



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

**“Estrategias moleculares del halófilo moderado *Aspergillus sydowii*
como respuesta a condiciones hipo- e hipersalinas.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Eya Caridad Rodríguez Pupo

DIRECTORES DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

CUERNAVACA, MORELOS

Septiembre, 2021

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Contó con el financiamiento del proyecto CONACyT- 249086 y PRODEP-UAEMor-PTC_333, además de la beca otorgada por CONACyT durante el doctorado.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar mis sinceros agradecimientos a mi Directora de Tesis, la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente, por su guía y colaboración en el desarrollo de esta Tesis, por su honestidad, afecto personal y la libertad que genera en su grupo de trabajo. Por ser más que una tutora, ser una amiga, por siempre estar presente y dispuesta a escucharme y aconsejarme tanto en lo profesional como en lo personal. Por tener la paciencia suficiente por todos los contratiempos que ha tenido la tesis en estos años. Y en particular en mis largos y difíciles tiempos de escritura por su tolerancia y respeto.

Quiero expresar mis agradecimientos al Dr. Jorge Luis Folch por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por aceptarme y formar parte de su grupo, por tener la paciencia de escucharme, aconsejarme y sugerirme cada vez que lo necesitaba, para hacer mejor el proyecto de tesis.

A Norma, Dra. Martha, M. en C. Francisco y el Dr Antonio Peña por brindarme un lugar en su el Laboratorio (306) del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**), por hacerme sentir una más de su grupo, por dejarme formar parte de esa maravillosa familia que han hecho entre ellos, por su gran apoyo laboral y personal durante mis últimos semestres que fueron cruciales para mí.

No puedo olvidar agradecer a mis amigos mexicanos: Giovanni Salazar, Omar Jasiel Quintero, Ricardo Sánchez, gracias a todos por brindarme su amistad, por siempre tener una disponibilidad absoluta cada vez que los he necesitado, por aceptarme y enseñarme lo hermoso que es su país y sus costumbres. Gracias por hacerme sentir parte de ustedes y hacer que se añore un poquito menos a la familia.

Al Dr. Edgar Balcazar por soportar mis tenebrosos tiempos de ignorancia en la confección de mutantes, por las alegrías y tristezas vividas, por la compañía permanente, por un futuro mejor para todos.

Agradezco también a mis compañeros de laboratorio por haberme aceptado como parte de ellos y hacer mi vida profesional más alegre y placentera, en especial a Yordanis Pérez Llano por brindarme su amistad, por aportarme sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado, por su apoyo e inestimable ayuda en todo momento.

Por la interacción intelectual y personal que nos permite crecer, por la colaboración espontánea, por los buenos momentos compartidos, y por los empujones recibidos en los últimos tiempos.

A mis amigas y hermanas Leydis y Deborah, no tengo palabras para agradecerle por estar siempre apoyándome incondicionalmente, siempre teniendo un hombro disponible para apoyarme cada vez que me derrumbaba, por siempre tener un oído, para escucharme y un pañuelo al alcance de la mano mientras mis tristezas me ahogaban, por nunca dejarme caer y siempre estar dispuestas para sacarme una sonrisa y hacer que mi vida fuera mucho mejor cada día, ha sido un camino bien largo y de muchos obstáculos pero jamás me han dejado sola. Mil gracias, las adoro con todo mi corazón.

A mi amiga Arline quién ha compartido conmigo paralelamente este camino, gracias por su amistad, cariño, apoyo y ánimos, por estar presente en cada momento que la he necesitado.

Quiero agradecerle de todo corazón a Jose Raunel Tinoco Valencia, por brindarme su ayuda incondicional en todos los momentos que la necesité, por enseñarme a trabajar con el equipo de HPLC y siempre apoyarme con las mil muestras que tuve que analizar durante todo tiempo de doctorado.

A mi amigo y hermano Ayixon Sánchez Reyes, gracias porque siempre me ha prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles tanto en el ámbito personal como profesional de este largo camino, gracias por sus buenos consejos y por sus oportunas opiniones en este trabajo, por siempre estar sosteniendo mi mano cada vez que creía que no podía seguir y por la confianza que siempre me tuvo, por siempre estar ahí cada vez que lo necesité.

A todos mis amigos de la universidad que aun aquí seguimos juntos: Nilda, Vichy, Gerson, Reinier, Yainier. Gracias a todos por compartir los buenos momentos que nos han tocado pasar aquí en estos años y por estar siempre dispuestos a ayudarme cada vez que lo he necesitado, gracias por su infinita amistad y formar parte importante para mí y mi familia. Son muy pocas las palabras que he escrito para agradecerles.

Quiero agradecer a la Dra. Alicia González Manjarrez por sus buenas y oportunas sugerencias, contribuyendo a un mejor desarrollo en este trabajo y por hacer que los tutorales fueran más agradables. Por siempre estar dispuesta a brindarme su ayuda siempre que la necesité. Gracias por aceptar formar parte del Comité Tutorial de esta Tesis.

Quiero agradecer a la Dra. Verónica Lira Ruan, por aceptar formar parte de mi comité tutorial y acompañarme en estos largos años, además por sus oportunas y muy aceptadas sugerencias para mejorar el proyecto de doctorado.

Quiero agradecer a los integrantes del Comité Revisor Dra. Sonia Dávila Ramos, Dr. Alexandre Cardoso Taketa y Dr. Ramón Alberto Batista García, por aceptar ser parte de mi comité de examen, por sus oportunos comentarios sobre la tesis, por sus magníficas correcciones que hicieron al revisarla y que contribuyeron a que se obtuviera un mejor manuscrito

La lista de las personas para agradecer es muy larga, porque esta experiencia no habría sido tan agradable sin todas ellas y más cuando nos encontramos fuera de nuestro país y lejos de nuestra familia. A todas muchísimas gracias por haberme ayudado a llegar hasta aquí y a todos aquellos que colaboraron de forma directa o indirecta a vivir esta hermosa etapa de mi vida.

La tesis está dedicada con todo mi cariño y amor para quien me dio la oportunidad de vivir, que ha luchado siempre porque logre mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando más lo he necesitado, a mi madre querida, Eya, a ti por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Con todo mi amor para quien siempre me inculcó ser mejor persona cada día, quien me enseñó a mantener siempre una sonrisa para cada momento difícil de la vida, a mi padre querido, que a pesar de no encontrarse entre nosotros hoy, donde quiera que esté sé que sigue guiando mi camino, siempre te amaré.

No puede faltar mi enorme agradecimiento a mis mayores inspiradores, a ser mejor cada día, A mis hijos Maykelito y Samuelito por su paciencia y comprensión; todo conlleva un enorme sacrificio, han sido testigos y mi empuje diario, para que pueda ofrecerles un mejor futuro siendo el gran orgullo de mi vida y que los tengo presente en cada paso que doy, por ellos lucho y deseo la superación, los amo con todo mi corazón.

A esas grandes personas, que con su ejemplo me han sabido guiar y juntos hemos superado los grandes obstáculos de la vida, a esos grandes amigos que la vida me ha sabido dar, que han contribuido al arduo trabajo no sólo de este proyecto sino de mi propia vida, gracias por ese gran apoyo.

Y en general a todas aquellas personas que me han regalado grandes lecciones y experiencias que me han ayudado a formarme y a prepararme para los grandes retos de la vida diaria, gracias queridos maestros y amigos.

Al resto de mi familia y mis amigos de siempre, porque no importan los tiempos, las distancias ni los caminos elegidos para seguir compartiéndonos.

RESUMEN

Aspergillus sydowii es un hongo halófilo moderado reportado como patógeno de arrecifes de coral y que recientemente ha sido estudiado a nivel fisiológico y molecular, como modelo de un organismo extremófilo debido a que es capaz de crecer bajo condiciones de alta salinidad. Esta propiedad ha derivado en la evaluación de su potencial biotecnológico como degradador de lignocelulosa y xenobióticos. Un análisis transcriptómico reciente de este hongo, identificó los genes relacionados con la modificación de la pared celular y los transportadores de cationes regulados en condiciones de hipersalinidad. Sin embargo, en la condición de 0.5 M de NaCl, que es la salinidad óptima para su crecimiento se desconocen los genes que describen estos procesos. La mayoría de los organismos que son expuestos a un estrés osmótico responden acumulando de manera diferencial solutos compatibles, por lo que decidimos estudiar la acumulación de osmolitos compatibles y la de los iones Na^+/K^+ para determinar cómo *A. sydowii* contiente con la salinidad moderada. Los resultados muestran que *A. sydowii* acumula como principales solutos compatibles: trehalosa, arabitol, manitol y glicerol, con dinámicas temporales que dependen de la concentración de NaCl de la continuidad de la exposición, o bien regímenes o choques hipo- o hiperosmóticos. Los transcritos identificados que codifican las enzimas responsables de la síntesis de los polialcoholes fueron: *tktA*, *tktB*, *gpd*, *stps*, *m2dh*, *mtld* y *tad*, y que estuvieron regulados principalmente de manera dependiente del estrés. Resulta interesante, la observación que *A. sydowii* contiene tres homólogos de la MAPK Hog1, el regulador principal de la respuesta al estrés hiperosmótico en *Saccharomyces cerevisiae* y en otros hongos, los cuales se denominan Hog1, Hog2 y mpkC. Mostramos una regulación transcripcional y mediante fosforilación de estas MAPK en diferentes condiciones de salinidad. *A. sydowii* mantiene niveles de fosforilación basal sostenida de Hog1/Hog2 en ausencia de NaCl o con 2.0 M NaCl, en contraste con lo observado en *S. cerevisiae*. Estos hallazgos indican que los hongos halófilos como *A. sydowii* utilizan diferentes mecanismos de osmoadaptación a las condiciones hipersalinas.

ABSTRACT

Aspergillus sydowii is a moderate halophilic fungus which has been reported as a coral reef pathogen and has recently been studied at the physiological and molecular level as a model of an extremophilic organism due to its biotechnological potential as a degrader of lignocellulose and xenobiotics. We have recently carried out a transcriptomic analysis of this fungus, in which the genes related to the modification of the cell wall and regulated cation transporters under conditions of hypersalinity have been determined, but not under the condition of 0.5 M NaCl, which is optimal salinity for its growth. Most organisms that are exposed to osmotic stress respond by differentially accumulating compatible solutes, so we decided to study the accumulation of compatible osmolytes and the accumulation of Na⁺ / K⁺ ions to determine how *A. sydowii* contends at moderate salinity. The results show that *A. sydowii* accumulates as main compatible solutes: trehalose, arabinol, mannitol and glycerol with temporal dynamics that depend on the NaCl concentration to which they are exposed and if this exposure is continuous or under hypo- or hyperosmotic shock. The transcripts identified that encode the enzymes responsible for the synthesis of the polyalcohols were: tktA, tktB, gpd, stps, m2dh, mtld and tad were regulated mainly in a stress-dependent manner. Interestingly, *A. sydowii* contains three homologues of MAPK Hog1, the main regulator of the hyperosmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi, which are named Hog1, Hog2 and mpkC. We show a transcriptional regulation and by phosphorylation of these MAPKs under different salinity conditions. *A. sydowii* maintains sustained basal Hog1 / Hog2 phosphorylation levels in the absence of NaCl or with 2.0 M NaCl, in contrast to that observed in *S. cerevisiae*. These findings indicate that halophilic fungi such as *A. sydowii* use different mechanisms of osmoadaptation to hypersaline conditions.

ÍNDICE GENERAL

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	17
1.1. Marco teórico	17
1.1.1. Los microorganismos extremófilos	17
1.1.2. Microorganismos halófilos/halotolerantes	18
1.1.3. Mecanismos moleculares de halofilia	19
1.1.3.1. Estrategia salt in	21
1.1.3.2. Estrategia salt out	21
1.1.4. Solutos compatibles	24
1.1.4.1. Funciones de los solutos	24
1.1.4.1.1. Trehalosa	25
1.1.4.1.2. Manitol	26
1.1.4.1.3. Glicerol	26
1.1.4.1.4. Eritritol y Arabitol	27
1.1.4.2. Transporte de los solutos	29
1.1.5. Vía de respuesta a alta osmolaridad mediada por HOG (High Osmolarity Glycerol)	31
1.1.5.1. Funciones de HOG en hongos halófilos/halotolerantes	35
1.2. Antecedentes	38
1.3.1. Justificación	39
1.3.2. Hipótesis	40
1.3.2.1. Predicciones	40
1.3.3. Objetivos	41
1.3.3.1. Objetivo general	41
1.3.3.2. Objetivos específicos	41
1.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	43
1.4.1. Cepa fúngica y condiciones de cultivo	43
1.4.2. Determinación de la tasa de crecimiento por peso seco de <i>A. sydowii</i>	43
1.4.3. Preparación de las muestras para la extracción de los solutos compatibles	44
1.4.4. Detección y caracterización de polioles	44
1.4.5. Determinación de solutos osmóticamente activos en células adaptadas a la sal	45
1.4.6. Determinación de solutos osmóticamente activos en células después del shock hiposmótico e hiperosmótico	45
1.4.7. Extracción de ARN y qPCR	46

1.4.8. Determinación de la fosforilación de Hog por Western blot.....	46
1.4.9. Análisis filogenético de ortólogos MAPK.....	48
1.4.10. Cuantificación de los cationes intracelulares Na ⁺ y K ⁺	49
1.4.11. Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo y respuestas antioxidantes en <i>A. sydowii</i>	49
1.4.11.1. Biomarcadores antioxidantes	50
1.4.11.1.1. Actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa	50
1.4.11.1.2. Determinación de glutatión reducido.....	50
1.4.11.2. Biomarcadores pro-oxidantes.	51
1.4.11.2.1. Determinación de Hidroperóxidos Orgánicos	51
1.4.11.2.2. Determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas	51
1.4.11.2.3. Determinación de malonildialdehído y 4-hidroxialquenos	51
1.4.11.2.4. Determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica o Potencial de Peroxidación	52
1.4.12. Análisis estadístico.....	52
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
1.5.1. Solutos compatibles en células de <i>A. sydowii</i> adaptadas a la sal	54
1.5.2. Perfiles transcripcionales de genes que codifican enzimas de síntesis de osmolitos.....	57
1.5.3. Dinámica de solutos compatibles después de un choque hipo-osmótico o hiperosmótico en <i>A. sydowii</i>	67
1.5.4. Fosforilación de Hog como respuesta frente al choque osmótico	73
1.5.5. Relación Na ⁺ / K ⁺ en <i>A. sydowii</i>	79
1.5.6. El estrés osmótico induce cambios en el estado redox de <i>A. sydowii</i>	82
1.6. CONCLUSIONES.....	90
1.7. PERSPECTIVAS	92
1.8. RESULTADOS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS	93
1.9. APÉNDICES	103
1.9.1. Metodología (Protocolos detallados).....	103
1.9.1.1. Fosforilación de la proteína HOG mediante western blotting	103
1.9.1.2. Cuantificación de los cationes intracelulares Na ⁺ y K ⁺	108
1.9.1.3. Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo.....	110
1.9.1.3.1. Determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD) por el método del Pirogallol.....	111
1.9.1.3.2. Determinación de glutatión reducido.....	113
1.9.1.3.3. Determinación de Hidroperóxidos Orgánicos (HPO).....	115
1.9.1.3.4. Determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas (PAOP)	

.....	117
1.9.1.3.5. <i>Determinación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiálquenos (4-HDA)</i>	120
1.9.1.3.6. <i>Determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica</i>	121
1.10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
CAPÍTULO 2	143
2.1. INTRODUCCIÓN	143
2.2. Antecedentes	147
2.3. Hipótesis	148
2.4. Objetivos	148
2.5. MATERIALES Y MÉTODOS	149
2.5.1. Medios de cultivo y soluciones stock	149
2.5.2. Clonación del gen <i>hog1</i> de <i>A. sydowii</i> en el vector intermediario pJET 1.2blunt	150
2.5.3. Construcción de mutantes del gen <i>As-hog1</i> (mediante CRISPR/Cas)	152
2.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	158
2.6.1. Clonación del gen <i>hog1</i> de <i>A. sydowii</i> en el vector de clonación pJET 1.2blunt.	158
2.6.2. Construcción de la mutante del gen <i>hog1</i> de <i>A. sydowii</i> mediante CRISPR/Cas.	161
2.7. CONCLUSIONES	164
2.8. PERSPECTIVAS	164
2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
2.10. ANEXOS	167

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

<i>A. sydowii</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NaCl	Cloruro de sodio
M	Molar
HPLC	High-performance liquid chromatography
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
HOG	High-Osmolarity Glycerol
a_w	actividad de agua
mM	miliMolar
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
atm	atmósfera
KCl	Cloruro de potasio
Pi	Fosfato inorgánico
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
STRE	Stress Response Element
PDA	Potato Dextrose Agar
MMG	medio mineral líquido con glucosa
mL	miliLitro
rpm	revoluciones por minutos
°C	Grado Celsius
μm	micrometro
μL	microlitro
mg	miligramo
mm	milímetro
ARN	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
g	gramos
PBS	phosphate buffered saline
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
UA	Unidades Arbitrarias

SOD	Superóxido Dismutasa
GSH	glutación
DTNB	5,5'-ditiobis (2 ácido nitrobenzónico)
HPO	hidroperóxidos orgánicos
PAOP	Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas
DO	Densidad óptica
nm	nanómetro
MDA	malondialdehído
4-HDA	4-hidroxialquenas
Cq	ciclo de cuantificación

LISTA DE TABLAS

1.1.1	Estructuras de los solutos compatibles acumulados en los hongos.	23
1.5.1	Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Aspergillus sydowii</i> cultivados a diferentes concentraciones de NaCl.	55
1.5.2	Genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de los solutos compatibles en <i>A. nidulans</i> y sus genes homólogos en <i>A. sydowii</i> .	58
1.8.1	Información de los oligonucleótidos para el análisis de expresión por qPCR de genes implicados en la síntesis de solutos compatibles.	95
1.8.2	Valores de p del análisis estadístico realizado en los experimentos que se muestran en la Figura 1.5.1B.	96
1.8.3	Valores de p obtenidos del análisis estadístico realizado en los experimentos que se muestran en la Figura 1.5.4.	98
1.8.4	Valores de p obtenidos en el análisis estadístico realizado en los experimentos que se muestran en la Figura 1.5.8.	101
1.8.5	Valores de p obtenidos en el análisis estadístico realizado en los experimentos que se muestran en la Figura 1.5.9.	102
2.5.1	Secuencias de los Oligonucleótidos para la amplificación de <i>hog1</i> y <i>hog2</i> .	151
2.5.2	Condiciones del programa de PCR.	151
2.5.3	Secuencias de los oligonucleótidos generados para realizar la construcción de los sgRNA guías.	154

LISTA DE FIGURAS

1.1.1	Clasificación y ejemplos de organismos extremófilos.	18
1.1.2	Regulación bajo estrés osmótico de la expresión génica a través de la ruta HOG.	34
1.1.3	Respuestas osmoadaptativas en levaduras.	37
1.5.1	Tasa de crecimiento de <i>A. sydowii</i> (A) y acumulación de osmolitos (B) en condiciones óptimas, hipo e hiperosmóticas.	55
1.5.2	Vías de síntesis de metabolitos con posibles funciones osmolíticas en respuesta a la salinidad.	60
1.5.3	Análisis de la expresión de transcripciones relacionadas con la síntesis de osmolitos de <i>A. sydowii</i> en diferentes salinidades después de 7 días de cultivo.	62
1.5.4	Acumulación de solutos compatibles en <i>A. sydowii</i> después de diferentes choques osmóticos.	70
1.5.5	Regulación transcripcional de los genes enzimáticos involucrados en la síntesis de osmolitos después del choque hiperosmótico, choque hipoosmótico y choque inductor de estrés	71
1.5.6	Sistema HOG MAPK en <i>A. sydowii</i> .	78
1.5.7	Regulación de la relación K^+ / Na^+ intracelular en respuesta a la salinidad en células de <i>A. sydowii</i> .	82
1.5.8	Estrés oxidativo y marcadores antioxidantes evaluados en cultivos de <i>A. sydowii</i> en condiciones de salinidad estable.	85
1.5.9	Estrés oxidativo y marcadores antioxidantes evaluados en <i>A. sydowii</i> después del choque osmótico.	88
1.6.1	Resumen de los mecanismos generales de compensación osmótica y respuesta antioxidante en estrés por hipo-e hipersalinidad en <i>A. sydowii</i> .	91
1.8.1	Cromatogramas de todos los estándares utilizados. Concentración: 5 mg / mL cada uno.	93

1.8.2	Cromatogramas de muestras seleccionadas de todas las condiciones de salinidad.	94
1.8.3	Reconstrucción filogenética de los transcritos de MAPK en <i>Aspergilli</i> seleccionados, incluidos los genes <i>hog1</i> , <i>hog2</i> y <i>mpkC</i> de <i>A. sydowii</i> .	97
1.8.4	Niveles de expresión de los genes <i>hog1</i> y <i>hog2</i> .	100
2.5.1	pJET 1.2/blunt, vector de clonación.	152
2.5.2	Construcción de los vectores para mutagénesis dirigida en hongos filamentosos mediante el sistema CRISP/Cas9.	155
2.5.3	Mapa representativo del vector de clonación pJET 1.2 que contiene el inserto de <i>As_Hog1</i> .	159
2.6.1	Integridad del ARN total purificado de <i>A. sydowii</i> y fragmentos de los amplicones de Hog1 y Hog2.	160
2.6.2	Análisis de restricción de las colonias obtenidas de la transromación de la construcción pJet:: <i>hog1</i> .	160
2.6.3	Secuencia obtenida para pFC332::RNA guía de Hog1.	161
2.6.4	Construcción del vector pFC332 con el inserto de la unidad transcripcional del sgRNA específico para el gen <i>hog1</i> de <i>Aspergillus sydowii</i> .	163
2.6.5	Tamizado de las colonias trasformantes con pFC332:SgRNA_ <i>As_hog1</i> .	163
2.6.6	Características morfológicas de las posibles colonias mutantes en Hog1 de <i>Aspergillus sydowii</i> .	164

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. Marco teórico

1.1.1. *Los microorganismos extremófilos*

El crecimiento óptimo de los microorganismos depende de una serie de factores físicos, geoquímicos y biológicos. Dentro de los factores esenciales para el desarrollo de la vida microbiana encontramos: la actividad de agua (a_w), nutrientes específicos y los factores ambientales (pH, salinidad, temperatura, presión atmosférica, radiaciones, etc.) (Harrison *et al.*, 2013).

Durante los últimos años, las investigaciones han puesto de manifiesto la existencia de vida en ecosistemas con condiciones fisicoquímicas distintas a las establecidas como estándar por el hombre (pH neutro, temperatura en el rango de la mesofilia, 1 atm de presión, etc.) (Gomes y Steiner, 2004). A estos ambientes se les denomina extremos (Van den Burg, 2003; Gomes y Steiner, 2004), por lo que a los organismos que requieren de condiciones extremas para crecer de manera óptima se definen como extremófilos. Estos tipos de organismos se han encontrado en los tres dominios del árbol de la vida, Eukarya, Bacteria y Archaea (Rothschild y Mancinelli, 2001). Estos pueden ser clasificados de acuerdo a la condición fisicoquímica en la que alcanzan el óptimo de proliferación (Javaux, 2006) (Figura 1.1.1). Por otro lado, los organismos que crecen en ambientes moderados, pero que son capaces de resistir parámetros ambientales extremos durante un tiempo determinado y bajo condiciones específicas, son conocidos como organismos extremotolerantes (Gunde-Cimerman *et al.*, 2005).

Es común que muchos microorganismos, debido al ambiente en el cual se desarrollan, tengan la capacidad de crecer en más de una condición extrema. Con base en esto se han encontrado microorganismos definidos como poliextremófilos, los cuales requieren de varias condiciones extremas para mostrar un crecimiento óptimo (Padan *et al.*, 2001; Oren, 2002a; Harrinson *et al.*, 2013).



Figura 1.1.1. Clasificación de organismos extremófilos

La fisiología microbiana de los organismos extremófilos es una de las mayores incógnitas para el hombre, porque éstos poseen estrategias que le permiten sobrevivir y colonizar ambientes extremos.

El estudio de los microorganismos extremófilos reside tanto en posibles aplicaciones industriales de sus enzimas y bioproductos, como en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la extremofilia. Nuestro grupo se encuentra interesado particularmente en los organismos halófilos y halotolerantes, cuyo crecimiento se da en condiciones hipersalinas (≥ 0.5 M NaCl) (DasSarma y DasSarma, 2015).

1.1.2. Microorganismos halófilos/halotolerantes

Los organismos halófilos son aquellos extremófilos que requieren de altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) para su desarrollo y crecimiento (Benlloch *et al.*, 2002; Casamayor *et al.*, 2002; Litchfield y Gillevet, 2002; Burns *et al.*, 2004; Maturrano *et al.*, 2006; Rosselló-Mora *et al.*, 2008). El término halófilo proviene del griego, *halo* que significa sal y *philo* que significa amante de, es decir,

amante de la sal (Madigan *et al.*, 2003).

Los organismos halófilos pueden clasificarse de acuerdo con sus requerimientos de NaCl. Los halófilos extremos muestran un crecimiento óptimo en concentraciones que oscilan entre 2.5 y 5.2 M de NaCl; mientras que los halófilos moderados requieren concentraciones de 0.5 a 2.5 M de NaCl. En contraste, los organismos no halófilos únicamente pueden crecer en concentraciones menores a 0.2 M de NaCl. Se conocen algunos organismos denominados halotolerantes que presentan su óptimo de crecimiento en ausencia de sal, pero pueden tolerar concentraciones de hasta hasta 5.13 M de NaCl, que corresponde a 299.8 g de NaCl por litro de solución (Oren, 2008; Plemenitas *et al.*, 2014; Cira-Chavez *et al.*, 2018). Los organismos halófilos moderados y halófilos extremos son los principales colonizadores de los ambientes hipersalinos, aunque también pueden ser aislados de otros hábitats (Ventosa, 2006).

1.1.3. Mecanismos moleculares de halofilia

Se han descrito diferentes mecanismos fisiológicos que les permiten a los microorganismos halófilos y halotolerantes mantener su homeostasis en condiciones de salinidad, entre los que se encuentran: a) variación de la composición de la pared celular y membrana citoplasmática, principalmente modificaciones en los fosfolípidos existentes en las membranas y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de ellas (Russell, 1993); b) expresión diferencial de transportadores de iones, c) la acumulación de compuestos iónicos u orgánicos en el citoplasma, denominados solutos compatibles que permiten mantener el equilibrio osmótico sin interferir con la actividad enzimática (Brown, 1976). Algunos de estos mecanismos han sido ampliamente estudiados en bacterias halófilas, mientras que en hongos filamentosos se encuentran pobremente caracterizados (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009).

Cuando un organismo se enfrenta a una condición de estrés salino se generan, simultáneamente, dos tipos de estrés: el estrés osmótico que depende de la concentración de sal y, el estrés iónico derivado de la toxicidad provocada por los diferentes iones. Se ha demostrado que en concentraciones de sal

aproximadamente por arriba de 300 mM las reacciones metabólicas se inhiben ya que perturban el balance hidrofóbico y electrostático, afectando así el funcionamiento enzimático (Serrano, 1996).

La disponibilidad de agua es un factor determinante en la supervivencia y el crecimiento de cualquier célula viva. Generalmente, la exposición de las células a altas concentraciones de sales hace que éstas pierdan gran cantidad de agua y esto lleva a su muerte, a menos que desarrollen mecanismos de adaptación que les permita contener con en estas condiciones desfavorables (Ariño *et al.*, 2010). Los microorganismos halófilos tienen la capacidad de excluir el catión sodio hacia el medio extracelular y/o compartimentalizarlos mediante el uso de transportadores; por ejemplo en la levadura *S. cerevisiae* se han encontrado transportadores que excluyen al catión Na^+ hacia el medio extracelular como la bomba Ena 1-5 y Nha1, o el secuestro selectivo de cationes hacia los diferentes organelos (compartimentación), a través del transportador Vnx1 vacuolar y Nhx1 para los endosomas (Cyert y Philpott, 2013). En el análisis del genoma de la levadura halotolerante *H. werneckii* se identificó una considerable expansión en la familia de genes que codifican para transportadores de cationes metálicos en la membrana plasmática, como Nha1 y Ena Na^+ ATPasas tipo-P. Además, como en *S. cerevisiae* también en *H. werneckii* se han identificado transportadores de cationes en las membranas de los orgánulos como son: Nhx1 y Vnx1, los cuales se enriquecen en *H. werneckii* (Lenassi *et al.*, 2013; Plemenitas *et al.*, 2014). Estos transportadores también han sido identificados en el basidiomiceto halófilo obligado *W. ichthyophaga*, sin embargo, sólo hay un número bajo de transportadores catiónicos, a excepción del enriquecimiento de la familia de las Na^+ ATPasas tipo P (Plemenitaš *et al.*, 2014; Zajc *et al.*, 2013). En el caso, de *Aspergillus salisburgensis* fueron encontrados en su genoma la mayoría de los transportadores de iones, arriba mencionados (Tafer *et al.*, 2019).

Las células de organismos halófilos incrementan la actividad del agua de su citoplasma mediante estrategias de osmoadaptación que les permiten incrementar la osmolaridad interna de la célula; entre las que se encuentran: la acumulación de grandes cantidades de sal, específicamente KCl en el interior de la célula (*salt-in*),

o la acumulación de osmolitos o solutos compatibles orgánicos en el citoplasma (*salt-out*) (Roberts, 2005). Estos solutos compatibles reemplazan parcialmente al agua, protegen a las biomoléculas y por osmosis, dirigen el agua nuevamente dentro de la célula (Albertyn *et al.*, 1994).

1.1.3.1. Estrategia *salt in*

Se ha descrito que los organismos que tienen la habilidad de crecer de manera óptima en concentraciones elevadas de NaCl (hasta 5.0 M), emplean la acumulación de iones intracelulares de potasio (K^+) y cloruro (Cl^-) en concentraciones superiores a la concentración externa de NaCl para mantener cierto rango de presión de turgencia. Esta estrategia denominada *salt-in* se ha descrito en bacterias anaeróbicas halófilas y Arqueas principalmente (Hanelt y Muller, 2013; Sharma *et al.*, 2016; Vaidya *et al.*, 2018), la cual consiste en mantener el equilibrio osmótico mediante el aumento de las concentraciones citoplasmáticas de los iones de K^+ . De tal manera que el catión intracelular que predomina es el K^+ y no el Na^+ (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Este mecanismo requiere de ciertas adaptaciones en la maquinaria enzimática intracelular, ya que todas las enzimas deben mantener su conformación y actividad en presencia de altas concentraciones molares de K^+ (Kunte *et al.*, 2002). Para lograrlo, las proteínas de éstos tienen una naturaleza altamente ácida, con un exceso de aminoácidos ácidos (glutamato y aspartato) sobre los aminoácidos básicos (lisina y arginina). Por lo que tienen una carga altamente negativa en comparación con sus equivalentes no halófilos. Además, de tener un bajo contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Lanyi, 1974; Cira-Chávez *et al.*, 2018).

1.1.3.2. Estrategia *salt out*

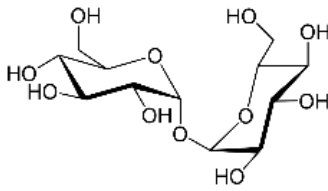
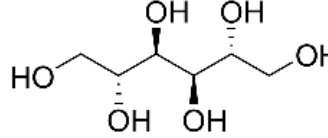
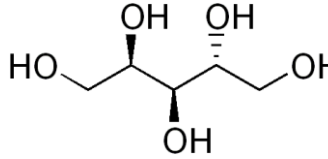
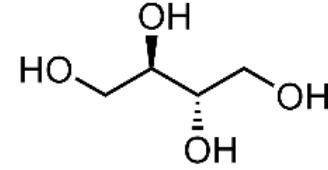
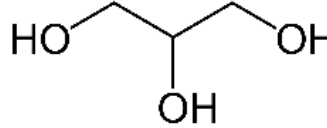
Alternativamente, existe la estrategia *salt-out* la cual consiste en la exclusión de iones Na^+ del medio citoplásmico mediante el uso de transportadores de membrana y/o organelos. Este mecanismo es empleado fundamentalmente por la gran mayoría de las bacterias halófilas y halotolerantes, así como levaduras, algas y hongos

halófilos (Oren, 2008; Vaidya *et al.*, 2018). Además de que para mantener el balance osmótico acumulan moléculas orgánicas que no interfieren con la actividad celular, las cuales pueden ser sintetizadas *de novo* por la célula o bien ser internalizadas al citoplasma desde el medio externo si se encuentran disponibles (Oren, 2008; Weinisch *et al.*, 2018).

Estas moléculas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, altamente solubles en agua, sin carga a pH fisiológico por lo que no interfieren con el metabolismo de la célula, aunque se acumulen a altas concentraciones. De ahí su denominación de solutos compatibles. Ellos actúan aumentando la fuerza iónica intracelular y estabilizando las macromoléculas celulares contra la inactivación, inhibición y desnaturalización (Brown, 1976; Lippert y Galinski, 1992; Galinski, 1995; Weinisch *et al.*, 2018).

De acuerdo a su naturaleza, los solutos compatibles se dividen en: polialcoholes (glicerol, manitol, sorbitol, entre otros), 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). En bacterias se ha reportado la presencia de solutos compatibles como glicina, betaína y glutamato (Oren *et al.*, 2002), mientras que en hongos se ha descrito la acumulación de solutos compatibles como trehalosa, y polioles como manitol, glicerol, arabitól y eritritol (Tabla 1.2.1.) (Koget *et al.*, 2007; Plemenitaš *et al.*, 2008; Zajc *et al.*, 2014).

Tabla 1.1.1. Estructuras de los solutos compatibles acumulados en hongos

Soluto	Estructura química	Fórmula química
Trehalosa		$C_{12}H_{22}O_{11}$
Manitol		$C_6H_{14}O_6$
Arabitol		$C_5H_{12}O_5$
Eritritol		$C_4H_{10}O_4$
Glicerol		$C_3H_8O_3$

Sin embargo, los estudios de homeostasis relacionados con la síntesis y acumulación de solutos compatibles en los hongos filamentosos halófilos han sido limitados, a pesar de que algunos autores han propuesto que la acumulación de solutos compatibles es una de las adaptaciones de mayor importancia fisiológica. Distintos reportes indican que el glicerol es el metabolito que se encuentra frecuentemente en distintos microorganismos. Por ejemplo, en estudios realizados en *Aspergillus niger* se observó que en micelio joven se acumula mayoritariamente el glicerol, seguido del eritritol, mientras que en micelio viejo se encuentran preferencialmente el manitol y el eritritol (Witteveen y Visser, 1995; Krijgsheld *et al.*, 2013; Van Leeuwen *et al.*, 2013).

Se ha reportado también en la levadura *Hortaea werneckii* y el basidiomiceto *Wallemia ichthyophaga*, que la estrategia de osmoadaptación empleada es la acumulación de una mezcla de polioles (glicerol, arabitol y manitol) (Plemenitaš *et*

al., 2014; Zajc *et al.*, 2014), mientras que en las conidiosporas de *A. niger* y *A. nidulans* se ha descrito la acumulación de trehalosa y manitol en condiciones de hipersalinidad (Ruijter *et al.*, 2004; Van Leeuwen *et al.*, 2013). Sin embargo, el glicerol puede relacionarse no solo a la presión osmótica, producida por concentraciones elevadas de NaCl, sino también con concentraciones elevadas de otros solutos, entre ellos la glucosa (Van Eck *et al.*, 1993; Plemenitaš *et al.*, 2008; Dakal *et al.*, 2014).

A pesar de estas evidencias el conocimiento acerca de la acumulación de solutos compatibles y las estrategias de haloadaptación se encuentra limitado tanto a nivel molecular como fisiológico (Zajc *et al.*, 2014). En hongos filamentosos, aún se desconoce como se da la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de estos solutos y la regulación de su acumulación. Por otro lado, se ha logrado complementar mutantes de los genes involucrados en la vía de regulación de la síntesis del glicerol en *S. cerevisiae* con los genes ortólogos encontrados en *A. nidulans*, *W. ichthyophaga* y *H. werneckii*, demostrando que estas vías están conservadas (Furukawa *et al.*, 2005; Lenassi *et al.*, 2007; Konte *et al.*, 2016). Sin embargo, aún no se comprenden del todo los mecanismos de osmoadaptación.

1.1.4. Solutos compatibles

1.1.4.1. Funciones de los solutos

Cuando hongos o levaduras se someten a estrés, éstos sintetizan metabolitos, entre ellos algunos que funcionan como solutos compatibles para compensar los desafíos ambientales. Dentro de estos están la trehalosa que es un disacárido no reductor, y polioles algunos de los que ya se han mencionado. Todos ellos tienen relevancia metabólica, porque participan como fuente de reserva de carbono, y son considerados como reguladores redox, además son osmoprotectores frente a diversos factores de estrés por calor, congelación, desecación, alta salinidad, radicales de oxígeno, radiación, urea y otros agentes desnaturizantes en la integridad de las proteínas, ácidos nucleicos, biomembranas e incluso las células completas (da Costa *et al.*, 1998; Lentzen y Schwarz, 2006).

En la actualidad se conoce que la estrategia de la acumulación de los solutos compatibles se conserva en los tres reinos de la vida (*Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*); sin embargo, se ha demostrado que la naturaleza de los osmolitos puede variar entre géneros y especies, dependiendo además de las condiciones de crecimiento de los diferentes organismos (Röhr *et al.*, 1987; Omar *et al.*, 1992; Lucca *et al.*, 2002; Tomaszewska *et al.*, 2014).

1.1.4.1.1. Trehalosa

La trehalosa es un azúcar que se encuentra presente en una amplia variedad de organismos dentro de los cuales se pueden mencionar bacterias, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y plantas. Es un disacárido no reductor formado por dos unidades de glucosa las cuales están unidas mediante un enlace α -1,1-glucosídico (Elbein, 1974; Argüelles 2000; Fillinger *et al.*, 2001;). Este azúcar juega un papel importante en la protección de las membranas celulares y las biomoléculas que se encuentran expuestas a sufrir un daño que puede ser causado por diferentes tipos de estrés como los generados por la alta osmolaridad, calor, oxidación, desecación y congelación (Elbein *et al.*, 2003).

Tanto en las bacterias como en los hongos, la trehalosa desempeña un papel como reserva de carbono, y también constituye una molécula de señalización en vías metabólicas específicas; en bacterias forma parte de la estructura de la pared celular y en los hongos se ha descrito que la trehalosa se sintetiza al comienzo de los períodos de crecimiento, y no cuando hay un exceso de fuente de energía exógena, siempre y cuando la disponibilidad de otros nutrientes esenciales no sea un factor limitante, lo que protege la integridad de la célula contra el daño por estrés (Argüelles 2000; Paul *et al.*, 2008). Donnataria y colaboradores en el año 1994 llegaron a la conclusión de que la trehalosa en solución protege las moléculas y estructuras biológicas tales como las proteínas y las biomembranas, impidiendo que las moléculas de agua se eliminen durante la deshidratación o congelación (Iturriaga *et al.*, 2009).

1.1.4.1.2. Manitol

El manitol es un polialcohol que se encuentra en bacterias, hongos, algas y plantas (Iwamoto y Shiraiwa, 2005; Wyatt *et al.*, 2014). En estos organismos, el compuesto actúa como un soluto compatible, además de tener otras funciones, incluida la osmorregulación, el almacenamiento de carbono, la regeneración del poder reductor, protección contra el estrés por calor (Corina y Munday, 1971; Solomon *et al.*, 2007) y protección contra el estrés oxidativo, funcionando como antioxidante debido a su capacidad para eliminar las especies reactivas de oxígeno (EROs en español, ROS en inglés) (Smirnoff y Cumbes, 1989; Iwamoto y Shiraiwa, 2005; Yancey, 2005; Solomon *et al.*, 2007; Upadhyay *et al.*, 2015). El manitol también juega un papel en la esporulación asexual de *Stagonospora nodorum*, que es un patógeno del trigo (Ruijter *et al.*, 2003; Solomon *et al.*, 2006), la germinación de esporas en *A. niger* (Voegelé *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2006). Otra de las funciones que se le atribuyen es la de regular a las enzimas, así como la regulación del pH citoplasmático al actuar como un amortiguador (Jennings, 1985; Velez *et al.*, 2007).

1.1.4.1.3. Glicerol

En diferentes organismos como por ejemplo en las levaduras en múltiples revisiones se ha mostrado evidencia que indica que el nivel intracelular de glicerol se ajusta en respuesta a la osmorregulación, y regula el aumento de la presión osmótica (Reed *et al.*, 1987; Van Eck *et al.*, 1993; Albertyn *et al.*, 1994; Tekolo *et al.*, 2010).

El glicerol funciona como osmoprotector en levaduras durante la proliferación, de la misma manera se considera una fuente de carbono y energía, ejerce un papel fundamental en la regulación del daño oxidativo, ya que equilibra el estado reductor de la célula. También es el precursor de los glicerofosfolípidos que forman parte de las biomembranas (Hohmann, 2002; Hohmann, 2009).

Hohmann, en 2009, concluyó que el glicerol actúa como un soluto compatible, ya que es capaz de reemplazar parcialmente a las moléculas de agua que se encuentran formando la capa de hidratación alrededor de las biomoléculas, de esa

manera ejerce función osmoprotectora, lo que provoca que el potencial hídrico intracelular aumente favoreciendo el restablecimiento osmótico (Andre, 1990; Blomberg y Adler, 1989; Hallsworth, 1998).

En los reportes existentes se evidencia que el glicerol tiene gran importancia en el mantenimiento de fosfato inorgánico citosólico (Pi), el cual en bajas concentraciones afecta la actividad de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), por lo que es necesario mantener el equilibrio del Pi cuando ocurre el cambio del metabolismo gluconeogénico al glucolítico (Thevelein y Hohmann 1995; van Heerden *et al.*, 2014).

1.1.4.1.4. Eritritol y Arabitol

En levaduras y hongos se ha estudiado poco la función del eritritol y arabinol, que participan en los procesos normales de crecimiento (Tomaszewska *et al.*, 2014).

El eritritol, es un alcohol de azúcar de cuatro carbonos (1,2,3,4-butanetetrol), se considera como un metabolito de almacenamiento de carbono y de energía en algas y hongos, al igual que se encuentra en varias frutas (Moon *et al.*, 2010).

A su vez el D-arabitol es un pentitol cíclico natural; Bernard y colaboradores en 1981 reportaron que este metabolito es producido por *Candida tropicalis* y *Candida lipolytica*, ambas levaduras patógenas, desconociéndose la función del arabitol a nivel clínico o en la expresión de factores de patogenicidad (Hattori y Suzuki, 1974). Moon y colaboradores en 2010 reportaron distintas levaduras que se consideran como osmotolerantes como *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula* y *Pichia*. Este tipo de levaduras acumulan osmolitos compatibles, principalmente el glicerol, aunque también se han identificado el eritritol y el arabitol, frente a un estrés osmótico (Yancey *et al.* 1982; van Eck *et al.* 1993; Kayingo *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2010) y se les atribuyen las funciones generales de los solutos compatibles, como proteger y estabilizar las enzimas, lo cual permite que se lleven a cabo las funciones celulares en condiciones osmóticas, almacenamiento de energía y carbono, participan en mantener el equilibrio redox (Brown 1978; Moon *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta todo esto, son capaces de contrarrestar la elevada presión

osmótica cuando los organismos son expuestos al estrés osmótico, por lo que son considerados como osmoprotectores (Blomerg y Adler 1992; Brown 1978; Lucca *et al.*, 2002; Diano *et al.*, 2006).

La construcción y caracterización de diferentes cepas mutantes de levadura ha permitido evaluar las funciones de la trehalosa y el glicerol en la supervivencia de células de la levadura *S. cerevisiae* cuando estas se someten a estrés osmótico. Se han realizado estudios en *S. cerevisiae* construyendo cepas mutantes (*tps1Δ tps2Δ* y *tps1Δ hxk2Δ*), las cuales mostraron mayor sensibilidad que la cepa silvestre, cuando se tratan con un estrés osmótico severo ($a_w = 0.866$). Esto confirma la importancia de la participación de la trehalosa en los mecanismos que protegen del estrés. Por otro lado, en esta misma levadura se han realizado estudios con cepas mutantes *nth1Δ* y *nth1Δ gpd1Δ*, expuestas a un estrés osmótico moderado ($a_w = 0.98$ y 0.97 , NaCl), en estos casos, a pesar de que ocurre una hiperacumulación de trehalosa, estas cepas no mejoraron sus tasas de supervivencia en comparación con las observadas en la cepa silvestre. Aún cuando los niveles de glicerol aumentaron muy rápidamente en las células *nth1Δ* a comparación de lo observada, en la cepa silvestre, esto no mejoró la respuesta a estrés en la mutante. Este estudio corroboró que la producción de glicerol no está relacionada con los niveles intracelulares de trehalosa, por lo que este soluto no actúa como un compuesto de reserva para la síntesis de glicerol (Hounsa *et al.*, 1998). De igual manera, Albertyn y colaboradores (1994) construyeron mutantes (*gpd1Δ*, *hog1Δ* y *gpd1Δ hog1Δ*), y las estudiaron en las condiciones de 0.6 M y 1.2 M de NaCl. Esto permitió analizar la función del glicerol en respuesta al estrés osmótico y comprobar que la expresión de GPD1 está controlada por la vía de HOG. Sus resultados aportaron evidencia para concluir que las mutantes por delección de GPD1 fueron incapaces de acumular altos niveles de glicerol al someterse a estrés osmótico. El crecimiento de una mutante *gpd1Δ* en una a_w normal ($a_w = 0.998$) no se observó afectado, sin embargo, en $a_w = 0.960$ y 0.980 el crecimiento si se mostró inhibido con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, esta mutante mostró ser menos sensible al estrés osmótico que la mutante *hog1Δ*, y la doble mutante (*gpd1Δ hog1Δ*) fue incluso más sensible que cada una de las mutantes simples. Con respecto a la mutante *hog1Δ*, se

concluyó que es osmosensible y parcialmente deficiente en la acumulación de glicerol inducida por el estrés osmótico. En esta cepa mutante el contenido de glicerol fue disminuido con respecto al acumulado en la cepa silvestre. Por otra parte, la inducción de la actividad GPDH y del nivel de ARNm de GPD1 fue totalmente deficiente en el mutante *hog1Δ*. Por lo que con estos resultados concluyeron que la vía HOG regula la expresión de *GPD1* durante el estrés osmótico y podría ser la única vía responsable de la inducción de la expresión de *GPD1* durante el estrés osmótico. En las mutantes que se investigaron, tanto en las sencillas *gpd1Δ* y *hog1Δ* como en la doble mutante *gpd1Δ hog1Δ*, la concentración de glicerol extracelular disminuyó durante el estrés salino hasta aproximadamente el 50% del valor inicial (Albertyn *et al.*, 1994).

1.1.4.2. Transporte de los solutos

En *S. cerevisiae* se ha identificado al canal Fps1p (Luyten *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2005; Beese-sims *et al.*, 2011). Este canal se cierra rápidamente cuando la concentración de solutos en el exterior es elevada evitando el eflujo de glicerol, contribuyendo a la acumulación de glicerol intracelular (Tamás *et al.*, 1999). Por el contrario, permite la entrada o influjo de glicerol cuando disminuye la osmolaridad intracelular (Luyten *et al.*, 1995; Tamás *et al.*, 1999). La velocidad de eflujo de glicerol es mayor que el influjo mediado por Fps1p (Oliveira *et al.*, 2003).

Además, se ha descrito que al simportador (glicerol/H⁺) Stl1p que permite la entrada de glicerol como respuesta inmediata al estrés osmótico. Este es codificado por el gen *STL1*, cuya expresión es inducida por NaCl y es dependiente de Hog1p y Hot1p (Gasch *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2005).

Tanto el simportador Stl1 como el transportador Fps1 funcionan paralelamente captando al glicerol de una manera dependiente de energía para lo cual se emplea un gradiente de protones a través de la membrana plasmática. Este sistema de captación de glicerol mediante el simporte glicerol/H⁺, ocurre co-transportando una molécula de glicerol contra su gradiente de concentración y un protón hacia el interior de la célula. Este sistema requiere la bomba de protones por una ATPasa

de membrana que genera el gradiente y esto conlleva a un alto consumo de energía (Sutherland *et al.*, 1997; Sauday, 2010).

En el caso de la acumulación de trehalosa, ésta se exporta mediante el simportador Agt1p (Han *et al.*, 1995; Jules *et al.*, 2004; Ratnakumar *et al.*, 2011; Eleutherio *et al.*, 2015). Aunque el D-manitol juega un papel importante en la osmorregulación y tolerancia al estrés (Jennings, 1984), se conoce poco de su metabolismo y transporte en levaduras, pero en plantas como *Apium graveolens* se ha descrito la proteína AgMaT1 encargada de mediar el transporte de manitol (Noiraud y colaboradores (2001). AgMaT1p pertenece a la superfamilia de transportadores principales (MFS: Major Facilitator Superfamily; Marger y Saier, 1993), como se ha descrito para la mayoría de las proteínas MFS, los transportadores de polioles son proteínas integrales de membrana con 12 segmentos transmembranales y las secuencias de consenso de la familia de transportadores de azúcar (SP, Sugar Porter Family), que está conservada en los transportadores de polioliol (Griffith *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 2003; Leandro *et al.*, 2009; Kalliampakou *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2014). Klepek y colaboradores en el 2005 caracterizaron el simportador de amplio espectro H⁺ AtPlt5 (AtPmt5) de *Arabidopsis thaliana*, a través del cual se transportan polioles, como sorbitol, xilitol, eritritol y glicerol, así como mioinositol y diferentes hexosas y pentosas (Klepek *et al.*, 2005).

Se ha demostrado la presencia de transportadores de polioles en levaduras como *Rhodotorula glutinis*, que acumula alditoles (D-glucitol, D-manitol, ribitol, xilitol, D-arabitol, L-arabitol y eritritol). Ésta presenta un sistema de transporte constitutivo en su membrana citoplasmática (Kloppel y Hofer, 1976). Por otro lado, la levadura *Candida intermedia* presenta un transportador de alta afinidad ($K_m = 6$ mM) para sorbitol, el cual transporta polioles/H⁺, y también es selectivo a xilitol, D-arabitol y D-manitol, pero no a glucosa (Loureiro- Dias, 1987; Pereira *et al.*, 2014).

En 2014, Pereira y colaboradores realizaron un análisis de la actividad de cinco distintos transportadores simportes de polioliol/H⁺ de *D. hansenii* a través de su expresión en *S. cerevisiae*. Sus resultados arrojaron que de los cinco que fueron evaluados a nivel bioquímico, solo dos permitían el paso de manitol y arabitol (simporte H⁺/polioliol (D-sorbitol/ D-mannitol/ ribitol/ D-arabitol/ D-galactitol),

nombrados *DhSyl1*, *Symporter Polyols 1* y *DhSyl2*, *Symporter Polyols 2*) (Pereira *et al.*, 2014).

1.1.5. Vía de respuesta a alta osmolaridad mediada por HOG (High Osmolarity Glycerol)

Se ha demostrado que la vía de HOG dirige la adaptación fisiológica de las células frente a una elevada osmolaridad (aumento de la concentración de solutos) en el espacio extracelular, evitando la pérdida de agua (Saito y Posas, 2012) y manteniendo la turgencia celular mediante la síntesis y la acumulación de solutos compatibles al asegurar un equilibrio osmótico entre el citosol y el medio extracelular (Hohmann, 2009).

La vía de HOG además de ser estimulada por la osmolaridad, también es inducida por estrés oxidativo (Bilsland *et al.*, 2004), pH ácido (Kapteyn *et al.*, 2001), temperaturas elevadas (Winkler *et al.*, 2002) o bajas (Hayashi y Maeda, 2006; Panadero *et al.*, 2006) y la inhibición de la síntesis de esfingolípidos (Tanigawa *et al.*, 2012).

La activación de la MAPK cinasa (Mitogen-Activated Protein Kinases) Hog1 está controlada por dos ramas independientes, denominadas vía de Sln1 y vía Sho1 las que convergen en la activación de la MAPKK Pbs2, la cual fosforila a Hog1 (Figura 1.2.2). Existen datos que indican que la rama de Sln1 desempeña una función más importante, ya que es más sensible y rápida a cambios osmóticos, y en condiciones iso-osmóticas la actividad quinasa se activa, mientras que cuando se produce un estrés hiperosmótico esta actividad se inhibe (Maeda *et al.*, 1994; Vázquez-Ibarra *et al.*, 2018). En ausencia de la vía de Sho1, Sln1 induce la activación total de Hog1 (O'Rourke y Herskowitz, 1998; Hohmann, 2002; Macia *et al.*, 2009). Por el contrario, la otra rama Sho1 se activa como respuesta al estrés hiperosmótico, se encarga de responder a estímulos de altas salinidades producido en el medio extracelular (Maeda *et al.*, 1994; Maeda *et al.*, 1995).

La rama Sln1 está controlada por el sensor de membrana Sln1, relacionado evolutivamente con los sensores por sistemas de dos componentes descritos por

primera vez en procariotas (Posas *et al.*, 1996). Este receptor posee un dominio histidina cinasa; que al formar un dímero tiene capacidad de autofosforilarse, lo que inicia la cascada de fosfotransferencia compuesta por Sln1-Ypd1-Ssk1 (Hohmann, 2009). Sln1 se encuentra constitutivamente en estado activo, cataliza su propia fosforilación y por tanto la fosforilación de Ypd1 y Ssk1, que al estar fosforilado no interacciona con las MAPKKKs Ssk2 y Ssk22 (Horie *et al.*, 2008). Sin embargo, en condiciones de alta osmolaridad este osmosensor está inactivo, con la consiguiente desfosforilación de Ssk1, induciendo su interacción con Ssk2 y Ssk22 para transmitir la señal (Tatebayashi *et al.*, 2003, Folch-Mallol *et al.*, 2004). Estas dos MAPKKKs fosforilan a la MAPKK Pbs2, la cual es responsable de la fosforilación en los sitios Thr-174 y Tyr-176, por lo tanto, fosforila y activa la MAPK Hog1. La fosforilación de Hog1p es una respuesta rápida y transitoria que se desencadena frente a un estrés hiperosmótico (Posas y Saito, 1997; Thomason y Kay, 2000; Kruppa *et al.*, 2003; Folch-Mallol *et al.*, 2004 Kruppa *et al.*, 2004; Kruppa y Calderone, 2006). Una vez fosforilada, la MAPK Hog1 se transloca al núcleo y fosforila a factores de transcripción como: Sko1p, Skn7p, Hot1p, Msn1p, Msn2p y Msn4p (Folch-Mallol *et al.*, 2004; Mettetal *et al.*, 2008; Muzzey *et al.*, 2009).

La rama Sho1, ruta de respuesta a alta osmolaridad, está controlada por el osmosensor Sho1. Se trata de una proteína con cuatro dominios transmembranales y un dominio citoplásmico SH3 (*Src Homology*) (Raitt *et al.*, 2000; Tatebayashi *et al.*, 2007; Vadaie *et al.*, 2008). La función de Sho1 se basa en la unión a través de su dominio SH3 a regiones ricas en prolinas presentes en Pbs2 (Maeda *et al.*, 1995; Zarrinpar *et al.*, 2004), que actúan como andamio para reclutar a la membrana a diferentes componentes de la cascada para que se localicen en lugares de crecimiento polarizado y remodelado activo (Reiser *et al.*, 2000). Sho1 consta a su vez de una región por la que se une a Ste11 independientemente de Pbs2 (Zarrinpar *et al.*, 2004). Así, todos los componentes de la cascada se encuentran anclados a la membrana plasmática a través de Sho1 (Raitt *et al.*, 2000). Finalmente, la activación de Pbs2 a través de las dos ramas descritas (tanto por Ssk2/22 como por Ste11) induce la fosforilación de la MAPK Hog1 (Figura 1.1.2), que se transloca al

núcleo para a su vez fosforilar también a los factores de transcripción que activan la transcripción de genes que contienen la secuencia STRE (*Stress Response Element*) en su región promotora donde se regulan aproximadamente 900 genes, 600 genes son reprimidos y 300 expresados (Święciło, 2016), además regula post-traduccionalmente a las enzimas relacionadas a las síntesis de solutos compatibles (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Entre los factores de transcripción sobre los que actúa Hog1 destacan los activadores Smp1, Msn2/Msn4, Msn1 y Hot1 y el represor Sko1 (de Nadal *et al.*, 2007; Mettetal *et al.*, 2008; Muzzey *et al.* 2009). El activador Hot1, unido constitutivamente al promotor del gen *GPD1*, induce la transcripción de este que controla la producción de glicerol en la célula (Alepuz *et al.*, 2001). Además, la MAPK Hog1 no sólo recluta a la RNA-polimerasa II a genes blanco, como *STL1*, *GPD1* y *GPP2* (Alepuz *et al.*, 2001; Hohmann, 2002; Alepuz *et al.*, 2003), sino también a los complejos remodeladores de cromatina (Mas *et al.*, 2009) y participa en la fase de elongación transcripcional (de Nadal *et al.*, 2011), además de regular post-traduccionalmente a las enzimas relacionadas a las síntesis de solutos compatibles (Saito y Posas, 2012).

También se ha descrito que Ste50 interacciona con Sho1, pero la función que tiene esta unión es todavía desconocida (Tatebayashi *et al.*, 2006). Asimismo, se ha comprobado que la MAPK Hog1 ejerce una retrofosforilación sobre Ste50. Siendo Ste50 una proteína adaptadora, con la función principal de formar un complejo estable con Ste11 y favorecer su anclaje a la membrana. Ste50 es una proteína común a otras rutas, limita la duración de la activación de Kss1, que es una MAPK cinasa, que participa en la vía de respuesta de apareamiento, inhibiendo el crecimiento invasivo en condiciones de alta osmolaridad y evitando así el entrecruzamiento entre rutas (Hao *et al.*, 2008). La MAPK Hog1 es además la responsable de inactivar al factor de transcripción Tec1, el cual participa en el crecimiento filamentoso, por lo que en condiciones de estrés osmótico la actividad de Tec1 se ve afectada por Hog 1 MAPK, el cual inhibe la unión de Tec1 al ADN (Madhani y Fink, 1997; Shock *et al.*, 2009).

En las últimas décadas se ha intentado identificar y estudiar las vías celulares que modulan el balance osmótico a través del uso de solutos compatibles en bacterias,

levaduras y hongos. En muchos casos se ha utilizado la complementación de mutantes en Hog 1 de *S. cerevisiae* con los genes ortólogos que participan en la vía de HOG o bien en la síntesis del glicerol de otros organismos tales como, *C. albicans*, *H. werneckii*, *A. nidulans*, entre otros (Furukawa *et al.*, 2005; Duran *et al.*, 2010; Kejžar *et al.*, 2015), siendo esta metodología útil en la comprensión de la vía de HOG y de síntesis de solutos compatibles principalmente de organismos cuya manipulación genética representa un reto. Sin embargo, aún se requiere de investigar como funcionaría la vía de HOG o la síntesis de solutos compatibles de organismos que al contrario de los mesófilos viven expuestos a condiciones de alta osmolaridad como sería el caso de los hongos halófilos, de los que aún se desconoce mucho de su fisiología y de la regulación de sus procesos celulares.

