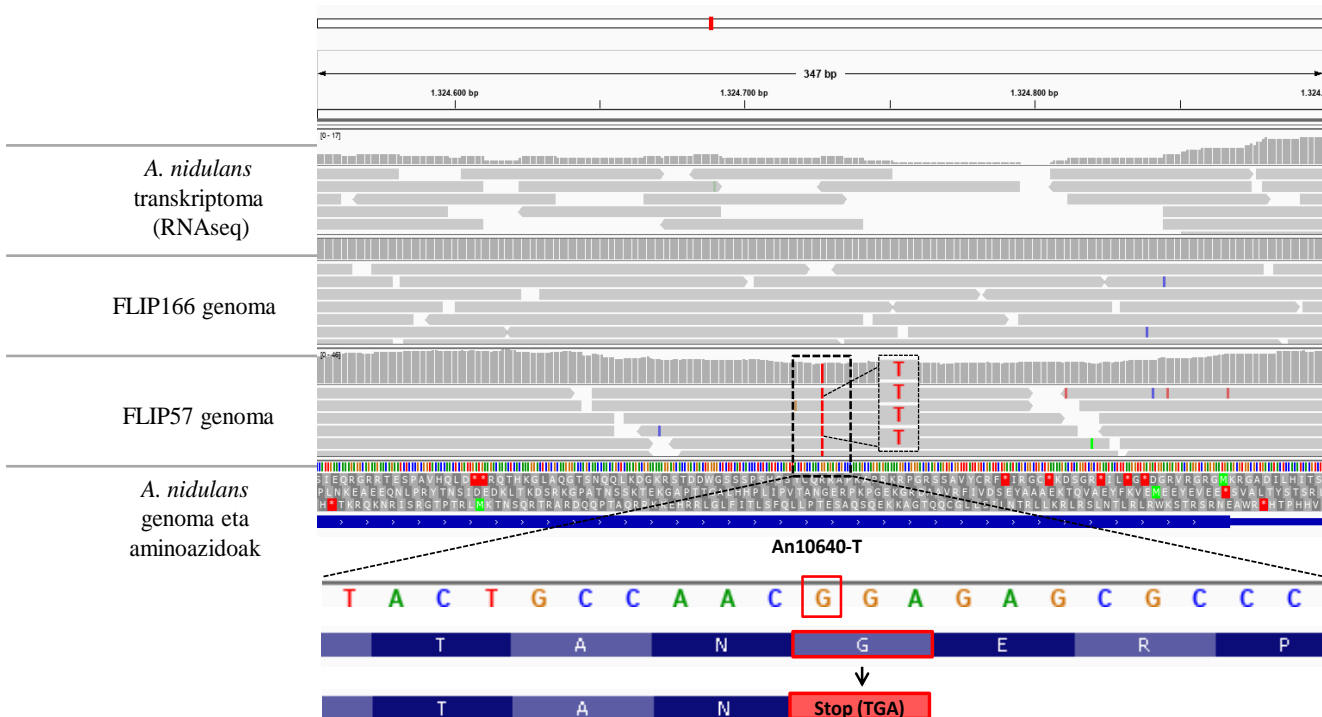
Ustezko bide alternatibo horietan parte hartzen duten geneak identifikatzeko, Otamendi et al. (2019) lanean, fosfatodun (0.65M) kultura medioan fenotipo akonidiala zuten 81 $\Delta flbB$ mutante (FLIP, *fluffy* in phosphate, mutanteak) isolatu ziren mutagenesi bidez (1C irudia). Mutante hauek, *flbB* genearen delezioaz gain, baldintza hauetan garapen asexuala inhibitzen duen beste mutazio ezezagunen bat dute. Hori kontutan hartuta, FLIP mutante horietako baten (FLIP166) azterketak, konidiazioaren kontrolean parte hartzen zuten bi generen identifikazioa eta ezaugarritzea ahalbidetu zuen (Otamendi et al., 2019). Ildo beretik jarraituz, lan honetan FLIP57 mutantea aztertu da, bere genomaren azterketa bioinformatikoa eginez garapen asexualaren kontrolean parte har lezaketen gene berriak identifikatzeko, batetik, eta identifikatutako gene eta horiek kodetzen dituzten proteinen ezaugarritze funtzionala burutzeko, bestetik.

