



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Análisis morfológico y molecular de *Aspergillus sydowii*
en condiciones de baja actividad de agua.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
Lic. Gisell Valdés Muñoz

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Ramón Alberto Batista García

Cuernavaca, Morelos

Enero, 2021

Sinodales

- Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
- Dra. Sonia Dávila Ramos
- Dr. Raúl Peralta Rodríguez
- Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
- Dr. Ramón Alberto Batista García

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “Análisis morfológico y molecular de *Aspergillus sydowii* en condiciones de baja actividad de agua”, que presenta la alumna **Gisell Valdés Muñoz (10024376)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez CIBNOR	APROBADO	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Raúl Peralta Rodríguez CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente CEIB-UAEM	APROBADO	
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	APROBADO	

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARLOS ELIUD ANGULO VALADEZ | Fecha:2020-11-06 17:19:56 | Firmante

R6sQjXmA3bERnKtClzuRkIpC/9Qw+16eznDYEkoBmcDujLin2ZHsrxqXjBqtj7lssVhxtVo+S9ls8xCXmJPu5K7QMcsHF73eWpZteKZFwBFgqa/z0j7x/JbWNAFMygYCoWPP2/46 qDwx8n8HuNm4PKOI7MLA82yVmbwck0p+mFVhyl/s7c2L/FGnID51/tH72eSOICdYQhCqaw8h6LQU98z6x6h/Y/QRGn427ZK1OVPRbJ7/Sh1oUHdmeDB7lz7x+ZyJlk7EPR930g tUo0yvnllcQ8FRz3xldsiVqL7E!0vzApJA+1keaNlyoCCQVQDw6g49C5sgCx2Zg==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2020-11-06 17:26:26 | Firmante

jheifxwD6gSn4DGmNL/HSRL/Q8apMn8OvMHTUk3GwFiohYvDVTik8zySK2tE8ZP0IM/58T>wogpv1ZZIOzTuYgxbiYL3lphhy2dvMY4ISMq9HdMUZuiLN1OMJXKJKWLF+rRzzVieC7xwFZfp62+xeICERoXnPqjhr2MVCP2/ScOsGNkKklOrMls6jMr7DdYM7UP0H4+n9jnZIHv50ijve9tCIAze5zCkPJFRmPlrvz2BtwGK7rYvT4U60L3wO6ZhouZINUL1EDG146 SjAhv6OBe30h9rTnwn847oaR+zQUPsSJKBkJWsnMKo1Ik6KutMbRiVNBA+mGUUXUmA==

RAUL PERALTA RODRIGUEZ | Fecha:2020-11-06 17:30:04 | Firmante

sV8QvHYbhwQ4njkuOKAmKPKJDSct3T9s4o+zEJYO2YbFWDjw3Sd0pte80HSMUm0Gqkkh9Ph0ceroAN3XZHUN9WaXsuOQ8lcX7dPg+P8ccZ5qHC+Qsf1YMXiSOuikytbd8xp23 TQn4Olej06Evv+f6+ICWojsvlLQHLet56gfn49yN92bk5FR7/G66UrtPBF1o9p5C6swW5xo8TFwGx4nubynN/XcZjIwzeNTTY7ZggG6XeWxjRMan02A6xoLryMWW6PmFvPDTI2W NnceyEgh+OYcJLy8W8nhyDyGAcDYR5deFchtTDMFJDUIv+R1TLQv77sJTIk4qBOLWVf31dw==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2020-11-06 18:01:03 | Firmante

OMQmbWt0i35dnA3HxqEz7VRJPw8Mt2gbqUf1zp67GLn4CnRjwoyYk1n1XMOYsE3BFk+VjpUxsZO/Guz7AKcOpS3ATIG5OJPqtXuM3BmRoGt3pSTqFUcDH3SBWgEZ8lv7D/T bsokK7TY4XS43InMG8RkWNtp/TnI7xLxPCExJOI0aQFBXuvxFWH+bnXkMBGnUuqKkC6wHHsuH8zm0JjMPSNWZgnQecFdhK5UodGrr/2HjuXgG9gSj5pgg9i9glstavt9R5j zuli5e/A767TOn8f0id1C83YgwlLq7uz2ttMcZfjQkXlhnxBkNAIL32hWc+XCJdx/25NP1MOg==

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2020-11-06 18:02:24 | Firmante

h9ICIFTMOCfEIXvu16xz52uDNWaidspkhH5SHeZGbpM2zaT7hPNeNOJKsu2XiiGpO+p5ScT+CyQx4bqRfKNWYXpGgE0re1X2ISDuMAQCIGdezJAJI0hEITOnAJALENyERP+L peaS8L1uvx8t5iDso8NnQDpco337H9zWxF8TPt6O5y99PXDIeHoduIUS5J65mqhKgYWGxTSYnGQHxbCUIt0zjv93qZ/EDaFe+Xk67FdxXxtb7PLPxrEmZPZNY9ifTy5dyZvlbnR bQetWqOL2KilHKP7ol4ppkRyoN7CFa6JPwJRI0MvDx+uXqSEmbmR8CH5yrvJdFmFrO09AmA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



QdMwyq

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fGDc3JZWgLP7fRmUJ0GRLPczP88Trx>

Agradecimientos

Estos dos años de maestría en México han sido de los mejores de mi vida, he aprendido tantas cosas nuevas y he superado muchos retos incluso miedos, y hay tantas personas a las cuales agradecer:

A mi tutor Dr. Ramón A. Batista García, por su aceptación, guía, palabras fuertes y cariñosas, y por toda su destreza para elaborar un camino bonito de estudios y superación para mí.

A mi asesora y amiga MsC. Irina Jiménez Gómez, por cada día enseñarme algo nuevo, por enseñarme a trabajar en el laboratorio con los hongos, por nuestras experiencias microscópicas en Ensenada y porque verdaderamente con ella mi maestría fue excelente.

A la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente y Dra. Sonia Dávila Ramos porque en cada examen semestral me apoyaron a mejorar esta investigación.

Al Dr. Ayixon Sánchez Reyes, MsC. Hugo Castelán y MsC. Yordanis Pérez Llano por su ayuda bioinformática tan amable y desinteresada, gracias por compartir esos conocimientos.

A las chicas “Aspergillus” Debu, Heidy, Lyselle, Adri por nuestros estudios en conjunto, por darnos apoyo y siempre estar disponibles, gracias por su amistad.

A todos los amigos mexicanos y cubanos encontrados en México y que han hecho esta estancia tan amena y alegre.

A mi amiga incondicional Halis Seuret, por ayudarme desde el principio y hasta el infinito, por apoyarme en mis exposiciones y por su fuerza interna incalculable.

Al Dr. Diego Seuret Jiménez, porque fue mi conexión a mi maestría y porque es la representación de un padre especial sin lugar a dudas, para mí y para todos los que lo conocen.

A mi amor Vitico y a sus padres Ana Isabel y Luis Alberto por ayudarme desde los inicios de esta travesía y por siempre estar presentes.

Y a mi familia entera, en especial a mi madre, mi padre y mi hermana, por su amor y apoyo siempre, porque que son el ATP de cada día de mi vida.

A CONACyT y a la UAEM por brindar el apoyo económico durante este tiempo de maestría que contribuyó tanto a la realización de este trabajo.

Muchas gracias a todos y seguimos adelante....

Publicaciones durante la maestría

- Vinculada directamente con la tesis de maestría y actualmente en revisión:
“Morphology, osmolyte synthesis and oxidative stress responses of the halophile *Aspergillus sydowii* to water deprivation induced by saturating NaCl concentrations”

Authors: Irina Jiménez-Gómez¹, Gisell Valdés-Muñoz¹, Tonatiuh Moreno-Perlin¹, Rosa Mouriño-Pérez², María del Rayo Sánchez-Carbente³, Jorge Luis Folch-Mallol³, Nina Gunde-Cimerman⁴, Yordanis Pérez-Llano¹, Nilda del Carmen Sánchez-Castellanos⁵ and Ramón Alberto Batista-García^{1*}

- Además otro artículo científico durante la maestría: “Tracking gene expression, metabolomics and biochemical analysis in the halotolerant basidiomycetous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 during benzo [a] pyrene and phenanthrene biodegradation under hypersaline conditions”

Authors: Liliana Martínez-Ávila, Heidy Peidro-Guzmán, Yordanis Pérez-Llano, Tonatiuh Moreno-Perlín, Nilda C. Sánchez-Castellanos, Maikel Gilberto Fernández-López, Ayixon Sánchez-Reyes, Lyselle Ruíz de León, Giselle Valdés-Muñoz¹, Deborah González-Abradelo, Elisabet Aranda, Gabriela Ángeles de Paz, Verónica Lira-Rúan, Arline Fernández-Silva, Clementina Pozo, Sonia Dávila-Ramos, Jorge Luis Folch-Mallol, María del Rayo Sánchez-Carbente, Hubert Cabana, Nina Gunde-Cimerman, Ramón Alberto Batista-García*

Tabla de contenido

Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
1. Antecedentes	13
1.1. Actividad de agua.	13
1.2. La vida en condiciones de baja a_w	14
1.3. Cambios morfológicos en condiciones de baja a_w	14
1.4. Mecanismos moleculares que permiten la adaptación a baja disponibilidad de agua.	16
1.5. Glicerol: soluto compatible por excelencia	18
1.6. Estrés oxidativo en hongos halófilos y halotolerantes	19
1.7. Aspectos generales del proceso de morfogénesis en hongos filamentosos	20
1.8. <i>Aspergillus</i> en condiciones de baja actividad de agua	21
1.9. <i>Aspergillus sydowii</i>	21
1.10. Transcriptoma	23
1.11. Tecnología RNA-seq	24
1.12. Transcriptoma en hongos halófilos	25
I. Problema	26
II. Hipótesis	27
III. Objetivo general	27
IV. Objetivos específicos	27
2. Materiales y métodos	27
2.1. Cultivo de <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 en condición óptima y de estrés.	28
2.2. Estudio de las características morfológicas de <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860	28

2.3. Biomarcadores de estrés oxidativo en <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 en condiciones hipersalinas _____	28
2.4. Evaluación del crecimiento de <i>Aspergillus sydowii</i> en su condición óptima (1 M) y de estrés (5.13 M). Curva de crecimiento para seleccionar el tiempo correcto para la extracción del ARN. _____	29
2.5. Extracción de ARN total de <i>A. sydowii</i> en la condición óptima y la condición de estrés _	30
2.5.1. Kit Zymo Spin IC _____	30
2.5.2. Método del Fenol ácido _____	31
2.6. Procesamiento y ensamblaje de las secuencias del transcriptoma _____	32
2.7. Análisis de expresión diferencial _____	32
2.8. Análisis de enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas. _____	33
2.9. Cálculos estadísticos _____	33
3. Resultados y discusión _____	33
3.1. Morfología de <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 a diferentes concentraciones de NaCl __	33
3.2 Evaluación del crecimiento de <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 _____	38
3.3 Extracción de ARN total en la condición óptima y la condición de estrés. _____	39
3.4 Análisis de la calidad de la secuenciación <i>RNA-Seq</i> _____	40
3.5 Ensamblaje de novo y expresión diferencial _____	44
3.6 Enriquecimiento de términos GO _____	46
3.7 Defensas ante el estrés oxidativo inducido por NaCl en <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860_	53
3.8 Expresión transcripcional de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo en <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 _____	58
Conclusiones _____	66
Referencias Bibliográficas _____	67
ANEXOS _____	79

Resumen

Los hongos ascomicetos filamentosos en particular los del género *Aspergillus*, son modelos especialmente atractivos para el estudio de los mecanismos de tolerancia al estrés osmótico pues pueden crecer en el rango de los valores más bajos de actividad de agua (a_w) que sostienen la vida (0.75-0.80). *Aspergillus sydowii* aislado a partir de bagaso de caña está descrito como un hongo halotolerante con un crecimiento óptimo entre 0.5 M y 1 M de NaCl tolerando hasta 2 M de NaCl. Varias especies de este mismo género, caracterizadas como halófilas, son atractivas por sus potenciales aplicaciones industriales y biotecnológicas, siendo eficientes en la degradación de la biomasa, de compuestos orgánicos recalcitrantes y en la producción de enzimas con funciones importantes. Con el fin de comprender los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la respuesta al estrés en este trabajo se propone analizar comparativamente el transcriptoma de *Aspergillus sydowii* en condiciones de crecimiento óptimas (CO) (1M) y estresantes (CE) (5.13M). La concentración de NaCl en la CE utilizada en este estudio, está reportada como saturante correspondiendo a una $a_w = 0.75$ y para la cual no existen estudios anteriores de transcriptómica en este organismo. Métodos: la extracción total de ARN se realizó a los 4 días de crecimiento en YMB con el kit Zymo-Spin IC para la CO y el método tradicional con fenol ácido fue utilizado para la CE. La secuenciación se realizó a través de la plataforma Illumina, con extremos pareados, con una profundidad de entre 30 y 50 millones de lecturas. Trinity se usó para el ensamble de novo; para la cuantificación de los niveles de expresión se empleó kallisto, el análisis de expresión diferencial se realizó con edgeR y el programa Blast2Go se usó para la anotación funcional y el enriquecimiento de GO y vías metabólicas. Además se estudió la presencia de enzimas relacionadas con la respuesta del hongo al estrés oxidativo la CE. El análisis bioinformático mostró que debido a la CE, 704 genes se regularon positivamente y 1138 negativamente. Entre los principales procesos sobrerrepresentados se encuentran la biosíntesis de la pared celular que se conoce como una estrategia de vida de los hongos halófilos; la actividad de la enzima 1-3 β glucanosiltransferasa y la biosíntesis de polisacáridos. Los procesos metabólicos del glicerol, de polioles, y de la transducción de señales mediante la fosforilación de proteínas se encuentran regulados negativamente. Se encontraron genes con sobreexpresión significativa con la relacionados actividad de los sistemas antioxidantes.

Abstract

Filamentous ascomycete fungi, particularly those of the genus *Aspergillus*, are especially attractive models for studying the mechanisms of tolerance to osmotic stress since they can grow in the range of the lowest values of water activity (a_w) that support life (0.75 - 0.80). *Aspergillus sydowii* isolated from cane bagasus is described as a halotolerant fungus with optimal growth between 0.5 M and 1 M NaCl, tolerating up to 2 M NaCl. Several species of this same genus, characterized as halophilic, are attractive for their potential industrial and biotechnological applications, being efficient in the degradation of biomass, recalcitrant organic compounds and in the production of enzymes with important functions. In order to understand the molecular and cellular mechanisms involved in the stress response, this work proposes comparatively analyzing the *Aspergillus sydowii* transcriptome under optimal growth conditions (CO) (1M) and stressful conditions (CE) (5.13M). The concentration of NaCl in the CE used in this study is reported as saturating, corresponding to $a_w = 0.75$ and for which there are no previous transcriptomic studies in this organism. Methods: total RNA extraction was carried out at 4 days of growth in YMB with the Zymo-Spin IC kit for CO and the traditional method with acid phenol was used for CE. Sequencing was performed through the Illumina platform, with paired ends, with a depth of between 30 and 50 million reads. Trinity was used for the ensemble de novo; kallisto was used for the quantification of the expression levels, the differential expression analysis was carried out by edgeR and Blast2Go was used for the functional annotations and GO enrichments and metabolic pathways. In addition, the presence of enzymes related to the response of the fungus to oxidative stress CE was studied. Bioinformatic analysis showed that due to CE, 704 genes were up-regulated and 1138 negatively. Among the main overrepresented processes are cell wall biosynthesis which is known as a life strategy of halophilic fungi; the activity of the enzyme 1-3 β glucanosyltransferase and the biosynthesis of polysaccharides. The metabolic processes of glycerol, polyols, and signal transduction through protein phosphorylation are negatively regulated. Genes with significant overexpression were found with related activity of antioxidant systems.

Introducción

Los sistemas celulares contienen más del 97% de agua, por lo que cambios termodinámicos en la disponibilidad de agua causan un estrés biológico fundamental que puede impactar severamente en los procesos metabólicos vitales (Brown 1978).

El parámetro termodinámico conocido como actividad de agua (Vargas-Muñiz et al.), es un importante factor ecológico para el crecimiento de los microorganismos (MOs) (Dimić et al. 2013). Este parámetro termodinámico caracteriza el grado de hidratación de una muestra, aspecto que puede ser determinante para el crecimiento microbiano correcto. Se conoce que a valores de $a_w \leq 0,85$ el agua se convierte en un factor limitante para la vida de los MOs (Zajc et al. 2014a).

Los organismos capaces de crecer óptimamente bajo condiciones de baja a_w , pero esto no constituye una condición obligada se conocen como xerotolerantes, mientras que los xerófilos son los que necesitan de manera obligada valores de baja a_w para su crecimiento óptimo. Dentro de esta clasificación se ubican los halófilos que son MOs que se desarrollan de manera óptima en ambientes con alta concentración de NaCl y los halotolerantes, que pueden crecer con o sin NaCl. Los mismos son capaces de crecer en ecosistemas hipersalinos desarrollando mecanismos de adaptación a altos niveles de iones (Grant 2004).

Los grupos microbianos xerófilos y halófilos estudiados pertenecen a los tres dominios de la vida Archaea, Bacteria y Eukarya (DasSarma and DasSarma 2015). Sin embargo, dentro de estos últimos, sobresalen los hongos como modelo para el estudio de los mecanismos de adaptación a condiciones de baja a_w . Estos organismos para evitar la pérdida de agua, en ambientes de baja a_w acumulan solutos compatibles como el glicerol, arabitol o manitol, eritritol que también pueden ser secretados al exterior.

Los hongos ascomicetos filamentosos, en particular del género *Aspergillus*, son modelos especialmente atractivos para el estudio de los mecanismos de tolerancia a baja a_w dado que son capaces de crecer en los valores más bajos de a_w que sustentan la vida (0.75 - 0.80), además de que presentan una gran diversidad metabólica que les permite crecer en diferentes sustratos (Grant 2004). En hongos filamentosos estos solutos compatibles han sido poco estudiados, por lo que es escasa la información relacionada con las características de la regulación de los genes relacionados con la biosíntesis. Por estas razones, en este proyecto se propone realizar el análisis transcriptómico de *Aspergillus*

sydowii capaz de crecer en baja a_w . Este proyecto contribuirá a una mejor comprensión de las adaptaciones moleculares y morfológicas que tienen lugar durante el crecimiento de hongos en condiciones de baja a_w , ya que en la literatura no existen estudios moleculares sobre cepas halófilas o xerófilas obligadas de *Aspergillus*; siendo este aspecto de relevancia científica.

1. Antecedentes

1.1. Actividad de agua.

El desarrollo biológico de los microorganismos en diferentes ambientes está condicionado a un rango específico de disponibilidad de agua, aspecto que se estudia a través del término *actividad de agua* (a_w). La a_w es el contenido efectivo de agua expresado como su fracción molar, entonces el agua pura tiene $a_w = 1$ y todas las otras soluciones tienen $a_w < 1$. Los diferentes tipos y cantidades de solutos presentes en el ambiente disminuyen los valores de a_w y ejercen efectos adicionales al crecimiento de los microorganismos, causando una presión osmótica y/o efectos tóxicos (Zajc et al. 2013). La a_w se basa en la ley de Raoult para soluciones ideales, y solo toma en consideración las interacciones del soluto con el agua. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$a_w = \frac{P}{P_0} = \frac{n_1}{n_1 + n_2}$$

donde: n_1 son los moles de solvente (agua) y n_2 son los moles de soluto; P , es la presión de vapor de la solución y P_0 es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (Grant 2004).

En presencia de valores de $a_w \leq 0,85$ el agua comienza a ser un factor limitante en el crecimiento de los microorganismos. En el caso de ambientes hipersalinos, el factor limitante es la alta concentración de NaCl y otras sales, que son frecuentemente acompañadas por otros tipos de estreses, como altas temperaturas, alta radiación ultravioleta, baja concentración de oxígeno y alta disponibilidad ocasional de nutrientes (Brock 1979) (Oren 2008). Los ecosistemas áridos, árticos y acuáticos con concentraciones de NaCl $\geq 1M$, se han considerado como ambientes de baja a_w , al igual que los medios donde la concentración de solutos orgánicos o de glucosa es muy elevada $\geq 50\%$ como lo es la miel de abeja. En consecuencia para garantizar el crecimiento, los microorganismos desarrollan mecanismos de supervivencia que estarán estrechamente relacionados con las condiciones específicas de su nicho ecológico.

1.2. La vida en condiciones de baja a_w

Los organismos capaces de crecer óptimamente en condiciones de baja actividad de agua, pero esto no constituye una condición obligada se conocen como xerotolerantes, mientras que los xerófilos son los que necesitan de manera obligada valores de baja a_w para su crecimiento óptimo. Generalmente los organismos xerófilos pueden crecer a valores de a_w menores en comparación con los xerotolerantes. Entre los medios que permiten el crecimiento de la mayoría de estos organismos están: los suelos salinos, los lagos salinos los cuales presentan valores de baja a_w como consecuencia de los iones inorgánicos y los alimentos conservados, en donde la baja a_w está con alguna forma de deshidratación o por los solutos orgánico (Grant 2004).

Los microorganismos halotolerantes pueden crecer óptimamente en presencia o no de NaCl. Por otra parte los halófilos crecen óptimamente en entornos con altas concentraciones de NaCl, prosperando desde la salinidad del mar ($\approx 0,5$ M) hasta la salinidad de saturación (> 5 M) lo que contribuye a una baja a_w , e incluye a Archaea, Bacteria y Eukarya (DasSarma and DasSarma 2015)

La mínima a_w reportada que permite la vida es de 0,61, medida para el hongo xerófilo *Xeromyces bisporus* crecido en un medio basado en azúcar (Pitt and Hocking 2009), por otro lado el hongo más halófilo que existe es *Wallemia ichthyophaga* (*W. ichthyophaga*), el cual requiere de al menos de un 10% de NaCl para su crecimiento (Zajc et al. 2014a).

1.3. Cambios morfológicos en condiciones de baja a_w

El engrosamiento de la pared celular (PC) es uno de los mecanismos de supervivencia propuestos para los hongos halófilos y que ha sido estudiado en *Wallemia ichthyophaga*, en levaduras negras del género *Trimmatostroma* (Kogej et al. 2006) y en el hongo marino *Dendryphiella salina*. Sin embargo, este mecanismo no es una respuesta generalizada en hongos halotolerantes como *Aspergillus flavus* y *Penicillium roquefortii*, en los cuales disminuye el grosor de la PC mientras aumenta el de la membrana citoplasmática. Se ha demostrado que en las levaduras *Debaryomyces hansenii* y *Hortaea werneckii* (*H. werneckii*), la membrana citoplasmática presenta características estructurales específicas en condiciones de halofilia. El valor de la relación esterol/fosfolípidos en un amplio rango de concentraciones de NaCl es menor que para la levadura no xerófila *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo halotolerante *Aureobasidium pullulans*, lo que garantiza una mayor fluidez. En el caso de los ácidos grasos, se ha reportado el aumento de sus niveles de desaturación en células de *Hortaea werneckii*, otro organismo de gran importancia en el

estudio del desarrollo microbiano en ambientes hipersalinos (Gostinčar et al. 2011). El crecimiento en agrupamientos celulares compuestos por numerosas células esféricas es otro mecanismo propuesto en el género *Wallemiales* y en *Hortaea werneckii*, que potencian al supervivencia en condiciones de estrés (Wollenzien et al. 1995).

Las variaciones en la morfología de las hifas y la conidiación de los hongos halófilos es un cambio con reportes limitados en la literatura. Se ha descrito que en condiciones de hipersalinidad, *Wallemia muriae* y *Wallemia sebi* desarrollan hifas con compartimentos más gruesos y de menor longitud en comparación con lo observable en condiciones de baja salinidad. Esos cambios de la morfología celular resultan en cambios en el tamaño y la forma de los pellet de micelio (Kunčič et al. 2010).

La presencia de hidrofobinas (HFBs) en la superficie de la PC es una estrategia particular descrita recientemente en hongos filamentosos. Son proteínas pequeñas de naturaleza anfipática, las cuales han sido asociadas con la formación de los agrupamientos celulares (Zajc et al. 2013), la morfogénesis de las hifas aéreas, la adhesión de las hifas a superficies hidrofóbicas (Wösten 2001). En los hongos halófilos se ha visto que tienen un mayor porcentaje de residuos acídicos que sus homólogos en hongos no halófilos, característica encontrada en arqueas extremófilas. En el genoma del halófilo obligado *W. ichthyophaga* existen 26 genes de HFBs, de los cuales 4 se sobreexpresan en condiciones de alta salinidad para este organismo (30%). En el género *Aspergillus* el promedio de genes de HFBs es 9, fluctuando entre 6 y 10 genes (Littlejohn et al. 2012). En el transcriptoma de *Aspergillus sydowii* (*A. sydowii*) se han descrito 4 genes de HFBs (*sih1*, *sih2*, *sih3*, *sih4*) y solo los primeros tres genes se encuentran completamente representados en el genoma secuenciado. En este estudio *sih1* y *sih2* se expresaron en presencia 2.0 M de NaCl en el medio de cultivo mientras que un gen *sih4* se expresó en ausencia de NaCl. Las HFBs podrían facilitar un empaquetamiento más denso del micelio debido al incremento de la hidrofobicidad (Appels et al. 2018), protegiendo a las células dentro del pellet de posibles daños externos. Adicionalmente más hifas y esporas hidrofóbicas podrían esparcirse más eficientemente en medio acuoso, lo que pudiera constituir una estrategia ecológica para aumentar la oportunidad de escapar de condiciones estresantes (Pérez-Llano et al. 2020).

La melanización de la PC es otro mecanismo importante que ayuda a mantener una alta concentración intracelular de glicerol en *H. werneckii* a pesar de su membrana altamente fluida. Este patrón de melanización tiene variaciones atendiendo a la salinidad, siendo la

capa de melanina menos compacta y con gránulos más pequeños en condiciones de alta concentración de NaCl. Los gránulos de melanina probablemente limitan la permeabilidad de la PC por la reducción de los tamaños de sus poros como se ha descrito en *Cryptococcus neoformans* (Jacobson and Ikeda 2005).

En el halófilo extremo *Aspergillus montevicensis* y el halotolerante *Aspergillus glaucus* se ha descrito que el estrés por la presencia de NaCl promueve el cambio de una reproducción sexual a asexual (Ding et al. 2019) y además la formación de conidióforos a través de la activación de las vías de señalización Ras y MAPK que estimulan la vía central del desarrollo asexual : “ *brlA* → *abaA* → *wetA* ” (Liu et al. 2017b). Las mutaciones de estos genes dan lugar a variaciones en los patrones de conidiación del organismo (Boylan et al. 1987). El análisis de transcriptoma de *Aspergillus cristatus* mostró que la mayoría de los genes relacionados con la esporulación están regulados negativamente en condiciones de alta presión osmótica (Ge et al. 2017).

1.4. Mecanismos moleculares que permiten la adaptación a baja disponibilidad de agua.

Los microorganismos halófilos han desarrollado diferentes estrategias para contrabalancear los cambios en la presión osmótica. La mayor parte de los halófilos eucarióticos tienden a acumular en el citoplasma solutos compatibles, cuyo estudio es limitado en los hongos filamentosos. Estos solutos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que proveen a la célula de un balance osmótico y turgencia sin interferir con el metabolismo celular (Brown 1976). Esta estrategia siempre está conectada con la expulsión de sales de la célula (Oren 2008). Los solutos compatibles se agrupan según su naturaleza en: polialcoholes o polioles (glicerol, eritritol, arabitol, manitol, trehalosa), α y β -aminoácidos y sus derivados (betaína, ectoína, hidroxiectoína, L- α glutamato, β -glutamina, entre otros), y por último, azúcares y sus derivados (sacarosa, trehalosa, entre otras).

La acumulación de los polioles en los hongos filamentosos es una respuesta generalizada a la exposición a bajas actividades de agua de la misma manera que para las levaduras (Brown 1978). Los polioles incluso en concentraciones muy altas inhiben pobremente las funciones enzimáticas (Brown 1978) (Adler et al. 1982), además pueden funcionar como compuestos de almacenamiento de carbono así como ayudar en el balance del potencial redox celular (Diano et al. 2006) y en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (Voegelé et al. 2005).

El glicerol es el soluto que más se acumula en la mayoría de los hongos que han sido estudiados como *H. werneckii* y *Debaryomyces hansenii*. Se han reportado otros solutos compatibles como el eritritol, el inositol, el arabitol, el xilitol y el manitol (Blomberg and Adler 1992; Pfyffer et al. 1986), compuestos que contienen nitrógeno como la glicina betaína y aminoácidos libres (Galinski 1995) como prolina y ornitina, neohesperidina (Ding et al. 2019), sodio (Prista et al. 1997), micosporinas (Kogej et al. 2006; Oren and Gunde-Cimerman 2007) y aminoácidos similares a las micosporinas (MAA) (Oren 1997). Se ha descrito que el patrón de expresión de estos solutos es variable dependiendo del porcentaje de salinidad y de la fase de crecimiento del cultivo. Se ha visto en la fase exponencial del crecimiento la acumulación predominante de glicerol, con un leve aumento del pool de eritritol, mientras que en la fase estacionaria tiene lugar lo contrario, siendo el eritritol el soluto mayoritario. En esta fase se acumula la micosporina-glutaminol-glucósido, aumentando abruptamente hasta 1M de NaCl y disminuyendo a más altas concentraciones de sal (Plemenitaš et al. 2008). El grado de expresión de estos solutos varía durante el crecimiento microbiano, reportándose para *Aspergillus niger* durante las 13 a 22 horas de crecimiento una mayor presencia de glicerol con respecto a eritritol y manitol. En una fase más tardía del crecimiento la concentración de glicerol disminuye con un concomitante aumento de los pools de manitol y eritritol. La presencia de grandes cantidades de manitol en las coindiosporas sugiere su posible función como compuesto de almacén de carbono (Witteveen and Visser 1995b).

En condiciones de hipersalinidad se ha descrito para *Eurotium rubrum* modificaciones genómicas como la ganancia de genes específicos y el incremento del contenido de aminoácidos ácidos (ácido aspártico y glutámico) en las proteínas, al igual que en *W. ichthyophaga* y *H. werneckii*. Una mayor proporción de aminoácidos ácidos es característica de las proteínas expuestas a altas concentraciones de sal, como se ha observado en las proteínas halófilas de Archaea (Madern et al. 2000). Los aminoácidos ácidos en una superficie proteica permiten la unión de grandes cantidades de sales y agua en condiciones de solvente, y de esta manera mantienen conformaciones solubles y activas en un ambiente que generalmente es perjudicial para otras proteínas (Siglioccolo et al. 2011).

Se ha reportado que en organismos eucariotas, la presencia de concentraciones de NaCl estresantes estimula la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que a la vez activa la vía de HOG. Los mecanismos de detoxificación que utilizan los hongos para la

eliminación de ROS son un campo de gran interés y poco estudiado por la comunidad. *W. ichthyophaga* presenta un bajo número de genes de respuesta al estrés oxidativo, lo que resulta sorprendente dada la interrelación de este fenómeno con la sal. Las defensas antioxidantes no enzimáticas como los complejos de manganeso y metabolitos pequeños pueden ser consideradas como un posible mecanismo alternativo a las enzimas para combatir el estrés oxidativo inducido por sal (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018).

1.5. Glicerol: soluto compatible por excelencia

En 1945 se demostró que las levaduras xerófilas producían alcoholes polihídricos, particularmente glicerol, a partir de un proceso de fermentación del azúcar, pero no fue hasta 1972 que Brown y Simpson propusieron una función fisiológica para esta acumulación de polioles en las levaduras (Brown and Simpson 1972). Algunos estudios sugieren que la acumulación de glicerol es necesaria para que las células vivas mantengan la homeostasis osmótica y alivien los efectos adversos de los iones tóxicos de Na⁺ (Kogej et al. 2007). Se ha reportado que el glicerol se acumula en las levaduras durante el crecimiento en medio salinos (André et al. 1988) (Brown 1978) al igual que en las algas del género *Dunaliella* (Avron and Ben-Amotz 1978).

La vía MAPK (mitogen-activated protein kinase) por la cual se regula la síntesis de glicerol en *Saccharomyces cerevisiae* y que tiene un papel central en la supervivencia en ambientes de baja actividad de agua se conoce como vía de respuesta al estrés HOG (del inglés High Osmolarity Glycerol). Esta levadura responde al aumento de la osmolaridad externa mediante los receptores Sln1 y Sho1 que definen dos ramas para la activación posterior de la cascada de señalización la cual está compuesta por tres MAPKKK (*Ssk2*, *Ssk22* y *Ste11*), una MAPKK (*Pbs2*) y el principal componente es la MAPK Hog1 (Gostinčar et al. 2011). La activación de la vía HOG resulta en la inducción de genes claves para la biosíntesis de glicerol como glicerol-3-fosfato-dishidrogenasa (*GPD1*) y glicerol-3-fosfatasa (*GPP 2*), además de otros genes involucrados en el metabolismo lipídico, de aminoácidos, de funciones mitocondriales, del ciclo celular y se incluyen genes con funciones desconocidas (Plemenitaš et al. 2014). En *H. werneckii* se han encontrado homólogos de *GPD1* (*HwGPD1A* y *HwGPD1B*) los cuales son inducidos por la presencia de sales, adicionalmente 95 genes diferencialmente expresados fueron identificados al comparar el crecimiento de en ambientes con salinidad moderada (3M) y extrema (4.5 M) (Gostinčar et al. 2011). En hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus fumigatus* también se han encontrado

homólogos de la vía HOG (Salazar et al. 2009) funcionando en varios procesos fisiológicos para la adaptación al ambiente en el cual se desarrollan (Hagiwara et al. 2016). La acumulación de glicerol por hongos xerófilos filamentosos, en respuesta a condiciones de baja aw, fue reportado en 1982 en las especies xerófilas *Chrysosporium fastidium*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* (Hocking 1993).

En *A. sydowii* crecido en cultivos con 2 M de NaCl, se ha reportado que el aumento de la transcripción de los genes codificantes de transportadores tipo STL1 de glicerol/H⁺, lo que facilita la entrada de glicerol a las células. Este soluto fue acumulado solamente a 2 M de NaCl y no en la salinidad óptima para su crecimiento, indicando que es un soluto característico del estrés (Pérez-Llano et al. 2020).

1.6. Estrés oxidativo en hongos halófilos y halotolerantes

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) surgen como subproductos de las funciones celulares y a través de la actividad regulada de las enzimas generadoras de ROS. En hongo, la mitocondria es la principal fuente de ROS (Warris and Ballou 2019a). El desequilibrio entre la producción de agentes oxidantes y la producción de ROS constituye la causa del estrés oxidativo en las células (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018). Este proceso es perjudicial para la vitalidad de la célula pues los radicales libres de los ROS atacan las membranas celulares, proteínas y eventos genéticos. Varios estudios han comprobado que la exposición de microorganismos al estrés, incluyendo altas concentraciones de sal, puede conducir a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula (Tanaka et al. 2006; Pang and Wang 2008). En condiciones de alta salinidad, la producción de ROS aumenta drásticamente y se altera la homeostasis fisiológica de la célula (Pang and Wang 2008).

La secuenciación del genoma completo de algunas de las especies de hongos más halotolerantes y halófilos ha permitido investigar los posibles vínculos entre la tolerancia al estrés oxidativo y salino a nivel genómico (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018). La reducción de oxígeno molecular (O₂) produce un anión superóxido (O₂⁻), que es convertido por superóxido dismutasas en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y esto es completamente reducido por catalasas o glutatión peroxidasas a agua (H₂O), o parcialmente reducido (vía reacción de Fenton catalizada por iones ferrosos) a radical hidroxilo (HO•). Los diferentes ROS en la célula no solo difieren en su reactividad, longevidad y tipos de daño que causan, sino también en los mecanismos de desintoxicación que utilizan las células para su eliminación (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018).

Las catalasas, peroxidasas, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, peroxirredoxinas, glioxalidasas, y tiorredoxinas son enzimas que tienen efectos antioxidantes en los sistemas biológicos y bioquímicos. Se ha visto que en casos de estrés por radiación ionizante las defensas no enzimáticas tienen un papel importante en la defensa antioxidante. Al menos en estas condiciones, la presencia de enzimas antioxidantes se vuelve redundante y el principal sistema de defensa de la célula es desencadenado por pequeños compuestos no proteicos como complejos de Mn^{2+} , fosfatos, ciertos aminoácidos y nucleótidos (Daly 2009). El sistema de defensa antioxidante protege a la célula contra el daño oxidativo de los radicales libres de las moléculas reactivas (Sarıkaya and Doğan 2020; Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018).

1.7. Aspectos generales del proceso de morfogénesis en hongos filamentosos

En hongos filamentosos, las bases moleculares de la morfogénesis de las hifas, incluyendo la septación y ramificación, no son ampliamente conocidas. Estos procesos se han relacionado molecularmente con la formación de pelos en las raíces vegetales y el desarrollo neuronal (Semighini and Harris 2008). Existen dos tipos de patrones de ramificación: apical y lateral.

Las ramificaciones apicales se desarrollan en la punta de la hifa y pueden ser una respuesta a perturbaciones que producen la acumulación anormal de vesículas exocíticas en la punta de la hifa, resultado del enlentecimiento de la extensión de la hifa pero sin interrupción del flujo citoplasmático de las vesículas. La acumulación excesiva de estas vesículas impulsa al nacimiento de la ramificación apical (Katz et al. 1972) (Trinci 1974). Las ramificaciones laterales son las más comunes en las hifas fúngicas, y se ha descrito que son resultado de la formación de un nuevo Spitzenkörper cerca del sitio incipiente de ramificación (Riquelme and Bartnicki-Garcia 2004). La septación en hongos filamentosos es homólogo a la citoquinesis en levaduras. Este proceso involucra la regulación de señalizaciones mitóticas, de la citoquinesis y de la biosíntesis de la pared celular (Wendland and Walther 2005). La presencia de los poros septales mantiene la conexión entre los compartimentos de la hifa. Existen diferentes estructuras relacionadas con la F-actina que son fundamentales para la septación, por ejemplo el nudo de actomiosina septal (SAT del inglés septal actomyosin tangle) en *Neurospora crassa* (Riquelme et al. 2018). Otra proteína muy importante es Cdc42, miembro de la familia de GTPasas Ras y que está involucrada en el inicio del proceso de ramificación, septación y en el crecimiento polarizado de las hifas. En *S. cerevisiae*, Cdc42 inicia el ensamblaje del anillo de septinas

en un sitio específico a través de sus proteínas efectoras Cla4 y Bni1. En *Ashbya gossypii* se demostró la importancia de Cla4 en el ensamblaje de complejos de proteínas septales tempranas y también en el posicionamiento de los septos en intervalos regulares a lo largo de la hifa (Wendland and Walther 2005) y además se ha visto la presencia de la proteína Spa2 tanto en las puntas de las hifas como en los septos (Knechtle et al. 2003). La formación del anillo de actina previo a la acumulación de la quitina, es un proceso que involucra indirectamente otras proteínas como Bud3 y Cyk1. Estudios en *Aspergillus fumigatus* describen que la delección de los genes que codifican para las septinas AspA, AspB, AspC, AspE producen un cambio morfológico en donde se observan distancias menores entre los septos subapicales (Vargas-Muñiz et al. 2015a).

1.8. *Aspergillus* en condiciones de baja actividad de agua

El género *Aspergillus* es uno de los géneros de hongos filamentosos más importantes y de los más variados del reino Eucariota (Shamim et al. 2016). Contiene aproximadamente 250 especies y abarca más de 200 millones de años de historia de evolución (Geiser et al. 2007). Son más comunes en climas calientes y existen un gran número de especies termotolerantes y tolerantes a condiciones ambientales de baja a_w (Pitt 1994). Son capaces de crecer en el rango de los menores valores de a_w que sustentan la vida (0.75-0.80), y aun así presentan una gran diversidad metabólica que les permite crecer en diferentes sustratos (Grant 2004) (Tabla 1). Varias especies de *Aspergillus* caracterizadas como xerófilas/halófilas son eficientes en la degradación de biomasa, de compuestos orgánicos recalcitrantes y en la producción de enzimas con aplicaciones biomédicas, agrícolas e industriales (Fedorova et al. 2008; Pel et al. 2007). Es por este motivo que son modelos especialmente atractivos para el estudio de los mecanismos de tolerancia de los hongos xerófilos/halófilos a baja a_w .

1.9. *Aspergillus sydowii*

El hongo ascomiceto *A. sydowii*, miembro de la sección *Aspergillus versicolores*, está globalmente distribuido y habita en diversos ambientes donde sobrevive como sapótrofo descomponedor del suelo (Klich 2002). Aparentemente es un hongo terrestre, pero es halotolerante y capaz de crecer en el mar (Hallegraeff et al. 2014). En los ecosistemas marinos, *A. sydowii* ha sido aislado de algunas comunidades de gorgonias del Caribe, costas del Pacífico colombiano y muestras ambientales de las aguas costeras australianas (Soler-Hurtado et al. 2016). Las cepas de *A. sydowii* han sido estudiadas

por su potencial biotecnológico como productores de metabolitos secundarios (Wang et al. 2014) y enzimas degradadoras de la biomasa de las plantas (Schmitt et al. 2002).