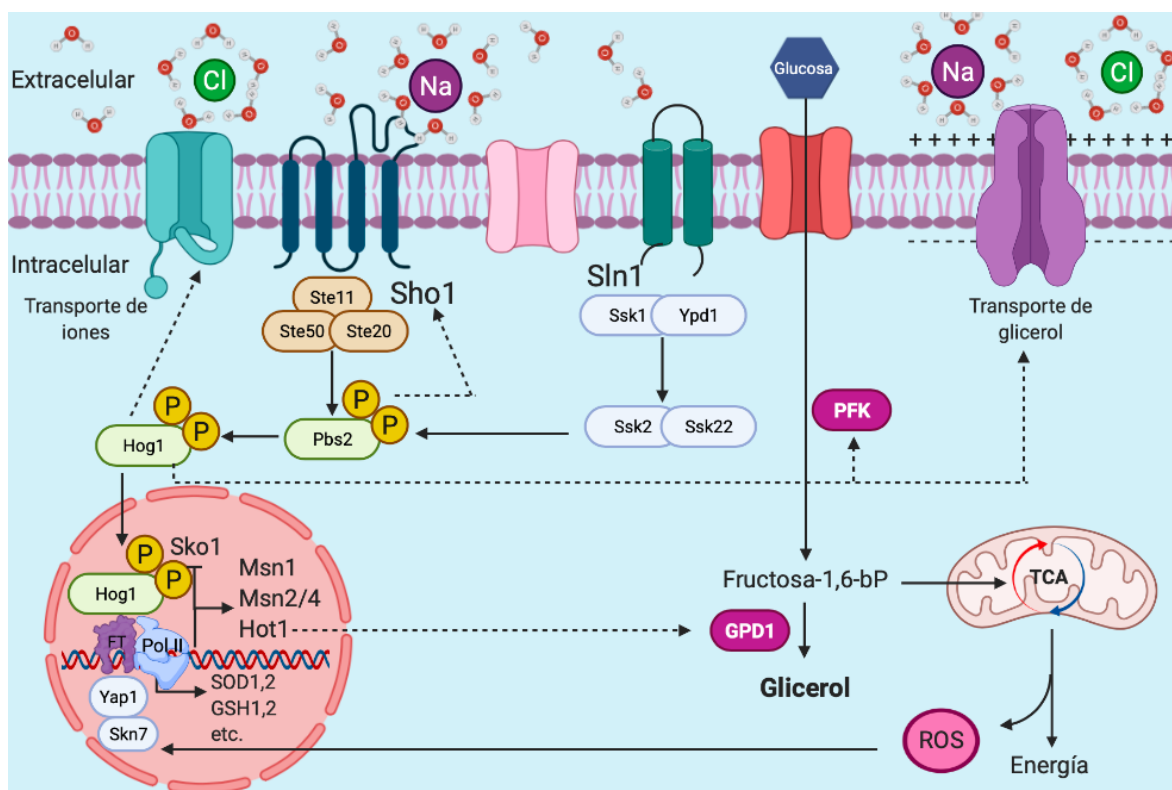


Figura 1.1.2. Regulación bajo estrés osmótico de la expresión génica a través de la ruta HOG. La célula es capaz de detectar un aumento de salinidad en el ambiente en que se halla, a través de dos sensores encontrados en la membrana independientes que transducen la señal a sus correspondientes MAPKKK, Ssk2/22 y Ste11, respectivamente. La activación de las MAPKKKs genera una cascada de quinastas común a través de la

fosforilación de la MAPKK Pbs2 que fosforila la MAPK Hog1. Hog1 puede por lo tanto acceder al núcleo, regulando directa e indirectamente la transcripción de un elevado número de genes (Rodríguez-Pupo y Garfias –Padilla, 2021).

Aún se requiere investigar como la vía de HOG y la síntesis de solutos compatibles se relaciona con otros tipos de estrés, ya que en organismos como *S. cerevisiae* se ha visto que una vez que Hog1 activa factores de transcripciones universales para respuesta al estrés como Msn2/Msn4 prepara a la célula para que responda más rápido a otros tipos de estrés como el estrés oxidativo reclutando también factores de transcripción específicos como Yap1 y Skn7 (Figura 1.1.2.) (Święciło, 2016; Gibson *et al.*, 2007; Auesukaree, 2017).

1.1.5.1. Funciones de HOG en hongos halófilos/halotolerantes

Como se ha venido describiendo en los puntos anteriores, una vez producido el choque osmótico, las células como las de *S. cerevisiae* desencadenan una serie de mecanismos a corto plazo (menos de 1 minuto), como el cierre inmediato del canal de exportación de glicerol Fps1, con el objetivo de evitar la salida del glicerol al medio extracelular y por lo tanto garantizar la acumulación de este soluto compatible (Tamás *et al.*, 1999, 2003; Thorsen *et al.*, 2006; Hohmann, 2007) y se activa el sistema de transducción de señales de glicerol de alta osmolaridad (HOG) (de Nadal *et al.*, 2002; Hohmann, 2002; Hohmann, 2007).

Hog1 una vez fosforilado ejerce varios roles en la adaptación al estrés osmótico tanto en el citoplasma como en el núcleo. Parte de la proteína Hog1 fosforilada migra al núcleo y otra se queda en el citoplasma, donde se encarga de modular directamente el transporte de iones en la membrana plasmática, regulando a los transportadores Ena1 (ATPasa tipo-P Na⁺), Nha1 (antiportador Na⁺/H⁺) y Tok1 (uniportador de K⁺), siendo Ena1 el más importante frente a un estrés hiperosmótico. Este transportador es necesario para el crecimiento en presencia de concentraciones elevadas de Na⁺, mientras que Nha1 y Tok1 no tienen prácticamente ningún papel en esta respuesta a largo plazo al estrés hiperosmótico. Los niveles de proteína Nha1 no están sujetos a regulación por estrés salino, lo que

indica que Nha1 activado (y presumiblemente Tok1) son insuficientes para reducir las concentraciones de iones a los niveles que se requieren para la transcripción y el crecimiento celular (Proft y Struhl, 2004). Por esto se requiere de una inducción robusta de ese transportador Ena1 dependiente de Hog1, para obtener una respuesta a largo plazo al estrés hiperosmótico (Proft y Struhl, 2004). Además, HOG1 estimula la glucólisis, regulando el flujo metabólico, necesario en la acumulación del glicerol (Dihazi *et al.*, 2004), y detiene el ciclo celular (Clotet *et al.*, 2006; Escote *et al.*, 2004) y reduce la eficiencia traduccional (Figura 1.2.3) (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001; Bilsland *et al.*, 2004; de Nadal y Posas, 2010). Por otro lado, Hog1 reorganiza el citoesqueleto de actina, y está involucrado en cambios en la dinámica de la pared celular (Bellí *et al.*, 2001; Hohmann, 2002; Clotet y Posas, 2007; de Nadal y Posas, 2010; Martínez-Montañés *et al.*, 2011). Sin embargo, una parte significativa de la proteína Hog1 MAPK activa, es decir, fosforilada, se acumula en el núcleo donde se recluta para dirigirse a los promotores y así controlar la expresión génica (O'Rourke and Herskowitz, 2004; Pokholok *et al.*, 2006; Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Hohmann, 2007; Saito y posas, 2012).

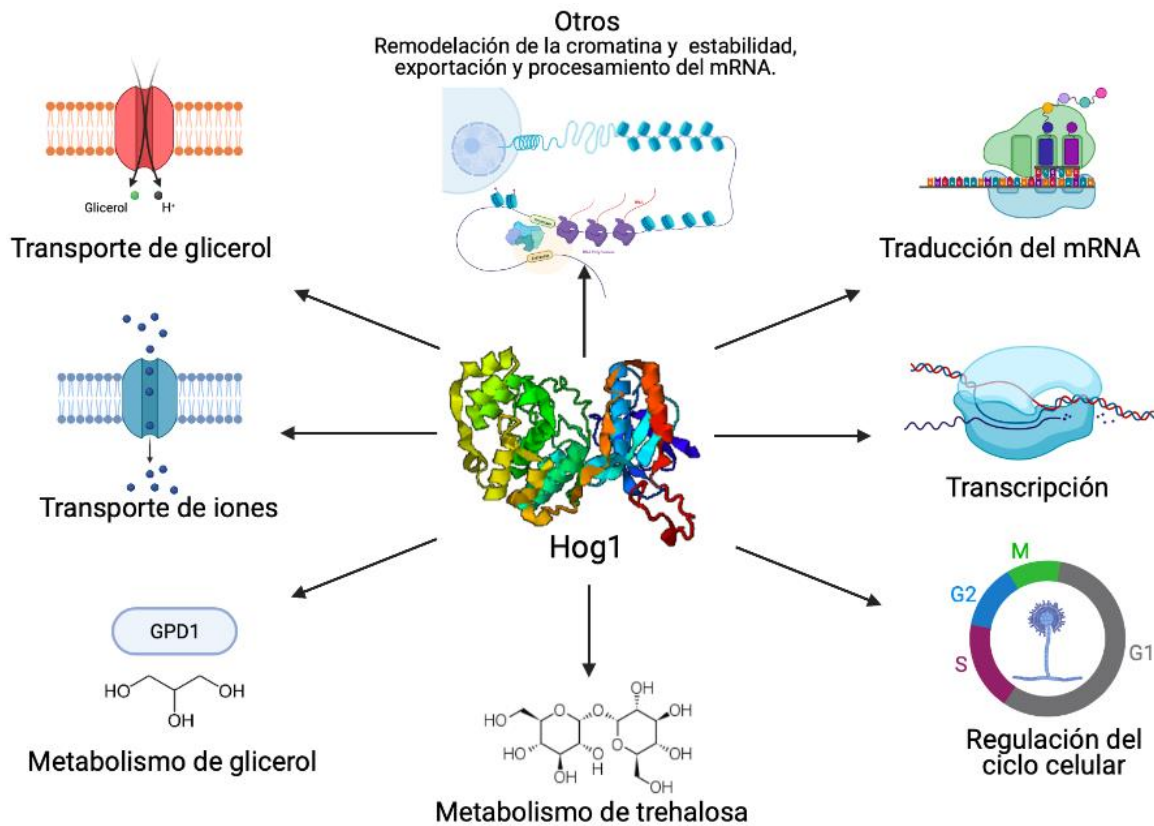


Figura 1.1.3. Respuestas osmoadaptativas en levaduras. En respuesta a un aumento de la osmolaridad extracelular, se activa Hog1 MAPK, lo que conduce a la inducción de respuestas adaptativas citoplásmicas y nucleares. (Tomado de información de Saito y Posas 2012)

1.2. Antecedentes

En el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB, se aisló una cepa fúngica moderadamente halófila, que se identificó como *Aspergillus sydowii*, mediante criterios morfológicos y moleculares. Experimentos de crecimiento de *A. sydowii* en carboximetilcelulosa (2 % CMC), como fuente de carbono en presencia de distintas concentraciones de NaCl, mostraron que la velocidad de crecimiento óptima se da en presencia de 0.5 - 1M de NaCl y que este puede crecer sobre diferentes sustratos como fibras de agave, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar y aserrín; además de metabolizar hidrocarburos aromáticos en presencia de NaCl (Batista-García *et al.*, 2014).

A pesar de que *A. sydowii* fue identificado por primera vez en 1913 por Bainier y Sartory como *Sterigmatocystis sydowi* y reclasificado en 1926 por Charles Thom y Margaret Brooks Church (Bainier y Sartory, 1913), poco se conoce respecto a su fisiología, particularmente cómo contienda con la presencia de altas concentraciones de sal. Dentro de los pocos estudios que existen respecto a este hongo se encuentra la caracterización de enzimas como queratinasas, amilasas e invertasas (Marcondes *et al.*, 2008; De Paris *et al.*, 2010; Novaki *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta el momento no hay información sobre los mecanismos de halofilia; particularmente se desconoce que tipos de osmolitos compatibles sintetiza, y si esta respuesta está regulada por la vía de HOG.

En nuestro laboratorio se realizó un estudio comparativo del transcriptoma de *A. sydowii* BMH-0004, cultivado en paja de trigo en condiciones de salinidad (0.5 y 2.0 M NaCl) (Pérez-Llano, 2016 Tesis de maestría). Los análisis de este transcriptoma mostraron que hay tres transcritos de *Hog* que provienen de genes independientes, éstos se han nombrado como *hog1*, *hog2* y *mpkC*. Esto concuerda con el análisis genómico de *A. nidulans*, en el que se describe que, además del gen *hogA*, también es portador del gen *mpkC*, ambos con un porcentaje alto de similitud con la MAPK Hog1 de *S. cerevisiae*. No obstante, *mpkC* no es esencial para que *A. nidulans* sobreviva en condiciones de alta osmolaridad, aunque es capaz de activar a la proteína PBS2, que es parte de esta vía (Furukawa *et al.*, 2005). Por otro lado, en este transcriptoma también se identificaron a los transcritos que codifican para las

enzimas limitantes en la síntesis de algunos solutos compatibles como glicerol, trehalosa y manitol.

1.3.1. Justificación

En las últimas décadas se ha logrado un avance importante en la comprensión de los mecanismos moleculares que les permiten a los hongos sobrevivir y proliferar en diferentes condiciones ambientales, como cambios en la temperatura, presión, pH y gradientes salinos. A pesar de conocerse que la respuesta a estrés osmótico se regula por la vía de HOG (High Osmolarity Glycerol), y que esta impacta en la síntesis de solutos compatibles en organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans*, aún no se conoce si estas vías son utilizadas en organismos halófilos. Hasta la fecha existe información limitada acerca de los mecanismos de osmoadaptación del halófilo moderado *Aspergillus sydowii*, por lo que la caracterización fisiológica de este organismo resulta relevante debido al potencial biotecnológico que posee, debido a que este hongo presenta actividad ligninolítica y la capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y otros compuestos xenobióticos en condiciones hipersalinas. Los mecanismos fúngicos de haloadaptación, particularmente aquellos que se relacionan con la síntesis de solutos compatibles se han abordado de forma limitada en la literatura científica; por lo que, resulta de gran interés estudiar los mecanismos fisiológicos involucrados en la acumulación de osmolitos en diferentes condiciones de salinidad y la regulación *Hog*-dependiente de la expresión de los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de estos solutos. Esta información nos permitiría tener un panorama más amplio sobre la respuesta al estrés osmótico en el género *Aspergillus*. Esto resulta relevante teniendo en cuenta que el estrés osmótico puede ser un factor crítico en la producción de enzimas en industrias que utilizan *Aspergilli*. La mayor parte de los estudios de regulación de solutos compatibles han sido realizados en hongos halotolerantes como *A. niger* y *A. nidulans*. Sin embargo, estos hongos adaptan estrategias para hacer frente a altas concentraciones de cloruro de sodio. Teniendo en cuenta la información que se conoce sobre los distintos mecanismos de osmoadaptación de los organismos

halófilos, siendo uno de ellos la acumulación de K^+ intracelular, resulta interesante determinar la relación Na^+/K^+ , así complementar la información que nos permitirá comprender la fisiología de *A. sydowii*. Dado que *A. sydowii* es un hongo halófilo, se esperaría que emplee estrategias que le permita hacer frente al estrés causado por las altas concentraciones de cloruro de sodio. En respuesta a este estrés, se produce la activación de las vías de respuesta que aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). De ahí que resulte interesante investigar los marcadores de estrés oxidativo y las respuestas antioxidantes para confirmar el nivel de estrés en las condiciones salinas. Esta información será útil para definir las condiciones de cultivo en futuras aplicaciones biotecnológicas de *A. sydowii*, además de determinar si el hongo regula la concentración intracelular de potasio. Esta información nos permitirá comprender la fisiología de los hongos halófilos.

1.3.2. Hipótesis

El hongo halófilo moderado *Aspergillus sydowii* generará respuestas celulares al estrés en condiciones hipo- e hipersalinas

1.3.2.1. Predicciones

Bajo la hipótesis de que *Aspergillus sydowii* generará respuestas celulares al estrés en condiciones hipo- e hipersalinas:

- 1- Esperaríamos observar la acumulación de solutos compatibles de forma diferencial en condiciones sin NaCl y en 2.0 M NaCl respecto a su condición óptima.
- 2- Esperaríamos observar que la generación de marcadores oxidativos se produzca en las condiciones que representan un estrés para el hongo *A. sydowii* (sin NaCl y 2.0M NaCl)
- 3- Esperaríamos observar una expresión diferencial entre las condiciones de estrés respecto a la condición óptima de crecimiento del hongo *A. sydowii*.

4- Esperaríamos que la fosforilación de la proteína HOG1 aparezca cuando se produce el choque osmótico y que vaya disminuyendo en el tiempo.

1.3.3. Objetivos

1.3.3.1. Objetivo general

Evaluar la dinámica de acumulación de solutos compatibles, así como, la expresión de genes involucrados en las vías de síntesis de estos solutos en *Aspergillus sydowii* en condiciones de salinidad.

1.3.3.2. Objetivos específicos

- ✎ Seleccionar las ventanas temporales de crecimiento de *A. sydowii* bajo diferentes condiciones de salinidad, para la determinación de concentración. de solutos.
- ✎ Evaluar la acumulación de solutos compatibles tipo polioles y trehalosa en *A. sydowii* cultivado en diferentes condiciones de salinidad (sin NaCl y con 0.5 y 2 M NaCl).
- ✎ Evaluar los niveles de expresión de genes relacionados a la síntesis de solutos compatibles (*gpd*, *tpsa*, *mpd*, *ardh*, *tkt1*) y los reguladores de estas respuestas (*hog1*, *hog2*), cuando *A. sydowii* crecen en condiciones de salinidad.
- ✎ Estudiar la dinámica de fosforilación de las proteínas HOG1 / HOG2 de *A. sydowii* inducida por cambios en la osmolaridad.
- ✎ Evaluar si la acumulación de potasio se utiliza como estrategia alternativa para contender con la salinidad en *A. sydowii* bajo las condiciones de hipo- e hipersalinidad.

- ✎ Evaluar marcadores de estrés oxidativos en los cultivos de *A. sydowii* en condiciones diferenciales de salinidad y de choque osmótico.

1.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los experimentos de este proyecto se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

1.4.1. Cepa fúngica y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizó la cepa BMH0004 del hongo halófilo moderado *Aspergillus sydowii*, cuyo aislamiento ha sido descrito previamente (Batista-García *et al.*, 2014). Esta cepa fue conservada en cajas Petri con PDA, cultivada a 28 °C y almacenada a 4 °C o como solución de esporas contenidas en una solución salina (0.5 % NaCl) suplementada con 20 % de glicerol y almacenadas a -80 °C, descritas por Batista-García *et al.* (2014). La cepa fue preservada en la Colección de Cultivos Fúngicos del Centro de Investigación en Biotecnología (Morelos, México) con número de referencia BMH0004, en la Colección Universitaria Tecnológica de Microorganismos de relevancia industrial (TUCIM, Viena, Austria) con número de referencia 6524 y la Colección Ex Culture del Centro de Infraestructura Mycosmo (MRIC, UL, Ljubljana, Eslovenia) con referencia número EXF-12860. Para todas las determinaciones experimentales, se cultivó a *A. sydowii* en medio mineral líquido con 2% de glucosa (medio MMG) incubándose a 28 °C y 150 rpm. El medio MMG (contiene: 7.8 mg/L $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 18 mg/L $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 500 mg/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L ZnSO_4 , 50 mg/L KCl, 1 g/L K_2HPO_4 y 2 g/L NH_4NO_3) se ajustó a pH 6 con H_3PO_4 o KOH, luego se esterilizó en autoclave y se suplementó con NaCl 0.5 M o 2.0 M y glucosa al 2 % esterilizada por filtración.

1.4.2. Determinación de la tasa de crecimiento por peso seco de *A. sydowii*

Para determinar la tasa de crecimiento de *A. sydowii* se tomó el peso seco, y la cinética de crecimiento se realizó inoculando 10^6 esporas en 50 mL de medio MMG estéril, suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (sin NaCl, con 0.5 M ó 2.0 M NaCl), en matraces de 150 mL. Los cultivos se incubaron a 28 °C con una

agitación constante de 150 rpm. Para cada determinación se colectó el micelio por filtración usando un colador de células (40 μm de tamaño de poro), que se tomó en intervalos de dos días hasta que alcanzaron la fase estacionaria y no se registraron cambios en la biomasa, entonces se secó en una estufa a 60 °C. Todas las determinaciones experimentales se realizaron por triplicado.

1.4.3. Preparación de las muestras para la extracción de los solutos compatibles

Se determinó la concentración de polioles y trehalosa en el micelio usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Primero se midieron los estándares de glicerol, eritritol, ribitol, xilitol, arabitol, galactitol, sorbitol, manitol, maltitol y trehalosa (kit de estándares, cat. 47266, Sigma-Aldrich) (Figuras suplementarias 1.7.1 y 1.7.2). Se inyectaron 50 μL de cada estándar con una concentración de 5 mg/mL. Se obtuvieron curvas de calibración de estándares usando 50, 200, 400, 600 y 800 $\mu\text{g/mL}$ de cada compuesto.

La preparación de las muestras para el análisis de HPLC se realizó como se ha descrito por Kogej *et al.*, (2007). Brevemente, a partir de 100 mg de micelio seco se realizó la extracción de los solutos por el método Bligh y Dyer modificado (1959) (Galinski y Herzog, 1990; Kogej *et al.*, 2007). El micelio se suspendió en 3680 μL de solución Bligh y Dyer (mezcla de cloroformo-metanol-agua [10:5:3.4]) y se agitó vigorosamente durante aproximadamente 30 min. Se añadieron 433 μL de cloroformo y 433 μL agua desmineralizada, y la suspensión se incubó durante 30 min con agitación vigorosa. Las muestras se centrifugaron a 5500 g durante 10 minutos para formar las fases. Los solutos que se encuentran en la fase superior metanol- agua, la que se transfiere a un tubo falcón de 15 mL y se congelan a - 20 °C hasta su análisis por HPLC (Kogej *et al.*, 2007).

1.4.4. Detección y caracterización de polioles.

El análisis por HPLC se realizó en un sistema isocrático con una columna AMINEX-HPX87H (300 mm \times 7.8 mm, Bio-Rad, Munich, Alemania) a 50 °C. Se inyectaron 50

µl de cada muestra. La separación se realizó con ácido sulfúrico 5 mM como fase móvil, a un caudal de 0.8 mL/min. El análisis de los cromatogramas se realizó utilizando el software ChromQuest v2.51 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) (Kogej *et al.*, 2007).

1.4.5. Determinación de solutos osmóticamente activos en células adaptadas a la sal

Para determinar la concentración de los solutos compatibles a partir de células adaptadas a sal, se crecieron los cultivos de *A. sydowii* en matraces (250 mL) con 100 mL de MMG y suplementado con glucosa al 2 % como fuente de carbono y diferentes concentraciones de NaCl (0M, 0.5M y 2.0M). Se colectó el micelio en diferentes puntos de tiempo de la curva de crecimiento 5, 7 y 11 días. Se secó en un horno a 60°C, hasta que se obtuvo el peso constante y se prepararon para el análisis por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

1.4.6. Determinación de solutos osmóticamente activos en células después del shock hipoosmótico e hiperosmótico

Para la determinación de la concentración de solutos en cultivos expuestos a choque osmótico, los cultivos fúngicos se cultivaron en 7 matraces (500 mL) con 200 ml de MMG y suplementado con glucosa al 2 % como fuente de carbono y diferentes concentraciones de NaCl (0M, 0.5M y 2.0M). Se incubaron a 28 °C con agitación 150 rpm durante 7 días. El preinóculo obtenido se colectó empleando un colador de células (40 µm de tamaño de poro) y se transfirió 1 g de biomasa húmeda a matraces (250 mL) con 50 mL de MMG con o sin NaCl. Se incubaron a 28 °C a 150 rpm. El micelio se colecta después de 10, 30 minutos, 2, 8, 24 y 48 horas de incubación. Se colocan en cajas Petri, para secarlo en un horno a 60 °C. Se extrajeron los solutos compatibles como se describió anteriormente. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los choques osmóticos se realizaron de 0.5 M a 0 M NaCl y viceversa; de 0.5 M a 2.0 M NaCl y viceversa; de 0 M a 2.0 M NaCl y viceversa.

1.4.7. Extracción de ARN y qPCR

El micelio se colectó por centrifugación, se congeló con nitrógeno líquido, se trituró usando mortero y maja. Se usaron 100 mg de este para aislar el ARN total, empleando el reactivo TRI (Sigma-Aldrich). El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de RNA total tratado con DNasa, usando el kit de síntesis de cDNA RevertAid™ H Minus First Strand con un cebador dT18 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Los cebadores para el análisis de qPCR se diseñaron utilizando Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) y se analizaron con los programas DINAMelt (Markham y Zuker 2005) y Mfold (Zuker 2003). Todos los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla suplementaria 1.7.1. Las condiciones de reacción de qPCR (temperatura, concentración de cebador y eficiencia) se optimizaron para cada par de cebadores (Tabla suplementaria 1.7.1) para determinar las condiciones de reacción. Las reacciones de qPCR contenían 5 µL de QuantiNOVA SYBR GREEN Master Mix (QIAGEN, Hilden, Alemania) y 1 µL de una dilución 1: 8 de cDNA en un volumen final de 10 µL. Se utilizó un termociclador Rotorgene (QIAGEN, Hilden, Alemania). Se utilizó una curva de fusión y una electroforesis PAGE para verificar la especificidad del producto amplificado. Los niveles de expresión relativa se calcularon con el método de Pfaffl descrito en 2001 utilizando el software REST (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002). En los casos en los que la prueba de aleatorización realizada por REST confirmó la diferencia significativa de la acumulación. Cuando se obtiene cambios con un logaritmo binario (logFC) sobre 2 se considera una regulación positiva o negativa biológicamente significativa. Los genes *sarA* y *cox5* se utilizaron como genes de referencia para la normalización (Bohle, Jungebloud y Dalpiaz, 2007).

1.4.8. Determinación de la fosforilación de Hog por Western blot

Los cultivos de *A. sydowii* se sometieron a choque osmótico como se describió anteriormente. Se incubaron los cultivos en los tiempos determinados para el choque (5, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos). Pasado este tiempo las células se filtraron en coladores de células (40 µm) y se pasaron a un falcon de 50 mL con 2 mL de MMG con la concentración de NaCl del cual proviene el micelio, y 1 mL de ácido

tricloroacético al 85 %. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015), las células fijadas se lavaron añadiendo 20 mL de agua desionizada, se centrifugó por 5 minutos a 1625 g, se desechó el sobrenadante y el proceso se repitió 3 veces más. El micelio lavado se congeló con nitrógeno líquido y se maceró, evitando la descongelación se pesó 100 mg de micelio y se lisó con buffer de lisis, se llevó a cabo añadiendo 200 µL de tampón (Tris 500 mM pH 6,8, DTT 100 mM, SDS al 2 %, glicerol al 4 % y azul de bromofenol al 0,01 %) y se agregó 0.3 g de perlas de vidrio (diámetro de 0.5 mm) (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2020). Para asegurar la lisis celular, el lisado se agitó por un minuto y se pone en hielo, esta operación se repitió 4 veces en total. Se calentó la mezcla a 95 °C durante 5 minutos, y se incubó en hielo. Para separar las perlas de vidrio de la mezcla de extracción, se perforó el tubo eppendorff en el fondo con una aguja y se centrifugó a 13 000 rpm un segundo. Las muestras se dejan en hielo hasta que se realizó el SDS / PAGE, con una concentración. La electroforesis se corrió a 100 V. Se utilizó un volumen constante (20 µL) del extracto de la proteína para el Western-blot. Como control positivo, se cargó 3 µL de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BY7472. Las células de *S. cerevisiae* se cultivaron durante la noche en caldo YPD, se sometieron a un choque osmótico de NaCl 1.0 M durante 10 min y se trataron como se describió anteriormente para el micelio fúngico (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2020). Se utilizó el marcador de peso molecular PageRuler™ Plus, 10 a 250 kDa (Thermo Scientific™). El gel se lavó con agua desionizada, y se dejó incubando durante 10 minutos en el buffer de transferencia (Tris 25 mM; Glicina 0.2 M; Metanol 20 %; pH 8.5) con agitación moderada a temperatura ambiente. Paralelamente la membrana de PVDF (Millipore, Edo. De México, México), se incubó en metanol durante 1 minuto, se lavó con agua desionizada durante 1 minuto y finalmente se dejó en buffer de transferencia durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación moderada. Para realizar la transferencia húmeda de las proteínas a la membrana de PVDF se utilizó una cámara Mini Trans-Blot de Biorad para a 100 V durante de 90 minutos. La membrana se lavó 2 veces con agua desionizada, y se bloqueó con 7% de leche descremada al 7 % (BD Bioscience, CA, EE. UU.) en PBS 1X por 1 hora. Para llevar

a cabo la inmunodetección, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-MAP quinasa-p38 en su forma fosforilada (en una dilución de 1: 1000; Cat. 4511, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) y para la detección de Hog total se uso el anticuerpo anti-Hog (1:1000 y-215; Cat. SC-9079, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Los anticuerpos se diluyen en una solución salina tamponada con fosfato (PBS), y para la detección de los anticuerpos primarios se utilizó como anticuerpo secundario un anti-conejo acoplado a HRP (siglas en inglés, Horseradish Peroxidase-Conjugated) (0.1 mg/ml en 50 % glicerol-PBS, Cat. G21234, Invitrogen) que se diluyó 1:10.000; en PBS. Incubandose a temperatura ambiente durante 1 hora. Para revelar, se utilizó un sustrato de HRP quimioluminiscente (Millipore, MA., EE.UU.).

1.4.9. Análisis filogenético de ortólogos MAPK

Las secuencias correspondientes a los ortólogos de la proteína HOG MAPK (quinasa activada por mitógenos) (KOG0660) se tomaron de los genomas de distintos miembros del género *Aspergilli* de la base de datos *Mycocosm*, mediante la búsqueda de anotaciones KOG. Estas secuencias se alinearon utilizando el algoritmo MUSCLE con parámetros predeterminados (Edgar 2004) utilizando la suite MEGA (Kumar *et al.*, 2016). El alineamiento múltiple de secuencias (MSA) resultante se editó manualmente en AliView (Larsson, 2014) para eliminar bloques de secuencia no informativos. Para la reconstrucción filogenética, se seleccionó el mejor modelo de sustitución en MEGA en función de las puntuaciones BIC (Bayesian Information Score (Bayesian Information Criterion) más bajas (criterio de información bayesiano). Las distancias filogenéticas se infirieron utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) y el modelo de Le_Gascuel_2008 (Le y Gascuel, 2008). Se utilizó el método Bootstrap utilizando 1000 iteraciones para determinar el grado de confianza del ML Tree (Felsenstein, 1985). El árbol consenso se modificó para su visualización utilizando FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

1.4.10. Cuantificación de los cationes intracelulares Na⁺ y K⁺

Para determinar la concentración de Na⁺ y K⁺ en las células de *A. sydowii*, a partir de cultivos de 5, 7 y 11 días, en las condiciones de ausencia de sal y en presencia de 0.5 y 2 M de NaCl, se realizó el siguiente procedimiento: se pesaron 300 mg del micelio húmedo, lavándose 2 veces y secándose con una bomba de vacío, utilizando filtros Millipore Whatman (0.45 µm; Millipore Multifilter). La biomasa se homogenizó con 5 mL de agua MilliQ con un vástago de teflón, por 2 minutos aproximadamente. El homogeneizado se colocó en un tubo falcón de 15 mL y se añaden 5 mL más de agua MilliQ al homogenizador para enjuagarlo y el tejido que se obtiene se agrega al tubo previo. Se tomaron 5 mL de este homogenizado y se pasaron a tubos de vidrio de 10 mL, se calentaron en baño María durante 20 minutos. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1625 g. El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se cuantificó el Na⁺ y el K⁺ en un Fotómetro de llamas (Carls Zeiss PF5 371777). Para la cuantificación se utilizaron estándares de NaCl 1 mM y KCl 1 mM los cuales correspondieron a 100 UA. Todas las mediciones se realizaron por triplicados.

1.4.11. Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo y respuestas antioxidantes en *A. sydowii*

Los marcadores de estrés oxidativo y la respuesta antioxidante fueron determinados utilizando las muestras en los días y las condiciones de salinidad mencionadas en la sección anterior. El micelio se recogió en un colador de células (40 µm de tamaño del poro), se maceró con nitrógeno líquido utilizando mortero. La lisis celular se realizó añadiendo 200 µl de tampón de lisis (Tris 0.3 M pH 6.8, SDS 2 % y glicerol 4 %) a 100 mg de micelio macerado congelado, con 0.3 g de perlas de vidrio de 0.5 mm. Las muestras se agitaron con vórtex 4 veces en lapsos de 1 minuto y se pusieron en en hielo. El sobrenadante se recuperó por centrifugación y se almacenó a -80 °C hasta el análisis. La cuantificación de los marcadores de estrés oxidativos se realizó para los cultivos en condiciones constantes de salinidad como para los cultivos que fueron sometidos a estrés osmótico, ya descritos anteriormente. A las

muestras se les realizaron el análisis tanto de los biomarcadores antioxidantes (determinación de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa y la determinación de glutatión reducido) como el de los biomarcadores pro-oxidantes (determinación de Hidroperóxidos Orgánicos, determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas, determinación de malonildialdehído y 4-hidroxi-alquenos y determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica o Potencial de Peroxidación).

1.4.11.1. Biomarcadores antioxidantes

1.4.11.1.1. Actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa

La actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD) se determinó por el método descrito previamente por Marklund and Marklund (1974) con modificaciones para microplaca. Basándose en la capacidad de la enzima para inhibir la autooxidación del pirogalol. El Pirogallol en medio básico se autooxida generado en el medio de reacción el radical superóxido, de esta forma la reacción de los radicales libres se propaga, acelerando la auto-oxidación del Pirogallol cuya forma oxidada absorbe la luz a 420 nm. La presencia de un secuestrador de radicales superóxidos en el medio, como la SOD inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convención 1 U de SOD es la cantidad de enzima que inhibe un 50 % la reacción de auto-oxidación del pirogallol a 25 °C y pH = 8.20.

1.4.11.1.2. Determinación de glutatión reducido

Los niveles de glutatión reducido (GSH) se determinaron como se describe previamente por Ecobichon en 1984. Brevemente, el GSH reacciona con el colorante 5,5'-ditiobis -2 ácido nitrobenzoico (DTNB) para producir un compuesto de color que absorbe la luz a 412 nm. La concentración de GSH se determinó comparando las muestras con la curva patrón de GSH (0, 56, 113, 225, 450, 900, 1800, 9000 µg/ml) (Ecobichon *et al.*, 1984)

1.4.11.2. Biomarcadores pro-oxidantes.

1.4.11.2.1. Determinación de Hidroperóxidos Orgánicos

Los hidroperóxidos orgánicos (HPO) y el peróxido de hidrógeno se cuantificaron como peróxidos totales en extractos celulares usando el kit de ensayo BIOXYTECH® H₂O₂-560™ (Cat. 21024, Oxis Int. Inc., Portland, EE. UU.). Brevemente: este ensayo colorimétrico se basa en la oxidación de iones ferrosos cuando el Fe²⁺ se convierte en Fe³⁺ en medio ácido. El Fe³⁺ forma un complejo coloreado con el xilenol naranja que es detectable por medición espectrofotométrica a 545 nm. El sorbitol en la reacción mejora la oxidación de iones ferrosos, lo que aumenta la sensibilidad del ensayo. La concentración de HPO se determinó comparando las muestras con la curva patrón de HPO (4, 8, 16, 31, 63, 125 µM).

1.4.11.2.2. Determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas

La determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas (PAOP) se realizó mediante el método de Witko con algunas modificaciones (Witko *et al.*, 1992). El método se basa en la detección de la conversión de los iones yodo a yodo diatómico por la reacción provocada por los PAOP, esto mediante el incremento en la absorbancia medida a 340 nm. Se utiliza la cloramina T (N-cloro-p-toluenosulfonamida) como estándar. Las cloraminas se determinaron mediante la producción de ion triyoduro a partir de la oxidación de yoduro de potasio en solución. Los resultados se expresan como µM de cloramina según lo reportado previamente (Witko *et al.*, 1992).

1.4.11.2.3. Determinación de malonildialdehído y 4-hidroxi-alquenos

La peroxidación lipídica se evaluó mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA, dos productos de degradación comunes de la peroxidación lipídica). La determinación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) se realizó mediante la reacción entre el N-metil-2-

fenilindol con el MDA y los 4-HDA a 45 °C, para formar cianina cromofórica que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 586 nm. Una molécula de MDA o de 4-hidroxi-alquenol reacciona con 2 moléculas de N-metil-2-fenil-indol (Erdelmeier *et al.*, 1998). La concentración de MDA se calculó usando una curva estándar. Para determinar la susceptibilidad celular a la peroxidación de lípidos, se incubaron extractos celulares con sulfato de cobre 2 mM a 37 °C durante 24 horas (Ozdemirler *et al.*, 1995). Al final del período de incubación, se miden los niveles MDA. La concentración de MDA se determinó comparando las muestras con la curva patrón de MDA (0,6, 13, 25, 50,100 µM).

1.4.11.2.4. Determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica o Potencial de Peroxidación

La determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica o el potencial de peroxidación se realizó induciendo procesos de peroxidación lipídica por catálisis con Cu^{2+} (2 mM) en la muestra biológica. Esta medición permite conocer el balance entre factores pro-oxidantes y antioxidantes, basándonos en mediciones de la formación de MDA (Ozdemirler *et al.*, 1995).

1.4.12. Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre las cantidades medias de osmolitos intracelulares en *A. sydowii*, determinados en las células adaptadas, así como también después del choque hipoosmótico e hiperosmótico determinado por análisis de HPLC, se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de clasificación simple considerando un modelo de efectos fijos con la salinidad como variable predictora. Las premisas de ANOVA se evaluaron de acuerdo con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Massey, 1951) y la prueba de homogeneidad de varianza de Levene o Brown-Forsythe (Brown y Forsythe, 1974). Las pruebas de comparación múltiple de medias se realizaron mediante el test de Duncan (Duncan, 1955). Cuando no se verificaron los requisitos de normalidad y homocedasticidad, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones de

medias múltiples se realizaron mediante la prueba de Duncan. El nivel de significancia se estableció en $\alpha = 0.05$ usando el software STATISTICA, versión 7.0 (www.statsoft.com StatSoft, Inc., 2004)).

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1. Solutos compatibles en células de *A. sydowii* adaptadas a la sal

La tasa de crecimiento de *A. sydowii* se ha analizado previamente en fuentes de carbono complejas como carboximetilcelulosa, paja de trigo y otros sustratos lignocelulósicos (Batista-García *et al.*, 2014) o hidrocarburos aromáticos policíclicos (Peidro-Guzmán *et al.*, 2020), por lo que para evitar el estrés inducido por la privación nutricional, se cultivó el hongo con glucosa como fuente de carbono (Batista-García *et al.*, 2014; Peidro-Guzmán *et al.*, 2020). Para evaluar la respuesta del hongo a diferentes concentraciones de NaCl, se analizó el contenido de osmolitos y otras determinaciones (Figura 1.5.1A). La duración de las fases de crecimiento fue distinta entre las diferentes condiciones, lo que sugiere que hay tres escenarios biológicos: el hongo creciendo en condiciones óptimas de salinidad, y en condiciones de estrés hiperosmótico e hipoosmótico. Una fase inicial de adaptación fue evidente en la condición sin NaCl, mientras que esta fase fue casi inexistente en las otras tres condiciones. La fase de crecimiento exponencial duró hasta el día 9 de cultivo en las condiciones óptimas y sin NaCl, pero solo duró hasta el día 2 a 2.0 M de NaCl. El tiempo de duplicación de *A. sydowii* con 0.5 M de NaCl y 1.0 M fue de 10 y 11 horas, respectivamente, mientras que en ausencia de sal y 2.0 M de NaCl fue de 13.5 y 14.6 horas, respectivamente. Estos resultados confirman que *A. sydowii* es un halófilo moderado con un crecimiento óptimo en el rango de salinidad de NaCl de 0.5 a 1.0 M (Figura 1.5.1A y Tabla 1.5.1), por lo que en experimentos posteriores se utilizó únicamente 0.5 M de NaCl como condición óptima de salinidad.

Es interesante hacer notar que cepas marinas de *A. sydowii* aisladas de corales también crecen de manera óptima en una salinidad cercana a la concentración de NaCl del agua de mar (NaCl 0.6 M) (Alker *et al.*, 2001; Rypien *et al.*, 2008). En el ambiente acuático, el hongo al infectar a los corales provoca que los tejidos se tornen morados, producido por la enfermedad *aspergillosis*, lo que puede provocar la muerte de la colonia. Aunque *A. sydowii* tiene un origen terrestre, los aislados

marinos han provocado una pandemia que ha reducido la población de los arrecifes de coral (Alker *et al.*, 2001; Rypien *et al.*, 2008).

También se han aislado cepas de *A. sydowii* en ambientes terrestres como la cepa BMH-0004 analizada en este estudio, las cuales no son patógenos para los corales (Alker *et al.*, 2001; Rypien *et al.*, 2008).

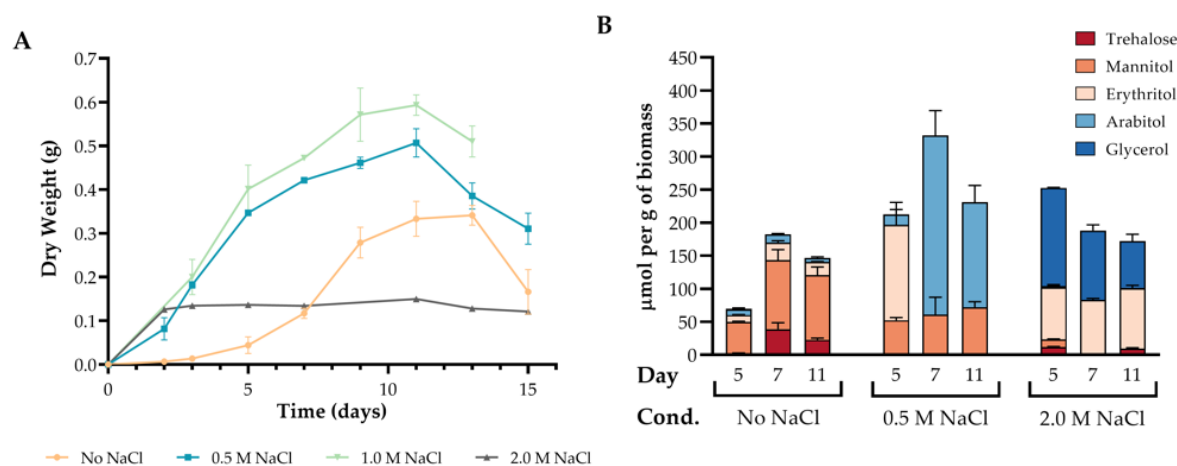


Figura 1.5.1. Tasa de crecimiento de *A. sydowii* (A) y acumulación de osmolitos (B) en condiciones óptimas, hipo e hiperosmóticas. Las barras de error indican las desviaciones estándar calculadas a partir de tres experimentos independientes ($n = 3$). Los análisis estadísticos se detallan en la Tabla suplementaria 1.8.2.

Tabla 1.5.1. Parámetros cinéticos de crecimiento de *Aspergillus sydowii* cultivados a diferentes concentraciones de NaCl.

Concentración NaCl (M)	Velocidad específica (μ)(h^{-1})	Tiempo de duplicación (t_d)(h)
No NaCl	0.0514	13.48
0.5	0.0683	10.14
1.0	0.0629	11.01
2.0	0.0474	14.62

La acumulación de osmolitos se evaluó en tres puntos temporales: 5, 7 y 11 días después de la inoculación, los que cubren diferentes etapas del crecimiento en todas las condiciones. El hongo alcanzó la fase de crecimiento exponencial en los cultivos sin NaCl o con 0.5 M de NaCl a los 5 y 7 días. Al día 11, todos los cultivos habían alcanzado la fase estacionaria. En los cultivos crecidos con 2.0 M de NaCl, la fase estacionaria se alcanzó a partir del día 2, imposibilitando el muestreo de la

fase exponencial en esta condición (Figura 1.5.1A). Las curvas de crecimiento de *A. sydowii* tuvieron un patrón similar al crecimiento de hongos como *Rhizopus microsporus* y *Aspergillus fumigatus* en medios nutricionalmente pobres (Meletiadis *et al.*, 2001).

Como consecuencia de crecer hongos en medios con una elevada osmolaridad, se ha encontrado que estos organismos mantienen su viabilidad celular a través de distintos mecanismos. Las células bajo estrés osmótico responden con un aumento en la acumulación de solutos compatibles independientemente del soluto extracelular que ocasione la disminución de la actividad del agua (Hallsworth y Magan, 1996). Este fenómeno se observó en *A. sydowii*, donde se determinó la acumulación de solutos compatibles como manitol, eritritol y arabitol, aún en condición óptima de crecimiento (0.5 M de NaCl), que no representa un estrés celular para este hongo (Figura 1.5.1B). El hongo *A. sydowii* a diferencia de *S. cerevisiae*, en el cual los osmolitos se acumulan principalmente en condiciones hiperosmóticas y de estrés celular, es capaz de inducir la producción de los solutos compatibles en ausencia de estrés (Brown, 1978, Hallsworth y Magan, 1996, Hounsa *et al.*, 1998; Gunde-Cimerman *et al.*, 2009, Zajc *et al.*, 2014). Mientras que la levadura halófila *D. hansenii* acumula más glicerol que trehalosa cuando se encuentra bajo estrés salino (2.0 y 3.0 M de NaCl), aumentando notablemente también los niveles intracelulares de polioles, otros hongos exhiben una mayor concentración de polioles cuando crecen en su concentración óptima de NaCl y KCl, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo (González-Hernández *et al.*, 2005; de Lima Alves *et al.*, 2015).

Por otra parte, *A. sydowii*, bajo hipersalinidad (2.0 M de NaCl) aumentó la concentración de solutos compatibles (eritritol y glicerol) diferentes a los detectados en ausencia de estrés (Figura 1.5.1B). Los medios sin sal, otra condición estresante para este hongo, indujeron la acumulación de manitol como el metabolito más abundante seguido de la trehalosa y el eritritol.

Con respecto al tiempo de cultivo, también se observó una variación en la acumulación fisiológica de los osmolitos. El hongo crecido en la condición óptima, acumuló los polialcoholes manitol y eritritol al cabo de los 5 días, mientras que el

arabitol reemplazó al eritritol a los 7 y 11 días. *A. sydowii* mostró un comportamiento similar al reportado para otros hongos (*W. ichthyophaga*, *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. tamarii*) y levaduras, en el cual el glicerol se detecta solo en la condición hipersalina. La cantidad de glicerol acumulada en *A. sydowii* fue máxima en el día 5 (fase exponencial media), en esta condición, y disminuyó con respecto al tiempo de cultivo. Además *A. sydowii* acumuló eritritol y trazas de trehalosa y manitol (Figura 1.5.1B). Comparativamente, *D. hansenii* bajo un estímulo hiperosmótico, acumula más glicerol que trehalosa, cuando las células se encuentran en la fase exponencial, mientras que en las células de la fase estacionaria se acumula arabitol (González-Hernández *et al.*, 2005).

W. ichthyophaga, además de glicerol, acumula arabitol, aunque en menor medida en condiciones de hipersalinidad (Zidan y Abdel-Mallek, 1987; Zajc *et al.*, 2014). Los hongos *Trichosporonoides megachiliensis* (0 M a 2.0 M de NaCl) y *H. werneckii* sintetizan glicerol y eritritol. *A. tamari*, *A. montevidensis* (3 M de NaCl) y *A. wentii* (4 M de NaCl) acumularon principalmente glicerol en condiciones de mayor salinidad (Kobayashi *et al.*, 2013; de Lima Alves *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2017).

La cantidad de los osmolitos va relacionada con los cambios en la expresión de los genes, la cantidad y actividad de enzimas involucradas con su síntesis y degradación de estos osmolitos.

1.5.2. Perfiles transcripcionales de genes que codifican enzimas de síntesis de osmolitos

La regulación genética de las vías metabólicas de la síntesis de osmolitos como trehalosa, manitol, eritritol, arabitol y glicerol en el hongo *A. sydowii* no ha sido estudiada, así como, tampoco se había realizado una caracterización de la regulación transcripcional de los genes que codifican las enzimas de síntesis de osmolitos en distintas especies y en diferentes condiciones previo a este trabajo. Sin embargo, para el género *Aspergilli* (*A. niger*, *A. nidulans* y *A. fumigatus*) se han descrito las vías metabólicas de síntesis (Diano *et al.*, 2006; Fillinger *et al.*, 2003; Ruijter *et al.*, 2003; De Vries *et al.*, 2003; Aguilar-Pontes *et al.*, 2018). Teniendo en

cuenta la información en la literatura del género *Aspergillus*, se identificaron los genes homólogos de *A. sydowii* relacionados a la síntesis de los osmolitos, en el estudio del transcriptoma reportado de este hongo (Tabla 1.5.2) (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

Las rutas metabólicas que conducen a la síntesis de los osmolitos identificados en este trabajo se muestran en la Figura 1.5.2, donde se destacan las enzimas para las que se evaluó la regulación transcripcional (Figura 1.5.3).

La trehalosa es un disacárido de glucosa, que se sintetiza a partir de glucosa-6-fosfato mediante dos reacciones consecutivas catalizadas por el complejo enzimático trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y trehalosa-6-P fosfatasa (TPP). Las subunidades TPS y TPP son codificadas por los genes *tps1* y *tps2* respectivamente, en *S. cerevisiae*, mientras que los genes *tps3* y *ts1* codifican subunidades reguladoras. En *A. nidulans*, los ortólogos de los genes *tps1-3* se denominan *tpsA*, *orlA* y *tps3*. *A. nidulans* también tiene un gen de trehalosa sintasa de choque térmico (*stps*) que se ha encontrado en el género *Aspergillus*, un homólogo del gen *ccg-9* de *Neurospora crassa* y un gen de la trehalosa-6-P fosfatasa que contiene solo el dominio TPP, que está posiblemente implicado en la síntesis de trehalosa a partir de trehalosa-6-P. Los homólogos de *A. sydowii* encontrados en el transcriptoma de la mayoría de estos genes se enumeran en la Tabla 1.5.2.

Tabla 1.5.2. Genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de los solutos compatibles en *A. nidulans* y sus genes homólogos en *A. sydowii*.

Genes	Enzimas	<i>A. sydowii</i>		
		ID Genes *	ID Proteína *	% de Identidad**
Vía de la Trehalosa				
<i>tpsA</i>	Trehalosa fosfato sintasa (subunidad)	e_gw1.4.743.1	149182	95
<i>orlA</i>	Trehalosa fosfato fosfatasa (subunidad)	fgenes1_pm.3_#_972	56871	85
<i>tps3</i>	TPS subunidad reguladora	fgenes1_pm.7_#_385	59235	89
<i>stps</i>	Trehalosa fosfato sintasa de choque térmico	fgenes1_pm.10_#_111	60104	50

<i>ccg-9</i>	Trehalosa fosfato sintasa	CE565934_14846	780972	83
<i>tpp</i>	Trehalosa-6-P fosfatasa	gm1.12758_g	96075	87
<i>treb</i>	Trehalasa neutra	e_gw1.4.354.1	149568	90
<i>trea</i>	Trehalasa ácida	fgenesh1_pm.18_#_129	62558	84
Vía del Manitol				
<i>mtld</i>	Manitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa	e_gw1.5.2043.1	152275	86
<i>m2dh</i>	Manitol 2-deshidrogenasa	fgenesh1_pg.3_#_1082	29920	84
<i>mpp</i>	Manitol/Hexitol fosfatasa			
<i>hk</i>	Hexoquinasa			
Vía del Glicerol				
<i>gpd</i>	Glicerol-3-P deshidrogenas	fgenesh1_kg.2_#_690_#_L ocus2578v1rpk69.02	40910	89
<i>gpd-m</i>	Glicerol-3-P deshidrogenasa mitochondrial	fgenesh1_pm.1_#_8	52965	79
<i>gpp</i>	Glicerol-3-P fosfatasa	fgenesh1_kg.1_#_238_#_L ocus2655v1rpk66.24	38002	91
<i>gut1</i>	Glicerol-quinasa	e_gw1.4.2272.1 gm1.5577_g	149605 88894	92 83
<i>had1</i>	Haloácido deshalogenasa			
<i>dak1</i>				
<i>gld1</i>	Glicerol deshidrogenasa	CE68380_3389 fgenesh1_pg.5_#_204 fgenesh1_pm.11_#_239	283418 31279 60569	90 86 56
Vía de las Pentosas fosfatos (Arabitol y Eritritol)				
<i>tktA</i>	Transcetolasa	e_gw1.2.510.1	142846	95
<i>tktB</i>	Transcetolasa - putativa	gm1.10640_g	93957	90
<i>tad</i>	Transaldolasa	fgenesh1_pm.2_#_386	55064	94
<i>larA / xylA</i>	L-arabinosa/D-xylosa reductasa	e_gw1.2.1363.1	144547	87
<i>ardh</i>	L-arabinitol deshidrogenasa	CE897698_12019	1112736	80

* Como en el genoma secuenciado en MycoCosm **% de identidad con el gen homólogo de *A. nidulans*

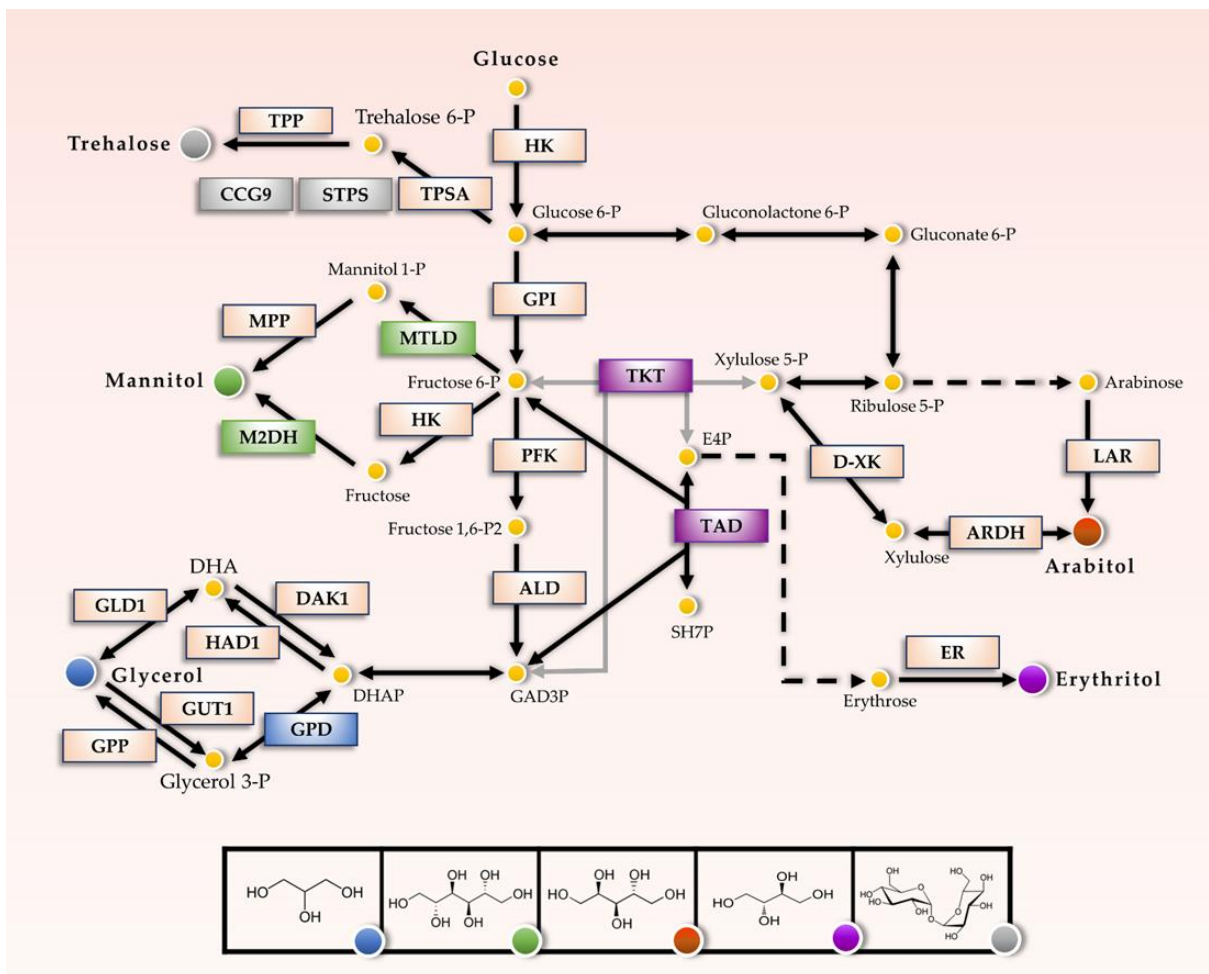


Figura 1.5.2. Vías de síntesis de metabolitos con posibles funciones osmolíticas en respuesta a la salinidad. La vía se ha modificado a partir de la vía KEGG de *Aspergillus nidulans*. Enzimas involucradas en la regulación de la concentración de osmolitos y representadas con el color gris: vía de la trehalosa; verde: manitol; azul: glicerol; púrpura: eritritol y rojo: arabitol se evaluaron mediante qPCR. No se evaluaron las enzimas representadas en naranja claro. TPSA (trehalosa fosfato sintasa), STPS (trehalosa fosfato sintasa de choque térmico), CCG-9 (trehalosa fosfato sintasa), TPP (trehalosa-6-P fosfatasa), MTLD (manitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa), M2DH (manitol 2-deshidrogenasa), MPP (manitol / hexitol fosfatasa), HK (hexoquinasa), GPI (fosfo-glucosa isomerasa), PFK (fosfo-fructoquinasa), ALD (aldolasa), GPD (glicerol-3-P deshidrogenasa), GPP (Glicerol-3-P fosfatasa), GUT1 (Glicerol-quinasa), HAD1 (Haloácido deshalogenasa), DAK1 (Dihidroxiacetona quinasa) GLD1 (Glicerol deshidrogenasa). TKT (transcetolasa), TAD (trans-aldolasa), LAR (L-arabinosa), ARDH (L-arabinitol deshidrogenasa), D-XK (D-xilosa quinasa), ER (eritrosa reductasa).

La trehalosa fue el metabolito con la menor concentración de los identificados en *A. sydowii* (Figura 1.5.1B). La concentración intracelular más alta de trehalosa se produjo en la condición sin NaCl en el día 7 (38 $\mu\text{mol/g}$) y también se produjo en la condición con 2.0 M de NaCl en los días 5 y 11. Consistente con estos resultados, la expresión del gen *stps* trehalosa sintasa, estuvo sobre-regulada en ambas condiciones extremas (Figura 1.5.3), pero su expresión disminuyó en la condición de salinidad óptima. Otro gen homólogo que se evaluó fue el *ccg-9*, el cual tuvo el mismo patrón de expresión que el *stps* pero con una menor expresión diferencial entre las condiciones (Figura 1.5.3A).

Existe una correlación positiva entre el contenido de trehalosa y la resistencia al estrés osmótico en *S. cerevisiae*, así como en otros microorganismos. Los mecanismos moleculares que describen la función de la trehalosa para contender contra el estrés osmótico incluyen: la estabilización de las biomembranas (Crowe *et al.*, 1984; Mackenzie *et al.*, 1988); reserva de carbonos; osmoprotector y/o protector contra la desnaturalización de proteínas por deshidratación (Thevelein, 1984, Wolschek y Kubicek, 1997).

La respuesta inducida por los diferentes estreses como la falta de nutrientes, el estrés por calor y estrés osmótico está estrechamente relacionada. La transcripción de los genes de la trehalosa sintasa está estimulada por los tres factores anteriormente mencionados. En las esporas que tienen un alto contenido de trehalosa se demostró que tienen mayor resistencia cambios de temperatura extremos, a la deshidratación, a la congelación, a los agentes oxidantes y a la inanición (Thevelein, 1984, Van Laere, 1989, Wiemken, 1990, Thevelein, 1996, Argüelles, 2000).

La acumulación de solutos intracelulares, se ha detectado en condición de choque térmico y estrés osmótico. La trehalosa se acumula tras el choque por calor, mientras que la síntesis y/o acumulación del glicerol se induce después de un estrés salino (Lewis *et al.*, 1995).

Las mutantes del gen *tps1* en *A. nidulans* y *S. cerevisiae* se ha reportado que son

menos termo- y halotolerantes (Lewis *et al.*, 1995, Hounsa *et al.*, 1998, Argüelles, 2000). En la respuesta celular a calor no solo la trehalosa participa en la respuesta adaptativa, también se ha propuesto la participación de otros componentes como las proteínas de choque térmico (Argüelles 1994; Nwaka y Holzer, 1998; Arguelles, 2000).

Se han identificado otras funciones para los genes *tps* como participar en la regulación de la estructura de la pared celular mediante la modulación de la actividad de la quitina sintasa (Borgia *et al.*, 1996, Puttikamonkul *et al.*, 2010, Thammahong *et al.*, 2017a, Thammahong *et al.*, 2017b), por lo que el efecto de estos genes podría entrelazar ambas respuestas fisiológicas. En *A. sydowii*, la baja cantidad de trehalosa acumulada y la alta expresión diferencial de los genes *stps* y *ccg-9* sugieren que están implicados en otras respuestas fisiológicas no solamente relacionadas a la síntesis de trehalosa.