3. Ikerketaren muina

3.1. *An10640* genearen mutazio batek eragin lezake FLIP57 fenotipoa

FLIP57 mutantearen ($\Delta flbB$ fondo genetikoa) genoma Stabvida enpresan (Caparica, Portugal) sekuentziatu zen. Genoma osoaren hainbat kopia ordezkatzeko zuten 72 nukleotidoz osatutako milioika sekuentzia (*read*-ak) lortu ziren. Lortutako emaitzak, aurrez eskura zeuden *A. nidulans*-en genomaren erreferentziako bertsioaz (Basenko et al., 2018), FLIP166 mutantearen (Otamendi et al., 2019) genomarekin, eta transkriptoma batekin (Oartzabal-Arano et al., 2015) konparatu ziren. IGV (*Integrative Genomics Viewer*) programa erabiliz, FLIP57 anduiaren azaldu bai baina, beste genoma/transkriptomatan azaltzen ez ziren mutazio exonikoak bilatu ziren (ikus 2. irudia). FLIP57 eta FLIP166 (Otamendi et al., 2019) anduien fenotipo akonidialaren eragilea zen mutazioa gene ezberdinetan zegoela jakinik, *An10640* genearen exoi batean zegoen mutazio bat identifikatu zen (lauki ez jarraia 2. irudian). Mutazio horrek G bat T batez ordezkatzeko zuten, 347. kodoian GGA(Gly)-TGA(stop) ordezkapena eraginez. Honek stop seinale goiztiar bat sartuko luke, sortuko litzatekeen proteinak berezkoak baino 45 aminoazido gutxiago izango litzatekeelarik. Mutazio hau FLIP57-ren fenotipoaren eragile izateko hautagai nagusi bezala hartu zen. Fosfatodun medioan konidioen ekoizpena inhibituko lukeenez, *flpA* adiera eman zitzaion *An10640* geneari (*fluffy in phosphate A*).

2. irudia. *A. nidulans*-en erreferentziako genoma eta transkriptomekiko FLIP57-ren genomak duen mutazioaren irudikapena. Lauki ez-jarraiak mutazioaren kokapena adierazten du, beheko sekuentziak mutazio horrek proteinan eragingo lukeen aldaketa adierazten duelarik. IGV *software*-a erabiliz lortutako irudia.