En este estudio se trabajó con la cepa EXF-12860 de *A. sydowii*. Sus características morfológicas en medio YMA con 0.5 M de NaCl son similares a las reportadas para otras cepas de este hongo. Macroscópicamente se desarrolla como colonias verdes claras granuladas productora de exudados carmelita. Por otra parte, a nivel microscópico se conoce que *A. sydowii* es un hongo biseriado, con vesículas espatuladas a subclavadas, con presencia de fiálides y conidios equinulados. *A. sydowii* es capaz de crecer en medio líquido y sólido sin NaCl, pero su crecimiento óptimo se reporta entre 0.5 M y 1 M, siendo 2 M de NaCl la máxima salinidad que puede tolerar cuando crece en glucosa y en sustratos complejos como carboximetilcelulosa y paja de trigo (Batista-García et al. 2014).

Tabla 1. Actividad de agua mínima inhibitoria para el crecimiento de microorganismos en alimentos.

Valor de a_w	Procariotas	Levadura	Mohos
0.97-0.95	<i>Clostridium spp.</i>		
	<i>Pseudomonas spp.</i>		
	<i>Escherichia spp.</i>		
	<i>Bacillus spp.</i>		
	<i>Pediococcus spp.</i>		
	<i>Citrobacter spp.</i>		
	<i>Vibrio spp.</i>		
0.95-0.90	<i>Lactobacillus spp.</i>		
	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Rhodotorula spp.</i>	
	<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Pichia spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
	<i>Micrococcus spp.</i>	<i>Candida spp.</i>	<i>Mucor spp.</i>
		<i>Trichosporon spp.</i>	
0.90-0.85	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>Cladosporium spp.</i>
		<i>Hansenula spp.</i>	

<i>Torulopsis spp.</i>			
0.85-0.80	haloarchaea	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Aspergillus patulum</i>
			<i>Aspergillus glaucus</i>
0.80-0.75			<i>Aspergillus conicus</i>
			<i>Aspergillus flavus</i>
< 0.70	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		<i>Xeromyces bisporus</i>

1.10. Transcriptoma

La transcripción de ADN genómico para producir ARNm es el primer paso en el proceso de síntesis de proteínas. Las diferencias en la expresión génica son responsables tanto de las diferencias morfológicas como fenotípicas, así como de las respuestas celulares a estímulos y perturbaciones ambientales (Lockhart and Winzeler 2000). Durante la transcripción, un sistema enzimático convierte la información genética de un segmento de ADN de doble cadena en una cadena de ARN con una secuencia de bases complementarias a la de una de las cadenas del ADN, siendo estos procesos restringidos para que se formen los productos génicos necesarios en cada momento. Por eso a diferencia del genoma, el transcriptoma refleja la expresión diferencial de genes en respuesta a las condiciones ambientales o de desarrollo, estableciendo un vínculo dinámico entre el genoma de un organismo y sus características físicas. Los activadores o represores dictaminan la tasa de síntesis de ARNm que debe producir la maquinaria basal de transcripción, la cual está constituida por los factores de transcripción generales (GTFII) que están muy conservados en los organismos eucariotas y la ARN polimerasa II (Meijueiro et al. 2014).

Las herramientas para la creación de perfiles de ARN han estado disponibles durante años, y han evolucionado desde la secuencia de firmas masivamente paralela (MPSS del inglés Massively Parallel Signature Sequencing), transferencias Northern, PCR de transcripción inversa (RT-PCR), marcadores de secuencia expresada (EST del inglés Expressed Sequence Tag), y análisis en serie de la expresión génica (SAGE), hasta los diferentes tipos de Microarrays y la aplicación generalizada de plataformas de secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq) (Wang et al. 2009). Estas últimas tecnologías de secuenciación conocidas como NGS (del inglés Next Generation Sequencing)

actualmente domina el campo debido a su alto rango dinámico y porque no depende de la disponibilidad de un genoma de referencia para obtener la secuencia del ARN total, permitiendo estudiar los ARN no codificantes con interesantes papeles en el proceso de regulación global de la expresión genética.

1.11. Tecnología RNA-seq

En la última década, la secuenciación de transcriptomas completos (RNA-Seq) se ha establecido como una técnica poderosa para comprender mecanismos moleculares versátiles y abordar problemas biológicos. El RNA-Seq, tiene claras ventajas sobre los enfoques existentes y se espera que revolucione la forma en que se analizan los transcriptomas de organismos eucariotas. Entre las especies que se han estudiado mediante esta técnica se encuentran: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, ratón y células humanas (Schenk et al. 2012). RNA-Seq permite el refinamiento de la anotación del genoma de referencia, la identificación de regiones transcritas impredecibles y la detección de variantes de empalme genético. El enfoque RNA-Seq se basa en la secuenciación masiva de ADNc sintetizado a partir de ARNm obtenido de la muestra en estudio.

En la técnica RNA-seq, una población de ARN (total o fraccionada, tal como poli (A)) se convierte en una biblioteca de fragmentos de ADNc con adaptadores unidos a uno o ambos extremos. Luego, cada molécula, con o sin amplificación, se secuencia para obtener fragmentos cortos de un extremo (secuenciación de un extremo) o de ambos extremos (secuenciación de pares). Las lecturas suelen ser de 30–400 pb, dependiendo sobre la tecnología de secuenciación de ADN utilizada.

Uno de los objetivos al emplear la tecnología de RNA-seq no es solo identificar la presencia de transcritos, sino la de cuantificar el nivel de expresión de cada uno. En este sentido aquellas lecturas que se encuentren en alta proporción representarán niveles altos de expresión de determinado gen y aquellos transcritos ausentes, o con un bajo número de lecturas, serán aquellos que o no se expresan o lo hacen a niveles muy bajos (Schurch et al. 2016). En algunos casos se realizan normalizaciones químicas en las librerías de ADNc con el fin de igualar su abundancia. De esta manera aquellos transcritos altamente expresados no serán los únicos para los que se obtengan lecturas en la secuenciación (Sims et al. 2014).

Existen diferentes plataformas de secuenciación de alto rendimiento para RNA-Seq; entre ellos, el Roche 454, el analizador de genoma Solexa/Illumina y la plataforma SOLiD de secuenciación por ligadura de Applied Biosystems son los más utilizados. La plataforma Roche 454 produce lecturas más largas que las producidas por las tecnologías Illumina o SOLiD, que permiten un mapeo más preciso al genoma de referencia y producen más fácilmente transcriptomas de novo. Sin embargo, las plataformas SOLiD e Illumina generan una mayor cantidad de lecturas, proporcionando una secuencia más profunda que se requiere para la detección más sensible de transcripciones raras y variantes de empalme (Wang et al. 2009).

1.12. Transcriptoma en hongos halófilos

Las investigaciones basadas en los análisis transcriptómicos que se desarrollan entorno a los organismos halófilos, han permitido una mejor comprensión de las estrategias adaptativas necesarias para sobrevivir en ambientes estresantes por la presencia de sal. En la actualidad este campo no es muy amplio, por lo que es muy atractivo realizar estudios que aporten en este sentido a la comunidad científica.

El análisis del transcriptoma de *W. ichtyophaga* en condiciones de alta salinidad demostraron el papel importante que tiene la PC en la respuesta biológica en ambientes con altas concentraciones de sal (Zajc et al. 2013). El análisis reveló un enriquecimiento significativo de genes asociados a HFBs, proteínas presentes en la PC. Este descubrimiento es de particular interés debido a las numerosas aplicaciones de las HFBs en la industria farmacéutica y la medicina. Los estudios transcriptómicos en *Eurotium rubrum* (*Aspergillus ruber*) permitieron comprender los cambios principales en tres condiciones de salinidad, sobresaliendo la sobreexpresión de genes vinculados al transporte de cationes divalentes como Mg^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} y la enzima glicerol-3 fosfato deshidrogenasa relacionada con la síntesis de glicerol (Kis-Papo et al. 2014). Un estudio transcriptómico muy interesante realizado en *Aspergillus glaucus*, detectó la relación entre el estrés por salinidad pero además por la presencia o no de luz, demostrando que para este la fisiología y el metabolismo de este hongo marino parece ser mucho más sensible al estrés salino que por las señales de la luz (Liu et al. 2017b). El transcriptoma de *Aspergillus cristatus* logró asociar la regulación negativa de los genes relacionados con la conidiación y las condiciones de alta presión osmótica por la presencia de NaCl (Ge et al. 2017). También está reportado en la literatura el análisis transcriptómico del hongo halotolerante *Aspergillus sclerotialis* y del hongo halófilo *Aspergillus salisburgensis*, este

último regula tres veces menos genes que el halotolerante (Tafer et al. 2019). Existe información del transcriptoma proveniente de *A. montevidensis* ZYD4 (Liu et al. 2017a) en el cual se encontraron 733 genes regulados positivamente relacionados con la acumulación de glicerol, el almacenamiento de solutos compatibles, la esporulación asexual, entre otros. El último trabajo que se reporta en el 2020 pertenece a *A. sydowii*, en donde se evaluaron las adaptaciones moleculares ante tres molaridades de NaCl (Pérez-Llano et al. 2020). Estos ocho estudios mencionados anteriormente aportan resultados interesantes para la comprensión a nivel molecular de los mecanismos osmoadaptativos en los hongos halófilos y halotolerantes.

I. Problema

Los efectos celulares de la baja disponibilidad de agua se han estudiado poco en las especies del género *Aspergillus*. Son necesarios nuevos y profundos esfuerzos para comprender cómo los hongos mantienen la funcionalidad fisiológica en valores críticos de agua biológicamente disponible ($a_w < 0,90$). Hasta la fecha, los mecanismos de osmoadaptación se han investigado en pocas especies de *Aspergillus* como *A. cristatus* (Ge et al. 2017), *A. montevidensis* (Ding et al. 2019), *A. ruber* (anteriormente *Eurotium rubrum*) (Kis-Papo et al. 2014), *A. salisburgensis* y *A. sclerotiales* (Tafer et al. 2019).

Estamos interesados en estudiar las estrategias de tolerancia a la sal en el ascomiceto halófilo *Aspergillus sydowii*.

II. Hipótesis

El estudio transcriptómico comparativo de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 permitirá analizar los mecanismos moleculares y su asociación con varios cambios morfológicos para adaptarse a ambientes con condiciones de baja actividad de agua impuestas por concentraciones saturantes de NaCl.

III. Objetivo general

Analizar, mediante transcriptómica comparativa, los mecanismos moleculares involucrados en las respuestas de *Aspergillus sydowii*, en condiciones de baja actividad de agua, así como los cambios morfológicos producidos.

IV. Objetivos específicos

1. Realizar la cinética de crecimiento de *A. sydowii* para determinar el tiempo correcto para la extracción de ARN.
2. Obtener el transcriptoma de *A. sydowii* en las condiciones establecidas.
3. Analizar comparativamente el transcriptoma de *A. sydowii* para identificar genes importantes y estrategias moleculares para el crecimiento del hongo en presencia de baja actividad de agua.
4. Analizar a nivel morfológico los cambios de *A. sydowii* en respuesta a la alta concentración de NaCl.

2. Materiales y métodos

A. sydowii EXF-12860 es la cepa utilizada en este estudio. Se encuentra conservada en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se conserva a 4°C en cultivo inclinado y en glicerol al 15%.

2.1. Cultivo de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en condición óptima y de estrés.

Para la preparación del medio líquido (YMB) se utilizaron los siguientes reactivos con las masas adecuadas para 1000 mL de volumen final: 10g Malta; 4g Levadura; 4g Dextrosa anhidra; 5g Peptona; 58,44g NaCl para una concentración de 1M correspondiente a la condición óptima (CO) de crecimiento; 299,79g NaCl para una concentración de 5,13M correspondiente a la condición estresante (CE). Se adicionó 1,5% de agar para los medios sólidos.

2.2. Estudio de las características morfológicas de *Aspergillus sydowii* EXF-12860

Para la caracterización morfológica se seleccionaron 30 hifas del hongo crecido en tres condiciones: 0M, 1M, 5.13M. De estas hifas se analizaron los siguientes aspectos: longitud del primer compartimento, índice de ramificaciones y de septación, el diámetro de la hifa en tres longitudes a partir del extremo apical: 10 μm , 250 μm , 500 μm .

Las características generales del crecimiento de las colonias fueron observadas con un estereoscopio Olympus SZX12, con los objetivos 7x, 20x y 90x. Para la obtención de las imágenes de hifas, ramificaciones y septos las muestras fueron teñidas con Calcofluor blanco (Ram and Klis 2006) y observadas con la técnica de agar invertido en un microscopio de epifluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti-U acoplado a una cámara Hamamatsu Orca Flash 4.0, con un objetivo de Apo 60x/1.49 A.N. La excitación fue realizada con una lámpara de mercurio usando un cubo de filtros ET-DAPI (Exc.340-380; Emi. 435-485). Para la observación de los núcleos las muestras fueron teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y observadas en un microscopio invertido Olympus IX81, módulo confocal de barrido laser FV1000 con un objetivo PlanApo 60x/1.42 A.N, excitado con un láser de 405 nm. Filtro de emisión BA430-470. Las imágenes se obtuvieron a través del software FLUOVIEW FV10 versión 4.0.2.9. El análisis de la pared celular, la dimensión y número de vesículas se realizó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión y la micromorfología de conidios se estudió con Microscopía Electrónica de Barrido.

2.3. Biomarcadores de estrés oxidativo en *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en condiciones hipersalinas

Los sobrenadantes y las fracciones celulares se obtuvieron mediante centrifugación a 6.000 g después de 96 h de crecimiento fúngico en 250 ml de medio YMB con NaCl 1,0 M o 5,13 M. Las células se trituraron en nitrógeno líquido y se añadió 1 ml de H₂O milliQ por

muestra. Las determinaciones se realizaron tanto a partir de sobrenadantes como de fracciones celulares (n = 3).

La actividad de la superóxido dismutasa se evaluó midiendo la inhibición de la autooxidación de pirogalol (Marklund and Marklund 1974). Brevemente, se preparó una solución de pirogalol 0,2 mM usando tampón fosfato (50 mM, pH 8) y se añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 mM. Después de agregar 10 µL de muestra, se midió espectrofotométricamente la tasa de pirogalol oxidado (purpurogalina-quinona) a 405 nm durante 1 minuto (Ramasarma et al., 2015). Además, la actividad de catalasa se determinó usando el kit de ensayo de catalasa EnzyChrom™ (BioAssay System, Hayward, CA, EE. UU.). Finalmente, la concentración de glutatión reducido se cuantificó como se describió anteriormente (Ecobichon 1984) con modificaciones menores. Brevemente, se mezclaron 5 µl de la muestra con tampón fosfato 0,1 M pH 8 y 50 µl de ácido 5'-ditiobis- (2-nitrobenzoico) (DNTB) 10⁻² M. La producción de color debido a la oxidación de DNTB se midió espectrofotométricamente a 412 nm. La concentración de glutatión reducido se determinó utilizando una curva estándar de glutatión reducido preparada en tampón fosfato 0,1 M pH 8.

Además, se analizaron cinco biomarcadores de oxidación. La concentración de peróxido de hidrógeno se midió usando el kit de ensayo BIOXYTECH® H2O2-560 (Bioxytech, Portland, OR, EE. UU.). Además, los productos avanzados de oxidación proteica se cuantificaron como se describió anteriormente (Witko et al. 1992). Como otro indicador de oxidación, se realizó un ensayo colorimétrico para los marcadores de peroxidación lipídica. Los niveles de malondialdehído y 4-hidroxi-alquenos se determinaron a 586 nm según (Erdelmeier et al. 1998). Finalmente, se determinó la susceptibilidad a la peroxidación lipídica según lo informado por (Sánchez et al. 2003). Brevemente, las muestras se incubaron con sulfato de cobre 2 mM a 37 ° C durante 24 horas. Los niveles de malondialdehído se midieron espectrofotométricamente a 586 nm.

2.4. Evaluación del crecimiento de *Aspergillus sydowii* en su condición óptima (1 M) y de estrés (5.13 M). Curva de crecimiento para seleccionar el tiempo correcto para la extracción del ARN.

Para la obtención del preinóculo se cultivó el hongo *A. sydowii* proveniente de medio sólido en matraces de 250 mL con 150 mL de medio líquido YMB (Yeast Malt Broth) con 1M de NaCl, a 30°C, 150 rpm durante 8 días. Luego del octavo día, el micelio se colectó mediante centrifugación en tubos falcon de 50 mL a 4500 rpm, por 10 minutos a

temperatura ambiente (TA) y se almacenó en solución salina 1 M durante 12 horas. Con el objetivo de construir la curva de crecimiento, se centrifugó nuevamente el micelio en solución salina en las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se inoculó 1g de micelio en matraces de 150 mL conteniendo 60 mL de YMB 1 M para la CO y 5.13 M para CE. Estos matraces se incubaron por triplicado durante 6 días a 30°C a 150 rpm. Se colectó el micelio húmedo mediante filtración en un kitasato con filtros de 40 μ m diariamente. Luego se dejó secar este micelio húmedo a 80°C durante 48 horas. Los valores de masa obtenidos se procesaron utilizando GraphPad Prism 6 para graficar la curva de crecimiento y seleccionar el mejor día para la extracción del ARN. Se seleccionan los días en donde los datos sigan un comportamiento asociado a la fase exponencial del crecimiento de los MOS.

2.5. Extracción de ARN total de *A. sydowii* en la condición óptima y la condición de estrés

Durante el proceso de extracción del ARN, las muestras de las dos condiciones no se comportaron igual, resultando muy difícil obtener el ARN de las muestras de la CE (5.13M). Por esta razón se utilizaron dos métodos de extracción de ARN: Zymo Spin IC según las instrucciones del fabricante para las muestras de CO y el método tradicional con fenol ácido para las muestras de CE. La integridad y pureza del ARN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa (1% de agarosa en tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico); 0,9% formaldehído). Posteriormente, las muestras se analizaron mediante electroforesis capilar (Qubit RNA Assay Kit and Agilent bioanalyzer) para determinar el RIN (del inglés RNA Integrity Number). Los siguientes pasos de este proceso para la secuenciación del ARNm mediante la técnica RNASeq se llevaron a cabo en las instalaciones de Macrogen, Korea: las bibliotecas se construyeron con TruSeq Stranded mRNA LT Sample prep kit, por depleción de ARNr, para permitir el enriquecimiento de ARNm; y la secuenciación del ADNc en la plataforma Illumina de extremos pareados (Paired-End), con una profundidad de entre 30 y 50 millones de lecturas de 150pb por librería. Las bibliotecas se agruparon y cuantificaron mediante qPCR.

2.5.1. Kit Zymo Spin IC

Primeramente, se colecta el micelio y se congela en nitrógeno líquido, posteriormente se macera el micelio congelado y se vierte en viales de 1.5 μ L. Se añade 1 mL de Trizol, con agitación en vortex y se deja incubar en hielo durante 10 minutos, luego se centrifuga a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se colecta el sobrenadante y se le añade 200 μ L de

cloroformo, se agita y se centrifuga 5 minutos a 4500 rpm. Posteriormente se colecta la fase acuosa y se transfiere a un vial nuevo de 1.5 µL con la misma cantidad de sobrenadante que de etanol absoluto (relación 1:1) y mezclar bien. Esta mezcla se coloca en la columna que forma parte del Kit de extracción. Se centrifuga a 13500 rpm durante 1 minuto y posteriormente se añade a la columna 400 µL de Prep Buffer. Se centrifuga de igual manera y se añade a la columna 700 µL de RNA Wash Buffer. Se repite la centrifugación, pero esta vez por 2 minutos y se transfiere la columna del Kit a un vial nuevo. Finalmente se añaden 20 µL de DNAsa/RNAsa Free Water y se centrifuga durante 2 minutos. Con el sobrenadante obtenido se realiza la cuantificación del ARN total en un Espectrofotómetro para microplacas Epoch y se analiza la integridad del ARN extraído corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1X.

2.5.2. Método del Fenol ácido

Primeramente, se colectó el micelio y se adicionó 1 mL de Trizol, para luego homogenizar y congelar la muestra con nitrógeno líquido. El micelio congelado se maceró y se colocó en viales de 1.5 mL donde se añadieron 600 µL de solución A previamente preparada la cual contiene agua DEPC; SDS 10%; Acetato de Sodio 3M pH 4.8; EDTA 0.5 M pH 8 y se homogenizó. La mezcla se adicionó a un tubo con 600 µL de fenol ácido precalentado a 620C y se le aplicó vortex durante 15 segundos. La mezcla se incubó a 620C durante 5 minutos, agitando manualmente por 10 segundos cada 50 segundos y posteriormente se centrifugó a 12250 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se recuperó en un vial de 1.5 mL con 1 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente y se aplicó vortex por 10 segundos. Luego se centrifugó a 13250 rpm durante 5 minutos y se decantó (se retira el exceso de etanol con una sanita limpia). Al precipitado se le añadió 1 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente y se le aplicó vortex (hasta despegar la pastilla del vial). El vial se centrifugó a 12250 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente y se decantó cuidadosamente. El pellet formado se resuspendió en 400 µL de solución A y se le aplicó vortex durante 10 segundos. Luego se añadió 1 mL de etanol absoluto y se aplicó vortex durante 10 segundos. Se centrifugó a 13250 rpm durante 5 minutos y se decantó (se retira el exceso de etanol con una sanita limpia). Al precipitado se le añadió 1 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente y se le aplicó vortex (hasta despegar la pastilla del vial). Se centrifugó a 12250 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente y se decantó cuidadosamente. El vial de 1.5 mL Se dejó abierto dentro del flujo laminar durante 40 minutos y posteriormente se resuspendió el pellet en 20 µL de agua libre de nucleasas. El ARN se cuantificó en el Espectrofotómetro para microplacas Epoch

y finalmente se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1%. Las mismas se guardaron a -80°C hasta secuenciación. Para garantizar la estabilidad del ARN durante su transportación se añadió a las muestras una mezcla de acetato de sodio 3 M, pH 5,5 y etanol absoluto y el envío de se realizó en bolsas azules de gel congelado.

2.6. Procesamiento y ensamblaje de las secuencias del transcriptoma

El análisis de la calidad de las secuencias se realizó mediante el software FastQC. Dados los parámetros de calidad obtenidos, fue necesario realizar un primer procesamiento de las lecturas para potenciar su calidad. Para ello se utilizaron varias herramientas bioinformáticas como RemoveFastqcOverrepSequenceReads.py (Freedman 2016) para la eliminación de las secuencias sobrerrepresentadas; Trimmomatic 0.39 para remover los adaptadores (longitud mínima de contig de 124 bp, tamaño k-mer de 23) resultado del proceso de secuenciación (Bolger et al. 2014a). Seguidamente las secuencias fueron procesadas con Rcorrector (Song and Florea 2015b) y BBnorm para corregir errores y normalizar la cobertura de lectura. Este conjunto de datos está disponible públicamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI): ID de envío: SUB8102769, BioProject PRJNA662826, Acceso a BioSample: SAMN16095160. El transcriptoma fue secuenciado por Macrogen Company (Seoul, South Korea).

El ensamblaje de novo de las secuencias se realizó utilizando el software Trinity 2.10.0 (Haas et al. 2013) (Grabherr et al. 2011a). La herramienta utilizada para la cuantificación de transcritos fue kallisto (Bray et al. 2016), generando valores de abundancia para los genes en TPM (Robinson and Oshlack 2010). Este método de normalización ampliamente reconocido utiliza una media recortada ponderada de las relaciones de expresión logarítmica para estimar los factores de escala entre muestras (Bracken-Grissom et al. 2020).

2.7. Análisis de expresión diferencial

El procesamiento de los datos de expresión de genes se realizó utilizando diferentes paquetes implementados en Bioconductor, un proyecto de código abierto para el análisis de datos genómicos en R (Gentleman et al. 2004). Para realizar el análisis de expresión diferencial se eliminaron los transcritos con bajos niveles de expresión en todas las condiciones, es decir, aquellos que tenían menos de 1,5 conteos por millón de lecturas (cpm < 1,5). Los datos de expresión fueron normalizados mediante el algoritmo TMM para eliminar la variación experimental en las muestras y ponderar

la variación (Robinson and Oshlack 2010). El análisis de la expresión diferencial de genes se realizó utilizando la herramienta EdgeR (Robinson et al. 2010). Se consideraron como diferencialmente expresados, aquellos transcritos con logFC (Fold Change) > 1,5 y FDR (False Discovery Rate) < 0.01.

2.8. Análisis de enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas.

La anotación funcional y el enriquecimiento de términos de GO se realizó mediante el programa Blast2GO (Götz et al. 2008) (Biobam Bioinformatic, 2019). El análisis de enriquecimiento de vías metabólicas se realizó con la herramienta BlastKOALA de la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Para el análisis funcional de GO se utilizó el método de Prueba Exacta de Fischer (FDR < 0,05) (Al-Shahrour et al. 2004). Este método permitió obtener gráficos asociados a vías metabólicas teniendo en cuenta los términos asociados a las ontologías: Proceso Biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC) (Haas et al. 2013). En cada caso se analizaron y representaron gráficamente los términos más significativos para este estudio.

2.9. Cálculos estadísticos

Todas las determinaciones experimentales se realizaron por triplicado con tres réplicas técnicas. Las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre la media de las determinaciones morfológicas o las cantidades de marcadores de estrés oxidativo se determinaron mediante ANOVA de una vía ($n = 3$) y la prueba de Tukey's HSD como análisis post hoc. Las diferencias ($p < 0,05$) entre las cantidades medias de osmolitos se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn como análisis post hoc. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando GraphPad versión Prism8 (<https://www.graphpad.com>).

3. Resultados y discusión

3.1. Morfología de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 a diferentes concentraciones de NaCl

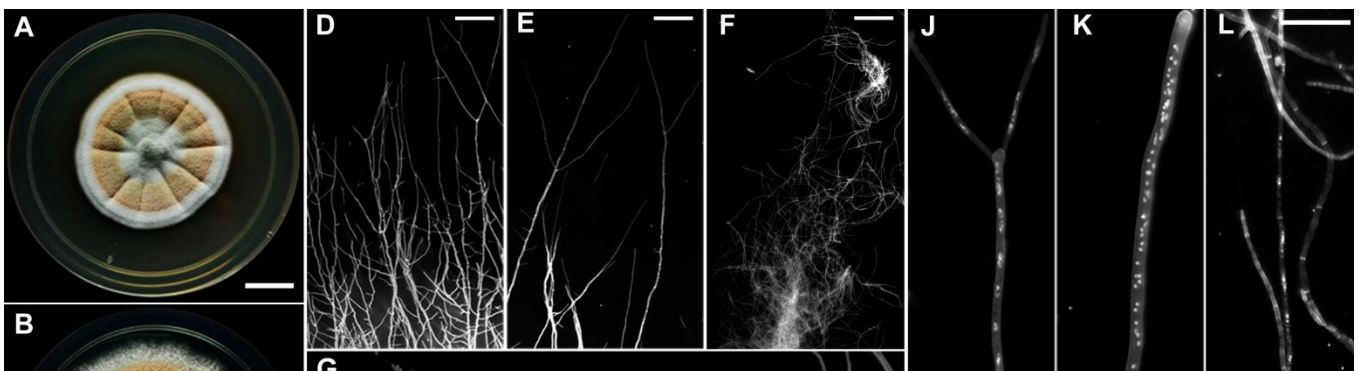
Se examinaron los caracteres micro y macromorfológicos de *A. sydowii* con concentraciones de 1M y 5,13 M de NaCl utilizando cultivos de 10 días incubados en condiciones de oscuridad (Figura 1A-M). Las colonias que crecieron en ausencia de NaCl mostraron un diámetro de 32-35 mm, mostraron elevación umbonada, produjeron conidios

pigmentados de color naranja-blanco a naranja claro, y los contornos variaron de enteros a delicadamente filiformes (Figura 1A). La apariencia de la superficie de la colonia es flocosa en el centro y aterciopelada en los márgenes, el micelio es de hialino a blanco y radialmente arrugado. El reverso de la colonia es de color amarillento a pardusco, y se observaron exudados de pardo rojizo a pardo oscuros.

Por otro lado, las colonias en medio YMA con NaCl 1,0 M se extendieron ampliamente, alcanzaron un diámetro de 42-45 mm (Figura 1B). Las colonias mostraban elevación de plano a umbonado, esporulación de verde opaco a naranja claro, la superficie de la colonia se observó entre pulverulenta y flocosa, con márgenes enteros a delicadamente finos, micelio hialino a blanco, reverso ligeramente amarillo y ausencia de exudados (Figura 1B). Se observó abundante esporulación a concentraciones de NaCl tanto 0 M como 1,0 M.

Las colonias que crecieron en YMA a una concentración saturada de NaCl (5,13 M) alcanzaron el menor diámetro (5-6 mm) con una superficie levaduriforme y una apariencia plana (Figura 1C). El micelio era hialino con un reverso incoloro y presentaba márgenes filiformes. La pigmentación de colonias, el desarrollo de esporas y la producción de exudados se inhibieron en esta concentración. *A. sydowii* EXF-12860 mostró un crecimiento óptimo a 1.0 M NaCl resultando en un mayor diámetro de colonia (Tukey's HSD, $p \leq 0.05$) comparado con el diámetro del micelio obtenido a 0 M y 5.13 M NaCl. De acuerdo con este resultado, se identificó NaCl 1,0 M como la concentración de crecimiento óptimo de EXF-12860, mientras que NaCl 0 M y 5,13 M se consideraron condiciones de estrés.

El examen de micromorfología mostró que el NaCl influyó drásticamente en los bordes de las colonias de *A. sydowii* (Figura 1D, E y F). Las hifas vegetativas en NaCl 0 M y 1.0 M mostraron un crecimiento polarizado (Figura 1D y E), mientras que el crecimiento de las hifas en 5.13 M se tornó aberrante, rizado y enredado (Figura 1F). Además, se observó un aumento en la ramificación de las hifas en ausencia de sal con regiones que alcanzaban un crecimiento isométrico (Figura 1D). El NaCl también afectó la longitud del primer compartimento hifal, la frecuencia septación y los índices de ramificación y nucleación (Figura 1G-M).



Se encontraron diferencias significativas cuando *A. sydowii* EXF-12860 creció en YMA con 1,0 M y 5,13 M NaCl, o en ausencia de sal (Figura 2A y B). La longitud media del primer compartimento de hifas fue de 323 μm y 231 μm con NaCl 1,0 M y 0 M, respectivamente mientras que en 5,13 M se observaron primeros compartimentos mucho más pequeños (29 μm en promedio) (Figura 2A). La septación se promovió significativamente durante el crecimiento de hongos en solución saturada de NaCl - condición de estrés-, alcanzando en promedio un septo cada 15,5 μm versus un septo cada 162 μm en NaCl 1,0 M -condición óptima de NaCl- (Figura 2A). También encontramos que los índices de ramificación y nucleación eran marcadamente más altos en condiciones de estrés (0 M y NaCl 5,13 M) en comparación con la condición óptima de crecimiento de sal (Figura 2B).

El diámetro de las hifas cultivadas a diferentes concentraciones de NaCl se midió a 10 μm , 250 μm y 500 μm desde la punta apical de la hifa hacia el interior de la misma (Figura 2C). Las hifas en YMA con 1.0 M NaCl mostraron los mayores diámetros (Figura 2D). Además, la longitud media de los compartimentos hifales -la distancia entre dos septos- se redujo mucho en 5,13 M en comparación con las otras condiciones de NaCl (Figura 2E).

En resumen, la micro-caracterización de *A. sydowii* EXF-12860 mostró que este hongo halófilo cambió drásticamente su morfología bajo privación extrema de agua por concentraciones saturadas de NaCl. Curiosamente, EXF-12860 reveló una micromorfología similar en YMA saturado con NaCl que en ausencia de sal, siendo ambas condiciones de crecimiento no óptimas para esta cepa halófila de ascomicetos. Aunque las soluciones saturadas de NaCl restringen significativamente el desarrollo de hongos (Gunde-Cimerman et al. 2018), este ascomiceto adaptado al NaCl creció en condiciones de a_w extremadamente bajas produciendo hifas no polarizadas con un mayor número de septos en comparación con el NaCl 0 M y 1,0 M. Hay un aumento aparente en la multicelularidad micelial basado en el aumento de la biogénesis nuclear observado en NaCl 1,0 M. Curiosamente, la multicelularidad fue mayor a 5,13 M que en ausencia de sal. La multicelularidad no se ha estudiado antes en hongos halófilos, y probablemente podría representar una importante respuesta de haloadaptación para enfrentar el estrés inducido por NaCl.

El estrés salino altera drásticamente la morfología, la pigmentación y la estructura de la pared celular de las colonias en los hongos (Gunde-Cimerman et al. 2018). Si bien algunos estudios se han centrado en el análisis microestructural de la pared celular de hongos halófilos / xerófilos (Pérez-Llano et al. 2020) (Kogej et al. 2007) (Kunčič et al. 2010), la caracterización micelial micromorfológica de los hongos halófilos ha sido poco investigada (Ding et al. 2019) (Kunčič et al. 2010). Estudios previos demostraron que en condiciones extremadamente salinas se producían cambios en el tamaño y apariencia de la morfología de la colonia de la levadura ascomiceto halotolerante *H. wernneckii* (Gunde-Cimerman et al. 2018), así como de los basidiomicetos halófilos / xerófilos cosmopolitas *W. ichthyophaga*, *Wallemia sebi* y *Wallemia muriae* (Kunčič et al. 2010). *A. montevidensis*, por otro lado, mostró respuestas morfológicas únicas a las condiciones hipersalinas impuestas por NaCl 3,0 M. Por ejemplo, la producción de pigmento y el desarrollo de cleistotecio se inhibieron drásticamente en *A. montevidensis* cultivado bajo estrés salino

(Ding et al. 2019) (Liu et al. 2017a). Mientras que la alta salinidad promovió la formación de conidios en *A. montevicensis* (Ding et al. 2019), este proceso fue fuertemente inhibido en nuestra cepa de *A. sydowii* a 5.13 M NaCl.

Nuestros resultados son consistentes con (Liu et al. 2017a) quienes informaron que el ancho de las hifas se redujo bajo estrés salino. También encontramos en *A. sydowii* EXF-12860 que los compartimentos hifales eran más delgados y más cortos en condiciones saturadas de NaCl en comparación con lo observado en baja salinidad, como se describió en los basidiomicetos xerófilos *W. muriae* y *W. sebi* (Kunčič et al. 2010). Se describió una morfología similar en el *Aspergillus repens* débilmente halotolerante que mostró diferencias significativas en el grosor del micelio, la ramificación y la septación bajo estrés de NaCl en comparación con la condición no estresada (Kelavkar et al. 1993a). En una *Exophiala* sp., un informe reciente mostró que el cambio dimórfico fue provocado por el NaCl (de fenotipos filamentosos a tipo de levadura) (Ide-Pérez et al. 2020).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el NaCl cambió drásticamente la geometría de las hifas, lo que indica que se produjo un reordenamiento dinámico del citoesqueleto particularmente en NaCl 5,13 M y, posteriormente, se produjeron cambios en la forma celular. Es bien sabido que las septinas y las forminas son las principales proteínas implicadas en la morfogénesis de las hifas y están implicadas en esculpir la forma de las células fúngicas filamentosas (Gladfelter 2006b, 2010), así como en la dinámica nuclear de las hifas (Kozubowski and Heitman 2010). El NaCl podría influir en la dinámica de expresión de estas proteínas ya que los requisitos de septación, polaridad de hifas, diámetro y apariencia morfológica, de todos los fenotipos fúngicos son controlados por septinas y forminas, y fueron modificados en condiciones hipersalinas en *A. sydowii* EXF-12860. Estas proteínas han sido reconocidas como componentes clave para la morfogénesis hifal en *Aspergillus* (Lindsey et al. 2010b). Por ejemplo, los genes que codifican para los septinas en *A. nidulans* (*aspA-E*) se han relacionado con el patrón de ramificación de las hifas y el desarrollo de conidióforos (Gladfelter 2006b), mientras que los genes ortólogos de septin en *A. fumigatus*, *aspA*, *aspB*, *aspC* y *aspE*, coordinan distancias interseptales en los compartimentos hifales apical y subapical (Vargas-Muñiz et al. 2015a). *SepA*, un homólogo de formin de *A. nidulans*, se relacionó con la septación y el diámetro de las hifas (Gladfelter 2006b).

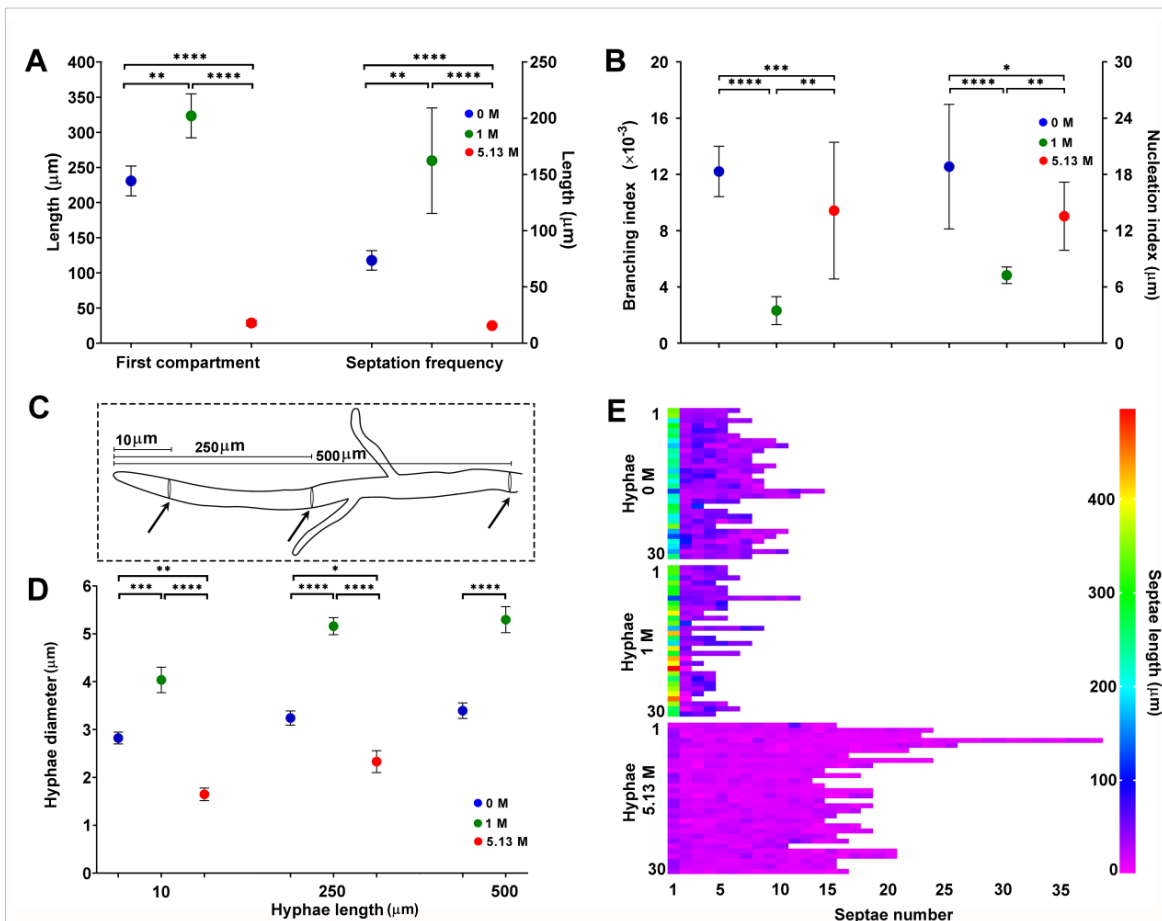


Figura 2. Cuantificación de descriptores morfológicos de cultivos de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 cultivados en medio de agar de malta de levadura a concentraciones de NaCl 0 M, 1,0 M y 5,13 M después de 10 días de cultivo a 28°C. A) Longitud del primer compartimento hifal y frecuencia de septación. B) Índice de ramificación e índice de nucleación. C) Representación metodológica de cómo se midieron los diámetros de las hifas. Las flechas negras indican las distancias desde las puntas de las hifas donde se midieron los diámetros. E) Número de septos y longitud de septos para 30 hifas diferentes. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas determinadas por ANOVA de una vía y la prueba HSD de Tukey ($p < 0.05$).

Aunque no se ha explorado nada sobre el papel de la septina y la formina en los hongos halófilos, este estudio proporciona información morfológica interesante que sugiere que la expresión de la septina y la formina podría estar influenciada por la sal en *A. sydowii* EXF-12860 desde el crecimiento de las hifas, el patrón de hiperramificación y el número de septos se alteraron en condiciones hipersalinas.

