



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estandarización de microcultivos de *Aspergillus sydowii* para la  
localización de hidrofobinas fusionadas con proteínas fluorescentes**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

*Castrejón Nogueroń Libni Anajared*

DIRECTORA DE TESIS:

*Dra. María del Rayo Sánchez Carbente*

**CUERNAVACA, MORELOS**

Abril, 2024

## **Agradecimientos**

Y en algún momento leí que una tesis no es solo de quien la escribe, sino de todo aquel que dio palabras de aliento, un abrazo, su apoyo, su tiempo y sus enseñanzas, por lo que esta tesis es de todo ellos.

Primeramente, quiero agradecer infinitamente a mis hermanos Misael y Luis, los cuales han sido mis compañeros de aventuras, mis confidentes y mis mejores amigos sin importar las circunstancias. También porque durante estos últimos años me soportaron en los momentos difíciles, me escucharon, me dieron su apoyo y abrazos cuando más los necesitaba. A Akira, porque siempre me acompañó en los momentos de alegría y de tristeza, se desveló y madrugó conmigo siempre sin importar nada.

A mis padres Lizette y Luis por su apoyo y motivación. A mi abuelita Esther por cuidarme siempre y ser un ejemplo de una gran mujer. A mis tías Elizabeth, Ruth y Eliuth por ser parte de mi formación, por apoyarme, cuidarme y guiarme siempre. A mi abuelito Antonio porque, aunque ya no está con nosotros lo recuerdo con mucho cariño, me hubiera gustado que formara parte de este proceso.

Agradezco profundamente a mi directora de tesis, la Dra. María del Rayo, por su dedicación al enseñarme, guiarme, escucharme y motivarme incansablemente. Además de haberme dado la oportunidad de trabajar con ella, formar parte de su equipo y confiarme este proyecto.

A mi comité tutorial, Dra. Rosa Estela, Dra. Lucia Perezgasga y Dr. José Augusto, por todo su apoyo, revisiones, correcciones y principalmente las palabras de aliento dadas. Al Dr. Edgar Balcazar por ser parte de mi comité tutorial y principalmente por ayudarme en el diseño y revisión de los oligonucleótidos quiméricos.

También quiero agradecer a la Dra. Nina Pastor, por guiarme en la obtención de la predicción de estructuras de las proteínas, por tenerme paciencia y siempre estar dispuesta a resolver mis dudas. A la Dra. Laura Ramírez y al Dr. Enrique Raynaud por prestar sus microscopios de fluorescencia, lo que hizo posible este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Karla, Fernando, Amanda, Jesús, Josué, Cristian, Martín, Mario Iza, Yeni, Amelia, Dr. German y Mario por todo el apoyo, las risas y el conocimiento dado. A Amairani, por guiarme, enseñarme y dar de su tiempo para ayudarme, y principalmente por ser una gran compañera y amiga. A Jasiel por enseñarme sobre técnicas de microscopía, estar al pendiente de todos y su ayuda incondicional. Y finalmente a Andrés, por ser un gran amigo, por escucharme, enseñarme y principalmente ser mi compañero de risas en el laboratorio

También quiero agradecer a la Dra. Gabriela Hernández Luna, por ser una gran maestra, por escucharme y motivarme siempre, por ser un gran ejemplo de seguir e inspirarme como mujer de ciencia. A Clau por ser una gran amiga, su alegría compartida y acompañarme en este trayecto, que en algún momento lo sentimos imposible y hoy lo estamos logrando.

A mis amigos, Marianita, Fanny, Karen, Megan, Leila, Maricela, Andy, Kelly, Blas y Gio, por todo, por los momentos de risa, por las aventuras en campo, por las tardes de plática en el pasillo y los abrazos que siempre me impulsaron a seguir. A S. Gama, que me escucho en los momentos en los que lo necesitaba, me alentó y me ayudo a seguir. A Mariela, por ser una gran amiga y consejera, los momentos contigo son de mis favoritos. A Shaid, por acogerme un día cualquiera en la facultad y hoy ser uno de mis amigos más importantes y especiales, eres una gran persona, las palabras se quedan cortas para agradecerte. Su amistad es gran tesoro para mí.

A mis amigas Adri y Mariel, por todas las aventuras, las experiencias, las risas y los consejos. Y a Elena, por ser una gran amiga con quien puedo hablar de muchas cosas, gracias por acompañarme durante toda la carrera, por tus consejos, correcciones y compañía. Sin duda su amistad es invaluable, son de lo mejor que me paso en la universidad, las quiero mucho.

Finalmente agradezco al CONACYT por la beca otorgada por el proyecto FORDECYT-PRONACES 252952 y el financiamiento de los materiales y reactivos a: FORDECYT-PRONACES/263954/2020 y 252952.

## Resumen

Los hongos poseen proteínas pequeñas (5 a 20 kD) llamadas hidrofobinas. Estas son proteínas anfipáticas y su principal característica es que poseen 8 residuos de cisteína altamente conformados, que forman 4 puentes disulfuro brindando estabilidad y rigidez a la proteína. Se encuentran recubriendo la pared celular en las diferentes estructuras de los hongos y participan en el crecimiento y desarrollo de estos. Sin embargo, en los hongos halófilos (*Wallemia ichthyophaga* y *Aspergillus sydowii*) se ha observado la expresión diferencial de transcritos de las hidrofobinas en dependencia de la concentración de sal del medio, por lo que se ha sugerido que estas podrían ser una respuesta ante el estrés hipo e hiperosmótico. No obstante, se desconoce su localización en los hongos halófilos y si ésta cambia en dependencia de la concentración de sal. En este estudio, se realizó el diseño de las construcciones para la fusión de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii* con proteínas fluorescentes para su futura localización. Además, se llevó a cabo la estandarización de microcultivos de *A. sydowii* y su caracterización micro morfológica en tres condiciones diferentes (0 M, 0.5 M y 2 M de NaCl). Esto nos permitirá en el futuro localizar a las diferentes hidrofobinas fusionadas con proteínas fluorescentes en las diferentes condiciones y tiempos del desarrollo utilizando los microcultivos estandarizados en el trabajo.

Palabras clave: hidrofobinas, microcultivos, DJ-PCR, halofilia y localización.

## Índice

Lista de abreviaturas .....	1
Índice de figuras .....	3
Índice de tablas .....	7
1 Introducción.....	9
2 Marco teórico.....	11
2.1 Extremófilos .....	11
2.2 Halófilos .....	12
2.2.1 Ambientes hipersalinos .....	12
2.3 Hongos halófilos.....	13
2.3.1 Mecanismos de halofilia.....	14
2.3.2 Hidrofobinas .....	17
3 Antecedentes.....	21
3.1 <i>Aspergillus sydowii</i> .....	21
3.2 Análisis transcriptómico en condiciones óptimas e hipersalinas.....	22
3.3 Localización de hidrofobinas por marcaje de proteínas fluorescentes .....	24
4 Justificación .....	24
5 Hipótesis .....	25
6 Objetivos.....	25
6.1 Objetivo general .....	25