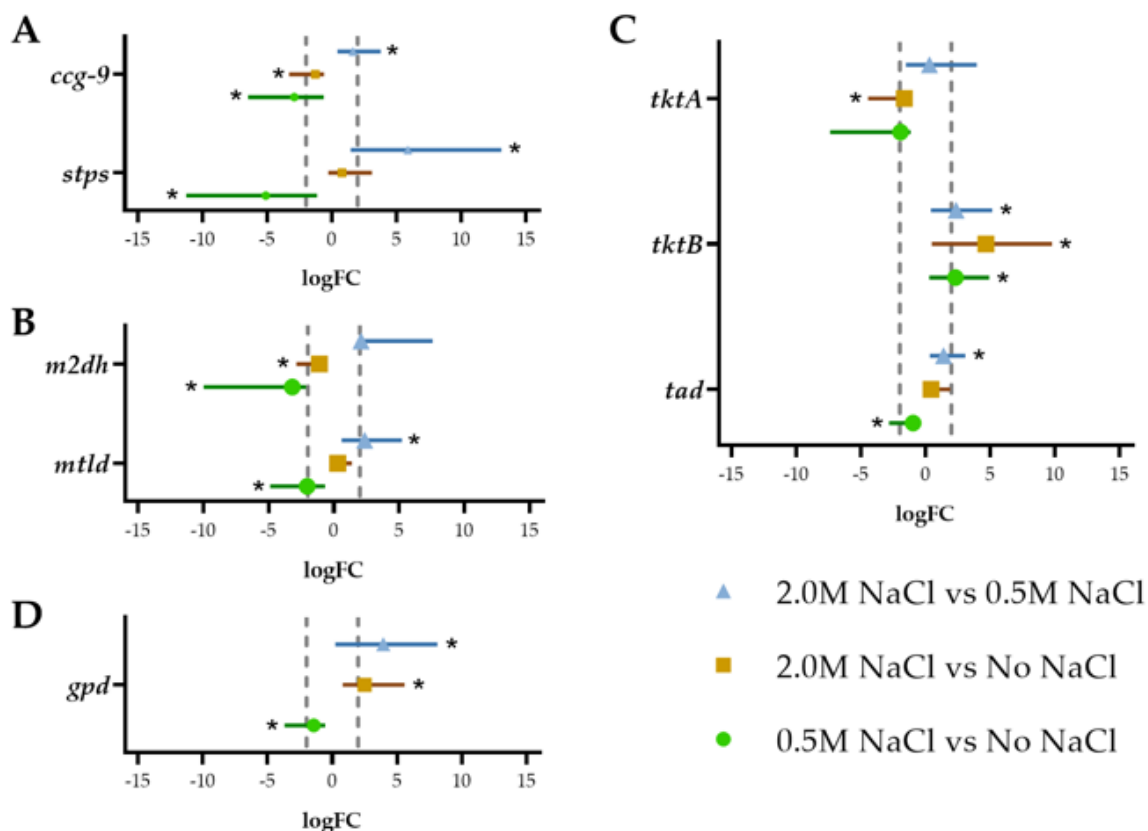


Figura 1.5.3. Análisis de la expresión de transcripciones relacionadas con la síntesis de osmolitos de *A. sydowii* en diferentes salinidades después de 7 días de cultivo. Los valores corresponden a las desviaciones promedio y estándar de tres réplicas biológicas ($n = 3$) y dos réplicas técnicas de qPCR. Los genes analizados se agruparon según la vía: (A) Síntesis de trehalosa, (B) Síntesis de manitol, (C) Vía de pentosas fosfato (para la síntesis de arabitol y eritritol) y (D) Síntesis de glicerol. La significación estadística (*) se evaluó mediante una prueba de aleatorización realizada con el software Rest (Pfaffl *et al.*, 2002). Las líneas verticales punteadas corresponden a un corte $\logFC = \pm 2$.

Otro soluto encontrado en *A. sydowii* fue el manitol. La vía más común de biosíntesis de manitol en hongos filamentosos es la conversión de fructosa-6-P en manitol-1-P por la manitol-1-P deshidrogenasa y la posterior desfosforilación para obtener manitol (Solomon *et al.*, 2007). Una vía alternativa convierte fructosa en manitol mediante la enzima manitol deshidrogenasa. En *A. nidulans*, los genes que codifican estas enzimas se denominan *mtld* y *m2dh*, respectivamente. Los patrones de expresión del gen *mtld* y los genes de trehalosa sintasa fueron similares, mostrando una mayor expresión en condiciones extremas en comparación con la salinidad óptima (Figura 1.5.3B). Sin embargo, la expresión de *mtld* no se correlacionó con la acumulación de manitol, particularmente en las condiciones sin NaCl o con 0.5 M de NaCl. El gen *m2dh*, por otro lado, está altamente expresado en la condición sin NaCl, pero su expresión fue disminuida en presencia de 0.5 M de NaCl (Figura 1.5.3B). El patrón de expresión de estos genes no explica la acumulación de manitol en 0.5 M de NaCl.

La acumulación del manitol no es necesaria en todos los hongos para su protección contra el estrés osmótico, la prevención del estrés oxidativo y/o la esporulación (Solomon *et al.*, 2007; Patel y Williamson, 2016). En contraste, su acumulación en *A. sydowii* podría deberse al metabolismo activo del crecimiento, ya que no parece estar regulado por los mecanismos de respuesta al estrés salino.

Como se mencionó anteriormente, el glicerol es el osmolito canónico producido bajo estrés hiperosmótico por muchos microorganismos. Este se produce por dos rutas a partir de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) obtenido durante la glucólisis. La

primera vía implica la conversión de DHAP en glicerol-3-P por la enzima glicerol-3-P deshidrogenasa (GPD), que es el principal punto regulador en la vía del glicerol. El glicerol-3-P luego se convierte en glicerol por la glicerol-3-P fosfatasa (GPP), mientras que la reacción opuesta es catalizada por la glicerol-quinasa (GUT1). La vía alternativa implica la conversión de DHAP en dihidroxiacetona (DHA) por una haloácido deshalogenasa (HAD1) y la posterior conversión en glicerol por la enzima glicerol deshidrogenasa (GLD1).

El gen *gpd* en *A. sydowii* se expresó altamente en condiciones hiperosmóticas, con respecto a la condición de salinidad óptima (Figura 1.5.3D). Esto coincide con la acumulación de glicerol en 2.0 M de NaCl. De hecho, el gen *gpd* se reguló negativamente en la condición óptima en comparación con la condición sin sal. Esto refuerza la hipótesis de que las respuestas al estrés osmótico no se están activando cuando *A. sydowii* se cultiva en condiciones de salinidad óptima, sino que se activan únicamente bajo el estrés hiperosmótico inducido por 2.0 M de NaCl.

La trehalosa, el manitol y el glicerol están directamente bajo la influencia del marco regulador de la glucólisis, mientras que el arabitol y el eritritol se producen a partir de intermediarios de la vía de las pentosas fosfato y, por lo tanto, se producen preferentemente en condiciones en las que el equilibrio energético y óxido-reductor en la célula favorecen las reacciones anabólicas (van der Veen *et al.*, 1995).

El arabitol se produce a partir de L-arabinosa por la L-arabinosa reductasa (LAR) o de L-xilulosa por una reacción reversible catalizada por la L-arabitol deshidrogenasa (ARDH). La transcetolasa codificada por el gen *tkt* es una enzima clave para controlar el flujo a xilulosa. En *A. sydowii* los dos homólogos de este gen son *tktA* y *tktB*. El gen *tktA* en *A. sydowii* fue regulado negativamente en 2.0 M de NaCl, mientras que el gen *tktB* aumentó su expresión a medida que aumentó la salinidad (Figura 1.5.3C). Ninguno de estos patrones de expresión se correlacionó con la acumulación de eritritol o arabitol.

Por otro lado, el eritritol se produce a partir de la eritrosa por la eritrosa reductasa (ER), que en *A. niger* se identificó como un aldehído reductasa, con una especificidad más amplia para otros aldehídos de cinco carbonos (Jovanović *et al.*,

2013). El primer paso en la derivación de intermediarios glucolíticos a eritosa-4-P lo realiza la enzima trans-aldolasa (TAD) y es, por tanto, un posible punto de regulación de esta vía. El gen *tad* en *A. sydowii* no mostró una alta expresión diferencial en las condiciones de salinidad probadas y, por lo tanto, no se analizó más en experimentos posteriores.

En comparación con el glicerol, el eritritol tiene propiedades antioxidantes y es menos hidroscópico (Kobayashi *et al.*, 2013). Ambos polioles de bajo peso molecular son más eficaces en la protección osmótica que el manitol o el arabitol, que tienen un tamaño molecular más alto. Algunos estudios han informado que los osmolitos con mayor peso molecular pueden incluso inhibir la actividad enzimática en comparación con la misma concentración de glicerol (Brown y Simpson, 1972, Chirife *et al.*, 1984, Hallsworth y Magan, 1996). También, hay un "costo de carbono" adicional en la síntesis de osmolitos más grandes, que la célula puede no permitirse si está bajo estrés.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados para *Hortaea werneckii*, *Penicillium chrysogenum* y algunos *Aspergilli* donde también se detectó la acumulación de manitol, arabitol y eritritol en las condiciones óptimas de crecimiento. Sin embargo, la cantidad de trehalosa fue significativamente menor en *A. sydowii* que la reportada para *A. oryzae*, *A. fischeri* y *A. niger*, (Adler *et al.*, 1982, Ruijter *et al.*, 2004). Como se ha indicado, el manitol fue el poliol más abundante en *A. sydowii* BMH004, en los diferentes días de crecimiento, tanto en ausencia de sal como en salinidad óptima (Figura 1.5.1B). De manera similar, en estudios realizados en 1982 por Adler y colaboradores, se detectó la acumulación del manitol una amplia variación de salinidad (0M – 2 M de NaCl), alcanzándose el máximo concentración en la condición sin NaCl en *P. chrysogenum* y *A. niger*. El arabitol solo se detectó en cantidades mínimas en la misma condición (Adler *et al.*, 1982). Se sabe que este poliol puede proteger contra la inactivación de enzimas por el calor (Ortbauer y Popp, 2008), pero debido a su limitada solubilidad y tendencia a cristalizar, el manitol proporciona poca protección contra el estrés osmótico y la congelación (Hallsworth y Magan, 1997; Al-Hussein y Gieseler, 2012). En este

mismo trabajo se describió que estos dos hongos en salinidades mayores acumularon polioles de menor tamaño (glicerol y eritritol) (Adler *et al.*, 1982).

En investigaciones realizadas por Brown en 1978 mostraron que la inhibición enzimática por los polioles disminuye cuando la longitud de la cadena de la molécula es menor, mientras que la capacidad de protección contra la desnaturalización está dada por el número creciente de grupos hidroxilo del polioliol (Gerlsma y Stuur, 1972). En contraste, a mayor salinidad *H. werneckii* (4.28 M NaCl) y *W. ichthyophaga* (4.25 M NaCl) acumulan principalmente glicerol y menores cantidades de eritritol (Kogej *et al.*, 2007, Zajc *et al.*, 2014). En estudios anteriores realizados por Plemenitas y colaboradores (2008), reportaron que *H. werneckii* acumula a parte del glicerol, una mezcla de compuestos orgánicos, como manitol, arabitol, y eritritol. Cabe destacar que las cantidades y/o la identidad de estos polioles van a variar según la salinidad del medio de crecimiento, de la especie de levadura u hongo, de la fase de crecimiento del cultivo y de la fuente de carbono (Tomaszewska *et al.*, 2012).

Plemenitas y colaboradores (2008) demostraron que *H. werneckii* cuando se cultivó en concentraciones de NaCl extremadamente altas (4.8 M de NaCl), el glicerol se acumuló predominantemente durante la fase de crecimiento exponencial y disminuyó abruptamente durante la fase estacionaria. Por otro lado, el eritritol aumentó gradualmente su acumulación durante la fase de crecimiento exponencial alcanzando su nivel más alto durante la fase estacionaria. Las cantidades de otros solutos compatibles permanecieron bajas, por lo que la cantidad total de polioles disminuyó durante la fase estacionaria (Plemenitas *et al.*, 2008). Este comportamiento es muy similar a lo obtenido en *A. sydowii* cuando fue expuesto en la mayor salinidad (2 M de NaCl) (Figura 1.5.1B).

Nuestros resultados muestran que *A. sydowii* acumuló glicerol y eritritol en concentraciones similares (82.9 y 105.27 $\mu\text{mol/g}$ en el día 7) cuando el hongo está creciendo a 2.0 M de NaCl (Figura 1.5.1B). En la literatura existen referencias sobre diferentes levaduras y hongos donde el glicerol es el principal soluto acumulado en respuesta al estrés hiperosmótico (Gunde-Cimerman y Plemenitaš, 2006, Gunde-Cimerman y Zalar, 2014). Sin embargo, existen indicios de que el soluto externo puede influir en el tipo de soluto que se acumula internamente. En el caso de

Saccharomyces rouxii se acumula glicerol bajo estrés salino (Brown, 1978), mientras que arabitol parece estar asociado con el crecimiento en medios concentrados de glucosa. Por lo tanto, el glicerol es un soluto compatible acumulado en microorganismos eucariotas crecidos bajo estrés salino, mientras que los medios ricos en azúcar promueven la acumulación de polioles con estructuras más grandes como el arabitol (Adler *et al.*, 1982). La levadura *Yarrowia lypolitica*, en presencia de un medio de cultivo con glicerol tanto crudo (derivado de la producción de biodiesel) como puro (glicerol 98%) como única fuente de carbono y suplementado con 0.7 M de NaCl, acumuló más eritritol que manitol a una concentración de 0.5 M NaCl, manteniéndose una relación eritritol-manitol de 4:1 cuando se expuso a una alta presión osmótica (Tomaszewska *et al.*, 2012).

1.4.3. Dinámica de solutos compatibles después de un choque hipo-osmótico o hiperosmótico en *A. sydowii*

La acumulación de solutos compatibles, en hongos modelos, se ha analizado durante el choque hiperosmótico o hipo-osmótico, pero hay pocos estudios que analicen hongos halófilos que crecen en condiciones óptimas de salinidad y que cambian a condiciones osmoestresantes (Gostincar *et al.*, 2011; Redkar *et al.*, 1995). En este trabajo se definió como choque inductor de estrés al cambio de medio óptimo (0.5 M NaCl) a el medio con 2.0 M de NaCl o al medio sin NaCl. Se evaluó la acumulación de polioles y trehalosa cuando *A. sydowii* en ambos experimentos.

Después de un choque hiperosmótico, *S. cerevisiae*, *H. werneckii* y *W. ichthyophaga* acumulan predominantemente glicerol. Sin embargo, en las células de *A. sydowii* en condiciones de salinidad constante, se observó que la acumulación de glicerol se produjo solo a 2.0 M de NaCl. Esto lleva a preguntas como se producirá glicerol u otros osmolitos si el micelio se cambia de condiciones hipoosmóticas (sin NaCl) a condiciones óptimas de sal (NaCl 0.5 M), que presumiblemente no representan una condición estresante para este hongo. Por lo tanto, se comparó la acumulación de solutos compatibles de *A. sydowii* cuando se exponen a choques osmóticos

hiposmóticos, hiperosmóticos e inductores de estrés.

Existen pocos estudios relacionados con el análisis de la acumulación de solutos frente en condiciones inductoras de estrés. Sin embargo, Redkar y colaboradores (1995) determinaron la acumulación de glicerol, en cultivos del hongo halotolerante *A. nidulans* en tres condiciones (cultivos sin adaptar a NaCl, adaptado con NaCl y choque hiperosmótico). Este hongo acumuló glicerol intracelular en micelios que se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento, en las 3 condiciones evaluadas. El contenido de glicerol aumentó 7.9 veces en el micelio adaptado a la sal y 2.4 veces en la condición inductora al estrés.

Los cultivos de *A. sydowii* en condiciones sin NaCl transferidos a 0.5 M de NaCl mostraron un aumento de la concentración eritritol y arabitol después de 2 horas (Figura 1.5.4), y disminuyeron a los niveles encontrados en la condición óptima después de 8 horas. Los niveles de trehalosa y manitol no cambiaron y no se produjo glicerol (Figura 1.5.4). Sin embargo, en otros *Aspergilli* no halófilos como *A. nidulans* y *A. niger* se acumula glicerol en salinidades similares (Beever y Laracy, 1986, Ianutsevich y Tereshina, 2019). Por el contrario, el cambio de cultivos sin NaCl a 2.0 M de NaCl indujo una pequeña acumulación de glicerol después de 8 horas y una disminución progresiva de la concentración de manitol.

El cambio de cultivos sin NaCl a 2.0 M de NaCl indujo la expresión de genes *stps* y *ccg-9* (Figura 1.5.5), que no se correlacionaron con la acumulación de trehalosa. El gen *m2dh* no cambió su expresión, mientras que el gen *mtld* se reguló negativamente después del choque, coincidiendo con la disminución de la concentración de manitol. Los transcritos de *gpd* se detectaron transitoriamente entre 2 y 8 horas, lo que también coincide con el aumento de glicerol después de 8 horas. Estas observaciones son diferentes con los estudios realizados en *S. cerevisiae* y *D. hansenii*, y otros, donde la concentración intracelular de glicerol aumentó después de 30 minutos cuando las células fueron expuestas a un choque osmótico moderado (sin sal a 0.5 M de NaCl) (Hohmann *et al.*, 2007; Parmar *et al.*, 2011; Plemenitaš *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2020).

Después de un choque hipo-osmótico de 2.0 M de NaCl a un medio sin sal, se

detectó trehalosa a los 10 minutos, mientras que la cantidad de glicerol disminuyó rápidamente. Se produjo un cambio en la identidad de los osmolitos acumulados, pero no hubo un cambio drástico en la concentración total de estos (Figura 1.5.4). Bajo este choque, el gen *ccg-9* se reguló positivamente poco después del choque, mientras que el gen *stps* se reguló negativamente después de 8 horas y los niveles de transcripción de *gpd* disminuyeron progresivamente (Figura 1.5.5). Estos cambios por sí solos no explican la dinámica de la trehalosa y el glicerol, pero son consistentes con la respuesta fisiológica del micelio en esta condición. Cuando el choque hipo-osmótico fue de 2.0 M de NaCl a un medio con 0.5 M de NaCl, los cambios fueron más evidentes, ya que pico máximo de las concentraciones de eritritol y glicerol se observaron a las 2 horas y el glicerol inicialmente se acumuló muy poco. Curiosamente, se detectó un pico de trehalosa a las 48 horas después de este tratamiento, el cual no era esperado para esta condición.

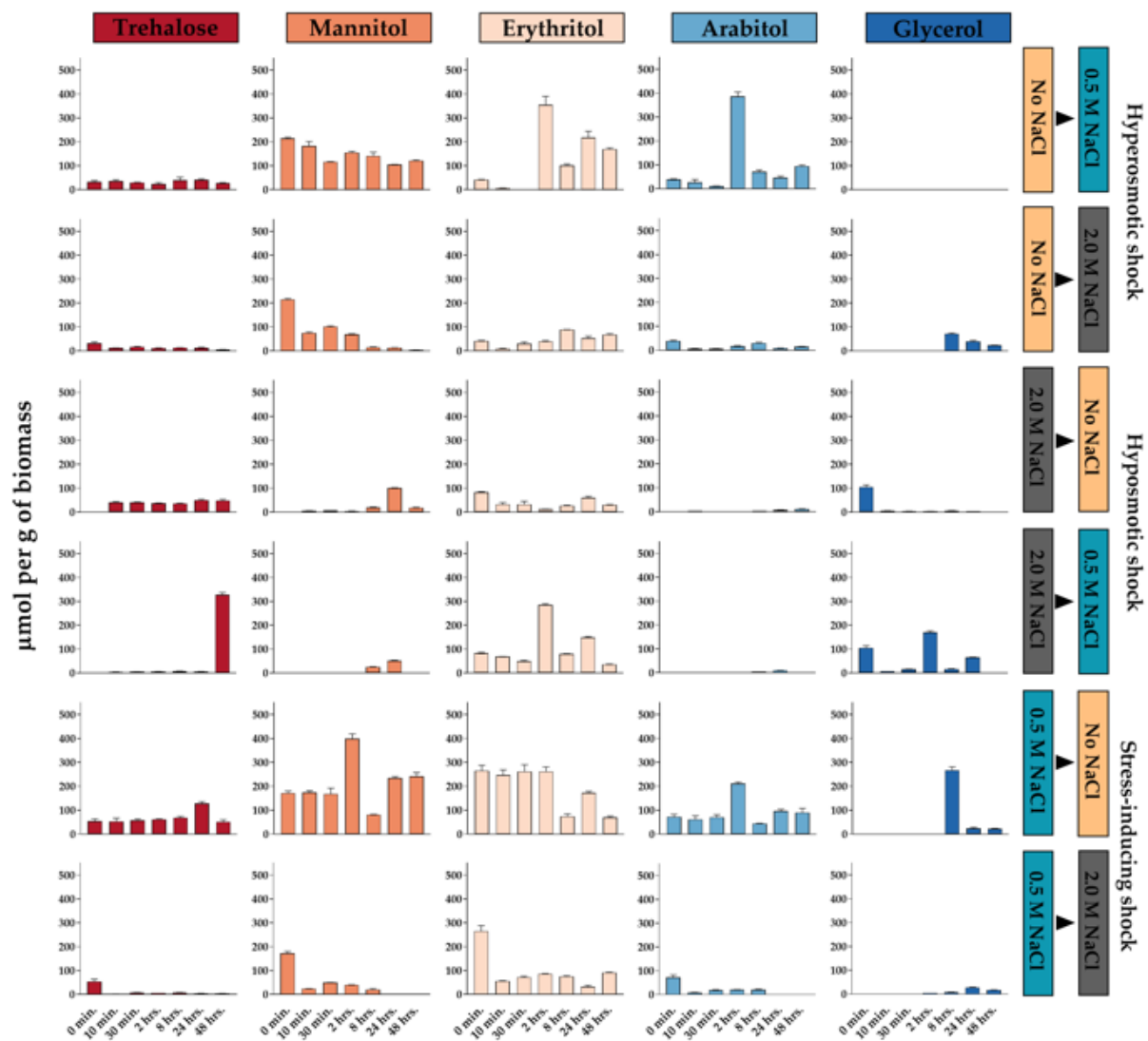


Figura 1.5.4. Acumulación de solutos compatibles en *A. sydowii* después de diferentes choques osmóticos. Las etiquetas de la derecha indican las condiciones de cultivo antes y después del choque osmótico. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de al menos tres repeticiones ($n = 3$). El análisis estadístico de los datos se resume en la Tabla suplementaria 1.8.3.

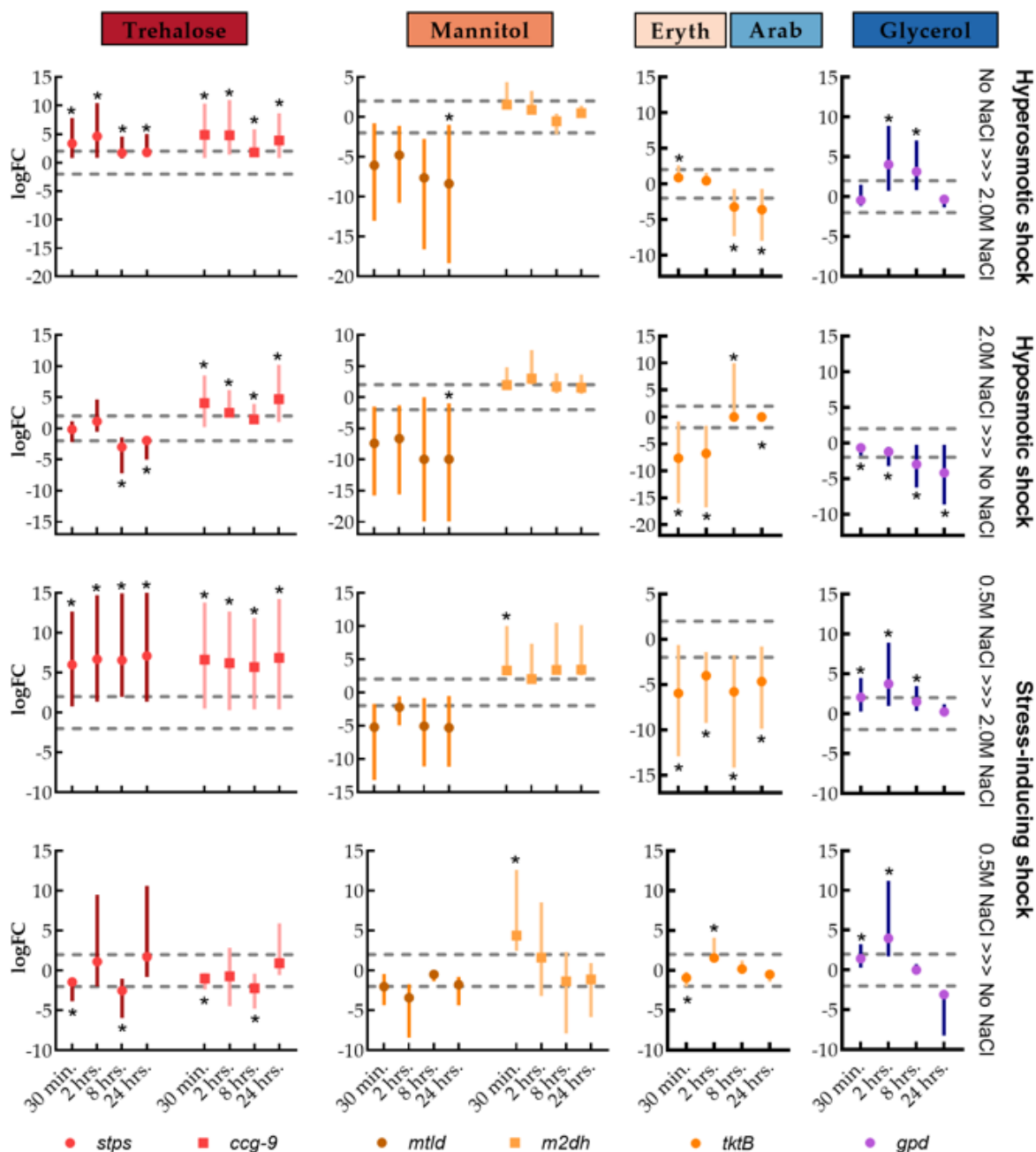


Figura 1.5.5. Regulación transcripcional de los genes enzimáticos involucrados en la síntesis de osmolitos después del choque hiperosmótico, choque hipoosmótico y choque inductor de estrés. Los valores corresponden a las desviaciones promedio y estándar de tres réplicas biológicas ($n = 3$) y dos réplicas de qPCR técnicas. La significación estadística (*) se evaluó mediante una prueba de aleatorización realizada con el software Rest (Pfaffl *et al.*, 2002). Las líneas horizontales discontinuas corresponden a un corte $\logFC = \pm 2$.

Los resultados de los experimentos de inducción de estrés (0.5 a sin NaCl) indican que las concentraciones de manitol y arabitol aumentaron transitoriamente a las 2 horas y regresaron aproximadamente al nivel inicial después de 24 horas (Figura 1.5.4), lo que coincidió con una sobre-regulación inicial del gen *m2dh* y en una menor medida del gen *tktB* (Figura 1.5.5). Sin embargo, éstos podrían no ser responsables de la dinámica osmolítica observada. La concentración de glicerol aumentó a las 8 horas (263 $\mu\text{mol/g}$ de biomasa seca) y aún se detectó a las 48 horas después de este choque hipo-osmótico, coincidiendo con la regulación positiva transitoria del *gpd* (Figura 1.5.5). La activación del gen *gpd* y la posterior producción de glicerol no han sido consideradas en general como una respuesta al choque hipo-osmótico, pero en este caso cabe resaltar que este mecanismo estuvo asociado al estrés osmótico independientemente de la dirección del estímulo.

Por otra parte, cuando se cambió de la salinidad óptima a la condición hipersalina, en lugar del aumento esperado en la concentración de solutos compatibles, hubo una reducción en trehalosa, manitol, eritritol y arabitol y solo un ligero aumento en glicerol (Figura 1.5.4). Los genes *mtld* y *m2dh* estaban altamente sobre-regulados poco después del choque, y permanecieron así incluso después de 24 horas, lo que no explica la dinámica del manitol. La expresión del gen *tktB* se redujo significativamente poco después del choque hipo-osmótico, lo que podría explicar la reducción de eritritol y arabitol. El transcrito de *gpd* se incrementó transitoriamente entre 30 minutos y 8 horas después del choque, antes del pequeño aumento de glicerol en esta condición (Figura 1.5.5.). La respuesta fisiológica de *A. sydowii* a los cambios hiperosmóticos en el medio (ya sea, de 0.5 a 2.0 M o de sin NaCl a 2.0 M) son similares en términos de osmolitos acumulados y regulación de genes enzimáticos, pero son más pronunciadas en el cambio del medio de 0.5 M de NaCl que del medio sin sal.

En conjunto, estas observaciones muestran que la respuesta de este hongo es diferente a la de otros hongos modelo halotolerantes y halófilos. Además, se observó que la acumulación de glicerol en *A. sydowii* es una respuesta al estrés hipersalino más que una respuesta a la salinidad, como se ha propuesto previamente (Pérez-Llano *et al.*, 2020). Esto también está descrito para *S.*

cerevisiae, *H. werneckii* y *W. ichthyophaga* acumulan glicerol predominantemente tras un choque hiperosmótico (Plemenitas *et al.*, 2008; Zacj *et al.*, 2014).

1.5.4. Fosforilación de Hog como respuesta frente al choque osmótico

La vía HOG coordina las respuestas al estrés osmótico celular en varios organismos modelo. En *S. cerevisiae* y *D. hansenii*, la activación de esta vía conduce a la fosforilación transitoria de Hog1 tras un choque hiperosmótico (Hohmann, 2009). En *H. werneckii*, el gen *hog* está duplicado, mientras que la dinámica de la fosforilación de la proteína es similar a la de Hog1p de *S. cerevisiae* (Konte *et al.*, 2016). Sin embargo, en el genoma del hongo halófilo obligado *W. ichthyophaga* se encontraron dos genes similares a *hog1*: *Wihog1A* y *Wihog1B*. Este hongo presenta un sistema HOG que responde en la dirección opuesta, ya que la cinasa se fosforila en las salinidades más bajas y se desfosforila transitoriamente cuando las células se exponen a un medio hipersalino (Konte y Plemenitas, 2013, Zacj *et al.*, 2014, Konte *et al.*, 2016). Estas diversas configuraciones de vías de señalización sugieren que el sistema HOG es un componente clave de los mecanismos de adaptación a la salinidad y otras condiciones que inducen estrés. Por lo tanto, estudiamos las respuestas de los ortólogos de *Hog* en *A. sydowii* al estrés por salinidad.

Algunos hongos del género *Aspergillus* tienen más de una copia del gen *Hog* que codifican para la correspondiente MAPK Hog (Garrido-Bazán *et al.*, 2018). Por ejemplo, *A. nidulans* tiene dos ortólogos de *Hog1* del gen de *S. cerevisiae*, llamados *SakA/HogA* y *MpkC*. El primero es responsable de la mayor parte de las respuestas osmoprotectoras en *A. nidulans*, mientras que el segundo está implicado en la respuesta al estrés oxidativo y la conidiación (Garrido-Bazán *et al.*, 2018). Curiosamente, *A. sydowii* tiene una tercera copia de *Hog* MAPK que no se encuentra en sus parientes cercanos *A. versicolor* y *A. mulundensis*. Aquí llamamos a estas MAPK como *Hog1*, *Hog2* y *MpkC*, que tienen identificadores de proteínas 141488, 372814 y 47278 respectivamente en el genoma publicado de *A. sydowii* CBS 593.65 (Figura 1.5.6A). Los tres ortólogos tienen dominios completos de proteína cinasa (PK) y el sitio de fosforilación de TGY conservado (Figura 1.5.6B), lo que implica que podrían fosforilarse y ser biológicamente activos. Esto nos

permitió detectar la fosforilación de los ortólogos de MAPK en *A. sydowii* utilizando anticuerpos de Hog1p de *S. cerevisiae* con reactividad cruzada.

Los niveles de transcripción de la variante *Hog1* fueron más altos que los de *Hog2*, de acuerdo con experimentos previos de RNA-seq (Figura suplementaria 1.8.4.) (Pérez-Llano *et al.*, 2020). Más importante aún, la expresión de ambos genes fue similar en condiciones de estrés (sin NaCl o 2.0 M NaCl) pero fue menor que en la condición óptima de salinidad (Figura 1.5.6C). Este efecto fue más pronunciado para *Hog2*, lo que sugiere que esta variante podría desempeñar un papel más importante en la respuesta al estrés por sal. Sin embargo, no se ha podido elucidar bien la función de cada una de las variantes de *hog* encontradas en *A. sydowii*, por lo que se sugiere realizar experimentos donde se diseñen mutantes simples, dobles y triples, así como complementar con cada una de las variantes de *hog* de *A. sydowii* en mutantes de *hog1* en *S. cerevisiae* con el objetivo de visualizar si se recupera el fenotipo cuando es expuesta a concentraciones de NaCl.

Previamente se estableció que las condiciones sin NaCl o con 2.0 M de NaCl inducen respuestas al estrés en *A. sydowii* (Pérez-Llano *et al.*, 2020). Por lo tanto, cambiar el micelio de un medio con 0.5 M de NaCl a otra condición induce respuestas de estrés, que pueden ser diferentes de las respuestas de choque hiper-osmótico o hipo-osmótico. En la Figura 1.5.6D se observa una representación esquemática de esas variaciones experimentales. La expresión diferencial de *Hog1* y *Hog2* disminuyó después de los choques hiper o hipo-osmóticos (Figura 1.5.6E), después de largos períodos de tiempo (de 8 a 24 horas después del estímulo). Nuevamente, este efecto fue más pronunciado para la variante del gen *Hog2* que para *Hog1*. Por el contrario, la expresión del gen *Hog2* aumentó principalmente después de choques osmóticos que inducen estrés, mientras que la expresión de *Hog1* no se cambió significativamente. Resultados similares fueron reportados por Konte y Plemenitas en 2013, donde determinaron la expresión diferencial de los genes *Wihog1A* y *Wihog1B* en *W. ichthyophaga*. Los niveles de transcripción analizados en las condiciones hiperosmóticas (5.1 M de NaCl) e hipo-osmótica (1.7 M de NaCl), indicaron que los genes fueron regulados positivamente. La expresión del gen *WiHog1A* aumentó 3 veces y la del gen *WiHog1B* aumentó 6 veces más

con respecto al nivel basal, en ambas condiciones, sugiriendo que *Wihog1B* responde mejor a los cambios en la salinidad. Además, observaron que en la concentración óptima (3.4 M de NaCl), no se produjo ningún cambio en la expresión de ambos genes (Konte y Plemenitas, 2013).

La fosforilación de las variantes de Hog MAPK de *A. sydowii* se analizó de 5 minutos a 3 horas después de un estímulo osmótico y se comparó con la dinámica de fosforilación de Hog1p en *S. cerevisiae* mediante Western blotting (Figura 1.5.6F). Los patrones independientes de fosforilación de Hog1/Hog2 no pudieron discernirse con este experimento ya que las bandas correspondientes a ambos productos proteicos posiblemente se superpusieron. Por el contrario, la banda de mayor peso molecular observada, por debajo de la correspondiente de Hog1p *S. cerevisiae*, podría corresponder a la variante MpkC, según su predicción de peso molecular.

Ambas o al menos una de las proteínas Hog1/Hog2 se fosforiló constitutivamente en las condiciones sin NaCl o en 2.0 M de NaCl, y en menor grado en la condición óptima de 0.5 M de NaCl. Tal estado de fosforilación no cambió con los choques hiperosmóticos o hipo-osmóticos, pero aumentó cuando las células se expusieron a choques osmóticos inductores de estrés. La fosforilación no fue transitoria, lo que indica que una fosforilación sostenida de Hog es el estado normal de este sistema de señalización en *A. sydowii*. Curiosamente, la proteína MpkC se produjo en cantidades detectables solo en la condición sin NaCl donde estaba constitutivamente fosforilada y permaneció fosforilada incluso después de un choque hiperosmótico. Por el contrario, esta proteína se fosforiló transitoriamente tras el choque hipo-osmótico, especialmente de 2.0 M de NaCl al medio sin NaCl.

La fosforilación de Hog1p en *S. cerevisiae* y su homólogo en *D. hansenii* se produce de forma transitoria e inmediatamente después de un estímulo de estrés leve, y persiste hasta media hora en ambos modelos (Sharma *et al.*, 2005, Sánchez *et al.*, 2020). Curiosamente, la fosforilación de Hog1 permaneció después de que las células adaptadas a un estrés osmótico severo fueran sometidas a un choque hipoosmótico (Sharma *et al.*, 2005; Van Wuytswinkel *et al.*, 2000). Cabe señalar que en *S. cerevisiae* la fosforilación constitutiva de Hog1 es letal (Maeda *et al.* 1994), mientras que en *W. ichthyophaga* no lo es (Konte y Plemenitas, 2013). La

fosforilación de WiHog1 en las condiciones de estrés hiperosmótico e hipo-osmótico fue constitutiva, aunque disminuyó con respecto al tiempo experimental, en la condición óptima también disminuyó.

Por otro lado, la levadura halotolerante *H. werneckii* cultivada en un medio con más de 3 M de NaCl, la proteína HwHog1 está fosforilada constitutivamente. Sin embargo, en medios con baja osmolaridad los niveles de fosforilación disminuyen (Turk y Plemenitas 2002, Konte y Plemenitas, 2013).

En la levadura *D. hansenii* se observó un estado prolongado de fosforilación de Hog1 en células sometidas a un estrés osmótico severo (Van Wuytswinkel *et al.*, 2000, Sharma *et al.*, 2005, Sánchez *et al.*, 2020). Curiosamente, la fosforilación de Hog1 permaneció después de que las células adaptadas a un estrés osmótico severo fueran sometidas a un choque hipoosmótico (Van Wuytswinkel *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005). El tiempo que puede durar el Hog1 fosforilado va a depender de la intensidad del estímulo hiperosmótico, por ejemplo, en una condición de estrés moderado (0.4 M a 0.6 M de NaCl), puede mantenerse fosforilado entre 40 a 60 minutos (Van Wuytswinkel *et al.*, 2000; Vázquez-Ibarra *et al.*, 2018). Los niveles de fosforilación de DhHog1 evaluados a diferentes concentraciones de NaCl, disminuyeron significativamente en concentraciones mayores a 2 M de NaCl, pero aun así se detectó en 3 M de NaCl. Además, observaron que la fosforilación de DhHog1 aumentó durante el tiempo de exposición al estrés, alcanzando el nivel máximo a los 60 minutos y disminuyó gradualmente, hasta los 180 minutos de exposición a NaCl (Sánchez *et al.*, 2020). Los resultados encontrados en *A. sydowii* difieren con los de *D. hansenii* en cuanto a los niveles de fosforilación de Hog en la condición de hipersalinidad.

En conjunto, estos resultados podrían indicar que la actividad biológica de Hog1/Hog2 está regulada transcripcionalmente en *A. sydowii*, mientras que la regulación de su actividad por fosforilación requiere de más estudios, ya que no podrían ser discriminados por Western Blot. El sistema HOG en *A. sydowii* responde a condiciones osmóticas que inducen estrés celular, ya que la presencia de sal en concentraciones óptimas no parece regular la abundancia de los transcritos o el estado de fosforilación de ninguna de las proteínas Hog. Por otro lado, el homólogo

de Hog MpkC respondió al choque hipo-osmótico. La interacción de estas MAPK en la regulación de la salinidad y las respuestas al estrés debe estudiarse más a fondo, ya que no sigue la dinámica de otros sistemas HOG en microorganismos modelos halotolerantes o halófilos.

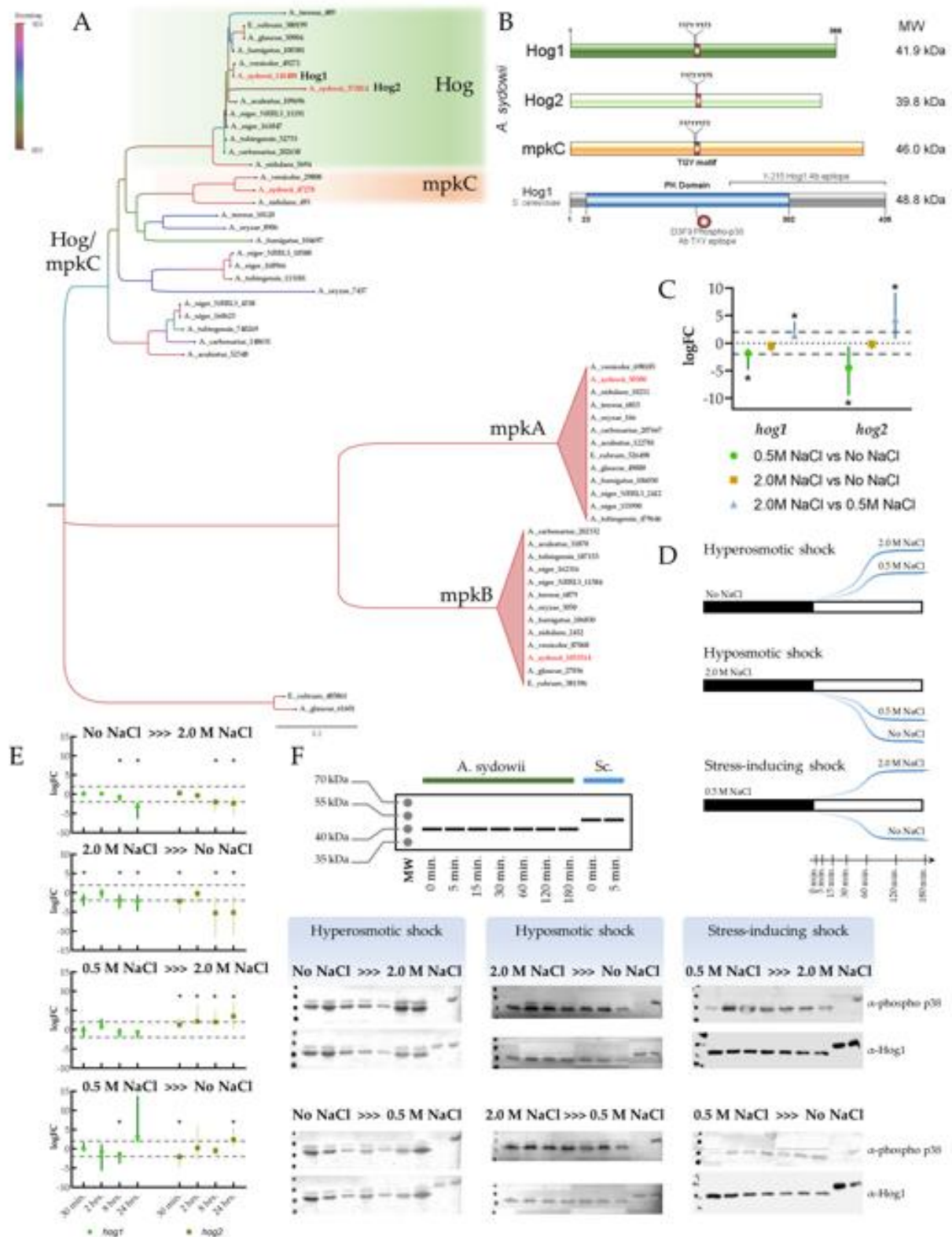


Figura 1.5.6. Sistema HOG MAPK en *A. sydowii*. A) Reconstrucción de la filogenia de

MAPK en *Aspergilli* seleccionados, incluidos los genes Hog1, Hog2 y MpkC de *A. sydowii*. Se puede observar un árbol filogenético más extenso en la Figura Suplementaria 1.7.3) Homólogos del gen *hog* en *A. sydowii* que muestran el tamaño de la proteína, el peso molecular, los motivos de fosforilación conservados, el dominio de la proteína cinasa (PK) y la región correspondiente a los epítomos de los anticuerpos Y-215 y D3F9 utilizados para la detectar el *hog* fosforilado y total, respectivamente por Western blot. C) Expresión relativa de los transcritos de Hog1 y Hog2 en *A. sydowii* adaptada a la sal que crece sin NaCl, 0.5 M o 2.0 M NaCl, se representa las desviaciones promedio y estándar de tres réplicas biológicas (n = 3) y dos réplicas técnicas de qPCR. D) Diagrama de las condiciones de choque utilizadas para probar la dinámica de fosforilación de Hog1 y Hog2 de *A. sydowii*. E) Expresión relativa de los transcritos de Hog1 y Hog2 después del choque osmótico en *A. sydowii*, que representa las desviaciones promedio y estándar de tres réplicas biológicas (n = 3) y dos réplicas técnicas de qPCR. La significación estadística (*) se evaluó mediante una prueba de aleatorización realizada con el software Rest (Pfaffl *et al.*, 2002). Las líneas horizontales discontinuas corresponden a un corte $\log_{2}FC = \pm 2$. F) Fosforilación de homólogos de Hog MAPK después de diferentes choques osmóticos. Se utilizaron extractos de cultivos de *S. cerevisiae* desplazados de un medio sin NaCl a un medio con NaCl 1,0 M como controles positivos para la fosforilación de Hog1.

Además del papel de los solutos compatibles en respuestas al estrés de los hongos también se ha descrito el cambio en la relación de los iones Na^{+}/K^{+} intracelular para compensar la presión osmótica celular.

1.5.5. Relación Na^{+} / K^{+} en *A. sydowii*

La regulación intracelular de los niveles de iones de sodio (Na^{+}) y potasio (K^{+}) es otro mecanismo importante de los eucariotas para compensar el desequilibrio osmótico (Rodríguez-Navarro, 2000), y se ha observado previamente en hongos halófilos y halotolerantes (Norkrans y Kylin, 1969, Gunde-Cimerman y Plemenitaš, 2006, Kumar y Gummadi, 2009, Martínez *et al.*, 2011, Zajc *et al.*, 2014).

El alto contenido de los cationes K^{+} en las células de levadura está relacionado con el estado de equilibrio que existe entre su entrada y salida simultánea a través de la membrana plasmática. Esta circulación continua es necesaria para las funciones

fisiológicas básicas del organismo (Ortega y Rodríguez- Navarro, 1985; Lapathitis y Kotyk, 1998; Arino *et al.*, 2010).

En *S. cerevisiae* en condiciones normales de crecimiento la concentración intracelular de cationes de K^+ varía de 200 a 300 mM. Estos niveles se ven afectados con la entrada de Na^+ . Las concentraciones intracelulares de Na^+ una vez que son equivalentes a las de K^+ son perjudiciales para la célula, afectando su crecimiento, debido a varios componentes: la toxicidad de los cationes de sodio, que inactivan a la mayoría de las enzimas debido que perturban las fuerzas que mantienen la estructura de estas proteína (equilibrio hidrofóbico-electrostático); el estrés osmótico causado (Murguía *et al.*, 1996; Ariño *et al.*, 2010); inhibir numerosas reacciones metabólicas; cambiar el potencial de la membrana celular y los sistemas de transporte (Goossens *et al.*, 2001, Rosenfeld *et al.*, 2010). Por lo tanto, a medida que aumenta la cantidad extracelular de sodio, las células de microorganismos halotolerantes y halófilos aumentan el número de transportadores de cationes para mantener una relación K^+/Na^+ alta (Norkrans y Kylin, 1969, Ariño *et al.*, 2010). Se requiere potasio intracelular en estas condiciones para mantener el potencial a través de la membrana plasmática, compensando el desequilibrio osmótico y las cargas negativas de las macromoléculas. El potasio también participa en la regulación de la síntesis y función de proteínas (Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2007; Benito *et al.*, 2009).

En la levadura halotolerante *D. hansenii*, utilizada aquí como control, el aumento de sodio extracelular a 0.5 M de NaCl desencadenó la acumulación de potasio dentro de la célula, alcanzándose una relación K^+/Na^+ diez veces menor que en los medios sin NaCl (Figura 1.5.7). El aumento de la concentración extracelular a 2.0 M de NaCl representó un aumento de cuatro veces con respecto a la condición con 0.5 M de NaCl, por lo que se redujo diez veces la relación K^+/Na^+ . Por el contrario, *A. sydowii* no parece tener los mismos mecanismos compensatorios para regular las concentraciones de cationes intracelulares cuando crece en el medio con 0.5 M de NaCl. En esta condición, la relación K^+/Na^+ disminuyó casi veinte veces en comparación con el medio sin sal. Una concentración más alta de NaCl

aparentemente desencadenó la acumulación de potasio o la eliminación de sodio, ya que la relación K^+/Na^+ aumentó de dos a cuatro veces en el medio con 2.0 M de NaCl en comparación con 0.5 M de NaCl (Figura 1.5.7). Esto indica que los sistemas de transporte que regulan la absorción de K^+ y la extrusión de Na^+ estaban sobre-regulados o activados como consecuencia del estrés por salinidad en concordancia con lo reportado (Martínez *et al.*, 2011). Esto no es un requisito para el correcto funcionamiento de las células de *A. sydowii* en condiciones de salinidad óptima. Los cambios en la relación K^+/Na^+ se pueden justificar mediante los estudios de transcriptómica realizado en *A. sydowii* donde se encontró que tres transcritos relacionados con transportadores de cationes metálicos tienen expresión diferencial inducida en la condición de 2.0 M de NaCl (Perez-Llano *et al.*, 2020). Uno de ellos es *Ena2*, una sodio ATPasa, que igualmente fue identificada en *W. ichthyophaga* y *H. werneckii*, con expresión diferencial en la condición de mayor salinidad. En este sentido, el hongo halófilo moderado *A. sydowii* tuvo un patrón de acumulación de K^+/Na^+ diferente en comparación con *S. cerevisiae* u otros hongos halotolerantes como *D. hansenii* o *Debaryomyces nepalensis* cuando se expuso a concentraciones crecientes de sodio (Kumar y Gummadi, 2009), mientras tuvo similitud con el estudio en el hongo *W. ichthyophaga* (3.4 M de NaCl, condición cercana al crecimiento óptimo) donde relación K^+/Na^+ fue más baja (Zajc *et al.*, 2014). Comparativamente, el comportamiento de *A. sydowii* en la condición sin sal fue similar al hongo halófilo obligado, que resultó tener el máximo valor de la relación K^+/Na^+ cuando tuvo un menor crecimiento y acumulación de biomasa (1.7 M de NaCl). El hongo *W. ichthyophaga*, al igual que *D. hansenii* cuando está sometido a estrés osmótico, pudiera tener niveles de Na^+ mayores que de K^+ para favorecer su crecimiento. (Prista *et al.*, 1997; González Hernandez *et al.* 2004; Prista *et al.* al.2005; Tekolo *et al.*, 2010; Zajc *et al.*, 2014).

En contraste, *D. nepalensis* acumuló grandes cantidades de K^+ dentro de la célula tanto en ausencia de NaCl como en presencia de un exceso extracelular (Kumar y Gummadi, 2009).

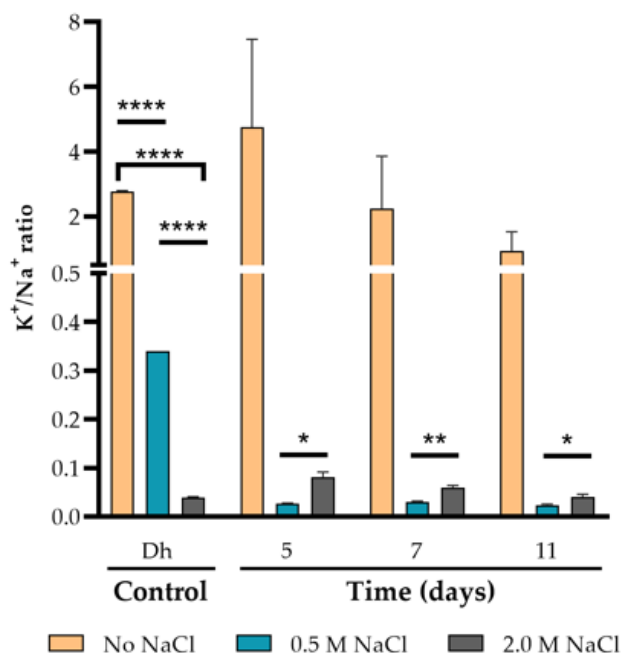


Figura 1.5.7. Regulación de la relación K^+/Na^+ intracelular en respuesta a la salinidad en células de *A. sydowii*. Dh: *Debaryomyces hansenii* se utilizó como control positivo. Los datos son medias \pm DE. La significación estadística se determinó mediante el método de Holm-Sidak, con alfa = 0.05. Cada fila se analizó individualmente, sin asumir una DE consistente. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

La respuesta inducida por estrés osmótico puede desencadenar mecanismos de respuestas a estrés oxidativo ya que ambos estímulos están relacionados.

1.5.6. El estrés osmótico induce cambios en el estado redox de *A. sydowii*

Los hongos y las plantas son propensos a generar especies reactivas de oxígeno (ERO, siglas en español) en presencia de una alta concentración de sal (Mittler *et al.*, 2004, Miller *et al.*, 2008, Kumar *et al.*, 2011, Bose *et al.*, 2014, Sharma y Sharma, 2017). Existe un vínculo causal entre la salinidad y el estrés oxidativo potencial, que es un resultado del desbalance entre la generación y la eliminación de las EROs (Mittler *et al.*, 2004, Miller *et al.*, 2010, Kumar *et al.*, 2011). Las EROs se generan como subproductos normales del metabolismo aeróbico pero su acumulación altera el equilibrio entre el glutatión oxidado y reducido. Los niveles elevados de EROs

que dañan macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que puede provocar la muerte celular (Farrugia y Balzan, 2012). No obstante, las EROs también son moléculas de señalización que pueden regular el crecimiento y la diferenciación celular (Aguirre *et al.*, 2005, Ramos-Moreno *et al.*, 2019). Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay evidencia que vincule las EROs y la adaptación de los hongos halófilos a los desafíos ambientales, como son las salinidades extremas. Por lo tanto, investigamos las respuestas oxidativas y antioxidantes de *A. sydowii* (lipoperoxidación, oxidación de proteínas y niveles de glutatión (GSH) y superóxido dismutasa (SOD), bajo diferentes condiciones de salinidad, en condiciones constantes: ausencia de sal (estrés hipoosmótico), 0.5 M de NaCl (condición óptima de crecimiento), o 2.0 M de NaCl (condición hiperosmótica). Los hidroperóxidos también se determinaron, pero no se detectaron en nuestras condiciones experimentales, tal vez porque en los momentos probados las células ya estaban adaptadas a los entornos donde crecían. Como se muestra en la Figura 1.5.8, la actividad de SOD (porcentaje) y la concentración de GSH cuando el hongo crecía en 2.0 M de NaCl fueron las mayores de las tres condiciones, alcanzando el 11.2 % en el día 11 y 290.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el día 5, respectivamente (Figura 1.5.8). En el día 11, la actividad de SOD aumentó significativamente (7.4%) cuando el hongo estaba creciendo sin sal en comparación con las condiciones óptimas de crecimiento (0.5 M NaCl). Mientras tanto, GSH se acumuló significativamente en NaCl 2.0 M, con la acumulación más baja en la condición de crecimiento óptima (115-145 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (Figura 1.5.8). Los productos de proteínas oxidados (PAOP) y el Malondialdehído (MDA) se utilizaron como una medida del daño oxidativo a nivel de proteína y de lípidos generados por el estrés osmótico. Los PAOP se acumularon solo en la condición hipersalina (2.0 M NaCl) alcanzando hasta 101.2 μM en el día 5 sugiriendo que esta es la condición más estresante para *A. sydowii*. Además, MDA se acumuló en niveles similares en todas las condiciones en los días 5 y 11. Sin embargo, en el día 7, hubo una correlación inversa entre los niveles de MDA y la presencia de sal. El MDA es un subproducto de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados mediada por radicales libres o por lipoxigenasas (Niemela *et al.*, 1995; Farmer y Mueller, 2013).

Durante el estrés oxidativo causado por una variedad de estímulos, salinidad o estrés osmótico, los EROs desencadenan la peroxidación de los lípidos de la membrana, lo que da como resultado la formación de aductos proteicos de MDA y acetaldehído (AA) denominados MAA (Niemela *et al.*, 1995). El mapa de calor en la Figura 1.5.8 muestra que los mecanismos antioxidantes fueron menores bajo una salinidad óptima en comparación con las condiciones hipo-osmóticas e hiperosmóticas. Estos resultados indican que condiciones de crecimiento de salinidad no óptimas (0 y 2.0 M NaCl) se favorece una mayor producción de ROS, en contraste con lo que se observa en condiciones óptimas de crecimiento (0.5 M NaCl). En general, los niveles del marcador oxidativo MDA fueron constantes en todas las condiciones en los diferentes momentos evaluados, mientras que las PAOP se detectaron solo en la condición hiperosmótica, lo que sugiere que esta es la condición más estresante para *A. sydowii*. Por lo tanto, en 2.0 M de NaCl hubo más daño oxidativo y niveles mucho más altos de GSH, un indicador de una respuesta antioxidante a un ambiente oxidativo. Este resultado, es consistente con la observación de altos niveles de antioxidantes y marcadores oxidativos en aislados bacterianos de un lago salino que se cultivaron en un medio con 3.4 M de NaCl (20 %) y también con la resistencia de *H. werneckii* al estrés oxidativo. Existe una correlación entre la salinidad y la resistencia al estrés oxidativo (Hassan *et al.*, 2020).

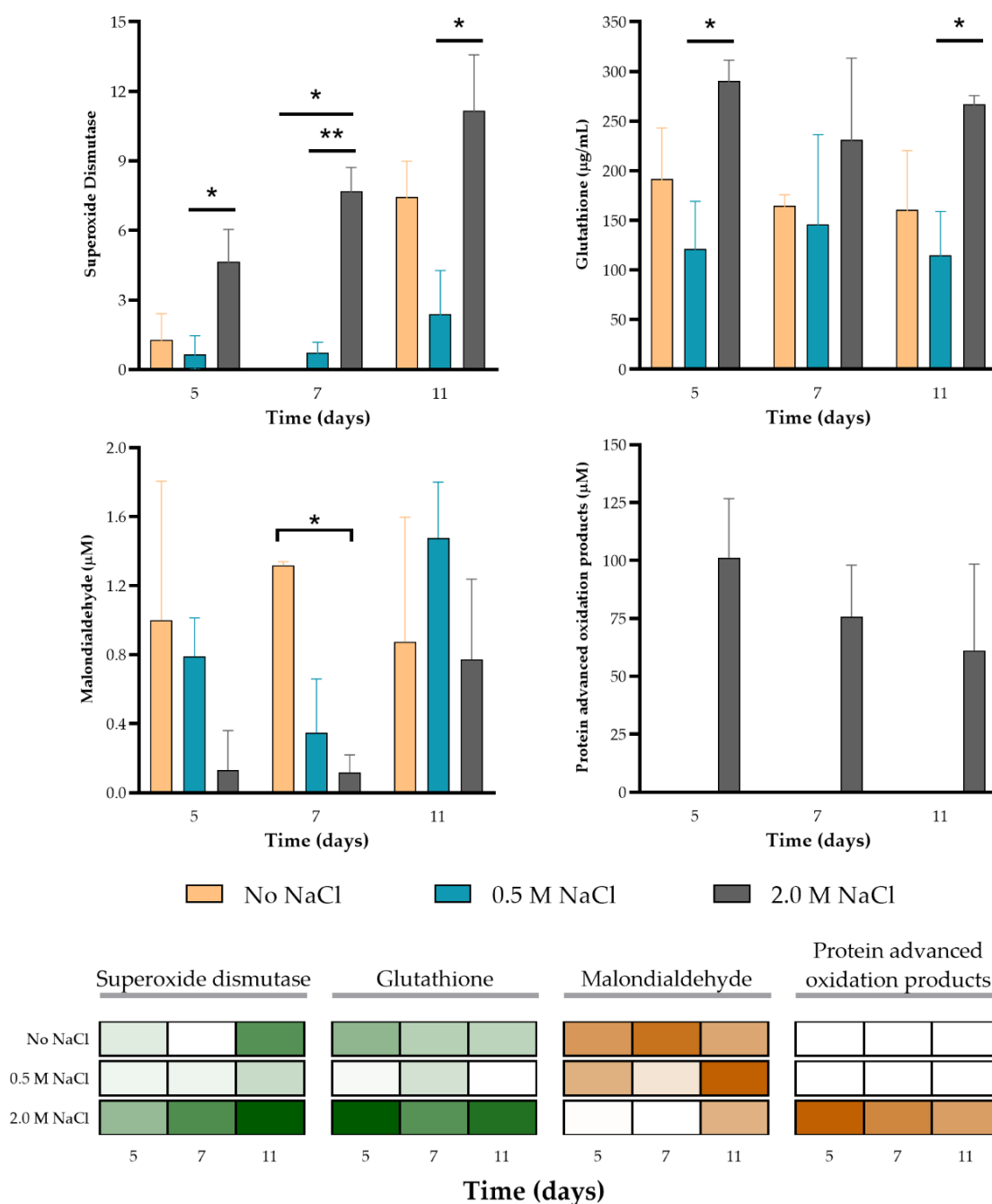


Figura 1.5.8. Estrés oxidativo y marcadores antioxidantes evaluados en cultivos de *A. sydowii* en condiciones de salinidad estable. Se analizaron la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión (GSH) (marcadores de antioxidantes; verde en los mapas de calor), malondialdehído (MDA) y productos de oxidación avanzada de proteínas (PAOP) (marcadores de daño oxidativo; marrón en los mapas de calor). Los datos son medias \pm DE. Las barras con asteriscos (*) indican la diferencia significativa (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

entre el control y sus respectivas muestras tratadas. Analizado por un ANOVA bidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los detalles de las diferencias estadísticas se muestran en la Tabla Suplementaria 1.7.4.