3.2 Evaluación del crecimiento de *Aspergillus sydowii* EXF-12860

Con el objetivo de seleccionar el tiempo correcto para la extracción del ARN de *A. sydowii* en presencia de NaCl, se realizó una cinética de crecimiento durante seis días utilizando

las muestras de la condición óptima. La Figura 3 muestra el comportamiento del hongo en función de las mediciones del peso seco y húmedo. La conducta del peso seco resulta más estable en comparación con la del peso húmedo debido a que este último puede fluctuar por la presencia de agua en el micelio. La fase exponencial de crecimiento del hongo estuvo presente entre el día tres y el día seis de la cinética con un $R= 0.92$. Según la literatura el momento correcto para la extracción de ARN es en la mitad de la fase exponencial de crecimiento del hongo por lo que se escogió el día cuatro para realizar la extracción de ARN en ambas condiciones de estudio.

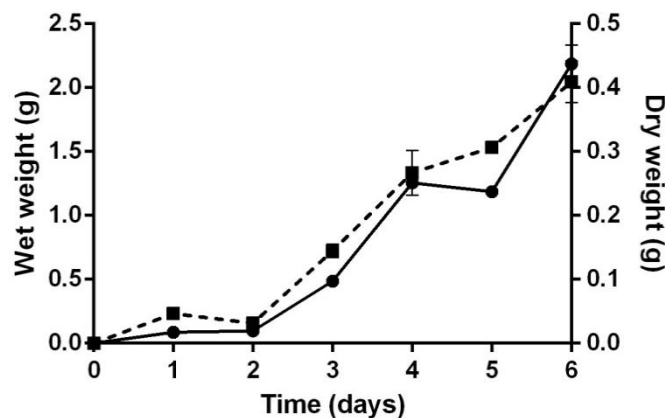


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en la condición óptima de crecimiento. Líneas con círculos: peso húmedo; Líneas con cuadrados: peso seco.

3.3 Extracción de ARN total en la condición óptima y la condición de estrés.

La extracción del ARN de *A. sydowii* en la CO se realizó mediante el kit Zymo Spin y para el caso de la CE se empleó el método tradicional con fenol ácido, pues con el kit no se logró obtener el ARN). Este segundo método se diferencia del kit pues incorpora dos rondas para precipitar la molécula de interés, en las cuales se trata con la solución desnaturalizante y con el fenol ácido el cual garantiza que el RNA se obtenga separado del DNA (Chomzynski 1987). Fue efectivo utilizar este método para obtener el ARN de *A. sydowii* crecido en medio YMB con 5.13M de NaCl considerando que una de los cambios morfológicos de este hongo filamentoso puede ser el engrosamiento de su PC, lo que pudiera tener una influencia negativa en la lisis celular química. Además este método incluye dos precipitaciones de ARN y propicia un medio más ácido para garantizar la extracción de la molécula de ARN totalmente independiente del ADN.

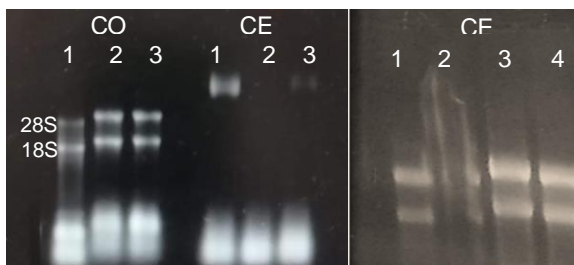


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% para analizar la integridad y pureza del ARN de *A. sydowii*. A: kit ZymoSpin para

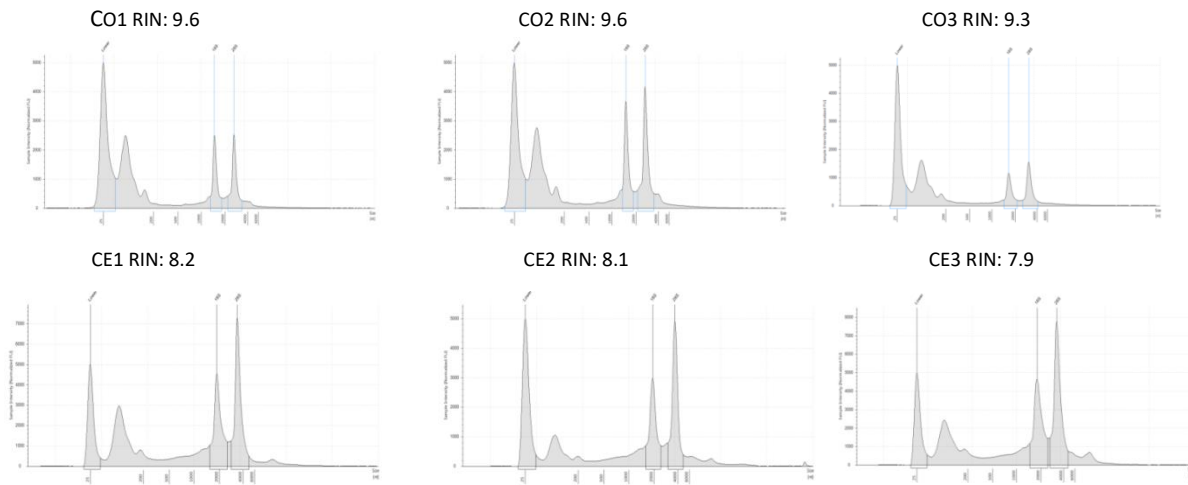


Figura 5. Electroferogramas correspondientes a la electroforesis capilar del ARN total de las réplicas de CO y CE.

La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose las bandas representativas del ARN total (Figura 4). Mediante electroforesis capilar se obtuvieron los RIN (RNA Integrity Number) para todas las réplicas los cuales cumplen con el requerimiento de ser mayores que 6 y lo más cercano a 10 posible. La Figura 5 muestra los electroferogramas correspondientes a todas las muestras donde los cuales presentan señales intensas y estrechas de los fragmentos 28S y 18S. Las réplicas de la CE presentan el pico correspondiente al fragmento 28S más grande con respecto al 18S, sin embargo este aspecto no es homogéneo para el caso de la réplicas de CO. Esta diferencia se puede deber a que las extracciones del ARN de la CE y la CO se realizaron con dos métodos diferentes.

3.4 Análisis de la calidad de la secuenciación *RNA-Seq*

En la tabla 3 se muestra las características de la secuenciación y en control de la calidad del ARN.

Tabla 2. Reporte de secuenciación y control de la calidad del ARN.

Condición	Identificador de Muestra	c(ARN) (ng/μL)	RIN	Total de lecturas de bases secuenciadas	Total lecturas	de Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)	AT (%)
NaCl 1M	licate 1	251.799	9.6	12,427,628,274	82,302,174	98.291	95.467	55.805	44.2
	Replicate 2	279.398	9.6	12,425,251,534	82,286,434	98.075	94.550	55.071	55.071
	Replicate 3	560.506	9.3	11,760,918,578	77,886,878	98.431	95.344	55.216	55.216
NaCl 5.13M	Replicate 1	63.05	8.2	11,904,515,350	78,837,850	98.36	95.38	53.43	46.57
	Replicate 2	208.574	8.1	11,916,204,562	78,915,262	98.39	95.35	53.53	46.47
	Replicate 3	101.0403	7.9	12,280,145,668	81,325,468	98.5	95.61	53.52	46.48

NaCl: concentración de cloruro de sodio (M) para las dos condiciones. RIN: número de integridad del ARN. Lecturas totales: número total de lecturas. Para la secuenciación paired-end de Illumina, este valor se refiere a la suma de la lectura 1 y la lectura 2. Q20 (%): Proporción de bases con puntuación de calidad phred superior a 20. Q30 (%): Proporción de bases con puntuación de calidad phred superior a 30. GC (%): contenido de GC. AT (%): contenido de AT.

El control de la calidad de las lecturas obtenidas mediante RNA-Seq efectuado mediante FastQC (Andrews 2010) involucra el análisis de varios módulos para detectar posibles errores en estas librerías. Entre los aspectos a evaluar se encuentran: la calidad de las secuencias crudas por base, el contenido de GC, la presencia de secuencias sobrerrepresentadas y duplicadas así como el contenido de k-meros.



Figura 6: Representación mediante MultiQC de la media de la calidad de las secuencias por posición de las lecturas.

La calidad media de la secuenciación (Figura 6) para ambas condiciones fue superior a 30 (escala Phred33: calidades de 0 a 41) por lo que no fue necesario cortar las secuencias

para eliminar regiones de baja calidad. No obstante, los resultados de este análisis mostraron varios módulos afectados por lo que se procedió a realizar un preprocesamiento de estas librerías con el objetivo de garantizar la mejor calidad de las lecturas para los pasos posteriores. Los aspectos corregidos fueron: el contenido de GC, el contenido de adaptadores, las secuencias sobrerrepresentadas y el contenido de k-meros. En la Figura 7 se observan las características de las librerías antes y después de preprocesamiento.

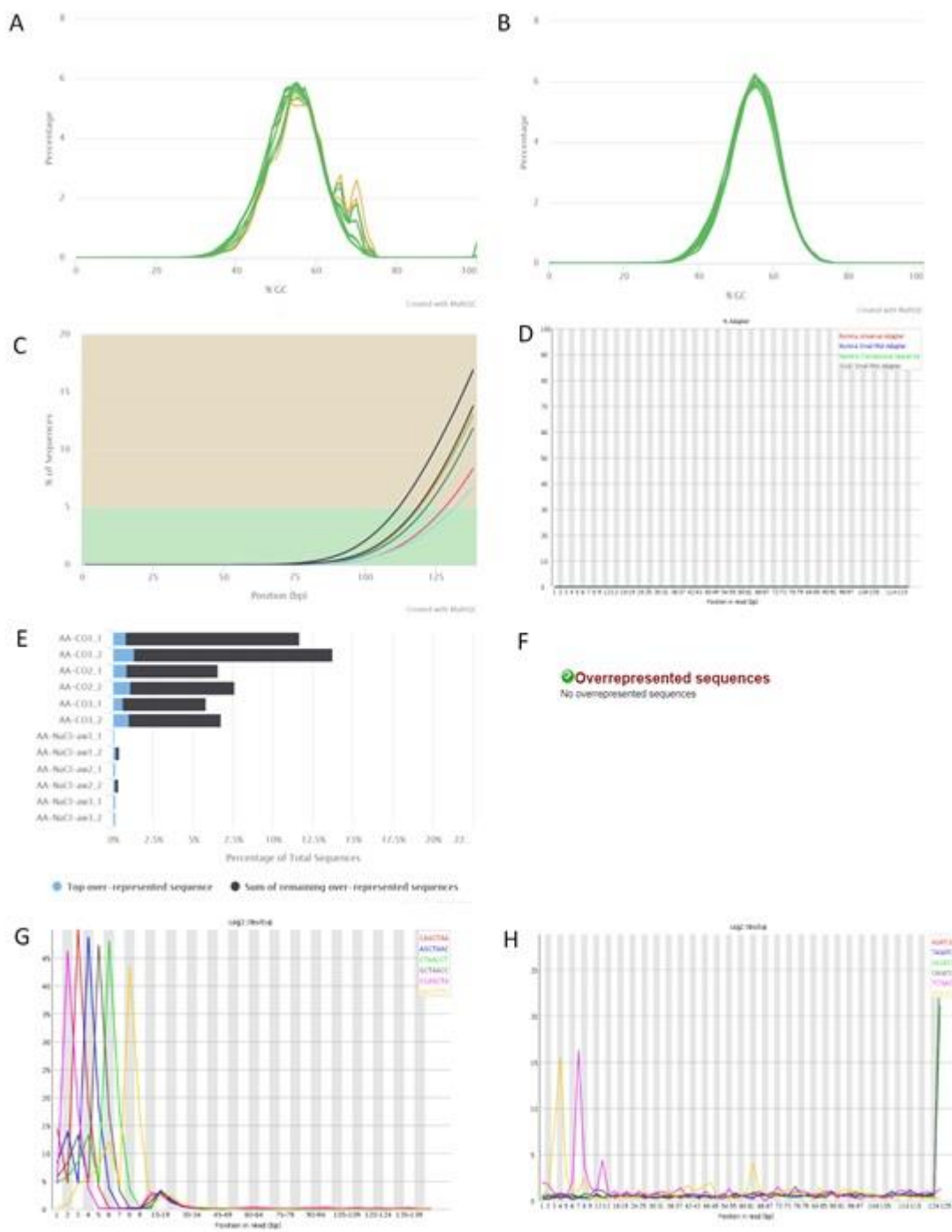


Figura 7. Análisis de la efectividad del preprocesamiento de las secuencias crudas de ARN de *Aspergillus sydowii* mediante MultiQC/FastQC. A y B: Contenido de GC de las secuencias crudas y procesadas respectivamente. C y D: Contenido de adaptadores de las secuencias crudas y procesadas respectivamente. E y F: Secuencias sobrerrepresentadas de las secuencias crudas y procesadas respectivamente. G y H: Contenido de kmeros de las secuencias crudas y procesadas respectivamente.

3.5 Ensamblaje de novo y expresión diferencial

Las lecturas preprocesadas y con la calidad requerida fueron ensambladas para producir unigenes usando el programa Trinity. El total de transcritos codificantes fue de 41 309, de los cuales 31 359 (76%) se anotaron funcionalmente mediante Blast e InterProScan contra la base de datos Uniprot_sprot en el programa Blast2GO donde el 50% de las bases ensambladas se encuentran en contigs de al menos 2930 bases de longitud. Los aspectos importantes de las características del transcriptoma se presentan en la tabla 2. Con el análisis de expresión diferencial realizada con el paquete EdgeR se obtuvieron 1138 transcritos regulados negativamente y 704 regulados positivamente a las 96 horas de exposición del hongo a 5,13M de NaCl. En la Figura

Tabla 3. Estadísticas del ensamblaje de novo del transcriptoma

Total Trinity genes	15379
Total Trinity transcripts	41,309
Median contig length	199
Average contig	2,533.09
Total assembled bases	104,639,553
Contig N10	8,012
Contig N20	6,403
Contig N30	5,387
Contig N40	4,540
Contig N50	3,782
Percent GC	51.02%
Total annotated sequences	31,359
Number of up-regulated transcripts	704
Number of down-regulated transcripts	1,138

Para el análisis de expresión diferencial se seleccionó el paquete EdgeR. Primeramente se aplicó un filtro para eliminar los transcritos con valores de expresión inferiores a 1

conteo por millón (CPM <1). Este primer paso potencia la fortaleza estadística de la predicción de genes diferencialmente expresados (Conesa et al. 2016). Los genes que tienen conteos muy bajos en todas las bibliotecas deben eliminarse antes del análisis posterior. Esto está justificado tanto por motivos biológicos como estadísticos. Desde el punto de vista biológico, un gen debe expresar un nivel mínimo antes de que sea probable que se traduzca en una proteína o se considere biológicamente importante. Desde un punto de vista estadístico, es muy poco probable que los genes con recuentos consistentemente bajos se evalúen como expresados con diferencias significativas porque los recuentos bajos no proporcionan suficiente evidencia estadística para realizar un juicio confiable. Por lo tanto, estos genes pueden eliminarse del análisis sin pérdida de información (Chen et al. 2016). Como regla general, se requiere que un gen tenga un recuento de al menos 10-15 en al menos algunas bibliotecas antes de que se considere expresado en el estudio. La normalización de los datos se realizó mediante el método TMM (del inglés Normalization by trimmed mean of M values) el cual calcula un conjunto de factores de normalización, uno para cada muestra, para eliminar los sesgos de composición entre bibliotecas (Robinson and Oshlack 2010). El producto de estos factores y el tamaño de la biblioteca definen el tamaño efectivo de la biblioteca, que reemplaza el tamaño original de la biblioteca en todos los análisis posteriores. En la Figura 8 A-B se refiere al efecto de la normalización en los datos en estudio. Se puede observar que las muestras poseen una buena distribución, que casi no cambia luego de la normalización. También se realizó el análisis MDS (Multidimensional Scaling). En el gráfico MDS, la distancia entre cada par de muestras se puede interpretar como el cambio de pliegue logarítmico principal entre las muestras para los genes que mejor distinguen ese par de muestras (Chen et al. 2016). En la Figura 8 C-D, se observa que las muestras de la condición estresante se agrupan entre ellas y se encuentran separadas de las réplicas de la condición óptima. Mientras que estas últimas se encuentran separadas entre ellas mismas más de lo esperado, lo cual puede ser resultado de algún fallo manual a la hora de la extracción del ARN. Para estudiar más de cerca los perfiles de expresión del set de transcritos se realizó un gráfico MD representado por el panel E de la Figura 8. Una gráfica MD visualiza el cambio de pliegue logarítmico ajustado por tamaño de biblioteca entre dos bibliotecas (la diferencia) frente a la expresión logarítmica promedio en esas bibliotecas (la media). En el panel E se puede observar que existen transcritos que después de la normalización tuvieron valores de cpm entre 0 y 1, los cuales no resultan de importancia para el estudio por sus bajos valores de abundancia.

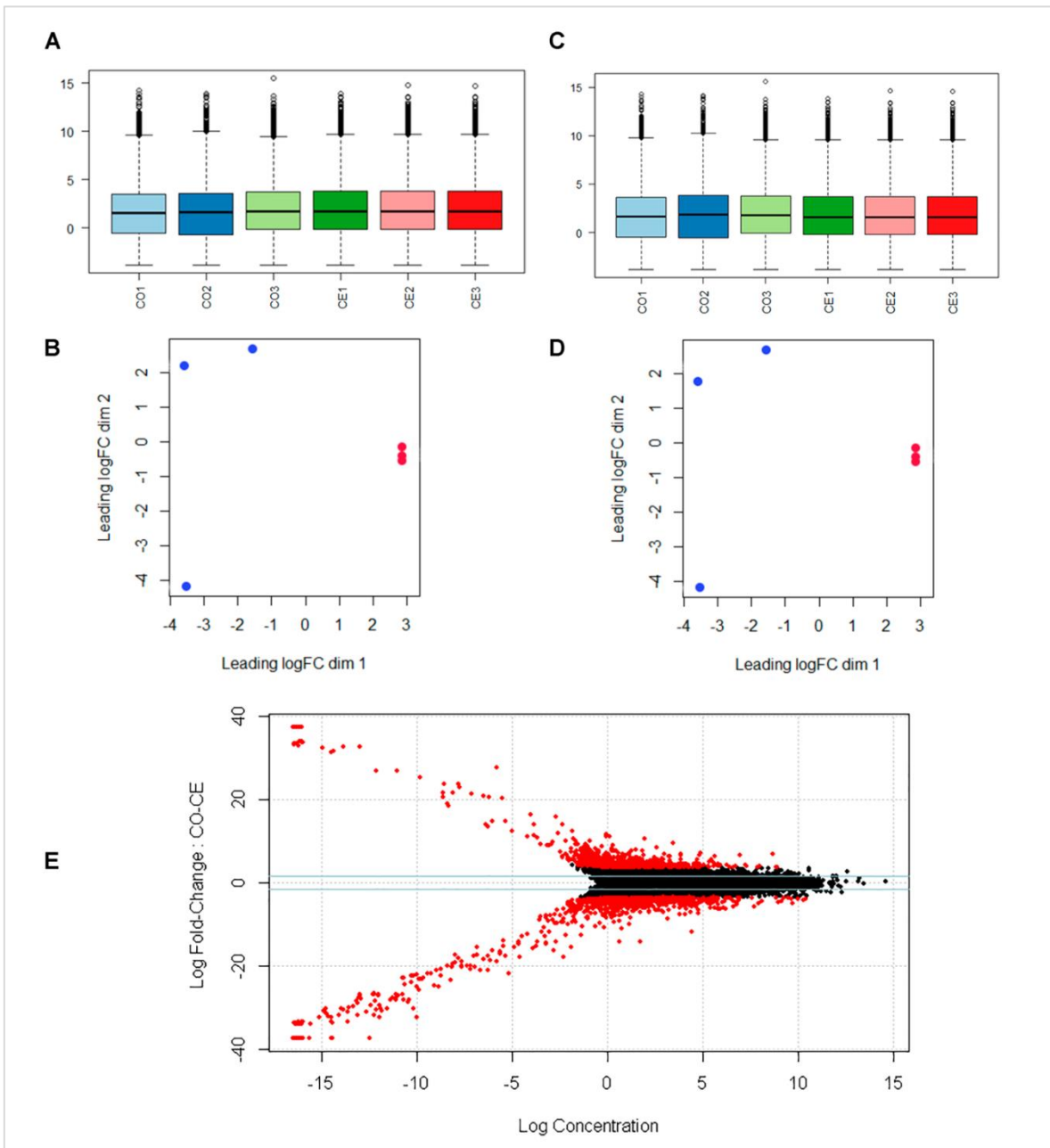


Figura 8. Resultados de la normalización mediante el método TMM y gráfico MDS para observar diferencias entre las librerías. A y B: sin normalización. C y D: después de la normalización. E: Gráfico MD para la expresión de los genes sobreexpresados (puntos rojos); la línea azul representa el valor establecido (LogFC = 1,5 y -1,5) para el estudio de expresión diferencial de genes.

3.6 Enriquecimiento de términos GO

En la Figura 9 se representan los resultados del análisis de enriquecimiento del conjunto de genes diferencialmente expresados en *A. sydowii* EXF-12860. Los genes sobreexpresados pertenecen en su mayoría a procesos biológicos enriquecidos que se

encuentran en gran medida relacionados con la organización o biogénesis de la pared celular del hongo, la biosíntesis de 1-3 β - glucano y otras macromoléculas de la pared celular.

El único GO enriquecido en la categoría de componente celular está relacionado con los componentes anclados a la membrana mientras que en función molecular los GO representativos se asocian a la actividad glucanosiltransferasa. Por otra parte, entre los procesos biológicos enriquecidos por el conjunto de genes regulados negativamente, resultan interesantes los relacionados con el metabolismo del nitrógeno, la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa NAD(P)⁺ y NAD⁺, transferencia de grupos aldehídos y cetónicos y el transporte nucleocitoplasmático.

El metabolismo del nitrógeno en hongos halófilos es un tema del cual no se cuenta con mucha información en comparación por ejemplo con los estudios en plantas en condiciones de alta salinidad, que son más amplios (Ashraf et al. 2018). La detección y absorción de nitrógeno son procesos esenciales para el crecimiento y desarrollo de hongos (Teichert et al. 2008). En los hongos, el metabolismo del nitrógeno está controlado por un circuito regulador genético complejo que asegura el uso preferencial de fuentes primarias de nitrógeno (amonio, glutamina y glutamato) y también confiere la capacidad de usar muchas fuentes secundarias de nitrógeno diferentes (nitrato, purinas, proteínas, péptidos, aminoácidos como histidina o prolina, amidas) cuando sea apropiado. El nitrato inorgánico sirve como una excelente fuente de nitrógeno para *Aspergillus*, *Neurospora* y muchas otras especies de hongos, pero en casi todos los casos no se utilizará a menos que las células carezcan de las fuentes primarias. Se han realizado estudios profundos del metabolismo del nitrógeno y su regulación con *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (Marzluf 1997).

En el transcriptoma de *A. sydowii* EXF-12860 en estudio se encontraron 24 genes diferencialmente expresados relacionados con el metabolismo del nitrógeno, 8 regulados positivamente y 16 regulados negativamente. Se encontró un transcrito descrito como factor de transcripción GATA regulado negativamente (LogFC = -9,14). Varios factores de transcripción pertenecientes a la familia GATA activan la transcripción de genes específicos cuando se ausentan las fuentes primarias de nitrógeno. Los miembros de esta familia incluyen *AreA* de *A. nidulans* y *Fusarium fujikuroi*, *NIT2* de *Neurospora crassa* y *Gln3p* de *S. cerevisiae* (Fu and Marzluf 1990; Kudla et al. 1990). También están regulados negativamente dos isoformas de un mismo transcrito para la glutamato deshidrogenasa

(NAD⁺) (LogFC = -11,72) y un transcrito para la glutamina sintetasa (LogFC = -7,42); estas enzimas están relacionadas con la síntesis de glutamato a partir de amonio y L-glutamina respectivamente. La glutamina sintetasa asimila el amonio en aminoácidos lo que ayuda a mantener una economía eficiente del nitrógeno, por lo que es una enzima clave para el metabolismo del nitrógeno (Canton et al. 2005). Esta enzima asimila el amonio derivado de la captación primaria de nitrógeno y de diversas vías internas de reciclaje de nitrógeno. La glutamato deshidrogenasa junto a la asparaginasa se han descrito como fuentes de amonio derivado del catabolismo de los aminoácidos (Bernard and Habash 2009). Además es necesaria para la expresión de una variedad de genes, incluidos los implicados en la biogénesis del ribosoma y el inicio de la traducción (Teichert et al. 2008).

La nitrato reductasa, enzima citoplasmática encargada de catalizar la reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ (Bonete et al. 2008), se pudo detectar en el transcriptoma, pero no de manera sobreexpresada, esto estuvo acompañado de una regulación negativa pronunciada de un transcrito que codifica para el factor de transcripción de asimilación de nitrógeno nirA (LogFC = -10,95). En *A. nidulans*, nirA se describe como el factor de transcripción específico de la vía de asimilación de nitratos y se acumula en el núcleo tras la inducción por nitrato (Bernreiter et al. 2007). Un total de 12 transcritos relacionados con la actividad de las permeasas de aminoácidos se encontraron regulados positivamente $3,9 < \text{LogFC} < 9,4$. La síntesis de estas proteínas y de otras enzimas catabólicas es esencial para el uso de aproximadamente todas las fuentes secundarias del nitrógeno como se ha comprobado en *A. nidulans* y *N. crassa* (Marzluf 1993). Las permeasas de aminoácidos son proteínas de membrana integrales involucradas en el transporte de aminoácidos al interior de la célula. También durante el estrés por altos niveles de NaCl, se ha descrito el aumento del catabolismo de los aminoácidos, para ser utilizados como fuente de nitrógeno (Bernard and Habash 2009).

Los resultados anteriores permiten analizar algunos aspectos del metabolismo del nitrógeno durante el crecimiento de *A. sydowii* EXF-12860 en concentraciones saturantes de NaCl. La regulación negativa de la expresión de los genes relacionados con la síntesis de la glutamina, apoyado por la no sobreexpresión de los niveles de nitrato reductasa, atribuyen un papel fundamental a la acumulación de amonio en estas condiciones. La acumulación de amonio en condiciones de salinidad ha sido descrita en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) y ha sido asociado a la inactivación de enzimas específicas involucradas

en la homeostasia del NH_4^+ (Wang et al. 2012). Entre estas enzimas se encuentran la glutamina sintasa y la glutamato deshidrogenasa, anteriormente mencionadas, las cuales pueden mantener las concentraciones de NH_4^+ bajo los niveles de toxicidad mediante su incorporación a los aminoácidos (Teixeira and Fidalgo 2009). Muchos estudios han informado que el estrés por sal puede inhibir la absorción de NO_3 debido a la competencia de transporte entre Cl^- y NO_3 , con la consiguiente disminución del contenido de NO_3 celular y la actividad de la nitrato reductasa, enzima que está presente en el transcriptoma de *A. sydowii*, mas no se encuentra en niveles sobreexpresados (Abouelsaad et al. 2016).

Finalmente, los efectos de la salinidad sobre el metabolismo del nitrógeno son muy complicados, ya que pueden reflejar interacciones osmóticas y / o específicas del NaCl en varios pasos de la asimilación del nitrógeno (Debouba et al. 2006). En el caso de *Aspergillus sydowii* EXF-12860, el análisis de los genes expresados infieren que el amonio puede estar acumulándose en la célula acompañado de un aumento del metabolismo de los aminoácidos, en función de mantener la homeostasis del nitrógeno.

Los procesos de biogénesis de la pared celular también se encuentran enriquecidos. Se obtuvieron transcritos asociados a la actividad glucanosiltransferasa regulados positivamente, mientras que transcritos responsables de la síntesis de quitina están regulados negativamente que concuerda con los resultados observados en el hongo halófilo *Aspergillus salisburgensis* (Tafer et al. 2019) .

Otro resultado curioso fue la presencia de varios GO enriquecidos por el conjunto de genes regulados negativamente, que están asociados los procesos metabólicos de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que es le enzima limitante de la velocidad en la vía de la síntesis del glicerol. Se encontraron 17 transcritos vinculados con esta actividad ($-4 < \text{LogFC} < -10$). Este resultado representa una diferencia importante pues lo que más se ha descrito es el aumento de la producción de glicerol en condiciones de baja actividad de agua (Pérez-Llano et al. 2020), aunque es aceptable un comportamiento diferente pues en este estudio se trabaja con concentraciones saturantes de NaCl. Se ha encontrado al glicerol y al eritritol como los solutos mayoritarios en altas salinidades en *Hortaea werneckii* (Kogej et al. 2007) (André et al. 1988).

Las actividades de transportadores enriquecidas funcionalmente corresponden al transporte nuclear y nucleocitoplasmático, aunque también se encontraron 8 transcritos codificantes para transportadores de sodio ($3 < \text{LogFC} < 10$) y 6 transcritos para transportadores de azúcares ($3,9 < \text{LogFC} < 12,2$) regulados positivamente.

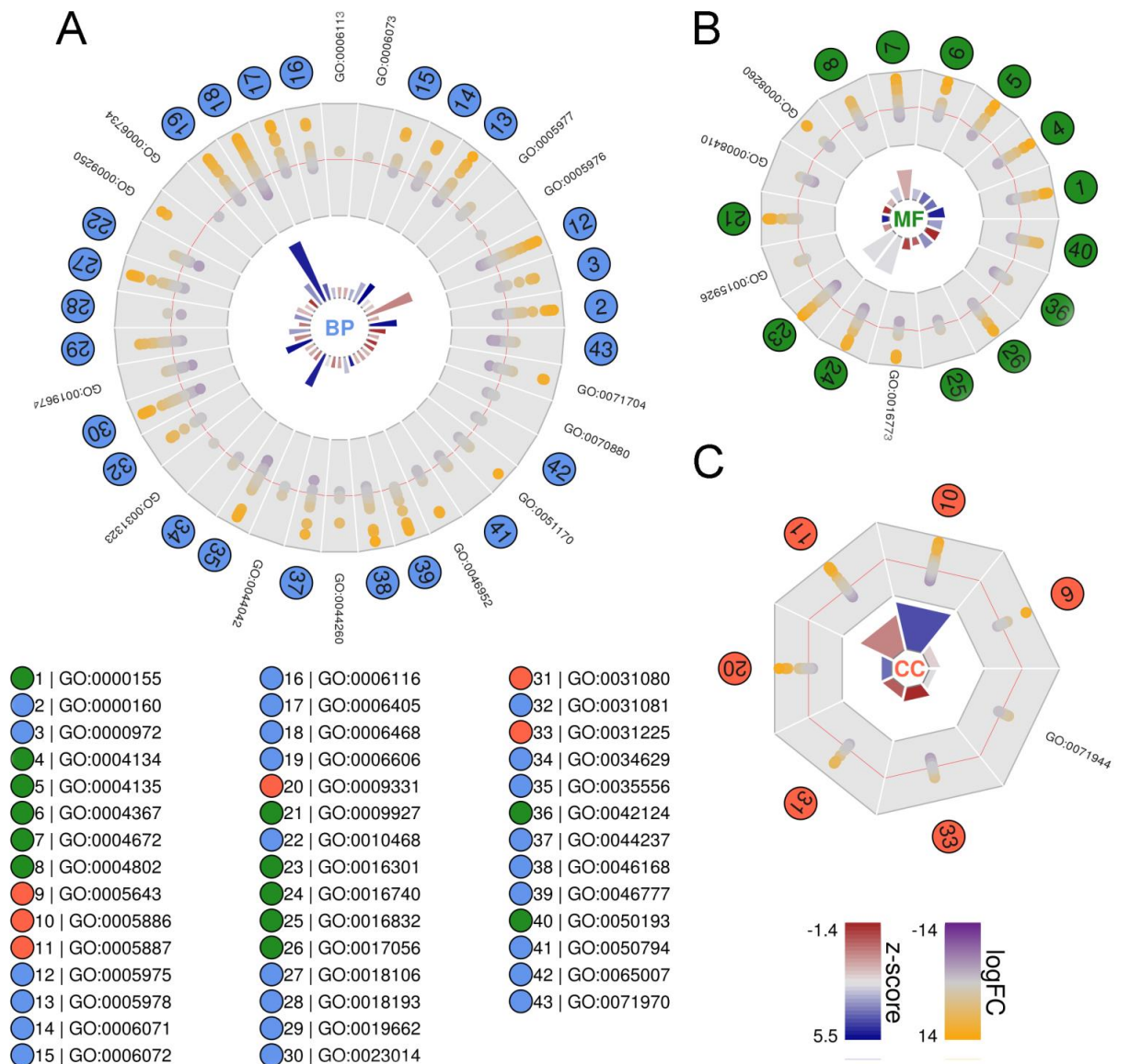


Figura 9. Visualización circular (GOCircle) representando los resultados del enriquecimiento en términos GO en el conjunto de genes diferencialmente expresados. A: Procesos biológicos B: Función molecular C: Componentes celulares. Línea roja representa $\text{logFC} = 0$. Puntos de grises a violeta (●) transcritos regulados negativamente ($\text{logFC} < 1,5$). Puntos naranjas (●) Transcritos regulados positivamente ($\text{logFC} > 1,5$). El tamaño de las barras del círculo interior representa el número de genes. El color de las barras del círculo interior representa el z-score.

Tabla 4. GO enriquecidos para las categorías de procesos biológicos, función molecular y componentes celulares. (Leyenda para la Figura 9)

Identificador de GO	Nombre de GO
PROCESOS BIOLÓGICOS	
GO:0000160	sistema de transducción de señales de fósforo
GO:0000972	Anclaje dependiente de la transcripción del ADN del gen de la ARN polimerasa II en la periferia nuclear
GO:0005975	proceso metabólico de carbohidratos
GO:0005978	proceso biosintético de glucógeno
GO:0006071	proceso metabólico del glicerol
GO:0006072	proceso metabólico de glicerol-3-fosfato
GO:0006116	Oxidación de NADH
GO:0006405	Exportación de ARN del núcleo
GO:0006468	fosforilación de proteínas
GO:0006606	importación de proteínas al núcleo
GO:0010468	regulación de la expresión génica
GO:0018106	fosforilación de peptidil-histidina
GO:0018193	modificación de peptidil-aminoácidos
GO:0019662	fermentación no glucolítica
GO:0023014	transducción de señales por fosforia de proteínas
GO:0031081	distribución de poros nucleares
GO:0034629	localización compleja que contiene proteínas celulares
GO:0035556	transducción de señales intracelulares
GO:0044237	proceso metabólico celular
GO:0046168	proceso catabólico de glicerol-3-fosfato
GO:0046777	autofosforilación de proteínas

GO:0050794	regulación del proceso celular
GO:0065007	regulación biológica
GO:0071970	Proceso biosintético de la pared celular de tipo fúngico (1-> 3)-beta-D-glucano

FUNCIÓN MOLECULAR

GO:0000155	actividad quinasa del sensor de fosforo
GO:0004134	Actividad 4-alfa-glucanotransferasa
GO:0004135	actividad amilo-alfa-1,6-glucosidasa
GO:0004367	Actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD +]
GO:0004672	actividad de la proteína quinasa
GO:0004802	actividad transcetolasa
GO:0009927	actividad quinasa de histidina fosfotransfer
GO:0016301	actividad quinasa
GO:0016740	actividad transferasa
GO:0016832	actividad de aldehído liasa
GO:0017056	constituyente estructural del poro nuclear
GO:0042124	Actividad 1,3-beta-glucanosiltransferasa
GO:0050193	actividad de la fosfocetolasa

COMPONENTES CELULARES

GO:0005643	poro nuclear
GO:0005886	membrana de plasma
GO:0005887	componente integral de la membrana plasmática
GO:0009331	complejo de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
GO:0031080	anillo exterior de poro nuclear
GO:0031225	componente anclado de la membrana

3.7 Defensas ante el estrés oxidativo inducido por NaCl en *Aspergillus sydowii* EXF-12860

Las condiciones de estrés, incluida la privación de agua por altas concentraciones de sal, producen daño oxidativo tanto en organismos procariontas como eucariotas (Sreenivasulu et al., 2004; (Hassan et al. 2020a; Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018). La relación entre la capacidad antioxidante de los hongos y su halotolerancia ha sido cuestionada recientemente a nivel genómico en el basidiomiceto halófilo *W. ichthyophaga*, y las levaduras negras halotolerantes *H. werneckii* y *A. pullulans* (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018); sin embargo, pocos trabajos centrados en el análisis de los sistemas de respuesta al estrés oxidativo en hongos halófilos se han publicado anteriormente (Petrovič 2006). En este trabajo se investigó la defensa antioxidante celular de *A. sydowii* EXF-12860 expuesta a concentraciones estresantes de NaCl. Los biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos relacionados directamente con la respuesta al estrés oxidativo se estudiaron en EXF-12860 crecido con 1,0 M y 5,13 M de NaCl (Figura 10A-I).

El glutatión reducido mostró niveles similares en los micelios de cultivos de hongos a NaCl 1,0 M (16,40 $\mu\text{g} / \text{ml}$) y NaCl 5,13 M (13,02 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (Figura 10A). Curiosamente, se encontró glutatión reducido extracelularmente en cultivos en 1M y 5.13M de NaCl, siendo sus valores de en sobrenadantes de cultivo de 21,45 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y 22,18 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas en las concentraciones de glutatión en las condiciones estudiadas. También se midió la actividad de la glutatión peroxidasa y se detectó una mayor actividad a 5,13 M de NaCl en las fracciones de micelio y sobrenadantes (Figura 10B). La actividad de la glutatión peroxidasa aumentó 7,7 y 1,2 veces en sobrenadantes y micelios, respectivamente, en cultivos en presencia de NaCl 5,13 M en comparación con cultivos con NaCl 1,0 M. Las actividades de catalasa y superóxido dismutasa también aumentaron significativamente en los cultivos bajo privación extrema de agua (NaCl 5,13 M) (Figura 10C y D). Mientras que la actividad de la catalasa mostró un aumento de dos veces tanto en el micelio como en los sobrenadantes a 5,13 M de NaCl, la superóxido dismutasa mostró un aumento más notable de aproximadamente 197 veces a 5,13 M de NaCl con respecto a los cultivos a la concentración de NaCl óptima. Curiosamente, no se detectó superóxido dismutasa en el micelio de las condiciones evaluadas.

Se estudiaron cinco biomarcadores metabólicos del estrés oxidativo pues se conoce que el anión superóxido (O_2^-) causa daño a todos los grupos principales de biomoléculas (Warris and Ballou 2019a). La concentración de hidroperóxidos se determinó como un

indicador directo de la oxidación de biomoléculas. Encontramos que la producción de hidroperóxidos fue dos veces mayor en la condición de estrés tanto para el micelio como para los sobrenadantes de *A. sydowii* EXF-12860 (Figura 10E). Se encontraron productos avanzados de oxidación proteica en los mismos niveles en ambas concentraciones de NaCl estudiadas (Figura 10F). El índice de peroxidación de lípidos fue similar en el micelio recolectado de ambas condiciones de sal (Figura 10G). Curiosamente, la peroxidación de lípidos se detectó en una proporción alta en el medio extracelular en ambas condiciones de NaCl. El malondialdehído es uno de los productos finales de la peroxidación de lípidos en células (Erdelmeier et al., 1998). De acuerdo con la proporción de peroxidación lipídica observada, se detectaron concentraciones más altas de malondialdehído en los sobrenadantes de *A. sydowii* (Figura 10H). Sin embargo, este biomarcador de estrés oxidativo se encontró exclusivamente en micelio cultivado en NaCl 5,13 M, lo que refleja que la peroxidación de lípidos se produce en condiciones extremadamente salinas. Finalmente, se cuantificaron 4-hidroxiálquenos y también alcanzaron su punto máximo en los sobrenadantes obtenidos de cultivos en NaCl 5,13 M (Figura 10I). Estos compuestos también son subproductos de la peroxidación de lípidos (Erdelmeier et al., 1998). Se encontraron 4-hidroxiálquenos en el micelio de EXF-12860 cultivado en ambas concentraciones de NaCl, pero sus niveles aumentaron dos veces en el medio de cultivo saturado de NaCl.