6.2	Objetivos particulares.....	25
7	Materiales y métodos.....	25
7.1	Cultivo de <i>A. sydowii</i> en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) en ausencia y presencia de NaCl.....	25
7.2	Microcultivos de <i>Aspergillus sydowii</i> .....	26
7.2.1	Ensamble de la cámara de incubación.....	26
7.2.2	Microcultivo .....	26
7.2.3	Tinción de núcleos y pared celular.....	27
7.3	Extracción de ADN genómico de <i>Aspergillus sydowii</i> .....	28
7.4	Purificación de plásmidos.....	29
7.4.1	Transformación de <i>E. coli</i> 1116 con pPICZ $\alpha$ ::mCherry, pDR::SED1 .....	29
7.4.2	Cultivo de <i>E. coli</i> para la obtención de plásmidos .....	30
7.4.3	Extracción de plásmidos.....	31
7.5	Construcción de los cassettes usando la técnica de “Double-joint PCR”.....	32
7.5.1	Diseño de oligonucleótidos quiméricos.....	32
7.5.2	“Double- joint PCR” para la construcción de los cassettes para la generación de transformantes.....	33
7.5.3	Purificación de ADN a partir de banda .....	36
7.6	Transformación de <i>A. sydowii</i> .....	36
7.6.1	Curva de resistencia de <i>Aspergillus sydowii</i> a higromicina .....	36

7.6.2	Determinación del tiempo de incubación para la obtención de germínulas .	36
8	Resultados y discusión .....	37
8.1	Microcultivos de <i>A. sydowii</i> .....	37
8.1.1	Estandarización de microcultivos de <i>A. sydowii</i> .....	37
8.1.2	Diferencias morfológicas macro y microscópicas de <i>A. sydowii</i> .....	41
8.1.3	Estandarización de la tinción de núcleos y pared celular de <i>A. sydowii</i> .....	44
8.2	Construcción de los cassetes para la fusión de las HFBs con proteínas fluorescentes .....	48
8.2.1	Extracción de ADNg de <i>A. sydowii</i> y de los plásmidos pDR::SED1, pPICZ $\alpha$ ::mCherry, pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, pPICZ $\alpha$ ::SIH4 y pFC332 .....	48
8.2.2	Elección del sitio de fusión de la posición de la proteína fluorescente .....	50
8.2.3	Predicción de las estructuras de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 fusionadas con las proteínas fluorescentes seleccionadas (Citrina, mCherry y mCerulean) aquí. ....	53
8.2.4	Diseño de oligonucleótidos quiméricos para generar la construcción .....	54
8.2.5	Amplificación de los templados para la construcción de las hidrofobinas SIH1 y SIH2 marcadas con PF. ....	57
8.2.6	Purificación de los amplicones ADN a partir de bandas de agarosa. ....	66
8.2.7	Ensamblado de los cassetes de SIH1 y SIH2 usando la técnica de “DJ-PCR” 68	
8.3	Estandarización de los parámetros para la transformación de <i>A. sydowii</i> .....	76
8.3.1	Curva de resistencia a higromicina.....	76

8.3.2	Tiempo de la germinación de las esporas de <i>A. sydowii</i> .....	77
9	Conclusiones.....	78
10	Perspectivas .....	79
11	Referencias .....	80
12	Anexos.....	88
12.1	Secuencias utilizadas para el alineamiento.....	88
12.2	Alineamiento visual de HFBs.....	91
12.3	Puentes disulfuro formados con los 8 residuos de Cys en las hidrofobinas de <i>A. sydowii</i> .....	93
12.4	Condiciones de PCR.....	94
12.5	Protocolos de microcultivos .....	98
12.5.1	Protocolo de microcultivo a partir de porción de micelio joven .....	99
12.5.2	Protocolo de microcultivos a partir de perla de micelio.....	99
12.5.3	Protocolo de microcultivos a partir de espora con porción de micelio .....	101
12.5.4	Protocolo de microcultivos a partir de espora con el cubreobjetos cubierto de PDA.	102
12.5.5	Votos aprobatorios.....	103

## Lista de abreviaturas

aa: aminoácidos

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DJ-PCR: “Double Joint- PCR” (PCR doble unión)

dNTP: trifosfato de desoxirribonucleótido

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético

Ex: Excitación

Em: Emisión

HFB: Hidrofobina

HFBs: Hidrofobinas

M: Molar

MAP: Proteínas asociadas a microtúbulos

MAPKKK: MAP cinasa-cinasa-cinasa

MAPKK: MAP cinasa-cinasa

MAPK: MAP cinasa

min: Minutos

NCBI: “National Center for Biotechnology Information”

LB: Medio Luria-Bertani

PBS: “Phosphate-buffered saline”

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”)

PDA: “Potato Dextrose Agar”

PDB: “Potato Dextrose Broth”

PF: Proteína fluorescente

RAM: “Regulation of Ace2 and Morphogenesis”

SDS: Dodecil sulfato de sodio (“Sodium Dodecyl Sulfate”)

TAE buffer: Tris-Acetato-EDTA

Tris: Tris(hidroximetil) aminometano

YMA: “Yeast Mannitol Agar”

## Índice de figuras

- Figura 1.** Mecanismos de halofilia. A) Mecanismo “Salt-in”, donde la turgencia celular se mantiene por la expulsión de Na<sup>+</sup> y la introducción de K<sup>+</sup> por medio de transportadores. B) Mecanismo “Salt-out” donde hay la acumulación de solutos compatibles y la expulsión de Na<sup>+</sup>, además de modificaciones de la membrana celular (melanización) y el recubrimiento de hidrofobinas. (Tomado de Rodríguez-Pupo, E., 2021. Modificado por Castrejón-Noguerón, L.) ..... 17
- Figura 2.** Características de las hidrofobinas. A) Residuos de Cys característicos de las hidrofobinas clase II formando puentes disulfuro. B) Estructura globular de las hidrofobinas mostrando el N- y C- terminal, en azul y rojo, respectivamente y el parche hidrofóbico en verde (Linder et al., 2005). ..... 18
- Figura 3.** Papel biológico de las hidrofobinas durante el crecimiento y desarrollo del hongo. .... 20
- Figura 4.** Expresión diferencial de hidrofobinas de *W. ichthyophaga* en dos diferentes concentraciones de NaCl (10% y 30%) (Zajc *et al.*, 2013). ..... 21
- Figura 5.** Cinética de crecimiento de *A. sydowii* en diferentes condiciones de salinidad (0, 0.5 M, 1 M y 2 M de NaCl). Se cultivó en un medio con glucosa como única fuente de carbono. Las barras de error indican la desviación estándar (n=3) (Rodríguez-Pupo et al., 2021). ..... 22
- Figura 6.** Niveles de expresión (TPM) de hidrofobinas identificadas en el transcriptoma de *A. sydowii*. TPM: transcritos por millón (Pérez-Llano et al., 2020). ..... 23
- Figura 7.** HFB4::mRFP y HFB10::YFP de *T. guizhouense*. A) Esporas en dormancias en portaobjetos, B) Esporas lavadas previamente para retirar a las HFBs, observadas en el microscopio confocal, C) Igual que en (B) pero después de una incubación de 20 min (t<sub>20'</sub>) en exceso de agua. La síntesis de HFB4::mRFP se hizo visible (flechas) (Cai et al., 2021). 24