La Figura 1.5.9 muestra la respuesta dinámica de *A. sydowii* de los marcadores oxidativos y la presencia de antioxidantes cuando el hongo fue desafiado por estrés osmótico. El hongo se cultivó durante 7 días en MMG sin sal, 0.5 M o 2.0 M de NaCl, luego se cambió a las otras condiciones. Los marcadores oxidativos y la respuesta antioxidante se evaluaron después de 30 minutos, 2 y 8 horas (algunos puntos de tiempo fueron los mismos para la evaluación de solutos compatibles y fosforilación de Hog). Los niveles de actividad de SOD y contenido de GSH fueron similares cuando *A. sydowii* estaba creciendo sin sal o con 0.5 M de NaCl (tiempo 0) y los niveles se mantuvieron cuando en ambas condiciones se cambiaron a 2.0 M de NaCl. Solo cuando el hongo estaba creciendo en 2.0 M NaCl, los niveles de los mecanismos antioxidantes fueron más altos y se mantuvieron cuando hubo un cambio a un medio sin sal o que contenía 0.5 M de NaCl. Los hidroperóxidos no se detectaron en el momento inicial en ninguna condición, posiblemente porque el hongo ya estaba adaptado al medio de cultivo en donde estaba creciendo, mientras que sus niveles aumentaron principalmente cuando *A. sydowii* se cambió a 2.0 M de NaCl. Estos resultados se correlacionan con los niveles de PAOP, donde se observaron cambios notables cuando el hongo se cambió de un medio sin sal o de 0.5 M NaCl a un medio con 2.0 M NaCl. También hubo un aumento en los niveles de PAOP en otras condiciones, pero solo después de 8 horas. El hidroperóxido se detectó a los 30 minutos de la exposición a un choque osmótico solo cuando el cultivo inicial estaba creciendo en 2.0 M de NaCl. Además, el hidroperóxido se detectó cuando el cultivo inicial que creció en 0.5 M de NaCl se transfirió a la condición hipersalina (2.0 M NaCl). En consecuencia, la oxidación de proteínas se detectó después de 30 minutos de exposición al medio hipo o hipersalino. Los niveles de MDA tuvieron una correlación inversa con la actividad antioxidante de SOD y los niveles de GSH. Las células crecidas en ausencia de sal y expuestas a 0.5 M y 2.0 M de NaCl disminuyeron sus mecanismos antioxidantes enzimáticos (SOD) y no enzimáticos (GSH). Cuando las células fueron expuestas a la condición

óptima de Na⁺, no hubo acumulación de peróxido o proteína oxidada, sin embargo, hubo un aumento en la peroxidación lipídica. En las condiciones en las que el hongo se desplazó a una salinidad más alta (2.0 M NaCl), hubo más peroxidación de lípidos. Esta acumulación podría ser consecuencia de la actividad de las lipoxigenasas (LOX), que se sabe que está regulada por el estrés abiótico, incluida la salinidad (Lim *et al.*, 2015), en lugar de la acumulación no regulada de EROs. En la condición de hipersalinidad, la respuesta fúngica fue mantener la actividad de SOD con cantidades más bajas de GSH (alrededor de 90 µg/mL).

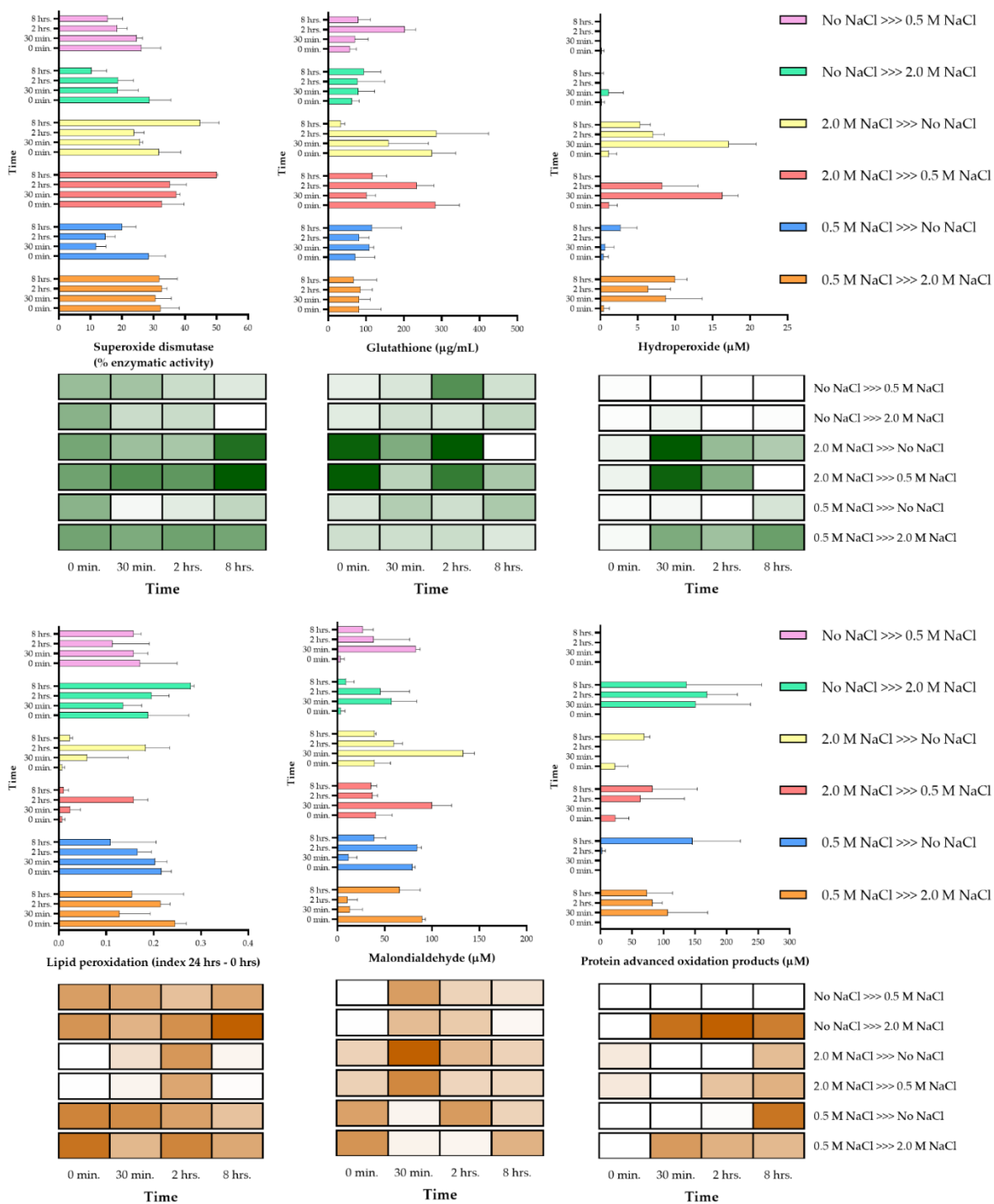


Figura 1.5.9. Estrés oxidativo y marcadores antioxidantes evaluados en *A. sydowii* después de un choque osmótico. Se analizaron la superóxido dismutasa (SOD) y glutati6n (GSH) (marcadores de antioxidantes, verde en los mapas de calor), malondialdehido (MDA) y productos de oxidaci6n avanzada de prote6nas (PAOP) (marcadores de daño oxidativo, rojo

en los mapas de calor). Las columnas representan el promedio de al menos tres réplicas y las barras representan la desviación estándar. Los detalles de las diferencias estadísticas se muestran en la Tabla Suplementaria 1.7.5.

El efecto del estrés oxidativo puede depender de la tasa de duplicación del hongo y de las condiciones ambientales. La presencia de mecanismos antioxidantes es un indicador positivo de que las células son tolerantes a la salinidad debido a su potencial para manejar niveles crecientes de EROs (Kumari *et al.*, 2015). Las EROs no solo son indicadores de estrés, sino que también desempeñan funciones celulares en diferentes organismos, incluidas plantas y hongos. No obstante, se ha discutido si las mediciones de los sistemas celulares antioxidantes son indicadores adecuados de la tolerancia al estrés (Maksimović *et al.*, 2013).

1.6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados en el presente capítulo llegamos a las siguientes conclusiones que derivan en la representación gráfica en la Figura 1.6.1.

- ✗ Los días 5, 7 y 11 son los tiempos adecuados para la evaluación de solutos compatibles en el hongo *A. sydowii* crecidos en medios sin NaCl, 0.5 M o 2.0 M NaCl pues corresponden a las etapas exponencial media, exponencial tardía y estacionaria del crecimiento del hongo, respectivamente, para las tres salinidades evaluadas.
- ✗ El medio de cultivo suplementado con 0.5 M de NaCl constituye la concentración óptima para sostener el crecimiento para *A. sydowii*. Esta condición es estresante para otras especies de hongos, sin embargo, en *A. sydowii* no desencadena una respuesta al estrés y utiliza la síntesis de solutos compatibles para mantener el equilibrio osmótico.
- ✗ En todas las condiciones evaluadas se observó la acumulación de solutos compatibles. En cultivos de *A. sydowii* crecidos en condiciones óptimas (0.5 M NaCl) se acumularon los solutos arabitol, eritritol y manitol. Sin embargo, en condiciones hiperosmóticas (2.0 M de NaCl) hay una importante acumulación de glicerol en los diferentes días de crecimiento. En un choque hipo-osmótico (sin NaCl) el hongo produce trehalosa, lo que sugiere que este osmolito se produce como una respuesta al estrés más que a la hipersalinidad.
- ✗ La respuesta fisiológica de *A. sydowii* a los cambios hiperosmóticos incluyen acumulación dinámica de distintos osmolitos, así como la regulación de genes involucrados en la síntesis de estos. La acumulación de glicerol y la inducción del gen de la glicerol-3-P deshidrogenasa (*gpd*) fueron las principales respuestas al estrés salino.
- ✗ Ambas o al menos una de las proteínas Hog1 / Hog2 se fosforilaron constitutivamente tanto en condiciones hipo-osmóticas como hiperosmóticas, mientras que el homólogo de Hog MpkC solo respondió al choque hipo-osmótico. El sistema HOG en *A. sydowii* responde a condiciones osmóticas que inducen estrés celular, ya que la presencia de sal en concentraciones óptimas no parece

alterar el estado de fosforilación de ninguna de las proteínas Hog.

- Las células de *A. sydowii* en condiciones de salinidad óptima acumularon Na^+ , lo cual difiere de la respuesta clásica obtenida como consecuencia del estrés por salinidad. Este hongo no utiliza los sistemas de transporte que regulan la absorción de K^+ y la extrusión de Na^+ en el sentido de aumentar las concentraciones K^+ intracelular, ya que probablemente no es un requisito para su correcto funcionamiento en esta condición.
- La activación de los mecanismos antioxidantes evaluados en *A. sydowii* solo se detectó en cultivos de 2.0 M de NaCl, y se mantuvieron activos al cambiar a un medio sin NaCl o con 0.5 M de NaCl.

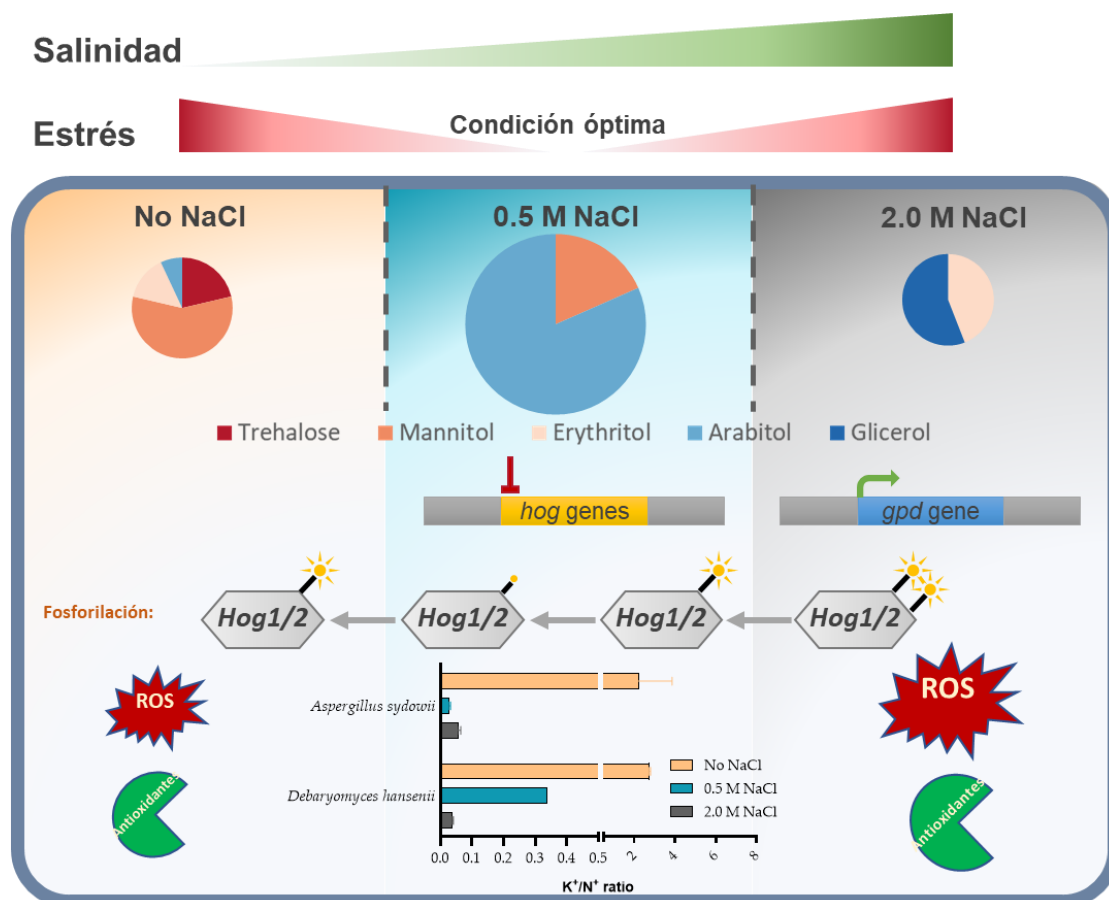


Figura 1.6.1. Resumen de los mecanismos generales de compensación osmótica y respuesta antioxidante en estrés por hipo-e hipersalinidad en *A. sydowii*.

1.7. PERSPECTIVAS

- ✓ Analizar las enzimas de degradación de las vías de síntesis de los solutos compatibles a nivel de transcriptoma y de actividad enzimática.
- ✓ Identificar la función de cada variante del gen *hog* de *A. sydowii* en condiciones de salinidad mediante la generación de mutantes y ensayos de complementación en *S. cerevisiae*.
- ✓ Identificar la identidad de Hog detectado en el Wester blot como parte del estudio de la función de Hog en respuesta al NaCl en *A. sydowii*.

1.8. RESULTADOS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

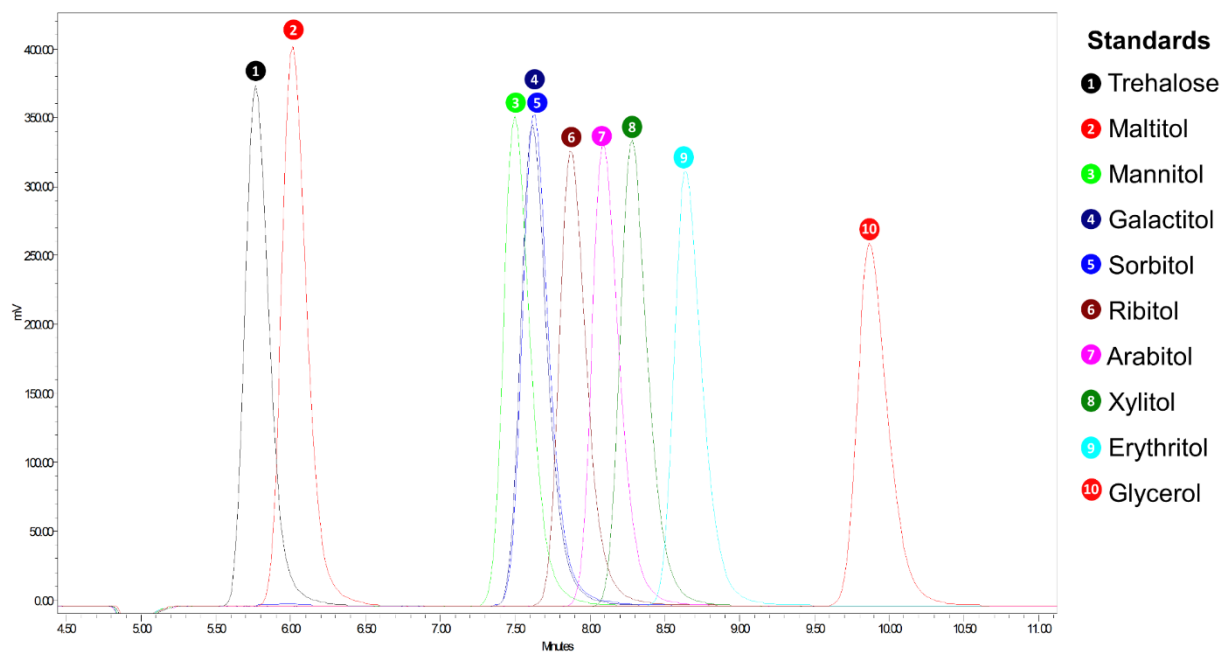


Figura suplementaria 1.8.1. Cromatogramas de todos los estándares utilizados. Concentración: 5 mg / mL cada uno.

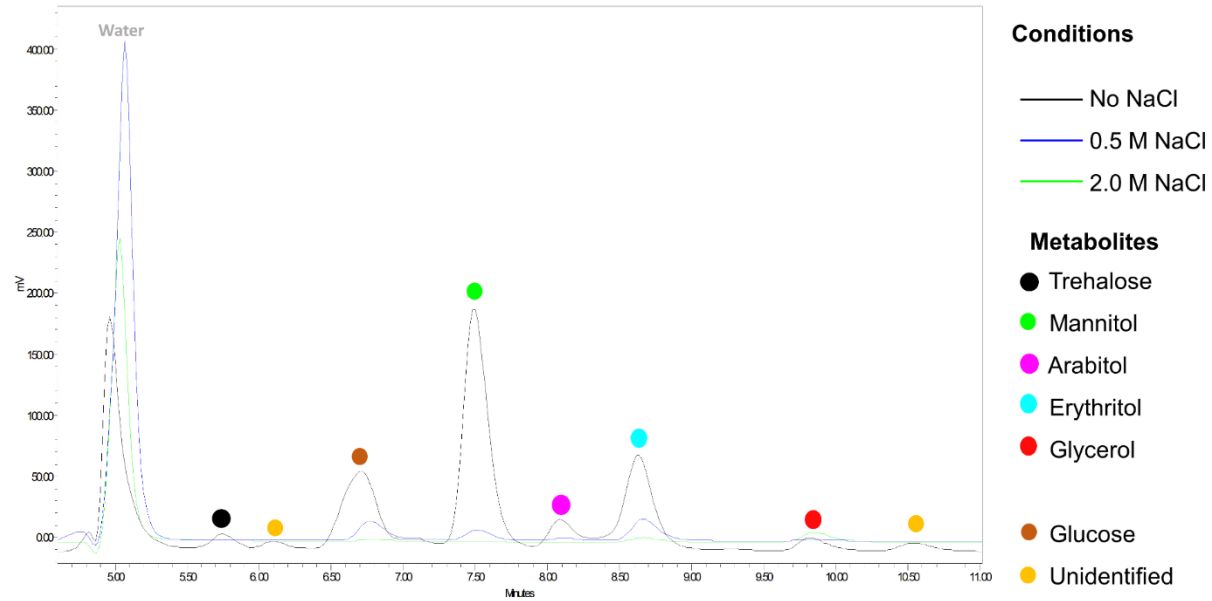


Figura suplementaria 1.8.2. Cromatogramas de muestras seleccionadas de todas las condiciones de salinidad.

Tabla suplementaria 1.8.1. Información de los oligonucleótidos para el análisis de expresión por qPCR de genes implicados en la síntesis de solutos compatibles.

Metabolito	Gen	Secuencia de Primer	Localización en el genoma	Tm	Tamaño del Amp.	Hibrid.	Conc.	Eff.
Trehalose	<i>stps</i>	Fw: TCA ACG ACG ATG GAC CAC TT	scaffold_10:397039-397058	60	109	63	300	0.92
		Rv: GGG TCG GAC TGC TTC GAT AT	scaffold_10:396950-396969					
	<i>ccg-9</i>	Fw: GTC AGC CAC CCT GTG AAA AC	scaffold_3:1753499-1753518	60	84	65	300	1.03
		Rv: CAG CCA ATC TGT CGA TGC AG	scaffold_3:1753435-1753454					
Mannitol	<i>mtld</i>	Fw: CAT CAA CGC CAC CGA TAC AC	scaffold_5:597303-597322	60	97	63	300	0.92
		Rv: ACA TTG AGG CCG TTG TTT GG	scaffold_5:597185-597204					
	<i>m2dh</i>	Fw: GCA TTG TCT CGC TGA CCA TC	scaffold_3:2943327-2943346	60	128	63	300	1.00
		Rv: GGT GGT ACG GGG AGT CTT TT	scaffold_3:2943435-2943454					
Erythritol	<i>tktB</i>	Fw: GCC ACC CAT CGC AGT ATC TA	scaffold_14:515665-515684	60	126	63	700	0.96
		Rv: TGA TAG TCT CGA CCA TGG CG	scaffold_14:515559-515578					
	<i>tktA</i>	Fw: TGC CTT CCA GCA GAT TCA GT	scaffold_2:2845201-2845220	60	126	65	300	1.09
		Rv: CGT ATG GCC GTT TTC CCA TC	scaffold_2:2845095-2845114					
Glycerol	<i>gpd</i>	Fw: ACA GGC TCT ACC CTC TGA GT	scaffold_2:1570111-1570130	60	124	60	500	1.06
		Rv: GAG AGC GCC TCC CAA TGA TA	scaffold_2:1570215-1570234					
HOG	<i>hog1</i>	Fw: GTC TTT GCC CTT CCC ATT TTC	scaffold_1:1249970-1249990	60	150	60	500	0.92
		Rv: GAA TTC CGC CAT TTT GAC CG	scaffold_1:1249841-1249860					
	<i>hog2</i>	Fw: CAT GAA TAC CTC GCT CCG TAC	NA	60		63	500	0.96
		Rv: TCA TCT TCC AAG TAT GCA CCG	scaffold_1:4867322-4867342					

Tabla suplementaria 1.8.2. Valores de p del análisis estadístico realizado en los experimentos que se muestran en la Figura 1.5.1B. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis y Dunn, donde $p < 0,05$ es estadísticamente significativa.

<i>Solutes</i>	<i>Condition</i>	<i>P Value</i>		
		Day 5	Day 7	Day 11
<i>Trehalose</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	0.5172	0.0504	0.019
	No NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.5172	0.0504	0.5172
	0.5 M NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.019	>0.9999	0.5172
<i>Mannitol</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	0.5391	0.5172	0.5172
	No NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.5391	0.019	0.019
	0.5 M NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.0219	0.5172	0.5172
<i>Arabitol</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	0.5391	0.5172	0.5391
	No NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.5391	0.5172	0.5391
	0.5 M NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.0219	0.019	0.0219
<i>Erythritol</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	0.0219	0.5172	0.5172
	No NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.5391	0.5172	0.5172
	0.5 M NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.5391	0.019	0.019
<i>Glycerol</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	>0.9999	>0.9999	>0.9999
	No NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.3062	0.0504	0.0504
	0.5 M NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.0306	0.0504	0.0504

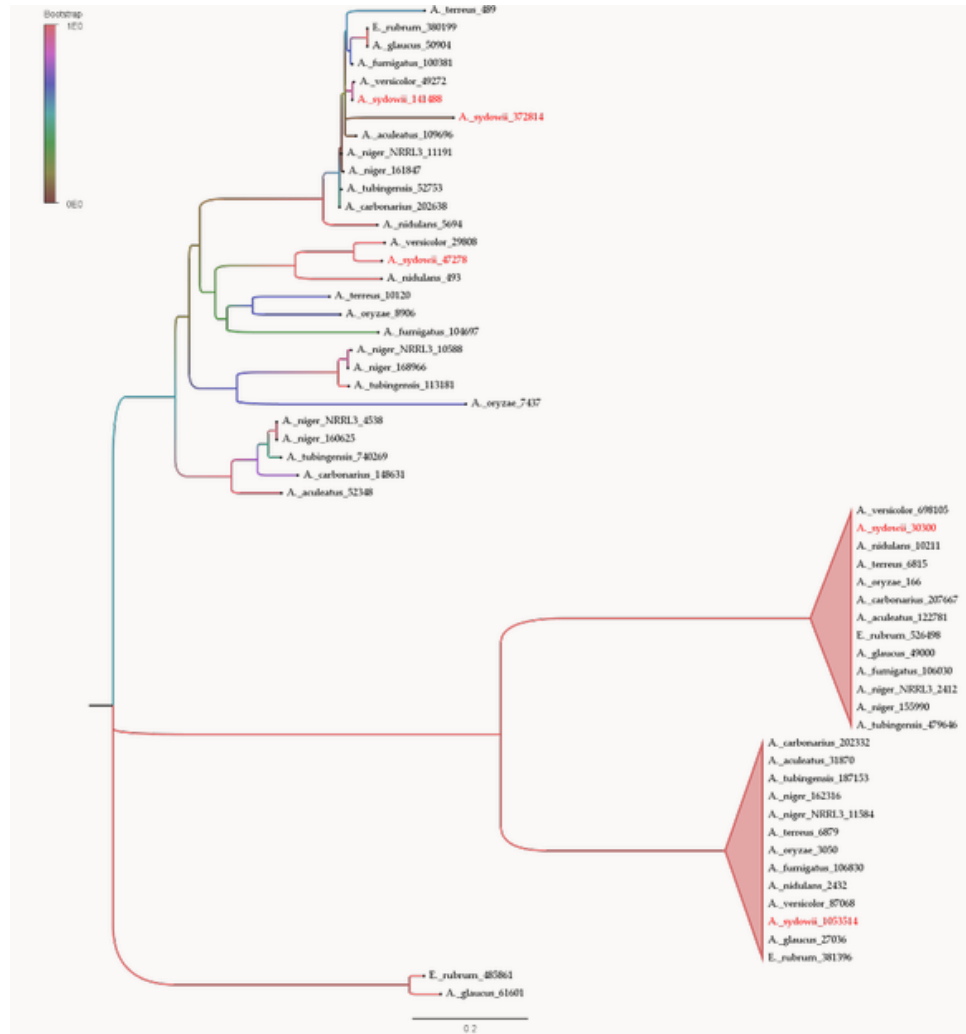


Figura suplementaria 1.8.3. Reconstrucción filogenética de los transcritos de MAPK en *Aspergilli* seleccionados, incluidos los genes *hog1*, *hog2* y *mpkC* de *A. sydowii*.

Tabla suplementaria 1.8.3. Valores de *p* obtenidos del análisis estadístico realizado en los experimentos que se muestran en la Figura 1.5.4.

<i>Solutes</i>	<i>Condition</i>	<i>P Value</i>					
		0.5 M NaCl- No NaCl	No NaCl- 0.5M NaCl	No NaCl- 2.0M NaCl	2.0M NaCl- No NaCl	2.0M NaCl- 0.5M NaCl	0.5 M NaCl- 2.0M NaCl
<i>Trehalose</i>	0 min vs. 10 min	0.9998	0.9484	<0.0001	<0.0001	0.6028	<0.0001
	0 min vs. 30 min	0.993	0.9929	<0.0001	<0.0001	0.3974	<0.0001
	0 min vs. 2 hrs	0.7194	0.417	<0.0001	<0.0001	0.2554	<0.0001
	0 min vs. 8 hrs	0.1675	0.6234	<0.0001	<0.0001	0.1114	<0.0001
	0 min vs. 24 hrs	<0.0001	0.397	<0.0001	<0.0001	0.237	<0.0001
	0 min vs. 48 hrs	0.9925	0.8485	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>Mannitol</i>	0 min vs. 10 min	0.9997	0.0045	<0.0001	0.0004	>0.9999	<0.0001
	0 min vs. 30 min	0.9996	<0.0001	<0.0001	<0.0001	>0.9999	<0.0001
	0 min vs. 2 hrs	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0021	>0.9999	<0.0001
	0 min vs. 8 hrs	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 24 hrs	0.0004	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 48 hrs	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	>0.9999	<0.0001
<i>Arabitol</i>	0 min vs. 10 min	0.7318	0.4791	<0.0001	<0.0001	>0.9999	<0.0001
	0 min vs. 30 min	0.9997	0.0148	<0.0001	0.47	>0.9999	<0.0001
	0 min vs. 2 hrs	<0.0001	<0.0001	<0.0001	>0.9999	>0.9999	<0.0001
	0 min vs. 8 hrs	0.0327	0.0052	<0.0001	0.0065	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 24 hrs	0.0857	0.8105	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 48 hrs	0.2647	<0.0001	<0.0001	<0.0001	>0.9999	<0.0001
<i>Erythritol</i>	0 min vs. 10 min	0.7	0.1093	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001
	0 min vs. 30 min	0.9997	0.0471	0.0354	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 2 hrs	0.9997	<0.0001	0.9979	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 8 hrs	<0.0001	0.0039	<0.0001	<0.0001	0.3936	<0.0001
	0 min vs. 24 hrs	0.0001	<0.0001	0.0149	0.0022	<0.0001	<0.0001

<i>Glycerol</i>	0 min vs. 48 hrs	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 10 min	>0.9999		>0.9999	<0.0001	<0.0001	>0.9999
	0 min vs. 30 min	>0.9999		>0.9999	<0.0001	<0.0001	>0.9999
	0 min vs. 2 hrs	>0.9999		>0.9999	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 8 hrs	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 24 hrs	0.0005		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 min vs. 48 hrs	0.0011		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

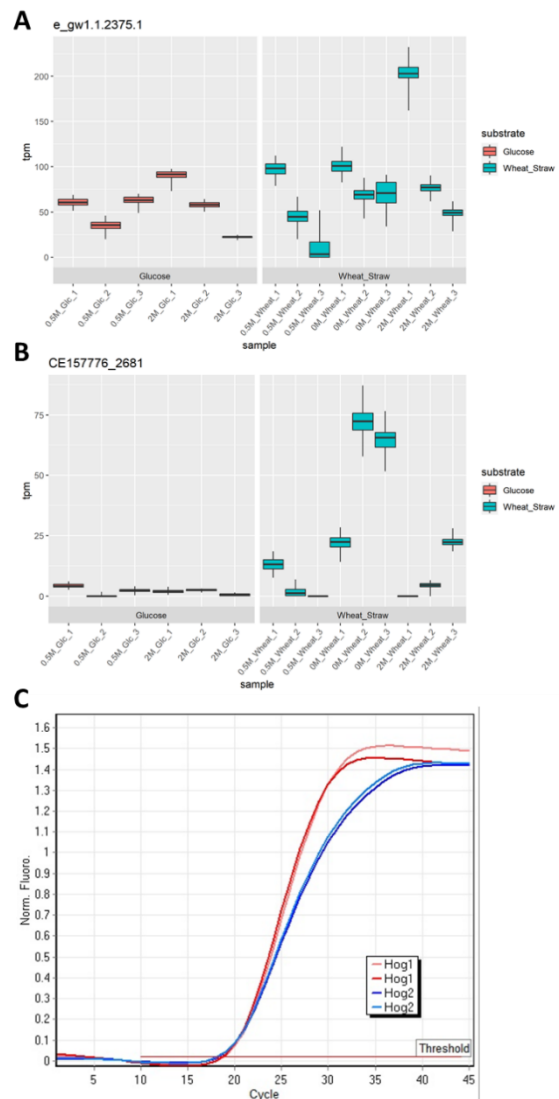


Figura suplementaria 1.8.4. Niveles de expresión de los genes *hog1* y *hog2*. Expresión de los genes *hog1* (A) y *hog2* (B) medidos por RNA-seq e indicados como transcritos por millón (tpm) en experimentos con glucosa o paja de trigo como fuentes de carbono. (C) Nivel de expresión relativo de Hog1 (rojo, Cq = 18.8) y Hog2 (azul, Cq = 18.3) medido por qPCR en una muestra con una mezcla de los ADNc de todas las condiciones analizadas (0 M, 0.5 M y 2.0 M NaCl).

Tabla suplementaria 1.8.4. Valores de *p* obtenidos en el análisis estadístico realizado en los experimentos que se muestran en la Figura 1.5.8.

<i>Oxidative markers</i>	<i>Condition</i>	<i>P value</i>		
		Day 5	Day 7	Day 11
<i>GSH</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	0.3008	0.9327	0.5803
	No NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.1212	0.484	0.1567
	0.5 M NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.0288	0.5106	0.0429
<i>SOD</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	0.7352	0.1955	0.0518
	No NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.0708	0.0108	0.189
	0.5 M NaCl vs. 2.0 M NaCl	0.0425	0.005	0.0186
<i>PAOP</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	NA	NA	NA
	No NaCl vs. 2.0 M NaCl	NA	NA	NA
	0.5 M NaCl vs. 2.0 M NaCl	NA	NA	NA
<i>MDA</i>	No NaCl vs. 0.5 M NaCl	0.9049	0.0587	0.4844

Tabla suplementaria 1.8.5. Valores de p obtenidos en el análisis estadístico realizado en los experimentos que se muestran en la Figura 1.5.9.

Condition	P value					
	GSH	SOD	PAOP	HPO	MDA	Lipid peroxidation
No NaCl >>> 0.5 M NaCl						
0 min. vs. 30 min.	0.9807	0.9638	>0.9999	0.9989	<0.0001	0.9763
0 min. vs. 2 hrs.	0.0061	0.1319	>0.9999	0.9989	0.0184	0.3731
0 min. vs. 8 hrs.	0.9261	0.0225	>0.9999	0.9989	0.1502	0.9763
0.5 M NaCl >>> No NaCl						
0 min. vs. 30 min.	0.7412	0.0002	>0.9999	0.998	<0.0001	0.9782
0 min. vs. 2 hrs.	0.9923	0.0026	0.9996	0.9859	0.9605	0.4957
0 min. vs. 8 hrs.	0.6404	0.0835	0.0005	0.3535	0.006	0.0373
No NaCl >>> 2.0 M NaCl						
0 min. vs. 30 min.	0.9649	0.0317	0.0003	0.8895	0.0002	0.4522
0 min. vs. 2 hrs.	0.9739	0.0349	<0.0001	0.9986	0.0042	0.9958
0 min. vs. 8 hrs.	0.8172	<0.0001	0.0012	>0.9999	0.9445	0.0898
2.0 M NaCl >>> No NaCl						
0 min. vs. 30 min.	0.035	0.2782	0.8622	<0.0001	<0.0001	0.4448
0 min. vs. 2 hrs.	0.9903	0.114	0.8622	0.0016	0.2527	0.0003
0 min. vs. 8 hrs.	<0.0001	0.0038	0.4226	0.032	>0.9999	0.9593
0.5 M NaCl >>> 2.0 M NaCl						
0 min. vs. 30 min.	>0.9999	0.9434	0.0128	<0.0001	<0.0001	0.0201
0 min. vs. 2 hrs.	0.9996	0.9993	0.0672	0.0015	<0.0001	0.8123
0 min. vs. 8 hrs.	0.9797	0.9991	0.1118	<0.0001	0.1462	0.0898
2.0 M NaCl >>> 0.5 M NaCl						
0 min. vs. 30 min.	0.0005	0.499	0.8519	<0.0001	<0.0001	0.9558
0 min. vs. 2 hrs.	0.5544	0.8543	0.5478	0.0002	0.9834	0.0021
0 min. vs. 8 hrs.	0.0016	0.0001	0.2454	0.8085	0.9626	0.9996

1.9. APÉNDICES

1.9.1. Metodología (Protocolos detallados)

1.9.1.1. Fosforilación de la proteína HOG mediante western blotting

Materiales:

- Membrana de PVDF (Difluoruro de polivinilideno), Millipore de 0.45 μM de tamaño de poro, No de catálogo: IPVH00010 o el IPVH08100.
- Papel de filtro Whatman de 3 mm.
- Perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro
- Equipo de transferencia Mini Trans-Blot de BioRad.
- Equipo de electroforesis

Reactivos

Buffer de corrida

Tris 0.025 M-----3.03 g

Glicina 0.192 M-----14.41 g

SDS 1%-----1 g

pH: 8.5 (No es necesario ajustarlo)

H₂O-----1L

Buffer de gel separador y concentrador (Grosor del gel 0.75 mm)

Reactivos	Gel separador	Gel concentrador
Acilamida	3.3 mL	433 μL
Tris 1.5 M pH 8.9	2.16 mL	-----
Tris 1.5 M pH 6.8	-----	566 μL
H ₂ O	4.3 mL	2.3 mL
SDS 10%	100 μL	33.3 μL
Persulfato de amonio 10%	25 μL	16.6 μL
TEMED	16.6 μL	10 μL

Blot (Buffer de transferencia)

Tris 25 mM-----3.0285 g
 Glicina 0.2M-----15.014 g
 Metanol 20 %-----200mL
 pH: 8.5 (No es necesario ajustarlo)
 H₂O-----1L

PBS 10X

NaCl 1.5 M-----43.83 g
 Na₂HPO₄ 100mM-----7.1 g
 Ajustar pH a 7.2 con NaH₂PO₄ 1 M
 H₂O-----500 mL

Buffer de Lisis SB 5X con DTT

Tris 1.5 M pH 6.8 ----- 1.66 mL
 DTT ----- 0.766 g
 SDS ----- 1 g
 Glicerol ----- 2 mL
 Azul de Bromofenol ----- 0.05 g
 H₂O ----- 10 mL

Buffer de Lisis 1X

Tris 1.5 M pH 6.8 -----1.5 mL
 Buffer de Lisis 5X-----1.0 mL
 H₂O -----2.5 MI

TCA (Tricloro acético) al 85 %

TCA ----- 8.5 g
 H₂O ----- 10 mL

PBS 1X + Tween 20_0.1 %

Agregar 227 µL de Tween 20 a 250mL de PBS 1X

Leche descremada al 7 % (Difco Skim Milk 232100) en PBS 1X

Procedimiento

- En un Matraz de 500 mL con 200 mL de medio MMG poner a cultivar al hongo, a partir de 10^6 esporas/mL.
- Incubar durante 7 días en agitación constante de 150 rpm a una temperatura de 28 °C.
- Pasado los 7 días proceder a dar el choque osmótico en las diferentes condiciones establecidas (sin NaCl a 0.5 M NaCl y viceversa; 0.5 M NaCl a 2.0 M NaCl y viceversa; Sin NaCl a 2.0 M NaCl y viceversa).
- Los matraces que serán utilizados para dar el choque osmótico, con el medio de cultivo se deben de poner 30 minutos antes en la incubadora, con el objetivo que de atemperarlos a 28 °C para luego dar el choque.
- Filtrar el micelio empleando coladores de células de 40 μ M de tamaño de poro.
- Pesar 1.5 g de micelio y pasarlo a los matraces de 250 mL con 50 mL de medio MMG con la salinidad establecida para dar el choque (Este paso se debe realizar lo más rápido posible)
- Incubar los matraces a 150 rpm a 28 °C, según el tiempo de incubación determinado (5, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos), además tomar el tiempo cero, colectar el micelio directamente del matraz incubado durante los 7 días.
- Mientras que transcurre el tiempo de incubación preparar tubos falcon de 50 mL con 2 mL de medio MMG con la salinidad (NaCl) que se dio el choque osmótico y 1 mL de TCA (Tricloroacético) al 85%.
- Pasado el tiempo de incubación filtrar el micelio en los coladores de células y pasarlo al tubo falcon con la mezcla (medio MMG + TCA 85%).
- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Transcurrido ese tiempo añadir 20 mL de agua desionizada para lavar el micelio y eliminar el TCA.
- Centrifugar durante 5 minutos, desechar el sobrenadante y añadir nuevamente 25 mL de agua desionizada, centrifugar nuevamente, este paso se debe repetir 4 veces en total.
- El micelio lavado, macerarlo en nitrógeno líquido y sin dejar que se descongele pesar 100 mg de micelio en un eppendorf de 1.5 mL.

- Al eppendorf con el micelio añadir 200 μ L de buffer de lisis, además añadir 0.3 g de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro.
- Se le da vortex durante 1 minuto y se descansa en hielo durante 1 minuto, repetir esta operación 4 veces en total.
- Luego se pone a calentar el eppendorf en un termo shaker a una temperatura de 95 °C durante 5 minutos, terminada la incubación ponerlo en hielo.
- Teniendo en cuenta que los eppendorf tienen perlas de vidrio, por lo que se hace necesario perforar el fondo del tubo con una aguja caliente y poner ese tubo dentro de otro vacío para recuperar el sobrenadante, que es donde se encuentran las proteínas y el buffer de lisis.
- Dar un toque de centrifuga a 13 000 rpm (Con esto es suficiente para recuperar el sobrenadante y las perlas queden atrapadas en el tubo).
- Preparar el gel de acrilamida al 10 % para cargar las muestras
- El gel se cargó con 20 μ L de cada muestra (proteínas) por cada pozo, como control cargar 3 μ L de *Saccharomyces cerevisiae* la cual se le dio un choque osmótico de 1 M de NaCl.
- Poner 5 μ L del marcador de peso molecular (MPM).
- Correr el gel a un voltaje de 100 V.
- Terminada la corrida lavar el gel poniéndolo en un bote con agua desionizada durante un minuto.
- Desechar el agua y añadir al gel buffer de transferencia durante 10 minutos en agitación moderada (55 rpm) a temperatura ambiente.
- La membrana a utilizar para la transferencia es de PVDF (tamaño de la membrana 9cm x 5.5 cm), esta hay que ponerla en un bote con metanol durante 1 minuto, luego pasarla a otro bote con agua desionizada durante 1 minuto y finalmente, dejarla en buffer de transferencia durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación moderada (40 rpm).
- Para realizar la transferencia, en una charola con buffer de transferencia, hacer primeramente un sándwich como se describe a continuación:
(-) cátodo 1- Tapa negra

2- Fibra

3- Papel de filtro

4- Gel

5- Membrana PVDF

6-Papel de filtro

7-Fibra

(+) ánodo 8- Tapa transparente

- Antes de cerrar el sándwich se debe sacar todas las burbujas formadas durante en el montaje del sándwich con un tuvo de vidrio.
- La parte transparente del sándwich se coloca hacia el lado rojo del cassette y la tapa negra va hacia el lado negro.
- Colocar el cassette en la cámara, poner un contenedor pequeño de hielo y una mosca, llenar la cámara con el buffer de transferencia hasta la primera línea de círculos (arriba) de las paredes del cassette.
- Toda la cámara de transferencia debe de estar en una charola llena de hielo.
- Poner la transferencia a 100 Voltios durante 90 minutos.
- Transcurrido el tiempo de transferencia, sacar la membrana y se le da 2 lavados rápidos con agua desionizada para retirar el metanol.
- Bloquear la membrana con leche descremada al 7 % con PBS 1X.
- Incubar durante 1 hora con agitación moderada (40 rpm)
- Pasado el tiempo de bloqueo, cortar la membrana dejando solamente donde se esperan las bandas de la proteína de interés.
- Introducir la membrana cortada en un falcon de 15 mL con 7 mL de leche descremada 7 % con PBS 1X más el anticuerpo primario (anticuerpo MAP quinasa anti-p38 fosforilado, No de catálogo: 4511) en una dilución 1: 1000.
- Como control de carga y además poder detectar la proteína total emplear el anticuerpo anti-Hog (No de catálogo: 9079) en una dilución 1: 1000.
- Incubar en un cuarto frío (4 °C) toda la noche con agitación moderada.
- Pasado el tiempo de incubación, realizar un lavado rápido a la membrana con PBS 1X adicionado con 0.1 % de Tween 20.
- Realizar 2 lavados más con esta solución durante 10 minutos cada uno, con agitación de 60 rpm.

- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo acoplada a HRP, No de catálogo: G21234) a una dilución de 1: 10.000.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Terminado el tiempo de incubación, lavar la membrana 2 veces con PBS 1X adicionado con 0.1 % de Tween 20, durante 10 minutos cada uno, con una agitación de 60 rpm.
- Dejar la membrana en aproximadamente 5 mL de PBS 1X, y revelarla.
- Para el revelado colocar 1 mL de sustrato (H₂O₂) y 1 mL de luminol en una caja oscura, colocar la membrana con unas pinzas y delarla 1 minuto de incubación.
- Finalmente, revelar.
- Como control positivo utilizar un extracto de proteína de *S. cerevisiae* cepa BY7472 en caldo YPD toda la noche, se colectaron las células y se les dio un choque osmótico de NaCl 1.0 M durante 10 min y se trataron como se describió anteriormente para el micelio fúngico (Velázquez-Zavala et al. 2015; Sánchez et al. 2020).

1.9.1.2. Cuantificación de los cationes intracelulares Na⁺ y K⁺

Materiales y Equipos

Matraces de 500 mL

Matraces de 250 mL

Coladores de células (40 µM de tamaño de poro)

Homogeneizador de tejidos con vástago de teflón

Tubos de vidrio de 10 mL

Canicas

Taladro

Baño de María

Procedimiento

- Inocular 10⁶ esporas de *Aspergillus sydowii* en matraces de 250 mL con 50 mL de medio MMG suplementado con 2 % de glucosa a diferentes concentraciones

de NaCl (0 M, 0.5 M y 2.0 M).

- Se incubó a una temperatura de 28 °C con una agitación constante de 150 rpm en distintos días (5, 7 y 11), para el caso de la condición constante de NaCl.
- Para el caso de la condición de choque osmótico, el hongo hay que cultivarlo en matraces de 500 mL con 250 mL de medio MMG suplementado con 2 % de glucosa a diferentes concentraciones de NaCl (0 M, 0.5 M y 2.0 M).
- Incubar durante 7 días a 28 °C a una agitación de 150 rpm.
- A los 7 días dar el choque osmótico, se requiere de matraces de 250 mL con 50 mL de medio MMG con la salinidad requerida para el choque.
- Colectar el micelio de los matraces de 500 mL en coladores de células (40 µM de tamaño de poro) y pasar 1 g de micelio a cada matraz de 250 mL
- Las muestras se procesaron de la siguiente manera para los dos casos tanto para la condición de concentración constante como para la del choque osmótico:
- Pesar 300 mg del micelio húmedo.
- Secar el micelio al vacío, utilizando filtros Millipore Whatman de tamaño de poro 0.45 µm en un equipo Millipore Multifilter
- Realizar dos lavados al micelio en el mismo equipo de filtración y finalmente dejar totalmente seco el micelio.
- Pasar la biomasa a un homogeneizador de tejido
- Añadir 5 mL de agua MilliQ y homogeneizar con un vástago de teflón durante 2 minutos aproximadamente.
- Luego pasar el homogeneizado a un tubo falcón de 15 mL y añadir al homogeneizador 5 mL más de agua MilliQ enjuagándolo y agregándose al tubo falcón, obteniéndose un volumen final de 10 mL.
- De este volumen, se toman 5 mL y se pasan a tubos de vidrio de 10 mL de capacidad
- Ponerlos a calentar en baño María a punto de ebullición durante 20 minutos con una canica en la boca del tubo para evitar que se evapore el líquido.
- Pasado este tiempo poner los tubos en hielo hasta que estén totalmente fríos
- Centrifugar durante 5 minutos a 1625 g.
- Colectar el sobrenadante en un tubo nuevo y finalmente cuantificar el Na⁺ y el K⁺

en un Fotómetro de llamas (Carls Zeiss PF5 371777).

- Para la cuantificación se utilizan estándares de NaCl 1 mM y KCl 1 mM los cuales correspondieron a 100 UA (unidades arbitrarias).

1.9.1.3. Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo

Procedimiento de preparación de la muestra

- Para cultivar al hongo *Aspergillus sydowii*, poner en matraces de 500 mL, 200 mL de medio MMG a diferentes concentraciones de NaCl (0 M, 0.5 M y 2.0 M) a partir de 10^6 esporas/mL.
- Incubar a una temperatura de 28 °C, con una agitación constante de 150 rpm durante 7 días.
- Pasado los 7 días se procede a dar el choque osmótico en las diferentes condiciones establecidas (sin NaCl a 0.5 M NaCl y viceversa; 0.5 M NaCl a 2.0 M NaCl y viceversa; Sin NaCl a 2.0 M NaCl y viceversa).
- Colectar el micelio en un colador de células (40 μ m de tamaño del poro).
- Pesando 1.5 g de micelio y pasarlo a los matraces de 250 mL con 50 mL de medio MMG con la salinidad establecida para dar el choque (Este paso se debe realizar lo más rápido posible). Los matraces con el medio de cultivo que serán utilizados para el choque osmótico, se atemperan por 30 a 28 °C.
- Incubar los matraces a 150 rpm a 28 °C, según el tiempo de incubación determinado (30 minutos, 2 y 8 horas), además se toma el tiempo cero, este se toma directamente del matraz incubado durante los 7 días.
- Macerar el micelio con nitrógeno líquido utilizando mortero, y sin dejar que se descongele pesar 100 mg de micelio en un eppendorf de 1.5 mL.
- Añadir 200 μ l de tampón de lisis (Tris 0.3 M pH 6.8, SDS 2 % y glicerol 4 %), además de añadir 0.3 g de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro.
- Agitar las muestras con vórtex 4 veces en lapsos de 1 minuto y se dejar reposar durante un minuto en hielo.
- Recuperar el sobrenadante por centrifugación y se almacenar a -80 °C hasta el análisis.
- Con este procedimiento se pueden analizar la cuantificación de los

marcadores de estrés oxidativos tanto para cultivos en condiciones constantes de salinidad como para cultivos que estén sometidos a estrés osmótico.

- A la muestra obtenida se les puede realizar los análisis tanto de los biomarcadores antioxidantes (determinación de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa y la determinación de glutatión reducido) como el de los biomarcadores pro-oxidantes (determinación de Hidroperóxidos Orgánicos, determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas, determinación de malonildialdehído y 4-hidroialquenes y determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica o Potencial de Peroxidación).

1.9.1.3.1. Determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD) por el método del Pirogallol.

Materiales

Lector de ELISA

Material biológico: Muestra biológica fúngica

Reactivos :

Cantidades para 100 determinaciones aproximadamente

Pirogallol-----4.7 mg

EDTA-----112 mg

Tris-----2 g

HCl 32 %----- 2 mL

Preparación de los reactivos:

Preparación de la solución de Pirogallol 7.37 mM:

1. Pesar 9.3 mg
2. Disolver en 10 mL de agua destilada
3. Conservar en un frasco ámbar en refrigeración hasta una semana después de su preparación (proteger de la luz).

Preparación de la solución de EDTA 60 mM:

1. Pesar 223.3 mg de EDTA
2. Disolver en 10 mL de agua destilada
3. Conservar en refrigeración hasta un mes después de su preparación

Preparación de la solución amortiguadora Tris - HCl pH 8.20 (50 mM).

Soluciones Stock:

A: Solución 0.2 M Tris (1.21 g de Tris en 50 mL de agua destilada).

B: Solución 0.2 M HCl (1.05 mL de HCl 37% $\rho = 1.19$ en 100 mL de agua destilada)

Mezclar 50 mL de **A** con 21.9 mL de **B**, diluir a un total de 200 mL con agua destilada, ajustar pH 8.20.

Procedimiento

- Primeramente realizar el Ensayo blanco, de la reacción no inhibida (se debe verificar que la reacción no inhibida de la DO adecuada cada vez que se prepare pirogallol, antes de cuantificar las muestras):
- Preparar la siguiente mezcla por condición de prueba del Pirogallol :

Tris-HCL (0.2 M) ----- 253 μ L

EDTA (1mM) ----- 5 μ L

- Añadir a la mezcla 32 μ L de la solución de Pirogallol (0.79 mM)
- Incubar por 10 segundos
- Medir a partir de este momento la diferencia de densidades ópticas en un minuto a 420nm.
- Repita el procedimiento al menos tres veces
- El valor resultante debe ser $\Delta DO = 0.020 \pm 0.001$. Este valor se tomará como ΔDO del blanco y representa la diferencia de densidades ópticas para la reacción no inhibida.

Procedimiento para la determinación en las muestras biológicas

- Mezclar en una placa de 96 pozos:

Tris - HCl (pH 8.20) -----	253 μ L
EDTA-----	5 μ L
Solución de Pirogallol-----	32 μ L
Muestra biológica -----	10 μ L

- Incubar la reacción durante 10 segundos.
- Medir en un lector de placas ELISA la de densidad óptica (D.O.) durante un minuto a 420 nm y calcular la diferencia de D.O.

Cálculos

- La actividad enzimática se calcula mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$$\left[\frac{(VM \Delta DO_m * 100)}{VM \Delta DO_b} - 100 \right] * 0.6$$

Donde:

ΔDO m: Diferencia de DO de la muestra.

ΔDO b: Diferencia de DO del blanco.

VM: valor medio

1.9.1.3.2. Determinación de glutatión reducido

Reactivos

DTNB -----	19.8 mg
Acetona -----	5 mL
Solución amortiguadora fosfato (PB) pH 8.00 50 mM -----	300 mL

Procedimiento

- Realizar primeramente una curva de patrón como referencia del ensayo:
- Pesar 18 mg de GSH (P.M.= 307.33 g/mol)
- Disolver en 50 mL de PBS 1X
- Preparar las mezclas que se indican en la tabla siguiente para obtener las

concentraciones requeridas.

Curva Patrón de GSH

μl de solución de GSH	μl de PBS	Concentración final ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
100	900	360
200	800	720
300	700	1080
400	600	1440
500	500	1800
600	400	2160
700	300	2520
800	200	2880
900	100	3240

- Preparar la reacción como se detalla más adelante.
- Para determinar la actividad de GSH de las muestras, se requiere preparar las siguientes soluciones:

Solución A:

PBS 10X

NaCl 1.5 M-----43.83 g

Na₂HPO₄ 100mM-----7.1 g

Ajustar pH a 7.2 con NaH₂PO₄ 1 M

H₂O-----500 mL

PBS 1X

PBS 10X----- 10 mL

H₂O-----90 mL

Solución B: DTNB en acetona

- DTNB ----- 19.8 mg
- Disolver en acetona 5 mL
- Guardar en un recipiente firmemente tapado en el refrigerador

Solución C: Solución amortiguadora fosfato (PB) de pH: 8.00, 50 mM, consta de dos soluciones:

Solución C1: NaH₂PO₄ ----- 278 mg

H₂O ----- 10 mL

Solución C2: Na₂HPO₄ x 7H₂O -----5.36 g ó Na₂HPO₄ x 12H₂O ----- 7.17 g
 H₂O -----100 mL

- Mezclar 5.3 mL de la solución C1 con 94.7 mL de la solución C2
- Enrasar con H₂O hasta 200 mL
- Ajustar el pH a 8.00

Para preparar la reacción:

- Preparar la siguiente mezcla por muestra y multiplicar por el total de muestras +1 (n+1)

PB pH 8-----290µL

Muestra/ Solución de curva patrón-----5µL

DTNB en acetona----- 5µL

- En la placa de 96 pozos poner los 300 µL totales de la reacción

Poner los controles blancos:

- En la reacción el volumen correspondiente a la muestra se va a sustituir por la solución amortiguadora de fosfato (PB) pH:8, 50 mM

Para la curva patrón:

- Sustituir el volumen de muestra por soluciones de referencia (las preparadas anteriormente según la tabla).
- Adicionar 5µL de DTNB en acetona
- Agitar aproximadamente 40 segundos
- Medir en el lector de placas ELISA la D.O. a una absorbancia de 412 nm
- Con las densidades ópticas y la concentración calcular la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de correlación.

Cálculos

- Calcular interpolando la D.O. en la curva patrón correspondiente.

1.9.1.3.3. Determinación de Hidroperóxidos Orgánicos (HPO)

Reactivos:

Xylenol orange -----9.5 mg para 100 determinaciones.

Sorbitol 70 %-----260µL para 100 determinaciones.

Ácido Sulfúrico 96 % -----96mL para 1 000 determinaciones.

Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂ X 6H₂O -----98.03mg para 1000 determinaciones.

Peróxido de hidrógeno 30 %, -----285µL para cada serie de ensayos

Preparación de soluciones

(Las soluciones se mantienen estables por 7 días a temperatura de refrigeración, protegidas de la luz)

Solución A:

- Pesar 0.1961 g de Fe(NH₄)₂ (SO₄)₂ X 6H₂O
- Disolver en 10 mL de agua desionizada
- Añadir 1.96 mL de Ácido Sulfúrico 96 %:
- Llevar a un volumen final de 10mL en matraz aforado/ agregar 10ml de Ácido sulfúrico 7.67 N. Reactivo estable por un mes a temperatura de refrigeración. (Proteger de la luz)

Solución B (4X):

- Pesar 0.0190 g de Xylenol (2X)
- Agregar 520 µL de Sorbitol 70%
- Agregar agua desionizada y enrasar a 50 mL en tubo de 50 mL. (2X)
Este reactivo es estable por un mes a temperatura de refrigeración. (Proteger de la luz).

Solución de trabajo:

- Diluir la **solución B (4X)** (2.5 mL stock) en 7.5 mL agua desionizada para preparar Solución B (1X)
- Mezclar 1 volumen de **Solución A** con 100 volúmenes de **Solución B (1X)** y almacenar esta mezcla entre 2-8 °C, bajo estas condiciones el reactivo se mantiene estable por 12 horas.

Preparación de la curva patrón:

- Añadir 142.5 µL de Peróxido de hidrógeno 30 % a un volumen de 50 mL de agua desionizada

- Ajustar la densidad óptica de esta solución a 1.09 a una longitud de onda $\lambda=240$ nm (Solución de referencia 25 mM de H₂O₂).
- Utilice cubetas de cuarzo para este ajuste.
- Diluir la solución anterior según la Tabla, para obtener las soluciones patrones correspondientes

Solución patrón	mL de solución de	Completar con H ₂ O
1(200)	2	250
2(100)*	1	250
3(50)	0.5	250

*Patrón más comúnmente empleado

Procedimiento

- Preparar 200 μ l de la **Solución de trabajo** por cada muestra, incluyendo los puntos de la curva patrón.
- Agregar a 20 μ L de la muestra a analizar en cada pozo.
- Incubar por 25-30 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar la lectura en el lector de placas de ELISA
- Dispensar 200 μ L de la muestra por triplicado en los pozos de la placa, proceder a la lectura a una longitud de onda de 560 nm.
- Incluir lectura de aire, reactivo blanco y patrones.

Cálculos

Hacer una curva patrón tomando en cuenta las concentraciones de los patrones utilizados y sus respectivas densidades ópticas. Interpolar en dicha curva los valores de absorbancia de la muestra para obtener el valor de la concentración.

1.9.1.3.4. Determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas (PAOP)

Reactivos:

Yoduro de potasio -----1.92 g para 200 determinaciones.

Cloramina T-----22.76 mg cada vez que se haga el ensayo.
NaH₂PO₄•H₂O-----3.19 mg para 100 determinaciones.
Na₂HPO₄ -----2.84 mg para 100 determinaciones.
Ácido Acético glacial -----100 UL por muestra.

Preparación de soluciones

(Las soluciones se mantienen estables por 7 días a temperatura de refrigeración)

Solución amortiguadora fosfato salina (PBS) 10 mM pH: 7.4

Solución A 2x:

- Pesar 3.19 mg de NaH₂PO₄•H₂O
- Disolver en 50mL de agua destilada

Solución B 2x:

- Pesar 2.84 mg de Na₂HPO₄
- Disolver en 50 mL de agua destilada

Solución de trabajo

- Mezclar 2.375 mL de **Solución A 2x** con 10.125 mL de **Solución B 2x**
- Enrasar a 50 mL con agua destilada (solución madre, se guarda).
- Tomar 10 mL de esta solución y enrasar con agua destilada hasta 50 mL (esta última solución es la que se utiliza para el ensayo y se tiene que preparar en el momento de realizar el ensayo).