Nuestros resultados demuestran que los medios saturados de NaCl (5,13 M) promovieron el estrés oxidativo en *A. sydowii* EXF-12860, lo que resultó en una sólida defensa celular instalada para superar el daño inducido por la salinidad. Como sugieren nuestros datos, EXF-12860 lidera respuestas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas como estrategias adaptativas para contrarrestar la salinidad extrema (Figura 10A-D). La privación de agua por NaCl constituye un factor de estrés ambiental duro para los eucariotas (Gunde-Cimerman et al., 2018; Osman et al., 2020). Los hongos responden al estrés osmótico induciendo metabolitos antioxidantes como glutatión (respuesta antioxidante no enzimática) y enzimas (respuesta antioxidante enzimática) como catalasas, superóxido dismutasas y glutatión peroxidasas, entre otros (Vaupotic et al. 2008; Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018; Warris and Ballou 2019a)

A. sydowii EXF-12860 mostró un excelente equilibrio de glutatión en ambas condiciones estudiadas, lo que indica que este hongo era capaz de revertir la toxicidad del Na⁺ en concentraciones saturadas (Figura 10A). Aunque el glutatión intracelular mostró niveles

ligeramente más bajos con NaCl 5,13 M, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de glutatión en los micelios y los sobrenadantes obtenidos de ambas condiciones de salinidad. No fueron detectados grandes cambios en el glutatión reducido en cultivos expuestos a NaCl 1,0 M y 5,13 M. Esta es una señal de que EXF-12860 fue capaz de desencadenar una defensa exitosa contra el estrés oxidativo no enzimático. El glutatión es el antioxidante más abundante en la célula y el estrés oxidativo disminuye notablemente los niveles intracelulares de glutatión reducido (Morgan et al., 2011). También se encontró un aumento de los niveles de glutatión intracelular en bacterias halotolerantes cultivadas a altas concentraciones de NaCl (Hassan et al., 2020).

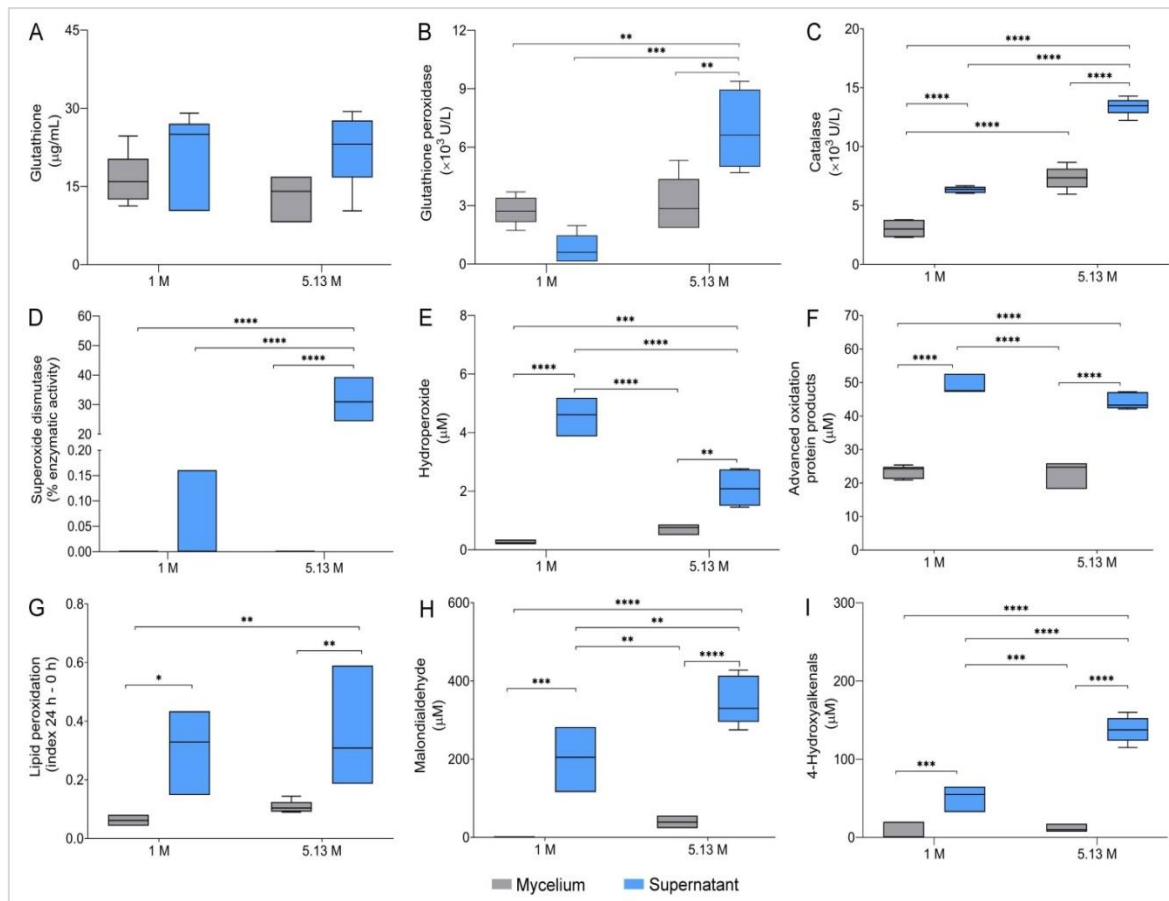


Figura 10. Respuestas al estrés oxidativo en *Aspergillus sydowii* EXF-12860. Se investigaron nueve biomarcadores de estrés oxidativo en micelio y sobrenadantes de cultivados de EXF-12860 con NaCl 1,0 M y 5,13 M: A) Concentración de glutatión; B, C y D) Actividad enzimática de la enzima glutatión peroxidasa, catalasas y superóxido dismutasas, respectivamente; E, F, G, H e I) Determinación de hidroperóxidos, productos avanzados de oxidación proteica, proporción de peroxidación lipídica, malondialdehído y 4-hidroxiálquenos, respectivamente. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas determinadas por ANOVA de una vía y la prueba HSD de Tukey ($p < 0.05$)

La actividad enzimática de las enzimas antioxidantes estudiadas como glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa mostró niveles más altos en NaCl 5,13 M (Figura 10B-D). Esta observación apoya que las condiciones extremadamente hipersalinas promovieron el estrés oxidativo en *A. sydowii* EXF-12860, que produjo una defensa enzimática antioxidante para mantener la homeostasis celular redox. Estas enzimas juegan un papel clave en la protección del daño oxidativo en los hongos porque limitan de manera eficiente el daño celular que pueden causar las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Warris y Ballou, 2018). Las ROS surgen principalmente como subproductos del metabolismo aeróbico del oxígeno en las mitocondrias e incluyen el $O_2^{\cdot-}$, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) (Schieber y Chandel, 2014). El $O_2^{\cdot-}$ debe convertirse inmediatamente en H_2O_2 mediante superóxido dismutasa. Luego, la desintoxicación del H_2O_2 se realiza mediante procesos de reducción mediados por catalasas y glutatión peroxidasa. El H_2O_2 también se puede reducir parcialmente a OH^{\cdot} , que tiene una reactividad extremadamente alta (Warris and Ballou 2019a). El desequilibrio entre la producción de ROS y la protección antioxidante desencadena la acumulación de ROS que resulta en estrés oxidativo con daño severo a los lípidos, proteínas y ADN. Sin embargo, un aumento en los niveles de ROS activa las vías de señalización para mantener el estado redox celular (Schieber and Chandel 2014).

Los marcadores de daño oxidativo estudiados en este trabajo revelaron que la exposición de *A. sydowii* EXF-12860 a una concentración saturada de Na^+ también indujo daños a biomoléculas como proteínas y lípidos (Figura 10E-I). En particular, nuestros resultados sugieren que la peroxidación de lípidos se promueve en NaCl 5,13 M porque la concentración de hidroperóxidos, malondialdehído y 4-hidroxiálquenos fue mayor a 5,13 M que a NaCl 1,0 M (Figura 10E, H e I). Además, los medios saturados de Na^+ potenciaron la relación de peroxidación de lípidos (Figura 10E) que ha sido bien documentada durante el estrés oxidativo (Busch y Binder, 2017). Se conoce que la oxidación de biomoléculas (p. Ej., lípidos) implica la formación continua de hidroperóxidos como productos de oxidación primaria, que se reducen mediante glutatión peroxidasa con glutatión como reductor (Dobarganes y Velasco, 2002). La peroxidación lipídica resulta en la generación de malondialdehído como uno de los productos finales (Busch and Binder 2017b), así como de 4-hidroxiálquenos que se consideran productos de peroxidación no enzimática de ácidos grasos poliinsaturados (Sasson et al., 2018). Por estas razones, estos subproductos de la peroxidación lipídica se utilizan habitualmente como biomarcadores de estrés oxidativo. En este contexto, en las especies de bacterias

halotolerantes *Planococcus*, *Bacillus haikouensis* y *Microcystis aeruginosa*, se encontraron elevaciones en los niveles de malondialdehído en condiciones de alta salinidad (Zhang et al., 2013; Hassan et al., 2020).

Por otro lado, las determinaciones de productos proteicos de oxidación avanzada mostraron un ligero aumento en la condición de NaCl 5.13 M. Las proteínas también se ven afectadas por ROS, particularmente aquellas con grupos protésicos Fe-S (Schieber and Chandel 2014). Las cisteínas son especialmente susceptibles a la oxidación por ROS, en particular los aniones tiolato (Cys-S⁻), la forma química de cisteína que se encuentra a pH neutro (Finkel, 2012). Por ejemplo, el H₂O₂ media la oxidación reversible de Cys-S⁻ a forma sulfénica (Cys-SOH) que actúa como una vía de señalización determinante para superar el estrés oxidativo. Sin embargo, niveles dañinos de H₂O₂ producen oxidación irreversible de Cys-S⁻ a especies sulfínicas (SO₂H) o sulfónicas (SO₃H) (Winterboum y Hampton 2008). Como estas transformaciones irreversibles de Cys-S⁻ implican daño proteico permanente, desencadenan la oxidación avanzada de proteínas (Schieber y Chandel, 2014). Teniendo esto en cuenta, nuestros resultados sugieren que el Na⁺ a una concentración saturada no provocó una oxidación proteica significativa en *A. sydowii* EXF-12860 ya que la cuantificación de los productos avanzados de la oxidación proteica fue similar en ambas condiciones de salinidad.

Actualmente hay muy poca literatura relacionada con las defensas oxidativas celulares de la exposición de hongos al estrés hipersalino (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018). Este es el primer estudio que investiga la respuesta celular adaptativa de diferentes biomarcadores de estrés oxidativo no enzimáticos y enzimáticos en hongos filamentosos halófilos. Estudios previos en la levadura negra halotolerante extrema *H. werneckii*, demostraron que el estrés oxidativo limitaba el crecimiento de la levadura en ambientes de alta salinidad (Petrovič 2006). En resumen, la exposición de *A. sydowii* EXF-12860 al estrés por salinidad provocó estrés oxidativo particularmente demostrado por el aumento en el nivel de enzimas antioxidantes y biomarcadores de peroxidación lipídica. Se evidencia que el ascomiceto halófilo EXF-12860 explotó sus sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos ante el estrés oxidativo celular para contrarrestar el daño oxidativo causado por el NaCl en concentraciones saturadas.

3.8 Expresión transcripcional de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo en *Aspergillus sydowii* EXF-12860

El estudio de los resultados transcriptómicos en función de analizar los niveles de transcripción de genes implicados en las defensas antioxidantes, arrojó un resultado de 44 genes expresados diferencialmente en el transcriptoma de *A. sydowii* EXF-12860 cultivado a 5,13 M frente a 1 M NaCl (Tabla 3). Mientras que siete transcripciones de catalasa (*cat*) se expresaron de manera diferencial, solo dos de ellas estaban fuertemente sobreexpresadas ($\log_{2}FC = 11.27$ y $\log_{2}FC = 10.73$). Curiosamente, todas las transcripciones de catalasa correspondían al mismo gen, lo que indica que la expresión preferencial de las transcripciones se produjo en la reprogramación transcripcional de *A. sydowii* EXF-12860 a alta salinidad. Además, diferentes isoformas de genes que codifican para superóxido dismutasas citoplasmáticas (*sod1*) y mitocondriales (*sod2*) y cistationina gamma-liasas (*cse*) se regularon positivamente. Estos resultados confirmaron que la expresión preferencial de ARNm empalmados alternativamente tuvo lugar en *A. sydowii* EXF-12860 a una concentración saturada de Na^{+} .

Además, genes que codifican glutatión-S-transferasa (*gst*), tiorredoxina (*trx*), glioxalasa (*gly*), aconitasa (*aco*), citocromo P450 (*cyp*) y succinil-CoA-3-cetoácido-coenzima A transferasa (*scot*) también se sobreexpresaron. Curiosamente, se encontraron genes *ish1* ($\log_{2}FC = 4.84$) y *oax* ($\log_{2}FC = 5.24$) regulados positivamente que codifican el sensor de respuesta al estrés y la enzima antioxidante auxiliar respectivamente.

Estos resultados también son una señal de que el estrés por salinidad 5.13. M NaCl resultó en estrés oxidativo en *A. sydowii* EXF-12860. Por tanto, este hongo halófilo regula positivamente la expresión transcripcional de diferentes genes implicados en el manejo de las defensas del estrés oxidativo. Nuestros resultados sugieren que la reprogramación transcripcional que se produjo durante la exposición a EXF-12860 a NaCl 5,13 M podría haber ayudado a superar el desequilibrio entre los niveles celulares de oxidantes (ROS) y antioxidantes. En este contexto, las catalasas, superóxido dismutasas y glutatión reductasas son enzimas con efectos antioxidantes que limitan el daño de las ROS (Sarikaya and Doğan 2020). Las glutatión reductasas y las glutatión-S-transferasas desempeñan un papel clave en el ciclo redox del glutatión, manteniendo niveles adecuados de glutatión reducido para conectarse con diferentes vías metabólicas de desintoxicación de ROS (Aktaş et al., 2005). El glutatión, reconocido como la molécula antioxidante más importante, es un tripéptido con funciones metabólicas cruciales que

incluyen desintoxicación de xenobióticos, biosíntesis de grupos de hierro-azufre, transporte de aminoácidos, preservación de niveles suficientes de cisteína y desintoxicación de peróxido, entre otros (Calabrese et al. 2017b). El glutatión reducido también sirve como puente con otros metabolismos de desintoxicación que reaccionan con hidroperóxidos o peróxidos de lípidos a través de la glutatión peroxidasa. Aunque los niveles de glutatión no cambiaron en gran medida con NaCl 5.13 M, la sobreexpresión del gen de la glutatión reductasa, que convierte el glutatión de la forma oxidada a la reducida (Couto et al. 2016b), sugiere que *A. sydowii* EXF-12860 instaló una respuesta transcriptómica para mantener niveles reducidos de glutatión en la célula fúngica. La glutatión peroxidasa no mostró un perfil transcriptómico expresado diferencialmente, probablemente porque los niveles de hidroperóxido fueron menores en la condición de 5.13 M que a 1 M NaCl (Figura 9E). Esta peroxidasa citosólica dependiente del glutatión reducido media la reducción de hidroperóxidos formados en las células

Otra defensa antioxidante que mostró genes sobreexpresados en *A. sydowii* EXF-12860 fue el sistema de tiorredoxina, que está íntimamente involucrado en la eliminación de ROS, particularmente de peróxido de hidrógeno H_2O_2 . Las tiorredoxinas detectan el estrés oxidativo que mantiene el estado redox relacionado con el tiol y también activan de manera importante proteínas de señalización como las peroxirredoxinas, quinasas y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Fujino et al. 2006a). Las peroxirredoxinas juegan un papel importante en el sistema de tiorredoxina estabilizando el equilibrio redox de la tiorredoxina (Matsuzawa 2017a). Además están involucradas en la señalización de información redox y controlan el metabolismo celular (Liebthal et al. 2018a). Los genes que codifican para peroxirredoxina, tiorredoxina reductasa y proteínas de la familia de tiorredoxina, todos implicados en el sistema de tiorredoxina, fueron regulados positivamente por *A. sydowii* EXF-12860 en 5,13 M de NaCl.

La cisteína es un aminoácido crucial para mantener la respuesta celular antioxidante pues interviene en la síntesis de glutatión (Matsuzawa 2017a). Por el contrario, la homocisteína, que es un derivado de la metionina, perturba la síntesis de proteínas, contribuye a la formación de ROS y promueve reacciones de hipermetilación en la célula, lo que podría alterar la expresión y regulación génica (Richard et al., 2018; (Esse et al. 2019b). Por lo tanto, durante el estrés oxidativo es crucial reducir de manera eficiente los niveles de homocisteína intracelular que se pueden condensar con una molécula de serina para formar cistationina mediante cistationina b-sintasa (CBS). La cistationina finalmente se

convierte en cisteína a través de la cistationina gamma-liasa (CSE) (Taysi et al. 2015a; Esse et al. 2019b). Encontramos que los genes *cbs* y *cse* fueron regulados positivamente por *A. sydowii* EXF-12860 durante el crecimiento en estrés de salinidad. Como era de esperar, los genes de homocisteína sintasa (CYSB) están regulados negativamente. Estos genes codifican enzimas que catalizan la conversión de O-acetil-L-homoserina en homocisteína en la vía de biosíntesis de metionina (Esse et al. 2019b). Los resultados obtenidos sugieren entonces que la síntesis de homocisteína está desactivada, mientras que la conversión de homocisteína en cisteína está activada transcripcionalmente. Esta estrategia también evidencia la defensa antioxidante de este hongo en condiciones hipersalinas.

El sistema glioxalasa también fue un punto de análisis en este trabajo. El papel de las glioxalosas se ha relacionado con la respuesta al estrés en eucariotas, lo que contribuye a conferir tolerancia a los factores de estrés ambientales (Sankaranarayanan et al. 2017a). Por ejemplo, se han propuesto como biomarcadores para la tolerancia al estrés abiótico en plantas (Kaur et al. 2014b). Sin embargo, las glioxalosas se relacionaron principalmente con la vía de desintoxicación del metilglioxal, un producto citotóxico de la glucólisis. Las glioxalosas catalizan la conversión de metilglioxal en D-lactato usando glutatión reducido como cofactor (Thornalley 1996). Se ha informado que varios estreses abióticos, incluida la salinidad y la privación de agua, aumentan las concentraciones intracelulares de metilglioxal, que es eliminado por las glioxalosas que codifican los genes *glyI* y *glyII* (Sankaranarayanan et al. 2017a). Las glioxalosas I median la combinación de metilglioxal con glutatión reducido para formar S-lactoilglutatión, que luego se convierte en D-lactato a través de las glioxalosas II que también regeneran el glutatión reducido (Crook and Law 1952a). También encontramos *glyI* regulado positivamente (S-D-lactoilglutatión liasa).

La transcripción de genes relacionados con la oxidación de lípidos también fue estudiada, por ser un proceso fuertemente inducido por el estrés oxidativo (Busch and Binder 2017b). Se expresaron diferencialmente cuatro transcritos del gen *scot* que codifica para succinil-CoA-3-cetoácido-coenzima A transferasa. Las cuatro isoformas de este gen (id de transcripción: DN1899) están reguladas negativamente. Las succinil-CoA-3-cetoácido-coenzima A transferasas son enzimas de la matriz mitocondrial con una función central en el catabolismo de cuerpos cetónicos. El vínculo entre los genes *scot* y el estrés oxidativo no se ha estudiado profundamente hasta la actualidad. En la bacteria *Burkholderia*

pseudomallei, un trabajo previo ha sugerido que los genes *scot* responden a ROS externos (Chutoam et al. 2013b). A pesar de que se planteó la hipótesis de que durante el estrés oxidativo son necesarias las succinil-CoA-3-cetoácido-coenzima A transferasas para transferir CoA de succinil-CoA a lípidos oxidados, los niveles de ARNm de genes *scot* se encontraron regulados negativamente en *B. pseudomallei*. La regulación transcripcional negativa de los genes *scot* puede reducir los niveles intracelulares de acetoacetil-CoA y la reducción de NADH y FADH₂, lo que resulta en una menor cantidad de ROS intracelulares (Chutoam et al. 2013b). Por tanto, puede esperarse que *A. sydowii* EXF-12860 también regule negativamente la transcripción de cuatro transcritos codificantes para transferasas de succinil-CoA-3-cetoácido-coenzima A en condiciones hipersalinas como se encontró en este transcriptoma.

Finalmente, el gen *aox* que codifica una oxidasa alternativa fue regulado positivamente en condición hipersalina (logFC = 5.25). Las oxidasas alternativas, que son sintetizadas por una gran variedad de plantas, hongos y algunos protistas, suponen una cadena respiratoria alternativa que confiere resistencia a diferentes estresores ambientales (McDonald 2008b); (Folgueira et al. 2020b). Estas enzimas permiten el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria de fosforilación oxidativa incluso en presencia de niveles tóxicos de ROS que inhiben los complejos III y IV. La actividad de las oxidasas alternativas es crucial cuando se produce una acumulación de O₂⁻ derivado del complejo III como consecuencia del estrés oxidativo (Warris and Ballou 2019a). Se sabe que los genes *aox* están relacionados con el desarrollo de hongos en condiciones de estrés (Lin et al., 2019; (Barsottini et al. 2020a). En *Candida albicans*, los oxidantes alternativos están íntimamente involucrados en el crecimiento de la levadura durante la exposición al fluconazol (Yan et al., 2009), mientras que estas enzimas son relevantes durante el crecimiento de *A. fumigatus* (Grahl et al. 2012); Kowalski et al. , 2016) y *Botrytis cinerea* (Lin et al., 2019) en condiciones hipóxicas. Además, los genes *aox* se han regulado positivamente en varios hongos como *A. niger*, *Yarrowia lipolytica* (Honda et al., 2012), *A. fumigatus* (Yukioka et al. 1998a), *Hansenula anomala* (Minagawa et al. 1992b), y *Paracoccidioides brasiliensis* (Martins et al. 2011b) en respuesta al estrés oxidativo o la privación de agua.

Nuestros resultados son consistentes con los reportados por (Petrovič 2006) quien estudió la respuesta transcripcional en la levadura halotolerante *H. werneckii* durante su crecimiento en condiciones hipersalinas. En *H. werneckii*, la expresión de genes que

codifican la aconitasa y la proteína del racimo Fe-S (nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) deshidrogenasa) se incrementó al 17% NaCl. Además, estos genes se regularon positivamente en la transcripción en *A. sydowii* EXF-12860 a 5,13 M de NaCl. La aconitasa y la NADH deshidrogenasa funcionan como sensores de equilibrio redox mitocondrial y son uno de los principales objetivos moleculares de ROS (Bulteau et al. 2003a). Al mismo tiempo, la aconitasa, por ejemplo, es una enzima clave en el ciclo de Krebs, mientras que la NADH deshidrogenasa es un componente importante del complejo I para el flujo de electrones durante la respiración mitocondrial. Por lo tanto, pueden sobreexpresarse en condiciones de alta salinidad para mantener niveles fisiológicos suficientes de enzimas que mantienen encendido el ciclo de Krebs y preservan el papel de señalización como sensor de estado redox, o para apoyar la producción de ATP, respectivamente (Petrovič 2006). Se reportan resultados similares en el proteoma de *H. werneckii* expuesto a NaCl 3,0 y 4,5 M (Vaupotic et al. 2008).

Nuestros resultados son consistentes con los reportados por (Petrovič 2006) quien estudió la respuesta transcripcional en la levadura halotolerante *H. werneckii* durante su crecimiento en condiciones hipersalinas. En *H. werneckii*, la expresión de genes que codifican la aconitasa y la proteína del racimo Fe-S (nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) deshidrogenasa) se incrementó al 17% de NaCl. Además, estos genes se regularon positivamente en la transcripción en *A. sydowii* EXF-12860 a 5,13 M de NaCl.

La aconitasa y la NADH deshidrogenasa funcionan como sensores de equilibrio redox mitocondrial y son uno de los principales objetivos moleculares de ROS (Bulteau et al. 2003a). Al mismo tiempo, la aconitasa, por ejemplo, es una enzima clave en el ciclo de Krebs, mientras que la NADH deshidrogenasa es un componente importante del complejo I para el flujo de electrones durante la respiración mitocondrial. Por lo tanto, pueden sobreexpresarse en condiciones de alta salinidad para mantener niveles fisiológicos suficientes de enzimas que mantienen encendidos el ciclo de Krebs y preservan el papel de señalización como sensor de estado redox, o para apoyar la producción de ATP, respectivamente (Petrovič 2006). También se encontraron resultados similares en el proteoma de *H. werneckii* expuesto a NaCl 3,0 y 4,5 M (Vaupotic et al. 2008)

Nuestros resultados bioquímicos y transcriptómicos señalan que la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa actuaron juntas como un sistema de defensa antioxidante primario para proteger *A. sydowii* EXF-12860 contra moléculas de

peroxidante en condiciones de salinidad extrema. Este ascomiceto halófilo regula al alza bajo estrés de Na^+ un conjunto de genes que evidencia la explotación de una extensa respuesta antioxidante que también incluía los sistemas de glutatión, tioredoxina y glioxalasa. La Figura 10 representa un modelo celular con la defensa antioxidante de *A. sydowii* EXF-12860 a una concentración saturada de NaCl.

Tabla 5. Expresión transcriptómica de genes de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 relacionados con respuestas de estrés oxidativo inducidas por condición hipersalina.

Identificador de transcrito	Anotación	Identificador del gen	LogFC	FDR
TRINITY_DN892_c0_g1_i12	Catalase A	<i>catA</i>	11.27	4.46E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i4			10.73	6.37E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i3			-4.12	2.57E-03
TRINITY_DN892_c0_g1_i6			-5.08	2.69E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i11			-11.27	2.46E-08
TRINITY_DN892_c0_g1_i9			-11.94	2.53E-09
TRINITY_DN892_c0_g1_i10			-14.33	1.37E-11
TRINITY_DN1037_c0_g1_i5	Glyoxalase I	<i>gly1</i>	11.15	4.82E-04
TRINITY_DN1037_c0_g1_i4			10.4	9.77E-04
TRINITY_DN2716_c0_g2_i1			3.85	5.32E-02
TRINITY_DN1197_c0_g1_i1	Cystathionine gamma-lyase	<i>cth</i>	10.51	8.67E-04
TRINITY_DN1197_c0_g1_i7			7.2	3.63E-06
TRINITY_DN1197_c0_g1_i6			3.66	8.26E-03
TRINITY_DN2112_c0_g1_i19	Cytochrome P450 alkane hydroxylase	<i>cyp</i>	9.84	9.10E-07
TRINITY_DN3588_c0_g1_i1	Cytochrome P450	<i>cyp</i>	6.65	4.76E-06
TRINITY_DN2010_c0_g1_i16			4.89	3.88E-04
TRINITY_DN2010_c0_g1_i10			4.65	7.22E-04
TRINITY_DN312_c0_g1_i9			-4.57	1.59E-03
TRINITY_DN312_c0_g1_i2			-3.67	8.32E-03
TRINITY_DN4029_c0_g1_i2	Aconitate hydratase	<i>aco1</i>	8.88	7.12E-06
TRINITY_DN1574_c0_g1_i2	Alternative oxidase-domain-containing protein	<i>aox</i>	5.25	1.47E-04
TRINITY_DN1793_c0_g1_i1	Fe-S cluster assembly protein dre2	<i>dre2</i>	5.24	1.51E-04
TRINITY_DN10053_c1_g1_i1	Peroxirredoxin 6	<i>prdx6</i>	5.2	1.89E-04
TRINITY_DN2598_c0_g1_i4	Cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase	<i>sod1</i>	5.01	2.74E-04
TRINITY_DN2598_c0_g1_i3			4.38	1.66E-03
TRINITY_DN1168_c0_g2_i5	Stress response protein putative	<i>ish1</i>	4.84	8.67E-04
TRINITY_DN681_c0_g1_i14	Glutaredoxin/glutathione-dependent peroxiredoxin	<i>prx1</i>	4.73	7.03E-04
TRINITY_DN1443_c0_g1_i3	Tiorredoxin-like protein	<i>trx</i>	4.39	1.36E-03
TRINITY_DN1443_c0_g1_i3			-5.45	2.93E-04
TRINITY_DN2569_c2_g2_i1	Glutathione S-transferase	<i>gst</i>	4.19	2.90E-03
TRINITY_DN9329_c0_g1_i1			-4.15	5.47E-03
TRINITY_DN473_c0_g1_i3			-10.53	1.67E-07
TRINITY_DN902_c0_g1_i5	Superoxide dismutase [Mn] mitochondrial	<i>sod2</i>	4.21	3.20E-03
TRINITY_DN902_c0_g1_i4	Superoxide dismutase Fe-Mn family	<i>sod2</i>	3.65	7.90E-03
TRINITY_DN2375_c0_g1_i2	MAP kinase kinase kinase	<i>ask1</i>	-3.8	5.87E-03
TRINITY_DN38_c0_g1_i5	Homocysteine synthase	<i>cysD</i>	-3.84	7.67E-03
TRINITY_DN50_c0_g1_i16			-6.25	8.00E-05
TRINITY_DN1899_c0_g1_i4	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	<i>scot</i>	-4.23	2.02E-03
TRINITY_DN1899_c0_g1_i2			-5.14	2.47E-04
TRINITY_DN1899_c0_g1_i5			-9.54	1.81E-06
TRINITY_DN1899_c0_g1_i6			-9.57	1.71E-06
TRINITY_DN298_c0_g1_i11	Glyoxalase II (Hydroxyacylglutathione hydrolase)	<i>gly2</i>	-4.45	1.78E-03
TRINITY_DN1341_c0_g1_i2	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	<i>ipda</i>	-8.91	9.70E-06

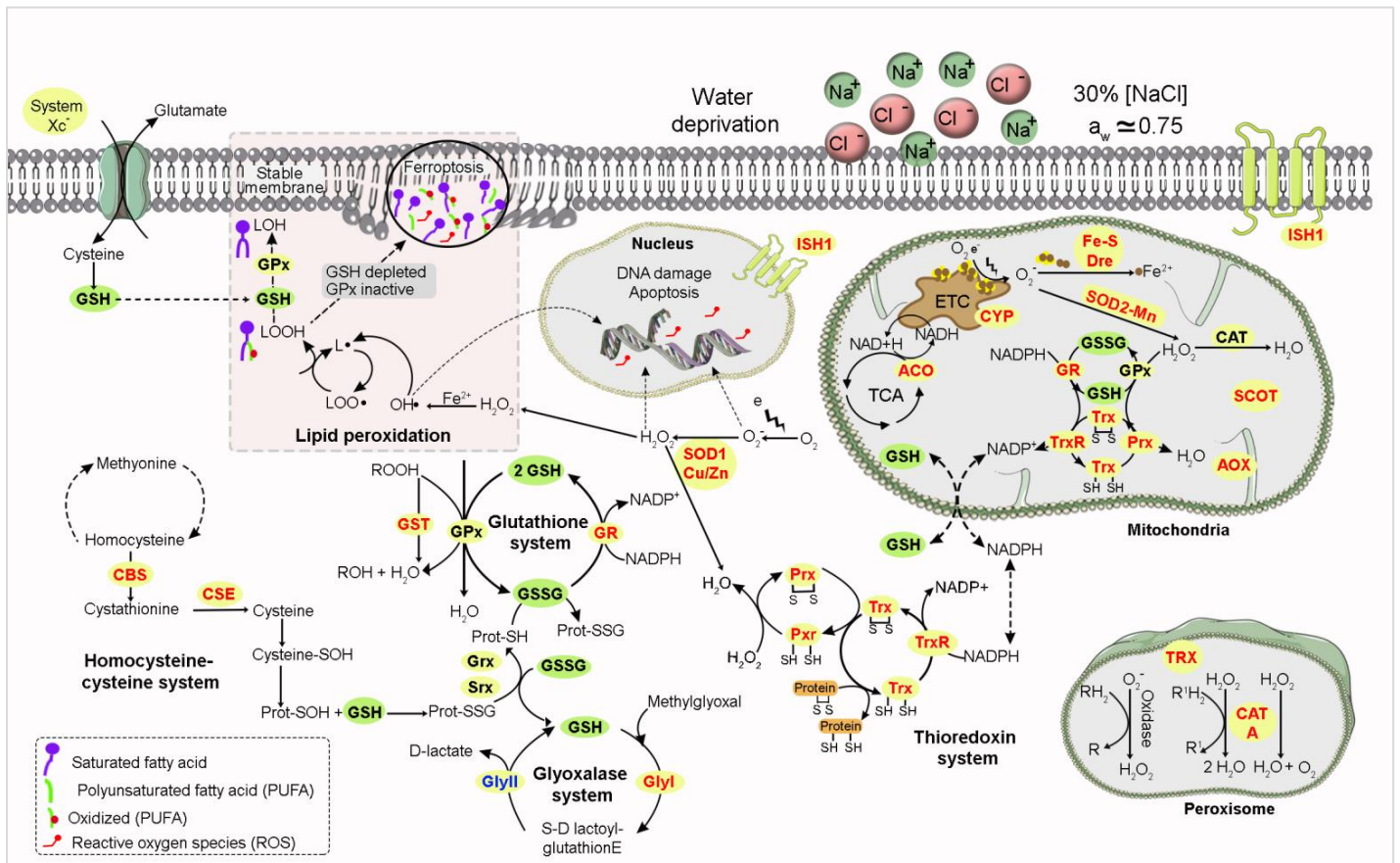


Figura 11. El modelo de defensa antioxidante celular de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 a concentración saturada de NaCl.

Conclusiones

1. Las concentraciones saturantes de NaCl influyen en la expresión diferencial de genes para responder al estrés por salinidad.
2. La morfología de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 presenta diferencias estadísticamente significativas al comparar el desarrollo de estructuras como las hifas, los septos y los núcleos en la condición de estrés en comparación con la condición óptima. El índice de nucleación y la longitud septal disminuyen, mientras que las ramificaciones aumentan.
3. Las concentraciones saturantes de NaCl, producen estrés oxidativo en el hongo, el cual responde con varios sistemas de defensas reportados también en otros hongos.
4. Enzimas claves en el metabolismo del nitrógeno y del glicerol se encuentran reguladas negativamente en *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en concentraciones saturantes de NaCl, lo cual es novedoso y a la vez controversial con lo reportado hasta el momento sobre la respuesta de hongos halotolerantes y halófilos en condiciones de salinidad.

Referencias Bibliográficas

- Abouelsaad, I., D. Weihrauch, and S. Renault. 2016. Effects of salt stress on the expression of key genes related to nitrogen assimilation and transport in the roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative. *Scientia Horticulturae* 211:70-78.
- Adler, L., A. Pedersen, and I. Tunblad-Johansson. 1982. Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. *Physiologia plantarum* 56 (2):139-142.
- Aktaş, M., Değirmenci, U., Ercan, SK, Tamer, L. y Atik, U. Aktap M, Değirmenci U, Ercan SK, Tamer L, Atik U. . 2005. The Comparison of Spectrophotometric and HPLC Methods in Reduced Glutathione Measurements. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 3:95-99.
- Al-Shahrour, F., R. Díaz-Uriarte, and J. Dopazo. 2004. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 20 (4):578-580.
- André, L., A. Nilsson, and L. Adler. 1988. The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* 134 (3):669-677.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data: Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Appels, F. V., J. Dijksterhuis, C. E. Lukasiewicz, K. M. Jansen, H. A. Wösten, and P. Krijgsheld. 2018. Hydrophobin gene deletion and environmental growth conditions impact mechanical properties of mycelium by affecting the density of the material. *Scientific reports* 8 (1):1-7.
- Ashraf, M., S. M. Shahzad, M. Imtiaz, and M. S. Rizwan. 2018. Salinity effects on nitrogen metabolism in plants—focusing on the activities of nitrogen metabolizing enzymes: A review. *Journal of Plant Nutrition* 41 (8):1065-1081.
- Avron, M., and A. Ben-Amotz. 1978. Production of glycerol from algae: Google Patents.
- Ball, P., and J. E. Hallsworth. 2015. Water structure and chaotropicity: their uses, abuses and biological implications. *Physical Chemistry Chemical Physics* 17 (13):8297-8305.
- Barsottini, M. R., A. Copsey, L. Young, R. M. Baroni, A. T. Cordeiro, G. A. Pereira, and A. L. Moore. 2020a. Biochemical characterization and inhibition of the alternative oxidase enzyme from the fungal phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Communications biology* 3 (1):1-9.
- Barsottini, M. R. O., A. Copsey, L. Young, R. M. Baroni, A. T. Cordeiro, G. A. G. Pereira, and A. L. Moore. 2020b. Biochemical characterization and inhibition of the alternative oxidase enzyme from the fungal phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Commun Biol* 3 (1):263.
- Batista-García, R. A., E. Balcázar-López, E. Miranda-Miranda, A. Sánchez-Reyes, L. Cuervo-Soto, D. Aceves-Zamudio, K. Atriztán-Hernández, C. Morales-Herrera, R. Rodríguez-Hernández, and J. Folch-Mallol. 2014. Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS One* 9 (8):e105893.
- Bernard, S. M., and D. Z. Habash. 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* 182 (3):608-620.
- Bernreiter, A., A. Ramon, J. Fernández-Martínez, H. Berger, L. Araújo-Bazan, E. A. Espeso, R. Pachlinger, A. Gallmetzer, I. Anderl, C. Scazzocchio, and J. Strauss. 2007. Nuclear Export of the Transcription Factor NirA Is a Regulatory Checkpoint

- for Nitrate Induction in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and cellular biology* 27 (3):791-802.
- Blomberg, A., and L. Adler. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. In *Advances in microbial physiology*: Elsevier, 145-212.
- Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014a. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15):2114-2120.
- Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014b. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15):2114-2120.
- Bonete, M. J., R. M. Martínez-Espinosa, C. Pire, B. Zafrilla, and D. J. Richardson. 2008. Nitrogen metabolism in haloarchaea. *Saline systems* 4 (1):1-12.
- Boylan, M., P. Mirabito, C. e. a. Willett, C. Zimmerman, and W. Timberlake. 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Molecular and cellular biology* 7 (9):3113-3118.
- Bracken-Grissom, H. D., D. M. DeLeo, M. L. Porter, T. Iwanicki, J. Sickles, and T. M. Frank. 2020. Light organ photosensitivity in deep-sea shrimp may suggest a novel role in counterillumination. *Scientific reports* 10 (1):1-10.
- Bray, N. L., H. Pimentel, P. Melsted, and L. Pachter. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology* 34 (5):525-527.
- Brock, T. 1979. Ecology of saline lakes. *Strategies of microbial life in extreme environments. Dahlem Konferenzen, Berlin*:29-47.
- Brown, A. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological reviews* 40 (4):803.
- . 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. In *Advances in microbial physiology*: Elsevier, 181-242.
- Brown, A., and J. R. Simpson. 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Microbiology* 72 (3):589-591.
- Bulteau, A.-L., M. Ikeda-Saito, and L. I. Szveda. 2003a. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 42 (50):14846-14855.
- Bulteau, A. L., M. Ikeda-Saito, and L. I. Szveda. 2003b. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 42 (50):14846-14855.
- Busch, C. J., and C. J. Binder. 2017a. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862 (4):398-406.
- Busch, C. J., and C. J. Binder. 2017b. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862 (4):398-406.
- Calabrese, G., B. Morgan, and J. Riemer. 2017a. Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. *Antioxid Redox Signal* 27 (15):1162-1177.
- Calabrese, G., B. Morgan, and J. Riemer. 2017b. Mitochondrial glutathione: regulation and functions. *Antioxidants & Redox Signaling* 27 (15):1162-1177.
- Canton, F. R., M. F. Suárez, and F. M. Canovas. 2005. Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research* 83 (2):265-278.
- Conesa, A., P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomez-Cabrero, A. Cervera, A. McPherson, M. W. Szczesniak, D. J. Gaffney, L. L. Elo, and X. Zhang. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology* 17 (1):13.
- Couto, N., J. Wood, and J. Barber. 2016a. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med* 95:27-42.
- Couto, N., J. Wood, and J. Barber. 2016b. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine* 95:27-42.
- Crook, E., and K. Law. 1952a. Glyoxalase: the role of the components. *Biochemical Journal* 52 (3):492-499.