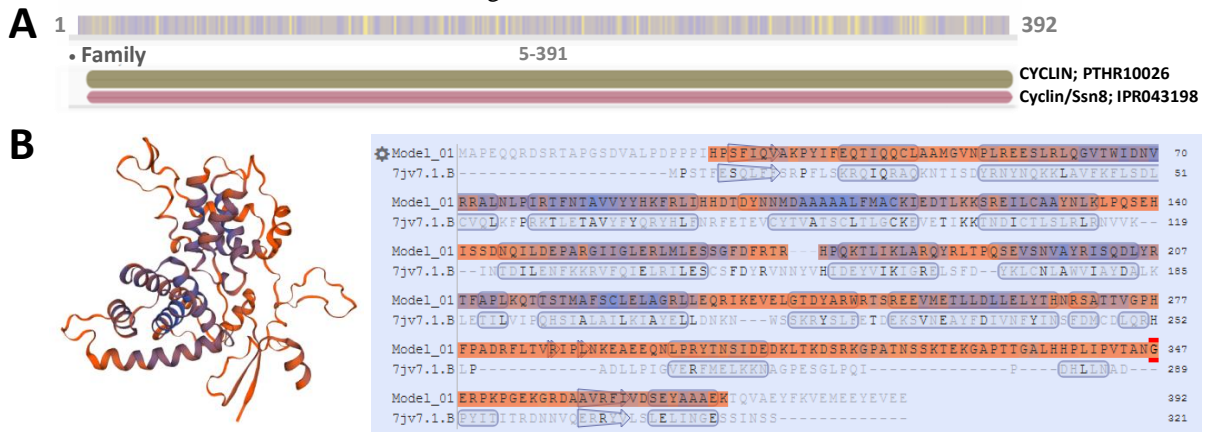


3.2. FlpA proteina ziklina bat izan liteke, ziklo zelularren erregulatuzailea

InterPro izeneko plataforman (Blum et al., 2021) egindako FlpA-ren aminoazido sekuentziaren azterketaren arabera, FlpA proteina ziklina (IPR043198 eremua; 23 eta 391. aminoazidoen artean kokatua) bat izan daitekeela ikusi zen (ikus 3A irudia). Ziklinak, ziklo zelularren erregulazioan parte hartzen duten proteinak dira (Paolillo et al., 2018). Hauek, ziklinen menpeko kinasak (CDK; *Cyclin-Dependent Kinase*) izeneko entzimekin elkartuz konplexuak osatzen dituzte, kinasak horiek fosforilazioz aktibatuz edo desaktibatuz.

Horrez gain, 3B irudian Swiss-Model plataformaren bitartez (Waterhouse et al., 2018) lortutako FlpA proteinaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena erakusten da. Eredu hau, proteina honen homologoen aminoazido kontserbatuak erreferentziatzen hartuz eraikitzen da (ikus 3B irudia).

3. irudia. FlpA proteinaren aminoazido sekuentziaren azterketa. A) *A. nidulans* onddoaren *An10640* geneak kodetzen duen FlpA proteinaren sekuentziaren azterketa InterPro plataforman. B) Swiss-Model plataformaren bidez egindako FlpA proteinaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena (ezkerrean) eta eredu hau FlpA-ren sekuentzia basatiaren zein eremuri dagokion erakusten duen irudia (eskuinean). Gorritz FlpA-n mutatua dagoen glizina adierazten da.