Solución de referencia de Cloramina T:

- Pesar 22.76 mg de cloramina T
- Disolver en 50 mL de agua destilada (**Stock 2 µM**).
- De la solución **Stock 2 µM** tomar 22.5 mL y enrasar a 50 mL con agua destilada (**Stock 100 nM**) (esta última solución es la que se utiliza para el ensayo).

Solución de Yoduro de potasio:

- Pesar 1.92 g de KI
- Disolver en 10 mL de agua destilada

Procedimiento

- Preparar la curva de solución de referencia de Cloramina T con solución de PB.

Curva de Cloramina T

μL de solución patrón	μl de solución PB	C final(x) nM
0	30	0
1.625	28.375	6.25
3.25	26.75	12.5
7.5	12.5	25
15	15	50
30	0	100

- Preparar la siguiente mezcla por cada muestra incluyendo la curva patrón:
 - Solución PB-----90 μl
 - Solución de KI-----.5 μl
 - Ácido acético glacial-----10 μl
- En la placa de 96 pozos poner 10 μL de solución patrón ó muestra por pozo
- Añadir a las muestras en el pozo la mezcla anteriormente preparada
- Leer la D.O. en el lector de placa ELISA inmediatamente a 340 nm

Cálculos

Hacer una curva de regresión lineal con los valores de concentración de los patrones de Cloramina y los valores de densidad óptica correspondientes. Calcular la concentración de PAOP interpolando los valores de D.O. de las muestras. Auxiliarse de un programa estadístico u otro que permita el análisis de correlación real. Para hacer los cálculos es necesario un coeficiente de correlación mayor de 0.95 (si no es así, repetir el ensayo completo: muestras y curva patrón). Si ha diluido la muestra para el ensayo tome en cuenta la dilución en los cálculos.

Los valores se expresan en μM de Cloramina T

1.9.1.3.5. Determinación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetaldehídos (4-HDA)

Reactivos:

N-metil-2 fenil-indol (M1164)

Ácido metanosulfónico al 99 % (M6391)

HCl al 35 %

Metanol

Acetonitrilo (M3396)

1.1.3.3 tetrametoxipropano (T1642)

Preparación de las soluciones

Solución I: N-metil-2 fenil-indol en acetonitrilo (10.3 mM)

- Pesar 38 g de N-metil-2fenil-indol
- Disolver en 18 mL de acetonitrilo
- Añadir 6 mL de metanol para enrasar un volumen de 24 mL (**Solución I diluida**)

Solución II: estándar de 1.1.3.3 tetrametoxipropano (Patrón de MDA 10 mM)

- Adicionar 16,5 μ l del Patrón de MDA (densidad 0.997g/ml) en 10ml de agua destilada o en solución amortiguadora donde están disueltas las muestras.

Preparación de curva de calibración de MDA

- Diluir 500 μ L de la Solución II en 50 mL de agua destilada o en solución amortiguadora. (**Solución II diluida**)

Solución II Cfinal (μ M)	Solución I diluida (μ l)	Solución II diluida (μ l)	H ₂ O destilada
0	650	0	200
2.5	650	25	175
5	650	50	150
10	650	100	100

15	650	150	50
20	650	200	0

- Agitar en Vortex
- Adicional 150 μ l de ácido metanosulfónico o HCl 35 %
- Incubar 45 °C durante 1 hora
- Enfriar a temperatura ambiente
- Leer absorbancia a 586 nm con agua destilada

Procedimiento (para la determinación de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxiálquenos (4-HDA))

- Adicionar a un tubo 650 μ L de la solución I diluída
- Adicionar 200 μ L de muestra ó agua destilada en caso del blanco
- Dar vortex 3 ó 4 segundos
- Para la determinación de MDA adicionar 150 μ L de ácido metanosulfónico al 99%.
- Para la determinación de 4-hidroxiálquenos (4-HDA), adicionar 150 μ L de ácido clorhídrico al 35 %
- Mezclar vigorosamente
- Incubar en baño maría a 45 °C durante 40 minutos
- Terminado ese tiempo, enfriar a temperatura ambiente 15 minutos
- Centrifugar durante 15 minutos a 3000 rpm
- Leer en el lector de placas ELISA la absorbancia a 586 nm contra el reactivo blanco

1.9.1.3.6. Determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica

Material biológico:

- 200 μ L de muestra biológica, si el estudio incluye solo determinaciones de MDA.

- 600 μL de muestra biológica, si el estudio incluye determinaciones de Malonildialdehído (MDA) y Dienos Conjugado (DC).

Reactivos:

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ----- 24.94 mg (para mediciones solo de MDA)

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -----64.87 mg (para mediciones de MDA y DC)

Preparación de los reactivos:

Preparación de la Solución de CuSO_4 :

▪ Pesar:

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ----- 24.94 mg (para mediciones solo de MDA)

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -----64.87 mg (para mediciones de MDA y DC)

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -----249. 4 mg (Solución concentrada, para el método de placa)

- Disolver en 10 mL de agua destilada

Procedimiento

- Tomar 200 μL (mediciones de MDA) ó 600 μL (si va a medir MDA y DC) de muestra biológica
- Añadir 50 μL de la solución de CuSO_4 que corresponda
(Para el método de placa de 96 pozos: 200 μL de muestra biológica y 5 μL de la solución de CuSO_4 correspondiente)
- Tomar 100 μL para la determinación de MDA o 200 μL para determinar DC. Esta medición se considerará a tiempo cero
- Incubar la muestra remanente a 37 °C por 24 horas
- Repetir las determinaciones de MDA y/o DC

Cálculos

Restar para cada muestra el valor de la determinación correspondiente a las 24 horas con la correspondiente a las 0 horas.

1.10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, L.; Blomberg, A.; Nilsson, A. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* 1985, 162, 300–306.
- Adler, L.; Pedersen, A.; Tunblad-Johansson, I. Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. *Physiol. Plant.* 1982, 56, 139–142.
- Aguilar-Pontes, M. V.; Brandl, J.; McDonnell, E.; Strasser, K.; Nguyen, T.T.M.; Riley, R.; Mondo, S.; Salamov, A.; Nybo, J.L.; Vesth, T.C.; et al. The gold-standard genome of *Aspergillus niger* NRRL 3 enables a detailed view of the diversity of sugar catabolism in fungi. *Stud. Mycol.* 2018, 91, 61–78.
- Aguirre, J.; Ríos-Momberg, M.; Hewitt, D.; Hansberg, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 2005, 13, 111–118.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M., & Prior, B. A. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology*, 14(6), 4135-4144.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M., & Prior, B. A. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology*, 14(6), 4135-4144.
- Alepuz, P. M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., & Posas, F. (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *The EMBO journal*, 22(10), 2433-2442.
- Alepuz, P. M., Jovanovic, A., Reiser, V., & Ammerer, G. (2001). Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Molecular cell*, 7(4), 767-777.
- Al-Hussein, A.; Gieseler, H. The effect of mannitol crystallization in mannitol-sucrose systems on LDH stability during freeze-drying. *J. Pharm. Sci.* 2012, 101, 2534–2544.
- André, L., Hemming, A., & Adler, L. (1991). Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS letters*, 286(1-2), 13-17.
- Antoniou, C.; Savvides, A.; Christou, A.; Fotopoulos, V. Unravelling chemical priming machinery in plants: the role of reactive oxygen–nitrogen–sulfur species in abiotic stress tolerance enhancement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016, 33, 101–107.
- Argüelles, J. C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of microbiology*, 174(4), 217-224.
- Argüelles, J.C. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: A comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 2000, 174, 217–224.

- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 95-120.
- Auesukaree, C. (2017). Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(2), 133-142.
- Bainier, G., and Sartory, A. (1913). Étude d'une espèce nouvelle de Sterigmatocystis, Sterigmatocystis sydowi (n.sp.). *Ann. Mycol.* 11, 25–29.
- Batista-García, R.A.; Balcázar-López, E.; Miranda-Miranda, E.; Sánchez-Reyes, A.; Cuervo-Soto, L.; Aceves-Zamudio, D.; Atriztán-Hernández, K.; Morales-Herrera, C.; Rodríguez-Hernández, R.; Folch-Mallol, J (2014). Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS One*, 9(8), 1–12.
- Beese-Sims, S. E., Lee, J., & Levin, D. E. (2011). Yeast Fps1 glycerol facilitator functions as a homotetramer. *Yeast*, 28(12), 815-819.
- Beever, R.E.; Laracy, E.P. (1986). Osmotic Adjustment in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 168, 1358–1365.
- Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., & Herrero, E. (2001). Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 39(4), 1022-1035.
- Benito, B.; Garcíadeblas, B.; Perez-Martin, J.; Rodriguez-Navarro, A. (2009). Growth at High pH and Sodium and Potassium Tolerance in Media above the Cytoplasmic pH Depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell*, 8, 821–829.
- Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F. L., ... & Rodríguez-Valera, F. (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 349-360.
- Bernard, E. M., Christiansen, K. J., Tsang, S. F., Kiehn, T. E., & Armstrong, D. (1981). Rate of arabinitol production by pathogenic yeast species. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(2), 189-194.
- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., & Sunnerhagen, P. (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Molecular microbiology*, 53(6), 1743-1756.
- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., & Sunnerhagen, P. (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Molecular microbiology*, 53(6), 1743-1756.
- Bilsland-Marchesan, E., Ariño, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., & Posas, F. (2000). Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Molecular and cellular biology*, 20(11), 3887-3895.

- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Blomberg, A. (2000). Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: Questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 1–8.
- Blomberg, A. N. D. E. R. S., & Adler, L. E. N. N. A. R. T. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 171(2), 1087-1092.
- Blomberg, A., & Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in microbial physiology*, 33, 145-212.
- Bohle, K., Jungebloud, A., Göcke, Y., Dalpiaz, A., Cordes, C., Horn, H., & Hempel, D. C. (2007). Selection of reference genes for normalisation of specific gene quantification data of *Aspergillus niger*. *Journal of biotechnology*, 132(4), 353-358.
- Bohle, K.; Jungebloud, A.; Dalpiaz, A. (2007). Selection of reference genes for normalisation of specific gene quantification data of *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol.* 132, 353–358.
- Borgia, P.T.; Miao, Y.; Dodge, C.L. (1996). The *orfA* gene from *Aspergillus nidulans* encodes a trehalose-6-phosphate phosphatase necessary for normal growth and chitin synthesis at elevated temperatures. *Mol. Microbiol.* 20, 1287–1296.
- Bose, J.; Rodrigo-Moreno, A.; Shabala, S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 2014, 65, 1241–1257.
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological reviews*, 40(4), 803-846.
- Brown, A. D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in microbial physiology*, 17, 181-242.
- Brown, A.D.; Mackenzie, K.F.; Singh, K.K. (1986). Selected aspects of microbial osmoregulation. *FEMS Microbiol. Lett.* 39, 31–36.
- Brown, A.D.; Simpson, J.R. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* 72, 589–591.
- Brown, M. B., & Forsythe, A. B. (1974). Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*, 69(346), 364-367.
- Brown, M.B.; Forsythe, A.B. (1974). Robust tests for the equality of variances. *J. Am. Stat. Assoc.* 69, 364–367.
- Bu, C., Zhang, Q., Zeng, J., Cao, X., Hao, Z., Qiao, D., ... & Xu, H. (2020). Identification of a novel anthocyanin synthesis pathway in the fungus *Aspergillus sydowii* H-1. *BMC genomics*, 21(1), 1-16.
- Burg, M.B.; Ferraris, J.D. (2008). Intracellular organic osmolytes: Function and regulation. *J. Biol. Chem.* 283, 7309–7313.
- Burns, D. G., Camakarlis, H. M., Janssen, P. H., & Dyall-Smith, M. L. (2004). Cultivation of *Walsby's square haloarchaeon*. *FEMS microbiology letters*, 238(2), 469-473.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V. J., ... & Pedrós-Alió,

- C. (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 338-348.
- Charles Thom MBC. (1926). The Aspergilli. In: Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins. p. 147
- Chirife, J.; Favetto, G.; Fontán, C.F. (1984). Microbial growth at reduced water activities: some physicochemical properties of compatible solutes. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 259–268.
- Cira-Chávez, L. A., Guevara-Luna, J., Soto-Padilla, M. Y., Román-Ponce, B., Vásquez-Murrieta, M. S., & Estrada-Alvarado, M. I. (2018). Kinetics of halophilic enzymes. In *Kinetics of Enzymatic Synthesis*. IntechOpen.
- Clotet, J., & Posas, F. (2007). Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods in enzymology*, 428, 63-76.
- Clotet, J., Escote, X., Adrover, M. À., Yaakov, G., Garí, E., Aldea, M., ... & Posas, F. (2006). Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *The EMBO journal*, 25(11), 2338-2346.
- Corina, D. L., & Munday, K. A. (1971). Studies on polyol function in *Aspergillus clavatus*: a role for mannitol and ribitol. *Microbiology*, 69(2), 221-227.
- Cyert, M. S., & Philpott, C. C. (2013). Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(3), 677-713.
- Da Costa, M. S., Santos, H., & Galinski, E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Biotechnology of extremophiles*, 117-153.
- Dakal, T. C., Solieri, L., & Giudici, P. (2014). Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *International journal of food microbiology*, 185, 140-157.
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Current opinion in microbiology*, 25, 120-126.
- de Lima Alves, F.; Stevenson, A.; Baxter, E.; Gillion, J.L.M.; Hejazi, F.; Hayes, S.; Morrison, I.E.G.; Prior, B.A.; McGenity, T.J.; Rangel, D.E.N.; et al. (2015). Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Curr. Genet.* 61.
- de Nadal, E., & Posas, F. (2007). Regulation of gene expression in response to osmostress by the yeast stress-activated protein kinase Hog1. In *Stress-Activated Protein Kinases* (pp. 81-97). Springer, Berlin, Heidelberg.
- De Nadal, E., & Posas, F. (2010). Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *The EMBO journal*, 29(1), 4-13.
- de Nadal, E., Alepuz, P. M., & Posas, F. (2002). Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO reports*, 3(8), 735-740.
- De Nadal, E., Ammerer, G., & Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 833-845.

- De Paris, L. D., Scheufele, F. B., Júnior, A. T., Guerreiro, T. L., & Hasan, S. D. M. (2010). Estudo do crescimento de *A. asiellus* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. *Estudos Tecnológicos Em Engenharia*, 6(1), 22-35.
- De Vries, R.P.; Flitter, S.J.; Van De Vondervoort, P.J.I.; Chaverroche, M.K.; Fontaine, T.; Fillinger, S.; Ruijter, G.J.G.; D'Enfert, C.; Visser, J. (2003). Glycerol dehydrogenase, encoded by *gldB* is essential for osmotolerance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 49, 131–141.
- Diano, A., Bekker-Jensen, S., Dynesen, J., & Nielsen, J. (2006). Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnology and bioengineering*, 94(5), 899-908.
- Diano, A.; Bekker-Jensen, S.; Dynesen, J.; Nielsen, J. (2006). Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: Influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 899–908.
- Dihazi, H., Kessler, R., & Eschrich, K. (2004). High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23961-23968.
- Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11(1), 1-42.
- Duran, R., Cary, J. W., & Calvo, A. M. (2010). Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins*, 2(4), 367-381.
- Ecobichon, D. J. (1984). Glutathione depletion and resynthesis in laboratory animals. *Drug and chemical toxicology*, 7(4), 345-355.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Elbein, A. D. (1974). The metabolism of α , α -trehalose. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 30, 227-256.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., & Magalhães, R. (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Current genetics*, 61(3), 263-274.
- Erdelmeier, I., Gérard-Monnier, D., Yadan, J. C., & Chaudiere, J. (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.
- Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J., & Posas, F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature cell biology*, 6(10), 997-1002.
- Farmer, E.E.; Mueller, M.J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 429–450.

- Farrugia, G.; Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front. Oncol.* 2 JUN, 1–21.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., ... & Brandt, A. (2005). A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 2068-2076.
- Fillinger, S., Chaverroche, M. K., Van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., & d'Enfert, C. (2001). Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*The GenBank accession number for the sequence reported in this paper is AF043230. *Microbiology*, 147(7), 1851-1862.
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de microbiología*, 46(1-2), 24-46.
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., & Abe, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Molecular microbiology*, 56(5), 1246-1261.
- Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Advances in microbial physiology*, 37, 273-328.
- Galinski, E. A., & Herzog, R. M. (1990). The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Archives of Microbiology*, 153(6), 607-613.
- Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S. D., Van Nocker, S., & Loescher, W. (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiology*, 131(4), 1566-1575.
- Garrido-Bazán, V.; Jaimes-Arroyo, R.; Sánchez, O.; Lara-Rojas, F.; Aguirre, J. (2018). SakA and MpkC Stress maps show opposite and common functions during Stress responses and development in *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* 9, 1–12.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... & Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), 4241-4257.
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS microbiology reviews*, 31(5), 535-569.
- Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology*, 42(4), 223-225.
- Gonzalez, N.A.; Vázquez, A.; Ortiz Zuazaga, H.G.; Sen, A.; Olvera, H.L.; de Ortiz, S.P.; Govind, N.S. (2009). Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 26, 111–124.

- González-Hernández, J.C.; Jiménez-Estrada, M.; Peña, A. (2005). Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles*. 9, 7–16.
- Goossens, A.; Dever, T.E.; Pascual-Ahuir, A.; Serrano, R. (2001). The Protein Kinase Gcn2p Mediates Sodium Toxicity in Yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 30753–30760.
- Griffith, J. K., Baker, M. E., Rouch, D. A., Page, M. G., Skurray, R. A., Paulsen, I. T., ... & Henderson, P. J. (1992). Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Current opinion in cell biology*, 4(4), 684-695.
- Gunde-Cimerman, N., Oren, A., & Plemenitaš, A. (Eds.). (2006). *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (Vol. 9). Springer Science & Business Media.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS microbiology reviews*, 42(3), 353-375.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological research*, 113(11), 1231-1241.
- Gunde-Cimerman, N.; Plemenitaš, A. Ecology and molecular adaptations of the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2006, 5, 323–331.
- Gunde-cimerman, N.; Zalar, P. (2014). Extremely Halotolerant and Halophilic Fungi Inhabit Brine in Solar Salterns Around the Globe. 9862.
- Hald, P.M. (1947). The flame photometer for the measurement of sodium and potassium in biological materials. *J. Biol. Chem.* 499–510.
- Hallsworth, J. E. (1998). Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of fermentation and bioengineering*, 85(2), 125-137.
- Hallsworth, J.E.; Magan, N. (1996). Culture Age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2435–2442.
- Hallsworth, J.E.; Magan, N. (1997). A rapid HPLC protocol for detection of polyols and trehalose. *J. Microbiol. Methods.* 29, 7–13.
- Han, E. K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H., & Michels, C. A. (1995). Characterization of AGT1 encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Molecular microbiology*, 17(6), 1093-1107.
- Hanelt I, Muller V (2013) Molecular mechanisms of adaptation of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus* to its environment. *Life (Basel)* 3:234–243
- Hao, N., Zeng, Y., Elston, T. C., & Dohlman, H. G. (2008). Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 33798-33802.
- Harrison, J. P., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D., & Cockell, C. S. (2013). The limits for life under multiple extremes. *Trends in microbiology*, 21(4), 204-212.

- Hassan, A.H.A.; Alkhalifah, D.H.M.; Al Yousef, S.A.; Beemster, G.T.S.; Mousa, A.S.M.; Hozzein, W.N.; AbdElgawad, H. (2020). Salinity Stress Enhances the Antioxidant Capacity of *Bacillus* and *Planococcus* Species Isolated From Saline Lake Environment. *Front. Microbiol.* 11, 1–15.
- Hayashi, M., & Maeda, T. (2006). Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry*, 139(4), 797-803.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic Adaptation in Yeast - Control of the Yeast Osmolyte System. *Int. Rev. Cytol.* 215, 149–187.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system. *International review of cytology*, 215, 149-187.
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 583(24), 4025-4029.
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 583(24), 4025-4029.
- Hohmann, S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* 61, 373–382.
- Hohmann, S.; Krantz, M.; Nordlander, B. (2007). *Yeast Osmoregulation*; Elsevier Masson SAS. Vol. 428; ISBN 9780123739216.
- Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., & Saito, H. (2008). Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Molecular and cellular biology*, 28(17), 5172-5183.
- Hounsa, C. G., Brandt, E. V., Thevelein, J., Hohmann, S., & Prior, B. A. (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, 144(3), 671-680.
- Ianutsevich, E.A.; Tereshina, V.M. (2019). Combinatorial impact of osmotic and heat shocks on the composition of membrane lipids and osmolytes in *Aspergillus niger*. *Microbiol. (United Kingdom)*. 165, 554–562.
- Iturriaga, G., Suárez, R., & Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 3793-3810.
- Iwamoto, K., & Shiraiwa, Y. (2005). Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Marine Biotechnology*, 7(5), 407-415.
- Javaux, E. J. (2006). Extreme life on Earth—past, present and possibly beyond. *Research in microbiology*, 157(1), 37-48.
- Jennings, D. H. (1985). Polyol metabolism in fungi. *Advances in microbial physiology*, 25, 149-193.
- Jovanović, B.; Mach, R.L.; Mach-Aigner, A.R. (2013). Characterization of erythrose reductases from filamentous fungi. *AMB Express*. 3, 1–11.
- Jules, M., Guillou, V., François, J., & Parrou, J. L. (2004). Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental*

- microbiology*, 70(5), 2771-2778.
- Kalliampakou, K. I., Kouri, E. D., Boleti, H., Pavli, O., Maurousset, L., Udvardi, M. K., ... & Flietakis, E. (2011). Cloning and functional characterization of Lj PLT4, a plasma membrane xylitol H⁺-symporter from *Lotus japonicus*. *Molecular membrane biology*, 28(1), 1-13.
- Kapteyn, J. C., Ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular microbiology*, 39(2), 469-480.
- Kayingo, G., Kilian, S. G., & Prior, B. A. (2001). Conservation and release of osmolytes by yeasts during hypo-osmotic stress. *Archives of microbiology*, 177(1), 29-35.
- Kejžar, A., Grötli, M., Tamás, M. J., Plemenitaš, A., & Lenassi, M. (2015). HwHog1 kinase activity is crucial for survival of *Hortaea werneckii* in extremely hyperosmolar environments. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 45-58.
- Kinclova-Zimmermannová, O.; Sychrová, H. (2007). Plasma-membrane Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter regulates potassium homeostasis in *Candida albicans*. *Microbiology*. 153, 2603–2612.
- Klepek, Y. S., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-Arsivaud, L., Lemoine, R., ... & Sauer, N. (2005). Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *The Plant Cell*, 17(1), 204-218.
- Klipp, E.; Nordlander, B.; Krüger, R.; Gennemark, P.; Hohmann, S. (2005). Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat. Biotechnol.* 23, 975–982.
- Klöppel, R., & Höfer, M. (1976). Transport und Umsatz von Polyalkoholen bei der Hefe *Rhodotorula gracilis* (glutinis). *Archives of Microbiology*, 107(3), 329-334.
- Kobayashi, Y.; Yoshida, J.; Iwata, H.; Koyama, Y.; Kato, J.; Ogihara, J.; Kasumi, T. (2013). Gene expression and function involved in polyol biosynthesis of *Trichosporonoides megachiliensis* under hyper-osmotic stress. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 645–650.
- Kogej, T., Stein, M., Volkman, M., Gorbushina, A. A., Galinski, E. A., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, 153(12), 4261-4273.
- Konte, T., Terpitz, U., & Plemenitaš, A. (2016). Reconstruction of the high-osmolarity glycerol (HOG) signaling pathway from the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in microbiology*, 7, 901.
- Konte, T.; Plemenitas, A. (2013). The HOG signal transduction pathway in the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: identification and characterisation of MAP kinases WiHog1A and WiHog1B. 623–636.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R. V., Van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Development in aspergillus. *Studies in mycology*, 74, 1-29.
- Kruppa, M., & Calderone, R. (2006). Two-component signal transduction in human fungal pathogens. *FEMS yeast research*, 6(2), 149-159.

- Kruppa, M., Goins, T., Cutler, J. E., Lowman, D., Williams, D., Chauhan, N., ... & Calderone, R. (2003). The role of the *Candida albicans* histidine kinase [CHK1] gene in the regulation of cell wall mannan and glucan biosynthesis. *FEMS yeast research*, 3(3), 289-299.
- Kruppa, M., Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F., & Calderone, R. (2004). The histidine kinases of *Candida albicans*: regulation of cell wall mannan biosynthesis. *FEMS yeast research*, 4(4-5), 409-416.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kumar, S.; Gummadi, S.N. (2009). Osmotic adaptation in halotolerant yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: role of osmolytes and cation transport. *Extremophiles*. 13, 793–805.
- Kumar, S.; Kalyanasundaram, G.T.; Gummadi, S.N. (2011). Differential response of the catalase, superoxide dismutase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase to different environmental stresses in *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413. *Curr. Microbiol.* 62, 382–387.
- Kumari, S.; Joshi, R.; Singh, K.; Roy, S.; Tripathi, A.K.; Singh, P.; Singla-Pareek, S.L.; Pareek, A. (2015). Expression of a cyclophilin OsCyp2-P isolated from a salt-tolerant landrace of rice in tobacco alleviates stress via ion homeostasis and limiting ROS accumulation. *Funct. Integr. Genomics*. 15, 395–412.
- Kunte, H. J., Trüper, H. G., & Stan-Lotter, H. (2002). Halophilic microorganisms. In *Astrobiology* (pp. 185-200). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 38(3), 272-290.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276-3278.
- Larsson, C.; Morales, C.; Gustafsson, L.; Adler, L. (1990). Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J. Bacteriol.* 172, 1769–1774.
- Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1307-1320.
- Leandro, M. J., Fonseca, C., & Gonçalves, P. (2009). Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Research*, 9(4), 511-525.
- Lee, Y.J.; Jeschke, G.R.; Roelants, F.M.; Thorner, J.; Turk, B.E. (2012). Reciprocal Phosphorylation of Yeast Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenases in Adaptation to Distinct Types of Stress. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4705–4717.
- Lenassi, M., Gostinčar, C., Jackman, S., Turk, M., Sadowski, I., Nislow, C., ... & Plemenitaš, A. (2013). Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by de novo genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *PLoS One*, 8(8), e71328.
- Lenassi, M., Vaupotic, T., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitas, A. (2007). The MAP kinase HwHog1 from the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: coping with stresses in solar salterns. *Saline*

- Systems*, 3(1), 1-11.
- Lentzen, G., & Schwarz, T. (2006). Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(4), 623-634.
- Lewis, J.G.; Learmonth, R.P.; Watson, K. (1995). Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 141, 687–694.
- Lim, C.W.; Han, S.W.; Hwang, I.S.; Kim, D.S.; Hwang, B.K.; Lee, S.C. (2015). The pepper lipoxygenase CaLOX1 plays a role in osmotic, drought and high salinity stress response. *Plant Cell Physiol*. 56, 930–942.
- Lippert, K., & Galinski, E. A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied microbiology and biotechnology*, 37(1), 61-65.
- Liu, K.H.; Ding, X.W.; Narsing Rao, M.P.; Zhang, B.; Zhang, Y.G.; Liu, F.H.; Liu, B.B.; Xiao, M.; Li, W.J. (2017). Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress. *Front. Microbiol.* 8, 1–12.
- Loureiro-Dias, M. C. (1987). Glucose and polyol transport systems in *Candida intermedia* and their regulation. *Microbiology*, 133(10), 2737-2742.
- Lucca, M., Spencer, J., & De Figueroa, L. (2002). Glycerol and arabitol production by an intergeneric hybrid, PB2, obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii*. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4), 472-476.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W. F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *The EMBO Journal*, 14(7), 1360-1371.
- Macia, J., Regot, S., Peeters, T., Conde, N., Solé, R., & Posas, F. (2009). Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Science signaling*, 2(63), ra13-ra13.
- Madhani, H. D., Styles, C. A., & Fink, G. R. (1997). MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell*, 91(5), 673-684.
- Madigan, M. T. (2003). Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. *Photosynthesis research*, 76(1), 157-171.
- Maeda, T., Takekawa, M., & Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269(5223), 554-558.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., & Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(6477), 242-245.
- Mager, W.H.; Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.* 2, 251–257.
- Maksimović, J.D.; Zhang, J.; Zeng, F.; Živanović, B.D.; Shabala, L.; Zhou, M.; Shabala, S. (2001). Linking oxidative and salinity stress tolerance in barley: Can root antioxidant enzyme activity be used as a measure of stress tolerance? *Plant Soil*. 365, 141–155.

- Marcondes, N. R., Taira, C. L., Vandresen, D. C., Svidzinski, T. I. E., Kadowaki, M. K., & Peralta, R. M. (2008). New feather-degrading filamentous fungi. *Microbial Ecology*, 56(1), 13-17.
- Marger, M. D., & Saier Jr, M. H. (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in biochemical sciences*, 18(1), 13-20.
- Margesin, R.; Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5, 73–83.
- Markham, N. R., & Zuker, M. (2005). DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2), W577-W581.
- Marklund, S.; Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474.
- Martínez Montañés, F. V. (2011). *Adaptación a estrés osmótico en Saccharomyces cerevisiae: Caracterización genómica de factores de transcripción involucrados y represión de la biosíntesis de ergosterol* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Martínez, J.L.; Sychrova, H.; Ramos, J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *FUNGAL Genet. Biol.* 48, 177–184.
- Mas, G., De Nadal, E., Dechant, R., De La Concepción, M. L. R., Logie, C., Jimeno-González, S., ... & Posas, F. (2009). Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *The EMBO journal*, 28(4), 326-336.
- Massey Jr, F. J. (1951). The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *Journal of the American statistical Association*, 46(253), 68-78.
- Maturrano, L., Santos, F., Rosselló-Mora, R., & Antón, J. (2006). Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3887-3895.
- Meletiadis, J.; Meis, J.F.G.M.; Mouton, J.W.; Verweij, P.E. (2001). Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *J. Clin. Microbiol.* 39, 478–484.
- Mettetal, J. T., Muzzey, D., Gómez-Uribe, C., & van Oudenaarden, A. (2008). The frequency dependence of osmo-adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 319(5862), 482-484.
- Miller, G.; Shulaev, V.; Mittler, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* 133, 481–489.
- Miller, G.; Suzuki, N.; Ciftci-Yilmaz, S.; Mittler, R. (2004). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ*, 33, 453–467.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498.
- Moon, H. J., Jeya, M., Kim, I. W., & Lee, J. K. (2010). Biotechnological production of erythritol and its applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(4), 1017-1025.
- Muzzey, D., Gómez-Uribe, C. A., Mettetal, J. T., & van Oudenaarden, A. (2009). A systems-level

- analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. *Cell*, 138(1), 160-171.
- Niemela, O.; Parkkila, S.; Yla-Herruuala, S.; Villanueva, J.; Ruebner, B.; Halsted, C.H. (1995). Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology*. 22, 1208–1212.
- Noiraud, N., Maurousset, L., & Lemoine, R. (2001). Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *The plant cell*, 13(3), 695-705.
- Norkrans, B.; Kylin, A. (1969). Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J. Bacteriol.* 100, 836–845.
- Novaki, L., Hasan, S. D., Kadowaki, M. K., & Andrade, D. (2010). Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. *Engevista*, 12(2).
- O'Rourke, S. M., & Herskowitz, I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 12(18), 2874-2886.
- O'Rourke, S.M.; Herskowitz, I. (2004). Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Mol. Biol. Cell*. 15, 532–542.
- Oliveira, A.P.; Ludwig, C.; Picotti, P.; Kogadeeva, M.; Aebersold, R.; Sauer, U. (2012). Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Mol. Syst. Biol.* 8.
- Oliveira, R., Lages, F., Silva-Graça, M., & Lucas, C. (2003). Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1613(1-2), 57-71.
- Omar, S. H., Honecker, S., & Rehm, H. J. (1992). A comparative study on the formation of citric acid and polyols and on morphological changes of three strains of free and immobilized *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(4), 518-524.
- Oren, A. (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS microbiology ecology*, 39(1), 1-7.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4(1), 1-13.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S., & Galinski, E. A. (2002). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, 6(6), 491-498.
- Ortbauer, M.; Popp, M. (2008). Functional role of polyhydroxy compounds on protein structure and thermal stability studied by circular dichroism spectroscopy. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 428–434.
- Özdemirler, G., Mehmetcik, G., Öztezcan, S., Toker, G., Sivas, A., & Uysal, M. (1995). Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. *Hormone and metabolic research*, 27(04), 194-196.
- Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y., & Dover, N. (2001). Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochimica et*

- biophysica acta (BBA)-Bioenergetics*, 1505(1), 144-157.
- Panadero, J., Pallotti, C., Rodríguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2006). A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4638-4645.
- Parmar, J.H.; Bhartiya, S.; Venkatesh, K. V., (2011). Characterization of the adaptive response and growth upon hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biosyst.* 7, 1138–1148.
- Patel, T.K.; Williamson, J.D. (2016). Mannitol in Plants, Fungi, and Plant–Fungal Interactions. *Trends Plant Sci.* 21, 486–497.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurreea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 417-441.
- Peidro-Guzmán, H.; Pérez-Llano, Y.; González-Abradelo, D.; Fernández-López, M.G.; Dávila-Ramos, S.; Aranda, E.; Hernández, D.R.O.; García, A.O.; Lira-Ruan, V.; Pliego, O.R.; et al. (2020). Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions. *Environ. Microbiol.* 00.
- Pereira, I., Madeira, A., Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., & Leandro, M. J. (2014). Characterization of new polyol/H⁺ symporters in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS one*, 9(2), e88180.
- Pérez-Llano, Y., Rodríguez-Pupo, E. C., Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Cai, F., Gunde-Cimerman, N., ... & Sánchez-Carbente, M. D. R. (2020). Stress reshapes the physiological response of halophile fungi to salinity. *Cells*, 9(3), 525.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. *Frontiers in microbiology*, 5, 199.
- Plemenitaš, A., Vaupotič, T., Lenassi, M., Kogej, T., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, 61, 67-75.
- Pokholok, D. K., Zeitlinger, J., Hannett, N. M., Reynolds, D. B., & Young, R. A. (2006). Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science*, 313(5786), 533-536.
- Posas, F., & Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, 276(5319), 1702-1705.
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., De Nadal, E., & Ariño, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17249-17255.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., & Saito, H. (1996). Yeast

- HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1–YPD1–SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell*, 86(6), 865-875.
- Prista, C.; Almagro, A.; Loureiro-Dias, M.C.; Ramos, J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 4005–4009.
- Proft, M., & Struhl, K. (2004). MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*, 118(3), 351-361.
- Puttikamonkul, S.; Willger, S.D.; Grahl, N.; Perfect, J.R.; Movahed, N.; Bothner, B.; Park, S.; Paderu, P.; Perlin, D.S.; Cramer, R.A. (2010). Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 77, 891–911.
- Raitt, D. C., Posas, F., & Saito, H. (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *The EMBO journal*, 19(17), 4623-4631.
- Ramos-Moreno, L.; Ramos, J.; Michán, C. (2019). Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1–13.
- Ratnakumar, S., Hesketh, A., Gkargkas, K., Wilson, M., Rash, B. M., Hayes, A., ... & Oliver, S. G. (2011). Phenomic and transcriptomic analyses reveal that autophagy plays a major role in desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular BioSystems*, 7(1), 139-149.
- Reed, R. H., Chudek, J. A., Foster, R., & Gadd, G. M. (1987). Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9), 2119-2123.
- Reiser, V., Salah, S. M., & Ammerer, G. (2000). Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nature Cell Biology*, 2(9), 620-627.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (2000). The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock: Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes* 210. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8290-8300.
- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems*, 1(1), 1-30.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1469, 1–30.
- Röhr, M., Kubicek, C. P., Zehentgruber, O., & Orthofer, R. (1987). Accumulation and partial re-consumption of polyols during citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 235-239.
- Rosenfeld, L.; Reddi, A.R.; Leung, E.; Aranda, K.; Jensen, L.T.; Culotta, V.C. (2010). The effect of phosphate accumulation on metal ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15, 1051–1062.
- Rossello-Mora, R., Lucio, M., Pena, A., Brito-Echeverría, J., Lopez-Lopez, A., Valens-Vadell, M., ...

- & Schmitt-Kopplin, P. (2008). Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *The ISME journal*, 2(3), 242-253.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101.
- Ruijter, G. J., Bax, M., Patel, H., Flitter, S. J., van de Vondervoort, P. J., de Vries, R. P., ... & Visser, J. (2003). Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryotic cell*, 2(4), 690-698.
- Ruijter, G. J., Visser, J., & Rinzema, A. (2004). Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology*, 150(4), 1095-1101.
- Russell, S. D. (1993). The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. *The Plant Cell*, 5(10), 1349.
- Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), 289-318.
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., González, J., Defosse, T., Papon, N., Peña, A., & Coria, R. (2020). Contribution of the mitogen-activated protein kinase Hog1 to the halotolerance of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Genetics*, 66(6), 1135-1153.
- Sauday, S. (2010). The role of Stl1p in glycerol accumulation in osmotically stressed icewine yeast *Saccharomyces cerevisiae* K1 V1116.
- Sharma, A.; Sharma, S.C. (2017). Physiological Basis for the Tolerance of Yeast *Zygosaccharomyces bisporus* to Salt Stress. *HAYATI J. Biosci.* 24, 176–181.
- Sharma, P.; Meena, N.; Aggarwal, M.; Mondal, A.K. (2005). *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. *Curr. Genet.* 48, 162–170.
- Shock, T. R., Thompson, J., Yates III, J. R., & Madhani, H. D. (2009). Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) interrupts signal transduction between the Kss1 MAPK and the Tec1 transcription factor to maintain pathway specificity. *Eukaryotic cell*, 8(4), 606-616.
- Smirnov, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Solomon, P. S., Waters, O. D., & Oliver, R. P. (2007). Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in microbiology*, 15(6), 257-262.
- Solomon, P. S., Waters, O. D., Jörgens, C. I., Lowe, R. G., Rechberger, J., Trengove, R. D., & Oliver, R. P. (2006). Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch). *Biochemical Journal*, 399(2), 231-239.
- Sutherland, F. C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., ... & Kilian, S. G. (1997). Characteristics of Fps1-dependent and-independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 179(24), 7790-7795.
- Świącilo, A. (2016). Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast—new insight into an old phenomenon. *Cell Stress and Chaperones*, 21(2), 187-200.
- Tafer, H., Poyntner, C., Lopandic, K., Sterflinger, K., & Piñar, G. (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.
- Tamás, M. J., Karlgren, S., Bill, R. M., Hedfalk, K., Allegri, L., Ferreira, M., ... & Hohmann, S. (2003). A short regulatory domain restricts glycerol transport through yeast Fps1p. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6337-6345.
- Tamás, M. J., Luyten, K., Sutherland, F. C. W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., ... & Hohmann, S. (1999). Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular microbiology*, 31(4), 1087-1104.
- Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., & Maeda, T. (2012). Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology*, 32(14), 2861-2870.
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H. Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., ... & Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO journal*, 26(15), 3521-3533.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tomida, T., Nishimura, A., Takayama, T., Oyama, M., ... & Saito, H. (2020). Osmostress enhances activating phosphorylation of Hog1 MAP kinase by mono-phosphorylated Pbs2 MAP 2K. *The EMBO journal*, 39(5), e103444.
- Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H., & Ammerer, G. (2001). Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5625-5630.
- Tekolo, O. M., Mckenzie, J., Botha, A., & Prior, B. A. (2010). The osmotic stress tolerance of basidiomycetous yeasts. *FEMS yeast research*, 10(4), 482-491.
- Thammahong, A.; Caffrey-card, A.K.; Dhingra, S.; Obar, J.J.; Cramer, R.A. (2017). *Aspergillus fumigatus* Trehalose-Regulatory Subunit Homolog Moonlights To Mediate Cell Wall Homeostasis through Modulation of Chitin Synthase Activity. *MBio*, 8, e00056-17.
- Thammahong, A.; Puttikamonkul, S.; Perfect, J.R.; Brennan, R.G.; Cramer, R.A. (2017). Central Role of the Trehalose Biosynthesis Pathway in the Pathogenesis of Human Fungal Infections: Opportunities and Challenges for Therapeutic Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81, 1–31.
- Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (1995). Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?. *Trends in biochemical sciences*, 20(1), 3-10.
- Thevelein, J.M. (1984). Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* 48, 42–59.
- Thevelein, J.M. (1996). Regulation of Trehalose Metabolism and Its Relevance to cell Growth and Function. *Biochem. Mol. Biol.* 395–420.
- Thomason, P., & Kay, R. (2000). Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *Journal of cell science*, 113(18), 3141-3150.
- Thorsen, M., Di, Y., Tängemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., ... & Tamás, M. J. (2006). The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in








- yeast. *Molecular biology of the cell*, 17(10), 4400-4410.
- Tomaszewska, L., Rakicka, M., Rymowicz, W., & Rywińska, A. (2014). A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. *FEMS yeast research*, 14(6), 966-976.
- Tomaszewska, L.; Rywińska, A.; Gladkowski, W. (2012). Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 1333–1343.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W71-W74.
- Upadhyay, R. S., Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., & Gupta, V. K. (2015). Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions. *Frontiers in microbiology*, 6, 1019.
- Vadaie, N., Dionne, H., Akajagbor, D. S., Nickerson, S. R., Krysan, D. J., & Cullen, P. J. (2008). Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *The Journal of cell biology*, 181(7), 1073-1081.
- Vaidya, S., Dev, K., & Sourirajan, A. (2018). Distinct osmoadaptation strategies in the strict halophilic and halotolerant bacteria isolated from Lunsu salt water body of North West Himalayas. *Current microbiology*, 75(7), 888-895.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 213-218.
- Van Eck, J. H., Prior, B. A., & Brandt, E. V. (1993). The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *Microbiology*, 139(5), 1047-1054.
- van Heerden, J. H., Wortel, M. T., Bruggeman, F. J., Heijnen, J. J., Bollen, Y. J., Planqué, R., ... & Teusink, B. (2014). Lost in transition: start-up of glycolysis yields subpopulations of nongrowing cells. *Science*, 343(6174).
- Van Laere, A. (1989). Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol. Lett.* 63, 201–209.
- Van Leeuwen, M. R., Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., ... & Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in mycology*, 74, 59-70.
- Van Wuytswinkel, O.; Reiser, V.; Siderius, M.; Kelders, M.C.; Ammerer, G.; Ruis, H.; Mager, W.H. (2000). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol. Microbiol.* 37, 382–397.
- Vázquez-Ibarra, A., Subirana, L., Ongay-Larios, L., Kawasaki, L., Rojas-Ortega, E., Rodríguez-González, M., ... & Coria, R. (2018). Activation of the Hog1 MAPK by the Ssk2/Ssk22 MAP 3Ks, in the absence of the osmosensors, is not sufficient to trigger osmostress adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS journal*, 285(6), 1079-1096.

- Velázquez-Zavala, N., Rodríguez-González, M., Navarro-Olmos, R., Ongay-Larios, L., Kawasaki, L., Torres-Quiroz, F., & Coria, R. (2015). Ineffective phosphorylation of mitogen-activated protein kinase Hog1p in response to high osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic cell*, *14*(9), 922-930.
- Véléz, H., Glassbrook, N. J., & Daub, M. E. (2007). Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology*, *44*(4), 258-268.
- Ventosa, A. (2006, January). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In *Symposia-society for general microbiology* (Vol. 66, p. 223). Cambridge; Cambridge University Press; 1999.
- Voegelé, R. T., Hahn, M., Lohaus, G., Link, T., Heiser, I., & Mendgen, K. (2005). Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiology*, *137*(1), 190-198.
- Weinisch, L., Kühner, S., Roth, R., Grimm, M., Roth, T., Netz, D. J., ... & Filker, S. (2018). Identification of osmoadaptive strategies in the halophile, heterotrophic ciliate *Schmidingerothrix salinarum*. *PLoS biology*, *16*(1), e2003892.
- Wiemken, A. (1997). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek* . *58*, 209–217.
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C. P., Burkholder, A., Knoche, K., & Ota, I. (2002). Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryotic cell*, *1*(2), 163-173.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., ... & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney international*, *49*(5), 1304-1313.
- Witteveen, C. F., & Visser, J. (1995). Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, *134*(1), 57-62.
- Wolschek, M.F.; Kubicek, C.P. (1997). The filamentous fungus *Aspergillus niger* contains two “differentially regulated” trehalose-6-phosphate synthase-encoding genes, *tpsA* and *tpsB*. *J. Biol. Chem.* *272*, 2729–2735.
- Wyatt, T. T., Van Leeuwen, M. R., Wösten, H. A. B., & Dijksterhuis, J. (2014). Mannitol is essential for the development of stress-resistant ascospores in *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*). *Fungal Genetics and Biology*, *64*, 11-24.
- Wyatt, T.T.; van Leeuwen, M.R.; Golovina, E.A.; Hoekstra, F.A.; Kuenstner, E.J.; Palumbo, E.A.; Snyder, N.L.; Visagie, C.; Verkennis, A.; Hallsworth, J.E.; et al. (2015). Functionality and prevalence of trehalose-based oligosaccharides as novel compatible solutes in ascospores of *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) and other fungi. *Environ. Microbiol.* *17*, 395–411.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of experimental biology*, *208*(15), 2819-2830.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., & Somero, G. N. (1982). Living with water

- stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214-1222.
- Yancey, P.H. (2001). Water stress, osmolytes and proteins. *Am. Zool.* 41, 699–709.
- Zajc, J., Džeroski, S., Kocev, D., Oren, A., Sonjak, S., Tkavc, R., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Chaophilic or chaotolerant fungi: a new category of extremophiles?. *Frontiers in microbiology*, 5, 708.
- Zajc, J., Kogej, T., Galinski, E. A., Ramos, J., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Applied and environmental microbiology*, 80(1), 247-256.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R. P., Nittler, M. P., & Lim, W. A. (2004). Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Molecular cell*, 14(6), 825-832.
- Zidan, M.A.; Abdel-Mallek, A.Y. (1987). Effect of NaCl on the accumulation of glycerol by three *Aspergillus* species. *J. Basic Microbiol.* 27, 393–397.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), 3406-3415.

Article

Osmolyte Signatures for the Protection of *Aspergillus sydowii* Cells under Halophilic Conditions and Osmotic Shock

Eya Caridad Rodríguez-Pupo ^{1,2,†}, Yordanis Pérez-Llano ^{1,2,†} , José Raunel Tinoco-Valencia ³, Norma Silvia Sánchez ⁴ , Francisco Padilla-Garfias ⁴, Martha Calahorra ⁴, Nilda del C. Sánchez ⁵, Ayixón Sánchez-Reyes ⁶ , María del Rocío Rodríguez-Hernández ¹, Antonio Peña ⁴, Olivia Sánchez ⁴, Jesús Aguirre ⁴ , Ramón Alberto Batista-García ² , Jorge Luis Folch-Mallol ¹  and María del Rayo Sánchez-Carbente ^{1,*} 

- ¹ Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca C.P. 62209, Morelos, Mexico; eyarguez2013@gmail.com (E.C.R.-P.); yordanis.perezllano@yahoo.com (Y.P.-L.); rocio.rodriguez@uaem.mx (M.d.R.R.-H.); jordi@uaem.mx (J.L.F.-M.)
 - ² Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, UAEM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca C.P. 62209, Morelos, Mexico; rabg@uaem.mx
 - ³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca C.P. 62210, Morelos, Mexico; raunel@ibt.unam.mx
 - ⁴ Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Cto. Exterior s/n, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México C.P. 04510, Federal District, Mexico; nsanchez@ifc.unam.mx (N.S.S.); fpadilla@ifc.unam.mx (F.P.-G.); mcalahor@ifc.unam.mx (M.C.); apd@ifc.unam.mx (A.P.); asanchez@ifc.unam.mx (O.S.); jaguirre@ifc.unam.mx (J.A.)
 - ⁵ Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Campus Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca C.P. 62210, Morelos, Mexico; nildita1985@gmail.com
 - ⁶ Catedras Conacyt-Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca C.P. 62210, Morelos, Mexico; ayixon.sanchez@ibt.unam.mx
- * Correspondence: maria.sanchez@uaem.mx
 † These authors contributed equally to this work.



Citation: Rodríguez-Pupo, E.C.; Pérez-Llano, Y.; Tinoco-Valencia, J.R.; Sánchez, N.S.; Padilla-Garfias, F.; Calahorra, M.; Sánchez, N.d.C.; Sánchez-Reyes, A.; Rodríguez-Hernández, M.d.R.; Peña, A.; et al. Osmolyte Signatures for the Protection of *Aspergillus sydowii* Cells under Halophilic Conditions and Osmotic Shock. *J. Fungi* **2021**, *7*, 414. <https://doi.org/10.3390/jof7060414>

Academic Editor:
Francesca Scandellari

Received: 18 April 2021
 Accepted: 20 May 2021
 Published: 26 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Aspergillus sydowii* is a moderate halophile fungus extensively studied for its biotechnological potential and halophile responses, which has also been reported as a coral reef pathogen. In a recent publication, the transcriptomic analysis of this fungus, when growing on wheat straw, showed that genes related to cell wall modification and cation transporters were upregulated under hypersaline conditions but not under 0.5 M NaCl, the optimal salinity for growth in this strain. This led us to study osmolyte accumulation as a mechanism to withstand moderate salinity. In this work, we show that *A. sydowii* accumulates trehalose, arabitol, mannitol, and glycerol with different temporal dynamics, which depend on whether the fungus is exposed to hypo- or hyperosmotic stress. The transcripts coding for enzymes responsible for polyalcohol synthesis were regulated in a stress-dependent manner. Interestingly, *A. sydowii* contains three homologs (Hog1, Hog2 and MpkC) of the Hog1 MAPK, the master regulator of hyperosmotic stress response in *S. cerevisiae* and other fungi. We show a differential regulation of these MAPKs under different salinity conditions, including sustained basal Hog1/Hog2 phosphorylation levels in the absence of NaCl or in the presence of 2.0 M NaCl, in contrast to what is observed in *S. cerevisiae*. These findings indicate that halophilic fungi such as *A. sydowii* utilize different osmoadaptation mechanisms to hypersaline conditions.

Keywords: halophile; osmolyte; osmotic shock; HOG; *Aspergillus*; extremophile

1. Introduction

Halophilic and halotolerant microorganisms, which thrive in saline environments, adapt strategies to cope with high concentrations of sodium chloride. The high ionic force in these environments provokes the inactivation of proteins and the osmotic pressure causes

water loss from non-adapted cells, while the activation of stress-response pathways increases the levels of reactive oxygen species (ROS) [1,2]. Salt-adapted cells actively extrude metal cations to avoid toxicity and prevent water efflux by the accumulation of osmolytes, some of which also possesses ROS scavenging activity, among other mechanisms [1–3].

Osmolytes or compatible solutes are low molecular weight molecules that cells accumulate in high concentration to maintain osmotic balance [4–7]. Halophilic bacteria use glycine, betaine, and glutamate as the main osmolytes [8] whereas fungi preferably accumulate trehalose and poly-alcohols such as mannitol, glycerol, arabinol, and sorbitol [9–11].

The main pathway that regulates the production of osmolytes and other salinity responses in yeasts and filamentous fungi is the High Osmolarity Glycerol (HOG) signaling pathway [12–14]. This is a MAPK signal transduction cascade that leads to differential gene expression driven by Hog due to the phosphorylation of target transcription factors [12,13,15]. For example, the synthesis of osmolytes such as glycerol, arabinol, and mannitol is controlled by transcriptional regulation of the genes *gpd*, *ardh*, *mpdh*, and post-translational regulation of the activity of the proteins through phosphorylation [14,16–18].

Cellular responses in hyperosmotic media are well known in the halotolerant ascomycetous yeasts *S. cerevisiae* [19–22] and *Debaryomyces hansenii* [23–26] and in the halotolerant ascomycetous filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [27]. In all these cases, the presence of salt entails stress responses that are superimposed with adaptation mechanisms to tolerate high salinity.

Hortaea werneckii, an extreme halotolerant black yeast, and *Wallemia ichthyophaga*, an obligate halophile, have recently emerged as models to study hyper-salinity adaptations in Basidiomycetes [10,23]. Osmolyte signatures, signaling pathways activation, cell wall adaptations, ionic balance, and membrane transporters have been studied in these models. However, previous studies in these and other halophilic fungi have been generally conducted in the minimum and maximum tolerated salinities [9,10,28]. Under these conditions, as in the studies of halotolerant fungi, the independent contribution of stress and salinity to physiological responses are difficult to discriminate.

We have recently shown that in the case of the halophilic ascomycetous model *A. sydowii*, the physiological responses to salinity vary if the fungus is under additional salinity stress [29]. In this strain, hyperosmotic conditions (2.0 M NaCl) induce the transcriptional regulation of cell wall reorganization, membrane cation transporters, hydrophobin production, and glycerol synthesis. However, such regulatory mechanisms were not observed at a salt concentration (0.5 M NaCl) that is optimal for the growth of this fungus [29]. Thus, we hypothesize that, at the optimal salinity, the fungus accumulates osmolytes other than glycerol, regulates ionic balance, and maintains low oxidative stress levels by mechanisms that do not require a steady transcriptional change. The aim of the present work was to analyze the osmolyte signatures in salt-adapted *A. sydowii* cells and their dynamic changes after hypoosmotic and hyperosmotic shocks.

In this report we examined osmolyte accumulation, transcriptional regulation of key enzymes involved in their synthesis, the activation of HOG signaling pathway, and the sodium and potassium ion balance in *A. sydowii* under hyperosmotic, hypoosmotic and optimal salinity conditions. Oxidative stress markers and antioxidant responses were also investigated to assert the level of stress in the evaluated conditions. This information will be useful for defining culture conditions in future biotechnological applications of *A. sydowii*. This fungus can grow with lignocellulosic substrates and hydrocarbons as the only carbon sources [29–32], and produces biotechnologically relevant enzymes [33–37] and secondary metabolites [38–40], which attest to its potential use as a tool in biorefineries and in bioremediation approaches.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal Strain and Culture Conditions

Isolation of the moderate halophilic fungus *A. sydowii* strain BMH0004 has been previously described [29,30]. The strain was maintained in PDA petri dishes grown at 28 °C

and stored at 4 °C or as spores suspension in 20% glycerol supplemented with 0.5% NaCl at –80 °C in the Fungal Culture Collection of the Center for Research on Biotechnology (CEIB, UAEM, Morelos, Mexico) with reference number BMH0004, in the Technological University Collection of Industrially Relevant Microorganisms (TUCIM, Vienna, Austria) with reference number 6524 and the Ex Culture Collection of the Infrastructural Centre Mycosmo (MRIC, UL, Ljubljana, Slovenia) with reference number EXF-12860.

For all experimental determinations, *A. sydowii* was grown in liquid mineral medium with glucose (MMG medium) and incubated at 28 °C and 150 rpm. The MMG medium (containing: 7.8 mg/L CuSO₄·5H₂O, 18 mg/L FeSO₄·7H₂O, 500 mg/L MgSO₄·7H₂O, 10 mg/L ZnSO₄, 50 mg/L KCl, 1 g/L K₂HPO₄ and 2 g/L NH₄NO₃) was adjusted to pH 6 with H₃PO₄ or KOH, then sterilized by autoclaving and supplemented with 0.5 M or 2.0 M NaCl and 2% filter-sterilized glucose.

2.2. Growth Rate Determination

To determine the growth rate of *A. sydowii* at different salinities, 10⁶ spores were inoculated into 250 mL flasks with 50 mL of MMG with different concentrations of NaCl (without NaCl, with 0.5 M, 1.0 M, or 2.0 M NaCl). The cultures were incubated at 28 °C with constant shaking at 150 rpm. All the mycelium in a culture flask was harvested every 2 days until no changes in biomass were recorded. The mycelium was collected by filtration with a 40 µm pore size cell strainer, dried at 60 °C in an oven and weighted. All experimental determinations were made in triplicate.

2.3. Identification and Quantification of Compatible Solutes

Intracellular glycerol, erythritol, ribitol, xylitol, arabitol, galactitol, sorbitol, mannitol, maltitol, and trehalose (Standards kit, Cat. 47266, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were measured by HPLC (Supplementary Figures S1 and S2). The extraction of the metabolites was carried out by a modification of the Bligh and Dyer method [9,41]. Briefly, 100 mg of mycelium were suspended in 3680 µL of Bligh and Dyer solution (chloroform–methanol–water (10:5:3.4)) and stirred vigorously for approximately 30 min. 433 µL of chloroform and 433 µL of demineralized water were added, and the suspension was incubated for 30 min with stirring. The samples were centrifuged at 5500 × g for 10 min for phase separation. The upper methanol–water phase was collected and stored at –20 °C until analysis.

The HPLC analysis was performed in an isocratic system with an AMINEX-HPX87H column (300 mm × 7.8 mm, Bio-Rad, Munich, Germany) at 50 °C. Injection volume was 50 µL for all samples. Calibration curves of standards were obtained using 50, 200, 400, 600, and 800 µg/mL of each compound. The separation was carried out by elution with 5 mM sulfuric acid, at a flow rate of 0.8 mL/min. Chromatogram analysis was performed using ChromQuest software v2.51 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4. Compatible Solutes in Salt-Adapted Mycelium

To determine the compatible solutes in cells adapted to salt, 10⁶ spores were inoculated into 250 mL flasks with 100 mL of MMG with different concentrations of NaCl (0 M, 0.5 M, or 2.0 M NaCl). The mycelium was collected at different time points of the growth curve (5, 7, and 11 days) and dried until constant weight, in an oven at 60 °C, before extraction of compatible solutes as previously described. All the experiments were performed with three culture replicates.

2.5. Compatible Solutes after Osmotic Shock

Compatible solutes were determined in cells after osmotic shock exerted by transferring the mycelium in all possible conditions between 0 M, 0.5 M, and 2.0 M NaCl. The fungus was cultured in 500 mL flasks with 200 mL of MMG with or without NaCl and incubated for 7 days at 28 °C, 150 rpm. The obtained pre-inoculum was harvested using a 40 µm pore size cell strainer and 1 g of wet biomass was transferred to 250 mL flasks with 50 mL of MMG with or without NaCl and incubated at 28 °C, 150 rpm. The mycelia were

collected after 10 min, 30 min, 2 h, 8 h, 24 h, and 48 h post-inoculation, dried in an oven at 60 °C and compatible solutes were extracted as described above. All the experiments were performed with three culture replicates.

2.6. RNA Extraction and qPCR Analysis

The fungus was cultured for 7 days as previously described (t0) and was subjected to osmotic shock following the same procedure as for the determination of compatible solutes. The mycelium was harvested by centrifugation, frozen with liquid nitrogen, grinded using a mortar and pestle, and 100 mg were used to isolate total RNA using the TRI-reagent method (Sigma-Aldrich). cDNA was synthesized from 2 µg of DNase-treated total RNA, using the RevertAid™ H Minus First Strand cDNA synthesis kit with a dT18 primer (Thermo Fisher Scientific).

Primers for qPCR analysis were designed using Primer3Plus [42] and their physico-chemical properties and amplicon structures were evaluated using DINAMelt [43] and Mfold [44], respectively. All primers used are listed in Supplementary Table S1.

Two-step qPCR reaction conditions (temperature, primer concentration and efficiency) were optimized for each primer pair (see Supplementary Table S1 for reaction conditions). qPCR reactions contained 5 µL of QuantiNOVA SYBR GREEN Master Mix (QIAGEN, Hilden, Germany) and 1 µL of a 1:8 dilution of cDNA in a final volume of 10 µL. All reactions were quantified in duplicate using a Rotorgene apparatus (QIAGEN, Hilden, Germany). A melting curve and a polyacrylamide gel electrophoresis were used to verify the specificity of the amplified product.

Relative expression levels were calculated with the Pfaffl method using the REST software [45,46]. In cases where the randomization test performed by REST confirmed statistical significance of the fold change, a binary logarithm (logFC) over 2 was considered as biologically significant up- or down-regulation. The genes *sarA* and *cox5* were used as reference genes for normalization [47].

2.7. Phylogenetic Analysis of MAPK Orthologs

Protein sequences corresponding to mitogen-activated protein kinase (MAPK) orthologs (KOG0660) were retrieved from the genomes of Aspergilli in the MycoCosm database by KOG annotation search. These sequences were aligned using the MUSCLE algorithm with default parameters [48] as implemented in the MEGA suite [49]. The resulting multiple sequence alignment (MSA) was edited in AliView [50] to remove non parsimonious-informative sequence blocks, resulting in a MSA with 253 sites. For phylogenetic reconstruction, the best substitution model was selected in MEGA based on the lowest BIC scores (Bayesian Information Criterion). Phylogenetic distances were inferred by using the Maximum Likelihood (ML) method and Le_Gascuel_2008 model [51] assuming gamma distributed evolutionary rates among sites. The ML Tree confidence was evaluated with the Bootstrap method using 1000 iterations [52]. The bootstrap consensus tree was modified for visualization using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, accessed on 15 May 2021).