<b>Figura 8.</b> Ensamble de la cámara de incubación para micro cultivo. ....	26
<b>Figura 9.</b> Zona de la colonia donde se tomaron los inóculos para los experimentos en microcultivos. ....	27
<b>Figura 10.</b> Diseño de las construcciones para generar hidrofobinas en marco con proteínas fluorescentes. Oligonucleótidos quiméricos diseñados para la amplificación de las secuencias para la construcción en los dos diferentes órdenes. A) Construcción con la proteína fluorescente ubicada en el amino terminal. B) Construcción con la proteína fluorescente ubicada en el carboxilo terminal. ....	33
<b>Figura 11.</b> Ensamblaje de los cassettes usando “Double- joint PCR”. A) Amplificación de los fragmentos con los oligonucleótidos quiméricos diseñados (primera ronda), B) Empalme y amplificación de los fragmentos (segunda ronda) de la PF con la HFB, y el Ttef-hph con el brazo 3’. C) Reamplificación del empalme. ....	35
<b>Figura 12.</b> Diferencia en el tamaño de las perlas de micelio de <i>A. sydowii</i> cultivado en PDB con las diferentes condiciones (0 M, 0.5 M y 2 M de NaCl) por 6 días. ....	38
<b>Figura 13.</b> Diámetro de las perlas de micelio de <i>A. sydowii</i> cultivadas en medio líquido PDB sin NaCl (0 M) y suplementado con 0.5 M y 2 M NaCl sal en los días 2, 4 y 6 de incubación. ....	39
<b>Figura 14.</b> Diferencias microscópicas de <i>A. sydowii</i> con 2 días de incubación y a partir de microcultivos de esporas, observadas con tinción de pared celular (Calcoflúor 2%). ....	42
<b>Figura 15.</b> El estrés osmótico afecta las características micro-morfológicas de <i>A. sydowii</i> . ....	43
<b>Figura 16.</b> Estandarización de la tinción de pared celular de <i>A. sydowii</i> . ....	46
<b>Figura 17.</b> Tinción de <i>A. sydowii</i> con DAPI a 25 µg/mL. ....	47

<b>Figura 18.</b> Integridad del ADNg de <i>A. sydowii</i> y de los plásmidos pDR::SED1, pPICZ $\alpha$ ::mCherry, pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, pPICZ $\alpha$ ::SIH4 y pFC332 usados como templados.....	49
<b>Figura 19.</b> Alineamiento de 34 secuencias de hidrofobinas sin péptido señal basadas en el anclaje de sus ocho Cys (resaltados en verde) a partir de la base de datos de Interpro y NCBI. ....	51
<b>Figura 20.</b> Diferencia entre la longitud del lado amino terminal y el lado carboxilo terminal de las 34 secuencias alineadas.....	52
<b>Figura 21.</b> Predicción de las estructuras de las hidrofobinas fusionadas con proteínas fluorescentes. ....	54
<b>Figura 22.</b> Esquema representativo del empalme de las secuencias para el diseño de los oligonucleótidos quiméricos.....	55
<b>Figura 23.</b> Amplicones de los fragmentos de Ttef-hph a partir del plásmido. ....	58
<b>Figura 24.</b> Secuencias amplificadas de las HFBS y de las PF indicadas en el plásmido de templado. ....	59
<b>Figura 25.</b> Amplificación de los fragmentos de SIH1, SIH2 Citrina y mCherry a partir de los plásmidos pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, SED1 y pPICZ $\alpha$ ::mCherry. ....	60
<b>Figura 26.</b> Amplificación de mCherry a partir del plásmido pPICZ $\alpha$ ::mCherry por la Taq polimerasa y a diferentes temperaturas de alineamiento (57.3°C, a 59.5 °C y a 60.8 °C). ..	61
<b>Figura 27.</b> Amplicones de los brazos 5' y 3' de las hidrofobinas SIH1 y SIH2 usando DNAg como templado. ....	63
<b>Figura 28.</b> Estandarización de la amplificación de los fragmentos de los brazos 5' y 3' de las hidrofobinas SIH1 y SIH2 usando DNAg como templado usando dos temperaturas de alineamiento.....	64

<b>Figura 29.</b> Amplicones de los brazos 5' y 3' de las hidrofobinas SIH2 usando DNAg como templado y 1.2 $\mu$ M de oligonucleótidos. ....	65
<b>Figura 30.</b> Amplificación de SIH1 usando pPICZ $\alpha$ ::SIH1 como templado a diferentes temperaturas.....	66
<b>Figura 31.</b> Amplicones purificados para generar los cassettes de SIH1 y SIH2 para su posterior transformación en <i>A. sydowii</i> . ....	68
<b>Figura 32.</b> Ensamble de los cassettes quiméricos de la SIH1 y la SIH2 por medio de “DJ-PCR”.....	69
<b>Figura 33.</b> Amplicones obtenidos de la unión de fragmentos en dos partes (B5'-PF-HFB y Ttef-hph-B3'). ....	70
<b>Figura 34.</b> Ensamble de fragmentos de tamaño similar. ....	71
<b>Figura 35.</b> Amplicones de la unión de PF-HFB y Ttef-B3' de SIH1 y SIH2. ....	72
<b>Figura 36.</b> Tolerancia de <i>A. sydowii</i> a higromicina. Cultivo de <i>A. sydowii</i> en A) PDA sin higromicina (C+), PDA suplementado con 50 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL, 150 $\mu$ g/mL y 200 $\mu$ g/mL de higromicina, incubado por 7 y 14 días a 28°C.....	77
<b>Figura 37.</b> Cinética de germinación de las esporas de <i>A. sydowii</i> cultivadas en PDB en los tiempos de incubación de: A) 6 horas, B) 8 horas y C) 10 horas, con su acercamiento respectivo.....	78
<b>Figura 38.</b> Representación visual del alineamiento de las HFBs usadas en el alineamiento. Los cuatro caracteres posteriores al “_” son pertenecientes al número de acceso de la secuencia. Los cuadros rojos indican la posición de la primera y última Cys. ....	92
<b>Figura 39.</b> Puentes disulfuro formados por los 8 residuos de Cys en la HFB de <i>A. sydowii</i> Los cuadros rojos indican la posición de las Cys y las líneas punteadas el puente disulfuro formado entre ellas. ....	93

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Componentes del buffer de extracción de DNAG.....	28
<b>Tabla 2.</b> Componentes del medio LB (Luria-Bertani Medium) y LB bajo en sales.....	30
<b>Tabla 3.</b> Antibióticos de selección para las colonias. ....	30
<b>Tabla 4.</b> Composición de las soluciones para la extracción de plásmido por lisis alcalina.	31
<b>Tabla 5.</b> Componentes de la mezcla para la reacción de PCR.....	33
<b>Tabla 6.</b> Condiciones utilizadas en los microcultivos de <i>A. sydowii</i> . ....	39
<b>Tabla 7.</b> Estandarización de microcultivos de <i>A. sydowii</i> para la medición y seguimiento de las hifas. ....	40
<b>Tabla 8.</b> Concentración promedio del ADNg de <i>A. sydowii</i> y de los plásmidos obtenida en la extracción.....	48
<b>Tabla 9.</b> Peso molecular de los plásmidos que se utilizaron como templados. ....	49
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos diseñados para la generación de las construcciones de las hidrofobinas (SIH1, SIH2 y SIH4) fusionadas con proteínas fluorescentes (Citrina, mCherry y Cerulean). ....	55
<b>Tabla 11.</b> Mezcla de los componentes para estandarización de la amplificación de mCherry. ....	61
<b>Tabla 12.</b> Peso molecular y concentración de los amplicones para los cassettes de SIH1 y SIH2.....	67
<b>Tabla 13.</b> Condiciones de la tercera ronda del “DJ-PCR” con las diferentes variantes probadas.....	72
<b>Tabla 14.</b> Número de acceso de las secuencias utilizadas en el alineamiento.....	88