- Crook, E. M., and K. Law. 1952b. Glyoxalase; the role of the components. *Biochem J* 52 (3):492-499.
- Chen, Y., A. T. Lun, and G. K. Smyth. 2016. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Research* 5.
- Chomzynski, P. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Chutoam, P., V. Charoensawan, P. Wongtrakoongate, A. Kum-Arth, P. Buphamalai, and S. Tungpradabkul. 2013a. RpoS and oxidative stress conditions regulate succinyl-CoA: 3-ketoacid-coenzyme A transferase (SCOT) expression in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol Immunol* 57 (9):605-615.
- Chutoam, P., V. Charoensawan, P. Wongtrakoongate, A. Kum-arth, P. Buphamalai, and S. Tungpradabkul. 2013b. Rpo S and oxidative stress conditions regulate succinyl-CoA: 3-ketoacid-coenzyme A transferase (SCOT) expression in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology and immunology* 57 (9):605-615.
- Daly, M. J. 2009. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nature Reviews Microbiology* 7 (3):237-245.
- DasSarma, S., and P. DasSarma. 2015. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Current opinion in microbiology* 25:120-126.
- Debouba, M., H. Gouia, A. Suzuki, and M. H. Ghorbel. 2006. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. *Journal of plant physiology* 163 (12):1247-1258.
- Diano, A., S. Bekker-Jensen, J. Dynesen, and J. Nielsen. 2006. Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnology and bioengineering* 94 (5):899-908.
- Dimić, G. R., S. D. Kocić-Tanackov, Ž. Maletić, and I. Z. Suturović. 2013. Effect of water activity on the growth of fungi isolated from „muesli“ components. *Acta Periodica Technologica* (44):31-37.
- Ding, X., K. Liu, Y. Lu, and G. Gong. 2019. Morphological, transcriptional, and metabolic analyses of osmotic-adapted mechanisms of the halophilic *Aspergillus montevidensis* ZYD4 under hypersaline conditions. *Applied microbiology and biotechnology* 103 (9):3829-3846.
- Dobarganes, M. C., & Velasco, J. . 2002. Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104:420-428.
- Ecobichon, D. 1984. Glutathione depletion and resynthesis in laboratory animals. *Drug and chemical toxicology* 7 (4):345-355.
- Erdelmeier, I., D. Gérard-Monnier, J.-C. Yadan, and J. Chaudiere. 1998. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology* 11 (10):1184-1194.
- Esse, R., M. Barroso, I. Tavares de Almeida, and R. Castro. 2019a. The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art. *Int J Mol Sci* 20 (4).
- Esse, R., M. Barroso, I. Tavares de Almeida, and R. Castro. 2019b. The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: State-of-the-art. *International journal of molecular sciences* 20 (4):867.
- Fedorova, N. D., N. Khaldi, V. S. Joardar, R. Maiti, P. Amedeo, M. J. Anderson, J. Crabtree, J. C. Silva, J. H. Badger, and A. Albarraq. 2008. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* 4 (4):e1000046.
- Finkel, T. 2012. From sulfenylation to sulphydration: what a thiolate needs to tolerate. *Sci Signal* 5 (215):pe10.

- Folgueira, I., J. Lamas, R. A. Sueiro, and J. M. Leiro. 2020a. Molecular characterization and gene expression modulation of the alternative oxidase in a scuticociliate parasite by hypoxia and mitochondrial respiration inhibitors. *Sci Rep* 10 (1):11880.
- Folgueira, I., J. Lamas, R. A. Sueiro, and J. M. Leiro. 2020b. Molecular characterization and gene expression modulation of the alternative oxidase in a scuticociliate parasite by hypoxia and mitochondrial respiration inhibitors. *Scientific reports* 10 (1):1-12.
- Freedman, A. 2016. Best Practices for De Novo Transcriptome Assembly with Trinity.
- Fu, Y.-H., and G. A. Marzluf. 1990. nit-2, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (14):5331-5335.
- Fujino, G., T. Noguchi, K. Takeda, and H. Ichijo. 2006a. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. Paper read at Seminars in cancer biology.
- Fujino, G., T. Noguchi, K. Takeda, and H. Ichijo. 2006b. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol* 16 (6):427-435.
- Galinski, E. A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. In *Advances in microbial physiology*: Elsevier, 273-328.
- Ge, Y., F. Yu, Y. Tan, X. Zhang, and Z. Liu. 2017. Comparative transcriptome sequence analysis of sporulation-related genes of *Aspergillus cristatus* in response to low and high osmolarity. *Current microbiology* 74 (7):806-814.
- Geiser, D. M., M. Klich, J. C. Frisvad, S. Peterson, J. Varga, and R. A. Samson. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59:1-10.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, and J. Gentry. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5 (10):R80.
- Gladfelter, A. S. 2006a. Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nat Rev Microbiol* 4 (3):223-229.
- Gladfelter, A. S. 2006b. Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nature Reviews Microbiology* 4 (3):223-229.
- . 2010. Guides to the final frontier of the cytoskeleton: septins in filamentous fungi. *Current opinion in microbiology* 13 (6):720-726.
- Gostinčar, C., and N. Gunde-Cimerman. 2018. Overview of oxidative stress response genes in selected halophilic fungi. *Genes* 9 (3):143.
- Gostinčar, C., M. Lenassi, N. Gunde-Cimerman, and A. Plemenitaš. 2011. Fungal adaptation to extremely high salt concentrations. In *Advances in applied microbiology*: Elsevier, 71-96.
- Götz, S., J. M. García-Gómez, J. Terol, T. D. Williams, S. H. Nagaraj, M. J. Nueda, M. Robles, M. Talón, J. Dopazo, and A. Conesa. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research* 36 (10):3420-3435.
- Grabherr, M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, and Q. Zeng. 2011a. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* 29 (7):644-652.
- Grabherr, M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B. W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, and A. Regev. 2011b. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29 (7):644-652.

- Grahl, N., T. M. Dinamarco, S. D. Willger, G. H. Goldman, and R. A. Cramer. 2012. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Molecular microbiology* 84 (2):383-399.
- Grahl, N., Dinamarco, T. M., Willger, S. D., Goldman, G. H., & Cramer, R. A. . 2012. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Molecular microbiology* 84:383-399.
- Grant, W. 2004. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359 (1448):1249-1267.
- Gunde-Cimerman, N., A. Plemenitaš, and A. Oren. 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS microbiology reviews* 42 (3):353-375.
- Haas, B. J., A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P. D. Blood, J. Bowden, M. B. Couger, D. Eccles, B. Li, and M. Lieber. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols* 8 (8):1494-1512.
- Hagiwara, D., K. Sakamoto, K. Abe, and K. Gomi. 2016. Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80 (9):1667-1680.
- Hallegraeff, G., F. Coman, C. Davies, A. Hayashi, D. McLeod, A. Slotwinski, L. Whittock, and A. J. Richardson. 2014. Australian dust storm associated with extensive *Aspergillus sydowii* fungal "bloom" in coastal waters. *Applied and environmental microbiology* 80 (11):3315-3320.
- Hallsworth, J. E. 2018. Stress-free microbes lack vitality. *Fungal biology* 122 (6):379-385.
- Hassan, A. H., D. H. M. Alkhalifah, S. A. Al Yousef, G. T. Beemster, A. S. Mousa, W. N. Hozzein, and H. AbdElgawad. 2020a. Salinity Stress Enhances the Antioxidant Capacity of *Bacillus* and *Planococcus* Species Isolated From Saline Lake Environment. *Frontiers in microbiology* 11:2191.
- Hassan, A. H. A., D. H. M. Alkhalifah, S. A. Al Yousef, G. T. S. Beemster, A. S. M. Mousa, W. N. Hozzein, and H. AbdElgawad. 2020b. Salinity Stress Enhances the Antioxidant Capacity of *Bacillus* and *Planococcus* Species Isolated From Saline Lake Environment. *Front Microbiol* 11:561816.
- Hickey, P. C., D. J. Jacobson, N. D. Read, and N. L. Glass. 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 37 (1):109-119.
- Hocking, A. 1993. Responses of xerophilic fungi to changes in water activity.
- Honda, Y., T. Hattori, and K. Kirimura. 2012. Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (*aox1*) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J Biosci Bioeng* 113 (3):338-342.
- Ide-Pérez, M. R., M. G. Fernández-López, A. Sánchez-Reyes, A. Leija, R. A. Batista-García, J. L. Folch-Mallol, and M. d. R. Sánchez-Carbente. 2020. Aromatic Hydrocarbon Removal by Novel Extremotolerant *Exophiala* and *Rhodotorula* Spp. from an Oil Polluted Site in Mexico. *Journal of Fungi* 6 (3):135.
- Jacobson, E. S., and R. Ikeda. 2005. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Medical Mycology* 43 (4):327-333.
- Katz, D., D. Goldstein, and R. Rosenberger. 1972. Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *Journal of bacteriology* 109 (3):1097-1100.

- Kaur, C., A. Ghosh, A. Pareek, S. K. Sopory, and S. L. Singla-Pareek. 2014a. Glyoxalases and stress tolerance in plants. *Biochem Soc Trans* 42 (2):485-490.
- Kaur, R., J. Kaur, J. Mahajan, R. Kumar, and S. Arora. 2014b. Oxidative stress—implications, source and its prevention. *Environmental Science and Pollution Research* 21 (3):1599-1613.
- Kelavkar, U., K. Rao, and H. Ghhatpar. 1993a. Sodium chloride stress induced morphological and ultrastructural changes in *Aspergillus repens*. *Indian journal of experimental biology* 31 (6):511-515.
- Kelavkar, U., K. S. Rao, and H. S. Ghhatpar. 1993b. Sodium chloride stress induced morphological and ultrastructural changes in *Aspergillus repens*. *Indian J Exp Biol* 31 (6):511-515.
- Kis-Papo, T., A. R. Weig, R. Riley, D. Peršoh, A. Salamov, H. Sun, A. Lipzen, S. P. Wasser, G. Rambold, and I. V. Grigoriev. 2014. Genomic adaptations of the halophilic Dead Sea filamentous fungus *Eurotium rubrum*. *Nature communications* 5 (1):1-8.
- Klich, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. *Centraalbureau voor schimmelcultures*.
- Knechtle, P., F. Dietrich, and P. Philippsen. 2003. Maximal polar growth potential depends on the polarisome component AgSpa2 in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Molecular biology of the cell* 14 (10):4140-4154.
- Kogej, T., A. A. Gorbushina, and N. Gunde-Cimerman. 2006. Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycological research* 110 (6):713-724.
- Kogej, T., M. Stein, M. Volkmann, A. A. Gorbushina, E. A. Galinski, and N. Gunde-Cimerman. 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology* 153 (12):4261-4273.
- Kowalski, C. H., S. R. Beattie, K. K. Fuller, E. A. McGurk, Y. W. Tang, T. M. Hohl, J. J. Obar, and R. A. Cramer, Jr. 2016. Heterogeneity among Isolates Reveals that Fitness in Low Oxygen Correlates with *Aspergillus fumigatus* Virulence. *mBio* 7 (5).
- Kozubowski, L., and J. Heitman. 2010. Septins enforce morphogenetic events during sexual reproduction and contribute to virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology* 75 (3):658-675.
- Krijgsheld, P., R. Bleichrodt, G. J. van Veluw, F. Wang, W. H. Müller, J. Dijksterhuis, and H. A. Wösten. 2013. Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 74 (1):1-29.
- Kudla, B., M. Caddick, T. Langdon, N. Martinez-Rossi, C. Bennett, S. Sibley, R. Davies, and H. Arst Jr. 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO journal* 9 (5):1355-1364.
- Kunčič, M. K., T. Kogej, D. Drobne, and N. Gunde-Cimerman. 2010. Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and environmental microbiology* 76 (1):329-337.
- Liebthal, M., D. Maynard, and K.-J. Dietz. 2018a. Peroxiredoxins and redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling* 28 (7):609-624.
- Liebthal, M., D. Maynard, and K. J. Dietz. 2018b. Peroxiredoxins and Redox Signaling in Plants. *Antioxid Redox Signal* 28 (7):609-624.
- Lin, Z., J. Wu, P. A. Jamieson, and C. Zhang. 2019. Alternative Oxidase Is Involved in the Pathogenicity, Development, and Oxygen Stress Response of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 109 (10):1679-1688.
- Lindsey, R., S. Cowden, Y. Hernández-Rodríguez, and M. Momany. 2010a. Septins AspA and AspC are important for normal development and limit the emergence of new

- growth foci in the multicellular fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 9 (1):155-163.
- Lindsey, R., S. Cowden, Y. Hernández-Rodríguez, and M. Momany. 2010b. Septins AspA and AspC are important for normal development and limit the emergence of new growth foci in the multicellular fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell* 9 (1):155-163.
- Lindsey, R., Y. Ha, and M. Momany. 2010c. A septin from the filamentous fungus *A. nidulans* induces atypical pseudohyphae in the budding yeast *S. cerevisiae*. *PLoS One* 5 (3):e9858.
- Littlejohn, K. A., P. Hooley, and P. W. Cox. 2012. Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloids* 27 (2):503-516.
- Liu, K.-H., X.-W. Ding, M. P. Narsing Rao, B. Zhang, Y.-G. Zhang, F.-H. Liu, B.-B. Liu, M. Xiao, and W.-J. Li. 2017a. Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress. *Frontiers in microbiology* 8:1789.
- Liu, S., J. Li, Y. Wu, Y. Ren, Q. Liu, Q. Wang, X. Zhou, M. Cai, and Y. Zhang. 2017b. De novo transcriptome sequencing of marine-derived *Aspergillus glaucus* and comparative analysis of metabolic and developmental variations in response to salt stress. *Genes & Genomics* 39 (3):317-329.
- Lockhart, D. J., and E. A. Winzeler. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405 (6788):827-836.
- Madern, D., C. Ebel, and G. Zaccai. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4 (2):91-98.
- Marklund, S., and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry* 47 (3):469-474.
- Martins, V. P., T. M. Dinamarco, F. M. Soriani, V. G. Tudella, S. C. Oliveira, G. H. Goldman, C. Curti, and S. A. Uyemura. 2011a. Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell* 10 (2):237-248.
- Martins, V. P., T. M. Dinamarco, F. M. Soriani, V. G. Tudella, S. C. Oliveira, G. H. Goldman, C. Curti, and S. A. Uyemura. 2011b. Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryotic cell* 10 (2):237-248.
- Marzluf, G. A. 1993. Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Annual review of microbiology* 47 (1):31-55.
- Marzluf, G. A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (1):17-32.
- Matsuda, Y., F. Sugiyama, K. Nakanishi, and S.-i. Ito. 2006. Effects of sodium chloride on growth of ectomycorrhizal fungal isolates in culture. *Mycoscience* 47 (4):212-217.
- Matsuzawa, A. 2017a. Thioredoxin and redox signaling: roles of the thioredoxin system in control of cell fate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 617:101-105.
- Matsuzawa, A. 2017b. Thioredoxin and redox signaling: Roles of the thioredoxin system in control of cell fate. *Arch Biochem Biophys* 617:101-105.
- McDonald, A. E. 2008a. Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed 'cyanide-resistant' terminal oxidase. *Funct Plant Biol* 35 (7):535-552.
- McDonald, A. E. 2008b. Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed 'cyanide-resistant' terminal oxidase. *Functional Plant Biology* 35 (7):535-552.

- Meijueiro, M. L., F. Santoyo, L. Ramírez, and A. G. Pisabarro. 2014. Transcriptome characteristics of filamentous fungi deduced using high-throughput analytical technologies. *Briefings in functional genomics* 13 (6):440-450.
- Minagawa, N., S. Koga, M. Nakano, S. Sakajo, and A. Yoshimoto. 1992a. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* 302 (3):217-219.
- Minagawa, N., S. Koga, M. Nakano, S. Sakajo, and A. Yoshimoto. 1992b. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS letters* 302 (3):217-219.
- Morgan, B., D. Ezeriņa, T. N. Amoako, J. Riemer, M. Seedorf, and T. P. Dick. 2013. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat Chem Biol* 9 (2):119-125.
- Oren, A. 1997. Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiology Journal* 14 (3):231-240.
- . 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems* 4 (1):2.
- Oren, A., and N. Gunde-Cimerman. 2007. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS microbiology letters* 269 (1):1-10.
- Osman, M. S., A. A. Badawy, A. I. Osman, and A. A. H. Abdel Latef. 2020. Ameliorative Impact of an Extract of the Halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* on Growth and Biochemical Parameters of Soybean Under Salinity Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*.
- Ozdemirler, G., G. Mehmetcik, S. Oztezcan, G. Toker, A. Sivas, and M. Uysal. 1995. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. *Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme* 27 (4):194-196.
- Pang, C.-H., and B.-S. Wang. 2008. Oxidative stress and salt tolerance in plants. In *Progress in botany*: Springer, 231-245.
- Pel, H. J., J. H. De Winde, D. B. Archer, P. S. Dyer, G. Hofmann, P. J. Schaap, G. Turner, R. P. De Vries, R. Albang, and K. Albermann. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology* 25 (2):221-231.
- Pérez-Llano, Y., E. C. Rodríguez-Pupo, I. S. Druzhinina, K. Chenthamara, F. Cai, N. Gunde-Cimerman, P. Zalar, C. Gostinčar, R. Kostanjšek, and J. L. Folch-Mallol. 2020. Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells* 9 (3):525.
- Petrovic, U. 2006. Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res* 6 (5):816-822.
- Petrovič, U. 2006. Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Research* 6 (5):816-822.
- Pfyffer, G. E., B. Pfyffer, and D. M. Rast. 1986. The polyol pattern, chemotaxonomy, and phylogeny of the fungi. *Sydowia* 39:160-201.
- Pitt, J. 1994. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Journal of medical and veterinary mycology* 32 (sup1):17-32.
- Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 2009. *Fungi and food spoilage*. Vol. 519: Springer.
- Plemenitaš, A., M. Lenassi, T. Konte, A. Kejžar, J. Zajc, C. Gostinčar, and N. Gunde-Cimerman. 2014. Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. *Frontiers in microbiology* 5:199.

- Plemenitaš, A., T. Vaupotič, M. Lenassi, T. Kogej, and N. Gunde-Cimerman. 2008. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology* 61:67-75.
- Prista, C., A. Almagro, M. C. Loureiro-Dias, and J. Ramos. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and environmental microbiology* 63 (10):4005-4009.
- Ram, A. F., and F. M. Klis. 2006. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature protocols* 1 (5):2253.
- Ramasarma, T., A. V. Rao, M. M. Devi, R. Omkumar, K. Bhagyashree, and S. Bhat. 2015. New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol autoxidation. *Molecular and cellular biochemistry* 400 (1-2):277-285.
- Reid, D. S. 2020. Water activity: fundamentals and relationships. *Water activity in foods: Fundamentals and applications*:13-26.
- Richard, E., L. Gallego-Villar, A. Rivera-Barahona, A. Oyarzábal, B. Pérez, P. Rodríguez-Pombo, and L. R. Desviat. 2018. Altered Redox Homeostasis in Branched-Chain Amino Acid Disorders, Organic Acidurias, and Homocystinuria. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018:1246069.
- Riquelme, M., J. Aguirre, S. Bartnicki-García, G. H. Braus, M. Feldbrügge, U. Fleig, W. Hansberg, A. Herrera-Estrella, J. Kämper, and U. Kück. 2018. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82 (2).
- Riquelme, M., and S. Bartnicki-Garcia. 2004. Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 41 (9):842-851.
- Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26 (1):139-140.
- Robinson, M. D., and A. Oshlack. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology* 11 (3):1-9.
- Rueden, C. T., J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena, and K. W. Eliceiri. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics* 18 (1):529.
- Salazar, M., W. Vongsangnak, G. Panagiotou, M. R. Andersen, and J. Nielsen. 2009. Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data analysis. *Molecular Genetics and Genomics* 282 (6):571.
- Sánchez, G. M., A. Giulianib, R. H. Delaportec, O. Sonia, and L. Fernández. 2003. INDICADORES CLÍNICOS DEL BALANCE REDOX, UNA HERRAMIENTA INDISPENSABLE PARA LAS INVESTIGACIONES DEL ESTRÉS OXIDATIVO.
- Sankaranarayanan, S., M. Jamshed, A. Kumar, L. Skori, S. Scandola, T. Wang, D. Spiegel, and M. A. Samuel. 2017a. Glyoxalase goes green: the expanding roles of glyoxalase in plants. *International journal of molecular sciences* 18 (4):898.
- Sankaranarayanan, S., M. Jamshed, A. Kumar, L. Skori, S. Scandola, T. Wang, D. Spiegel, and M. A. Samuel. 2017b. Glyoxalase Goes Green: The Expanding Roles of Glyoxalase in Plants. *Int J Mol Sci* 18 (4).
- Sarıkaya, E., & Doğan, S. 2020. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases. *Glutathione Peroxidase in Health and Disease. IntechOpen*.
- Sarıkaya, E., and S. Doğan. 2020. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases. In *Glutathione Peroxidase in Health and Disease: IntechOpen*.

- Sasson, S. 2018. 4-Hydroxyalkenal-activated PPAR δ complexes mediate glucocorticoid and lipocorticoid interactions in diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* 124:560.
- Schenk, P. M., L. C. Carvalhais, and K. Kazan. 2012. Unraveling plant–microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends in biotechnology* 30 (3):177-184.
- Schieber, M., and N. S. Chandel. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology* 24 (10):R453-R462.
- Schmitt, E., B. Eilinghoff, R. Olliger, H. Decker, and U. Kück. 2002. Development of molecular tools for the mulundocandin producer *Aspergillus sydowii*: DNA-mediated transformation and reporter gene expression. *Applied microbiology and biotechnology* 58 (5):625-631.
- Schurch, N. J., P. Schofield, M. Gierliński, C. Cole, A. Sherstnev, V. Singh, N. Wrobel, K. Gharbi, G. G. Simpson, and T. Owen-Hughes. 2016. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *Rna* 22 (6):839-851.
- Semighini, C. P., and S. D. Harris. 2008. Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics* 179 (4):1919-1932.
- Shamim, M., M. Kumar, R. R. Kumar, P. Pandey, D. Srivastava, D. Kumar, N. Khan, R. R. Kumar, and K. Singh. 2016. Understanding the Diversity of *Aspergillus* by Next-Generation Sequencing. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*: Elsevier, 29-40.
- Siglioccolo, A., A. Paiardini, M. Piscitelli, and S. Pascarella. 2011. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC structural biology* 11 (1):1-12.
- Sims, D., I. Sudbery, N. E. Ilott, A. Heger, and C. P. Ponting. 2014. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature reviews genetics* 15 (2):121-132.
- Soler-Hurtado, M. M., J. V. Sandoval-Sierra, A. Machordom, and J. Diéguez-Urbeondo. 2016. *Aspergillus sydowii* and other potential fungal pathogens in gorgonian octocorals of the Ecuadorian Pacific. *PLoS One* 11 (11):e0165992.
- Song, L., and L. Florea. 2015a. Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *Gigascience* 4:48.
- Song, L., and L. Florea. 2015b. Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *GigaScience* 4 (1):s13742-13015-10089-y.
- Sreenivasulu, N., M. Miranda, H. S. Prakash, U. Wobus, and W. Weschke. 2004. Transcriptome changes in foxtail millet genotypes at high salinity: Identification and characterization of a PHGPX gene specifically up-regulated by NaCl in a salt-tolerant line. *Journal of plant physiology* 161 (4):467-477.
- Stevenson, A., J. Burkhardt, C. S. Cockell, J. A. Cray, J. Dijksterhuis, M. Fox-Powell, T. P. Kee, G. Kminek, T. J. McGenity, and K. N. Timmis. 2015a. Multiplication of microbes below 0.690 water activity: implications for terrestrial and extraterrestrial life. *Environmental microbiology* 17 (2):257-277.
- Stevenson, A., J. A. Cray, J. P. Williams, R. Santos, R. Sahay, N. Neuenkirchen, C. D. McClure, I. R. Grant, J. D. Houghton, and J. P. Quinn. 2015b. Is there a common water-activity limit for the three domains of life? *The ISME journal* 9 (6):1333-1351.
- Tafer, H., C. Poyntner, K. Lopandic, K. Sterflinger, and G. Piñar. 2019. Back to the Salt Mines: Genome and Transcriptome Comparisons of the Halophilic Fungus *Aspergillus salisburgensis* and Its Halotolerant Relative *Aspergillus sclerotialis*. *Genes* 10 (5):381.

- Tanaka, T., K. Nishio, Y. Usuki, and K.-i. Fujita. 2006. Involvement of oxidative stress induction in Na⁺ toxicity and its relation to the inhibition of a Ca²⁺-dependent but calcineurin-independent mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering* 101 (1):77-79.
- Taysi, S., M. Keles, K. Gumustekin, M. Akyuz, A. Boyuk, O. Cikman, and N. Bakan. 2015a. Plasma homocysteine and liver tissue S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine status in vitamin B6-deficient rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19 (1):154-160.
- Taysi, S., M. S. Keles, K. Gumustekin, M. Akyuz, A. Boyuk, O. Cikman, and N. Bakan. 2015b. Plasma homocysteine and liver tissue S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine status in vitamin B6-deficient rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19 (1):154-160.
- Teichert, S., J. C. Rutherford, M. Wottawa, J. Heitman, and B. Tudzynski. 2008. Impact of Ammonium Permeases MepA, MepB, and MepC on Nitrogen-Regulated Secondary Metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryotic cell* 7 (2):187-201.
- Teixeira, J., and F. Fidalgo. 2009. Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (9):807-813.
- Thornalley, P. J. 1990. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 269 (1):1-11.
- Thornalley, P. J. 1996. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General Pharmacology: The Vascular System* 27 (4):565-573.
- Trinci, A. 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Microbiology* 81 (1):225-236.
- Turk, M., and C. Gostinčar. 2018. Glycerol metabolism genes in *Aureobasidium pullulans* and *Aureobasidium subglaciale*. *Fungal biology* 122 (1):63-73.
- Vargas-Muñiz, J. M., H. Renshaw, A. D. Richards, F. Lamoth, E. J. Soderblom, M. A. Moseley, P. R. Juvvadi, and W. J. Steinbach. 2015a. The *Aspergillus fumigatus* septins play pleiotropic roles in septation, conidiation, and cell wall stress, but are dispensable for virulence. *Fungal Genetics and Biology* 81:41-51.
- Vargas-Muñiz, J. M., H. Renshaw, A. D. Richards, F. Lamoth, E. J. Soderblom, M. A. Moseley, P. R. Juvvadi, and W. J. Steinbach. 2015b. The *Aspergillus fumigatus* septins play pleiotropic roles in septation, conidiation, and cell wall stress, but are dispensable for virulence. *Fungal Genet Biol* 81:41-51.
- Vaupotic, T., P. Veranic, P. Jenoe, and A. Plemenitas. 2008. Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *Fungal Genetics and Biology* 45 (6):994-1007.
- Vaupotic, T., Veranic, P., Jenoe, P., & Plemenitas, A. 2008. Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *Fungal Genetics and Biology* 45:994-1007.
- Voegele, R. T., M. Hahn, G. Lohaus, T. Link, I. Heiser, and K. Mendgen. 2005. Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiology* 137 (1):190-198.
- Wang, H., Z. Wu, Y. Zhou, J. Han, and D. Shi. 2012. Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism in rice. *Plant, Soil and Environment* 58 (2):62-67.

- Wang, J.-F., X.-P. Lin, C. Qin, S.-R. Liao, J.-T. Wan, T.-Y. Zhang, J. Liu, M. Fredimoses, H. Chen, and B. Yang. 2014. Antimicrobial and antiviral sesquiterpenoids from sponge-associated fungus, *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6. *The Journal of antibiotics* 67 (8):581-583.
- Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics* 10 (1):57-63.
- Warris, A., and E. R. Ballou. 2019a. Oxidative responses and fungal infection biology. Paper read at Seminars in cell & developmental biology.
- Warris, A., and E. R. Ballou. 2019b. Oxidative responses and fungal infection biology. *Semin Cell Dev Biol* 89:34-46.
- Wendland, J., and A. Walther. 2005. *Ashbya gossypii*: a model for fungal developmental biology. *Nature Reviews Microbiology* 3 (5):421-429.
- Winterbourn, C. C., and M. B. Hampton. 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 45 (5):549-561.
- Witko, V., A. T. Nguyen, and B. Descamps-Latscha. 1992. Microtiter plate assay for phagocyte-derived Taurine-chloramines. *Journal of clinical laboratory analysis* 6 (1):47-53.
- Witteveen, C. F., and J. Visser. 1995a. Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* 134 (1):57-62.
- Witteveen, C. F., and J. Visser. 1995b. Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS microbiology letters* 134 (1):57-62.
- Wollenzien, U., G. De Hoog, W. Krumbein, and C. Urzi. 1995. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Science of the total Environment* 167 (1-3):287-294.
- Wösten, H. A. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Reviews in Microbiology* 55 (1):625-646.
- Yan, L., M. Li, Y. Cao, P. Gao, Y. Cao, Y. Wang, and Y. Jiang. 2009. The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 64 (4):764-773.
- Yukioka, H., S. Inagaki, R. Tanaka, K. Katoh, N. Miki, A. Mizutani, and M. Masuko. 1998a. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1442 (2-3):161-169.
- Yukioka, H., S. Inagaki, R. Tanaka, K. Katoh, N. Miki, A. Mizutani, and M. Masuko. 1998b. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1442 (2-3):161-169.
- Zajc, J., S. Džeroski, D. Kocev, A. Oren, S. Sonjak, R. Tkavc, and N. Gunde-Cimerman. 2014a. Chaophilic or chaotolerant fungi: a new category of extremophiles? *Frontiers in microbiology* 5:708.
- Zajc, J., T. Kogej, E. A. Galinski, J. Ramos, and N. Gunde-Cimerman. 2014b. Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Appl Environ Microbiol* 80 (1):247-256.
- Zajc, J., Y. Liu, W. Dai, Z. Yang, J. Hu, C. Gostinčar, and N. Gunde-Cimerman. 2013. Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC genomics* 14 (1):1-21.
- Zhang, Y., Xu, Q., & Xi, B. . 2013. Effect of NaCl salinity on the growth, metabolites, and antioxidant system of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Freshwater Ecology* 28:477-487.

ANEXOS

ANEXO 1

Artículo en Revisión

Manuscript ID **jof-986848**
Status Under review
Article type Article
Title Morphology, osmolyte synthesis and oxidative stress responses of the halophile *Aspergillus sydowii* to extreme water deprivation induced by saturating NaCl concentrations
Journal *Journal of Fungi*
Special Issue Fungal Biodiversity and Ecology
Abstract Water activity (a_w) is critical for microbial growth, as it is severely restricted at $a_w < 0.90$. Saturating NaCl concentrations (≈ 5.0 M) induce extreme water deprivation and cellular stress responses. Halophilic fungi have cellular adaptations that enable osmotic balance and ionic/oxidative stress prevention to grow at high salinity. Here we studied the morphology, osmolyte synthesis and oxidative stress defenses of the halophile *Aspergillus sydowii* EXF-12860 at 1.0 M and 5.13 M NaCl. Colony growth, pigmentation, exudate and spore production were inhibited at NaCl-saturated media. Also, hyphae showed unpolarized growth, lower diameter, and increased septation, multicellularity and branching compared to optimal NaCl concentration. Trehalose, mannitol, arabitol, erythritol, and glycerol were produced in the presence of both 1.0 M and 5.13 M NaCl. Exposing *A. sydowii* cells to 5.13 M NaCl resulted in oxidative stress evidenced by an increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation biomarkers. Also, genes involved in cellular antioxidant defense systems were upregulated. This is the most comprehensive study that investigates the micromorphology and the adaptive cellular response of different non-enzymatic and enzymatic oxidative stress biomarkers in halophilic filamentous fungi.
Keywords *Aspergillus sydowii*; halophily; extremophilic fungi; saline stress; water deprivation; oxidative stress; osmolytes; micromorphology
Manuscript File [manuscript.docx](#)
PDF File [manuscript.pdf](#)



Article

“Morphology, osmolyte synthesis and oxidative stress responses of the halophile *Aspergillus sydowii* to water deprivation induced by saturating NaCl concentrations”

Irina Jiménez-Gómez¹, Gisell Valdés-Muñoz¹, Tonatiuh Moreno-Perlin¹, Rosa Mouriño-Pérez², María del Rayo Sánchez-Carbente³, Jorge Luis Folch-Mallol³, Nina Gunde-Cimerman⁴, Yordanis Pérez-Llano¹, Nilda del Carmen Sánchez-Castellanos⁵ and Ramón Alberto Batista-García^{1*}

¹Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, Mexico; irinajimenez1987@gmail.com

²Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, Mexico; rmourino@cicese.mx

³Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, Mexico; jordi@uaem.mx

⁴Department of Biology, Biotechnical Faculty. University of Ljubljana. Ljubljana, Slovenia; nina.gundecimerman@bf.uni-lj.si

⁵Centro de Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, Mexico; nildita1985@gmail.com

* Correspondence: rabg@uaem.mx, rbatista25@yahoo.com; +52-777-3297020

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: A single paragraph of about 200 words maximum. For research articles, abstracts should give a pertinent overview of the work. We strongly encourage authors to use the following style of structured abstracts, but without headings: (1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; (2) Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied; (3) Results: Summarize the article's main findings; and (4) Conclusions: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article, it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: *Aspergillus sydowii*, halophily, extremophilic fungi, saline stress, saturated NaCl solution, water deprivation, oxidative stress.

1. Introduction

Water activity (a_w) is a thermodynamic descriptor that indicates how much water is chemically available in an aqueous solution (Reid 2020). For biological systems the a_w reveals the water accessibility to enable biochemical reactions (Ball and Hallsworth 2015). This parameter is thus critical for microorganisms, as microbial growth is severely restricted below certain a_w levels ($a_w < 0.90$) (Stevenson et al. 2015a). Although pH, temperature, chaotropicity, and dissolved oxygen, among other environmental factors, are recognized to influence the microbial metabolism, a_w is the most important factor supporting microbial growth (Hallsworth 2018).

Sodium chloride has been extensively studied regarding reduction of a_w and is defined as a potent cellular stressor because entropically promotes supramolecular disorder, osmotic stress, oxidative damage, and cytotoxicity (Hallsworth 2018; Stevenson et al. 2015b). Thus, high NaCl concentrations

are undoubtedly hostile for life (Gunde-Cimerman et al. 2018; Stevenson et al. 2015b) and impose an extensive cell reprogramming to sustain the adaptive mechanisms at hypersaline conditions (Kis-Papo et al. 2014; Plemenitaš et al. 2014; Plemenitaš et al. 2008; Zajc et al. 2013).

Fungi have a variety of cellular adaptations to enable the osmotic balance in the event of water deprivation induced by high NaCl concentrations (Gunde-Cimerman et al. 2018). For example, hypersaline conditions promote, in *Hortea werneckii* and *Wallemia ichthyophaga*, the production of pigments, changes in the meristematic growth, synthesis of compatible solutes, modifications of the cell wall ultrastructure and the composition of the cell membrane, upregulation of certain membrane transporters, and the MAPK signal-transduction system, among others (Gunde-Cimerman et al. 2018; Zajc et al. 2013). *H. werneckii* and *W. ichthyophaga*, that have been widely studied as model halophilic fungi, as they grow in a huge range of NaCl concentration (from 0% to 35%: $a_w=0.75$), where cell division has been observed also in another limited number of fungi (Gunde-Cimerman et al. 2018).

The cellular effects of water deprivation have been poorly studied in aspergilli. New efforts are needed to understand how fungi maintain the physiological functionality at critical values of biologically available water ($a_w<0.90$). To date, the osmoadaptation mechanisms have been investigated in few *Aspergillus* species such as *A. cristatus* (Ge et al. 2017), *A. montevicensis* (Ding et al. 2019), *A. ruber* (previously *Eurotium rubrum*) (Kis-Papo et al. 2014), *A. salisburgensis* and *A. sclerotiales* (Tafer et al. 2019).

We are interested in studying the salt tolerance strategies in the halophilic ascomycete *Aspergillus sydowii*. In a previous work we analyzed the transcriptional response of *A. sydowii* growing at 0, 0.5, 1.0 and 2.0 M of NaCl (Pérez-Llano et al. 2020). In this study we investigated the morphological and physiological behavior of *A. sydowii* EXF-12860 grown in a saturated NaCl solution, being this work the first attempt to understand how a halophilic filamentous ascomycete responds to extreme water deprivation by NaCl saturation (5.13 M NaCl). We studied how low a_w achieved by NaCl saturation influenced the fungal morphology, the synthesis of compatible solutes, and the oxidative balance in *A. sydowii* EXF-12860. To the best of our knowledge, this is the first work that evaluates the oxidative stress caused by NaCl in halophilic filamentous fungi. We also analyzed the transcriptional expression of genes involved in the redox balance and in the cellular responses to face the oxidative stress produced by hypersaline conditions. This study demonstrates that *A. sydowii* EXF-12860 is morphologically and physiologically active under water deprivation by saturated NaCl concentrations.

2. Materials and Methods

2.1. Strain, preservation and culture conditions

A. sydowii EXF-12860 used in this study is a halophilic fungus isolated from a solid fermentation of sugarcane bagasse in the presence of 2.0 M NaCl. EXF-12860 showed its optimal growth in culture media supplemented with 0.5 - 1.0 M NaCl (Batista-García et al. 2014). The fungus was grown and maintained on Yeast Malt Agar (YMA): malt extract 10 g/L, yeast extract 4g/L, dextrose 4 g/L, mycological peptone 5 g/L, agar 20 g/L. Spores and mycelium were conserved in 20% glycerol at -80 °C and deposited in the Ex Microbial Culture Collection of the Infrastructural Centre Mycosmo,

Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana (Slovenia). Cultures supplemented with two NaCl concentrations were used in this study: 1.0 M (optimal growth) and 5.13 M NaCl (saturated NaCl solution, $a_w=0.75$). Spores and mycelium obtained from fresh cultures of EXF-12860 supplemented with 1.0 M NaCl were used as pre-inoculum in all experiments.

2.2. Morphological analysis of *Aspergillus sydowii* EXF-12860 at saturated NaCl solution

The morphological aspect of the fungal colony was examined by inoculating 0.1 g of fresh mycelium into YMA medium plates with added NaCl at 0, 1.0, or 5.13 M as final concentration. Ten-day-old cultures of *A. sydowii* EXF-12860 incubated at 28 °C under dark conditions were used to describe the macro-morphological appearance of the colonies. The “inverted agar block” method (Hickey et al. 2002) was used for microscopy observations of EXF-12860 using a live-cell imaging system equipped with an inverted laser scanning microscope (NiKon Eclipse Ti-U, Tokio, Japan) with an Apo 60x/1.49 A.N. objective. A Hamamatsu Orca Flash 4.0 camera was used for the live-cell data acquisition. Confocal images were analyzed quantitatively using the ImageJ software (Rueden et al. 2017). For micro-morphological examination, vegetative hyphae were fixed and stained with calcofluor white. Samples were excited using a mercury lamp equipped with ET-DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) filters. Length of the first hyphal compartment, septation frequency, branching and nucleus indexes, and hyphal diameter were determined by analyzing 30 independent microscopic fields. Figures were processed and produced using Adobe Photoshop CS6 Extended (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Representative microscopic fields are shown as final images.

2.3. Osmolytes in *Aspergillus sydowii* EXF-12860 exposed to saturated NaCl concentration

The production of arabitol, erythritol, galactitol, glycerol, maltitol, mannitol, ribitol, sorbitol, trehalose, and xylitol by *A. sydowii* EXF-12860 was determined from 100 mg of mycelium collected by centrifugation after 0, 18, 96, and 168 h of fungal culture in Yeast Malt Broth (YMB). Osmolytes were also determined after hypo-osmotic shocks using 200 mg of mycelium: *i*) from 1.0 M to 0 M NaCl and *ii*) from 5.13 M to 1.0 M NaCl (see Figure 3D). Seven-day-old fungal cultures were grown in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL YMB with either 1.0 M or 5.13 M NaCl. After mycelium was exposed to hypo-osmotic shocks, it was incubated at 28 °C for 30 min and was collected then by centrifugation.

The extraction of the compatible solutes was performed as previously described by (Kogej et al. 2007). Briefly, the mycelium was dried at 60 °C and mixed with 1.5 mL of Bligh and Dyer solution (methanol:chloroform:water, 10:5:4) for 30 min. Later, chloroform (450 μ L) and demineralized water (450 μ L) were added. The resulting solution was vigorously shaken for 30 min, and finally centrifugated at 6,000g for 10 min for phase separation. One hundred microliters from the upper phase (methanol:water) were collected and 50 μ L were injected into high-performance liquid chromatographer (HPLC) (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). The chromatographic analysis was performed in an isocratic system equipped with an AMINEX-HPX87H column - 300 mm x 7.8 mm - (Bio-Rad, Munich, Germany). Sulfuric acid (5 mM) was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. Calibration curves were obtained using 5 mg/mL and 10 mg/mL analytical standards of each tested osmolytes (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Chromatograms were processed using ChromQuest software version 2.51 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Chromatographic analysis (n=3) was performed at the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelos (Mexico).

2.4. Oxidative stress biomarkers in *Aspergillus sydowii* EXF-12860 at hypersaline conditions

Supernatants and cell fractions were obtained by centrifugation at 6,000g after 72 h of fungal growth in 250 mL of YMB media with 1.0 M or 5.13 M NaCl. Cells were ground in liquid nitrogen and 1 mL milliQ H₂O was added per sample. Determinations were performed from both supernatants and cell fractions (n=3).

Superoxide dismutase activity was evaluated by measuring the inhibition of pyrogallol autoxidation (Marklund and Marklund 1974). Briefly, 0.2 mM pyrogallol solution was prepared using phosphate buffer (50 mM, pH 8) and 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was added. After adding of 10 µL of sample, the rate of oxidized pyrogallol (purpurogallin–quinone) was measured spectrophotometrically at 405 nm during 1 min (Ramasarma et al. 2015). Also, catalase activity was determined using EnzyChrom™ Catalase Assay kit (BioAssay System, Hayward, CA, USA). Finally, the concentration of reduced glutathione was quantified as described previously by (Ecobichon 1984) with minor modifications. Briefly, 5 µL of the sample was mixed with 0.1 M phosphate buffer pH 8 and 50 µL of 10⁻² M 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DNTB). The production of color due to the DNTB oxidation was measured spectrophotometrically at 412 nm. The concentration of reduce glutathione was determined using a standard curve of reduced glutathione prepared in 0.1 M phosphate buffer pH 8.