2.8. Western Blot of Phosphorylated Hog

Cultures of *A. sydowii* were subjected to osmotic shock as previously described. The mycelium was harvested with a cell strainer after 5, 15, 30, 60, 120, and 180 min post-inoculation, and treated with 85% trichloroacetic acid for 10 min [53]. The fixed cells were washed three times with distilled water, frozen and macerated with liquid nitrogen, and vortexed with lysis buffer (500 mM Tris pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 4% glycerol and 0.01% bromophenol blue) and 0.5 mm diameter glass beads [53,54]. A constant volume of protein extract was used for Western blot. PVDF membranes were blocked with 7% skim milk (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) in Phosphate Buffer Saline (PBS), followed by incubation with an anti-p38 phosphorylated MAP kinase antibody (Cat. 4511, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) at a 1:1000 dilution. Anti-Hog antibody (Cat. SC-9079,

Santa Cruz, Dallas, TX, USA) was used at a 1:1000 dilution to detect total protein and served as loading control. An anti-rabbit IgG coupled to HRP (Invitrogen, Waltham, MA, USA) was used at a 1:10,000 dilution and incubated at room temperature for 1 h. The molecular weight marker used in this assay was Page Ruler pre-stained TM (10–180 kDa, ThermoScientific, Waltham, MA, USA). A protein extract from *S. cerevisiae* strain BY7472 was used as a positive control. In this case, *S. cerevisiae* cells were grown overnight in YPD broth, subjected to 1.0 M NaCl osmotic shock for 10 min, and treated as previously described for fungal mycelium [53,54].

2.9. Na⁺/K⁺ Quantification

For the quantification of intracellular sodium and potassium, 300 mg of wet mycelium (5, 7, and 11 days of culture, as previously described) was washed two times with deionized water and vacuum dried using Whatman filters with a pore size of 0.45 µm in a Millipore Multifilter equipment. The biomass was resuspended in 5 mL of deionized water and homogenized with a Teflon pestle in a tissue homogenizer for approximately 2 min. The homogenate was collected by rinsing the tissue homogenizer with 5 mL of deionized water to obtain a final volume of 10 mL. From this volume, 5 mL were heated in a water bath at the boiling point for 20 min and then centrifuged for 5 min at 1625 × g. The supernatant was collected and Na⁺ and K⁺ were quantified on a Flame Photometer (Carls Zeiss PF5 371777) [55]. For the quantification, 1 mM NaCl and 1 mM KCl were used as standards, corresponding to 100 AU. All measurements were made in triplicate.

2.10. Quantification of Oxidative Stress Markers and Antioxidant Responses in *A. sydowii*

The mycelium was collected in a cell strainer and macerated with liquid nitrogen using a mortar and pestle. Cell lysis was achieved by adding 200 µL of lysis buffer (0.3 M Tris pH 6.8, SDS 2% and glycerol 4%) to 100 mg of frozen macerated mycelium, with 0.3 g of 0.5 mm diameter glass beads. Samples were vortexed four times on lapses of 1 min and allowed to rest for another minute on ice. The supernatant was recovered by centrifugation and stored at −80 °C until analysis.

Hydrogen peroxide was quantified as total peroxides in cell extracts using the BIOXYTECH® H2O2-560™ Assay kit (Cat. 21024, OXIS International Inc., Portland, OR, USA). Briefly, this colorimetric assay is based on the oxidation of ferrous ions, which then bind to the xylenol orange dye to yield a colored complex. Sorbitol in the reaction enhances the oxidation of ferrous ions, which increases the assay sensitivity. The indicator dye production was evaluated by absorbance at 560 nm.

Protein Advanced Oxidation Product (PAOP) level was determined by a modified Witko's method [56] using chloramine-T (*N*-chloro-*p*-toluene-sulfonamide) as standard. Chloramines were determined by production of triiodide ion from the oxidation of potassium iodide in solution at 340 nm.

Lipid peroxidation was evaluated by the quantification of malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4-HDA), two common degradation products of lipid peroxidation. MDA and 4-HDA were determined by reaction with *N*-methyl-2-phenylindole to form a chromophoric cyanine that can be quantified spectrophotometrically at 586 nm [57]. MDA concentration was calculated using a standard curve. To further determine cell susceptibility to lipid peroxidation, cell extracts were incubated with 2 mM copper sulphate at 37 °C for 24 h [58]. At the end of the incubation period, MDA and diene conjugate levels were also measured.

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to the Marklund method [59] based on the ability of the enzyme to inhibit the autoxidation of pyrogallol. The rate of autoxidation is obtained from the increase in absorbance at 420 nm, in the absence of superoxide dismutase. The levels of reduced glutathione (GSH) present in the sample were determined as described previously by [60]. Briefly, the GSH reacts with 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) dye (DTNB dye) to yield a colored compound that

absorbs light at 412 nm. Concentration of GSH was determined by comparing the samples with a standard curve.

2.11. Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SD. Statistical analysis of solute concentration was performed using one-way ANOVA considering a fixed-effect model with salinity as predictor variable. The ANOVA premises were assessed according to the Kolmogorov-Smirnov normality test [61] and the Levene or Brown-Forsythe variance homogeneity test [62]. The means of multiple comparison tests were performed by Duncan test [63]. Where the normality and homoscedasticity requirements were not verified, a Kruskal-Wallis test was performed, and the multiple mean comparisons were performed using the Dunn's test. The level of significance was set at $\alpha = 0.05$ using the STATISTICA software, v. 7.0, (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Compatible Solutes in Salt-Adapted *A. sydowii* Cells

To avoid the stress induced by nutritional deprivation, we cultured the fungus with glucose as carbon source [30,32]. In a shaken flask cultivation, most microorganisms will grow exponentially until the stationary phase, where active growth ceases due to nutrient scarcity and other biologically imposed limits. The metabolic response of the cells is expected to be different in each growth phase, and therefore the growth rate of *A. sydowii* in different salinities was determined to establish the time needed to analyze the osmolyte content (Figure 1A). The duration of the growth phases was different between the tested conditions, reinforcing the notion that there are three different biological scenarios: the fungus growing under optimal salinity condition, or under either hyperosmotic or hypoosmotic conditions. An initial adaptation (or lag) phase was evident in the condition without NaCl, while this phase was nearly inexistent in the other three conditions. The exponential growth phase lasted until day 9 of culture under the optimal conditions and without NaCl, but only lasted until day 2 at 2.0 M NaCl. The doubling time of *A. sydowii* on 0.5 M and 1.0 M NaCl were 10 and 11 h, respectively, while in the absence of salt and 2.0 M NaCl were 13.5 and 14.6 h, respectively. In further experiments we used 0.5 M NaCl as the optimal salinity condition.

These results confirm that *A. sydowii* is a moderate halophile with optimal growth in the salinity range 0.5 to 1.0 M NaCl (Figure 1A and Supplementary Table S2). Previous reports of marine *A. sydowii* strains isolated from corals reinforce the notion that this fungus thrives in salinities near the seawater NaCl concentration (0.6 M NaCl) [64,65]. In this environment the fungus infects corals causing tissue purpling and galling. Although *A. sydowii* has a terrestrial origin, marine isolates have caused a pandemic that has reduced the coral reef population [64,65]. Nevertheless, terrestrial isolates, as is the case of the strain BMH-0004 analyzed in this study, are not pathogenic to corals [64,65].

Osmolyte accumulation in *A. sydowii* was evaluated at three time points: 5-, 7-, and 11-days post-inoculation, which cover different states of growth under all conditions. Given the unique profiles of the growth curves, it was difficult to determine equivalent physiological states for the cultures. At days 5 and 7, the fungus is in exponential growth phase in the cultures without NaCl or with 0.5 M NaCl. At day 11, all the cultures had reached the stationary phase. In the cultures with 2.0 M NaCl, the exponential growth phase was not sampled because the mycelium grows in a small window of time until a stationary state where the fungus remains viable but ceases to grow (Figure 1A). This pattern is similar to the growth of fungi such as *Rhizopus microsporus* and *A. fumigatus* on nutritionally poor media [66].

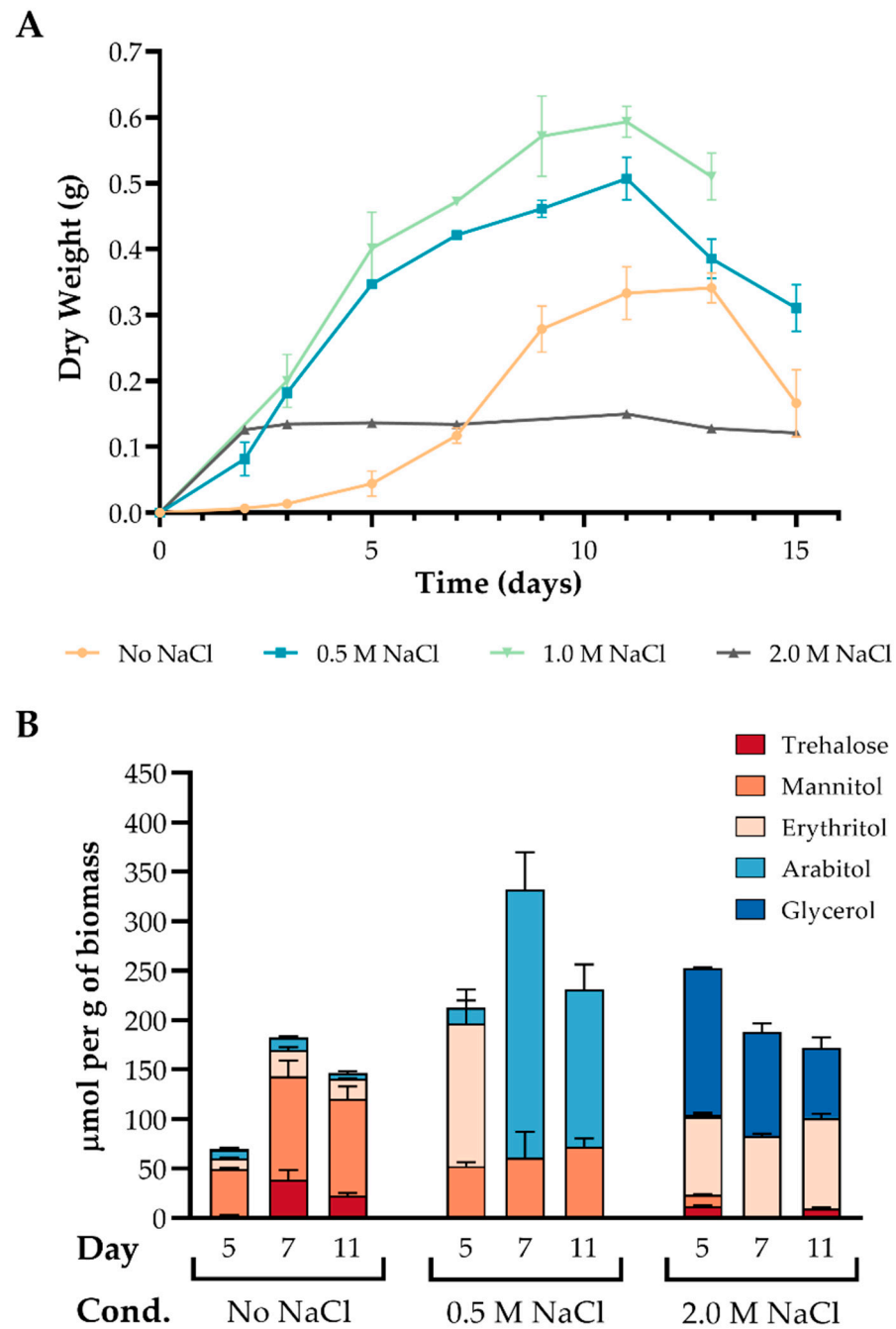


Figure 1. Growth rate of *A. sydowii* (A) and osmolyte accumulation (B) in optimal, hypo- and hyper osmotic conditions. Data are means \pm SD calculated from three independent experiments ($n = 3$). Statistical analyses are detailed in Supplementary Table S3.

It has been proposed that under osmotic stress, cells respond with an increased synthesis of compatible solutes, regardless of the solute, causing the lowering of water activity [67]. In *A. sydowii* the largest accumulation of compatible solutes (mannitol, erythritol and arabitol) was observed under optimal conditions of growth (Figure 1B). This result contradicts the general notion that osmolytes are mainly accumulated under hyperosmotic conditions and cellular stress [11,67–71]. However, it has been documented that other fungi exhibit higher polyol concentration when growing on their optimal NaCl and KCl concentration [72].

Our results also showed that *A. sydowii* increased the concentration of erythritol and glycerol only when the cells were exposed to hyper-salinity (Figure 1B). In the media with-

out salt, mannitol was the most abundant metabolite followed by trehalose and erythritol. In the optimal condition there is an apparent shift in the physiological accumulation of osmolytes after 5 days of culture, as mannitol and erythritol were present at day 5, while arabitol replaces erythritol at days 7 and 11. Interestingly, glycerol was detected only in the hypersaline condition, followed by erythritol and trace amounts of trehalose and mannitol (Figure 1B). Under a hyperosmotic stimulus, *W. ichthyophaga* also synthesizes glycerol and arabitol [11], while *Trichosporonoides megachiliensis* and *H. werneckii* synthesize glycerol and erythritol [73], and *A. tamari*, *A. montevidensis*, and *A. wentii* synthesize mainly glycerol [72,74,75].

3.2. Transcriptional Profiling of Genes Coding for Osmolyte Synthesis Enzymes

The metabolic pathways of osmolyte synthesis have been described in several fungi including model Aspergilli such as *A. niger*, *A. nidulans*, and *A. fumigatus* [76–80]. However, the genetic regulation of these pathways is diverse, and hence, a characterization of the transcriptional regulation of genes coding for osmolyte synthesis enzymes should be conducted in distinct species and under different conditions. The metabolic pathways leading to the synthesis of the identified osmolytes are depicted in Figure 2, highlighting the enzymes for which transcriptional regulation was evaluated (Figure 3).

Trehalose, a glucose disaccharide, is synthesized from glucose-6-phosphate by two consecutive reactions catalyzed by the trehalose-6-phosphate synthase (TPS) and trehalose-6-P phosphatase (TPP) enzyme complex. In *S. cerevisiae* the genes *tps1* and *tps2* encode the TPS and TPP subunits, respectively, while the genes *tps3* and *tsl1* encode regulatory subunits. In *A. nidulans* the orthologues of the *tps1-3* genes are named *tpsA*, *orlA*, and *tps3*. All three genes contain a glycosyl transferase domain from family 20 (GT 20 domain, pfam: PF00982), while *orlA* and *tps3* additionally contain a TPP domain (pfam: PF02358). *A. nidulans* has also a heat shock trehalose synthase gene (*stps*) that has been found in Aspergilli, a homolog of the *Neurospora crassa ccg-9* gene which encodes a trehalose synthase with a glycosyl transferase family 1 domain, and a trehalose-6-P phosphatase gene containing only the TPP domain, which is putatively involved in the synthesis of trehalose from trehalose-6-P. The *A. sydowii* homologs of these genes are listed in Supplementary Table S4.

Among the tested metabolites in *A. sydowii*, we found that trehalose was accumulated to a lesser extent (Figure 1B). The highest intracellular concentration of trehalose occurred without NaCl at day 7 (38 $\mu\text{mol/g}$) and it was also produced in the condition with 2.0 M NaCl (at days 5 and 11). As shown in Figure 3, this is consistent with the expression of the *stps* trehalose synthase gene, which was upregulated in both extreme conditions, but downregulated in optimal salinity. The *ccg-9* gene has the same expression pattern but with lesser differential expression among the conditions (Figure 3A).

Trehalose is suggested to function as a reserve carbohydrate, as an osmo-protectant, or for protection against protein denaturation by dehydration [81,82]. For example, spores that have a high content of trehalose are more resistant to temperature stress, dehydration, freezing, oxidizing agents, or starvation [81,83–86]. *A. nidulans* and *S. cerevisiae* mutants lacking the *tps1* gene are also less thermo- and halotolerant [69,86,87]. Nevertheless, *tps* genes are also involved in the regulation of cell wall structure by modulating chitin synthase activity [88–91], hence the effect of these genes might intertwine both physiological responses. In *A. sydowii*, the low amount of accumulated trehalose and the high differential expression of the *stps* and *ccg-9* genes suggest that they are involved in stress responses other than trehalose synthesis.

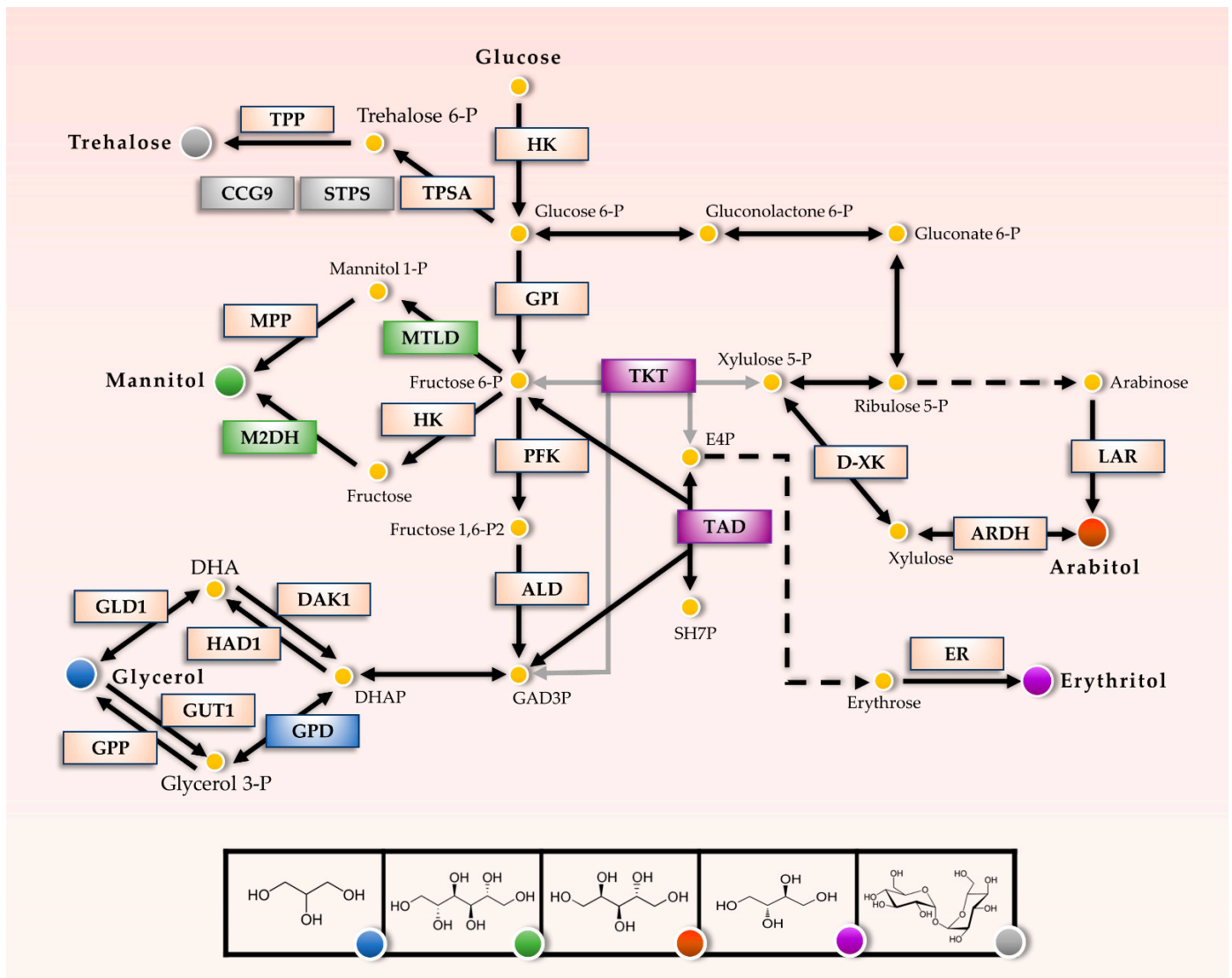


Figure 2. Pathways for the synthesis of metabolites with possible osmolyte functions in response to salinity. The pathway has been modified from the *Aspergillus nidulans* KEGG pathway. Enzymes involved in the regulation of osmolyte concentration and depicted with the color grey: trehalose pathway; green: mannitol; blue: glycerol; purple: erythritol, and red: arabitol were evaluated by qPCR. The enzymes depicted in light orange were not evaluated. TPSA (Trehalose phosphate synthase), STPS (Heat shock trehalose phosphate synthase), CCG-9 (Trehalose phosphate synthase), TPP (Trehalose-6-P phosphatase), MTL D (Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase), M2DH (Mannitol 2-dehydrogenase), MPP (Manitol/Hexitol phosphatase), HK (Hexokinase), GPI (Phospho-glucose isomerase), PFK (Phospho-fructokinase), ALD (Aldolase), GPD (Glycerol-3-P dehydrogenase), GPP (Glycerol-3-P phosphatase), GUT1 (Glycerol-kinase), HAD1(Halo-acid dehalogenase), DAK1 (Dihydroxyacetone kinase) GLD1 (Glycerol dehydrogenase). TKT (Transketolase), TAD (Trans-aldolase), LAR (L-arabinose), ARDH (L-arabinitol dehydrogenase), D-XK (D-Xylose Kinase), ER (Erythrose reductase).

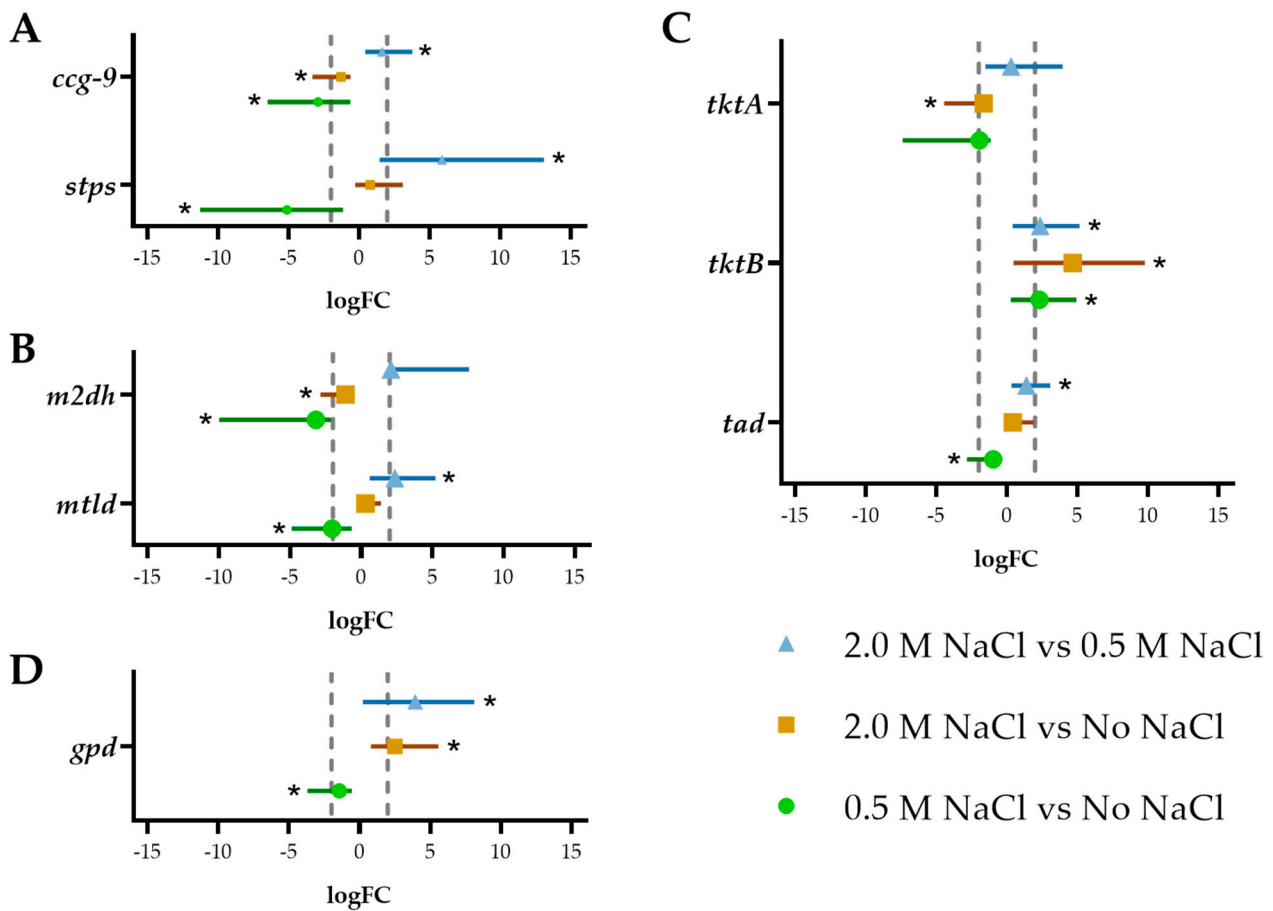


Figure 3. Expression analysis of transcripts related to osmolytes synthesis of *A. sydowii* in different salinities after 7 d of culture. The values correspond to the average and standard deviations of three biological replicates ($n = 3$) and two technical qPCR replicates. Analyzed genes were grouped according to the pathway: (A) Trehalose synthesis, (B) Mannitol synthesis, (C) Pentose phosphate pathway (for arabinol and erythritol synthesis) and (D) Glycerol synthesis. Statistical significance (*) was assessed by a randomization test performed with the software Rest [46]. The dashed vertical lines correspond to a cutoff $\logFC = 2$.

The most common pathway of mannitol biosynthesis in filamentous fungi is the conversion from fructose-6-P to mannitol-1-P by the mannitol-1-P dehydrogenase and subsequently the dephosphorylation to obtain mannitol [92]. An alternative pathway converts fructose to mannitol by the mannitol dehydrogenase. In *A. nidulans* the genes encoding these enzymes are named *mtld* and *m2dh*, respectively. The patterns of expression of *mtld* gene and trehalose synthase genes were similar, showing higher expression in extreme conditions when compared to optimal salinity (Figure 3B). However, *mtld* expression did not correlate with mannitol accumulation particularly without NaCl or 0.5 M NaCl. The *m2dh* gene, on the other hand, is highly expressed in the condition without NaCl, but it is downregulated in 0.5 M NaCl (Figure 3B). The expression pattern of these genes does not account for the accumulation of mannitol in 0.5 M NaCl.

Although mannitol has been found in high abundance in several fungal species, accumulating evidence suggests that it is not required in all fungi for osmotic stress protection, oxidative stress prevention, or sporulation [92]. Therefore, while its role in fungal physiology is not completely clear, mannitol is not an essential polyol in fungi [93]. In *A. sydowii*, mannitol accumulation might result from active growth metabolism, as it does not seem to be regulated by salt stress response mechanisms.

As mentioned before, glycerol is the canonical osmolyte produced under hyperosmotic stress by many microorganisms. Glycerol is produced by two routes from the dihydroxyacetone phosphate (DHAP) obtained during glycolysis. The first pathway involves the

conversion of DHAP to glycerol-3-P by the glycerol-3-P dehydrogenase (GPD) enzyme, which is the main regulatory point in the glycerol pathway. Glycerol-3-P is then converted to glycerol by the glycerol-3-P phosphatase (GPP), while the opposite reaction is catalyzed by the glycerol-kinase (GUT1). The alternative pathway involves the conversion of DHAP to dihydroxyacetone (DHA) by a halo-acid dehalogenase (HAD1) and the subsequent conversion to glycerol by the glycerol dehydrogenase (GLD1).

In *A. sydowii* the *gpd* gene was highly expressed under hyperosmotic conditions, but not under the optimal salinity (Figure 3D). This coincides with the glycerol accumulation in 2.0 M NaCl. In fact, the *gpd* gene was downregulated in the optimal condition when compared to the condition without salt. This reinforces our hypothesis that osmotic stress responses are not taking place when *A. sydowii* is grown under optimal salinity but occur only under the hyperosmotic stress induced by 2.0 M NaCl.

While trehalose, mannitol, and glycerol are directly under the influence of the regulatory frame of glycolysis, erythritol and arabitol are produced from pentose phosphate pathway intermediates and are therefore produced preferentially in conditions where the energy and redox balance in the cell favors anabolic reactions. Arabitol is produced from L-arabinose by the L-arabinose reductase (LAR) or from L-xylulose by a reversible reaction catalyzed by the L-arabitol dehydrogenase (ARDH). A key enzyme controlling the flux to xylulose is the transketolase which is encoded by the gene *tkt*. In *A. sydowii* we found two homologs of this gene, named *tktA* and *tktB*. The former was downregulated in 2.0 M NaCl, while the latter had an expression that increases with increasing salinity (Figure 3C). Neither of these expression patterns correlated with erythritol or arabitol accumulation.

On the other hand, erythritol is produced from erythrose by the erythrose reductase (ER), which in *A. niger* was identified as an aldehyde reductase with a broader specificity for other five-carbon aldehydes [94]. The first step in the shunt from glycolytic intermediates to erythrose-4-P is carried out by the enzyme trans-aldolase (TAD) and it is, therefore, a possible point of regulation of this pathway. The *tad* gene in *A. sydowii* did not show a high differential expression in the salinity conditions tested, and therefore was not analyzed further.

Compared to glycerol, erythritol has lower hygroscopicity and antioxidant properties [73]. Both low-molecular-weight polyols are more effective in osmotic protection than mannitol or arabitol, which have higher molecular size. Some studies have reported that osmolytes with higher-molecular-weight can even inhibit enzymatic activity as compared with the same concentration of glycerol [67,95,96]. Besides, there is an added “carbon cost” in the synthesis of larger osmolytes, which the cell may not afford if it is under stress.

Consistent with our results, *Hortaea werneckii*, *Penicillium chrysogenum*, and some *Aspergilli* also accumulate mannitol, arabitol, and erythritol at the optimal growth condition. However, a contrasting observation with our results was obtained for *A. oryzae*, *A. Fischeri*, and *A. niger*, where trehalose was the most abundant osmolyte [3,97]. As indicated, mannitol was the most abundant polyol in *A. sydowii* BMH004, found in different days of growth, both in absence of salt and under optimal salinity (Figure 1B). Consistently, in *P. chrysogenum* and *A. niger* in the absence of salt, mannitol is accumulated in greater proportion, and arabitol is only detected in minimal quantities [97]. It is known that this polyol can protect against the inactivation of enzymes by heat [98], but due to its limited solubility and tendency to crystallize, mannitol provides little protection against osmotic stress and freezing [99–101].

In contrast, at higher salinity *H. werneckii* (4.28 M NaCl) and *W. ichthyophaga* (4.25 M NaCl) accumulate mainly glycerol and lower amounts of erythritol [9,11]. Our results show that *A. sydowii* accumulated both polyols in similar concentrations (82.9 and 105.27 $\mu\text{mol/g}$ at day 7) when the fungus is growing at 2.0 M of NaCl (Figure 1). In several reports of different yeasts and fungi, glycerol was the main solute accumulated in response to hyperosmotic stress [102,103]. For instance, *Yarrowia lipolytica* also accumulates erythritol in higher concentrations than mannitol when exposed to high osmotic pressure [104].

3.3. Dynamics of Compatible Solutes Accumulation after Hypoosmotic or Hyperosmotic Shock

In model fungi, the accumulation of compatible solutes has been analyzed during hyperosmotic or hypoosmotic shock but there are few studies analyzing halophile fungi growing under optimal salinity conditions and changed to osmo-stressful conditions [105,106]. Here we have termed these as stress-inducing shocks to highlight the difference from hyperosmotic and hypoosmotic shocks between non-optimal growth conditions. We evaluated the accumulation of polyols and trehalose when *A. sydowii* was growing with 0.5 M NaCl and then exposed to a medium without salt or with 2.0 M NaCl.

After a hyperosmotic shock, *S. cerevisiae*, *H. werneckii*, and *W. ichthyophaga* prevalently accumulate glycerol. However, in *A. sydowii* cells under stable salinity conditions, we observed that the accumulation of glycerol occurred only at 2.0 M NaCl. This leads to questions as to whether glycerol or other osmolytes will be produced if mycelium is shifted from hypoosmotic conditions (without NaCl) to optimal salt conditions (0.5 M NaCl), which presumably do not represent a stressful condition for this fungus. Therefore, we determined the accumulation of compatible solutes of *A. sydowii* when exposed to hypoosmotic, hyperosmotic, and stress-inducing osmotic shocks.

When cultures without NaCl were transferred to 0.5 M NaCl (Figure 4), the fungus responded after 2 h with a spike in the concentration of erythritol and arabitol, which diminished after 8 h to the levels encountered in mycelia cultured at 0.5 M NaCl. Trehalose and mannitol levels did not change, and glycerol was not produced, even though similar salinities induce its accumulation in other non-halophile Aspergilli such as *A. nidulans* and *A. niger* [4,107]. In contrast, the shifting of cultures without NaCl to 2.0 M NaCl induced a small glycerol accumulation after 8 h and a progressive decrease of mannitol concentration. This osmotic shock induced the expression of both *stps* and *ccg-9* genes (Figure 5), which did not correlate with trehalose accumulation. The gene *m2dh* did not change its expression, while the *mtld* gene was downregulated after the shock, coinciding with the decrease of mannitol concentration. The *gpd* transcripts were detected transiently between 2 and 8 h, which also coincides with the increase in glycerol after 8 h. These observations are different than in studies performed in *S. cerevisiae* and *D. hansenii*, and others, where the intracellular concentration of glycerol increased after 30 min when the cells were exposed to a moderate osmotic shock (without salt to 0.5 M of NaCl) [54,108–110].

After a hypoosmotic shock from 2.0 M NaCl to a medium without salt, trehalose was detected as early as 10 min, while glycerol rapidly disappeared, but there were not dramatic changes in total osmolyte concentration (Figure 4). Under this shock, the *ccg-9* gene was upregulated soon after, while the *stps* gene was downregulated after 8 h and the *gpd* transcript levels decreased progressively (Figure 5). These changes alone do not explain the dynamics of trehalose and glycerol but are consistent with the physiological response of the mycelium in this scenario. When the hypoosmotic shock was from 2 M NaCl to a medium with 0.5 M NaCl, fluctuations were more evident, as erythritol concentrations spiked after 2 h and glycerol initially disappeared and later spiked also after 2 h from the shock. There was a spike of trehalose 48 h after this treatment for which we have no plausible explanation.

Our results indicated that, when changed to a condition without salt, the concentrations of mannitol and arabitol spiked transiently at 2 h and returned to approximately the initial level after 24 h (Figure 4), which coincided with an initial upregulation of *m2dh* and to a lesser extent *tktB* (Figure 5), but these might not be responsible for the observed osmolyte dynamics. The concentration of glycerol spiked at 8 h (263 $\mu\text{mol/g}$ dry mass) and was still detected 48 h after this hypoosmotic shock, coinciding with the transient upregulation of *gpd* (Figure 5). The activation of *gpd* gene and the subsequent production of glycerol is not generally regarded as a response to hypoosmotic shock, but in this case, it highlights the notion that this mechanism is associated with osmotic stress regardless of the direction of the stimulus.

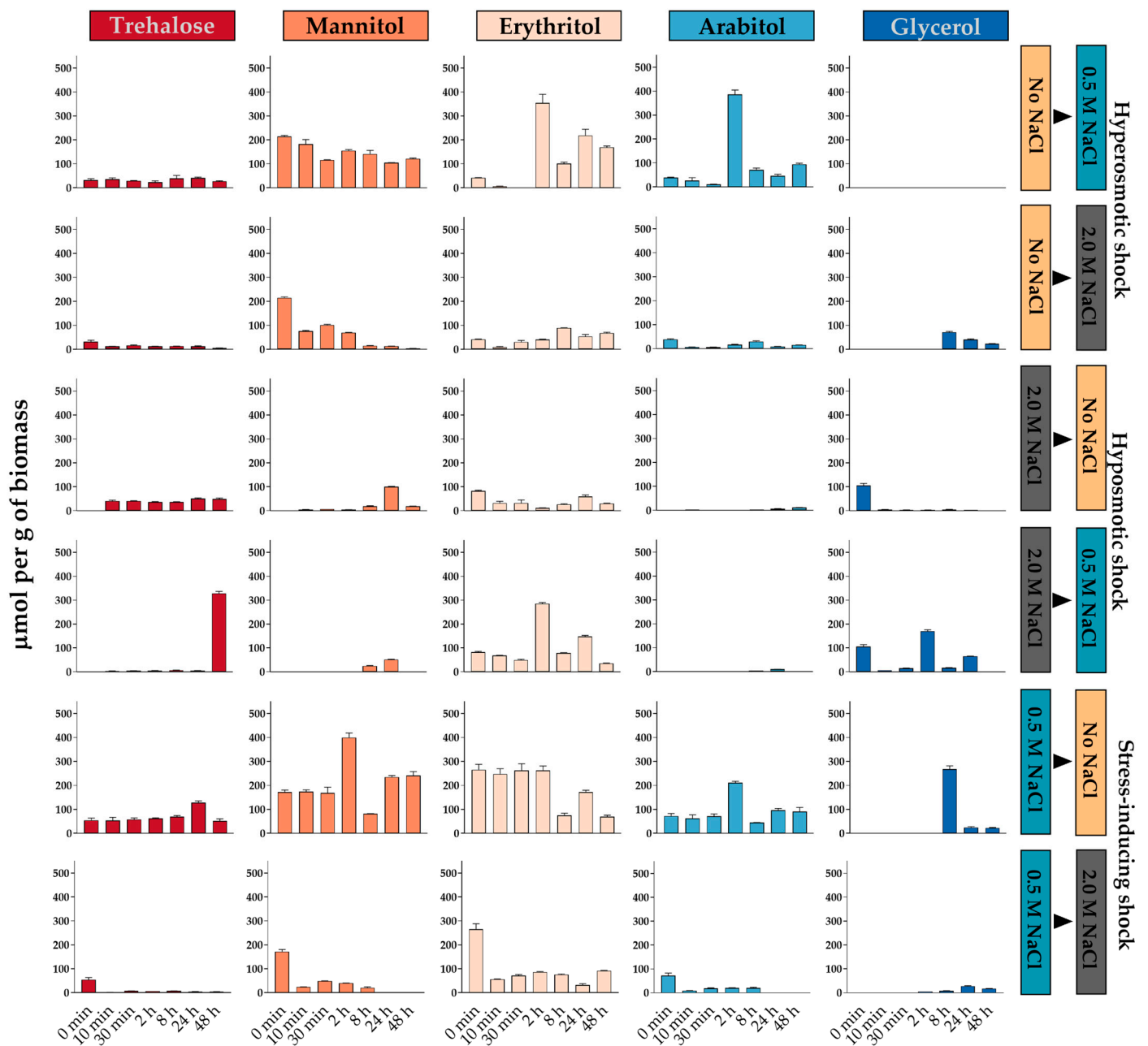


Figure 4. Accumulation of compatible solutes in *A. sydowii* after different osmotic shocks. The labels on the right indicate the culture conditions before and after the osmotic shock. The data represent the average and standard deviation of at least three replicates ($n = 3$). Statistical analyses of the data are summarized in Supplementary Table S5.

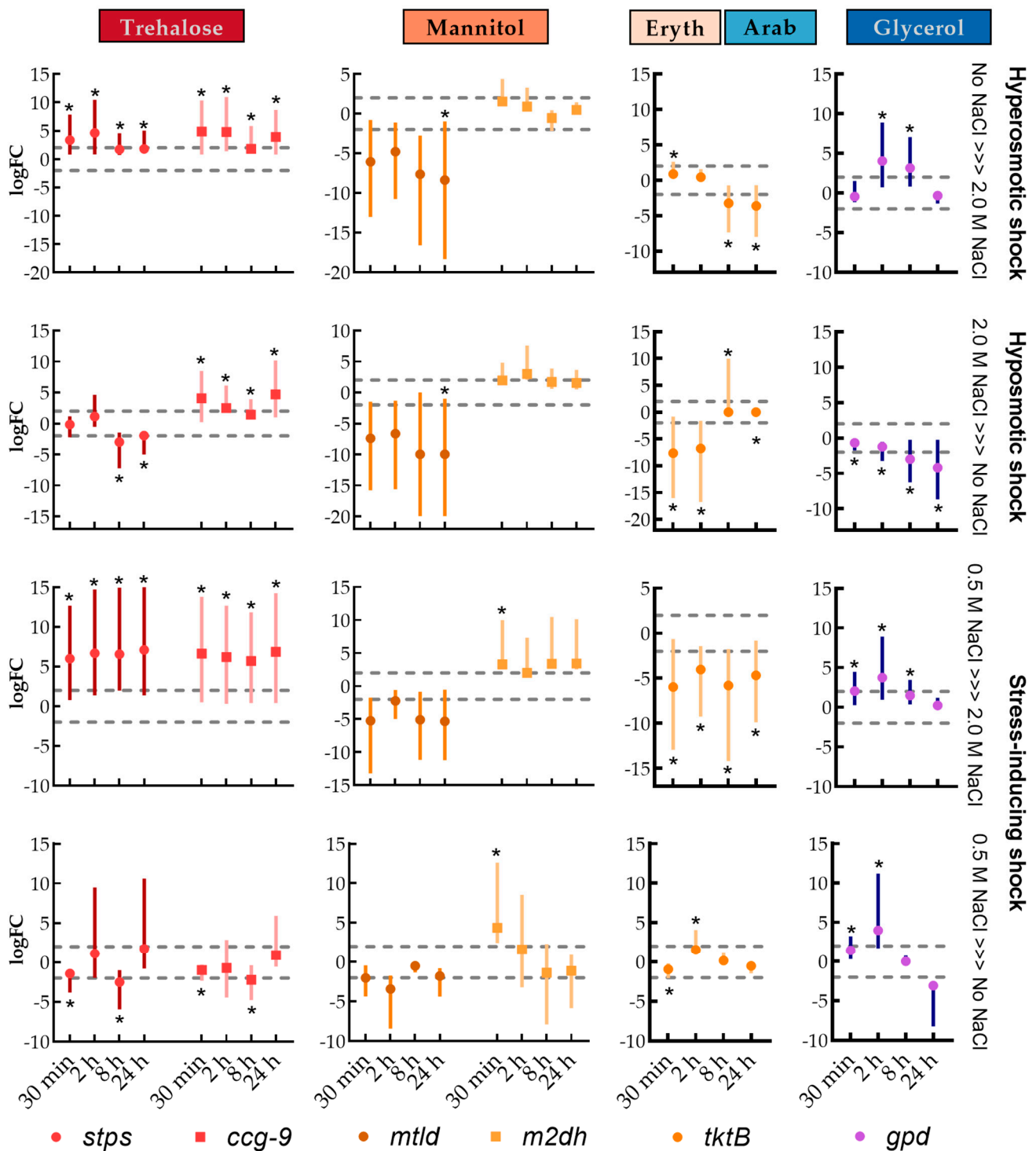


Figure 5. Transcriptional regulation of enzyme genes involved in the synthesis of osmolytes after hyperosmotic shock, hypoosmotic shock, and stress-inducing shock. The values correspond to the average and standard deviations of three biological replicates ($n = 3$) and two technical qPCR replicates. The statistical significance (*) was assessed by a randomization test performed with the software Rest [46]. The dashed horizontal lines correspond to a cutoff $\logFC = \pm 2$.

When changed from the optimal salinity to the hypersaline condition, instead of the expected increase in the concentration of compatible solutes, there was a reduction in trehalose, mannitol, erythritol, and arabinol and only a slight increase in glycerol (Figure 4). The *mtld* and *m2dh* genes were highly upregulated shortly after the shock, and remained so even after 24 h, which does not explain mannitol dynamics. The *tktB* gene was significantly

downregulated shortly after the hypoosmotic shock, which might account for the reduction of erythritol and arabinol. The *gpd* gene was transiently upregulated between 30 min and 8 h after the shock, preceding the small surge of glycerol in this condition (Figure 5). The physiological responses of *A. sydowii* to hyperosmotic changes in the medium are similar in terms of accumulated osmolytes and enzyme gene regulation but are counterintuitively more pronounced in the change from 0.5 M NaCl than from the medium without salt.

Altogether, these observations show that the response of this fungus is different from other halotolerant and halophile model fungi. Moreover, we observed that the accumulation of glycerol in *A. sydowii* is a response to hypersaline stress more than a response to salinity, as we have previously proposed [29].

3.4. Hog Phosphorylation Response to Osmotic Shock

Using several model organisms, it has been established that the HOG pathway coordinates responses to cellular osmotic stress. In *S. cerevisiae* and *D. hansenii*, the activation of this pathway leads to the transient phosphorylation of Hog upon a hyperosmotic shock [111]. In *H. werneckii*, the *hog* gene is duplicated while the protein phosphorylation dynamics is similar to Hog1p from *S. cerevisiae* [18]. However, in *W. ichthyophaga*, the HOG system responds in the opposite direction, since the kinase is phosphorylated in the lowest salinities and is transiently dephosphorylated when the cells were exposed to a hypersaline medium [11,18,112]. These diverse signaling pathway configurations suggest that the HOG system is a key component of the mechanisms of adaptation to salinity and other stress-inducing conditions. Therefore, we studied the responses of the *A. sydowii* Hog orthologues to salinity stress.

Few fungi, like several Aspergilli, have more than one copy of the Hog MAPK [113]. For example, *A. nidulans* has two orthologues of the *S. cerevisiae* Hog1p, named SakA/HogA and MpkC. The former is responsible for most of the osmo-protective stress responses in *A. nidulans*, while the latter is involved in conidiation and oxidative stress response [113]. Interestingly, *A. sydowii* has a third copy of the Hog MAPK that cannot be found in its close relatives *A. versicolor* and *A. mulundensis*. Here we named these MAPKs as Hog1, Hog2, and MpkC, which respectively have protein identifiers 141488, 372814, and 47278 in the published *A. sydowii* CBS 593.65 genome (Figure 6A). All three orthologues have complete protein kinase (PK) domains and the conserved TGY phosphorylation site (Figure 6B), which implicates that they could be phosphorylated and biologically active. This allowed us to detect the phosphorylation of the *A. sydowii* MAPK orthologues using antibodies with cross-reactivity to the *S. cerevisiae* Hog1p.

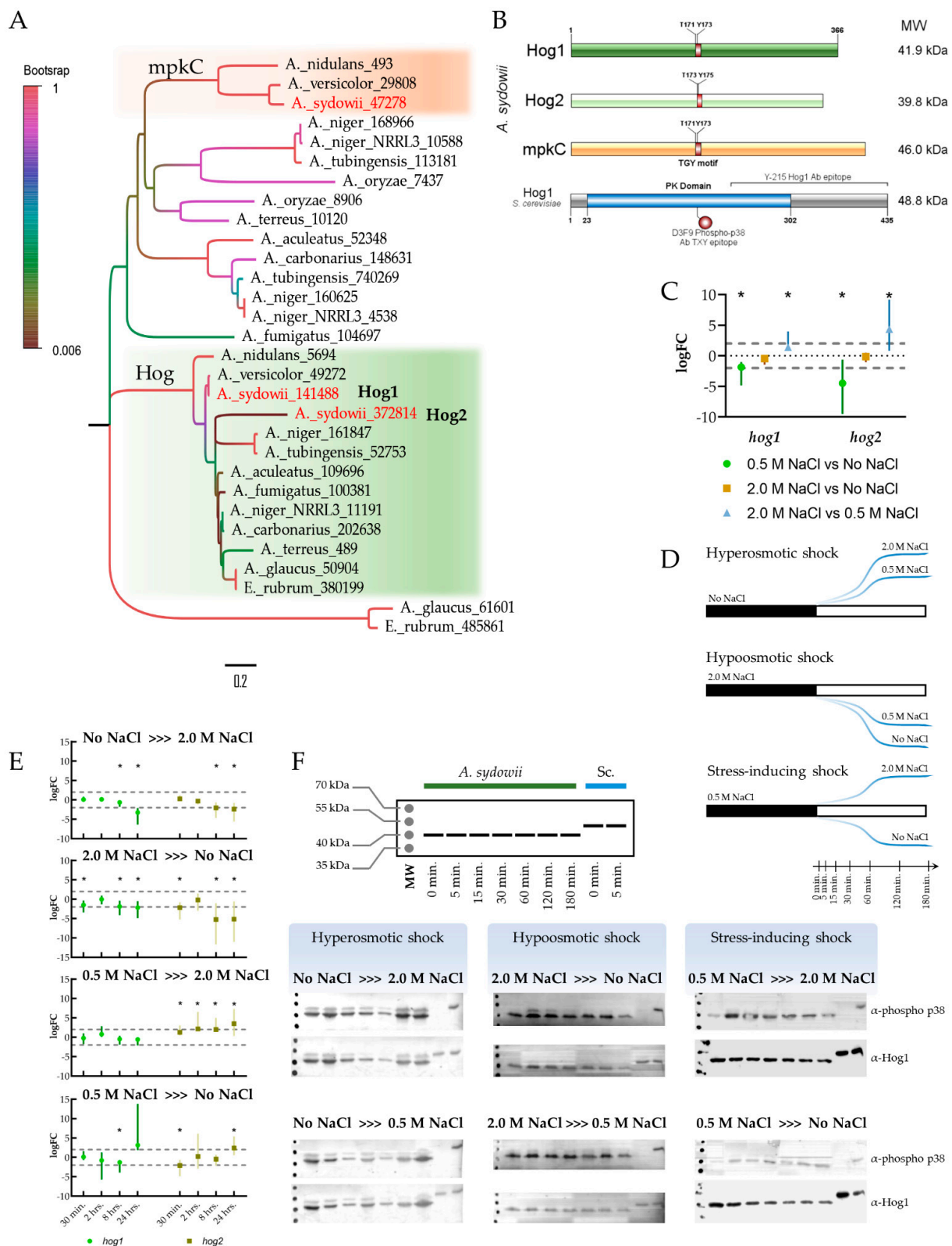


Figure 6. Hog MAPK system in *A. sydowii*. **(A)** Reconstruction of MAPK phylogeny in selected Aspergilli, including Hog1, Hog2, and MpkC genes of *A. sydowii*. A more extensive phylogenetic tree can be observed in Supplementary Figure S3. **(B)** Hog gene homologs on *A. sydowii* showing protein size, molecular weight, conserved phosphorylation motifs, protein kinase (PK) domain, and the region corresponding to Y-215 and D3F9 recognized by the antibodies used to detect phosphorylated and total Hog, respectively, by Western blot. **(C)** Relative expression of *Hog1* and *Hog2* transcripts in salt-adapted *A. sydowii* growing without NaCl, 0.5 M or 2.0 M NaCl, representing the average and standard deviations of

three biological replicates ($n = 3$) and two technical qPCR replicates. (D) Diagram of the shock conditions used to test the phosphorylation dynamics of Hog1 and Hog2 (E) Relative expression of *Hog1* and *Hog2* transcripts after osmotic shock in *A. sydowii*, representing the average and standard deviations of three biological replicates ($n = 3$) and two technical qPCR replicates. The statistical significance (*) was assessed by a randomization test performed with the software Rest [46]. The dashed horizontal lines correspond to a cutoff $\log_{2}FC = \pm 2$. (F) Phosphorylation of Hog MAPK homologs after different osmotic shocks. Extracts from *S. cerevisiae* cultures shifted from a medium without NaCl to a medium with 1.0 M NaCl were used as positive controls for Hog1 phosphorylation.

The transcript levels of the *Hog1* variant might be higher than those of *Hog2*, according to previous RNA-seq experiments (Supplementary Figure S4) [29]. More important, the expression of both genes was similar under stress conditions (No NaCl or 2.0 M NaCl) but was lower under optimal salinity conditions (Figure 6C). This effect was more pronounced for *Hog2*, suggesting that this variant might play a more significant role in the salt stress response.

We have established that the conditions without NaCl or with 2.0 M NaCl induce stress responses in *A. sydowii* [29]. Therefore, changing the mycelium from media with 0.5 M NaCl to another condition induces stress responses, which might be different from hyperosmotic or hypoosmotic shock responses. A schematic representation of those experimental variations can be observed in Figure 6D. The differential expression of *Hog1* and *Hog2* under these scenarios showed that both genes were downregulated after hyper- or hypoosmotic shocks (Figure 6E), reducing the transcript abundance after long time periods (8 to 24 h post-stimulus). Again, this effect is more pronounced for *Hog2* gene variant than for *Hog1*. In contrast, *Hog2* gene expression is mostly upregulated after stress-inducing osmotic shocks, while *Hog1* expression is not significantly perturbed.

The phosphorylation of Hog MAPK variants was analyzed by Western Blot from 5 min to 3 h after an osmotic stimulus and compared to the phosphorylation dynamic of Hog1p in *S. cerevisiae* (Figure 6F). The independent patterns of Hog1/Hog2 phosphorylation could not be discerned with this experiment as the bands corresponding to both protein products overlapped. Conversely, a higher molecular weight band, below of *S. cerevisiae* Hog1p could correspond to the MpkC variant, according to its molecular weight prediction.

Both or at least one of the Hog1/Hog2 proteins were phosphorylated constitutively in the conditions without NaCl or in 2.0 M NaCl, and to a lesser extent in the 0.5 M NaCl optimal condition. Such phosphorylation status did not change upon hyper- or hypoosmotic shocks, but increased when cells were exposed to stress-inducing osmotic shocks considering the growth optimal condition. These changes were not transient, though, indicating that a sustained phosphorylation of Hog is the normal status of this signaling system in *A. sydowii*. Interestingly, MpkC protein was produced in detectable amounts only in the condition without NaCl where it was constitutively phosphorylated. It remained phosphorylated even after a hyperosmotic shock. In contrast, this protein was transiently phosphorylated upon hypoosmotic shock, especially from 2.0 M NaCl to the medium without NaCl.

The phosphorylation of Hog1p in *S. cerevisiae* and its homolog in *D. hansenii* occurs transiently and immediately after a mild stress stimulus, and persists up to half an hour in both models [54,114]. In contrast, in *D. hansenii* a prolonged Hog1 phosphorylation state was observed in cells subjected to a severe osmotic stress [54,114,115]. Interestingly, the phosphorylation of Hog1 remained after cells adapted to severe osmotic stress were subjected to a hypoosmotic shock [114,115].

Taken together, these results might indicate that the biological activity of Hog1/Hog2 is regulated transcriptionally, while regulation of their activity by phosphorylation is not evident, as they could not be discriminated by Western Blot. The HOG system in *A. sydowii* is responding to osmotic conditions that induce cellular stress, since the presence of salt in optimal concentrations did not seem to regulate transcript abundance or phosphorylation status of either of the Hog proteins. On the other hand, the Hog homolog MpkC was responsive to hypoosmotic shock. The interplay of these MAPKs on the regulation of

salinity and stress responses should be studied further, as it does not follow the dynamics of other HOG systems in halotolerant or halophile model microorganisms.

3.5. Na^+/K^+ Ratio in *A. sydowii*

Eukaryotes also compensate osmotic imbalance through intracellular regulation of potassium and sodium ion levels [116], which has been as well observed in halophilic and halotolerant fungi [28,102,117–119]. Intracellular sodium ions are potentially toxic for eukaryotic cells, as they can inhibit numerous metabolic reactions and change cell membrane potential and transport systems [120,121]. Therefore, as the extracellular amount of sodium increases, the cells of halotolerant and halophile microorganisms increase the number of cation transporters to maintain a high K^+/Na^+ ratio [117,122]. Intracellular potassium is required in these conditions to sustain the potential across the plasma membrane, compensating for osmotic imbalance and the negative charges of macromolecules. Potassium is also involved in the regulation of protein synthesis and function [123,124].

In the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*, used here as a control, the increase of extracellular sodium triggered the accumulation of potassium inside the cell. At 0.5 M NaCl, the K^+/Na^+ ratio was ten times smaller than in the media without NaCl (Figure 7). Increasing the extracellular concentration to 2.0 M NaCl, a four-fold increase with respect to the condition with 0.5 M NaCl, reduced the K^+/Na^+ ratio ten-fold. In contrast, *A. sydowii* does not seem to have the same compensatory mechanisms to regulate intracellular cation concentrations when growing in the medium with 0.5 M NaCl. In this condition the K^+/Na^+ ratio decreased almost twenty times compared to the medium without salt. A higher concentration of NaCl apparently triggered the accumulation of potassium or the removal of sodium, as the K^+/Na^+ ratio rose by two- to four-fold in the medium with 2.0 M NaCl compared to 0.5 M NaCl (Figure 7). This indicates that, as a consequence of salinity stress, the transport systems that regulate K^+ uptake and Na^+ extrusion were upregulated or activated [119], whereas this was not a requirement for the proper functioning of *A. sydowii* cells under optimal salinity. In this regard, this moderate halophile fungus has a different K^+/Na^+ accumulation pattern as compared to *S. cerevisiae* or other halotolerant fungi such as *D. hansenii* or *Debaryomyces nepalensis* when exposed to increasing concentrations of sodium [118].

3.6. Stress Induces Changes in the Redox State of *A. sydowii*

Fungi and plants are prone to generate Reactive Oxygen Species (ROS) in the presence of a high salt concentration [125–129]. There is a causal link between salinity and potential oxidative stress, which is the result of the unbalanced generation vs. scavenging of ROS [128–130]. Whereas ROS are generated as normal by-products of aerobic metabolism, their accumulation alters the balance between oxidized and reduced glutathione. High ROS levels can damage macromolecules such as lipids, proteins, and nucleic acids, which can lead to cell death [131], although there is also evidence that ROS are signaling molecules that can regulate growth and cell differentiation [132,133]. However, to our knowledge, there is no evidence linking ROS levels and halophile fungi adaptation to extreme salinities. Therefore, we investigated oxidative and antioxidant responses of *A. sydowii* (lipoperoxidation, protein oxidation, GSH and SOD activity levels), under different salinity conditions. Hydroperoxides were not detected under our experimental conditions, perhaps because cells were already adapted at the tested times. As shown in Figure 8, SOD activity (percentage) and GSH concentration were higher when the fungus was growing in 2.0 M of NaCl reaching 11.2% on day 11 and 290.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on day 5, respectively (Figure 8). On day 11, SOD activity increased significantly (7.4%) when the fungus was growing without salt as compared with the optimal growing condition (0.5 M NaCl). Meanwhile, GSH was accumulated significantly at 2.0 M NaCl, with the lowest accumulation in the optimal growth condition (115–145 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 8). The protein advanced oxidation products (PAOPs) were accumulated only in the hypersaline condition (2.0 M NaCl) reaching up to 101.2 μM on day 5, suggesting that this is the most stressful condition for *A. sydowii*.

Malondialdehyde (MDA) accumulated at similar levels in all conditions by day 5 and 11. However, on day 7 there was an inverse correlation between MDA levels and the presence of salt. MDA is a byproduct of polyunsaturated fatty acid peroxidation mediated by free radicals or by lipoxygenases [134,135]. The heat map in Figure 8 shows that antioxidant mechanisms were reduced under optimal salinity as compared to hypoosmotic and hyperosmotic conditions. These results indicate that non-optimal salinity growth conditions (0 and 2.0 M NaCl) favor a higher production of ROS, in contrast to what is observed under optimal growth conditions (0.5 M NaCl). This is consistent with the detection of high levels of both antioxidants and oxidative markers in salt-tolerant bacterial isolates from a saline lake cultured in a media with 20% (3.4 M) NaCl and also with the resistance of *H. werneckii* to oxidative stress, which show a correlation between salinity and resistance to oxidative stress [136].