<b>Tabla 15.</b> Condiciones finales PCR para la amplificación de los fragmentos.....	94
<b>Tabla 16.</b> Condiciones de la segunda ronda del “DJ-PCR”. .....	95
<b>Tabla 17.</b> Condiciones de la tercera ronda del “DJ-PCR”.....	96
<b>Tabla 18.</b> Condiciones de la segunda ronda del “DJ-PCR” con el cambio de relaciones molares (1:2:3:1:1) de los fragmentos.....	96
<b>Tabla 19.</b> Condiciones de la tercera ronda del “DJ-PCR” ” con el cambio de relaciones molares (1:2:3:1:1) de los fragmentos.....	97

## 1 Introducción

Los organismos extremófilos son aquellos cuyo crecimiento óptimo se da en condiciones extremas. En las últimas décadas, éstos han ganado interés debido a su gran potencial biotecnológico. Se clasifican según en la condición en la que se desarrollen, por ejemplo, los termófilos son organismos que se desarrollan de manera óptima en temperaturas  $>60^{\circ}\text{C}$  o los halófilos, organismos cuyo crecimiento óptimo se da en una concentración de NaCl mayor a la del mar (0.5 M de NaCl) (Meseguer Soria, 2004; Salwan & Sharma, 2020). Estos últimos están principalmente representados por organismos procariontes (bacterias y arqueas) y hasta hace un par de décadas se pensaba que no había organismos eucariontes halófilos (DasSarma, 2001). Fue hasta el 2000 que el equipo de Gunde-Cimerman, aisló hongos en una salina de Sečovlje, en Eslovenia, a partir de este hallazgo el número de hongos halófilos descubiertos se ha incrementado.

Los halófilos poseen principalmente dos estrategias generales para hacer frente al estrés iónico y osmótico causado por el NaCl, entre estas estrategias está el “Salt-in” usado principalmente por arqueas y bacterias y el “Salt-out” usado por eucariontes como los hongos, los cuales también poseen proteínas llamadas hidrofobinas, que son proteínas pequeñas de aproximadamente 20 kD producidas únicamente por ellos, son anfipáticas, brindándoles la capacidad de pasar de un medio hidrofílico a uno hidrofóbico y su principal característica es la presencia de ocho residuos de cisteína (Cys) altamente conservados. Y recientemente, se ha hipotetizado que podrían representar un nuevo mecanismo de halofilia en base a lo reportado sobre su expresión diferencial vista en los hongos *W. ichtyophaga* y *A. sydowii* cuando estos crecen en altas concentraciones de sal (5M y 2 M, respectivamente), por lo que podrían estar participando en el crecimiento del hongo en condiciones salinas (Zajc *et al.*, 2013; Pérez-Llano *et al.*, 2020).

En 2014, Batista-García y col. aislaron al hongo halófilo moderado *Aspergillus sydowii* a partir de una fermentación de bagazo de caña suplementado con medio mineral y 2 M de NaCl. Posteriormente, Pérez-Llano y col. en 2020, realizaron un estudio transcriptómico del hongo crecido en ausencia de sal, 0.5 M o 2 M de NaCl, en este determinó que tres hidrofobinas (SIH1, SIH2 y SIH4) se expresan diferencialmente y en dependencia de la concentración de NaCl. Se ha hipotetizado que las hidrofobinas expresadas en alta salinidad

(SIH1 y SIH2) le permiten al hongo contender con el estrés salino, sin embargo, la expresión de los transcritos no nos permite conocer ni la localización de éstas en las diferentes estructuras del hongo ni el papel que juegan en la fisiología del hongo. Por lo tanto, este proyecto tiene como objetivo generar líneas transgénicas de *A. sydowii* que expresen a estas hidrofobinas fusionadas con proteínas fluorescentes para determinar su localización.

## 2 Marco teórico

### 2.1 Extremófilos

Dentro de la gran variedad de ambientes que existen en el planeta, encontramos aquellos con condiciones que son extremas para el ser humano (Coker, 2019). Estas condiciones están dadas por factores fisicoquímicos como: altas o bajas temperaturas, pH ácido o básico, una radiación elevada, altas concentraciones de metales, presión mayor a una atmósfera o altas concentraciones de sal. Entre los hábitats donde encontramos estas condiciones están los volcanes, las fumarolas hidrotermales, los desiertos, las regiones polares, lagos salinos, entre otros. A pesar de tener estas condiciones adversas para la vida, existen organismos capaces de desarrollarse en estos ambientes a los que se les conoce como extremófilos y extremo-tolerantes (Salwan & Sharma, 2020).

El término extremófilo proviene del latín “*extremus*” y del griego “*philo*” que significa amante de lo extremo (Schröder *et al.*, 2020), y se refiere a aquellos organismos que tienen la capacidad de crecer de manera óptima en condiciones que el hombre considera fuera del estándar. Mientras que los extremo-tolerantes son aquellos cuyo óptimo de crecimiento se encuentra dentro de los parámetros de la mesofilia, pero son capaces de crecer en condiciones extremas (Salwan & Sharma, 2020). De acuerdo al tipo de condiciones en la que se desarrollan, los extremófilos y extremo tolerantes se dividen en: termófilos (temperaturas mayores a los 45 °C), psicrófilos (temperaturas de menos 0 a 20 °C), alcalófilos (pH mayores a 9), acidófilos (pH menores a 5), xerófilos (actividad de agua menor al 0.75), metalotolerantes (altas concentraciones de metales), piezófilos (presión superior a 1 atm), radiotolerantes (radiación de 40 a 400 nm) y halófilos (concentraciones de NaCl superiores al mar) (Ramírez *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2018).

En los últimos años, el interés por los extremófilos se ha incrementado debido a su enorme potencial biotecnológico, como la estabilidad de sus enzimas y proteínas. Un ejemplo es la Taq polimerasa, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, descubierta en 1960 en el Parque Nacional de Yellowstone en Estados Unidos, enzima que es usada en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) además de la Pfu polimerasa, aislada de la archaea hipertermófila *Pyrococcus furiosus* (Salwan & Sharma,

2020; Ramírez *et al.*, 2006). A pesar de que los estudios de extremófilos se han enfocado en organismos procariontes, éstos se encuentran representados en los tres dominios de la vida (Coker, 2019).

En las últimas décadas, se inició la caracterización de los hongos extremófilos, los cuales también presentan adaptaciones fisiológicas que les permiten desarrollarse en estos ambientes con características extremas como en altas concentraciones de sal, estos son de especial interés para este proyecto y se denominan hongos halófilos (Salwan & Sharma, 2020).