Also, five oxidation biomarkers were analyzed. The concentration of hydrogen peroxide was measured using BIOXYTECH® H₂O₂-560 Assay kit (Bioxytech, Portland, OR, USA). Also, advanced oxidation protein products were quantified as previously described (Witko et al. 1992). As another oxidation indicator, a colorimetric assay for lipid peroxidation markers was performed. The levels of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals were determined at 586 nm according to (Erdelmeier et al. 1998). Finally, lipid peroxidation susceptibility was determined as reported by (Ozdemirler et al. 1995). Briefly, samples were incubated with 2 mM copper sulphate at 37 °C for 24 hours. Malondialdehyde levels were measured spectrophotometrically at 586 nm.

2.5. Transcriptomic expression of genes involved in cellular oxidative stress defenses

A transcriptomic dataset of *A. sydowii* EXF-12860 growing at 1.0 M and 5.13 M NaCl dataset was analyzed to identify differentially expressed genes related to cellular redox balance and oxidative stress responses at hypersaline conditions. This dataset is publicly available at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI): Submission ID: SUB8102769, BioProject PRJNA662826, BioSample accession: SAMN16095160. For this experiment, total RNA was isolated from mycelium samples after 72 h of fungal growth in media with 1.0 M and 5.13 M NaCl. Transcriptomes (n=3) were sequenced by Macrogen Company (Seoul, South Korea) and analyzed as previously mentioned in (Pérez-Llano et al. 2020). Briefly, sequencing quality control was performed using Trimmomatic version 0.39 (Bolger et al. 2014b) and Rcorrector was conducted to correct Illumina sequencing errors (Song and Florea 2015a). Trinity version 2.10.0 was used as *de novo* assembly algorithm (Grabherr et al. 2011b). Functional annotations and analysis of the transcriptional levels of genes related to redox balance and oxidative stress responses were performed using Blast2GO (Biobam Bioinformatic, 2019).

2.6. Statistical calculations

All experimental determinations were performed in triplicates with three technical replicates. Statistical differences ($p < 0.05$) among the mean of morphological determinations or the amounts of oxidative stress markers were determined by one-way ANOVA ($n=3$) and Tukey's HSD test as *post hoc* analysis. Differences ($p < 0.05$) among the mean amounts of osmolytes were determined by Kruskal-Wallis test, and Dunn's test as *post hoc* analysis. Statistical calculations were performed using GraphPad version Prism8 (<https://www.graphpad.com>). Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis to visualize statistical ordinations of data from the osmolyte determinations, was performed in R using vegan package (R Development Core Team).

To analyze the grouping of samples according to oxidative stress biomarker levels we performed a principal component analysis (PCA) using the PCA function of the FactoMineR package for R (R Development Core Team). Missing values were previously imputed using the regularised iterative PCA algorithm of the missMDA package for R (R Development Core Team). In both analyses, the variables were scaled to unit variance. The Pearson correlation coefficient was calculated for each pair of indicators to analyze the correlation among the different oxidative stress biomarkers.

3. Results and discussion

3.1. Morphology of *Aspergillus sydowii* EXF-12860 at different NaCl concentrations

The micro- and macro-morphological characters of *A. sydowii* at 0, 1 and 5.13 M NaCl were examined using 10-day-old cultures incubated in dark conditions (Figure 1A-M). Colonies grown in absence of NaCl showed 32-35 mm diameter, raised to umbonate elevation, produced orange-white to light orange pigmented conidia, and contours ranged from entire to delicately filiform (Figure 1A). The colony surface appearance was floccose in the center and velutinous in the margins, the mycelium was hyaline to white and radially wrinkled. The colony reverse was yellowish to brownish, and reddish-brown to dark-brown exudates were observed.

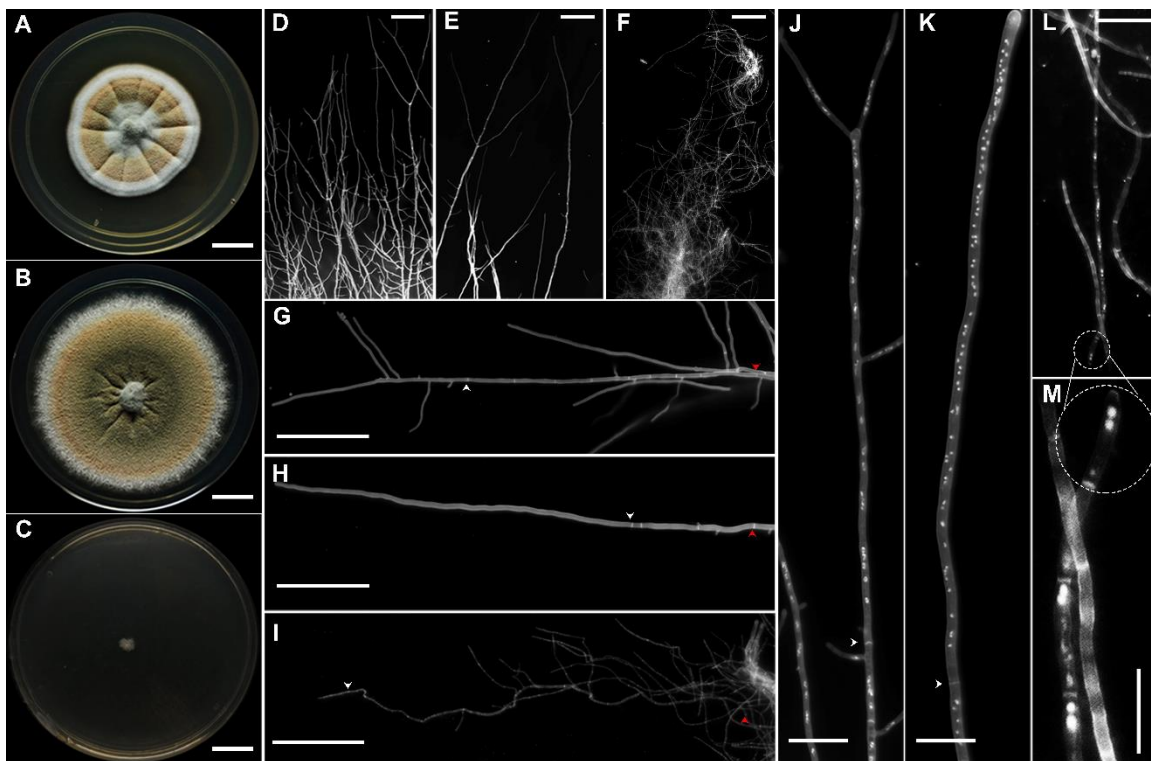


Figure 1. Morphological characterization of *Aspergillus sydowii* EXF-12860 grown on Yeast Malt Agar medium at different NaCl concentrations after 10 days of culture at 28 °C. A, B and C) Colony appearance at 0 M, 1.0 M, and 5.13 M NaCl, respectively. Bars: 1 cm. D, E and F) Stereoscopic examination of colonies contour after fungal growth at 0 M, 1.0 M, and 5.13 M NaCl, respectively. Bars: 100 μm . G, H and I) Hyphae grown in the presence of 0 M, 1.0 M, and 5.13 M NaCl, respectively. Bars: 100 μm . White arrows indicate the first hyphal compartment, while red arrows show 500 μm of length. Calcofluor white staining was applied in D-I. J, K and L) Multicellularity at 0 M, 1.0 M, and 5.13 M NaCl, respectively. Bars: 25 μm . M) Zoom image. Bars: 25 μm . Staining using calcofluor white and DAPI was applied in J-M.

On the other hand, colonies on YMA medium with 1.0 M NaCl spread broadly, attained a diameter of 42-45 mm (Figure 1B). Colonies displayed flat to umbonate elevation, dull green to light orange sporulation, powdery to floccose colony surface, entire to delicately filiform margins, hyaline to white mycelium, slightly yellow reverse, and absence of exudates (Figure 1B). Abundant sporulation was observed at both 0 M and 1.0 M NaCl concentrations.

Colonies grown on YMA at saturated NaCl concentration (5.13 M) attained the lesser diameter (5-6 mm) with a yeasty surface and a flat appearance (Figure 1C). The mycelium was hyaline with an uncolored reverse and showed filiform margins. Colony pigmentation, spore development, and production of exudates were inhibited at 5.13 M NaCl. *A. sydowii* EXF-12860 showed an optimal growth at 1.0 M NaCl resulting in a higher colony diameter (Tukey's HSD, $p \leq 0.05$) compared with mycelium diameter obtained at 0 M and 5.13 M NaCl. According to this result, 1.0 M NaCl was identified as the salt concentration to support the optimal growth of EXF-12860, while 0 M and 5.13 M NaCl were considered stress conditions.

Micro-morphology examination showed that NaCl drastically influenced the borders of *A. sydowii* colonies (Figure 1D, E and F). Vegetative hyphae at both 0 M and 1.0 M NaCl displayed polarized growth (Figure 1D and E), while hyphae grew aberrant, curly, and tangled at 5.13 M NaCl (Figure 1F). In addition, an increase in hyphal branching was observed in the absence of salt with regions attaining isometric growth (Figure 1D). NaCl also affected the length of the first hyphal compartment, the septation frequency, and the branching and nucleus indexes (Figure 1G-M).

There were significant morphological differences when *A. sydowii* EXF-12860 grew on YMA with 1.0 M and 5.13 M NaCl, or in absence of salt (Figure 2A and B). While the average length of the first hyphal compartment was 323 μm and 231 μm at 1.0 M and 0 M NaCl, respectively, much smaller first compartments (29 μm on average) were observed at 5.13 M NaCl (Figure 2A). Septation was significantly promoted during fungal growth at saturated NaCl solution -stress condition-, reaching on average one septum every 15.5 μm versus one septum every 162 μm at 1.0 M NaCl -optimal NaCl condition- (Figure 2A). We also found that the branching and nucleus indexes were markedly higher at stress conditions (0 M and 5.13 M NaCl) in comparison to the optimal salt growth condition (Figure 2B).

The diameter of hyphae grown at different NaCl concentrations was measured at 10 μm , 250 μm , and 500 μm from the hypha apical tip (Figure 2C). Hyphae on YMA with 1.0 M NaCl showed the higher diameters (Figure 2D). Also, the average length of hyphal compartments -distance between two septa- was highly reduced in 5.13 M of salt when compared with the other NaCl conditions (Figure 2E).

In summary, the micro-characterization of *A. sydowii* EXF-12860 showed that this halophilic fungus drastically changed its morphology under extreme water deprivation by saturated NaCl concentrations. Interestingly, EXF-12860 revealed a similar micro-morphology on YMA saturated with NaCl than in absence of salt, being both non-optimal growth conditions for this ascomycete halophilic strain. Although saturated NaCl solutions significantly restrict the fungal development (Gunde-Cimerman et al. 2018), this NaCl-adapted ascomycete grew at extremely low a_w conditions producing un-polarized hyphae with a higher number of septa compared to 0 M and 1.0 M NaCl. There is an apparent increase in the mycelial multicellularity based on the increased nuclear biogenesis observed in 1.0 M NaCl. Interestingly, the multicellularity was higher at 5.13 M than in absence of salt. Multicellularity has not been studied before in halophilic fungi, and could probably represent an important haloadaptation response to face NaCl-induced stress.

Salt stress drastically alters colony morphology, pigmentation, and cell wall structure in fungi (Gunde-Cimerman et al. 2018). While some studies have been focused on the micro-structural analysis of the cell wall of halophilic/xerophilic fungi (Kogej et al. 2007; Kunčič et al. 2010; Pérez-Llano et al. 2020), mycelial micro-morphological characterization of halophilic fungi has been poorly investigated (Ding et al. 2019; Kunčič et al. 2010). Previous studies showed that extremely saline conditions caused changes in size and appearance in the colony morphology of the halotolerant ascomycete yeast *H. werneckii* (Gunde-Cimerman et al. 2018), as well of the cosmopolitan halophilic/xerophilic basidiomycetes *W. ichthyophaga*, *Wallemia sebi*, and *Wallemia muriae* (Kunčič et al. 2010). *A. montevidensis*, on the other hand, displayed unique morphological responses to hypersaline conditions imposed by 3.0 M NaCl (Ding et al. 2019; Liu et al. 2017a). For example, the pigment production and cleistothecium development were drastically inhibited in *A. montevidensis* grown under salt stress (Ding et al. 2019; Liu et al. 2017a). While high salinity promoted the conidial formation in *A. montevidensis* (Ding et al. 2019), this process was strongly

inhibited in our *A. sydowii* strain at 5.13 M NaCl.

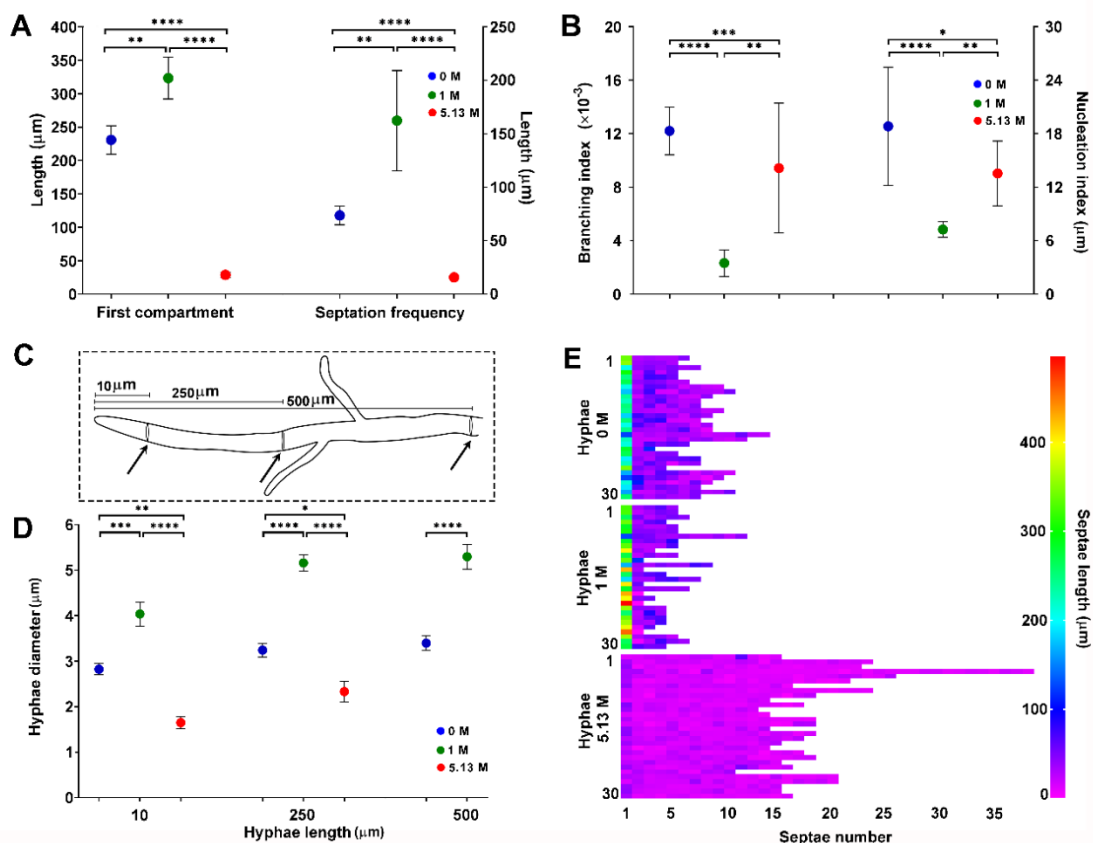


Figure 2. Quantification of morphological descriptors from cultures of *Aspergillus sydowii* EXF-12860 grown on Yeast Malt Agar medium at 0 M, 1.0 M, and 5.13 M NaCl concentrations after 10 days of culture at 28 °C. A) Length of the first hyphal compartment and septation frequency. B) Branching index and nucleation index. C) Methodological representation of how hyphae diameters were measured. Black arrows indicate the distances from the hyphal tips where diameters were measured. E) Septae number and septae length for 30 different hyphae. Asterisks represent statistically significant differences determined by one-way ANOVA and Tukey’s HSD test ($p < 0.05$).

Our results are consistent with (Matsuda et al. 2006) and (Liu et al. 2017a) who reported that hyphae width was reduced under salt stress. We also found in *A. sydowii* EXF-12860 that hyphal compartments were thinner and shorter at saturated NaCl conditions compared to what was observed at low salinity, as was described in xerophilic basidiomycetes *W. muriae* and *W. sebi* (Kunčič et al. 2010). Similar morphology was described in the weakly-halotolerant *Aspergillus repens* that showed significant differences in the mycelial thickness, branching, and septation under NaCl stress compared to the non-stressed condition (Kelavkar et al. 1993b). In an *Exophiala* sp., a recent report showed that dimorphic change was triggered by NaCl (from filamentous to yeast type phenotypes) (Ide-Pérez et al. 2020).

Results obtained in this work demonstrate that hyphal geometry was drastically changed by NaCl, indicating that a dynamic rearrangement of the cytoskeleton occurred particularly at 5.13 M NaCl, and subsequently, changes in cell shape were produced. It is well known that septins and formins are the main proteins involved in hyphal morphogenesis and they are implicated in sculpting the

filamentous fungal cell shape (Gladfelter 2006a; Gladfelter 2010), as well as in nuclear dynamics in hyphae (Kozubowski and Heitman 2010). NaCl could influence the expression dynamic of these proteins since septation requirements, hyphal polarity, diameter, and morphological appearance, all fungal phenotypes controlling by septins and formins, were modified at hypersaline conditions in *A. sydowii* EXF-12860. These proteins have been recognized as key components for hyphal morphogenesis in *Aspergillus* (Lindsey et al. 2010a; Lindsey et al. 2010c). For example, genes encoding for septins in *A. nidulans* (*aspA-E*) have been related with the hyphal branching pattern and conidiophore development (Gladfelter 2006a), while the septin orthologous genes in *A. fumigatus*, *aspA*, *aspB*, *aspC* and *aspE*, coordinate interseptal distances in the apical and subapical hyphal compartments (Vargas-Muñiz et al. 2015b). *SepA*, a formin homolog of *A. nidulans*, was related to septation and hyphal diameter (Gladfelter 2006a). Even though nothing has been explored about the septin and formin's role in halophilic fungi, this study provides interesting morphological insights which suggest that septin and formin's expression could be influenced by salt in *A. sydowii* EXF-12860 since the hyphal growth, the hyperbranching pattern, and the number of septa were altered at hypersaline conditions.

3.2. Synthesis of compatible solutes by *Aspergillus sydowii* EXF-12860 exposed to NaCl

A. sydowii EXF-12860 produced trehalose, mannitol, arabitol, erythritol, and glycerol in the presence of both 1.0 M and 5.13 M NaCl concentrations (Figure 3A and B). At early times (18 h) of cultures with 5.13 M NaCl, trehalose, mannitol, arabitol, and erythritol were produced at higher concentrations in comparison to older cultures (96 h and 168 h) (Figure 3A). At 18 h, mannitol and arabitol were synthesized only in the NaCl saturated medium, while trehalose showed a similar concentration that at 0 h (Figure 3A). At 5.13 M NaCl, the synthesis of the compatible solutes decreased throughout the experiment. Interestingly, the glycerol concentration did not change when EXF-12860 was grown at NaCl saturated solution (Figure 3A). The production of the compatible solutes at 1.0 M NaCl was maximal at 96 h (Figure 3A), when the fungal culture reached the midpoint of the exponential growth phase (data not shown). The highest production of arabitol was achieved after 168 h post-inoculation (stationary growth phase) (Figures 3A).

Our results show that the compatible solute profile drastically changed at 96 h (exponential growth) in comparison to 18 h (acclimation phase). The tridimensional NMDS showed two statistical ordinations based on the response of *A. sydowii* EXF-12860 to produce compatible solutes in different culture times at 1.0 M and 5.13 M NaCl (Figure 3C). Data obtained from the synthesis of compatible solutes at 1.0 M after 96 h and 168 h exhibited a strong ordination, reflecting that these conditions could be defined as a physiological scenario that contrasts greatly with the rest of the experimental stressful conditions (Figure 3C).

The compatible solute profile was determined after 30 min of different hypo-osmotic shocks (Figure 3D). Trehalose significantly increased when EXF-12860 was transferred from 5.13 M to 1.0 M NaCl (Figure 3E). Erythritol and glycerol were produced in lesser amounts, while arabitol was not detected. Interestingly, the production of compatible solutes was more abrupt when mycelium was transferred from 1.0 M to 0 M NaCl (Figure 3E). After 30 min of this hypo-osmotic shock, mannitol drastically increased the concentration. In contrast, this compatible solute did not show a notable change when *A. sydowii* was transferred from 5.13 M to 1.0 M NaCl. Arabitol displayed a similar profile that mannitol.

Galactitol, maltitol, ribitol, sorbitol, and xylitol were non-detectable in the studied conditions. Figure 3B shows a properly resolved chromatographic signal of a compound that eluded at 6.2

minutes in the 1.0 M NaCl culture. Another chromatographic signal was observed at 6.8 minutes in cultures with 5.13 M NaCl (Figure 3B). Interestingly, the concentration of this unidentified compound increased with salinity. These peaks did not correspond to any of the tested analytical standards, probably indicating the presence of new osmolytes synthesized by *A. sydowii* EXF-12860. On the other hand, these chromatographic signals were almost exclusive of one or another condition (Figure 3B).

Production of compatible solutes has been recognized as one of the main responses employed by extremophilic/extremotolerant fungi growing under water-deprivation conditions (Gunde-Cimerman et al. 2018). Extremely saline conditions induce the accumulation of polyols and sugars (e.g. glycerol, erythritol, arabitol, mannitol) in halophile fungi such as *H. werneckii* and *W. ichthyophaga*, being glycerol the primary osmolyte accumulated (Gunde-Cimerman et al. 2018; Kogej et al. 2007; Zajc et al. 2014b). Interestingly, the glycerol concentrations obtained in this work did not correlate with increases in salinity (Figure 3A). This compatible-solute strategy has been demonstrated in *H. werneckii* (Kogej et al. 2007), as well as in *Aureobasidium pullulans* and *Aureobasidium subglaciale*

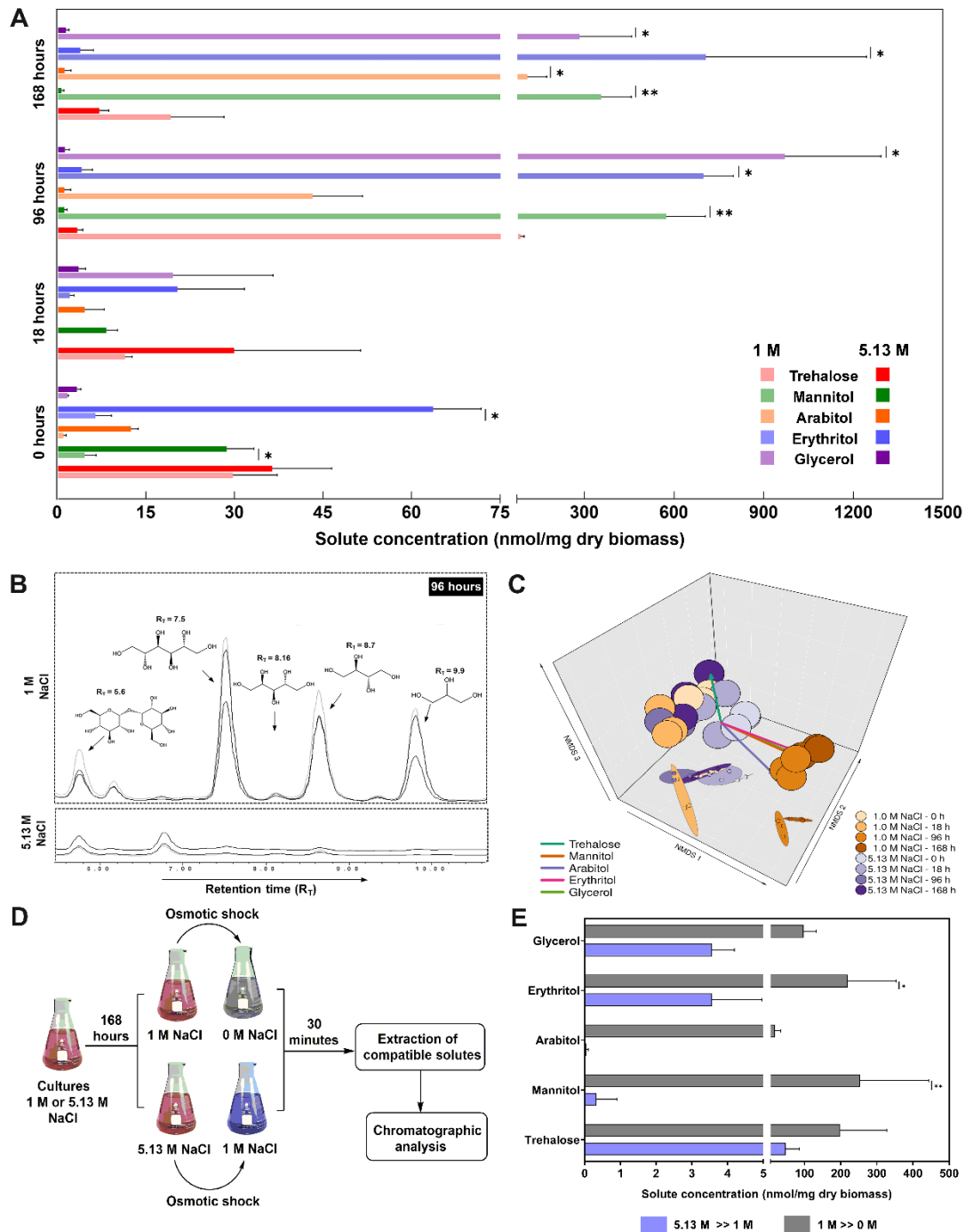


Figure 3. Osmolyte production by *Aspergillus sydowii* EXF-12860 grown at 1.0 M and 5.13 M NaCl (saturated NaCl solution) in Yeast Malt Broth at 28 °C. A) Synthesis of compatibles solutes at 0 h, 18 h, 96 h and 168 h. (B) Representative chromatograms obtained after 96 h of fungal culture at 1.0 M and 5.13 M NaCl. (C) Non-metrical multidimensional scaling (NMDS) analysis of the compatible solute production. (D) Experimental design to study the compatible solute production due to hypo-osmotic shocks (E). Blue bars represent the compatible solute production after the hypo-osmotic shock from 5.13 M to 1.0 M NaCl. Grey bars represent the compatible solute production after the

hypo-osmotic shock from 1.0 M to 0 M NaCl. Asterisks represent statistically significant differences determined by the Kruskal-Wallis test and Dunn's test ($p < 0.05$).

(Turk and Gostinčar 2018). In the studied conditions for *A. sydowii* EXF-12860, the accumulation of polyols does not seem to be a key response to overcome the osmotic imbalance at least at saturated concentrations of Na⁺ ions. However, the synthesis of the compatible solutes was increased in cultures of EXF-12860 at 1.0 M NaCl (Figure 3A), reflecting the physiological role of these small molecules to maintain the osmotic homeostasis.

Our results also support that osmolyte production exhibits a growth-phase dependence as previously reported in *H. werneckii* where glycerol was accumulated predominantly during the exponential phase while erythritol has a production peak at the stationary phase (Plemenitaš et al. 2008). Similar results were found in *Aspergillus niger* when glycerol and erythritol were determined as primary osmolytes in young mycelium, while mannitol and erythritol were predominant in old mycelium (Krijgsheld et al. 2013; Witteveen and Visser 1995a). Interestingly, *A. sydowii* EXF-12860 steadily accumulated mannitol, erythritol, and glycerol during exponentially and stationarily growing cells at 1.0 M NaCl (Figure 3A). In contrast, arabitol increased gradually during the exponential growth phase and peaked at the stationary phase in cultures with 1.0 M NaCl. The amounts of osmolytes remained low in cultures at 5.13 M NaCl and a growth-phase dependence was not observed in this extremely salty condition (Figure 3A).

Hypo-osmotic shock also affected the accumulation profile of compatible solutes by EXF-12860, as occurs in other halophilic fungi such as *W. ichthyophaga* (Kogej et al. 2007; Zajc et al. 2014b). The osmolyte management was notably different when *A. sydowii* EXF-12860 was transferred to cultures without salt, suggesting that this fungus not only reprograms quickly its compatible-solute strategy during hypo-osmotic shocks but also the osmolyte synthesis is more extensively modified when the osmotic shock is towards a culture medium without NaCl (Figure 3E).

3.3. Oxidative stress defenses induced by NaCl in *Aspergillus sydowii* EXF-12860

Stress conditions, including water deprivation by high concentrations of salt, produce oxidative damage in both prokaryotic and eukaryotic organisms (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018; Hassan et al. 2020b; Sreenivasulu et al. 2004). The link between the antioxidant capacity of fungi and their halotolerance have been interrogated recently at the genomic level in the halophilic basidiomycete *W. ichthyophaga*, and the halotolerant black yeasts *H. werneckii* and *A. pullulans* (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018); however, few works focused on the analysis of the oxidative stress response systems in halophilic fungi, have been published before (Petrovic 2006). Here we investigated the cellular antioxidant defense of *A. sydowii* EXF-12860 exposed to stressful NaCl concentrations. Non-enzymatic and enzymatic biomarkers related directly to oxidative stress response were studied in EXF-12860 at 1.0 M and 5.13 M NaCl (Figure 4A-I).

Reduced glutathione showed similar levels in the mycelia of fungal cultures at 1.0 M NaCl (16.40 $\mu\text{g/mL}$) and at 5.13 M NaCl (13.02 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 4A). Interestingly, reduced glutathione was found extracellularly in cultures at both 1.0 M and 5.13 M salt concentrations, achieving 21.45 $\mu\text{g/mL}$ and 22.18 $\mu\text{g/mL}$ in culture supernatants, respectively. No statistical differences were found in the glutathione concentrations in the studied conditions. Glutathione peroxidase activity was also measured and, higher activity was detected at 5.13 M NaCl in both mycelial and supernatants

fractions (Figure 4B). The activity of glutathione peroxidase increased 7.7 and 1.2 fold in supernatants and mycelia, respectively, in cultures in the presence of 5.13 M NaCl compared to cultures with 1.0 M NaCl. Catalase and superoxide dismutase activities also increased significantly in cultures grown under extreme water deprivation (5.13 M NaCl) (Figure 4C and D). While catalase activity showed a two-fold increase in both mycelium and supernatants at 5.13 M NaCl, superoxide dismutase exhibited a more noticeable increase of approximately 197-fold at 5.13 M NaCl with respect to cultures at optimal salt concentration. Interestingly, superoxide dismutase was not detected in the mycelium of any salty condition.

We also studied five metabolic biomarkers for oxidative stress because it is well known that superoxide anion (O_2^-) cause damage to all major groups of biomolecules (Warris and Ballou 2019b). The concentration of hydroperoxides was determined as a direct indicator of biomolecule oxidation. We found that the production of hydroperoxides was two-fold higher in the stress condition for both mycelium and supernatants of *A. sydowii* EXF-12860 (Figure 4E). Advanced oxidation protein products were found in the same levels in both studied NaCl concentrations (Figure 4F). The index of lipid peroxidation was similar in mycelium collected from both salt conditions (Figure 4G). Interestingly, lipid peroxidation was detected in a high ratio in the extracellular medium at both NaCl conditions. Malondialdehyde is a naturally occurring product of lipid peroxidation (Erdelmeier et al. 1998). In agreement with the observed lipid peroxidation ratio, malondialdehyde was detected in higher concentrations in supernatants of *A. sydowii* (Figure 4H). However, this oxidative stress biomarker was found exclusively in mycelium cultured at 5.13 M NaCl, reflecting that lipid peroxidation is occurring under extremely saline conditions. Finally, 4-hydroxyalkenals were quantified and they also peaked in supernatants obtained from cultures at 5.13 M NaCl (Figure 4I).

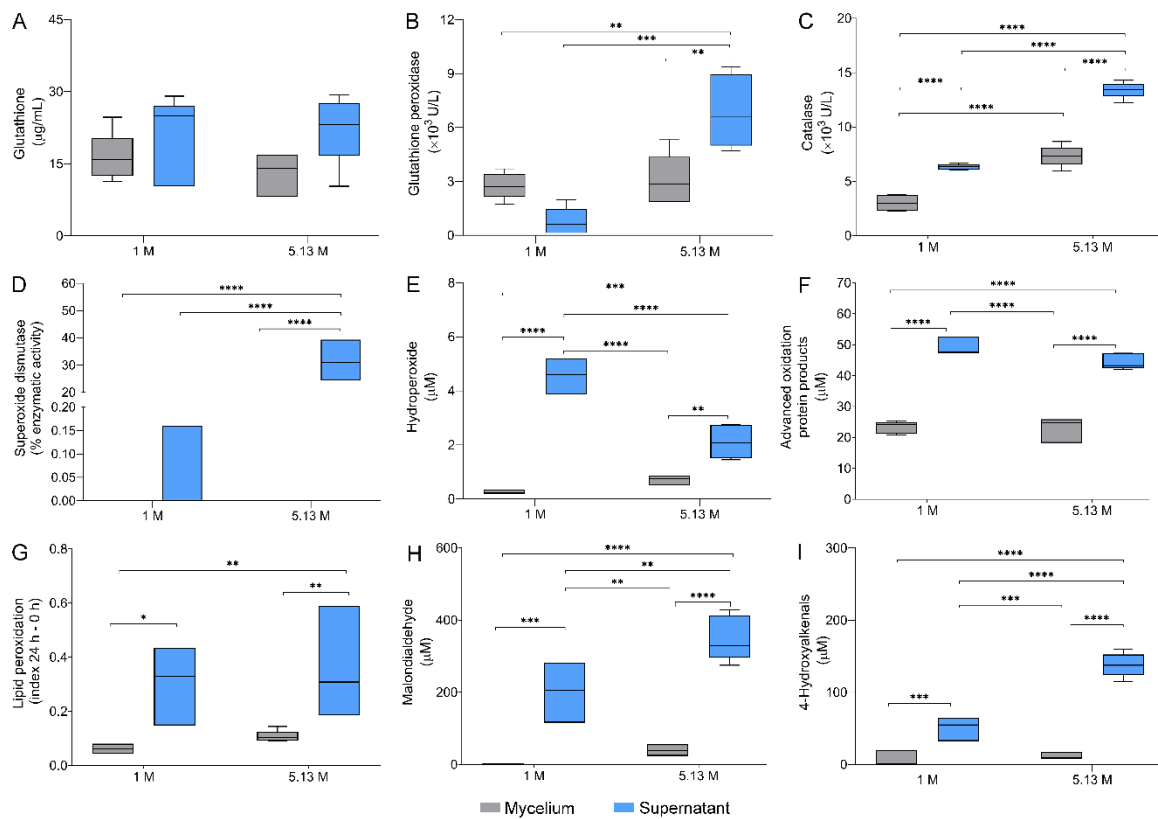


Figure 4. Oxidative stress responses in *Aspergillus sydowii* EXF-12860. Nine oxidative stress biomarkers were investigated in mycelium and supernatants of EXF-12860 grown at 1.0 M and 5.13 M NaCl: A) Glutathione concentration; B, C and D) Enzymatic activity of glutathione peroxidases, catalases, and superoxide dismutases, respectively; E, F, G, H and I) Determination of hydroperoxides, advance oxidation protein products, lipid peroxidation ratio, malondialdehyde, and 4-hydroxyalkenals, respectively. Asterisks represent statistically significant differences determined by one-way ANOVA and Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

These compounds are also byproducts of lipid peroxidation (Erdelmeier et al. 1998). 4-Hydroxyalkenals were found in the mycelium of EXF-12860 grown in both salt concentrations, but their levels increased two-fold in the NaCl saturated culture medium. Our results demonstrate that NaCl saturated media (5.13 M) promoted oxidative stress in *A. sydowii* EXF-12860, resulting in a robust cellular defense installed to overcome the salinity-induced damage. As our data suggest, EXF-12860 leads both non-enzymatic and enzymatic antioxidant responses as adaptative strategies to counteract extreme salinity (Figure 4A-D). Water deprivation by NaCl constitutes a hard-environmental stressor for eukaryotes (Gunde-Cimerman et al. 2018; Osman et al. 2020). Fungi respond to osmotic stress by inducing antioxidant metabolites as glutathione (non-enzymatic antioxidant response) and enzymes (enzymatic antioxidant response) as catalases, superoxide dismutases, and glutathione peroxidases, among others (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018; Vaupotic 2008; Warris and Ballou 2019b).

A. sydowii EXF-12860 showed an excellent glutathione balance at studied NaCl concentrations, indicating that this fungus was capable to overturn Na^+ toxicity at saturated concentrations (Figure 4A). Although intracellular glutathione showed slightly lower levels at 5.13 M NaCl, no significant differences were found in glutathione concentrations in mycelia and supernatants obtained from both salinity conditions. We did not detect large changes in the reduced glutathione in cultures exposed to 1.0 M and 5.13 M NaCl. This is a sign that EXF-12860 triggered a successful non-enzymatic oxidative stress defense. Glutathione is the most abundant antioxidant in the cell and oxidative stress notably decreases the intracellular levels of reduced glutathione (Morgan et al. 2013). An increase of the intracellular glutathione levels was also found in halotolerance bacteria cultured at high NaCl concentrations (Hassan et al. 2020b).

The enzymatic activity of the studied antioxidant enzymes as glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase showed higher levels at 5.13 M NaCl (Figure 4B-D). This observation supports that extremely hypersaline conditions promoted oxidative stress in *A. sydowii* EXF-12860, which produced an enzymatic antioxidant defense to maintain the redox cellular homeostasis. These enzymes play key roles in oxidative damage protection in fungi because they efficiently limit the cellular damage that reactive oxygen species (ROS) can cause (Warris and Ballou 2019b). ROS mainly arise as by-products of oxygen aerobic metabolism in mitochondria and include the O_2^- , hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$) (Schieber and Chandel 2014). O_2^- must be immediately converted to H_2O_2 by superoxide dismutases. Then, H_2O_2 detoxification is performed by reduction processes mediated by catalases and glutathione peroxidases. H_2O_2 can be also reduced partially to $\text{OH}\cdot$, which has an extremely high reactivity (Warris and Ballou 2019b). The imbalance between ROS production and antioxidant protection triggers ROS accumulation resulting in oxidative stress with severe damage to lipids, proteins, and DNA. However, an increase in ROS levels activates signaling pathways to maintain the cellular redox state (Warris and Ballou 2019b).

The oxidative damage markers studied in this work revealed that exposure of *A. sydowii* EXF-12860 to saturated Na⁺ concentration also induced damages to biomolecules like proteins and lipids (Figure 4E-I). Particularly, our results suggest that lipid peroxidation is promoted at 5.13 M NaCl because the concentration of hydroperoxides, malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals was higher at 5.13 M than at 1.0 M NaCl (Figure 4E, H and I). Also, saturated Na⁺ media enhanced the lipid peroxidation ratio (Figure 4E) which has been well documented during oxidative stress (Busch and Binder 2017a). As it is well known, biomolecule oxidation (e.g. lipids) involves the continuous formation of hydroperoxides as primary oxidation products, which are reduced by glutathione peroxidases with glutathione as the reductant (Dobarganes 2002). Lipid peroxidation results in the generation of malondialdehyde as one of the end products (Busch and Binder 2017a), as well as 4-hydroxyalkenals which are considered as non-enzymatic peroxidation products of polyunsaturated fatty acids (Sasson 2018). For this reason, these lipid peroxidation by-products are routinely used as oxidative stress biomarkers. In this context, in the halotolerant bacteria *Planococcus* species, *Bacillus haikouensis*, and *Microcystis aeruginosa*, elevations in malondialdehyde levels were found at high salinity conditions (Hassan et al. 2020b; Zhang 2013).

On the other hand, determinations of advanced oxidation protein products showed a slight increase in the 5.13 M NaCl condition. Proteins are also affected by ROS, particularly those with prosthetic Fe-S groups (Schieber and Chandel 2014). Cysteines are especially susceptible to oxidation by ROS, in particular the thiolate anions (Cys-S⁻), the cysteine chemical form found at neutral pH (Finkel 2012). For example, H₂O₂ mediates reversible Cys-S⁻ oxidation to sulfenic form (Cys-SOH) which acts as a determinant signaling pathway to overcome oxidative stress. However, damaging levels of H₂O₂ produce irreversible Cys-S⁻ oxidation to sulfinic (SO₂H) or sulfonic (SO₃H) species (Winterbourn and Hampton 2008). As these irreversible transformations of Cys-S⁻ involve permanent protein damage, they trigger the advanced oxidation of proteins (Schieber and Chandel 2014). With this in mind, our results suggest that Na⁺ at saturated concentration did not cause significant protein oxidation in *A. sydowii* EXF-12860 since the quantification of the advanced oxidation protein products was similar at both salinity conditions.