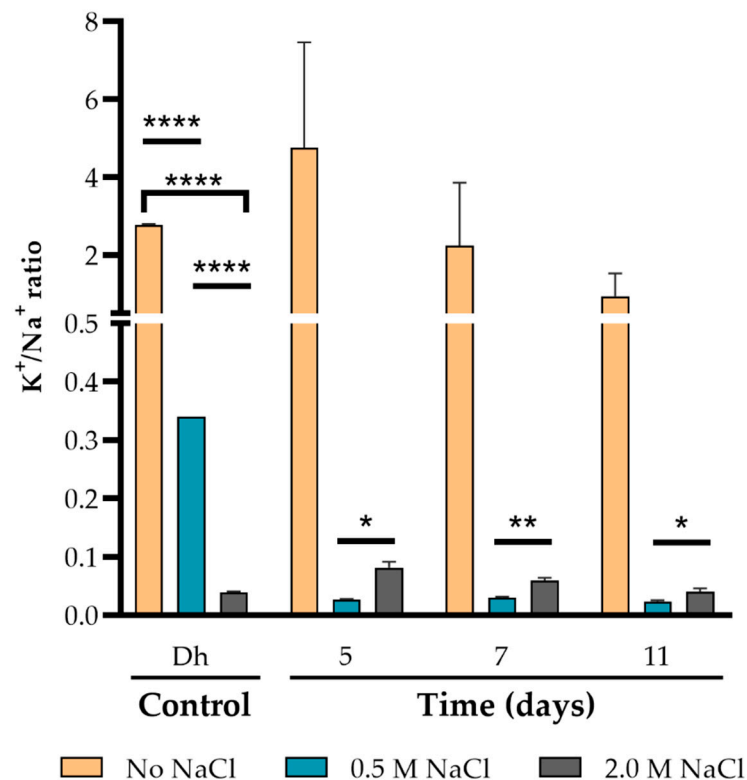


Figure 7. Regulation of intracellular K^+/Na^+ ratio in response to salinity in *A. sydowii* cells. Dh: *Debaryomyces hansenii* was used as a positive control. Data are means \pm SD. Statistical significance was determined using the Holm-Sidak method, with $\alpha = 0.05$. Each row was analyzed individually, without assuming a consistent SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

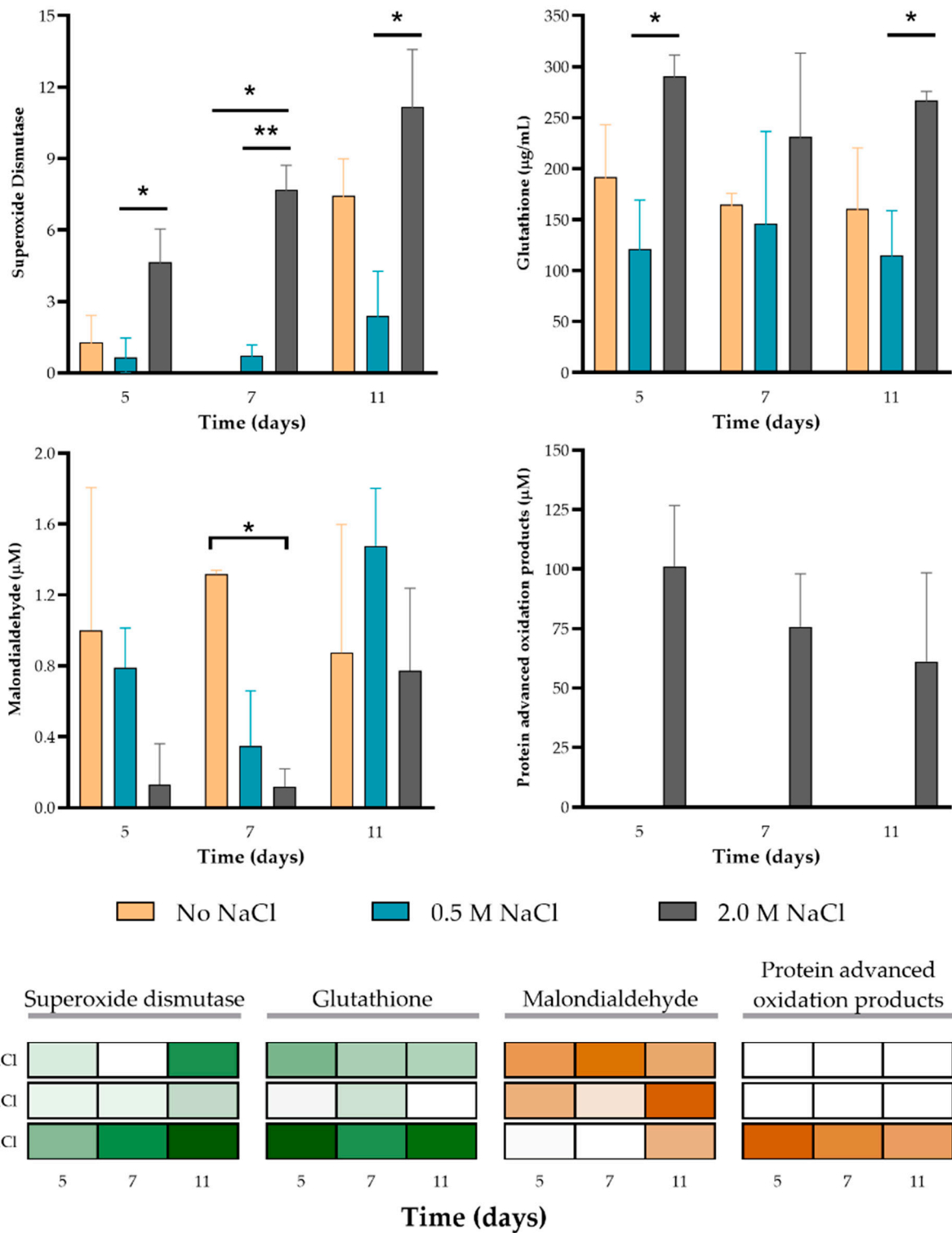


Figure 8. Oxidative stress and antioxidant markers evaluated in *A. sydowii* cultures under stable salinity conditions. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) (antioxidants markers; green in the heat maps), malondialdehyde (MDA) and protein advanced oxidation products (PAOP) (oxidative damage markers; brown in the heat maps) were analyzed. Data are means \pm SD. Bars with the asterisks (*) indicate the significant difference (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) between the control and its respective treated samples. Analyzed by a two-way ANOVA with Tukey’s multiple comparisons test.

Figure 9 shows *A. sydowii* dynamic response of oxidative markers and antioxidants when the fungus was challenged by osmotic stress. The fungus was grown for 7 days in MMG without salt, 0.5 M or 2.0 M of NaCl, then shifted to the other conditions and

oxidative markers and antioxidants were evaluated after 30 min, 2, and 8 h (some time points were the same for the evaluation of compatible solutes and Hog phosphorylation). SOD activity and GSH content were similar when *A. sydowii* was growing without salt or with 0.5 M NaCl (time 0) and those levels were maintained when both conditions were shifted to 2.0 M NaCl. The levels of these antioxidant mechanisms were higher only when the fungus was growing in 2.0 M and they were maintained after shifting to media without salt or with 0.5 M NaCl. Hydroperoxides were not detected at the initial time in any condition, possibly because the fungus was already adapted to the growing media, while their levels increased mainly when *A. sydowii* was shifted to 2.0 M NaCl. These results correlate with PAOP levels, where noticeable changes were observed when the fungus was shifted from a media without salt or 0.5 M NaCl to media with 2.0 M NaCl. There was also an increase in PAOP levels in other conditions, but only after 8 h. After osmotic shock, hydroperoxide was detected at 30 min of the exposure to a new environment only when the starter culture was growing in 2.0 M NaCl. The hydroperoxide was also detected when the starter culture growing in 0.5 M salt was transferred to the hypersaline condition (2.0 M NaCl). Accordingly, protein oxidation was detected after 30 min of exposition to the hypo- or hypersaline media, while MDA levels had an inverse correlation with SOD activity and the GSH levels. When cells growing in the absence of salt were exposed to either 0.5 M or 2.0 M NaCl, they responded with a decrease in the enzymatic (SOD) and non-enzymatic (GSH) antioxidant mechanisms. Strikingly when the cells were exposed to the optimal Na⁺ condition, there was no accumulation of peroxide or oxidized protein. However, there was an increase in lipid peroxidation. In the conditions where the fungus was shifted to a higher salinity (2.0 M), there was more lipid peroxidation; however, this might be due to lipoxygenase (LOXs) activity, which is regulated by abiotic stresses, including high salinity [137], rather than to an unregulated accumulation of ROS. Under this condition, the fungal response was to maintain SOD activity with lower amounts of GSH (around 90 µg/mL).

Previously, whether measurements of antioxidant cellular systems are proper indicators of stress tolerance has been discussed [138]. The effect of oxidative stress can depend on the duplication rate of the fungus and other environmental conditions. The presence of antioxidant mechanisms is a positive indicator of cell's tolerance to salinity [139]. ROS are not only indicators of stress, but also play regulatory roles depending on the cellular concentration. In plants, it has been proved that the expression of some LOXs is regulated by biotic and abiotic stresses including salinity and drought [137] and it is well known that ROS participate as signaling transduction molecules that control several pathways involved in the acclimation of these organisms to stressful conditions [140].

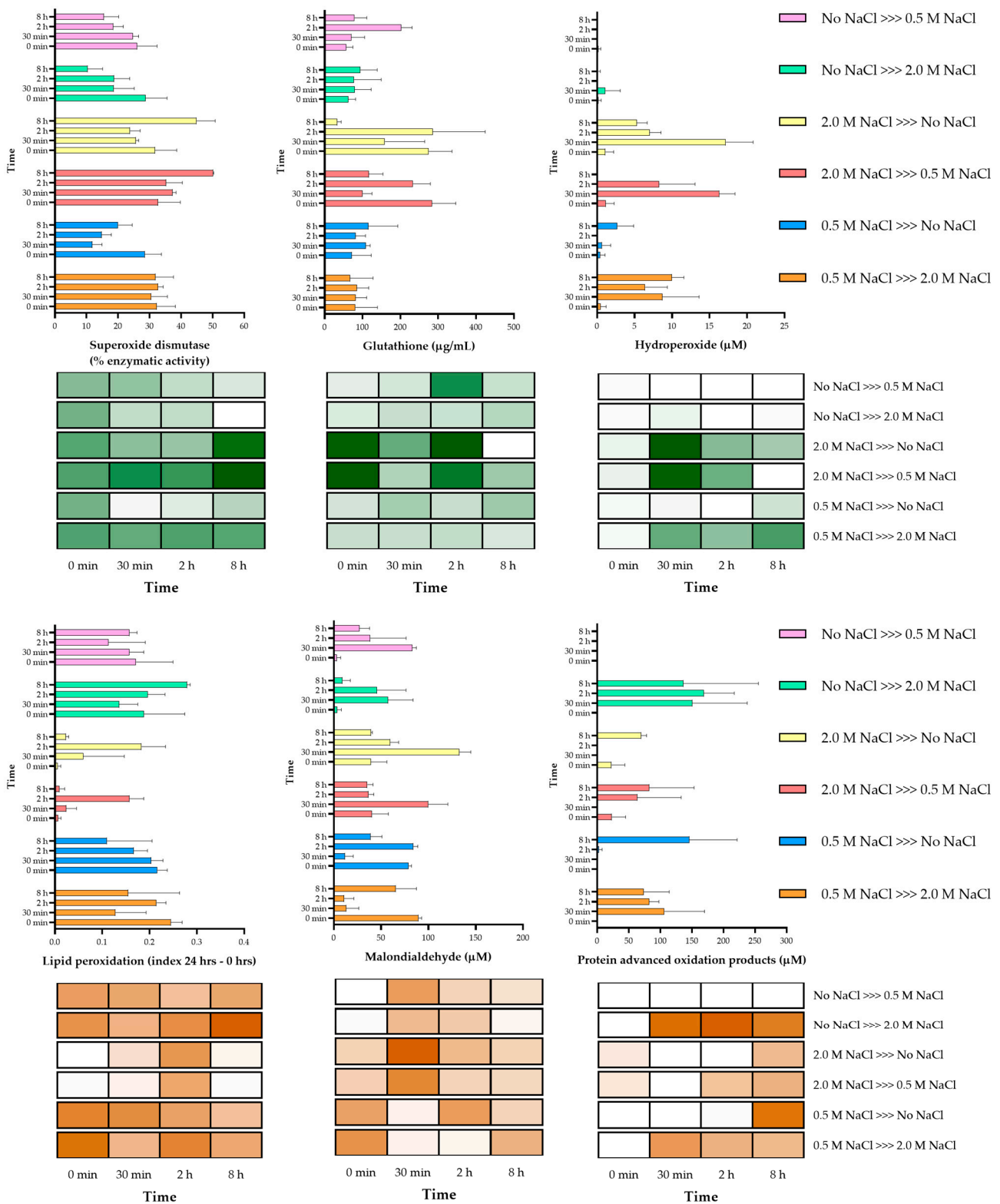


Figure 9. Oxidative stress and antioxidant markers evaluated in *A. sydowii* after osmotic shock. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) (antioxidants markers, green in the heat maps), malondialdehyde (MDA) and protein advanced oxidation products (PAOP) (oxidative damage markers, red in the heat maps) were analyzed. Columns represents the average of at least three replicates, and bars represent the standard deviation. Details of statistical differences are shown in Supplementary Table S7.

4. Conclusions

We have shown that *A. sydowii* displays unique physiological responses when grown under optimal and non-optimal salinity conditions. We found that 0.5 M NaCl, a salt concentration that is stressful for many other fungal species, results an optimal growing condition for *A. sydowii*, a salinity which did not trigger a stress response, and relied on the synthesis of compatible solutes to maintain the osmotic balance. Accordingly, we observed that glycerol-3-P dehydrogenase (*gpd*) gene induction and glycerol accumulation occur only as a response to saline stress, while other osmolytes are accumulated under optimal growth NaCl concentrations. The role of the constitutive phosphorylation of Hog kinase homologs in the accumulation of polyols observed under hypoosmotic conditions remains to be elucidated. However, it indicates a different regulation of the HOG pathway in moderate halophiles. Our results contribute to understand the response of the halophilic fungus *A. sydowii* under diverse saline environments. The establishment of 0.5 M NaCl as the optimal growth condition for this fungus is in accordance with its natural environment as a coral reef pathogen, as in the sea water NaCl concentration is around 0.6 M. This knowledge would also allow implementation of *A. sydowii* culture strategies for potential biotechnological applications, as this fungus is able to degrade hydrocarbons and lignocellulosic materials and can be a source of halotolerant enzymes.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7060414/s1>, Figure S1: Chromatograms of all used standards. Concentration: 5 mg/mL each; Figure S2: Chromatograms of selected samples from all salinity conditions, Table S1: Primer information for qPCR analysis of enzyme genes involved in the synthesis of compatible solutes. Table S2: Growth kinetic parameters of *Aspergillus sydowii* grown at different NaCl concentrations. Table S3: *p* values from statistics analysis performed on experiments shown in Figure 1B. Figure S3: Reconstruction of MAPK phylogeny in selected Aspergilli, including Hog1, Hog2, and MpkC genes of *A. sydowii*. Table S4: Genes encoding compatible solute synthesis enzymes in *A. nidulans* and their homologue genes of in *A. sydowii*. Table S5: *p* values obtained from statistics analysis performed on experiments shown in Figure 4. Figure S4: Expression levels of *hog1* and *hog2* genes. Table S6: *p* values obtained in the statistics analysis performed on experiments shown in Figure 8. Table S7: *p* values obtained in the statistics analysis performed on experiments shown in Figure 9.

Author Contributions: Conceptualization, Y.P.-L., E.C.R.-P., J.L.F.-M. and M.d.R.S.-C.; methodology, Y.P.-L., E.C.R.-P., J.R.T.-V., M.d.R.R.-H., N.S.S., F.P.-G., M.C., O.S., N.d.C.S., A.P., J.A. and M.d.R.S.-C.; software, Y.P.-L., E.C.R.-P., A.S.-R.; validation, Y.P.-L., E.C.R.-P. and J.R.T.-V.; formal analysis, Y.P.-L., E.C.R.-P., R.A.B.-G. and M.d.R.S.-C.; investigation, Y.P.-L., E.C.R.-P., J.R.T.-V., N.S.S., F.P.-G., M.C., O.S.; data curation, Y.P.-L., E.C.R.-P., J.R.T.-V., N.d.C.S. and M.d.R.S.-C.; writing—original draft preparation, Y.P.-L., E.C.R.-P., J.L.F.-M. and M.d.R.S.-C.; writing—review and editing, Y.P.-L., E.C.R.-P., R.A.B.-G., J.L.F.-M., N.S.S., F.P.-G., M.C., N.d.C.S., O.S., J.A., A.P. and M.d.R.S.-C.; visualization, Y.P.-L. and M.d.R.S.-C.; supervision, M.d.R.S.-C.; project administration, R.A.B.-G., J.L.F.-M. and M.d.R.S.-C.; funding acquisition, R.A.B.-G., J.L.F.-M. and M.d.R.S.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was partially financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant CB-250831, to J.L.F.-M.; grant CB-238497 to A.P., grant CB-285816, to R.A.B.-G. and grant-263954, to M.d.R.S.-C.; and by PRODEP grant UAEMOR-PTC-333, to M.d.R.S.-C., Y.P.-L. and E.C.R.-P received scholarship support from CONACyT.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We acknowledge to Nubia Karina Alonso Romero for the administrative support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. Also, 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.

References

1. Margesin, R.; Schinner, F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* **2001**, *5*, 73–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Roberts, M. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Syst.* **2005**, *1*, 1–30. [[CrossRef](#)]
3. Ruijter, G.J.G.G.; Visser, J.; Rinzema, A. Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology* **2004**, *150*, 1095–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Beever, R.E.; Laracy, E.P. Osmotic Adjustment in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **1986**, *168*, 1358–1365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Brown, A.D.; Mackenzie, K.F.; Singh, K.K. Selected aspects of microbial osmoregulation. *FEMS Microbiol. Lett.* **1986**, *39*, 31–36. [[CrossRef](#)]
6. Yancey, P.H. Water stress, osmolytes and proteins. *Am. Zool.* **2001**, *41*, 699–709. [[CrossRef](#)]
7. Burg, M.B.; Ferraris, J.D. Intracellular organic osmolytes: Function and regulation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 7309–7313. [[CrossRef](#)]
8. Oren, A.; Heldal, M.; Norland, S.; Galinski, E.A. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **2002**, *6*, 491–498. [[CrossRef](#)]
9. Kogej, T.; Stein, M.; Volkmann, M.; Gorbushina, A.A.; Galinski, E.A.; Gunde-Cimerman, N. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of osmolytes and melanization. *Microbiology* **2007**, *153*, 4261–4273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Plemenitaš, A.; Vaupotič, T.; Lenassi, M.; Kogej, T.; Gunde-Cimerman, N. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: A molecular perspective at a glance. *Stud. Mycol.* **2008**, *61*, 67–75. [[CrossRef](#)]
11. Zajc, J.; Kogej, T.; Galinski, E.A.; Ramos, J.; Gunde-Cimerman, N. Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 247–256. [[CrossRef](#)]
12. De Nadal, E.; Alepuz, P.M.; Posas, F. Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 735–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Saito, H.; Posas, F. Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **2012**, *192*, 289–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hohmann, S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* **2015**, *61*, 373–382. [[CrossRef](#)]
15. O'Rourke, S.M.; Herskowitz, I. Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 532–542. [[CrossRef](#)]
16. Lee, Y.J.; Jeschke, G.R.; Roelants, F.M.; Thorner, J.; Turk, B.E. Reciprocal Phosphorylation of Yeast Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenases in Adaptation to Distinct Types of Stress. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 4705–4717. [[CrossRef](#)]
17. Oliveira, A.P.; Ludwig, C.; Picotti, P.; Kogadeeva, M.; Aebersold, R.; Sauer, U. Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Mol. Syst. Biol.* **2012**, *8*, 623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Konte, T.; Terpitz, U.; Plemenitaš, A. Reconstruction of the High-Osmolarity Glycerol (HOG) Signaling Pathway from the Halophilic Fungus *Wallemia ichthyophaga* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 901. [[CrossRef](#)]
19. Blomberg, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: Questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *182*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hohmann, S. Osmotic Adaptation in Yeast—Control of the Yeast Osmolyte System. *Int. Rev. Cytol.* **2002**, *215*, 149–187.
21. Mager, W.H.; Siderius, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.* **2002**, *2*, 251–257. [[CrossRef](#)]
22. Klipp, E.; Nordlander, B.; Krüger, R.; Gennemark, P.; Hohmann, S. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 975–982. [[CrossRef](#)]
23. Prista, C.; Almagro, A.; Loureiro-Dias, M.C.; Ramos, J. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4005–4009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Larsson, C.; Morales, C.; Gustafsson, L.; Adler, L. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 1769–1774. [[CrossRef](#)]
25. Adler, L.; Blomberg, A.; Nilsson, A. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* **1985**, *162*, 300–306. [[CrossRef](#)]
26. Gonzalez, N.A.; Vázquez, A.; Ortiz Zuazaga, H.G.; Sen, A.; Olvera, H.L.; Peña de Ortiz, S.; Govind, N.S. Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **2009**, *26*, 111–124. [[CrossRef](#)]
27. Furukawa, K.; Hoshi, Y.; Maeda, T.; Nakajima, T.; Abe, K. *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 1246–1261. [[CrossRef](#)]
28. Zajc, J.; Džeroski, S.; Kocev, D.; Oren, A.; Sonjak, S.; Tkavc, R.; Gunde-Cimerman, N. Chaophilic or chaotolerant fungi: A new category of extremophiles? *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 708. [[CrossRef](#)]
29. Pérez-Llano, Y.; Rodríguez-Pupo, E.C.; Druzhinina, I.S.; Chenthamara, K.; Cai, F.; Gunde-Cimerman, N.; Zalar, P.; Gostinčar, C.; Kostanjšek, R.; Folch-Mallol, J.L.; et al. Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells* **2020**, *9*, 525. [[CrossRef](#)]
30. Batista-García, R.A.; Balcázar-López, E.; Miranda-Miranda, E.; Sánchez-Reyes, A.; Cuervo-Soto, L.; Aceves-Zamudio, D.; Atritzán-Hernández, K.; Morales-Herrera, C.; Rodríguez-Hernández, R.; Folch-Mallol, J. Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105893. [[CrossRef](#)]

31. González-Abradelo, D.; Pérez-Llano, Y.; Peidro-Guzmán, H.; Sánchez-Carbente, M.R.; Folch-Mallol, J.L.; Aranda, E.; Vaidyanathan, V.K.; Cabana, H.; Gunde-Cimerman, N.; Batista-García, R.A. First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic mycoremediation under high salinity conditions. *Bioresour. Technol.* **2019**, *279*, 287–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Peidro-Guzmán, H.; Pérez-Llano, Y.; González-Abradelo, D.; Fernández-López, M.G.; Dávila-Ramos, S.; Aranda, E.; Hernández, D.; García, A.O.; Lira-Ruan, V.; Pliego, O.R.; et al. Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions. *Environ. Microbiol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
33. Ghosh, M.; Nanda, G. Purification and Some Properties of a Xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 4620–4623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nair, S.G.; Shankar, R.S. Enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanase from *Aspergillus sydowii* SBS 45. *Indian J. Microbiol.* **2010**, *50*, 332–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ghosh, M.; Nanda, G. Thermostability of b-xylosidase from *Aspergillus sydowii* MG49. *FEBS* **1993**, *330*, 275–278. [[CrossRef](#)]
36. Nair, S.G.; Sindhu, R.; Shashidhar, S. Purification and Biochemical Characterization of Two Xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *149*, 229–243. [[CrossRef](#)]
37. Schmitt, E.K.; Eilinghoff, B.; Olliger, R.; Decker, H.; Kück, U. Development of molecular tools for the mulundocandin producer *Aspergillus sydowii*: DNA-mediated transformation and reporter gene expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 625–631. [[CrossRef](#)]
38. Wang, J.; Lin, X.P.; Qin, C.; Liao, S.R.; Wan, J.T.; Zhang, T.Y.; Liu, Y.H. Antimicrobial and antiviral sesquiterpenoids from sponge-associated fungus, *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 581–583. [[CrossRef](#)]
39. Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Kaewpet, M.; Phongpaichit, S.; Hutadilok-Tawatana, N.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. Sesquiterpene and Xanthone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1663–1667. [[CrossRef](#)]
40. Chung, Y.; Wei, C.K.; Chuang, D.W.; El-Shazly, M.; Hsieh, C.T.; Asai, T.; Chang, F.R. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**. [[CrossRef](#)]
41. Galinski, E.A.; Herzog, R.M. The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (Ectothiorhodospira halochloris). *Arch. Microbiol.* **1990**, *153*, 607–613. [[CrossRef](#)]
42. Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 71–74. [[CrossRef](#)]
43. Markham, N.R.; Zuker, M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 577–581. [[CrossRef](#)]
44. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415. [[CrossRef](#)]
45. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)]
46. Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e36–e46. [[CrossRef](#)]
47. Bohle, K.; Jungebloud, A.; Dalpiaz, A. Selection of reference genes for normalisation of specific gene quantification data of *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol.* **2007**, *132*, 353–358. [[CrossRef](#)]
48. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [[CrossRef](#)]
49. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)]
50. Larsson, A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 3276–3278. [[CrossRef](#)]
51. Le, S.Q.; Gascuel, O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* **2008**, *25*, 1307–1320. [[CrossRef](#)]
52. Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **1985**, *39*, 783. [[CrossRef](#)]
53. Velázquez-Zavala, N.; Rodríguez-González, M.; Navarro-Olmos, R.; Ongay-Larios, L.; Kawasaki, L.; Torres-Quiroz, F.; Coria, R. Ineffective phosphorylation of mitogen-activated protein kinase Hog1p in response to high osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* **2015**, *14*, 922–930. [[CrossRef](#)]
54. Sánchez, N.S.; Calahorra, M.; González, J.; Defosse, T.; Papon, N.; Peña, A.; Coria, R. Contribution of the mitogen-activated protein kinase Hog1 to the halotolerance of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr. Genet.* **2020**, *66*, 1135–1153. [[CrossRef](#)]
55. Hald, P.M. The flame photometer for the measurement of sodium and potassium in biological materials. *J. Biol. Chem.* **1947**, *167*, 499–510. [[CrossRef](#)]
56. Witko-Sarsat, V.; Witko-Sarsat, V.; Friedlander, M.; Capeillère-Blandin, C.; Nguyen-Khoa, T.; Nguyen, A.T.; Zingraff, J.; Jungers, P.; Descamps-Latscha, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 1304–1313. [[CrossRef](#)]
57. Erdelmeier, I.; Gérard-Monnier, D.; Yadan, J.C.; Chaudière, J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1184–1194. [[CrossRef](#)]

58. Ozdemirler, G.; Mehmetcik, G.; Oztezcan, S.; Toker, G.; Sivas, A.; Uysal, M. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. *Horm. Metab. Res.* **1995**, *27*, 194–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 469–474. [[CrossRef](#)]
60. Ecobichon, D.J. Glutathione depletion and resynthesis in laboratory animals. *Drug Chem. Toxicol.* **1984**, *7*, 345–355. [[CrossRef](#)]
61. Massey, F.J. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *J. Am. Stat. Assoc.* **1951**, *46*, 68–78. [[CrossRef](#)]
62. Brown, M.B.; Forsythe, A.B. Robust tests for the equality of variances. *J. Am. Stat. Assoc.* **1974**, *69*, 364–367. [[CrossRef](#)]
63. Duncan, D.B. Multiple Range and Multiple F Tests. *Int. Biometric Soc.* **1955**, *11*, 1–42. [[CrossRef](#)]
64. Alker, A.P.; Smith, G.W.; Kim, K. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia* **2001**, *460*, 105–111. [[CrossRef](#)]
65. Rypien, K.L.; Andras, J.P.; Harvel, C.D. Globally panmictic population structure in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus sydowii*. *Mol. Ecol.* **2008**, *17*, 4068–4078. [[CrossRef](#)]
66. Meletiadiis, J.; Meis, J.F.G.M.; Mouton, J.W.; Verweij, P.E. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 478–484. [[CrossRef](#)]
67. Hallsworth, J.E.; Magan, N. Culture Age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2435–2442. [[CrossRef](#)]
68. Brown, A.D. Compatible Solutes and Extreme Water Stress in Eukaryotic Micro-Organisms. *Adv. Microb. Physiol.* **1978**, *17*, 181–242.
69. Hounsa, C.G.; Brandt, E.V.; Thevelein, J.; Hohmann, S.; Prior, B.A. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **1998**, *144*, 671–680. [[CrossRef](#)]
70. González-Hernández, J.C.; Jiménez-Estrada, M.; Peña, A. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles* **2005**, *9*, 7–16. [[CrossRef](#)]
71. Gunde-Cimerman, N.; Ramos, J.; Plemenitaš, A. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol. Res.* **2009**, *113*, 1231–1241. [[CrossRef](#)]
72. De Lima Alves, F.; Stevenson, A.; Baxter, E.; Gillion, J.L.; Hejazi, F.; Hayes, S.; Morrison, I.E.; Prior, B.A.; McGenity, T.J.; Rangel, D.E.; et al. Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: Compatible solutes determine the biotic window. *Curr. Genet.* **2015**, *61*, 457–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Kobayashi, Y.; Yoshida, J.; Iwata, H.; Koyama, Y.; Kato, J.; Ogihara, J.; Kasumi, T. Gene expression and function involved in polyol biosynthesis of *Trichosporonoides megachiliensis* under hyper-osmotic stress. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *115*, 645–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zidan, M.A.; Abdel-Mallek, A.Y. Effect of NaCl on the accumulation of glycerol by three *Aspergillus* species. *J. Basic Microbiol.* **1987**, *27*, 393–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Liu, K.H.; Ding, X.W.; Narsing Rao, M.P.; Zhang, B.; Zhang, Y.G.; Liu, F.H.; Liu, B.B.; Xiao, M.; Li, W.J. Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1789. [[CrossRef](#)]
76. Diano, A.; Bekker-Jensen, S.; Dynesen, J.; Nielsen, J. Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: Influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *94*, 899–908. [[CrossRef](#)]
77. Fillinger, S.; Chaverroche, M.K.; Van Dijck, P.; de Vries, R.; Ruijter, G.; Thevelein, J.; d’Enfert, C. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **2001**, *147*, 1851–1862. [[CrossRef](#)]
78. Ruijter, G.J.G.; Bax, M.; Patel, H.; Flitter, S.J.; van de Vondervoort, P.J.; de Vries, R.P.; Visser, J. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 690–698. [[CrossRef](#)]
79. De Vries, R.P.; Flitter, S.J.; Van De Vondervoort, P.J.; Chaverroche, M.K.; Fontaine, T.; Fillinger, S.; Ruijter, G.J.; D’Enfert, C.; Visser, J. Glycerol dehydrogenase, encoded by *gldB* is essential for osmotolerance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **2003**, *49*, 131–141. [[CrossRef](#)]
80. Aguilar-Pontes, M.V.; Brandl, J.; McDonnell, E.; Strasser, K.; Nguyen, T.T.M.; Riley, R.; Mondo, S.; Salamov, A.; Nybo, J.L.; Vesth, T.C.; et al. The gold-standard genome of *Aspergillus niger* NRRL 3 enables a detailed view of the diversity of sugar catabolism in fungi. *Stud. Mycol.* **2018**, *91*, 61–78. [[CrossRef](#)]
81. Thevelein, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* **1984**, *48*, 42–59. [[CrossRef](#)]
82. Wolschek, M.F.; Kubicek, C.P. The filamentous fungus *Aspergillus niger* contains two ‘differentially regulated’ trehalose-6-phosphate synthase-encoding genes, *tpsA* and *tpsB*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2729–2735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Thevelein, J.M. Regulation of Trehalose Metabolism and Its Relevance to cell Growth and Function. *Biochem. Mol. Biol.* **1996**, 395–420. [[CrossRef](#)]
84. Van Laere, A. Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, *63*, 201–209. [[CrossRef](#)]
85. Wiemken, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek* **1990**, *58*, 209–217. [[CrossRef](#)]
86. Argüelles, J.C. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: A comparative analysis. *Arch. Microbiol.* **2000**, *174*, 217–224.
87. Lewis, J.G.; Learmonth, R.P.; Watson, K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **1995**, *141*, 687–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

88. Borgia, P.T.; Miao, Y.; Dodge, C.L. The orlA gene from *Aspergillus nidulans* encodes a trehalose-6-phosphate phosphatase necessary for normal growth and chitin synthesis at elevated temperatures. *Mol. Microbiol.* **1996**, *20*, 1287–1296. [[CrossRef](#)]
89. Puttikamonkul, S.; Willger, S.D.; Grahl, N.; Perfect, J.R.; Movahed, N.; Bothner, B.; Park, S.; Paderu, P.; Perlin, D.S.; Cramer, R.A., Jr. Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **2010**, *77*, 891–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Thammahong, A.; Caffrey-card, A.K.; Dhingra, S.; Obar, J.J.; Cramer, R.A. *Aspergillus fumigatus* Trehalose-Regulatory Subunit Homolog Moonlights to Mediate Cell Wall Homeostasis through Modulation of Chitin Synthase Activity. *mBio* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Thammahong, A.; Puttikamonkul, S.; Perfect, J.R.; Brennan, R.G.; Cramer, R.A. Central Role of the Trehalose Biosynthesis Pathway in the Pathogenesis of Human Fungal Infections: Opportunities and Challenges for Therapeutic Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017**, *81*. [[CrossRef](#)]
92. Solomon, P.S.; Waters, O.D.C.; Oliver, R.P. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 257–262. [[CrossRef](#)]
93. Patel, T.K.; Williamson, J.D. Mannitol in Plants, Fungi, and Plant–Fungal Interactions. *Trends Plant. Sci.* **2016**, *21*, 486–497. [[CrossRef](#)]
94. Jovanović, B.; Mach, R.L.; Mach-Aigner, A.R. Characterization of erythrose reductases from filamentous fungi. *AMB Express* **2013**, *3*, 1–11. [[CrossRef](#)]
95. Brown, A.D.; Simpson, J.R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: The role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **1972**, *72*, 589–591. [[CrossRef](#)]
96. Chirife, J.; Favetto, G.; Fontán, C.F. Microbial growth at reduced water activities: Some physicochemical properties of compatible solutes. *J. Appl. Bacteriol.* **1984**, *56*, 259–268. [[CrossRef](#)]
97. Adler, L.; Pedersen, A.; Tunblad-Johansson, I. Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. *Physiol. Plant.* **1982**, *56*, 139–142. [[CrossRef](#)]
98. Ortbauer, M.; Popp, M. Functional role of polyhydroxy compounds on protein structure and thermal stability studied by circular dichroism spectroscopy. *Plant. Physiol. Biochem.* **2008**, *46*, 428–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Hallsworth, J.E.; Magan, N. A rapid HPLC protocol for detection of polyols and trehalose. *J. Microbiol. Methods* **1997**, *29*, 7–13. [[CrossRef](#)]
100. Al-Hussein, A.; Gieseler, H. The effect of mannitol crystallization in mannitol-sucrose systems on LDH stability during freeze-drying. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 2534–2544. [[CrossRef](#)]
101. Wyatt, T.T.; Van Leeuwen, M.R.; Golovina, E.A.; Hoekstra, F.A.; Kuenstner, E.J.; Palumbo, E.A.; Snyder, N.L.; Visagie, C.; Verkennis, A.; Hallsworth, J.E.; et al. Functionality and prevalence of trehalose-based oligosaccharides as novel compatible solutes in ascospores of *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) and other fungi. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 395–411. [[CrossRef](#)]
102. Gunde-Cimerman, N.; Plemenitaš, A. Ecology and molecular adaptations of the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2006**, *5*, 323–331. [[CrossRef](#)]
103. Gunde-Cimerman, N.; Zalar, P. Extremely Halotolerant and Halophilic Fungi Inhabit Brine in Solar Salterns Around the Globe. *Food Technol. Biotechnol.* **2014**, *52*, 170–179.
104. Tomaszewska, L.; Rywińska, A.; Gladkowski, W. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 1333–1343. [[CrossRef](#)]
105. Gostinčar, C.; Lenassi, M.; Gunde-Cimerman, N.; Plemenitaš, A. Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. *Adv. Appl. Microbiol.* **2011**, *77*, 71–96.
106. Redkar, R.J.; Locy, R.D.; Singh, N.K. Biosynthetic Pathways of Glycerol Accumulation under Salt Stress in *Aspergillus nidulans*. *Exp. Mycol.* **1995**, *19*, 241–246. [[CrossRef](#)]
107. Ianutsevich, E.A.; Tereshina, V.M. Combinatorial impact of osmotic and heat shocks on the composition of membrane lipids and osmolytes in *Aspergillus niger*. *Microbiol.* **2019**, *165*, 554–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Parmar, J.H.; Bhartiya, S.; Venkatesh, K.V. Characterization of the adaptive response and growth upon hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 1138–1148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Hohmann, S.; Krantz, M.; Nordlander, B. Yeast Osmoregulation. In *Methods in Enzymology*; Elsevier Masson SAS: Paris, France, 2007; Volume 428.
110. Plemenitaš, A.; Lenassi, M.; Konte, T.; Kejžar, A.; Zajc, J.; Gostinčar, C.; Gunde-Cimerman, N. Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 199. [[CrossRef](#)]
111. Hohmann, S. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 4025–4029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Konte, T.; Plemenitas, A. The HOG signal transduction pathway in the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: Identification and characterisation of MAP kinases WiHog1A and WiHog1B. *Extremophiles* **2013**, *623*–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Garrido-Bazán, V.; Jaimes-Arroyo, R.; Sánchez, O.; Lara-Rojas, F.; Aguirre, J. SakA and MpkC Stress maps show opposite and common functions during Stress responses and development in *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2518. [[CrossRef](#)]
114. Sharma, P.; Meena, N.; Aggarwal, M.; Mondal, A.K. *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. *Curr. Genet.* **2005**, *48*, 162–170. [[CrossRef](#)]

115. Van Wuytswinkel, O.; Reiser, V.; Siderius, M.; Kelders, M.C.; Ammerer, G.; Ruis, H.; Mager, W.H. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: Evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 382–397. [[CrossRef](#)]
116. Rodríguez-Navarro, A. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **2000**, *1469*, 1–30. [[CrossRef](#)]
117. Norkrans, B.; Kylin, A. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J. Bacteriol.* **1969**, *100*, 836–845. [[CrossRef](#)]
118. Kumar, S.; Gummadi, S.N. Osmotic adaptation in halotolerant yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: Role of osmolytes and cation transport. *Extremophiles* **2009**, *13*, 793–805. [[CrossRef](#)]
119. Martínez, J.L.; Sychrova, H.; Ramos, J. Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *FUNGAL Genet. Biol.* **2011**, *48*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Goossens, A.; Dever, T.E.; Pascual-Ahuir, A.; Serrano, R. The Protein Kinase Gcn2p Mediates Sodium Toxicity in Yeast. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30753–30760. [[CrossRef](#)]
121. Rosenfeld, L.; Reddi, A.R.; Leung, E.; Aranda, K.; Jensen, L.T.; Culotta, V.C. The effect of phosphate accumulation on metal ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 1051–1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Ariño, J.; Ramos, J.; Sychrová, H. Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 95–120. [[CrossRef](#)]
123. Kinclova-Zimmermannova, O.; Sychrová, H. Plasma-membrane Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter regulates potassium homeostasis in *Candida albicans*. *Microbiology* **2007**, *153*, 2603–2612. [[CrossRef](#)]
124. Benito, B.; Garcíadeblas, B.; Perez-Martin, J.; Rodríguez-Navarro, A. Growth at High pH and Sodium and Potassium Tolerance in Media above the Cytoplasmic pH Depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 821–829. [[CrossRef](#)]
125. Miller, G.; Shulaev, V.; Mittler, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* **2008**, *133*, 481–489. [[CrossRef](#)]
126. Bose, J.; Rodrigo-Moreno, A.; Shabala, S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 1241–1257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Sharma, A.; Sharma, S.C. Physiological Basis for the Tolerance of Yeast *Zygosaccharomyces bisporus* to Salt Stress. *HAYATI J. Biosci.* **2017**, *24*, 176–181. [[CrossRef](#)]
128. Kumar, S.; Kalyanasundaram, G.T.; Gummadi, S.N. Differential response of the catalase, superoxide dismutase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase to different environmental stresses in *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 382–387. [[CrossRef](#)]
129. Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant. Sci.* **2004**, *9*, 490–498. [[CrossRef](#)]
130. Miller, G.; Suzuki, N.; Ciftci-Yilmaz, S.; Mittler, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant. Cell Environ.* **2010**, *33*, 453–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Farrugia, G.; Balzan, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 64. [[CrossRef](#)]
132. Aguirre, J.; Ríos-Momberg, M.; Hewitt, D.; Hansberg, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 111–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Ramos-Moreno, L.; Ramos, J.; Michán, C. Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Farmer, E.E.; Mueller, M.J. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2013**, *64*, 429–450. [[CrossRef](#)]
135. Niemela, O.; Parkkila, S.; Yläherttua, S.; Villanueva, J.; Ruebner, B.; Halsted, C.H. Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology* **1995**, *22*, 1208–1212. [[CrossRef](#)]
136. Hassan, A.H.A.; Alkhalifah, D.H.M.; Al Yousef, S.A.; Beemster, G.T.; Mousa, A.S.; Hozzein, W.N.; AbdElgawad, H. Salinity Stress Enhances the Antioxidant Capacity of *Bacillus* and *Planococcus* Species Isolated from Saline Lake Environment. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2191. [[CrossRef](#)]
137. Lim, C.W. The pepper lipoxygenase CaLOX1 plays a role in osmotic, drought and high salinity stress response. *Plant. Cell Physiol.* **2015**, *56*, 930–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Maksimović, J.D.; Zhang, J.; Zeng, F.; Živanović, B.D.; Shabala, L.; Zhou, M.; Shabala, S. Linking oxidative and salinity stress tolerance in barley: Can root antioxidant enzyme activity be used as a measure of stress tolerance? *Plant. Soil* **2013**, *365*, 141–155. [[CrossRef](#)]
139. Kumari, S.; Joshi, R.; Singh, K.; Roy, S.; Tripathi, A.K.; Singh, P.; Singla-Pareek, S.L.; Pareek, A. Expression of a cyclophilin OsCyp2-P isolated from a salt-tolerant landrace of rice in tobacco alleviates stress via ion homeostasis and limiting ROS accumulation. *Funct. Integr. Genomics* **2015**, *15*, 395–412. [[CrossRef](#)]
140. Antoniou, C.; Savvides, A.; Christou, A.; Fotopoulos, V. Unravelling chemical priming machinery in plants: The role of reactive oxygen–nitrogen–sulfur species in abiotic stress tolerance enhancement. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2016**, *33*, 101–107. [[CrossRef](#)]

CAPÍTULO 2.

Herramientas moleculares para el estudio de los genes ortólogos Hog1 de *Aspergillus sydowii* en condiciones de salinidad.

2.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha hecho mención en el capítulo 1 existen organismos que están expuestos a diferentes tipos de estrés. En particular, el estrés osmótico, desencadena una variedad de respuestas en los organismos que les permiten sobrevivir, reparar daños y adaptar a las células a las nuevas condiciones. Una de estas adaptaciones está relacionada con la inducción de la expresión de genes a través de la activación de rutas de transducción de señales. Por ejemplo, la vía de HOG (High Osmolarity Glycerol) es una cascada de señalización de MAP cinasas, la cual está conservada en hongos, plantas y mamíferos (Schaeffer y Weber, 1999; Taj *et al.*, 2010; Hagiwara *et al.*, 2016). En esta vía participan tres proteínas: la MAPKKK (MAP cinasa-cinasa-cinasa), la MAPKK (MAP cinasa-cinasa) y una MAPK (MAP cinasa). En la mayoría de los organismos se ha determinado que la MAP cinasa Hog1p se activa rápidamente y coordina una respuesta adaptativa a distintas perturbaciones fisiológicas, como en la modulación de la actividad de los transportadores de iones en la membrana citoplasmática, la regulación del ciclo celular, la modulación de la traducción de mRNAs y la activación transcripcional de cientos de genes en el núcleo (Saito y Posas, 2012; Hagiwara *et al.*, 2016).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un modelo eucarionte muy eficiente para la realización de diferentes estudios de biología molecular debido a su rápido crecimiento, no es un organismo patógeno de fácil manipulación genética (Entian y Kotter, 2007; Duina *et al.*, 2014). Mediante el empleo de este organismo modelo se han encontrado evidencias que permiten comprender los mecanismos de señalización celular desencadenados por la vía de HOG. Brevemente, cuando las células son sometidas a distintos estímulos éstas pueden desencadenar la activación de alguna MAPKKK a través de su fosforilación en residuos de serina y

treonina (Ser/Thr) que se encuentran altamente conservados, entonces la MAPKK fosforila a la MAPK en los residuos de tirosina y treonina (Tyr/Thr). Esta MAPK una vez fosforilada es la que se transloca al núcleo y es la encargada de desencadenar las respuestas adaptativas (Widmann, 1999; Saito y Posas, 2012).

Teniendo en cuenta que la maquinaria molecular de muchos procesos celulares se encuentra conservada entre los organismos eucarióticos, la introducción de mutaciones en el genoma de *S. cerevisiae*, ha facilitado comprender la función de proteínas/ genes ortólogos, haciendo inferencias de estas funciones a nivel evolutivo (Rubin *et al.*, 2000; Krantz *et al.*, 2006; Dujon, 2010; Zakrajšek *et al.*, 2011). Se ha determinado que levaduras, entre ellas *S. cerevisiae* han evolucionado a partir de modular su actividad metabólica, en respuesta a cambios en el ambiente extracelular. Entre ellos se incluyen cambios de temperatura, concentración de nutrientes, sales o agentes oxidantes (Blomberg, 2000; Hohmann, 2002; Mager y Siderius, 2002, Klipp *et al.*, 2005; Plemenitas *et al.*, 2008).

Particularmente, *S. cerevisiae* tolera bajas concentraciones de NaCl (hasta 1 M NaCl), lo que la convierte en un organismo sensible a la presencia de NaCl (Sánchez *et al.*, 2020), desencadenando mecanismos de respuesta al estrés osmótico. Entre estos los mecanismos de osmorregulación, que incluyen la síntesis y/o acumulación de glicerol, como principal soluto compatible, cuya síntesis es regulada fundamentalmente a nivel transcripcional por la vía de HOG (High Osmolarity Glicerol) (Albertyn *et al.*, 1994; Folch-Mallol *et al.*, 2004; Saito y Posas, 2012). La fosforilación y activación de la MAPK Hog1 lleva a una serie de respuestas celulares que pueden ser inducidas tanto por estrés osmótico como por estrés por frío, calor o radiación UV (Gacto *et al.*, 2003; Panadero *et al.*, 2006; Lenassi *et al.*, 2007).

Se ha observado que levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* y *Zygosaccharomyces rouxii* que poseen mutaciones que han activado al gen *hog1*, presentan un fenotipo osmosensible (Degols *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996, San Jose *et al.*, 1996, Iwaki *et al.*, 1999, Bansal y

Mondal, 2000).

Mediante estudios de complementación en *S. cerevisiae* usando genes ortólogos de la levadura halotolerante *Hortaea werneckii* se estableció que además de Hog1p, las isoformas de la MAPKK Pbs2, son claves en la respuesta de estas levaduras a la exposición a 1.0 M NaCl y KCl, así como de 1.5 M sorbitol (Plemenitas y colaboradores, 2008). Y en el caso de la complementación con el ortólogo Hog1p de *Debaryomyces hansenii*, se recupera el fenotipo de *S. cerevisiae* crecidas en diferentes medios salinos (NaCl 1 M, KCl 1 M, Sorbitol 2 M y CaCl₂ 0.2 M). De manera interesante, la cepa mutada de *S. cerevisiae* en Hog1 acumula la mitad de la concentración de glicerol respecto a la silvestre, cuando crecen en 0.4M NaCl. Sin embargo, en la cepa complementada con el gen *hog1* de *D. hansenii*, se acumuló el doble de concentración de glicerol.

Dado que Hog1p es esencial en la osmorregulación de la respuesta al estrés osmótico, se ha incrementado la búsqueda de sus ortólogos en hongos extremófilos. Recientemente, este tipo de estudios se realizó en los hongos *Wallemia ichthyophaga* y *Eurotium herbariorum* aislados de salinas solares y del Mar Muerto (5.8 M NaCl) (Jin *et al.*, 2005; Konte y Plemenitas, 2013). Estudios de complementación con Hog1p de *E. herbariorum* en *S. cerevisiae* evidenciaron que la cepa complementante, pero no la mutante, pudo crecer en medios que contenían 1 M NaCl, 1 M KCl, 2 M sorbitol, 0.4 M CaCl₂, 20% de agua del Mar Muerto y 300 mM LiCl. Lo cual demostró que efectivamente el gen *Eh-hog* tiene una función similar al gen *Sc-hog1* brindando la tolerancia a la sal.

En el hongo halófilo obligado *W. ichthyophaga* se identificaron dos genes similares a *Sc-hog1*, *Wi-hog1A* y *Wi-hog1B*. La proteína WiHog1A es menos activa que WiHog1B y Schog1, aún cuando conserva los residuos más importantes para la función del dominio PBD-2, ya que las células solo toleran hasta 0.4 M de NaCl (Konte y Plemenitas, 2013). Sin embargo, las células que expresaron WiHog1A crecieron más rápido que las mutantes $\Delta hog1$ transformadas con un vector vacío, mientras que las que expresaron WiHog1B crecieron mejor al ser cultivadas con 0.8

y 1.6 M de NaCl (Konte y Plemenitas, 2013).

En las últimas décadas se han realizado búsquedas de homología de los componentes de la vía de HOG en los genomas de hongos filamentosos, incluidos *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. fumigatus* y *Aspergillus niger*. En todos los casos se han encontrado las tres proteínas correspondientes a la MAPK. Interesantemente, se ha reportado que en estos, algunos componentes de los sistemas de señalización están duplicados. Por ejemplo Hog en *A. nidulans* y *A. fumigatus* se encuentra duplicada (cada uno tiene a HogA / SakA y MpkC), y en el caso de *A. oryzae* y *A. niger* está triplicada (cada uno tiene HogA / SakA, MpkC, y MpkD) (Hagiwara *et al.*, 2016).

Con el objetivo de estudiar las funciones de la vía de HOG, se han construido cepas mutantes realizando deleciones genéticas en una amplia variedad de hongos filamentosos (Bahn, 2008; Rispaill *et al.*, 2009; Hamel *et al.*, 2012; Hagiwara *et al.*, 2016). Furukawa y colaboradores (2005), han realizado estudios específicamente con *A. nidulans*. Este hongo posee a la vía de señalización de Hog, con los siguiente componentes: SskB MAPKKK, PbsB MAPKK y HogA / SakA MAPK en la vía HOG. Donde la deleción del gen *hogA* ($\Delta hogA$), conduce a la sensibilidad de *A. nidulans* cuando crece en medios con bajo YPD suplementado con 0.8 M de NaCl o 1.2 M de sorbitol condiciones de alta salinidad mientras que el fenotipo de las mutantes en los genes $\Delta sskA$, $\Delta sskB$ o $\Delta pbsB$ resultan menos sensible a condiciones de estrés osmótico. Mientras que la deleción de *mpkC* no genera sensibilidad frente a condiciones de estrés osmótico, por lo que los autores concluyeron que *mpkC* es prescindible en la osmoadaptación. Notablemente, la sensibilidad a la alta osmolaridad producida por la mutación en el gen *hogA* puede ser revertida por la sobreexpresión de este (Furukawa *et al.*, 2005). De manera similar en *A. fumigatus* se han descrito dos genes homólogos de Hog, denominados SakA (HogA) y MpkC. Estudios de deleción de ambos genes han demostrado que hay una disminución de ambas cepas cuando estas crecen en presencia de concentraciones de 100 mM sorbitol o manitol (Reyes *et al.*, 2006; Hagiwara *et al.*, 2016).

En conjunto, estos resultados han mostrado que la vía HOG en distintos *Aspergillus* se encuentra conservada como mecanismo de respuesta a estrés osmótico, sin embargo no se ha estudiado en detalle el funcionamiento de esta vía en *Aspergillus* halófilos. Con base en estas observaciones, nosotros hipotetizamos que el gen *hog1* de *A. sydowii* (homólogo del *hog1* de *Saccharomyces cerevisiae*) complementaría el fenotipo de sensibilidad a la salinidad de cepas mutadas en Hog1 de *S. cerevisiae* y que la delección de *AsHOG1* llevaría a la sensibilidad de *A. sydowii* BMH004 a medios hipersalinos.

2.2. Antecedentes

En el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB, se aisló la cepa halófila *Aspergillus sydowii* BMH-0004 a partir de una fermentación de bagazo de caña de azúcar con 2.0 M de NaCl. Como se ha mencionado en el capítulo 1, se ha determinado que la condición óptima de crecimiento para *A. sydowii* se encuentra en el rango de 0.5-1 M de NaCl en presencia de diferentes fuentes de carbono (Batista-García y colaboradores, 2014). A través del análisis transcriptómico de la cepa cuando crece en paja de trigo como fuente de carbono en ausencia o presencia de 0.5 y 2 M de NaCl (Perez-Llano *et al.*, 2020), se determinó que hay una relación en la expresión de los transcritos relacionados con la síntesis de los solutos compatibles como son trehalosa y glicerol relacionada a la presencia de altas concentraciones de sal (2M NaCl) pero no cuando crece en 0.5M de NaCl, su condición óptima de crecimiento. Este análisis mostró que *A. sydowii* podría acumular glicerol como respuesta a estrés osmótico, la que como se mencionó anteriormente está controlada por la vía de *HOG1* (High Osmolarity Glycerol). De manera interesante en los genomas de los *Aspergilli* se ha encontrado más de una copia de Hog MAPK (Garrido-Bazán *et al.*, 2018). En el análisis transcriptómico del hongo realizado por nuestro grupo en *A. sydowii* se encontraron tres copias de Hog, similar *A. versicolor* y *A. mulundensis*. Estos genes fueron nombrados como Hog1, Hog2 y MpkC, cuyos productos proteicos tienen el dominio de quinasa (PK) y el sitio de fosforilación de TGY, lo que indica que pueden ser potencialmente fosforilados y biológicamente activos. Lo anterior genera la pregunta de cuál de estos tres genes

hog1, *hog2* o MpkC es el regulador maestro que enciende la vía de estrés osmótico. Como se ha mencionado anteriormente, determinar o inferir la función de un gen puede abordarse de dos maneras, como una pérdida o como una ganancia de función. Y determinar cuál de estos es el ortólogo de Hog1 en *S. cerevisiae* se puede lograr a través de la complementación de mutantes en este gen con los posibles homólogos, en este caso de *A. sydowii*. Por lo que se decidió aislar mutantes que perdieran la función de Hog1 y/o Hog2 de *A. sydowii* utilizando la tecnología de Crispr-Cas y la complementación de la cepa mutante de *S. cerevisiae* de *HOG1* con los de *A. sydowii*. Debido a que en otros hongos MpkC generalmente juega un papel secundario como regulador del estrés osmótico, nos enfocamos en el estudio de Hog1 y Hog2.

2.3. Hipótesis

La eliminación del gen *Hog1* y/o *Hog2* en *A. sydowii* generará sensibilidad frente a condiciones salinas (incluida la salinidad óptima de crecimiento). Mientras que la expresión de estos en cepas mutantes en Hog1 de *S. cerevisiae* generará resistencia a estrés salino.

El gen *hog1* de *A. sydowii* es el equivalente funcional del gen *hog1* de *S. cerevisiae*, por lo que su eliminación generará sensibilidad de *A. sydowii* a medios salinos y complementará la función de las mutantes de Hog1 en *S. cerevisiae*.

2.4. Objetivos

- 1) Complementar a la mutantes de Hog1 de *S. cerevisiae* con los ortólogos de *A. sydowii* (*hog1* y *hog2*).
- 2) Generar las mutantes de *hog1*, *hog2* y la doble mutante *hog1/2* en *A. sydowii*
- 3) Evaluar la tolerancia a la salinidad tanto en las mutantes de *A. sydowii* *hog1*, *hog2* y la doble mutante; así como de las cepas complementantes de la cepa Hog1 mutante de *S. cerevisiae* con Hog1 y Hog2 de *A. sydowii*.

2.5. MATERIALES Y MÉTODOS

2.5.1. Medios de cultivo y soluciones stock

Medio LB

Para la preparación de medio LB (Medio Luria-Bertani) se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 1 L de agua destilada: 10g de bacto-triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl. Para la preparación de LB bajo en sales se añadió solo la mitad de NaCl y los otros reactivos en las mismas concentraciones en el mismo volumen. Se ajustó el pH a 7 con NaOH y se adicionó agar al 1.5% cuando se requirió preparar medio de cultivo sólido. Se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq.

Medio PDA

Para la preparación de medio PDA (Agar Papa-Dextrosa) se disolvieron 39 g de PDA (BD Bioxon) en 1 L de agua destilada y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq.

Medio PDA suave

Para la preparación del medio PDA suave, se disolvieron 2.4 g de PBD (Difco), 18.2 g de sorbitol, 0.7 g de agar bacteriológico en 100 mL de agua destilada y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq. Se le adicionó 200 µL de Higromicina.

Medio PDA selectivo

Para la preparación del medio PDA selectivo, se disolvieron 9.75 g de PBD (Difco), 22.75 g de sorbitol, en 250 mL de agua destilada y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq. Se le adicionó 500 µL de Higromicina.

Medio Mínimo suplementado con Glucosa (MMG)

Para la preparación de medio mínimo se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 1 L de agua destilada: 7.8 mg de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$,

18 mg de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 500 mg de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de ZnSO_4 , 50 mg de KCl, 1 g de K_2HPO_4 y 2 g de NH_4NO_3 . Luego se ajustó el pH a 6 con ácido fosfórico – KOH al 0.25 N y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq. Se suplementó con 2% de glucosa. Para el caso de medio sólido, se adicionó agar (1.5% en molaridades menores de 2 M de NaCl y 2% para molaridades mayores) cuando se requirió preparar medio de cultivo sólido.

Solución de dextrosa 10X D (Dextrosa al 20%)

Se disolvieron 200 g de dextrosa (Bioxon) en 1L de agua y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq.

2.5.2. Clonación del gen *hog1* de *A. sydowii* en el vector intermediario pJET

1.2blunt

A. sydowii se creció en medio mínimo suplementado con 2% de glucosa (MMG) y 0.5M de NaCl. Después de 7 días de incubación se colectó el micelio y se maceró en nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizó la extracción del ARN total de la muestra, utilizando TRIzol™ y siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen™). Se verificó la integridad del ARN realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se determinó la concentración de ARN utilizando un espectrofotómetro. Se utilizó 1 μg de ARN total como templado para obtener el cDNA. Este se sintetizó utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific) y usando oligo-dT. La determinación de la concentración y pureza del cDNA obtenido, se realizó en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). El cDNA (0.84 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se almacenó a -20°C hasta su utilización. La amplificación de los genes *hog1* y *hog2*, se realizó a partir de este cDNA. Utilizando oligonucleótidos que contienen el marco de lectura abierto y los sitios de corte enzimas de restricción específicas *Bam*HI y *Bgl*II, para el caso del gen *hog1*, mientras que los oligonucleótidos para amplificar al gen *hog2* contienen sitios de corte para la endonucleasa *Bam*HI y para la endonucleasa *Xba*I para que los productos generados por PCR fueran clonados en el vector de expresión pYES (ver

Tabla 2.5.1).

Tabla 2.5.1. Secuencias de los Oligonucleótidos para la amplificación de *hog1* y *hog2*

Gen	Secuencias	T _m
As-Hog1	Fw:[5'CGGATCCATGGCGGAATTCGTACGTGC3'] BamHI	60°C
	Rv:[3'CAGATCTCTATTGGAACCCCTTGTTGATTCAA5'] BglII	60°C
As-Hog2	Fw:[5'CGGATCCATGTATTTTCGTACACGGACC3'] BamHI	60°C
	Rv:[3'CCTCGAGCTACCCCATATGGTGGAAATC5'] XbaI	60°C

La amplificación del gen *hog1* se realizó mediante la técnica de PCR empleando 1µL de cDNA para una reacción de 50µL, adicionando a la mezcla de reacción los cebadores específicos y la enzima In-Phusion High-Fidelity DNA polymerase. Se utilizaron 35 ciclos de tres etapas cada uno: desnaturalización (30 seg. a 94 °C), hibridación (45 seg. a 60 °C) y elongación (1 min. a 72 °C) (Tabla 2.5.2). Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1%. El tamaño del producto de Hog1 es de 1112 pb y de Hog2 es de 770 pb. Las secuencias de los productos amplificados esperados se pueden observar en el Anexo 2.10.

Tabla 2.5.2. Condiciones del programa de PCR.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	35
Annealing	60°C	45 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extension final	72°C	10 min	1
	4°C	∞	

Los productos amplificados de los marcos abiertos de lectura de *As-hog1* y *As-hog2* se clonaron inicialmente en el vector de pJET 1.2/ blunt, y a esta construcción se denominó pJET1.2::*As-hog1* o pJET1.2::*As-hog2*. El vector pJet1.2 contiene un gen de resistencia a la ampicilina como se muestra en la Figura 2.5.1. Se realizaron transformaciones de las cepas *E. coli* DH5a con las construcciones, posteriormente para seleccionar las cepas transformadas fueron sembradas en placas de LB con

ampicilina e incubadas a 30 °C durante 24 horas. Se tomaron colonias aisladas, y se re-sembraron en una nueva otra placa con ampicilina.

Para verificar la correcta inserción de la construcción se procedió a realizar un PCR de colonia. Se tomó una muestra de las colonia seleccionadas y estas se resuspenden en 5 µL de H₂O grado MilliQ en un eppendorf de 1.5 ml. Se incuban por 5 minutos a 90°C en un Thermobloque. Luego se centrifugan a 13000 rpm durante 5 minutos y se toma 1 µL para usarlo como templado para el PCR, donde se emplearon los oligos As-Hog1 y As-Hog2, con las condiciones mencionadas en la tabla 2.5.2.