## **2.2 Halófilos**

Se define como halófilos a los organismos cuyo óptimo de crecimiento se da en concentraciones de NaCl superiores a las del mar (0.5 M de NaCl), estos se clasifican de acuerdo con la concentración en la que se desarrollan óptimamente: halófilos ligeros (0.2 a 0.85 M de NaCl), halófilos moderados (0.85 a 3.4 M de NaCl) y halófilos extremos (3.4 a 5.1 M de NaCl). Análogamente, los halotolerantes son aquellos que su óptimo de crecimiento se encuentra en concentraciones menores a 0.2 M de NaCl, pero que pueden llegar a habitar en concentraciones tan altas como 5M de NaCl (DasSarma, 2001; Meseguer Soria, 2004; Salwan & Sharma, 2020). Estos organismos se encuentran dentro de una gran variedad de ambientes hipersalinos que mantienen la cualidad de contener altas concentraciones de sal.

### **2.2.1 Ambientes hipersalinos**

Los ambientes hipersalinos se definen como aquellos en que la concentración de sal (NaCl) supera a la concentración del agua de mar (0.5 M de NaCl). Estos pueden ser de origen oceánico, en el que por eventos geológicos se da la separación del océano, quedando como un sistema cerrado, donde la evaporación del agua ocasiona la concentración gradual de sales, o por origen continental, este es dado por la disolución de sales de las capas geológica y rocas, seguido por la evaporación del agua, dando como resultado lagos salinos (DasSarma, 2001; Salwan & Sharma, 2020). Entre los ambientes salinos a nivel mundial encontramos al Mar Muerto en el Medio Oriente, el Gran Lago Salado en Utah Estados Unidos y en México encontramos a Guerrero Negro y a la Laguna San Ignacio en Baja California Sur. Además,

se estima que 1 millón de hectáreas de suelo están en condiciones salinas a causa de actividades antropogénicas y estas se encuentran principalmente en zonas áridas y semiáridas (DasSarma, 2001; Beltrán *et al.*, 2016; Salwan & Sharma, 2020). La diversidad biológica que se ha encontrado en estos ambientes es grande y abarca organismos de los tres dominios.

Dentro de los procariontes aislados de estos ambientes encontramos una gran variedad de bacterias como *Aphanothece halophytica* y *Oscillatoria salina*, y archaeas como *Methanohalobium evestigatum* y *Methanohalophilus halophilus* (DasSarma, 2001). Por mucho tiempo se creyó que sólo organismos procariontes eran halófilos, sin embargo, también se han encontrado eucariontes halófilos como: plantas (*Atriplex halimus*), algas (*Dunaliella salina*), protozoarios (*Fabrea salina*), levaduras (*Debaromyces hansenii* y *Cladosporium salinae*) y hongos (*W. ichthyophaga* y *A. niger*) (DasSarma, 2001; Gunde-Cimerman & Zalar., 2014; Gehlot & Singh, 2018).

### **2.3 Hongos halófilos**

Entre los organismos halófilos reportados, el 72% son procariontes (21.9% Arqueas y 50.1% Bacterias), y el resto son eucariontes que incluyen a las levaduras y a los hongos (Salwan & Sharma, 2020). En el 2000, se reportó la primera identificación de hongos en la salina Sečovlje, en Eslovenia, entre los que se encontraban: *Hortaea werneckii*, *Phaeothece triangularis*, *Trimmastostroma salinum*, *Aureobasidium pullulans* y varias especies del género *Cladosporium*. Posteriormente, se han descubierto especies nuevas y algunas ya conocidas en otros medios naturales hipersalinos, pero que previamente habían sido considerados únicamente como contaminantes de alimentos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2010; Batista-García *et al.*, 2014; Gehlot & Singh, 2018). Las divisiones a las que pertenecen la mayor parte de estos hongos son: *Ascomycota* y *Basidiomycota*. La mayoría de los reportes se enfocan en la identificación de estos hongos halófilos, pero hasta el momento sólo se han realizado estudios de caracterización fisiológica en los siguientes: *D. hansenii*, *W. ichthyophaga*, *H. werneckii* y recientemente, Pérez-Llano y col. propusieron como organismo modelo a *Aspergillus sydowii* (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009; Batista-García *et al.*, 2014; Gunde-Cimerman & Zalar., 2014; Gehlot & Singh, 2018; Pérez-Llano *et al.*, 2020).

Por tanto, se requiere profundizar en los mecanismos que permiten a estos organismos desarrollarse en condiciones de salinidad.

### **2.3.1 Mecanismos de halofilia**

Los ambientes salinos e hipersalinos generan dos tipos de estrés a las células: el estrés iónico causado por las altas concentraciones de iones extracelulares que penetran a la célula, ocasionando un efecto tóxico, y el estrés osmótico causado por la pérdida de agua al haber altas concentraciones de solutos extracelulares, causando la disminución del potencial hídrico y la reducción de la turgencia celular, provocando el incremento de la concentración de solutos en el citoplasma, que puede llevar a la inactivación de proteínas y la disminución de actividad celular (Folch-Mallol, 2004; Gunde-Cimerman & Zalar, 2014; Plemenitas *et al.*, 2014; Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021). Por lo que los organismos halófilos y halotolerantes tienen estrategias para hacer frente a ambos tipos de estrés. Se pueden mencionar dos estrategias generales: el “salt-in” que es utilizado principalmente por procariontes y el “salt-out” utilizado por eucariontes.

#### **2.3.1.1 Transporte iónico (“Salt-in”)**

Debido a la alta concentración de NaCl en un ambiente hipersalino, el potencial hídrico de la célula disminuye, lo que lleva a un desequilibrio osmótico, el cual puede ser contrarrestado aumentando la concentración de  $K^+$  intracelular para mantener la turgencia celular y expulsando a los iones de  $Na^+$  al medio extracelular o almacenándolos en organelos. Esto se logra a través de transportadores específicos para  $K^+$ , que lo introducen al medio intracelular, y por transportadores de  $Na^+$  encargados de expulsarlo al medio extracelular. Esta estrategia se ha reportado para Arqueas y algunas bacterias anaerobias halófilas (González-Hernández & Peña, 2002; Gunde-Cimerman *et al.*, 2009; Gunde-Cimerman & Zalar, 2014; Plemenitas *et al.*, 2014).

#### **2.3.1.2 Estrategia de exclusión de Sodio (“Salt-out”)**

La estrategia “salt-out” consiste en la exclusión de  $Na^+$  en el espacio extracelular a través de transportadores, acompañada de síntesis de solutos compatibles para evitar la deshidratación de la célula y mantener la turgencia celular. Los solutos compatibles u osmolitos son

moléculas que en altas concentraciones mantienen el balance osmótico, evitando la deshidratación y el correcto funcionamiento de las enzimas, sin intervenir en el metabolismo de la célula. Estos se caracterizan por ser de bajo peso molecular, son solubles en agua y en pH fisiológico son moléculas zwitteriónicas (sin carga). Estos se dividen de acuerdo con su naturaleza en: a) polioles, b) aminoácidos y sus derivados, y c) azúcares y sus derivados.

Estos pueden ser sintetizados de *novo* o capturados del medio extracelular por medio de transportadores. En los hongos halófilos se ha reportado la presencia de solutos compatibles, como la trehalosa, el arabitol, el manitol, el sorbitol y el glicerol, siendo este último el más común en organismos como *H. werneckii*, *W. ichtyophaga*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y *A. pullulans* cuando se encuentran creciendo en altas concentraciones de sal (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009; Zajc *et al.*, 2013; Gunde-Cimerman *et al.*, 2014; Plemenitas *et al.*, 2014).