Data characterizing the cellular oxidative defenses of fungi exposure to hypersaline stress are scarcely found in the literature (Gostinčar and Gunde-Cimerman 2018). This is the first study that investigates the adaptative cellular response of different non-enzymatic and enzymatic oxidative stress biomarkers in halophilic filamentous fungi. In the extremely halotolerant black yeast *H. wernneckii*, previous studies demonstrated that oxidative stress limited the yeast growth in high-salinity environments (Petrovic 2006).

To analyze the relation between the oxidative stress biomarkers studied and the NaCl concentration, we performed a PCA (Figure 5A). The analysis indicated that the PC1 and PC2 explained the majority of variance, as expected PC1 has the largest variance (65.45%) explained. The PCA also indicated that the biomarkers 4-hydroxyalkenals, malondialdehyde, and lipid peroxidation ratio contributed notably to PC1, while hydroperoxide and glutathione peroxidase (Figure 5B). Furthermore, the analysis showed that the biomarkers behave similarly in the samples from the mycelia regardless their treatment. However, the NaCl concentration did modify the behavior of the oxidative defense biomarkers in the supernatant samples (Figure 5A); while supernatant samples at 1.0 NaCl M were more related to higher concentrations of hydroperoxide and advanced oxidation protein products, the supernatant samples at 5.13 M NaCl had increased activities of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase (Figure 5A

and 5B). Finally, we analyzed how the different oxidative defense biomarkers related to each other through a pair-wise correlation analysis (Figure 5C).

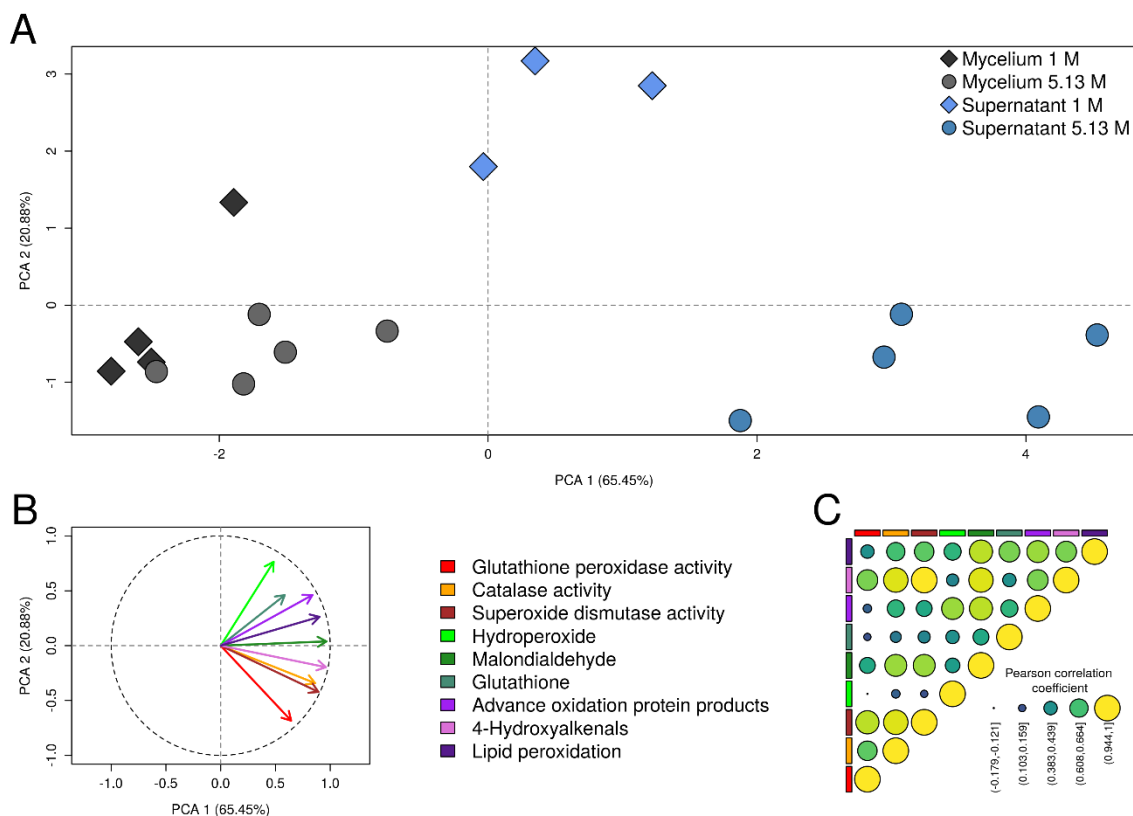


Figure 5. Multivariate statistical analysis of the oxidative stress responses in *Aspergillus sydowii* EXF-12860. (A) Principal component analysis (PCA) plot showing the grouping of mycelium and supernatant samples at 1.0 M and 5.13 M NaCl conditions according to their values of oxidative stress indicators. (B) The correlation between oxidative stress biomarkers and the axes of the PCA plot. (C) Pearson correlation coefficient of the oxidative stress biomarkers in samples of mycelium and supernatant at 1.0 M and 5.13 M NaCl conditions

The Pearson correlation analysis between the biomarkers showed that the three antioxidant enzymes measured had strong correlation among each other and with the concentration of 4-hydroxyalkenals. Also, the concentration of malondialdehyde was correlated with the lipid peroxidation index, and the concentration of advanced oxidation protein products and 4-hydroxyalkenals. Overall the analysis indicated that the principal oxidative defense biomarkers in the supernatant of *A. sydowii* EXF-12860 at concentration of 5.13 M of NaCl are the high activity of glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase, and high concentrations of 4-hydroxyalkenals.

In summary, exposing of *A. sydowii* EXF-12860 to salinity stress resulted in oxidative stress particularly demonstrated by an increase in the level of the antioxidant enzymes and lipid peroxidation biomarkers. Here we noticed that the halophilic ascomycete EXF-12860 exploited its both non-enzymatic and enzymatic cellular oxidative stress defense systems to counteract the oxidative damage caused by NaCl at saturated concentrations.

3.4. Transcriptional expression of genes related to oxidative stress responses in *Aspergillus sydowii* EXF-12860

The transcriptome of *A. sydowii* EXF12-860 showed differentially expressed transcripts involved in antioxidant responses at 5.13 M versus 1 M NaCl (Table 1).

While seven catalase transcripts (*cat*) were differentially expressed, only two of them were strongly upregulated (logFC=11.27 and logFC=10.73). All catalase transcripts corresponded to the same gene, indicating that differential transcript usage occurred in the transcriptional reprogramming of *A. sydowii* EXF-12860 at high salinity. Also, different isoforms of genes encoding for cytoplasmatic (*sod1*) and mitochondrial (*sod2*) superoxide dismutases, and cystathionine gamma-lyase (*cse*) were upregulated. These results confirmed that differential usage of alternatively spliced mRNAs took place in *A. sydowii* EXF-12860 at Na⁺ saturated concentration. Genes encoding glutathione-S-transferase (*gst*), thioredoxin (*trx*), glyoxalase (*gly*), aconitase (*aco*), cytochrome P450 (*cyp*), and succinyl-CoA-3-ketoacid-coenzyme A transferase (*scot*) were also overexpressed. Interestingly, *oax* (logFC=5.24) and *ish1* (logFC=4.84) genes that code for auxiliary antioxidant enzyme and stress response sensor respectively, were upregulated.

These results confirm that salinity stress by 5.13. M NaCl resulted in oxidative stress in *A. sydowii* EXF-12860. Thus, this halophilic fungus upregulated the transcriptional expression of different genes involved in the oxidative stress defense. Our results suggest that the transcriptional reprogramming that occurred in EXF-12860 exposed to 5.13 M NaCl could have helped to overcome the imbalance between the cellular levels of oxidants (ROS) and antioxidants. In this context, catalases, superoxide dismutases, and glutathione reductases are enzymes with antioxidant effects that limit the damage of ROS (Sarikaya 2020). Glutathione reductases and glutathione-S-transferases play a key role in the glutathione redox cycle keeping adequate levels of reduced glutathione to connect to different ROS detoxification metabolic pathways (Aktaş 2005). Glutathione, recognized as the most important antioxidant molecule, is a tripeptide with crucial metabolic functions including detoxification of xenobiotics, iron-sulfur cluster biosynthesis, transport of amino acids, preservation of sufficient levels of cysteine, and peroxide detoxification, among others (Calabrese et al. 2017a). Reduced glutathione also serves as a bridge with other detoxification metabolisms reacting with hydroperoxides or lipid peroxides through the glutathione peroxidase. Although glutathione levels were not largely changed at 5.13 M NaCl, the overexpression of the glutathione reductase gene suggests that *A. sydowii* EXF-12860 installed a transcriptomic response to maintain reduced levels of glutathione in the fungal cell. Glutathione reductase converts glutathione from the oxidized to reduced form (Couto et al. 2016a). Glutathione peroxidase was not differentially expressed, probably because the hydroperoxide levels were smaller at 5.13 M than in 1.0 M NaCl (Figure 4E). This cytosolic reduced-glutathione-dependent peroxidase mediates the reduction of hydroperoxides formed in cells. Our biochemical and transcriptomic results point out that catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase together acted as a primary antioxidant defense system to protect *A. sydowii* EXF-12860 against peroxidant molecules at extreme salinity conditions.

Another antioxidant defense that showed upregulated genes in *A. sydowii* EXF-12860 was the thioredoxin system, which is involved in the removal of ROS, particularly H₂O₂. Thioredoxins sense the oxidative stress, keeping the thiol-related redox state and also activate signaling proteins such as peroxiredoxins and kinases (e.g. mitogen-activated protein kinases -MAPKs-) (Fujino et al. 2006b). Subsequently, peroxiredoxins also play an important role in stabilizing the thioredoxin redox balance (Matsuzawa 2017b). In addition, peroxiredoxins are involved in redox information

signaling and controlling cell metabolism (Liebthal et al. 2018b). Genes encoding peroxiredoxin, thioredoxin reductase, and thioredoxin family proteins, all involved in the thioredoxin system, were upregulated in *A. sydowii* EXF-12860 grown at 5.13 M NaCl.

Cysteine is a crucial amino acid for the cellular antioxidant cellular response as it is used in the synthesis of glutathione (Matsuzawa 2017b). Contrarily, homocysteine, which is derived from methionine, perturbs protein synthesis, contributes to the formation of ROS, and promotes hypermethylation reactions in the cell, which could disturb gene expression and regulation (Esse et al. 2019a; Richard et al. 2018). Thus, during oxidative stress it is crucial to efficiently reduce the levels of intracellular homocysteine which can be condensed with serine to form cystathionine by cystathionine β -synthase (CBS). Cystathionine is finally converted to cysteine via cystathionine gamma-lyase (CSE) (Esse et al. 2019a; Taysi et al. 2015b). We found that *cbs* and *cse* genes were upregulated by *A. sydowii* EXF-12860 during growth at salinity stress. As expected, homocysteine synthase genes (*cys*) were down regulated. These genes encode enzymes that catalyze the conversion of O-acetyl-L-homoserine into homocysteine in the methionine biosynthesis pathway (Esse et al. 2019a). Our results suggest that homocysteine synthesis is turned off, while the conversion of homocysteine into cysteine is transcriptionally activated. This strategy also evidences the antioxidant defense of this fungus at hypersaline conditions.

Finally, the glyoxalase system was also analyzed. The role of glyoxalases has been linked to stress response in eukaryotes contributing to confer tolerance to environmental stressors (Sankaranarayanan et al. 2017b). For example, they have been proposed as biomarkers for abiotic stress tolerance in plants (Kaur et al. 2014a). However, glyoxalases were primarily related to the detoxification pathway of methylglyoxal, a cytotoxic product of glycolysis. Glyoxalases catalyze the conversion of methylglyoxal into D-lactate using reduced glutathione as a cofactor (Thornalley 1990). It has been reported that various abiotic stresses including salinity and water deprivation increase intracellular concentrations of methylglyoxal, which is removed by glyoxalases encoded by *glyI* and *glyII* genes (Sankaranarayanan et al. 2017b). Glyoxalase I mediates the combination of methylglyoxal with reduced glutathione to form S-lactoylglutathione, which is later converted into D-lactate via glyoxalases II that also regenerates reduced glutathione (Crook and Law 1952b). We also found upregulated *glyI* gene that encodes S-D-lactoylglutathione lyase.

Moreover, we analyzed the transcription of genes related with the lipid oxidation as it is a process strongly induced by the oxidative stress (Busch and Binder 2017a). Five transcripts that corresponded to two different *scot* genes encode succinyl-CoA-3-ketoacid-coenzymeA transferase were differentially expressed (Table 1). While only one gene (transcript id: DN1270) was upregulated under salinity stress (logFC = 5.04), four isoforms of the other gene (transcript id: DN1899) were downregulated. This gene also showed a differential transcript usage. Succinyl-CoA-3-ketoacid-coenzymeA transferases are mitochondrial matrix enzymes with a central function in ketone body catabolism. The link between *scot* genes and oxidative stress has not been comprehensively studied. In the bacterium *Burkholderia pseudomallei*, a previous work has suggested that *scot* genes respond to external ROS (Chutoam et al. 2013a). Although it was hypothesized that succinyl-CoA-3-ketoacid-coenzymeA transferases are needed to transfer CoA from succinyl-CoA to oxidized lipid during oxidative stress, the mRNA levels of *scot* genes were downregulated in *B. pseudomallei*. The negative transcriptional regulation of *scot* genes may reduce the intracellular levels of acetoacetyl-CoA, and the reduction of NADH and FADH₂, which results in smaller amount of intracellular ROS (Chutoam et al. 2013a). So, it is not surprising that *A. sydowii* EXF-

12860 downregulated the transcription of four different transcripts encode for succinyl-CoA-3-ketoacid-coenzymeA transferases at hypersaline conditions.

Finally, *aox* gene encoding an alternative oxidase was upregulated at hypersaline condition (logFC = 5.25). Alternative oxidases, that are synthesized by a huge variety of plants, fungi, and some protists, constitute an alternative respiratory chain that confers resistance to different environmental stressors (Folgueira et al. 2020a; McDonald 2008a). These enzymes allow electron flow through the oxidative phosphorylation respiratory chain even in the presence of toxic levels of ROS that inhibit complexes III and IV. The activity of alternative oxidases is crucial when occurs an accumulation of complex III-derived O_2^- as a consequence of the oxidative stress (Warris and Ballou 2019b). It is known that *aox* genes are linked to fungal development under stress conditions (Barsottini et al. 2020b; Lin et al. 2019). In *Candida albicans*, alternative oxidatives are intimately involved in the yeast growth during exposure to fluconazole (Yan et al. 2009), while these enzymes are relevant during the growth of *A. fumigatus* (Grahl 2012; Kowalski et al. 2016) and *Botrytis cinerea* (Lin et al. 2019) under hypoxic conditions. Also, *aox* genes have been upregulated in several fungi such as *A. niger*, *Yarrowia lipolytica* (Honda et al. 2012), *A. fumigatus* (Yukioka et al. 1998b), *Hansenula anomala* (Minagawa et al. 1992a), and *Paracoccidioides brasiliensis* (Martins et al. 2011a) in response to oxidative stress or water deprivation.

Our results are consistent with those reported by (Petrovic 2006) who studied the transcriptional response in the halotolerant yeast *H. werneckii* during its growth at hypersaline conditions. In *H. werneckii*, the expression of genes encoding aconitase and Fe-S cluster protein (nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase) was increased at 17% NaCl. Also, these genes were transcriptionally upregulated in *A. sydowii* EXF-12860 at 5.13 M NaCl. Aconitase and NADH dehydrogenase function as mitochondrial redox balance sensors and they are one of the main molecular targets of ROS (Bulteau et al. 2003b). At the same time, aconitase, for example, is a key enzyme in the Krebs cycle, while NADH dehydrogenase is an important component of the complex I for electron flow during mitochondrial respiration. Thus, they may be overexpressed under high salinity conditions to maintain sufficient physiological levels of enzymes keeping switched on the Krebs cycle and preserving the signaling role as a redox state sensor, or to support the ATP production, respectively (Petrovic 2006). Similar results were also found in the proteome of *H. werneckii* exposed to 3.0 and 4.5 M NaCl (Vaupotic 2008).

Our biochemical and transcriptomic results point out that catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase together acted as a primary antioxidant defense system to protect *A. sydowii* EXF-12860 against peroxidant molecules at extreme salinity conditions. This halophilic ascomycete upregulated under Na^+ stress a set of genes that evidences the exploitation of an extensive antioxidant response that also included the systems of glutathione, thioredoxin, and glyoxalase. Figure 6 represents a cellular model with the antioxidant defense of *A. sydowii* EXF-12860 to NaCl saturated concentration.

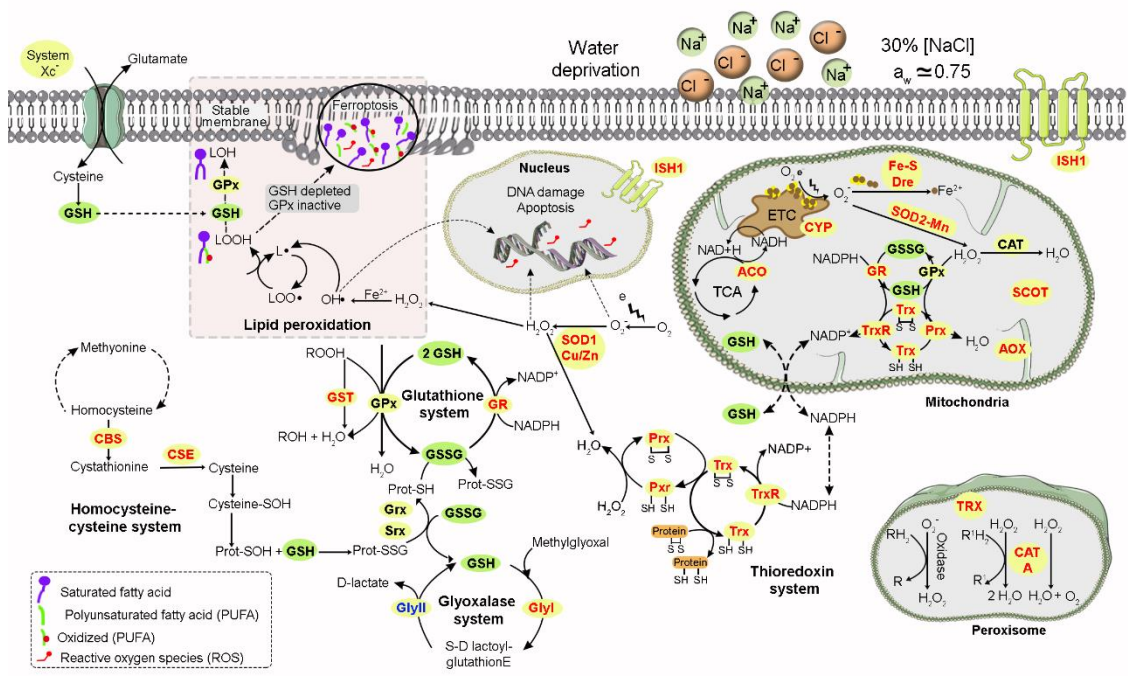


Figure 6. The cellular antioxidant defense model of *Aspergillus sydowii* EXF-12860 in saturated NaCl concentration.

Table 1. Transcriptomic expression of *Aspergillus sydowii* EXF-12860's genes related to oxidative stress responses induced by hypersaline condition.

Identificador de transcrito	Anotación	Identificador del gen	LogFC	FDR
TRINITY_DN892_c0_g1_i12	Catalase A	<i>catA</i>	11.27	4.46E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i4			10.73	6.37E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i3			-4.12	2.57E-03
TRINITY_DN892_c0_g1_i6			-5.08	2.69E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i11			-11.27	2.46E-08
TRINITY_DN892_c0_g1_i9			-11.94	2.53E-09
TRINITY_DN892_c0_g1_i10			-14.33	1.37E-11
TRINITY_DN1037_c0_g1_i5	Glyoxalase I	<i>gly1</i>	11.15	4.82E-04
TRINITY_DN1037_c0_g1_i4			10.4	9.77E-04
TRINITY_DN2716_c0_g2_i1			3.85	5.32E-02
TRINITY_DN1197_c0_g1_i1	Cystathionine gamma-lyase	<i>cth</i>	10.51	8.67E-04
TRINITY_DN1197_c0_g1_i7			7.2	3.63E-06
TRINITY_DN1197_c0_g1_i6			3.66	8.26E-03
TRINITY_DN2112_c0_g1_i19	Cytochrome P450 alkane hydroxylase	<i>cyp</i>	9.84	9.10E-07
TRINITY_DN3588_c0_g1_i1	Cytochrome P450	<i>cyp</i>	6.65	4.76E-06
TRINITY_DN2010_c0_g1_i16			4.89	3.88E-04
TRINITY_DN2010_c0_g1_i10			4.65	7.22E-04
TRINITY_DN312_c0_g1_i9			-4.57	1.59E-03
TRINITY_DN312_c0_g1_i2			-3.67	8.32E-03
TRINITY_DN4029_c0_g1_i2	Aconitate hydratase	<i>aco1</i>	8.88	7.12E-06
TRINITY_DN1574_c0_g1_i2	Alternative oxidase-domain-containing protein	<i>aox</i>	5.25	1.47E-04
TRINITY_DN1793_c0_g1_i1	Fe-S cluster assembly protein dre2	<i>dre2</i>	5.24	1.51E-04
TRINITY_DN10053_c1_g1_i1	Peroxisredoxin 6	<i>prdx6</i>	5.2	1.89E-04
TRINITY_DN2598_c0_g1_i4	Cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase	<i>sod1</i>	5.01	2.74E-04
TRINITY_DN2598_c0_g1_i3			4.38	1.66E-03
TRINITY_DN1168_c0_g2_i5	Stress response protein putative	<i>ish1</i>	4.84	8.67E-04
TRINITY_DN681_c0_g1_i14	Glutaredoxin/glutathione-dependent peroxiredoxin	<i>prx1</i>	4.73	7.03E-04
TRINITY_DN1443_c0_g1_i3	Tiorredoxin-like protein	<i>trx</i>	4.39	1.36E-03
TRINITY_DN1443_c0_g1_i3			-5.45	2.93E-04
TRINITY_DN2569_c2_g2_i1	Glutathione S-transferase	<i>gst</i>	4.19	2.90E-03
TRINITY_DN9329_c0_g1_i1			-4.15	5.47E-03
TRINITY_DN473_c0_g1_i3			-10.53	1.67E-07
TRINITY_DN902_c0_g1_i5	Superoxide dismutase [Mn] mitochondrial	<i>sod2</i>	4.21	3.20E-03
TRINITY_DN902_c0_g1_i4	Superoxide dismutase Fe-Mn family	<i>sod2</i>	3.65	7.90E-03
TRINITY_DN2375_c0_g1_i2	MAP kinase kinase kinase	<i>ask 1</i>	-3.8	5.87E-03
TRINITY_DN38_c0_g1_i5	Homocysteine synthase	<i>cysD</i>	-3.84	7.67E-03
TRINITY_DN50_c0_g1_i16			-6.25	8.00E-05
TRINITY_DN1899_c0_g1_i4	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	<i>scot</i>	-4.23	2.02E-03
TRINITY_DN1899_c0_g1_i2			-5.14	2.47E-04
TRINITY_DN1899_c0_g1_i5			-9.54	1.81E-06
TRINITY_DN1899_c0_g1_i6			-9.57	1.71E-06
TRINITY_DN298_c0_g1_i11	Glyoxalase II (Hydroxyacylglutathione hydrolase)	<i>gly2</i>	-4.45	1.78E-03
TRINITY_DN1341_c0_g1_i2	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	<i>ipda</i>	-8.91	9.70E-06

4. Conclusions

In conclusion, our results reflect that water deprivation by high NaCl concentrations (e.g. saturated salt conditions) have an important impact in the cell morphology of *A. sydowii* EXF-12860 that includes an extensive morphological remodeling to face salt stress. To the best of our knowledge, this is the most comprehensive analysis of a formal morphological description in a halophilic filamentous ascomycete.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used “Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.” please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Funding: This research was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico (Conacyt): Project Conacyt Vocaciones Científicas 1004; Project Conacyt-SEP-CB-285816; Project Conacyt-DADC-311684.

Acknowledgments: IJ-G and GV-M received a PhD fellowship from Conacyt. Authors thank a lot the technical HPLC facilities received from the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (Campus Cuernavaca, Morelos, Mexico). We thank specially to José Raunel Tinoco Valencia for his assistance during HPLC determinations. Also, we appreciate the technical support obtained from the Laboratorio Nacional de Microscopía, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (Ensenada, Baja California, Mexico). Authors would thanks to Heidy Peidro-Guzmán, Deborah González-Abradelo, Lyselle Ruíz de León, Lucía Perezgasga Ciscomani, Adriana Otero Blanca and Ayixon Sánchez Reyes for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Tracking gene expression, metabolomics and biochemical analysis in the halotolerant basidiomycetous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 during benzo [a] pyrene and phenanthrene biodegradation under hypersaline conditions

Liliana Martínez-Ávila¹, Heidy Peidro-Guzmán¹, Yordanis Pérez-Llano¹, Tonatiuh Moreno-Perlín¹, Nilda C. Sánchez-Castellanos², Maikel Gilberto Fernández-López¹, Ayixon Sánchez-Reyes³, Lyselle Ruíz de León¹, Giselle Valdés-Muñoz¹, Deborah González-Abradelo¹, Elisabet Aranda⁴, Gabriela Ángeles de Paz⁴, Verónica Lira-Rúan¹, Arline Fernández-Silva¹, Clementina Pozo⁴, Sonia Dávila-Ramos¹, Jorge Luis Folch-Mallo⁵, María del Rayo Sánchez-Carbente⁵, Hubert Cabana⁶, Nina Gunde-Cimerman⁷, Ramón Alberto Batista-García^{1*}

¹Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. Mexico. ²Centro de Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. Mexico. ³Cátedras Conacyt – Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. Mexico. ⁴Instituto Universitario de Investigación del Agua. Universidad de Granada. Granada. Spain. ⁵Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. Mexico. ⁶Faculté de Génie. Université de Sherbrooke. Sherbrooke, Quebec. Canada. ⁷Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Ljubljana. Slovenia.

*Corresponding author

Ramón Alberto Batista-García, PhD

Centro de Investigación en Dinámica Celular. Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Ave. Universidad 1001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. Mexico. CP 62209.

E-mail: rabg@uaem.mx, rbatista25@yahoo.com

Telephone: +52-777-3297020

Running title: PAH degradation by the halotolerant *R. mucilaginosa*

1. Introduction

Bioremediation is considered an eco-friendly, efficient and safe technology for the restoration of polluted ecosystems. It is based on the microbial ability to transform xenobiotics (e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons -PAHs-) (Varjani, 2017; Abd-Elmonsef and Khalil, 2018; Abdel-Shafy and Mansour, 2018; Srivastava and Kumar, 2019). Fungi are well established as promising microbes for bioremediation due to their capability to degrade environmentally recalcitrant compounds (e.g. benzo [a] pyrene -BaP- and phenanthrene -Phe-) (Prenafeta-Boldú et al., 2019; Srivastava and Kumar, 2019; Dacco et al., 2020). While filamentous fungi have been extensively studied as PAHs-bioremediating agents, yeasts emerged later as aromatic compound-utilizing microorganisms (Garapati and Mishra, 2012; Hashem et al., 2018; Yaguchi et al., 2020). Many yeast species have shown their potential for pollutant removal (e.g. PAHs, phenolic compounds, radioactive wastewaters), in particular those belonging to the genera *Aureobasidium*, *Candida*, *Exophiala*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* (now *Cutaneotrichosporon*) and *Yarrowia* (Jarboui et al., 2012; Margesin et al., 2014; Abd-Elmonsef and Khalil, 2018; Abdel-Shafy and Mansour, 2018; Deeba et al., 2018; Hashem et al., 2018; Tkav et al., 2018; Prenafeta-Boldú et al., 2019; Shuryak et al., 2019; Belloch et al., 2020; Yaguchi et al., 2020).

PAH biodegradation rates are influenced by different environmental conditions (Gupta et al., 2015; Guarino et al., 2017; Oluwadara et al., 2017). Many PAHs-polluted ecosystems (e.g. estuaries, hypersaline brines, oil-based drilling muds) are characterized to posse salts (e.g. NaCl) at different concentrations (McGenity, 2016). In these ecosystems, the stress generated by low water activity could hinder hydrocarbon biodegradation, since it extensively restricts microbial growth, decreases oxygen solubility, and affects the chemical properties of organic xenobiotics. Thus, halotolerant fungi (including yeasts) represent promising candidates for the implementation of bioremediation strategies in hypersaline conditions, or even at other (poly)extreme conditions (Jiang et al., 2015,

2016; Bano et al., 2018; Kamyabi et al., 2018; Tkavc et al., 2018; Ali et al., 2019; González-Abradelo et al., 2019; Shuryak et al., 2019).

Here we used transcriptomics, metabolomics and different biochemical and toxicological tests to analyze the mechanisms of PAHs biodepletion by the halotolerant basidiomycetous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 when grew at hypersaline conditions (1.0 M NaCl) with Phe and BaP as sole carbon sources. Phe and BaP are widely distributed polyaromatic contaminants in nature, which exhibit high toxicity, mutagenicity and carcinogenicity (Haritash and Kaushik, 2009). There is scarce information on metabolomics and genome-scale transcriptomic responses used by yeast to deplete and detoxify organic xenobiotics, and in particular (poly)aromatic compounds (Blasi et al., 2017; Kamyabi et al., 2018; Kashyap et al., 2020). To the best of our knowledge, no previous work has been published describing a metabolomics and transcriptomics analysis on PAH degradation by yeast.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strain and molecular identification

The halotolerant basidiomycetous red yeast *R. mucilaginosa* EXF-1630 used in this study was isolated from an Arctic glacier in Kongsfjorden, Spitsbergen, Svalbard (Norway). The yeast strain was grown and maintained on Yeast-Nitrogen Base (YNB, Qbiogene) with 0.5% ammonium sulphate and 2% glucose (YNG medium). It was preserved in 20% glycerol at -80 °C in the Ex-Culture Collection of the Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana (Slovenia). For molecular taxonomical identification, 24 highly conserved protein markers (alaS, cgtA, coaE, gmk, pgk, rplB, rplC, rplD, rplE, rplF, rplI, rplP, rplO, rplQ, rplW, rpmA, rpmL, rpsB, rpsI, rpsK, rpsL, rpsM, rpsP, tsf (Ren et al., 2016)) were extracted from the strain transcriptome and from other 27 genomes of the Sporidiobolaceae family. The sequences were concatenated and aligned with MAFFT software version 7.310 with default settings (Katoh et al., 2013). Gblocks version 0.91b was used to eliminate poorly aligned regions from the multiple sequence alignment (Castresana, 2000). Phylogenetic reconstruction was inferred from the multiple sequence alignment under a generalized time-reversible model using FastTree software version 2.1.10 under the maximum-likelihood approach (Price et al., 2010). Other options were set as default. Figtree version 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) was used to display the summarized and annotated tree produced by the reconstruction step.

2.2. NaCl tolerance and polycyclic aromatic hydrocarbon utilization by *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630

A two-days-old pre-culture of *R. mucilaginosa* EXF-1630 incubated at 28 °C and 150 rpm was obtained in 10 mL of YNG medium. Cells were recovered by centrifugation at 10,000×g for 10 min

at 4 °C and resuspended in saline solution (0.85%). Ten microliters of cell solution ($OD_{600\text{ nm}} = 0.2$) were used as inoculum for the halotolerance experiments, and for the primary screening of PAH utilization. Halotolerance of *R. mucilaginosa* EXF-1630 was determined on YNG agar medium supplemented with different NaCl concentrations: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 and 5 M. Cultures were incubated at 15 °C and 28 °C.

The strain was also screened for growth on hypersaline (1 M NaCl) solid minimal medium supplemented with 1,8-diaminonaphthalene (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S., Catalogue D21405), fluorene (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S., Catalogue 128333), anthracene (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S., Catalogue A89200), Phe (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S., Catalogue P11409), pyrene (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S., Catalogue 185515), BaP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S., Catalogue B1760), or a mixture of Phe and BaP (1:1), using different final hydrocarbon concentrations (10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 and 500 ppm) as sole carbon sources. The composition of the used minimal medium can be found in González-Abradelo et al. (2019). A culture on 2% glucose was included as control. Cultures were incubated at 28 °C for 10 days and a photographic record of the colonies was taken daily.

The growth kinetics were determined in hypersaline (1 M NaCl) liquid minimal medium supplemented with 2% glucose, Phe, BaP, or a mixture of Phe and BaP (1:1) as sole carbon sources. PAHs were used at 100 ppm final concentration. Five hundred milliliter flasks containing 150 mL of minimal medium were inoculated to a starting $OD_{600\text{ nm}}$ of 0.2. Absorbance at 600 nm was measured daily for 10 days using a Biotek[®] Epoch[™] microplate spectrophotometer. Biomass productivity and growth rate were determined.

All experiments were made in triplicates ($n = 3$).

2.3. Phenotype characterization of *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 during polyaromatic hydrocarbon exposure

The microscopic analysis was performed using yeast cells exposed to Phe, BaP, a mixture of Phe and BaP (1:1, 100 ppm final concentration), and 2% glucose in hypersaline liquid medium as previously described. Yeast cells were observed on a Zeiss Axio Observer microscope with a 100× DIC objective (Carl Zeiss Microscopy, 440782-9902-000) (Zeiss Corp., Thornwood, New York, U.S.). The images were captured with an AxioCamMR3 camera (Zeiss Corp., Thornwood, New York, U.S.) connected to the microscope and exported using the ZEN 2012 (blue edition) software version 1.1.1.0. Images from 25 microscopic fields were taken to quantify the number of cells, the number of budding cells per microliter, and cell size expressed in μm^2 . ImageJ 1.52p (Wayne Rasband National Institute of Health, U.S.; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) was used to analyze the images quantitatively.

Changes in the hydrodynamic radius and Z-potential of three-days-old cultures of *R. mucilaginosa* EXF-1630 in presence of Phe and BaP at hypersaline conditions were measured by Dynamic Light Scattering (DLS). Measurements were performed on a Malvern Zetasizer Nano ZSP Spectrophotometer (Malvern Panalytical, Taren Point, Australia) with a scattering angle of 173°. Three runs with 10 scans of 10 seconds each were obtained for each measured data point, then three sequential points were used to calculate the variation in the measurements. The data were used to obtain translational diffusion coefficients through the measurement of the correlation coefficient. Hydrodynamic radius was obtained from the translational diffusion coefficient, via the Stokes-Einstein equation. Results were treated using the Malvern software Zetasizer Nano DTS version 5.10.

2.4. Biochemical characterization of the biodegradation of phenanthrene and benzo [a] pyrene under hypersaline conditions by *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630

A two-days-old pre-culture of *R. mucilaginosa* EXF-1630 was obtained, and yeast cells were collected as previously mentioned. Then, cells were washed three times with saline solution (0.85%), and incubated at 28 °C and 150 rpm for 18 h to deplete nutrients accumulated during the yeast growth in YNG medium. Cells were recovered by centrifugation as previously described. Liquid cultures in 250 mL flasks containing 50 mL of minimal medium, 1 M NaCl, and a mixture of Phe and BaP (1:1, 100 ppm as final concentration) were inoculated to a starting OD_{600 nm} of 0.2. Cultures were incubated at 28 °C and 150 rpm for 10 days.

Total removal, bioadsorption, and biodegradation of Phe and BaP were quantified at 2, 4, 6, 8, and 10 days of PAHs exposure using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS). The analytical procedure is described in González-Abradelo et al. (2019). Briefly, solvent extractions using 2 mL of mass-spectrometry (MS) grade hexane from supernatants and cells were performed after yeast growth with PAHs. Abiotic controls with and without PAHs were implemented. Bioadsorption, biodegradation and total removal were determined as described in González-Abradelo et al. (2019).

The pH was determined in each sampling point. Also, changes in the chemical oxygen demand (COD) were measured using *AccuSPEC* COD Digestion Tubes kit (SCP Science, California, U.S., Catalogue 250-130-026) according to manufacturer instructions. Enzymatic tests were conducted to determine laccase, peroxidase, and un-specific peroxygenase activities in the supernatants of yeast treatments (Camacho-Morales et al., 2018; González-Abradelo et al., 2019). NADPH-cytochrome *c* reductase activity was quantified using an NADPH assay kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S., Catalogue CY0100). One International Unit (IU) of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme per milligram of protein catalyzing the oxidation of 1 mmol of substrate per minute.

Three independent experiments were made with three technical replicates each one (n = 9). All experimental determinations were also performed in triplicate for each sample.

2.5. Toxicological evaluation after polycyclic aromatic hydrocarbon removal by *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630

Residual concentrations of Phe and BaP after 10-days yeast treatment, as well as those possible toxic intermediate metabolites, were extracted with hexane and ethyl acetate from 10 mL of treated supernatants. Three consecutive extractions were performed for each case. Two milliliters concentrated fractions were prepared after solvent evaporation at 40 °C, and metabolites were resuspended in 1 mL of methanol. Extracts from non-inoculated flasks with or without PAHs (controls) were also included in the toxicological tests. Toxicity was determined on four different systems: the moss *Physcomitrium patens* (named before as *Physcomitrella patens*), the luminescent bacteria *Allivibrio fischeri*, whole blood human cells, and the cell line A549 (pulmonary epithelial cells).

Assays on *P. patens* were performed as described in Peidro-Guzmán et al. (2020). Briefly, fresh *P. patens*' colonies were incubated for 44 days in the presence of the enriched fractions obtained from the culture after yeast growth with PAHs. The relative growth rate of *P. patens* was determined from a photographic record of the moss colonies (Medina-Andrés et al., 2015). Toxicological assays using pure solvents (hexane and methanol) were implemented as controls. Nine moss explants were used in each test while experiments were conducted in triplicate (n = 27).

The Microtox® bioassay was used to measure acute toxicity of the PAHs' supernatant samples after yeast treatment, based on changes over the luminescence of bacteria *Allivibrio fischeri* (Microtox® Model 500 Toxicity Analyzer, Analytic Instrumentation S.A. Madrid, Spain). The toxicity was expressed as the concentration which produces a 50% light reduction on *A. fischeri* after 5 and 15

min of exposure (EC50), according to published protocols (Qureshi et al., 1982; Guisado et al., 2016).

Toxicity after yeast treatment was also analyzed using red blood human cells and pulmonary epithelial cells (cell line A549) according to Lackey et al. (1999) and Uliasz et al. (2000) respectively. Erythrocyte hemolysis and dead pulmonary cells (expressed in percentages) were determined when a whole blood sample and the cell line A549 were exposed to treated and non-treated supernatants by *R. mucilaginosa* EXF-1630. Microscopy preparations were made to observe cellular changes due to exposure to treated and non-treated supernatants by the strain EXF-1630. Blood human cells were observed from a cell smear using a bright-field microscope (Zeiss Corp., Thornwood, New York, U.S.), while pulmonary epithelial cells were observed using an inverted microscope (Zeiss Corp., Thornwood, New York, U.S.). In all experiments, negative and positive controls were implemented as previously mentioned. Experiments were performed in triplicates and three experimental determinations were made for each sample (n = 9).

2.6. Metabolomics studies in Rhodotorula mucilaginosa EXF-1630 during PAHs biodegradation under hypersaline conditions

Metabolites were extracted from 10 mL of supernatant samples. Three equal volumes of MS grade ethyl acetate were added and the solvent was removed using a rotary evaporator at 40 °C. Samples were concentrated in 1 mL of MS grade methanol (Wunder et al., 1997). For extraction of intracellular metabolites, yeast cells were resuspended in 3 mL of MS grade water until its complete homogenization followed by sonication for 10 min. Lysis Matrix E tubes (MP Biomedicals™, California, U.S., Catalogue 116914050-CF) and a FastPrep-24™ 5G homogenizer (MP Biomedicals™, California, U.S.) were used to disrupt cell walls and cytoplasmic membranes. After that, 2 mL of the lysed cell samples were mixed with 10 mL of MS grade acetone for 20 min. After

adjusting to a pH 2.0 (using 1 N HCl), samples were sonicated for 10 min and centrifuged at 14,000×g for 10 min. The solvent was removed using a rotary evaporator, and samples were collected as mention before using 1 mL of methanol (Wunder et al., 1997).

The experiment was performed in triplicates and three experimental determinations were made for each sample (n = 9).