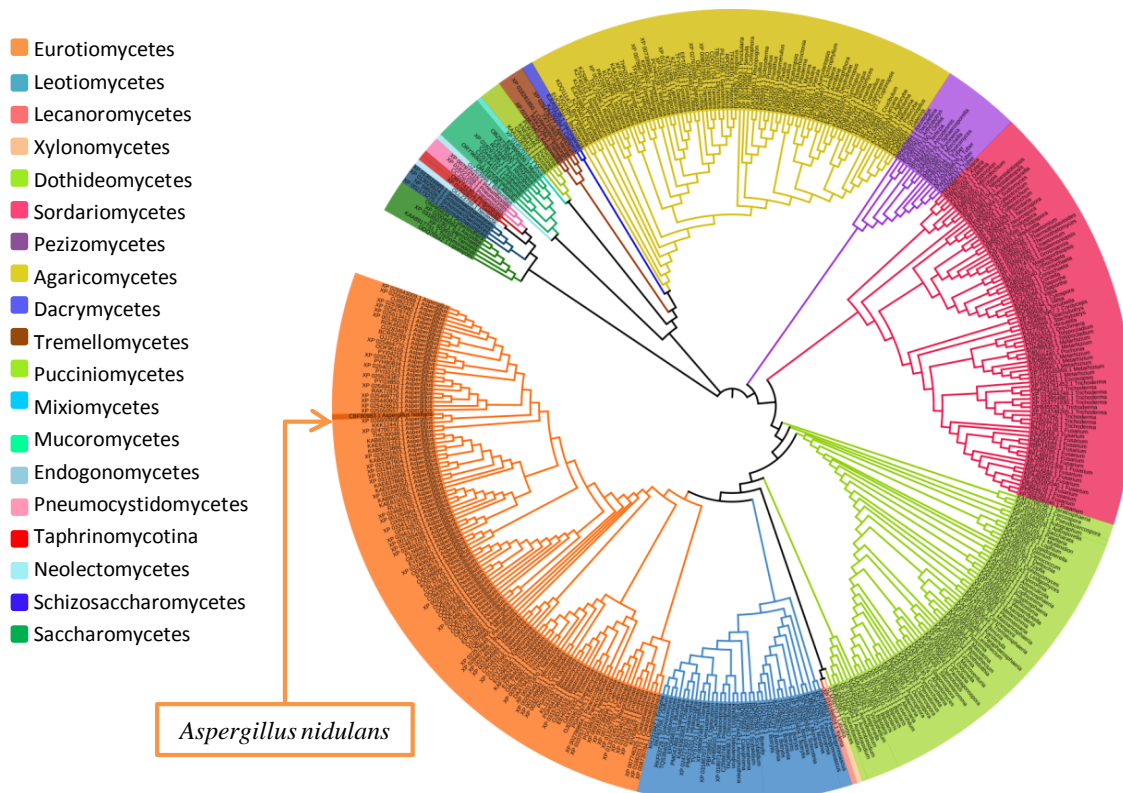


3.3. FlpA ustezko ziklina onddo klase guztietan kontserbatuta dago

FlpA proteinak onddoetan duen kontserbazio maila aztertzeko, bere aminoazido sekuentzia bilaketa-termino bezala erabiliz, proteina honen edo kontserbatueneren (ortologoak) bilaketa burutu zen organismo ezberdinetan (BLAST), NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) datu basean. Lortutako ustezko ortologoak sailkatu egin ziren, ustez, FlpA-ren ortologoak ez zirenak baztertuz eta onddo espezie bakoitzeko kontserbazio maila altuena zuen (*score*, *e value* eta *coverage* parametroen arabera) sekuentzia bakarra aukeratu. Sekuentzia horiekin guztiekin zuhaitz filogenetikoa eraiki (MegaX) eta editatu (iTOL) egin zen (4. irudia). Bertan ikus daitekeenez, FlpA proteinaren kontserbazioa oso zabala da onddoetan, onddoen 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.

4. irudia. *Aspergillus nidulans* onddoaren *An10640* geneak kodetzen duen FlpA proteinaren kontserbazioa adierazten duen zuhaitz filogenetikoa.

Irudi honetan, FlpA proteinaren ortologoa duten espezieak bildu dira; adarrak elkarrengandik zenbat eta hurbilago egon, orduan eta kontserbazio-maila handiagoa izango dute dagokion proteinek. Zuhaitz filogenetikoan agertzen diren adarretako bakoitza espezie baten FlpA-ren ortologo baten adierazle da. Adar horien koloreek berriz, onddo klase ezberdinak adierazten dituzte (ezkerrean adierazita).



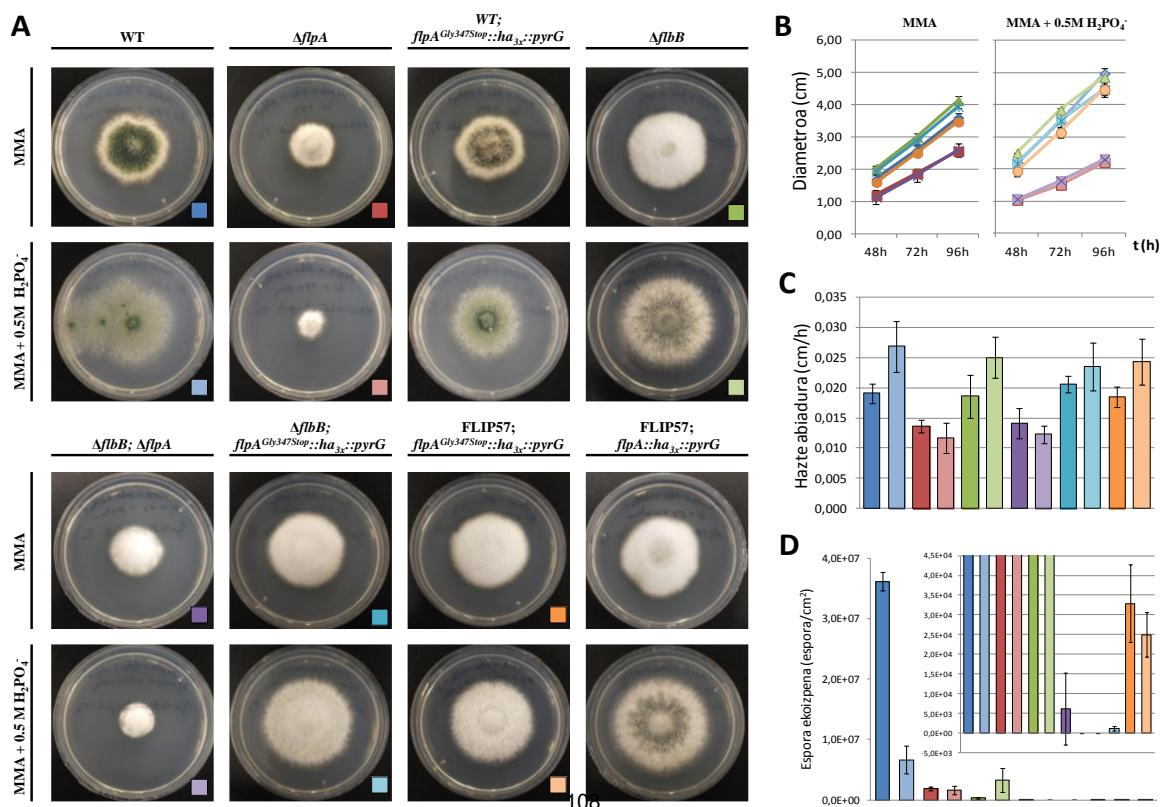
3.4. FlpA ustezko ziklinak konidiazioaren kontrol genetikoan parte har lezake