Desde hace varias décadas, es bien conocido que la regulación de la síntesis o el transporte de los solutos compatibles es controlada por la vía de HOG (por sus siglas en inglés: High Osmolarity Glicerol), la cual ha sido descrita ampliamente en *S. cerevisiae*. Esta vía es una cascada de fosforilación conformada por tres MAP cinasas: 1) MAPKKK (MAP cinasa-cinasa-cinasa), 2) MAPKK (MAP cinasa-cinasa) y 3) MAPK (MAP cinasa). A pesar de que se desconoce el mecanismo por el cual se activa bajo condiciones de estrés osmótico, se ha reportado que existen dos proteínas (Sln 1p y la Sho1 p) en la membrana plasmática que son los iniciadores en el encendido de la vía de HOG. Sln 1p es un regulador negativo de HOG, mientras que Sho1p se ancla a la MAPKK Pbs2p, en donde es fosforilada por MAPKKK Ssk2p/Ssk22, activándola y por tanto fosforila a la MAPK Hog1, activándola y permitiendo la fosforilación de los blancos citoplasmáticos y/o nucleares al translocar al núcleo, donde fosforilará factores de transcripción, los cuales activan la transcripción de secuencias en *cis* de genes de respuesta ante condiciones de estrés (STRE, por sus siglas en inglés), entre los cuales se encuentran genes para la síntesis del glicerol (González-Hernández & Peña, 2002; Folch-Mallol *et al.*, 2004).

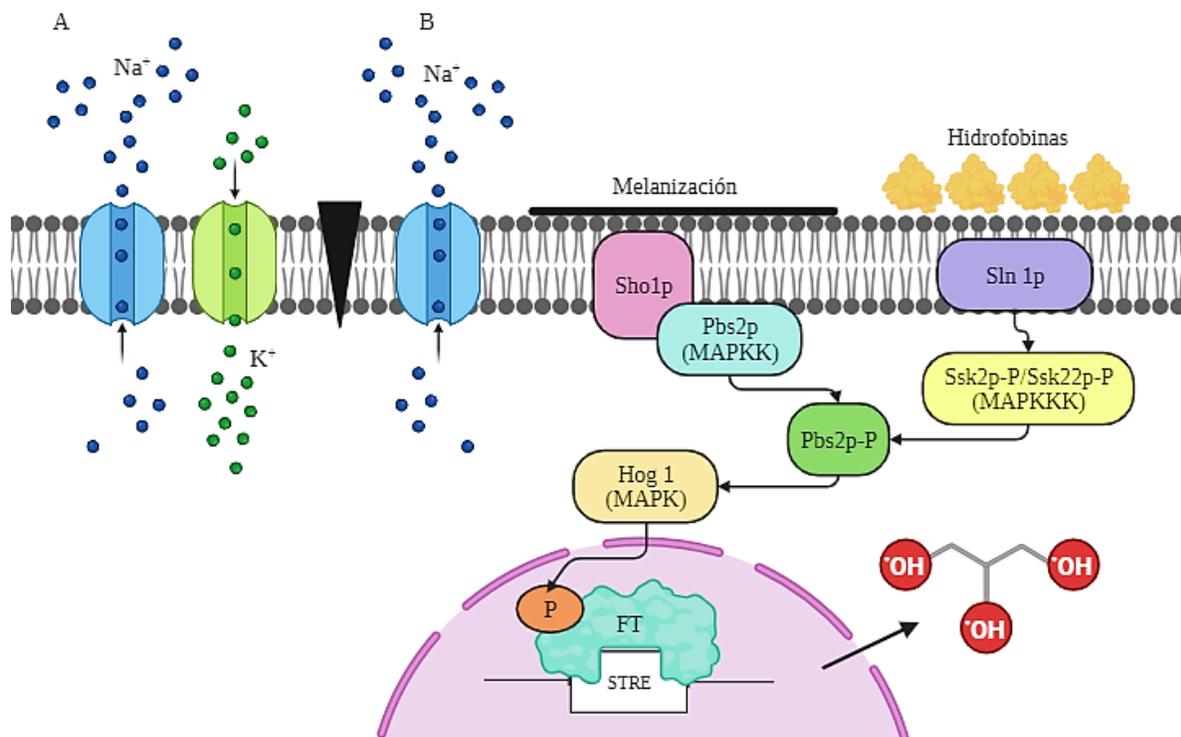
Además de la acumulación de solutos compatibles, la expulsión de Na<sup>+</sup> al espacio extracelular o a la vacuola es indispensable y esto se lleva a cabo por transportadores de iones de Na<sup>+</sup> (en contra del gradiente de concentración). En hongos como *D. hansenii*, *S. cerevisiae*, *W. ichtyophaga* y *H. werneckii*, se han identificado antiportadores, simportadores,

uniportadores, canales y algunos de ellos acoplados a ATPasa tipo P y V (por ejemplo, Ena Na<sup>+</sup>-ATPasa) (González-Hernández & Peña, 2002; Ma *et al.*, 2010; Gunde-Cimerman & Zalar, 2014; Plemenitas *et al.*, 2014; Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021). Además de esta estrategia, también se han detectado cambios en la composición de la membrana plasmática y en la pared celular (Figura 1).

### **2.3.1.3 Modificaciones en la membrana plasmática y pared celular**

La membrana plasmática es la primera defensa de la célula, por lo que es importante que ésta tenga adaptaciones bajo condiciones hipersalinas. Uno de los principales cambios es la fluidez de la membrana, la cual puede modificarse por el tipo de lípidos, la longitud de los ácidos grasos que los componen y la concentración de esteroides. Se ha reportado que en condiciones hipersalinas se incrementan el porcentaje de insaturaciones en los ácidos grasos, así como la proporción de fosfolípidos con naturaleza ácida como el ácido oleico (ácido *cis*-9-octadecenoico) (González-Hernández & Peña, 2002; Turk *et al.*, 2007; Gunde-Cimerman *et al.*, 2009).

Además de estas modificaciones en la composición de la membrana celular, también se ha reportado la melanización de diferentes hongos como *H. werneckii* cuando estos crecen en altas concentraciones de sal (Gunde-Cimerman & Zalar, 2014; Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). De la misma manera, se ha observado que en condiciones de hipersalinidad la pared celular presenta un engrosamiento, así mismo hay la sobreexpresión de transcritos relacionados con la remodelación de ésta, como los involucrados en la síntesis de β-glucanos en *W. ichthyophaga* y *A. sydowii* (Plemenitas *et al.*, 2014; Pérez-Llano *et al.*, 2020). En el halófilo obligado *W. ichthyophaga*, con un genoma pequeño de 9Mb presenta una expansión en los genes de la familia de las hidrofobinas, que se expresan diferencialmente en dependencia de la concentración de NaCl, por lo que se ha especulado que juegan un papel importante en el refuerzo de la pared celular contra el estrés salino, y se han propuesto como un nuevo mecanismo de halofilia (Zajc *et al.*, 2013; Plemenitas *et al.*, 2014).