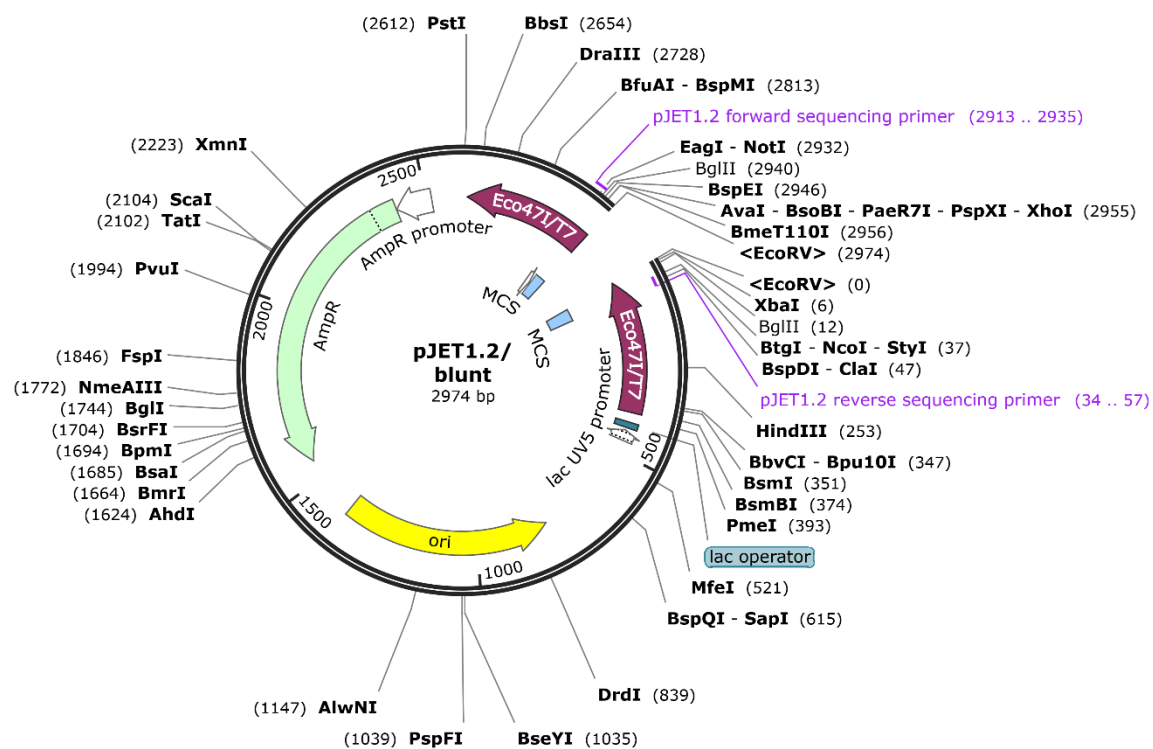


Figura 2.5.1.: pJET 1.2/blunt, vector de clonación. MCS (multiple cloning site, en sus siglas en inglés).

2.5.3. Construcción de mutantes del gene *As-hog1* (mediante CRISPR/Cas)

En los últimos años, se han desarrollado diferentes tecnologías, a través de las cuales se han podido modificar los genomas de diferentes organismos. Una de las

tecnologías más recientes para modificar el genoma de distintos organismos es el sistema CRISPR/ Cas 9, incluidos los genomas de hongos filamentosos (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) (Nødvig *et al.*, 2015; Katayama *et al.*, 2016). Este sistema comprende dos componentes: la nucleasa Cas9 que proviene de *Streptococcus pyogenes* y un RNA guía (sgRNA, single chimeric guide RNA). El DNA que codifica para este RNA guía se clona junto a la secuencia que codifica para la nucleasa Cas9. El RNA guía tiene regiones específicas complementarias a la secuencia genómica que se pretende modificar. De este modo se forma un híbrido de RNA / DNA en la secuencia del protoespaciador, que no es más que un fragmento de 20 pb de largo. Además, el protoespaciador requiere de motivos adyacentes denominados (PAM) para favorecer la unión estable de Cas9 al locus de interés. El RNA guía se obtiene como producto de fusión de dos ribozimas que se autoescinden una vez que se ha transcrito el RNA para generar el sgRNA maduro. Cabe destacar que este sistema CRISPR / Cas9 se ha aplicado a varios organismos como levaduras, peces, plantas, células de mamíferos y hasta en hongos filamentosos (Doudna y Charpentier, 2014; Liu *et al.*, 2015; Arazoe *et al.*, 2015; Nødvig *et al.*, 2015; Fuller *et al.*, 2015; Katayama *et al.*, 2016). En este trabajo, nos propusimos implementar el sistema CRISPR / Cas9 como método de edición del genoma de *A. sydowii*, para con este de obtener a las mutantes de los genes *hog1* y *hog*.

Para generar a las mutantes de *As-hog1* y *As-hog2* se generan primeramente proto-espaciadores diseñados con el programa E-CRISP (www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html). Los proto-espaciadores contienen 20 nucleótidos complementarios a regiones de los genes *As-hog1* o *As-hog2*, posteriormente estos clonan en el vector pFC332. Este contiene los elementos regulatorios para la expresión del proto-espaciador y del gen *cas9*, los elementos para la replicación tanto en bacteria como en hongos y los genes que confieren resistencia a higromicina B y a Ampicilina para la correcta selección de las colonias transformadas.

En una amplia gama de hongos filamentosos se han construido cuatro plásmidos

CRISPR-Cas9 diferentes para facilitar la mutagénesis empleando gRNA. Cada uno de estos contiene un marcador fúngico de uso común, AFUM_pyrG, AN_argB, bleR o hygR, así como el AMA1 (secuencia, que se ha demostrado que apoya la replicación en muchas especies de hongos diferentes).

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final se generó el sgRNA a partir de pFC334 empleando oligos específicos (Tabla 2.5.3). Se necesitan dos juegos de oligonucleótidos, un par para amplificar la región del RNA guía que contiene al protoespaciador y el otro par para amplificar un fragmento que complementa con una parte del protoespaciador y es necesario para el correcto autocorte por las ribozimas (Figura 2.5.2B).

Una vez generados ambos productos de las amplificaciones obtenidas de la construcción del vector pFC334, se procedió a la ligación de estos productos con el vector pFC332, por recombinación mediante el sistema In-Fusion Cloning Kit. Para corroborar la correcta construcción del sgRNA, resultando necesario realizar una amplificación mediante PCR para enviar el producto a secuenciación (Figura 2.5.2C)

Tabla 2.5.3. Secuencias de los oligonucleótidos generados para realizar la construcción de los sgRNA guías. Aquí se muestra

Nombre	Secuencia	Longitud (nt)	Tm (°C)
5'-sgRNA	GGCCCCGGGAAGATCTCATGGTCATAGCTGTTTCC	35	69
HOG1_HH_up	ACGAGCTTACTCGTTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGGCTT CACGGTGATGTCTGCTCAAGCG	62	71
HOG1_HH_down	AACGAGTAAGCTCGTCCGCTTCAGCAGCTCAATTCTGTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA	63	57
3'-sgRNA	TATGACCATGAGATCGAGCCAAGAGCGGATTCTC	35	59

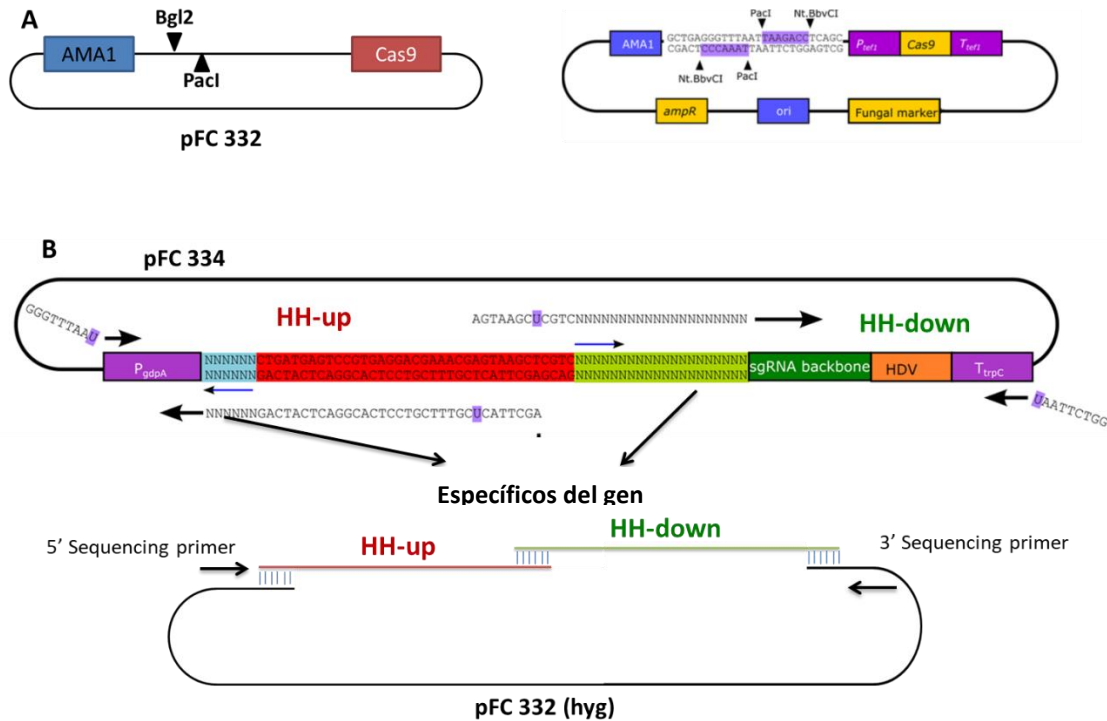


Figura 2.5.2: Construcción de los vectores para mutagénesis dirigida en hongos filamentosos mediante el sistema CRISP/Cas9. En la 2.5.2A se muestran los sitios de corte en el vector con la enzima BgIII, y donde se insertará el RNA guía. En la 2.5.2B se muestra el vector pFC334, donde en verde oscuro se observa el fragmento del RNA guía, en verde claro la secuencia de 20 nucleótidos que pertenece al protoespaciador y en azul claro la secuencia de seis nucleótidos que complementan con el protoespaciador. Ambas secuencias se obtienen, mediante PCR con oligonucleótidos específicos para cada gen. En la 2.5.2C se muestra la recombinación del vector pFC332 con los productos de las amplificaciones obtenidos del vector pFC 334.

Para obtener la construcción de plásmido pFC332-*hog1* se realizó una modificación a la metodología propuesta por Nødvig y colaboradores en 2015, en la que ellos emplearon para realizar el corte en el plásmido las enzimas PacI/ Nt.BbvCI. Debido al alto costo de este método USER, se reemplazó por el método In-Fusion Cloning kit (638947). En este kit se utiliza en lugar de las enzimas PacI/ Nt.BbvCI a la enzima *BgIII* para generar el corte en la doble cadena y crear los extremos cohesivos necesarios para introducir el inserto (Figura 2.5.2A). Se incubó a la enzima con el plásmido pFC332 por 3 horas a 37°C, según el protocolo de Thermo Scientific (*BgIII*

ER0081). Una vez linealizado el vector, se purificó en gel siguiendo el protocolo de Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction Kit #K0692. Se cuantificó y se realizó la ligación de todos los fragmentos (RNA guía y protoespaciador) con el pFC332, usando el sistema In-Fusion cloning kit (638947). Luego, se realizó la transformación mediante electroporación de las células de *Escherichia coli* XL-1 Blue y se esparcieron en placas de medio LB con Ampicilina a 100µg/L, a 37 °C, por 24 horas. Las colonias seleccionadas se analizaron por PCR de colonia usando los oligonucleótidos 5´sgRNA y 3´sgRNA que hibridan con las regiones que flanquean al inserto, en este caso el RNA guía.

Una vez verificada la construcción por secuenciación, se transformó la construcción pFC332::*hog1* en células de *A. sydowii* siguiendo el método protoplastos-polietilenglicol descrito para *Trichoderma atroviridae*, con algunas modificaciones (Herrera-Estrella, 1990).

A partir de un cultivo de *A. sydowii* en placas con PDA, se colectaron las esporas y para obtener las germinulas se inocularon con 5×10^8 conidias en un medio de cultivo GYEC (medio mínimo, extracto de levadura 1 %, glucosa 2 %, caseína 0.5 %), y se incubó a 28 °C durante 16 horas con agitación constante (180 rpm). Se colectan 0.3 g de las germinulas y se les adiciona 6 mL de una solución enzimática [1.2 g de Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma No. Cat L-1412)] y 6 mL de solución osmótica (50 mM CaCl₂, 0.5 M Manitol, 50 mM MES). El cultivo se incubó durante 3-4 horas a 30-32 °C con agitación suave (50 rpm). Se monitoreo la presencia de protoplastos utilizando un microscopio óptico, estos se recuperaron empleando filtros de Miradoth (100 y 50 µm) y se lavaron con 2 mL de solución osmótica. La suspensión de protoplastos se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos y la pastilla se resuspende suavemente en 20 µL de solución osmótica. Después de cuantificar los protoplastos, utilizando microscopio acoplado a una cámara de Neubauer, se ajusto el número a 1×10^8 /mL.

Los protoplastos de *A. sydowii* se transformarn con 15 µg del plásmido pFC332-*hog1* o con un plásmido vacío (control) en un volumen final de 220 µL de solución

osmótica. La mezcla se incubó durante 20 minutos en hielo, y posteriormente se les añaden 260 μ L de polietilenglicol (previamente incubado a 42 °C por 20 minutos en un Thermo-shaker) y se agitaron 6 veces de forma rápida. La mezcla se dejó a temperatura ambiente sin agitación durante 30 minutos.

Los protoplastos transformados (entre 10^3 - 10^6) se colocan en 8 mL de medio PDA suave, a una concentración de y entonces se vierte en placas de medio PDA sólido. Se prepararon 3 placas de PDA: una con la muestra de la reacción de transformación, otra con la que la cepa silvestre de *A. sydowii* como control negativo, ambas placas con higromicina (50 μ g/mL), mientras que la tercera placa no contiene el antibiótico, y se inoculó a la cepa de *A. sydowii* silvestre, como control positivo. Estos controles son importantes para analizar la viabilidad de los protoplastos al final del experimento y para verificar que las transformantes obtenidas se deben a la adición de la construcción o del vector vacío, ya que ambos confieren resistencia a higromicina.

Las placas se incubaron a 28 °C hasta observar crecimiento de colonias (~ 5días). Para comprobar que las colonias que crecieron son efectivamente transformantes, se re-sembraron 10 colonias a nuevas placas con PDA higromicina. De estas colonias se purificó DNA genómico para realizar PCRs y verificar la delección o inserción de bases en la región blanco del proto-espaciadores de Hog1 (Nodvig *et al.*, 2015). Para este PCR se utilizó la enzima In-Phusion High-Fidelity DNA polymerase y los oligonucléotidos:

Foward: 5'CGGATCCATGGCGGAATTCGTACGTC3'

Reverse: [5'CAGATCTCTATTGGAACCCTTGTTGATTCAA3'

2.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.6.1. Clonación del gen *hog1* de *A. sydowii* en el vector de clonación pJET

1.2blunt.

Los estudios de caracterización del hongo *A. sydowii* realizados en el grupo de trabajo, incluyen la obtención de su transcriptoma. Los experimentos de complementación propuestos, tuvieron la finalidad de identificar el RNAm de *As-Hog1* detectados en el análisis transcriptómico, resultando ser ortólogos del gen *hog1* de *S. cerevisiae*.

Para obtener los cDNAs de *AsHog1* y *AsHog2* se purificó ARN total a partir de un cultivo de *A. sydowii* crecido por 7 días en MMG suplementado con 0.5M de NaCl a través del método de TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). En la Figura 2.6.1A, se observa la integridad del RNA total, de acuerdo a la proporción 2:1 entre el del 28S respecto al 18S ARN ribosomales. Se realizó la retrotranscripción de este ARN total para obtener el cDNA total y entonces se amplificó de manera específica la región del marco abierto de lectura de *AsHog1* y *AsHog2* usando oligonucleótidos específicos (descritos en materiales y métodos). En la figura 1B se observa la amplificación el fragmento que corresponde a *hog1* y a *hog2*, cuyo tamaño esperado era de 1112 pb y de 770 pb respectivamente.

En este punto se decidió continuar con la clonación de *As_Hog1* para posteriormente generar la cepa complementante de *S. cerevisiae*. El fragmento obtenido se insertó primeramente en el vector de clonación pJET 1.2 (Figura 2.5.3), para facilitar la posterior clonación del fragmento al vector de expresión pYES. La construcción fue transformada en células de *E. coli* DH5a que fueron sembradas en placas de LB con ampicilina. Se seleccionaron algunas de las colonias para realizarles un PCR de colonia, usando los oligonucleótidos *As_Hog1* y *As_Hog2* que hibridan con sitios en el pJet. El resultado de esta clonación fue negativo, porque no se observó la amplificación del fragmento esperado (1112pb). Por lo que se procedió a purificar plásmido de las colonias y se realizó un análisis de restricción de la construcción pJET 1.2:*AsHog1* con las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII*. Los fragmentos esperados eran de 521, 839 y 3243 pb, sin embargo las bandas obtenidas fueron de 2500 y 3000 pb, (Figura 2.6.2A). Además, se digirió la construcción con *BglII*, porque *XhoI* un corta en una secuencia interna de *Hog1*,

pero nuestro objetivo era obtener el ORF completo de *hog1*. Los fragmentos esperados con la digestión con *Bgl*II eran de 1140 y 2929 pb, sin embargo, solo se obtuvo una banda correspondiente a 3000 pb, la que corresponde al plásmido sin inserto (Figura 2.6.2C). Se intentó volver a amplificar el ORF de *hog1* para intentar nuevamente su clonación, pero ya no fue posible amplificarlo. Se requiere volver a intentar amplificar usando otra DNA polimerasa e intentar clonar este producto nuevamente en pJET 1.2 blunt, ya que aparentemente el vector estaba vacío.

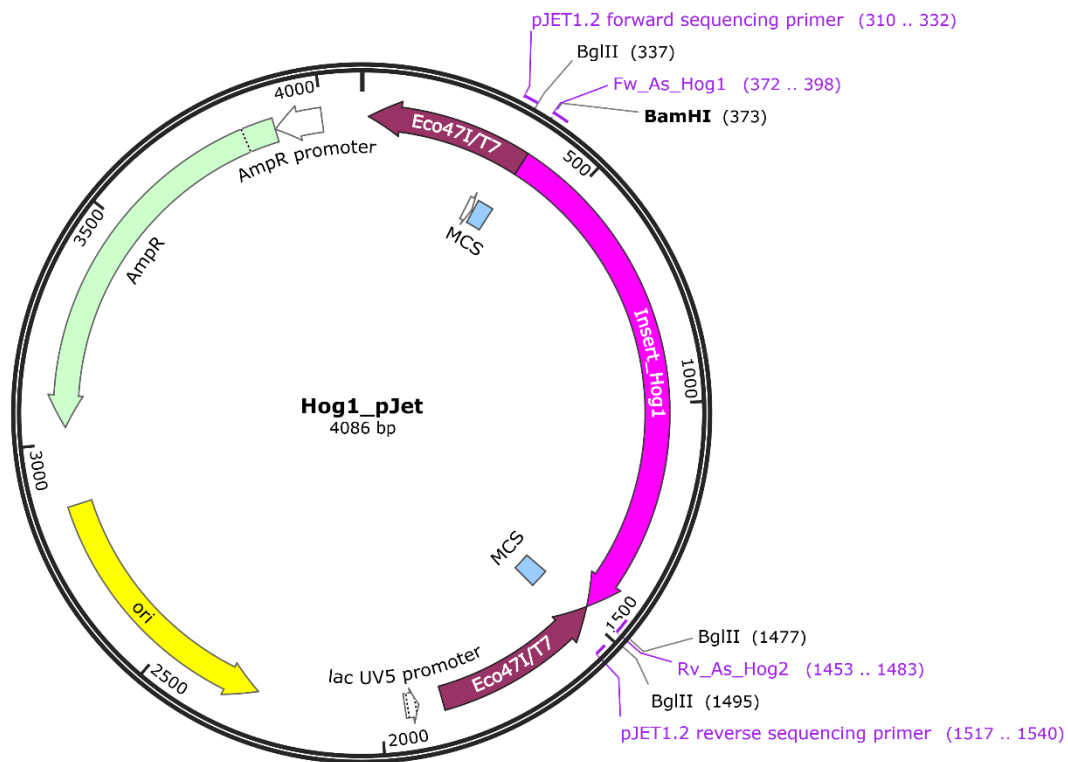


Figura 2.5.3.: Mapa representativo del vector de clonación pJET 1.2 que contiene el inserto de As_Hog1

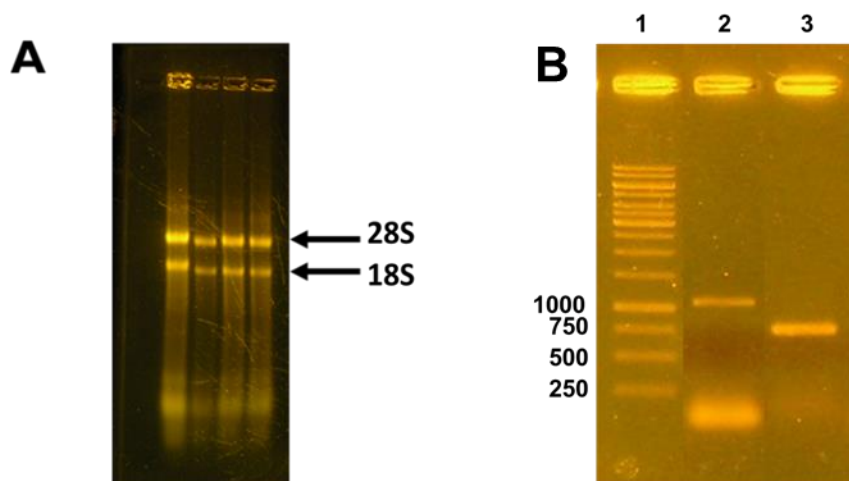


Figura 2.6.1. Integridad del ARN total purificado de *A. sydowii* y fragmentos de los amplicones de Hog1 y Hog2 A) Electroforesis de ARN en gel de agarosa (1%) del hongo *A. sydowii*, en los 3 carriles se muestran el ARN de las 3 colonias seleccionadas. (B) Electroforesis de DNA en gel de agarosa (1%). Los carriles se corresponden a las muestras: carril 1: marcador de peso molecular, carriles: 2 y 3 amplificación de *hog1* (1112 pb) y *hog2* (750 pb), respectivamente con enzima In-Phusion High-Fidelity DNA polimerase.

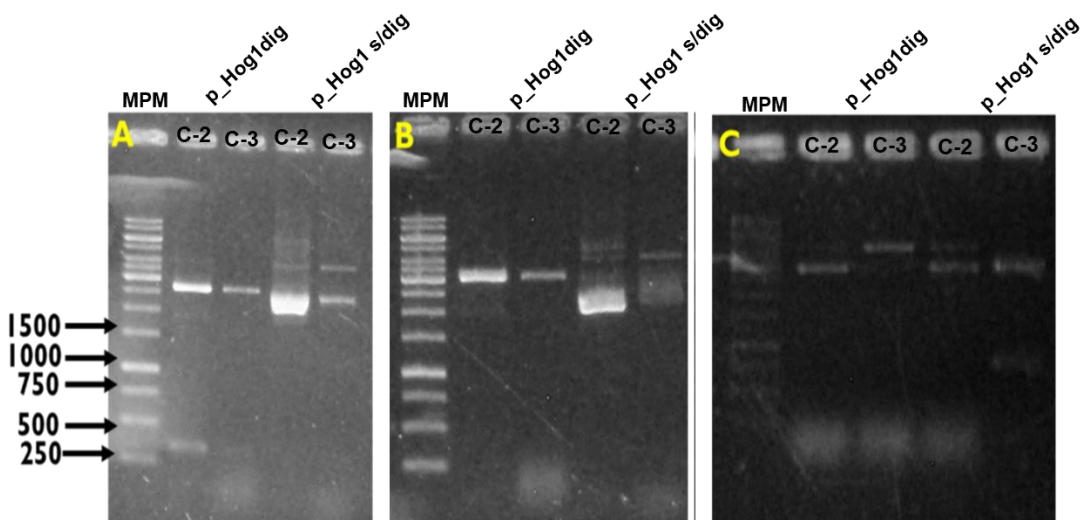


Figura 2.6.2. Análisis de restricción de las colonias obtenidas de la transfección de la construcción pJet::hog1. Electroforesis de DNA en gel de agarosa (1%). Los carriles se corresponden al análisis de restricción con *XhoI* y *HindIII* (A); *XhoI* (B); *BglII* (C) a 3 colonias escogidas al azar. carril 1: MPM; carril 2: colonia 2 (C2) (plásmido con gen *hog1*, digerido) (p_Hog1 dig); carril 3: colonia 3 (plásmido con gen *hog1*, digerido); carril 4: colonia 2 (plásmido con gen *hog1*, sin digerir) (p_Hog1 s/dig); carril 5: colonia 3 (plásmido con gen *hog1*, sin digerir).

2.6.2. Construcción de la mutante del gen *hog1* de *A. sydowii* mediante CRISPR/Cas.

Para generar la mutación del gen *hog1* de *A. sydowii* se utilizó el sistema de CRISPR/Cas, utilizando los plásmidos reportados por Nodvig, los que contienen las secuencias de las ribozimas que flanquean los 20 pb del RNA guía y que contienen en un extremo la secuencia PAM, así como la secuencia que codifica para la enzima Cas9. Para lograr este objetivo, primero se amplificó la unidad transcripcional del sgRNA, a partir del vector pFC334 que contiene el molde para estas secuencias, haciendo un PCR con los cebadores específicos para los extremos 5' y 3' del sgRNA que contienen la secuencia específica del protoespaciador que contiene las secuencias específicas que lo dirigen al gen Hog1 (Figura 2.6.3)

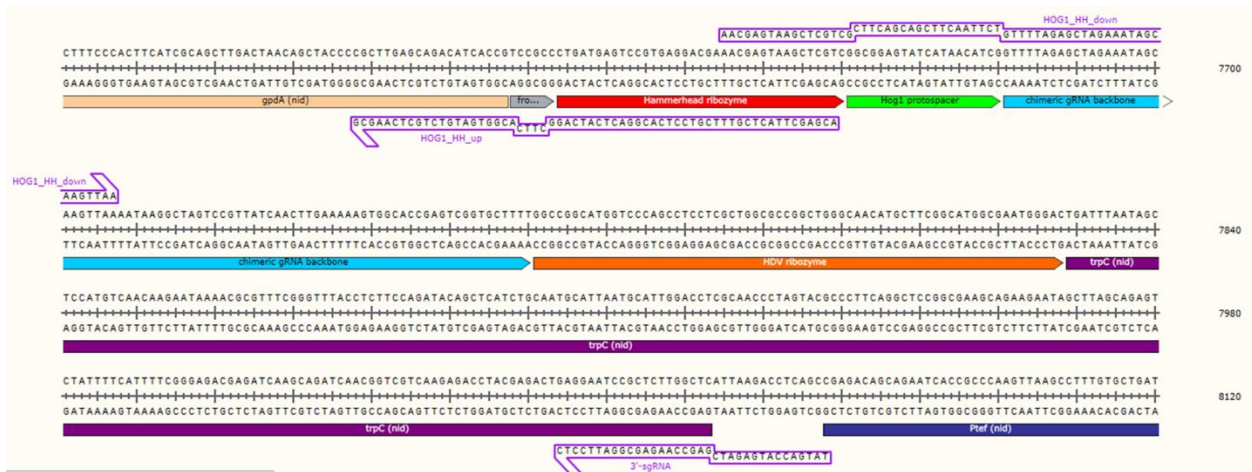


Figura 2.6.3: Secuencia obtenida para pFC332::RNA guía de Hog1.

En la Figura 2.6.4A se muestran los resultados de la amplificación de este producto. Se esperaba obtener En esta se esperaba obtener dos fragmentos de 600 y 400 pb aproximadamente. Estos fragmentos, junto con el vector pFC332 digerido con la enzima BglII fueron purificados en la concentración de 502 ng/ul en 20µL de reacción de con el kit de In-Fusion. A partir de la reacción In-Fusion se transformaron las células electrocompetentes *E. coli* XL-1blue. Las células transformadas se seleccionaron en placas con medios LB con ampicilina. El plásmido resultante se purificó a partir de un cultivo líquido de LB con ampicilina. En la Figura 2.6.4B, se pueden observar los plásmidos pFC332::sgRNA_Ashog1 y el vector original.

La presencia del sgRNA_*AsHog1* se verificó mediante PCR, como se muestra en la Figura 2.6.5. Sin embargo, aunque se obtuvo el fragmento del tamaño esperado, no se envió a secuenciar. Se prosiguió a purificar la construcción para obtener suficiente cantidad de DNA para transformar *Aspergillus sydowii* con por el protocolo de protoplastos (Herrera-Estrella, 1990). Se obtuvieron colonias transformadas que crecieron en PDA con higromicina (gen de resistencia que presente en el pFC332). Transcurridos 5 días de crecimiento se observaron las características que presentaron las colonias: estas eran colonias blancas, con pocas esporas localizadas en centro de la colonia y en forma de costra (Figura 2.6.6A). Se realizaron los pases monospóricos (en medio PDA higromicina 50µg/mL) de estas colonias, para obtener colonias genéticamente homogéneas. (Figura 2.6.6B). En la Figura 2.6.6C se observa una colonia aislada de los pases monospóricos que se mantuvo en un medio sin antibiótico y esto generó un fenotipo similar a la cepa silvestre (Figura 2.6.6D).

Para verificar si hubo deleciones o inserciones de bases en la secuencia blanco del ARN guía, se seleccionaron 3 colonias transformantes para extraer ADN genómico, realizar un PCR y enviar a secuenciar. El análisis de las secuencias obtenidas muestra que no hubo cambios en la secuencia del gen *hog1*. Por tanto, revisamos paso a paso a las construcciones. Al mandar a secuenciar la construcción pFC332:shRNA_*AsHog1* se observó que este tenía el protoespaciador correspondientes al gen *yA*, el cuál viene en el vector pFC334. Según Nødvig y colaboradores (2015) el gen *yA* está relacionado con la coloración de las esporas, por lo que suponemos que fue este gen el que generó el fenotipo que habíamos observado.

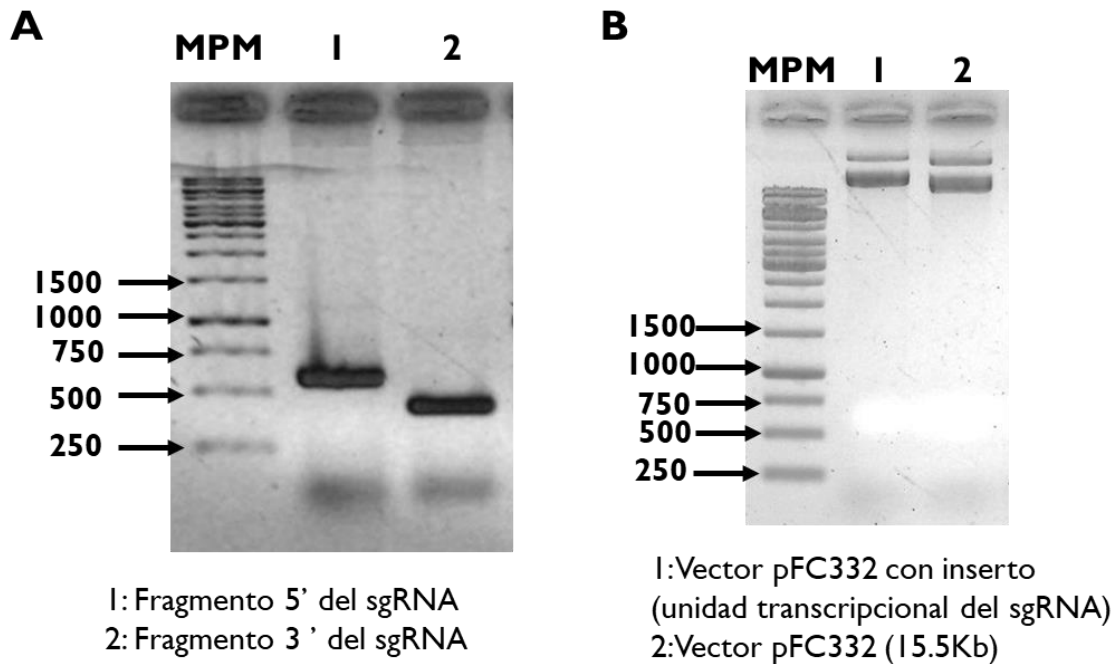


Figura 2.6.4. Construcción del vector pFC332 con el inserto de la unidad transcripcional del sgRNA específico para el gen *hog1* de *Aspergillus sydowii*. A) Amplificación por PCR de los fragmentos 5' y 3' del sgRNA a partir del vector pFC334, B) Purificación del vector pFC332 con el inserto del sgRNA específico

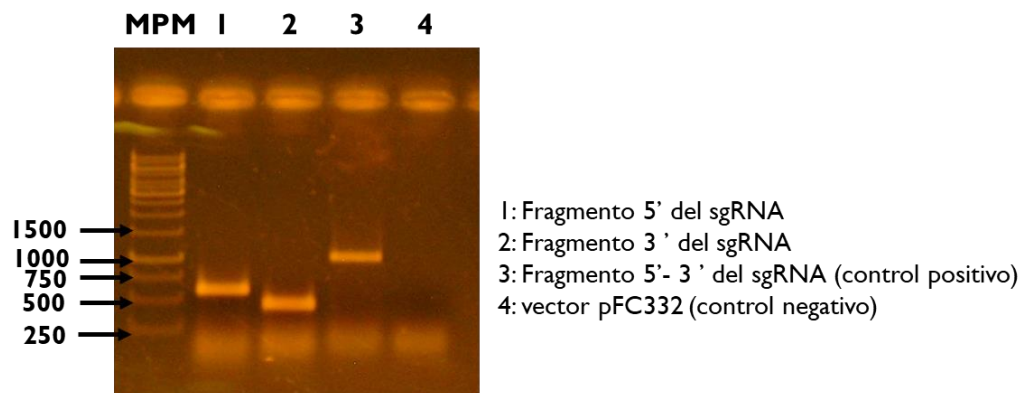


Figura 2.6.5. Tamizado de las colonias transformantes con pFC332:SgRNA_Ashog1. Amplicones del inserto del sgRNA de Hog1 obtenidos a partir de PCRs de colonia

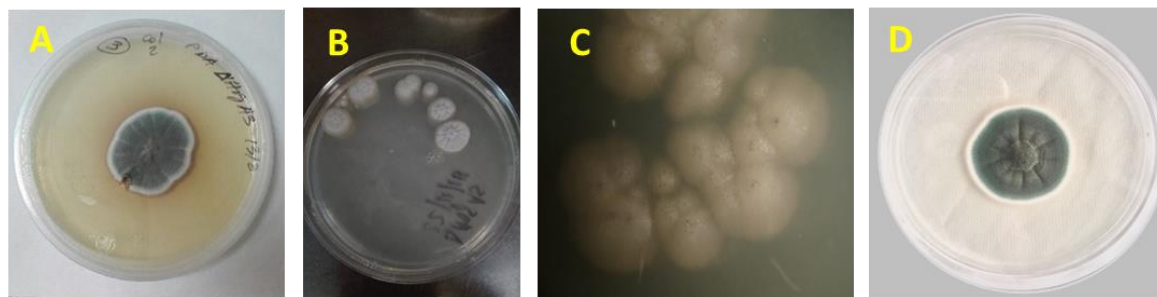


Figura 2.6.6. Características morfológicas de las posibles colonias mutantes en Hog1 de *Aspergillus sydowii*. Panel A: Colonia transformante de PFC332::sgRNA_*AsHog1*, aislada en medio PDA. Panel B: pasas monospóricas en medio PDA+Higromicina. Panel C: Vista estereoscópica (40X) de las colonias transformantes en medio PDA+Higromicina (50 µg/uL). Panel D: Colonia silvestre de *Aspergillus sydowii*

2.7. CONCLUSIONES

- ✓ La construcción de vector con el inserto de *hog1* para obtener la complementante de *S. cerevisiae*, no se obtuvo, ya que no se logró amplificar el ORF de *hog1*.
- ✓ No se obtuvieron las construcciones adecuadas para generar a las mutantes para Hog1 y/o Hog2 de *A. sydowii*.
- ✓ Las colonias de las posibles transformantes se secuenciaron y no se obtuvo la secuencia adecuada que complementa con el gen *Hog1*, por lo tanto los fragmentos no se insertaron exitosamente.

2.8. PERSPECTIVAS

- ✓ Complementar a la mutante de *S. cerevisiae* en *hog1* con los posibles genes ortólogos de *Aspergillus sydowii* (*hog1*, *hog2* y *MpkC*) y evaluar su tolerancia a estrés salino.
- ✓ Debido a que no se obtuvieron los vectores adecuados para generar cepas mutantes para Hog1 y/o Hog2 de *A. sydowii* mediante el sistema CRISP/Cas9, diseñar los oligonucleótidos para la generación de las mutantes mediante la metodología de recombinación homóloga.
- ✓ Generar las mutantes de *AsHog1*, *AsHog2* y *AsMpkC* en *A. sydowii* y evaluar su tolerancia a condiciones salinas.

2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M., & Prior, B. A. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology*, *14*(6), 4135-4144.
- Arazoe, T., Miyoshi, K., Yamato, T., Ogawa, T., Ohsato, S., Arie, T., & Kuwata, S. (2015). Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and bioengineering*, *112*(12), 2543-2549.
- Bahn, Y. S. (2008). Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryotic cell*, *7*(12), 2017-2036.
- Bansal, P. K., & Mondal, A. K. (2000). Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *16*(1), 81-88.
- Blomberg, A. (2000). Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS microbiology letters*, *182*(1), 1-8.
- Degols, G., Shiozaki, K., & Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*, *16*(6), 2870-2877.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213).
- Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, *197*(1), 33-48.
- Dujon, B. (2010). Yeast evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, *11*(7), 512-524.
- Entian, K. D., & Kötter, P. (2007). 25 yeast genetic strain and plasmid collections. *Methods in microbiology*, *36*, 629-666.
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de microbiología*, *46*(1-2), 24-46.
- Fuller, K. K., Chen, S., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell*, *14*(11), 1073-1080.
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., & Abe, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Molecular microbiology*, *56*(5), 1246-1261.
- Gacto, M., Soto, T., Vicente-Soler, J., Villa, T. G., & Cansado, J. (2003). Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *International Microbiology*, *6*(3), 211-219.
- Garrido-Bazán, V., Jaimes-Arroyo, R., Sánchez, O., Lara-Rojas, F., & Aguirre, J. (2018). SakA and MpkC stress MAPKs show opposite and common functions during stress responses and development in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2518.
- Hagiwara, D., Sakamoto, K., Abe, K., & Gomi, K. (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.
- Hagiwara, D., Sakamoto, K., Abe, K., & Gomi, K. (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.
- Hamel, L. P., Nicole, M. C., Duplessis, S., & Ellis, B. E. (2012). Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *The Plant Cell*, *24*(4), 1327-1351.
- Herrera-Estrella, A., Goldman, G. H., & Montagu, M. V. (1990). Notes High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Molecular microbiology*, *4*(5), 839-843.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system. *International review of cytology*, *215*, 149-187.
- Iwaki, T., Tamai, Y., & Watanabe, Y. (1999). Two putative MAP kinase genes, ZrHOG1 and ZrHOG2, cloned from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* are functionally homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 gene. *Microbiology*, *145*(1), 241-248.
- Jin, Y., Weining, S., & Nevo, E. (2005). A MAPK gene from Dead Sea fungus confers stress tolerance to lithium salt and freezing-thawing: prospects for saline agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(52), 18992-18997.
- Katayama, T., Tanaka, Y., Okabe, T., Nakamura, H., Fujii, W., Kitamoto, K., & Maruyama, J. I. (2016).

- Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology letters*, 38(4), 637-642.
- Kato, T., Okazaki, K., Murakami, H., Stettler, S., Fantes, P. A., & Okayama, H. (1996). Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS letters*, 378(3), 207-212.
- Klipp, E., Nordlander, B., Krüger, R., Gennemark, P., & Hohmann, S. (2005). Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nature biotechnology*, 23(8), 975-982.
- Konte, T., & Plemenitas, A. (2013). The HOG signal transduction pathway in the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: identification and characterisation of MAP kinases *WiHog1A* and *WiHog1B*. *Extremophiles*, 17(4), 623-636.
- Krantz, M., Becit, E., & Hohmann, S. (2006). Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Current genetics*, 49(3), 137-151.
- Lenassi, M., Vaupotic, T., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitas, A. (2007). The MAP kinase *HwHog1* from the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: coping with stresses in solar salterns. *Saline Systems*, 3(1), 1-11.
- Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, Z., & Zou, G. (2015). Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*, 1(1), 1-11.
- Mager, W. H., & Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS yeast research*, 2(3), 251-257.
- Nørdvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PloS one*, 10(7), e0133085.
- Panadero, J., Pallotti, C., Rodríguez-Vargas, S., Rande-Gil, F., & Prieto, J. A. (2006). A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4638-4645.
- Plemenitaš, A., Vaupotic, T., Lenassi, M., Kogej, T., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, 61, 67-75.
- Reyes, G., Romans, A., Nguyen, C. K., & May, G. S. (2006). Novel mitogen-activated protein kinase *MpkC* of *Aspergillus fumigatus* is required for utilization of polyalcohol sugars. *Eukaryotic Cell*, 5(11), 1934-1940.
- Rispail, N., Soanes, D. M., Ant, C., Czajkowski, R., Grünler, A., Huguet, R., ... & Di Pietro, A. (2009). Comparative genomics of MAP kinase and calcium–calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 46(4), 287-298.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., ... & Lewis, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287(5461), 2204-2215.
- Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), 289-318.
- San José, C., Monge, R. A., Perez-Diaz, R., Pla, J., & Nombela, C. (1996). The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 178(19), 5850-5852.
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., González, J., Defosse, T., Papon, N., Peña, A., & Coria, R. (2020). Contribution of the mitogen-activated protein kinase *Hog1* to the halotolerance of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Genetics*, 66(6), 1135-1153.
- Schaeffer, H. J., & Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology*, 19(4), 2435-2444.
- Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., & Kumar, A. (2010). MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant signaling & behavior*, 5(11), 1370-1378.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*, 79(1), 143-180.
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., ... & Jones, N. (1996). The *Atf1* transcription factor is a target for the *Sty1* stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & development*, 10(18), 2289-2301.
- Zakrajšek, T., Raspor, P., & Jamnik, P. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism—characterization at cellular and proteome level. *Journal of proteomics*, 74(12), 2837-2845.

2.10. ANEXOS

Secuencia del producto de Hog1

ATGGCGGAATTCGTACGTGCTCAGATTTTCGGCACGACCTTTGAAATCACCAGCCGATACACGG
 ACTTGCAGCCTGTAGGCATGGGTGCTTTTGGACTGGTCTGCTCGGCGAGGGATCAATTGACCGC
 CCAGCCGGTTGCCGTCAAGAAAATCATGAAGCCTTTCAGTACTCCAGTGCTCTCCAAAAGGACG
 TACCGAGAATTGAAGCTGCTGAAGCACCTGCGACACGAAAACATCATTAGCTTGAGCGATATAT
 TCATTTCCCCCTTGAGGACATCTACTTCGTACAGAACTTCTGGGTACCGACTTACATAGACT
 CCTTACTTCCAGGCCACTGGAGAAACAGTTTATCCAGTATTTCTTATATCAGATTCTGCGGGGA
 CTGAAATATGTCCATTCGGCAGGTGTTGTCCATCGTGACCTTAAGCCCAGTAATATTCTCATCA
 ATGAAAACCTGCGATCTAAAAATTTGCGATTTTCGGACTCGCGCGCATTCAAGACCCGCGAGATGAC
 AGGATATGTATCAACCAGGTACTACCGTGCGCCGGAGATCATGCTTACATGGCAAAAATACGAT
 GTCGAGGTAGACATCTGGAGTGCAGCATGCATCTTTGCCGAGATGCTGGAGGGAAAACCTCTGT
 TCCCCGGGAAAGACCACGTTAACCAGTTTTCCATCATTACGGAGCTTCTTGGGACGCCTCCGGA
 CGATGTGATCCAGACCATCTGCAGCGAGAATACTTTACGGTTCGTCAAGTCACTACCGAAGCGA
 GAGCGTCAGCCGTTGGCGACCAAATTCAGAAATGCCGATCCGGACGCTGTTGACCTCCTCGAGC
 GTATGCTCGTTTTTCGACCCCAAGAAGCGAATCCGTGCTGCCGATGCTCTTGCACATGAATACCT
 AGCTCCATACCATGATCCCACCGACGAGCCTGAAGCGGAGGAGAAGTTCGATTGGTTCGTTCAAC
 GATGCTGATTTGCCTGTGGACACCTGGAAAATCATGATGTACTCGGAGATTCTAGATTTCCACA
 ACATCGACCAGAATGCCGAAGGTAACCCGGCCCTCGTCGAAGGGGTTGGATTGAATCAACAAGG
 GTTCCAATAG

Secuencia del producto de Hog 2

CGCAAACAAAGTGTTCCCTCCTGCGTGGACACACGTCATTATTATCGTTATTCTAACGGCCCCAC
 TGCTGCTCATCCAGATAAGACAGTCGGCAGCCTCACGTCCCTTTTTATCCTTTCTCGTTTGAGT
 CTCGTTTTCTTTTTCTTTTTGCCGTCCTACTTCTTATTCTGAGCCAAGTCTAAGACCTAATGATAGA
 CTCGTGTGTACATAAGGCCGGTGTCCACTTACTTTGAATGCAAATGAACGAATTCGTCCGTGAC
 CAGATTCTAGGCACGACATTCGAGGTCACCAGCAGGTACACAGGTTTACAGCCCGTAGGAACCG
 GGGCTTTCGGACTCGTCTGCTCTGCAACGGACCAGTTAACTGGGCAGCCGGTTGCCGTCAAGAA
 AAATGTGACACCATTAGTAGCCCAGATCTGTCAAACGTATATATCGGGAGCTGAAGCTCCTG
 AAACACCTCCGGCATGAAAATATCATCAGCTTGAGTGATTTATTTATTTCTCCTCTTGAGGACA
 TGTATTTTCGTACGGACCTTTTTGACACAGATCTTACAAGGTTCTTTCTTCCAGACCATTGGA
 AAAGAAATTCATTCAGTATTTTCTATAACCAGCTCATGCGAGGACTCAAATATATCCACTCAGCA
 GCGGTTGTTACCGTGATCTCAAGCCCAGCAATATCCTCATCAATGAAAATTCGACCTCAAGA
 TTTGCGACTTTGGACTTGCCCGCATTCAGAACCCCGAGATGACCGGATATGTTGCAACCAGATA
 CTACCGTGCACCGGAGATCATGCTCACATGGAGGAAGTATGATGCAGAAGTAGATATCTGGAGC
 GCAGCATGCATCTTCGCCGAGATGATAGAGGGCAAGCCTCTGTTTCCCGGGAAAGACCATGTCC
 ATCAGTTCTCGATGATTACCGAGCTTCTGGGCACCCCTTCTGATGATGTGTGCAAGACAATTT
 CAGCGAAAATACCTTACAATTCCTCAACTCCATCCCAAAGCGCGAGCGCAACCGCTGGCCACA
 AAGCTGAAAACGCCGATCCAGACGCCATTGATCTTCTGGAGCGCACCTCGTCTTCGCCCCGA
 AAGAGCGATTAAACGCCGACCAGGCCCTCGCGCATGAATACCTCGCCCCGTACCACGATCCGAC
 TGACGAGCCCCGAGGCAGAAAAGTTCGATTGGTCTTTCAATGATACGGATTTGCCGGTGCATACT
 TGGAAGATGATGATGTATAGGGAGATTTTAGATTTCCACCATATGGGGTAGTGACACTAACCT
 CTGACGGGTTGTATAAAACTGTTAATGGAGGTCCATTTGATCGCGTCA

Secuencia del producto de MpkC

CCCGCCTTAACGTCAGAATGGCCGAGTTCGTGCGTGCTGAAATCCTGGGGACTACCTTTGAAAC
 CACCAGCAGATATGCGAATGTACAGCCCGTTCGGCCTCGGCGCTGCTGGCATCGTCTGCTCTGCT
 TATGATTTGATTTCCGAACAGGCAGTTGCAATCAAGAAGATGATGAAGCCGTTTCGATAGTACCT
 CAATTGCGAAGAGAACCTACCGAGAAGTGAAGCTCTTAAGGCACCTGCGACATGATAATCTGAT
 AAACATGAGCGATATCTTCATCTCCCTCTGGAAGACGTATATCTCGTAACAGAACTCCTACCA
 ACAGACCTGCACCGCCTGCTTAGCTCAAGACAACCTCGAGGGGACTTTTCATCCAGTATTTACAT
 ACCAAATACTGCGCGGGTTAAAATATATACACTCAGCAGGCGTGATTCATAGAGACCTCAAACC
 GGTGAATATTCTTATAAACGAAAACCTGTGACCTGAAAATTTGCGACTTCGGGCTGGCCCGTCTT
 CAGGAACCACAGATGACGGGCTACGTGTCAACGAGGTACTACCGCGCACCGGAAATCATGTTGT
 CCTGGCAGCGATACGGGAATAAGGTTGACCTGTGGAGCGTTCGGTTGTATTGTTGCCGAGATGTT
 TCTGGGTAGGCCATTATTTCCCGGGAACGGATCACATTAATCAGTTCTATTTGATTATGGACTTG
 TTAGGAAATCCACCGGATGAGGTGATTGATCGGATCACGACGACCAATACCCGTCGGATGGTAA
 AGTCCATGGCGAAAAAGAGTCCACGACGGTTGGAAGAGGTTTTTTCCCGGAGTTGAAGATCAAGC
 AATAAACTTTCTAAAGAACCTCCTGGTCTTCGACCCAGAGCAACGCCTTTCTGCAGAACAGGCA
 TTGAAACACCCTTACGTGGCGCAATATCACGATCCAAACGATGAACCTTGTGCAGAGCAAAAGT
 TCGACTGGTCATTCATGATGCTGAACTGCCACCGAGACGTGGAAGATCATGATATACTCCGA
 AGTCCCTCGATTTCTTCCAAGAGACCACAAACCCAGCGATCAGAACCAGGCTCTCCCAAGCACG
 GAAGATCCATCACAGCTCCAAACACCGGCCAACATATTAACGATGCGGAACTTCTCCCAGATC
 TTTCTACATTGGTCGATACGTCTAAGTTAGGTGGCATGGACTTCCTAGTCGACGGGCCACCAAT
 GGATTATGCTTAAATGAGCGTTTTTGTATGCGGTAAGAAATTTGACCTGAACGGAATTGAGTGGT
 GGTTTTGGAAAGTTTATGGAAGTAACTTCCACCTTCTGTCTGCTGGCCTGACGTCTGCTTGACTGG
 AAAGCGTACGCGTCCAAGAGCGAAAGGGAAAATTAATAATGAGTGATAATAAATCAGTAATTA
 CCATTCTTCTCTTTCCTTCCAACACTACGATTTTTCTCATTTTCATACAGTGTTTACTTCAACGCG
 GTTTACTCCCGGATAACAACGAAACGAACAGGAAAGAGTAAAGGTGGCACAAATCAC

Secuencia de la proteína Hog1

MAEFVRAQIFGTTFEITSRYTDLQPVGMGAFGLVCSARDQLTAQPVAVKKIMKPFSTPVLKRT
 YRELKLLKHLRHENIISLSDIFISPLEDIYFVTELLGTDLHRLLSRPLEKQFIQYFLYQILRG
 LKYVHSAGVVHRDLKPSNILINENCDLKICDFGLARIQDPQMTGYVSTRYYRAPEIMLTWQKYD
 VEVDIWSAACIFAEMLEGKPLFPKGDHVNQFSIITELLGTPPDDVIQITICSENTLRFVKSLPKR
 ERQPLATKFRNADPDAVDLLERMLVFDPKKRIRAADALAHEYLPYHDPTDEPEAEKFDWSFN
 DADLPVDTWKIMMYSEILDFHNIHQNAEGNPALVEGVGLNQGFQ*

Secuencia de la proteína Hog2

MQMNEFVRDQILGTTFEVTSRYTGLQPVGTGAFGLVCSATDQLTGQPVAVKKNVTPFSSPDLSK
 RIYRELKLLKHLRHENIISLSDLFISPLEDMYFVTDLFDLHKLSSRPLEKKFIQYFLYQLM
 RGLKYIHSAGVVHRDLKPSNILINENCDLKICDFGLARIQNPEMTGYVATRYRAPEIMLTWRK
 YDAEVDIWSAACIFAEMIEGKPLFPKGDHVVHVFQSMITELLGTPSDDVCKTISSENTLQFLNSIP
 KRERQPLATKLNADPDAIDLLERTLVFAPKERLNADQALAHEYLPYHDPTDEPEAEKFDWSF
 NDTDLPVHTWKMMMYREILDFHHMG*

Secuencia de la proteína MpkC

RLNVRMAEFVRAEILGTTFETTSRYANVQPVGLGAAGIVCSAYDLISEQAVAIKKMMKPF DSTS
IAKRTYREVKLLRHLRHDNLINMSDIFISPLEDVYLVTELLPTDLHRLSSRQLEGTFIQYFTY
QILRGLKYIHSAGVIHRDLKPVNINENCDLKICDFGLARLQEPQMTGYVSTRYYRAPEIMLS
WQRYGNKVDLWSVGCIVAEMFLGRPLFPGTDHINQFYLIMDLLGNPPDEVIDRITTTNTRMVK
SMAKKSPPRLEEVPFPGVEDQAINFLKNLLVFDPEQRLSAEQALKHPYVAQYHDPNDEPCAEQKF
DWSFNDAELPTETWKIMIYSEVLDFEQETTNP SDQNQALPSTEDPSQLQTPANILNDAELLPDL
STLVDTSKLGGMDFLVDGPPMDYA*

**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 **Estrategias moleculares del halófilo moderado *Aspergillus sydowii* como respuesta a condiciones hipo- e hipersalinas**, que presenta la alumna **Eya Caridad Rodríguez Pupo (5620141601)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. María Alicia González Manjarrez IFC-UNAM	APROBADO	
Dr. Ayixon Sánchez Reyes Cátedras CONACYT IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB-UAEM	APROBADO	
Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB-UAEM	APROBADO	
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente CEIB-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

ALEXANDRE TOSHIRRO CARDOSO TAKETA | Fecha:2021-11-17 11:18:44 | Firmante

rsq8WaNBvVTR471uCcpuBvkjvh4DkXRc4H/kdvbYNUCIYgF15nNZbpek3LSV7xzN3nj7G+UJ5p3g3cATbKY6jYTLb0URQVPvH+JKEybJd2X9cmGyZtBLAGp46vMdfQ4GjqRcnx
D9KJrQeRhQ98AG515fFyAqTsdKZHLcTjE1buzmuYTRraPEK3EWUpMnakHNW/3zF4pDXdsZz0O7iqHWEQf5BR3Qxbx1I714T2OYAMKXCMcN1718XECrDimjZqQ59OdHgzZ
6nVuyqV6gbqVWiKWocAM4Zv+HDCChQEXBQfeUwkh2ziTsrS8w7moBdm0fm1f5MMJmB6v3SrY+K6w==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2021-11-17 11:19:43 | Firmante

pz4P87CdFbwxCG5XKwvAlaEtMGA9akvCRobnZ68h1pKwRomOkYDd17Rq2aebZJR8G45kDLYamLED3YEEhoyGf2ImuXO9xbxGQ6C6FdnLm1NigRlqP5YR4ZYYSg0/PeFUX9+
djSTi+ZQW0r+sS9DErSjKzlu4dSaSQ5+hbtvpsMsgOp046HhLYeEf9SKwpT1jnB8pBkZeQ2cKbRbuZV3iqFz9nDzQDvIMyXH//qN8vblApaxyTzLwXWci+oc1jxgQSo+xtTkVoslrbs
vs/zmXU3G1bx7dQs2k1RIHS2l/H44HsKGvP4tAhJnJzQsLuvjnZlGmYaKyBti2zH38Hnyg==

AYIXON SÁNCHEZ REYES | Fecha:2021-11-17 11:26:00 | Firmante

sOe8KHezYJiGcFBDDU+Am2GtVqAZrGOUTiXXamMZmYuKfOOxHcPuspYDDP+02qv5OmMGmuA17z8Q6zdr4/ps07wPbFVbE9rBMjSc3BSG0JCwvYrcEkxmO/76NEIH2KNN5
VFS2Q/6TIRC5iz9Yr0OXP2hD2mMPHeTNoTdwVgGCORdSOBw9WIFlyzLOSbBe//Rb28zGj9giX/lbov9LL14FD+1L7Pp5DNlHc8jiwPTe/RIEvMu2n3N3HzDAGyEmeBwBEjzPrb
P94YeUbEGahhZbgECF9VA42qnmqxaOv+ZlznzJgortuacel10zP+I5K1tkONsG998MKV0C8s2Zxw==

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2021-11-17 11:28:48 | Firmante

GY/luwqaN5AHi5exA4yre3HuukTquz7DsUAbSLwaHMN827PSuqatmOaVMTqTUUFTh/qhTsfCOWhKOWC318QCDZNQ4BO2hR09pTh2r11j7VQcDStb+36ZhfT4HzFLDdotzoc6
xy7p1hcBnJ3ejkwA3Y53SsTJYzUF4bb8dH/tLMfPQY6E3qaEkxa07YOBuH3HPGidm4imc3YFrGdTNQ7iFGLQieUIUfi7N+qYkS4/wprIZC2ud6nMtj27C2G9catdhn+t7enGVuEfqJ
2jFweMR88//LDYdLbwwxakBtL0UBOIVVcHxvZti5xkvUZ8fVHAjoBxmjv9pMNJ1CH23J8Q==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2021-11-17 11:49:03 | Firmante

nd/wnAdX0uTC8TbdtAN7jaE0xO3/wj7kcM04vHtLrXvnsnDg/R2xPgaicvX7ChjG54UU818PLEPQmTPvMCRZ11pvmwDHuvBGnQ+0c1JuuYvTQRYMw2RJR/ulizLg43aPLER6PxVq
94X6nsQ79lw3GzqxL1VPVcdFq1R6ZfR3ybYS8LJVZMgsBft5GebMAp7wh1NfBsCxZ/PTXJj49WWRLAGsYF1syuIAZK0Ofzi3aYiAtQOVSMqa+SRsLiiRdVEzFJQtXNIPc7ejk0xBV
vSigrHibk5wujG7uzJ7960uFShAMipBs4qKf+LEQHb0QaU/49t9MbLqMxzcXjca==

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2021-11-17 12:25:41 | Firmante

JJlzVc5boW87qaoRTCuK7sI7N/nZasYn/hguttKBjuw4qpxpxDrNm6FPtoT9Z61GLOH5ngFO69sLzRdzGNwgZw3pPM4nbPS2Wh9kKPISSkoW5OQa1V3m+xbDT7462bAA7AIL4t
OxCi0jxicosDa8fr9E+mSRElysa2k+jpklBXPfB8wOwVSHxx4RiQmA8dggEqqhDNnRHzt73oE1yOTEjZ3JrdqRafVpkpQs/me2YeshB0d+btjlmIVSuFUd8VftWik9XGOZyQW3tg
8TNvREw2kFdr5fdgzewxhCpPsbqa5JPrSLJMeKgaVOSbh3FYojnVvOhhOcgOjtuXM1w==

MARIA ALICIA GONZALEZ MANJARREZ | Fecha:2021-11-17 16:39:13 | Firmante

jnVOSIMcl71uYz0o91jCaq0VK83Z3FbBj7rQrWKhWO845zncol0FXWchjqkQkXSAZbAtdCZufJMNNkcuObj1QWYhHmKMyNaVOMyv6iYziwaPF7233hEsZaj2HJSf/RHn+mRIQvJ7
mZD7uzB7Ov2Hd8/FV/NUKf2hnXk7f5m0LEONPj3L0Orl/2XeA5CRD3dJbNxxgAKYILMK10cE0OYwa2yDPoPH3BX0SRbSvwpzG5XhZ08JV4jAxKIIKqksgeSfYIM3qMjzLHTdR5
QhTaBjpBw3Wt2e70jSo5+4+m8B3MSHaqPpG15QefQ2nFGfImj3fOM9IIK8XWjWYDJiZQ==

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



G0137HcmC

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wkCUflaSYSN6NjzQpaPrmOg2Uqtaofj>