Chromatographic analysis of the metabolites was made using an UHPLC Acquity I-Class System (Waters, Milford, U.S.) connected to a Synapt-G2-HDMS mass spectrometer (Waters, Milford, U.S.). A Waters Cortecs® C-18 2.7 µm column (100 mm; Waters, Milford, U.S.) was used. The method conditions included a mobile phase A: H₂O with 0.1% NH₃ and B: acetonitrile with 0.1% ammonia, in a gradient flow rate of 0.350 L/min (initial 0% B; 5 min 70% B; 5,1 min 100% B; 6,6 min 0% B; 10 min 0% B) with 10 min as the run time. The column temperature was set at 40 °C and 5 µL of each sample was injected. Z-Spray electrospray ionization interface was working in negative (ESI-) and positive ion (ESI+) mode with reference capillary voltages at 2.1 kV and 2.5 kV, respectively. The source temperature was set at 100 °C and the desolvation temperature at 500 °C. The spectrum analysis, the metabolites analysis, the m/z value and error calculation, as well as the control of the equipment was made by the MassLynx software (version 4.1, Waters Milford, U.S.). The m/z value of each ion mass was used to retrieve metabolites using the online databases and bibliography previously reported with the following parameters: Mass Chromatogram Window 10.0 ppm, mass tolerance 30 ppm and Monoisotopic Mass Mode for the structure prediction.

2.7. Transcriptomics of Rhodotorula mucilaginosa EXF-1630 during PAHs biodepletion under hypersaline conditions

Three-days-old cultures of *R. mucilaginosa* in presence of Phe and BaP (1:1, 100 ppm final concentration) or 2% glucose -control- at hypersaline conditions (1 M NaCl) were obtained. Cells

were collected as previously described, and ground in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using the TRIzol extraction method (Thermo Fisher Co., U.S., 15596026), and a quality check (RNA integrity number (RIN) > 7) was performed with the Agilent 2100 Bioanalyzer. The samples were subject to rRNA depletion followed by fragmentation, first- and second-strand cDNA synthesis, adenylation of 3' ends, adapter ligation, DNA fragmentation enrichment, and real-time PCR quantification. Samples were sequenced (2×150 bp paired-end) on the Illumina HiSeq-2500 platform by ABM Company (Vancouver, Canada). Three replicates were sequenced for each study condition (n = 3).

After demultiplexing, sequences were processed to remove low-quality reads and trimmed to remove adaptors using Trimmomatic version 0.39 (Bolger et al., 2014). Highly overrepresented sequence reads were eliminated using a custom python script. Read sequencing errors were converted to the most probable nucleotide using rCorrector (Song and Florea, 2015). The resulting sequence reads from each sample were pooled to perform *de novo* transcriptome assembly using Trinity version 2.10.0 (Grabherr et al., 2011). Transcriptome quality was estimated by assessing completeness using BUSCO version 4.0.5 (Seppey et al., 2019). Functional annotation of the predicted transcripts was carried out using Blast2GO in OmicsBox (Biobam Bioinformatics, 2019). Briefly, a blast search against the Fungi section in nr database was conducted and gene ontology (GOs) were transferred from resulting hits. InterPro annotations were also retrieved and GOs merged with the previous annotation.

Transcript abundance estimation was conducted using kallisto v0.46.1 (Bray et al., 2016). Estimated read counts were normalized using RUVseq (Risso et al., 2014) and differential expression analysis was conducted using DESeq2 version 1.29.5 (Love et al., 2014). The set of differentially expressed transcripts was used for GO enrichment using Blast2GO in OmicsBox (Biobam Bioinformatics, 2019). Blast2GO uses over-representation analysis to estimate the false discovery rate (FDR) of GO enrichment using a Fisher exact test. Pathway enrichment analysis was conducted using the Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) annotations obtained by GhostKOALA (Kanehisa et al., 2016).

2.8. Genomic analysis of xenobiotics metabolism and biodegradation in yeasts

Sixty-one yeast genomes deposited in MycoCosm database (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) were analyzed and the number of genes annotated to 31 KEGG biological processes related to xenobiotic degradation was identified (Supplementary material, Table 1) (Kanehisa et al., 2016).

The number of enzyme genes in each pathway was used for clustering analysis by the UPGMA method using Jaccard distance. A heatmap showing normalized values was obtained using the vegan package in R (Oksanen et al., 2007). Also, a non-metrical multidimensional scaling analysis (NMDS) was performed to reduce the data to a three-dimension space without value autotransformation using the global model in the monoMDS function of vegan package.

2.9. Statistical calculations

Simple ANOVA tests were performed to determine significant differences in data ($p < 0.05$). Hartley-Cochran-Bartlett and Kolmogorov-Smirnov tests were conducted to demonstrate the variance homogeneity and the normal distribution of data. A post hoc analysis (Tukey HSD and Duncan tests) was used to establish the order of the ANOVA differences. Figures show the average of at least three replicates and the standard deviations. All statistical calculations were made on GraphPad version Prism8 (<https://www.graphpad.com>). In particular, statistical determinations related to transcriptomic studies were performed using R package.

3. Results and discussion

3.1. Polyphasic identification of *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630

Phylogenetic reconstruction of the strain EXF-1630 isolated from an Arctic glacier in Kongsfjorden, Spitsbergen, Svalbard (Norway) shows that EXF-1630 was placed in a *Rhodotorula mucilaginosa* 's cluster with high branch support (Figure 1). The phylogeny based on a multiple sequence alignment of concatenated 24 highly conserved markers (Ren et al., 2016), clearly revealed the taxonomic position of this yeast strain. *R. mucilaginosa* EXF-1630 was closely related to *R. mucilaginosa* CYJ03, a psychrotolerant and halotolerant yeast isolated from a water sample of the northern Yellow Sea of China (Tang et al., 2020).

EXF-1630 produced red/orange-like colored colonies on YNG (Figure 2A), Sabouraud and Malt Extract agar media (data not shown). This is a distinctive characteristic of *Rhodotorula* species which supports the taxonomic allocation of the strain to this genus (Wang et al., 2016; Tang et al., 2020). The minimal medium used in this study inhibited the carotenoid synthesis as evidenced by the loss of pigmentation (Figure 2B). Microscopic characterization showed that EXF-1630 is a unicellular budding yeast (no pleomorphic growth was found under the tested conditions), ovoidal, and a strictly aerobic organism. A polyphasic taxonomy approach for which micro-, macro-morphological, and physiological characteristics of EXF-1630 were examined, confirmed the molecular identification (data not shown).

3.2. *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 is a halotolerant yeast capable to grow on a wide variety of polycyclic aromatic hydrocarbons as sole carbon sources

The growth of *R. mucilaginosa* EXF-1630 displayed red/orange-like pigmented colonies with a high tolerance to NaCl at 15 °C and 28 °C (Figure 2A). High salt concentrations (> 1.5 M NaCl) negatively influenced pigment production in this strain. The yeast growth on 2 M NaCl was weaker at 15 °C than at 28 °C, and no growth was detected at higher salt concentrations at 28 °C.

R. mucilaginosa is a red-pigmented and saprophytic basidiomycete yeast widely distributed in nature, belonging to Sporidiobolaceae family (Wang et al., 2016). Several extremotolerant *R. mucilaginosa* strains have been isolated from many environmental sources including hypersaline and cold environments (e.g. salterns, hypersaline lakes, Antarctic and Arctic coasts, snow, glacial ice) (Gunde-Cimerman et al., 2005; de Menezes et al., 2019; Perini et al., 2019; Rafiq et al., 2019; Zajc et al., 2019). Both, salt- and cold-adapted yeasts share several physiological adaptations since fungal strategies to endure low temperature and salt stress seem to be closely related (Gunde-Cimerman et al., 2005; Collins and Margesin, 2019). *R. mucilaginosa* EXF-1630 isolated from a Norwegian glacier displayed both, halotolerant and psychrotolerant behavior (Figure 2A). *R. mucilaginosa* strains are also commonly found in highly toxic polluted environments such as heavy metal-contaminated mine drainage wastes, oil- and polyaromatic compounds-contaminated soils, water effluents from olive mills, and municipal wastes, among others (Chandran and Das, 2012; Irazusta et al., 2012; Ilyas et al., 2016; Liu et al., 2017; Hesham et al., 2018a; Mikolasch et al., 2019; Zajc et al. 2019). These anthropogenically polluted environments frequently exhibit various extreme conditions in addition to the organic and inorganic contaminants. *R. mucilaginosa* species has potent oxidative biodegradation pathways for xenobiotics metabolism, and a high ability to survive and grow on concentrated cytotoxic chemicals (Addis et al., 2016). Many strains of *R. mucilaginosa* also show a polyextremotolerant profile to low pH, temperature (0.5 to 37 °C), high levels of ionizing radiation and oxidative stress, multiple tolerance to heavy metals (e.g. Ni, Cd, Cr, Cu, Hg), and oligotrophic conditions (Addis et al., 2016; Liu et al., 2017; Tkavc et al., 2018; Zajc et al., 2019). Thus, *R. mucilaginosa* has emerged as a promising non-conventional yeast with attractive features for xenobiotics biodepletion under harsh environmental conditions (e.g.

hypersalinity) due to its high phenotypic plasticity (Deligios et al., 2015; Addis et al., 2016). With this in mind, we focused our attention on the growth of *R. mucilaginosa* EXF-1630 in presence of PAHs at hypersaline conditions (1 M NaCl).

A preliminary screening based on the EXF-1630 ability to grow on low- and high-weight PAHs at 1 M NaCl showed that this yeast strain successfully grew on a structurally diverse group of polyaromatic compounds as sole carbon sources (Figure 2B). Apparently, PAHs are as good carbon sources as glucose given that growth on any of the tested PAHs is similar to that on glucose (Figure 2B). Moreover, the growth of this strain was not negatively influenced by high concentrations of PAHs (e.g. 100 ppm) which impose an extremely toxic cellular context. Yeast growth was exhibited up to 500 ppm of the tested PAHs at hypersaline conditions. Yeast colonies showed a scattered appearance and irregular contours on 200 and 500 ppm of PAHs (Figure 2B). EXF-1630 assimilated 1,8-diaminonaphthalene which is an NH₂-substituted PAH recalcitrant to biodegradation (Verjani, 2017; Srivastava and Kumar, 2019). Strain EXF-1630 also grew on a mixture of Phe and BaP at different final concentrations (Figure 2B). These results display the high catalytic capacity of this yeast strain to assimilate heterocyclic aromatic compounds under hypersaline conditions. The potential utility of EXF-1630 in bioremediation was also highlighted by its ability to assimilate a set of PAHs with different hydrophobic properties. Thus, *R. mucilaginosa* EXF-1630 could be classified as a halotolerant-toxicotolerant yeast.

Based on the previous results, the growth kinetic of EXF-1630 in hypersaline (1 M NaCl) liquid medium supplemented with Phe, BaP, or a mixture of them was examined (Figure 2C). The biomass productivity and growth rate were determined under the same conditions (Figure 2D and E). Phe and BaP have been recognized as low- and high-weight model PAHs that contain three- and five-benzene rings, respectively (Verjani, 2017; Srivastava and Kumar, 2019). The angular arrangement of their aromatic rings imposes severe restriction in the biodegradative processes in comparison with those PAHs that possess linear topology (Srivastava and Kumar, 2019). These

PAHs are also considered model polyaromatic compounds because they induce high levels of oxidative stress in various life forms (Verjani, 2017; Srivastava and Kumar, 2019).

Cell proliferation did not show differences when *R. mucilaginosa* EXF-1630 grew with PAHs or glucose as sole carbon source after 10 days of culture (Figure 2C). This fact confirms that EXF-1630 can indistinctly assimilate glucose and PAHs to support its growth (Figure 2B and C). An initial adaptation phase (lag phase) was not observed when the yeast was cultured with Phe. At day three the yeast growth was slightly lower in culture medium supplemented with BaP. Growth on Phe was slightly better than on BaP, glucose, or the mixture of both PAHs at day seven and eight. Biomass productivity and growth rate were similar in all studied conditions with no statistically significant differences (Figure 2D and E).

EXF-1630 had similar biomass productivity in the presence of Phe, BaP, or a mixture of both. Similar results have been previously observed when *R. taiwanensis*, *R. ingeniosa*, *Candida pseudointermedia* and *Yamadazyma mexicana* were exposed to octane and pyrene (Hashem et al., 2018). The growth rates showed by EXF-1630 in the studied conditions were similar with those reported for a wastewater-derived *R. mucilaginosa* grown in presence of phenolic compounds (Jarboui et al., 2012). A recent study that screened the assimilation of six aromatic compounds by 36 yeasts found that the highest absorbance at 600 nm was 0.5, a much lower value than those attained by EXF-1630 (Figure 2C) (Yaguchi et al., 2020). The same study also demonstrated that many yeasts (e.g. *R. araucariae*, *R. borgoiensis*, *R. dairenensis*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis*, *Rhodospordiobolus ruineniae*, *Solicoccozyme phenolicus*, *Sporobolomyces johnsonii*, *Occultifur extemus*, *Yarrowia lipolytica*) produced the same density of biomass in presence of certain aromatic compounds than in media supplemented with glucose. This observation was also corroborated for EXF-1630 (Figure 2D and E).

Rhodotorula mucilaginosa has been extensively studied for its ability to deplete persistent anthropogenic pollutants such as PAHs, phenols, dimethyl phthalates esters, and heavy metals

(Jarboui et al., 2012; Irazusta et al., 2012; Wang et al., 2013; Wang et al., 2016a; Hesham et al., 2018; Belloch et al., 2020). Recently, a *R. mucilaginosa* strain isolated from a subsoil groundwater sample contaminated by hydrocarbons showed high capacity to degrade naphthalene, fluorene, and octane (Belloch et al., 2020), and another strain (KKU-A29) was efficient in transforming toluene (Hesham et al., 2018). In another study, an *R. mucilaginosa* strain isolated from oil mill wastewater could efficiently assimilate phenolic substrates (e.g. tyrosol, gallic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid and protocatechuic acid) (Jarboui et al., 2012). However, not all *R. mucilaginosa* strains express desired phenotypes to metabolize aromatic compounds. For example, *R. mucilaginosa* CBS 349 isolated from smut-infected leaves poorly metabolized syringate and ferulate (Yaguchi et al., 2020).

R. mucilaginosa EXF-1630 cells showed sarcina-like packed morphology in the presence of PAHs (Figure 3A-C). The number of budding cells is favored in the culture medium with Phe, while it is lower in the media with BaP or glucose (Table 1). The presence of polyaromatic hydrocarbons in the culture did not significantly affect the cell size or general morphology when compared to the control medium (glucose). These results contrast from those obtained by Patel et al. (2017) and Deeba et al. (2018) where phenol and PAHs increased the cell size of *Rhodospiridium kratochvilovae* and *Cryptococcus psychrotolerans* in response to (poly)aromatic compound stress.

The biophysical characterization of the cultures evidenced that hydrodynamic radius, and in consequence, the polydispersity index largely changed during the experiment (Figure 3D and E). No specific tendency was observed for these parameters. In contrast, Z-potential clearly showed a lineal decrease during the 10 days (Figure 3F). These experiments suggest that the cellular system is not homogeneously distributed in the studied conditions. Probably, the irregular sarcina-like arrangement contributes to the large variations of the hydrodynamic radius and polydispersity index. Phe and BaP did not affect the electrokinetic potential of cells in comparison with glucose,

and as cell dimensions are not changing, this result suggests that no extensive modification of cell wall structure is occurring as its electrochemical properties are not changing (Figure 3F).

3.3. Biodegradation of phenanthrene and benzo [a] pyrene by Rhodotorula mucilaginosa EXF-1630 under hypersaline conditions

Based on the demonstrated ability of *R. mucilaginosa* EXF-1630 to grow in presence of mixtures of Phe and BaP, we evaluated their removal in 1 M NaCl liquid media supplemented with both PAHs as the sole carbon source. As Figure 4A displays, Phe and BaP were quickly adsorbed (30 and 40%, respectively) to the cells after two days of exposure. In general, yeast cell preferentially adsorbed BaP over Phe, and biodegradation processes prevailed over bioadsorption (Figure 4A and B). Bioadsorption notably contributed to PAH removal at early stages. BaP, a five-rings PAH, was preferably adsorbed possibly due to a higher hydrophobicity/lipophilicity in comparison with Phe (three-rings PAH) (Oluwadara et al., 2017; Srivastava and Kumar, 2019). Significant levels of biodegradation were observed from the beginning of the experiment (Figure 4B). For example, 40% of each PAH was biotransformed at day two. After 10 days of culture EXF-1630 removed approximately 80% of each PAH (Figure 4A). Bioadsorption percentages drastically decreased (four-fold) during the 10 days, being only 20% at the end of the experiment (Figure 4A). Biodegradation showed an exponential phase between 0 and 6 days of yeast treatment ($R^2 = 0.997$). Chemical oxygen demand drastically decreased after two days of culture (Figure 4C). Ten-days mycotreatment diminished 99.4% this parameter. pH also dropped at day two (Figure 4C).

In parallel, enzymatic activities typically involved in PAH biodegradation were measured. Extracellular laccase, peroxidase and un-specific peroxygenase activities were not detected during the experiment. In contrast, NADPH-cytochrome *c* reductase activity was observed and reached its

maximum value at day four (Figure 4D). The activity of this enzyme drastically decreased at day six, and remained at low level until the end of the experiment.

The biochemical characterization of the Phe and BaP removal highlights the potential of *R. mucilaginosa* EXF-1630 as bioremediating agent under saline conditions. EXF-1630 biodegraded both PAHs at the same extension even when this complex polyaromatic mixture represents a catalytic challenge for the cell. The biodegradation index reached by this yeast strain was accompanied by a significant reduction of the chemical oxygen demand which is strongly desired in a bioremediation process (Srivastava and Kumar, 2019). Our results suggest that extracellular degradation mechanisms mediated by laccases, peroxidases, and peroxygenases do not seem to play a key role in the PAH assimilation by this yeast strain. Moreover, the high salinity (1 M NaCl) of the culture media did not prevent achieving high removal indexes of Phe and BaP even when it is asserted that low water activity imposed by high salt concentrations negatively affects the bioavailability of PAHs (McGenity, 2016; Varjani, 2017).

The removal percentages reported in this study are higher than those informed by Leelaruji et al. (2013) who investigated the removal of anthracene, naphthalene and BaP by the yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. *R. mucilaginosa* EXF-1630 also demonstrated better potential as mycoremediating agent of binary solutions of Phe and BaP compared to *Pichia anomala* (Hesham et al., 2006). Other studies using *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii* and *Rhodotorula* spp. NS01 also reported removal indexes lower than those obtained in this work (Hesham et al., 2009; Farag and Soliman, 2011; Kumar and Nilanjana, 2017). For example, *C. viswanathii* reached 55% of BaP degradation after 10 days in mixtures of PAHs, while *Rhodotorula* spp. NS01 assimilated 50% of BaP in seven days (Hesham et al., 2009; Kumar and Nilanjana, 2017). The *C. viswanathii* strains achieved 77% of Phe degradation after 10 days exposure time, a similar percentage to that of *R. mucilaginosa* EXF-1630 (Hesham et al., 2009). In addition, EXF-1630 exhibited similar PAH

removal percentages than *C. psychrotolerants* cultured in presence of naphthalene, anthracene and pyrene (Deeba et al., 2018).

The PAHs degradation by halotolerant yeasts has been poorly studied (Hadibarata et al., 2017; Kamyabi et al., 2018). The salt tolerance yeast *Basidioascus persicus* EBL-C16 showed high ability to remove anthracene, pyrene and Phe in 21 days at 2.5% NaCl (Kamyabi et al., 2018). Other study reported up 75% of pyrene degradation in 15 days by *Candida* sp. S1 in presence of 24 g/L of NaCl (Hadibarata et al., 2017). The hydrocarbon removal percentages and the biomass productivity reached by *B. persicus* and *Candida* sp. S1 are in agreement with those obtained by *R. mucilaginosa* EXF-1630. However, EXF-1630 strain achieved the same biodegradation rate within 10 days (Figure 4A and B).

The success of yeast-based treatments and the absence of toxicity of the metabolites formed during the biodegradation process were also corroborated by toxicological tests (Figure 4E-L). Explants of the moss *P. patens* grown in presence of yeast-treated PAHs polluted media showed a higher relative growth (five-fold) rate in comparison with negative controls (Figure 4E). Same results were obtained by microtox assay using the marine bioluminescent bacteria *A. fischeri* (Figure 4F). Toxic compounds strongly inhibit the cellular respiration of *A. fischeri*, and an inhibition of the bioluminescence is observed in correlation to toxicity (Girotti et al., 2007). When exposed to yeast-treated PAHs polluted media, luminescence of *A. fischeri* was less disrupted at 5- and 15-minutes exposure times than when exposed to the negative control (Figure 4F).

In addition, human cells were also used to toxicologically validate the potential of *R. mucilaginosa* EXF-1630 as PAHs-mycoremediating agent (Figure 4G-L). PAHs showed a strong effect as hemolytic agents (Figure 4G and H). In overall, hemolysis percentage decreased 45-fold when red blood human cells were incubated to yeast-treated PAHs polluted media (Figure 4G). Lysis of erythrocytes by the PAHs polluted media was evident under microscope examination (Figure 4H) whereas red blood cells incubated with yeast-treated media are unaffected (Figure 4I). Also, the

viability of the pulmonary epithelial cells (cell line A549) exposed to treated- and non-treated-yeast PAH polluted media was evaluated (Figure 4J-L). Dead pulmonary cells reached up 70% when the cell line A549 was exposed to non-treated-yeast media containing Phe and BaP (Figure 4J). In contrast, only 7% of the pulmonary epithelial cells died when the cell line A549 was incubated with mycoremediated media containing PAHs (Figure 4J). These effects were reflected in the preparations observed at the microscope where cell morphology was drastically affected in presence of non-treated PAHs polluted media (Figure 4K and L).

Our results demonstrate that *R. mucilaginosa* EXF-1630 is an excellent candidate to mitigate the PAH polluted in hypersaline conditions (Figure 4A-L). Specifically, different toxicological tests used in this study support that this basidiomycete yeast does not only degrade PAHs successfully but also significantly decreases the residual toxicity after mycotreatments (Figure 4E-L). The use of four models that included bacteria, plants and human cells to evaluate the residual toxicity at different scales, supports that EXF-1630-based treatments could be attractive for biotechnological applications because the metabolic profile generated for this yeast strain during PAHs biodegradation poorly produced toxicity in the studied systems. These results are of particular interest to implement and scale up successful mycorestoration strategies under real field conditions.

3.4. Metabolomics profile of Rhodotorula mucilaginosa EXF-1630 during PAHs biodegradation under hypersaline conditions

Metabolomics profiles were determined after three days of yeast culture in presence of Phe and BaP (100 ppm final concentration) at 1 M NaCl. This sampling point was chosen because it represented the midpoint of the biodegradation exponential phase (Figure 4B). As mentioned before, biodegradation process exhibited an exponential phase between 0 and 6 days of yeast treatment ($R^2 = 0.997$).

Eleven metabolites were identified as byproducts from the Phe and BaP degradation by *R. mucilaginosa* EXF-1630 (Table 2). Identification of the metabolites showed the presence of different hydroxylated products in the supernatant as well as inside the cells (Table 2). Hydroxybenzo[α]pyrene, 9,10-dihydroxyphenanthrene, phenanthrene trans 9,10-dihydrodiol, 9-phenanthrol and dihydroxy-benzene were found in the culture medium, probably as result of the cytochrome P450 monooxygenase activity (Kashyap et al., 2020). These metabolites have been frequently found in fungi during PAHs degradation (Cerniglia 1997; Hashem et al., 2018; Fu et al., 2018; Peidro-Guzmán et al., 2020).

The conjugative metabolite 1-phenanthryl- β -D-glucopyranose was detected in the culture medium as well as in the cells, indicating the presence of intracellular glycosyl-transferases functionally active during PAHs biodegradation. This conjugative metabolite has been also found in *Cunninghamella elegans* exposed to PAHs (Casillas et al., 1996).

The extracellular identification of the previously mentioned metabolites could suggest the presence of putative membrane transporters with some specificity for these byproducts. The occurrence of specific fungal transporters to facilitate the PAHs translocation is not yet comprehensively understood. However, some major facilitator superfamily (MFS) transporters and ATP-binding cassette (ABC) transporters seem to play a key role in mediating the influx and efflux of PAHs and byproducts across the cell membranes (Verdin et al., 2005; Park et al., 2019).

The absence of quinones and the presence of hydroxy-naphtoic acid and phthalic acid could indicate a different biodegradation mechanism in comparison with those found in some filamentous fungi (Aranda et al., 2016). The PAHs degradation via phthalic acid pathway has been previously reported in the halotolerant yeast *Basidioascus persicus* (Kamyabi et al., 2018). Also, phthalic acid pathway was identified in the deep-sea yeast *R. mucilaginosa* Mar-Y3 during dimethyl phthalate degradation, while dimethyl isophthalate and dimethyl terephthalate were degraded via terephthalic acid (Wang et al., 2016). Other phthalate derivatives were identified in cell-free extract of *R.*

taiwanensis HKUY-0162 grown with octane as sole carbon source (Hashem et al., 2018). As previously mentioned phthalic acid pathway seem to play an important role in depletion of xenobiotic by yeasts.

In the case of benzo[a] ring cleavage through *meta*-oxidation occurs leading to the formation of 2-hydroxymuconic semialdehyde pyrene, indicating the possible participation of catechol 2,3-dioxygenase enzymes. This metabolite has also been found in the yeast *C. tropicalis* during pyrene degradation, which is also possible to cleavage R-catechol via *meta*-fission pathway to 2-hydroxy muconic (Kashyap et al., 2020). Catechol was also identified in supernatants of *C. tropicalis* (Kashyap et al., 2020). Catechol conjugates were also identified as byproducts when *Rhodotorula* sp. degraded lindane (Salam et al., 2013).

Metabolomics studies to elucidate how yeasts degrade PAHs have rarely been reported (Hadibarata et al., 2017; Kamyabi et al., 2018; Kashyap et al., 2020). Further efforts should be conducted to investigate PAHs degradation pathways in yeast.

3.5. Transcriptome preprocessing, assembly and analysis

The assembled transcriptome of *R. mucilaginosa* EXF-1630 contained 19,933 predicted genes and 23,815 transcripts with an average length of 1,526 nucleotides (Table 3). This represents around twice the number of expected genes for this species, although it is a typical result for assembled transcriptomes to contain more genes than those identified in genomic sequences. The completeness assessment with BUSCO showed that 89% of the single-copy orthologues in Basidiomycota were present in the assembly, and from these 58% were in single-copy, 29% were artefactually duplicated and only 2% were fragmented (Figure 5A). This indicates that the duplication level in the transcriptome lies around 30%. Taking into consideration that the median length of transcripts (816 nt) is well below the average length, the duplication of the number of genes must reflect an

increase in very short sequences with no predicted function. The analysis of the coding potential of the assembly showed that approximately 74% of transcripts contained a putative Open Reading Frames (ORFs). From the total predicted ORFs, 46% were complete (e.g. contained the starting Met codon and a STOP codon in frame), 24% only contained the starting Met codon (5' partial), 13% contained only a STOP codon (3' partial), and 18% contained a frame with coding potential but no starting Met or STOP codon (incomplete) (Figure 5B). All these metrics reveal that the transcriptome assembly has sufficient quality for subsequent differential analysis.

The clustering of transcriptome quantification profiles shows that the samples are clustered according to the experimental conditions tested (Figures 5C and E). Furthermore, the heatmap of the quantification profiles shows a high abundance of low-count transcripts that could potentially reduce the statistical power of differential expression detection. Different cut-off filters based on a threshold CPM (counts per million) value were tested to remove this noise from the data while keeping most of transcripts (Figure 5D). The result of filtering out transcripts with $CPM < 0.05$ in more than three samples is shown in Figure 5E.

The count data was normalized prior to differential expression analysis using the RUVseq method, which resulted in all samples having a homogeneous distribution of relative log expression values (RLE) centered around 0, as expected (Figure 5F). This metric can help identify skewed count distributions that would bias differential expression inference. The principal component analysis of the normalized count data showed that samples from different experimental condition are grouped in different areas of the PC1-PC2 principal component plot (Figure 5G). Therefore, the PCA plot shows that the overall expression profile is representing the biological conditions in which *R. mucilaginosa* is growing. This analysis also reveals that intersample variation in the PAH group is larger than in glucose group, but this should not bias differential expression as group samples are clustered in separate areas (Figure 5G).

Finally, the differential expression analysis at transcript level showed that 870 transcripts were upregulated in *R. mucilaginosa* EXF-1630 when growing in PAHs as sole carbon source ($\logFC_{\text{PAH vs GLC}} > 2$, $\text{FDR} < 0.05$), while 2,288 transcripts were downregulated when compared to the control group growing in glucose ($\logFC_{\text{PAH vs GLC}} < -2$, $\text{FDR} < 0.05$). The MA plot of the differential expression analysis (Figure 5G) shows the distribution of statistically significant values of \logFC across different expression ranges (represented as mean of normalized counts). As shown in this plot, there is a high number of lowly expressed genes in the transcriptomes of *R. mucilaginosa* when growing in glucose media which expression is abolished in media containing PAHs. Many of these transcripts could be the result of basal expression under permissive conditions, and therefore not relevant to the biological comparison of these two metabolic states.

3.6. Pending

3.7. Genomic analysis of xenobiotics metabolism in yeasts

A surprising diversity of yeasts -unicellular fungi- resides in a wide range of environments from soils, cold and hot deserts, glaciers, polluted environments, hypersaline lakes and deep sea, among other ecosystems (Péter et al., 2017). Yeasts are a polyphyletic microbial group with a high metabolic plasticity that sustains a diverse physiological traits and ecological niches (Péter et al., 2017). Consistently, unicellular fungi exhibit a great diversity at genomic level that supports remarkably diverse heterotrophic lifestyles (Peter et al., 2018; Shen et al., 2018). The mining genomic of these microbes could produce unprecedented insights about genes related to the xenobiotic metabolism. Surprisingly to our knowledge no works focused on this topic have been published. Thus, the genomic bases of the metabolic processes related to xenobiotic biodegradation remain poorly understood.

To address the previous gap, we examined 31 xenobiotic degradation pathways in 61 yeast publicly available genomes (Figure 7A-C) (Supplementary material, Table 1) deposited in MycoCosm database (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>). A yeast taxonomically diverse group (Ascomycetes and Basidiomycetes) was included in the genomic analysis. Yeasts largely informed as good candidates for xenobiotic biodegradation were also considered (e.g. *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Exophiala*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, etc.).

The genome-scaling inferences showed that the 61 metabolically diverse yeast species could potentially degrade a heterogeneous group of structurally diverse environment pollutants (Figure 7A). The 31 analyzed xenobiotic metabolic pathways display a widespread distribution into different yeast lineages. The presence of these biodegradative pathways indicate that yeast genomes are enriched in genes encoding enzymes related to degradation of benzoate, benzoyl-CoA, cumate, bisphenol A, fluorobenzoate, dichlorobenzoate, and dichlorobenzene (Figure 7A). Some metabolic traits as degradation of chloroacrylic acid, phthalate, catechol ortho-cleavage, dichloroethane and methyl naphthalene are underrepresented. Interestingly, the categories of metabolism of xenobiotic by CYP450 and drug metabolism mediated by CYP450 showed a limited number of genes annotated into them. One interesting hypothesis derived from this result which should be properly tested using multiomics approaches, is that CYP450 could not be the most pivotal enzymes involved in these detoxification processes contrarily how occurs in many filamentous fungi (Aranda, 2016). This could mean that uncharacterized cytochromes are encoded by yeast genome and/or alternative undescribed metabolic pathways to contend with xenobiotics are used by yeasts.

Similar observations were found by Shen et al. (2018) who reported the reconstruction and diversity of 45 discrete metabolic traits through 332 budding yeast genomes. These authors concluded that the budding yeast common ancestor was metabolically complex and reductive evolution episodes was a major mode to establish the current diversification in yeast. These evolutionary events prompted a genome constriction of certain metabolic pathways during the timescale of yeast diversification

(Shen et al., 2018). This does not at all mean that unicellular fungi lost metabolic capacities. Conversely, yeasts retained their metabolic heterogeneity through their evolutionary diversification but with more compact genomes (Dujon and Louis, 2017) in comparison with filamentous fungi, such as *Aspergillus*, *Neurospora*, *Trichoderma*, or some Basidiomycota species. This was demonstrated for the nitrogen and carbon metabolism (Wisecaver et al., 2014; Shen et al., 2018). Figure 7A shows that could similarly occur for the yeast metabolism of xenobiotic.

Non-metrical multidimensional scaling analysis (NMDS) obtained from the number of enzymes annotated in each metabolic pathway displays that two distributions are easily distinguished (Figure 7B). The estimated surface density is almost identical for these statistical distributions which suggest that the metabolic capacities at genomic level of these two groups of yeast are similar. The first distribution is comprised by *Hortea werneckii*, and the *Cladophialophora* and *Exophiala* species. Also *Slooffia pilatii* and an *Aureobasidium pollulans* strains (NBB 7.2.1) were placed in this statistical distribution (Figure 7B). Regarding *Aureobasidium* genus, another strains of the same species (e.g. *A. pollulans* var. *namibiae*, *A. pollulans* var. *pollulans* and *A. pollulans* var. *subglaciale*), were not closely grouped reflecting a lower metabolic capacity to degrade xenobiotics. This first distribution was mainly formed by Ascomycota members (except *S. pilatii*).

The second distribution identified by the NMDS analysis is more heterogeneous at the genus level. This statistical distribution shows a density gradient with a yeast cluster in the region of higher density. *R. mucilaginosa* was placed in this cluster together with other members of the Sporidiobolaceae family (e.g. *Rhodosporidium glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodosporidium diovatatum*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporobolomyces gracilis*) (Figure 7B). Other basidiomycete yeasts such as *Mrakia frigida* and *Naganishia vishniacii* were also grouped in this cluster strictly comprised by basidiomycete members.

Saccharomyces cerevisiae and some *Schizosaccharomyces* species (*S. octosporus*, *S. aponicus* and *S. pombe*) were grouped together in the region of lower density of the all statistical distribution

(Figure 7B). As expected this indicates that these yeast species have a limited metabolic fitness to degrade xenobiotic compounds. These species were included in the analysis as negative controls.

Finally the genomic analysis revealed that the *Dothideales*, *Chaetothyriales*, *Mycosphaerellales* and *Sporidiobolales* orders showed the higher number of catabolic pathways and enzymes (Figure 7C). The same orders exhibited the best genomic potential to degrade hydrocarbons, and in particular PAHs. The same analysis at genus level identified to *Aureobasidium*, *Candida*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, and *Scheffersomyces* as the most promising genera to degraded hydrocarbons and PAHs particularly (Figure 7C). These genera have been largely reported as hydrocarbon degraders (Dallinger et al., 2016; Blasi et al., 2017; Zajc et al., 2019; Ide-Pérez et al., 2020). *Scheffersomyces* species have not been studied as hydrocarbon-utilizer yeasts.

This work highlights the great potential of taxonomically diverse yeast species as xenobiotic-degrader microbes. This is the first attempt to examined the genetic diversity of yeasts related to xenobiotic metabolism through a genome-scaling inference meta-analysis. Additional efforts will be needed to investigate in depth the genomic co-occurrence of the biodegradation pathways in yeasts because not much is understood regarding the genetic mechanisms used by unicellular fungi to degraded environmentally recalcitrant compounds. Comparative genomics may exhibit unique phenotypic traits to explore new candidates as promising mycoremediating agents.

Conclusions

Nina, please, would you like to write this section?

Figures legends

Figure 1. Phylogenetic reconstruction of *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 isolated from an Arctic glacier in Kongsfjorden, Spitsbergen, Svalbard (Norway). Phylogeny was prepared on an alignment of concatenated sequences of 24 highly conserved markers (Ren et al., 2016) from 27 available genomes of the Sporidiobolaceae family.

Figure 2. A) Growth of *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 on YNB agar medium at different NaCl concentrations at 15 and 28 °C. Broken circles represent the weak growth of the yeast strain in some salt concentrations. B) Growth of *R. mucilaginosa* EXF-1630 on hypersaline (1 M NaCl) minimal medium supplemented with glucose (control), 1,8 diaminonaphthalene (DNaph), fluorene (Flr), anthracene (Ant), phenanthrene (Phe), pyrene (Pyr), benzo [a] pyrene (BaP), or a mixture of Phe and BaP (1:1) as only carbon source. Different final concentrations were used: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 and 500 ppm. C) Cell growth (OD_{600nm}), D) biomass productivity, and E) growth rate of strain EXF-1630 cultured in hypersaline liquid medium with glucose (control), Phe, BaP, or a mixture of both aromatic compounds (1:1, 100 ppm final concentration) as only carbon source. Polyaromatic compounds were added at 100 ppm at final concentration in all cases.

Figure 3. A, B and C) Microscopic preparations of EXF-1630 in presence of phenanthrene (Phe), benzo [a] pyrene (BaP), or a mixture of both (1:1, 100 ppm final concentration) after three days exposure time at 1 M NaCl. D, E and F) Changes of hydrodynamic radius, polydispersity index, and Z-potential during Phe and BaP removal.

Figure 4. A and B) Removal, bioadsorption, and biodegradation of phenanthrene (Phe) and benzo[a] pyrene (BaP) by *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 at hypersaline conditions (1 M NaCl). Polyaromatic hydrocarbons (1:1) were added at 100 ppm as total final concentration. C) Chemical oxygen demand (COD) and pH variation during Phe and BaP removal. D) NADPH-cytochrome *c* reductase activity during 10 days of aromatic compound exposure. E) Relative growth of *Physcomitrium patens* (previously named *Physcomitrella patens*) when moss was grown in presence of supernatants from treated and non-treated PAHs polluted media. F) Toxicological tests on the bioluminescence bacteria *Allivibrio fischeri*. G) Hemolytic assay on red human blood cells using treated and non-treated PAHs polluted media. H and I) Microscopy of hemolytic assays using pelleted cells in presence of supernatants from treated and non-treated PAHs polluted media. J) Cellular viability assay using Trypan Blue stain of pulmonary epithelial cell line (A549). K and L) Microscopy of pulmonary epithelial cell line (A549) after 24 h cultured in presence of supernatants from treated and non-treated PAHs polluted media. Black arrows depict red blood cells (Figure 4I), and pulmonary cells with cellular damages or normal morphology, respectively (Figure 4K and L). Microscopies represent representative images obtained from the study.

Figure 5. Assembly, preprocessing, and differential expression analysis of *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 transcriptomes on PAH and glucose at hypersaline conditions (1 M NaCl). A) Assembly completeness assessed by BUSCO. B) Transcript coding potential assessed by CPAT. C) Transcriptome profiles before low-count read filtering. D) Evaluation of filtering cut-off based on the density distribution of read count level after filtering (see Materials and Methods section for filtering details), the selected cut-off is highlighted in as a bold blue line. E) Transcriptome profiles after low-count read filtering using the selected filtering cut-off. F) Relative logarithmic expression (RLE) of transcriptome samples after RUVseq normalization procedure. G) Principal component analysis of transcriptome samples after RUVseq normalization procedure. H) MA-plot of

differential expression of PAH transcriptome *versus* glucose transcriptome highlighting transcripts with $FDR < 0.05$ in blue. Horizontal red lines mark the selected logFC cut-off value of (2,-2) to consider differentially expressed transcripts.

Figure 6. Proposed degradation pathways of phenanthrene (Phe) (A) and benzo [a] pyrene (BaP) (B) by *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 at hypersaline conditions (1 M NaCl) based on transcriptomics and metabolomics results. Compounds in red were identified by UHPLC-MS in the supernatant and/or cells of *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 cultures. Possible enzymes involved in the biotransformation of intermediates were identified from the differentially expressed transcripts. C) Logarithmic fold change (logFC) of transcripts annotated to functions possibly involved in the biotransformation of Phe and BaP. Vertical dashed lines represent the (2, -2) logFC cut-off region.

Figure 7. Genomic analysis of xenobiotics metabolism and biodegradation in yeasts. A) The heatmap shows the number of enzymes annotated to each metabolic pathway. Absolute abundance of enzymes per species is shown in the right box as a red line. Relative abundances of enzymes per pathways are shown for each species as stacked barplots. Categories were clustered using the UPGMA method by Jaccard distance. B) Non-metrical multidimensional scaling analysis (NMDS) obtained from the number of enzymes annotated in each metabolic pathway. C) Boxplots show the number of metabolic pathways, the number of total enzymes, the number of enzymes involved in hydrocarbon biodegradation, and the number of enzymes involved in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation annotated in different orders (top row) and genera (bottom row). Figure was produced on R package. The dotted red lines represent the median of the distribution of total enzymes per category.

Acknowledgments

Authors are grateful with Alfonso Leija, Arielle Ariste, Olivier Sabori, Angélica Ortega, Marcela Ayala, Irina Jiménez, Adriana Otero, and Daniela Escamilla for their technical support. LM-A, HP-G, YP-LI, DG-A, GV-M, LR-L, AF-S, and HC-S thank to National Council for Science and Technology of Mexico because they received a scholarship. HP-G, DG-A, And YP-LI received a fellowship from Emerging Leaders in the American Program.