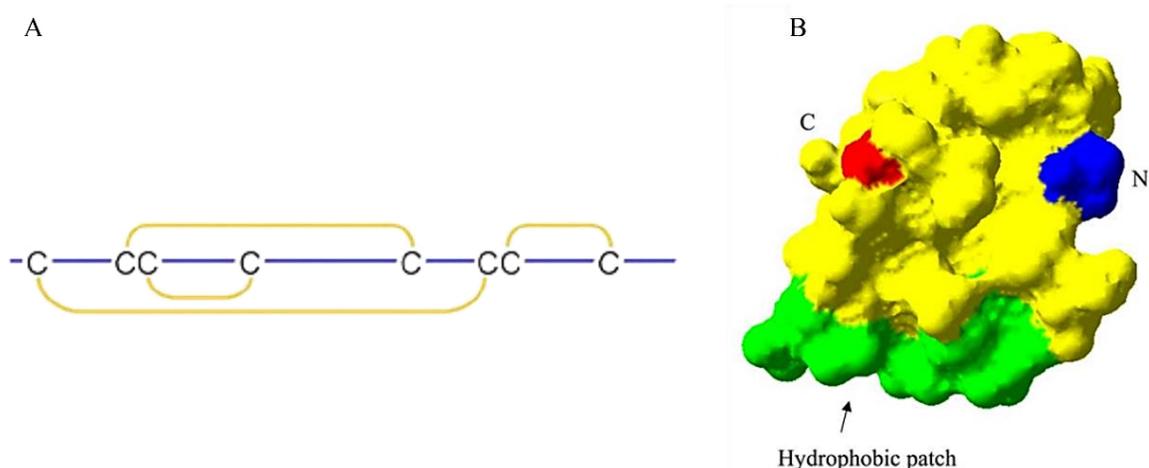
**Figura 1.** Mecanismos de halofilia. A) Mecanismo “Salt-in”, donde la turgencia celular se mantiene por la expulsión de  $\text{Na}^+$  y la introducción de  $\text{K}^+$  por medio de transportadores. B) Mecanismo “Salt-out” donde hay la acumulación de solutos compatibles y la expulsión de  $\text{Na}^+$ , además de modificaciones de la membrana celular (melanización) y el recubrimiento de hidrofobinas. (Tomado de Rodríguez-Pupo, E., 2021. Modificado por Castrejón-Noguerón, L.)

## 2.3.2 Hidrofobinas

### 2.3.2.1 Características

Las hidrofobinas son proteínas pequeñas de aproximadamente 20 kD (~100 aminoácidos) producidas únicamente por hongos filamentosos, éstas poseen una parte hidrofílica y una hidrofóbica, es decir son anfipáticas. Se caracterizan principalmente por la presencia de ocho residuos de cisteína (Cys), que se encuentran altamente conservados, los que forman cuatro puentes disulfuro, brindando estabilidad estructural a la proteína (Linder *et al.*, 2005; Zajc *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018).

De acuerdo con la distribución de los residuos de Cys, y con su solubilidad, las hidrofobinas se clasificaron inicialmente en: clase I y clase II (Linder *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2018). La clase I no presenta un número definido en los espacios intercisteína (ya que son variables) y se organizan en estructuras llamadas “rodlets”, además de que sólo se solubilizan en ácidos fuertes y son estables en altas temperaturas (Szilvay *et al.*, 2006; Bayry *et al.*, 2012; Winandy *et al.*, 2018); éstas se subdividen en las subclases: Ia y Ib, y se distribuyen principalmente en los Ascomycetos y Basidiomicetos, respectivamente (Linder *et al.*, 2005; Przylucka *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Quarantin *et al.*, 2019). Por otra parte, la clase II se caracteriza por mantener un patrón altamente definido entre los espacios intercisteína, un ensamblaje menos estable, carece de la formación de “rodlets” y son solubles en solventes orgánicos y etanol. Esta clase únicamente se ha reportado en basidiomicetos (Linder *et al.*, 2005; Bayry *et al.*, 2012). Debido a su naturaleza anfipática se caracterizan por su auto ensamblaje en monocapas en interfases hidrofílicas-hidrofóbicas (Figura 2).



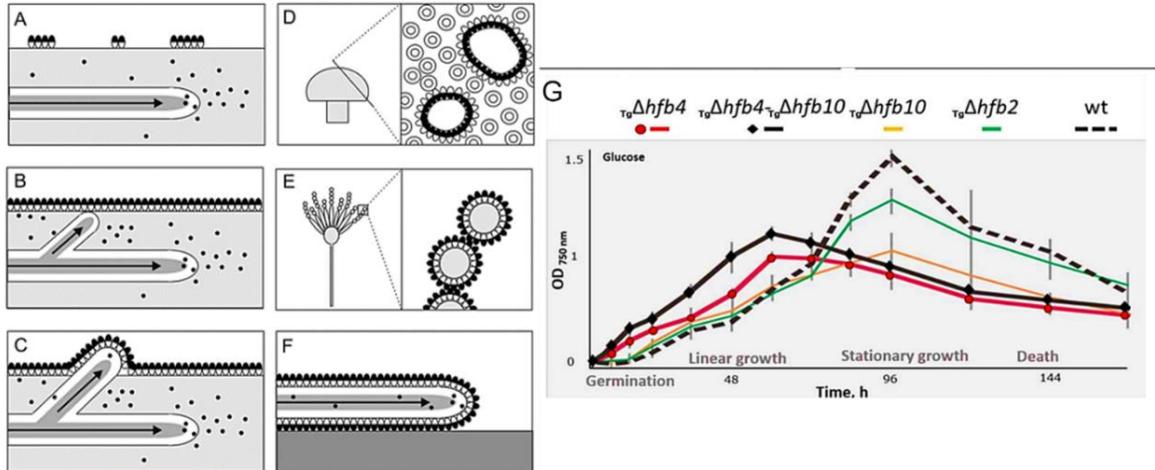
**Figura 2.** Características de las hidrofobinas. A) Residuos de Cys característicos de las hidrofobinas clase II formando puentes disulfuro. B) Estructura globular de las hidrofobinas mostrando el N- y C- terminal, en azul y rojo, respectivamente y el parche hidrofóbico en verde (Linder *et al.*, 2005).

### 2.3.2.2 Localización y función

Las hidrofobinas se encuentran recubriendo a la pared celular de los hongos en diferentes estructuras, como las hifas aéreas, las cavidades de cuerpos fructíferos y las esporas (Linder *et al.*, 2005; Wösten & Scholtmeijer, 2015; Cai *et al.*, 2021), lo que permite romper la tensión superficial del agua al formar monocapas que generan fases hidrofílicas-hidrofóbicas que permiten la adhesión de éstos a superficies hidrofóbicas, de tal manera que son proteínas importantes en el crecimiento y el desarrollo de los hongos (Torkkeli *et al.*, 2002; Pennacchio *et al.*, 2018).

Además, facilitan el intercambio gaseoso, previenen la pérdida de agua y ayudan a la adhesión al sustrato, condición necesaria para establecer interacciones bióticas, como en el caso de *Xanthoria* spp. y su interacción simbiótica con los líquenes (Bayry *et al.*, 2012) (Figura 3).

Un estudio reciente en *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma guizhouense*, demostró que la delección de las hidrofobinas *hfb4* y *hfb10*, reduce la turgencia celular, el crecimiento de hifas aéreas, la producción de conidióforos y aceleran la germinación de los conidios, mientras que las cepas sobre expresantes muestran el fenotipo contrario (Cai *et al.*, 2021). Estas refuerzan y aumentan la rigidez de la pared celular y se ha hipotetizado que ayudan a enfrentar el estrés osmótico y al estrés salino (Plemenitas *et al.*, 2014), pero esto no ha sido demostrado.