Aurreko atalean deskribatutako mutazioa FLIP57-ren fenotipoaren eragilea zen ala ez aztertzeko, hainbat transformazio burutu eta hainbat andui errekonbinante sortu zen. Batetik, FLIP57-ren zelulak sintetikoki sortutako *flpA::ha_{3x}::pyrG* DNA konstrukzio batekin transformatu ziren. Konstrukzio honek genearen aldaera basatia zuen, zeinak FLIP57-ren forma mutantea ordezkatuko zukeen. Kontrol bezala *flpA^(Gly347Stop)::ha_{3x}::pyrG* aldaera erabili zen. Lehen DNA konstrukzioak FLIP57-k fosfatodun medioan zuen fenotipoa itzularazten zuen bitartean, bigarrenarekin FLIP57-ren fenotipo bera mantentzen zen (5A irudia, beheko eskuineko bi zutabeak). Bestetik, $\Delta flbB$ anduiaren (BD177) zelulak ere bi DNA konstrukzio horiekin transformatu ziren. Lehenak, fosfatotan andui parental horrek zuen fenotipoa mantentzen zuen bitartean (ez erakutsia), bigarrenak, forma mutanteak alegia, FLIP57 fenotipoa eragiten zuen kultura medio horretan (5A irudia, beheko bigarren zutabea). Bi emaitza hauek, *flpA*-ren Gly347Stop mutazioa FLIP57 fenotipoaren eragilea dela baieztatu zuten.

Ondoren, eta FlpA proteinak eta identifikatutako mutazioak *A. nidulans*-en hazkuntza eta garapenaren kontrolean bete lezaketean funtzioa edo izan lezaketean eragina aztertzeko, andui errekonbinante gehiago sortu eta kolonien hazkuntza abiadura (5B eta 5C irudiak) nahiz konidio produkzioak kuantifikatu ziren (5D irudia). Horrela, andui basati (konidioduna) baten zelulak transformatu ziren aurrez aipatutako bi konstrukzioekin. *flpA* genea ezabatuta zuten anduiak ere sortu ziren, bai fondo genetiko basati honetan baita $\Delta flbB$ fondo genetiko batean ere (5A irudia). Era honetan, *flpA* genearen delezioak hazkuntza eta konidio ekoizpenean izan lezakeen eragina aztertu ahal izan zen eta Gly347Stop mutazioaren eraginarekin konparatu (5B-D irudiak). Eragindako ordezkapen genomiko guztiak ondo gertatu zirela baieztatu zen transformanteen eta parentalen (basatia, BD177 eta FLIP57) DNA genomiko laginak erauziz eta *flpA* locus-a aztertuz PCR eta DNA sekuentziazio bidez.

5. irudia. Andui transformante ($\Delta flpA$, WT; Gly347Stop, $\Delta flbB$; $\Delta flpA$, $\Delta flbB$; Gly347Stop eta FLIP57; *flpA*) eta andui parentalen (WT, BD177 eta FLIP57) arteko konparaketa fenotipikoa AMM (laborategian ondoak hazteko erabiltzen den medio minimoa) eta $H_2PO_4^-$ -dun (0.5M) AMM kultibo medio solidoetan.

A) MAD1425 (WT), BD177 eta FLIP57 fondo genetikoak eta hauetatik sortutako andui errekonbinanteen fenotipoak hazkuntzaren 72. orduan. Plakak 37 °C-tan hazi ziren. Plaken diametroa 5,5 cm-takoa da. B) Hazkuntza abiadurak, andui bakoitzaren kolonien diametroa (cm) hazkuntzaren 48, 72 eta 96. orduetan neurtuta, dagozkien desbideraketa estandarrekin adierazita. C) Andui bakoitzaren batzbesteko hazte abiadura (cm/h) eta balio hauen desbideraketa estandarra. D) Andui bakoitzaren batzbesteko espora ekoizpena (72h) azalera unitateko eta balio bakoitzaren desbideraketa estandarrek. Batzbesteko balio eta desbideraketa estandarren balio guztiak gutxienez hiru erreplikatatik lortu dira.



Alde batetik, fondo genetiko basatian, *flpA*ren Gly347Stop mutazioak ez du fenotipoan eragin nabariegirik izan. Honen ondoan, gene osoaren ezabaketaren eragina nabaria da (ikus 5A irudia). Beraz, mutazio honek eragindako proteinaren azken 45 aminoazidoen gabeziak FlpA-ren aktibitatearen galera partziala eragiten duela ondoriozta daiteke. Bestalde, genearen delezioak fenotipo akonidial oso argia erakusten du, ez bakarrik fosfatodun medio batean, baita hazkuntza medio estandarrean ere. Gly347Stop mutazioak onddoaren hazkuntzan eragin esanguratsurik ez duen arren, FlpA proteinaren gabeziak kolonien hazkuntza erradiala ere kaltetzen duela proposa liteke.

4. Ondorioak

- Gure taldeak isolatutako FLIP mutanteen bildumak *A. nidulans*-en hazkuntza eta garapenaren kontrolean parte hartzen duten gene/proteina berrien identifikazioa ahalbidetzen du.
- *flpA* genearen 347. kodoiko G-T mutazioak eragiten du FLIP57 fenotipoa.
- Zerbitzari bioinformatikoen arabera, FlpA-k ziklina funtzioa izango luke. Ziklina hau onddo erreinuko klase guztietan edo ia guztietan legoke kontserbaturik, bere funtzioa garrantzitsua dela iradokiz.
- FlpA-ren aktibitate galerak, hazkuntza eta garapenaren inhibizioa eragiten du. Proteinaren C-terminal ertzak garrantzia txikiagoa izango luke funtzio hauetan N-terminal eremuak baino.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea.

-Ziklina bat balitz, FlpA-ren lokalizazio subzelularra aztertu beharko litzateke fluoreszentsia mikroskopia bidez eta ziklo zelularren fase desberdinetan. Horretarako, FlpA::GFP kimera adierazten duten andui errekonbinanteak sortu dira eta laster aztertuko dira, eta aurrerago organulu desberdinen markatzaileekin ko-lokalizazio probak ere egingo dira.

-Bigarrenik, FlpA-ren galerak zein bide genetiko kaltetzen dituen aztertu nahi da. Horretarako, RNA-seq teknika erabiliko da ikusteko $\Delta flpA$ anduian zein generen adierazpena dagoen desregulaturik.

6. Erreferentziak

- Basenko, E. Y., Pulman, J. A., Shanmugasundram, A., Harb, O. S., Crouch, K., Starns, D., Warrenfeltz, S., Aurrecochea, C., Stoeckert, C. J., Jr., Kissinger, J. C., Roos, D. S., & Hertz-Fowler, C. (2018). FungiDB: An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. *J Fungi (Basel)*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/jof4010039>
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Necci, M., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., Sigrist, C. J. A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S. C. E., Wu, C. H., Bateman, A., & Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Res*, 49(D1), D344-d354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeier, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., Choi, C., Clum, A., Dos Santos, R. A., Damásio, A. R., Diallinas, G., Emri, T., Fekete, E., Flipphi, M., Freyberg, S., Gallo, A., Gournas, C., Habgood, R., Hainaut, M., Harispe, M. L., Henriessat, B., Hildén, K. S., Hope, R., Hossain, A., Karabika, E., Karaffa, L., Karányi, Z., Kraševac, N., Kuo, A., Kusch, H., LaButti, K., Legendijk, E. L., Lapidus, A., Lvasseur, A., Lindquist, E., Lipzen, A., Logrieco, A. F., MacCabe, A., Mäkelä, M. R., Malavazi, I., Melin, P., Meyer, V., Mielnichuk, N., Miskei, M., Molnár, Á., Mulé, G., Ngan, C. Y., Orejas, M., Orosz, E., Ouedraogo, J. P., Overkamp, K. M., Park, H. S., Perrone, G., Piumi, F., Punt, P. J., Ram, A. F., Ramón, A., Rauscher, S., Record, E., Riaño-Pachón, D. M., Robert, V., Röhrig, J., Ruller, R., Salamov, A., Salih, N. S.,

- Samson, R. A., Sándor, E., Sanguinetti, M., Schütze, T., Sepčić, K., Shelest, E., Sherlock, G., Sophianopoulou, V., Squina, F. M., Sun, H., Susca, A., Todd, R. B., Tsang, A., Unkles, S. E., van de Wiele, N., van Rossen-Uffink, D., Oliveira, J. V., Vesth, T. C., Visser, J., Yu, J. H., Zhou, M., Andersen, M. R., Archer, D. B., Baker, S. E., Benoit, I., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Fischer, R., Frisvad, J. C., Goldman, G. H., Houbraeken, J., Oakley, B., Pócsi, I., Scazzocchio, C., Seiboth, B., vanKuyk, P. A., Wortman, J., Dyer, P. S., & 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. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
- Dyer, P. S., & O’Gorman, C. M. (2011). A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Current Opinion in Microbiology*, 14(6), 649-654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.001>
- 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
- 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
- Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G. H., Caddick, M. X., Csukai, M., de Vries, R. P., Endy, D., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N., Haarmann, T., Hadar, Y., Hansen, K., Johnson, R. I., Keller, N. P., Kraševc, N., Mortensen, U. H., Perez, R., Ram, A. F. J., Record, E., Ross, P., Shapaval, V., Steiniger, C., van den Brink, H., van Munster, J., Yarden, O., & Wösten, H. A. B. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol*, 7, 5. <https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z>
- Oiartzabal-Arano, E., Garzia, A., Gorostidi, A., Ugalde, U., Espeso, E. A., & Etxebeste, O. (2015). Beyond asexual development: modifications in the gene expression profile caused by the absence of the *Aspergillus nidulans* transcription factor FlbB. *Genetics*, 199(4), 1127–1142. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.174342>
- Ojeda-López, M., Chen, W., Eagle, C. E., Gutiérrez, G., Jia, W. L., Swilaiman, S. S., Huang, Z., Park, H. S., Yu, J. H., Cánovas, D., & Dyer, P. S. (2018). Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Stud Mycol*, 91, 37-59. <https://doi.org/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
- 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
- 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
- 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
- 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

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau UPV/EHU-ko ikerketa taldeentzako deialdiaren barruko finantzazioa (GIU19/014) eta Eusko Jaurlaritzako PIBA (PIBA_2020_1_0032) eta Elkartek (KK-2019/00076) deialdietako finantzazioarekin burutu da.