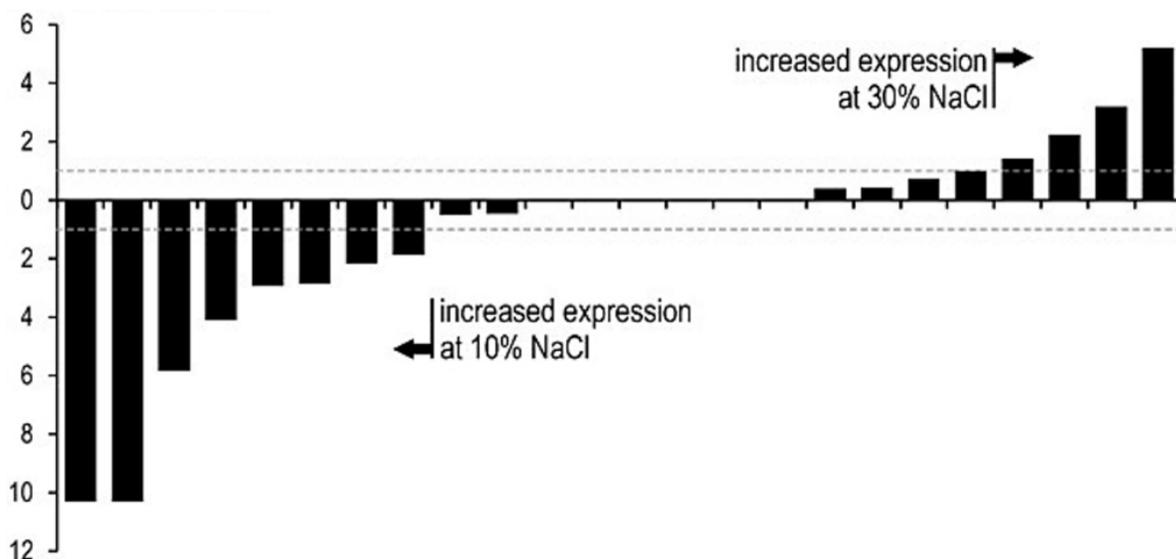


**Figura 3.** Papel biológico de las hidrofobinas durante el crecimiento y desarrollo del hongo. A) Secreción de hidrofobinas en estado soluble, B) ensamblaje de hidrofobinas en una membrana anfipática causando la reducción de la tensión superficial del agua, C) rompimiento de la interfaz del aire por la hifa, permitiendo su crecimiento aéreo. D) Revestimiento de las cavidades de los cuerpos fructíferos. E) Recubrimiento de esporas para su dispersión. F) Ensamblaje de hidrofobinas entre la pared celular y una superficie hidrofóbica, facilitando su fijación al sustrato. G) Efecto de la delección de hidrofobinas en el crecimiento de *T. guizhouense* (Wösten & Scholtmeijer, 2015; Cai et al., 2021).

### 2.3.2.3 Hidrofobinas como respuesta a estrés

En 2013, Zajc y col., realizaron un estudio transcriptómico de *W. ichthyophaga* (halófilo obligado) del hongo creciendo en 10% (1.7 M) y en 30% (5.1 M) de NaCl (Figura 4) y se determinó que los transcritos que codifican para las hidrofobinas se expresan diferencialmente en dependencia de la concentración de NaCl, donde se observó que en 30% de NaCl se expresan 4 hidrofobinas, mientras que en 10% de NaCl se sobreexpresan 8. Es importante recalcar que este hongo tiene un genoma compacto de 9.6 Mb y que presenta una expansión del número de hidrofobinas con 26 genes respecto a los otros miembros del género que cuentan con un genoma de tamaño similar y que tiene 15 genes. Este mismo comportamiento se encontró en el hongo halófilo moderado *A. sydowii* en el que hay expresión diferencial de tres genes de hidrofobinas (*sih1*, *sih2* y *shi4*), en donde en ausencia

de sal *sih4* se sobreexpresa, mientras que los genes *sih1* y *sih2* se regulan positivamente en 2 M de NaCl (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

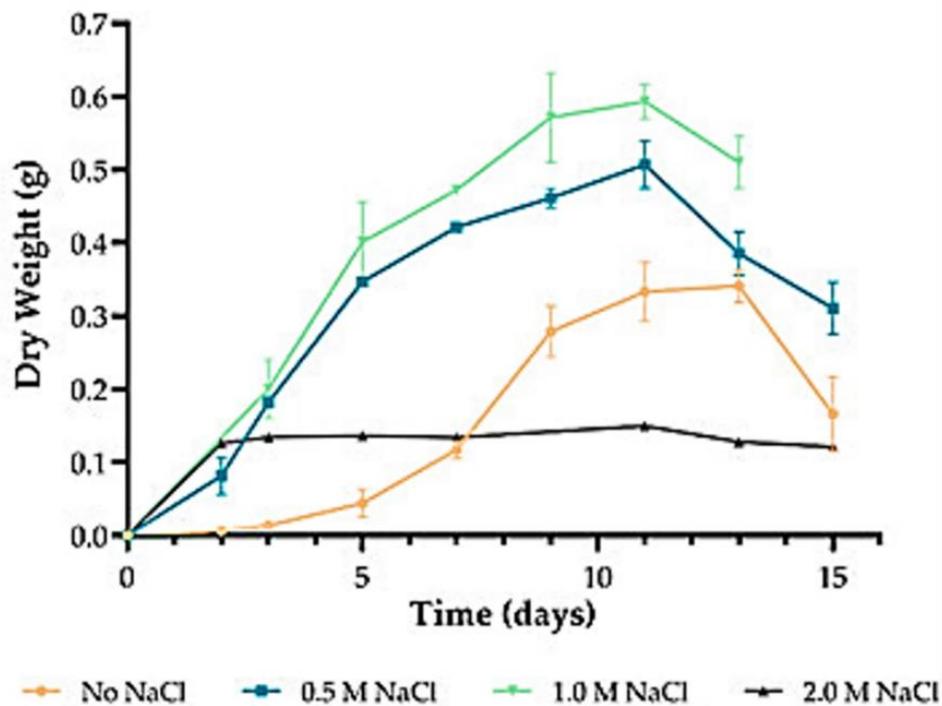


**Figura 4.** Expresión diferencial de hidrofobinas de *W. ichthyophaga* en dos diferentes concentraciones de NaCl (10% y 30%) (Zajc *et al.*, 2013).

### 3 Antecedentes

#### 3.1 *Aspergillus sydowii*

*Aspergillus sydowii* es un hongo halófilo cosmopolita tanto de ambientes terrestres como marinos, algunas cepas de esta especie son patógenos de corales, contaminantes de comida y patógenos oportunistas de pacientes inmunodeprimidos (Alker *et al.*, 2001). En nuestro grupo de trabajo se aisló a *A. sydowii*, a partir de una fermentación de bagazo de caña de azúcar suplementado con 2 M de NaCl, y se determinó que su óptimo de crecimiento se da entre 0.5 M y 1 M de NaCl (Batista-García *et al.*, 2014; Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021) (Figura 5).



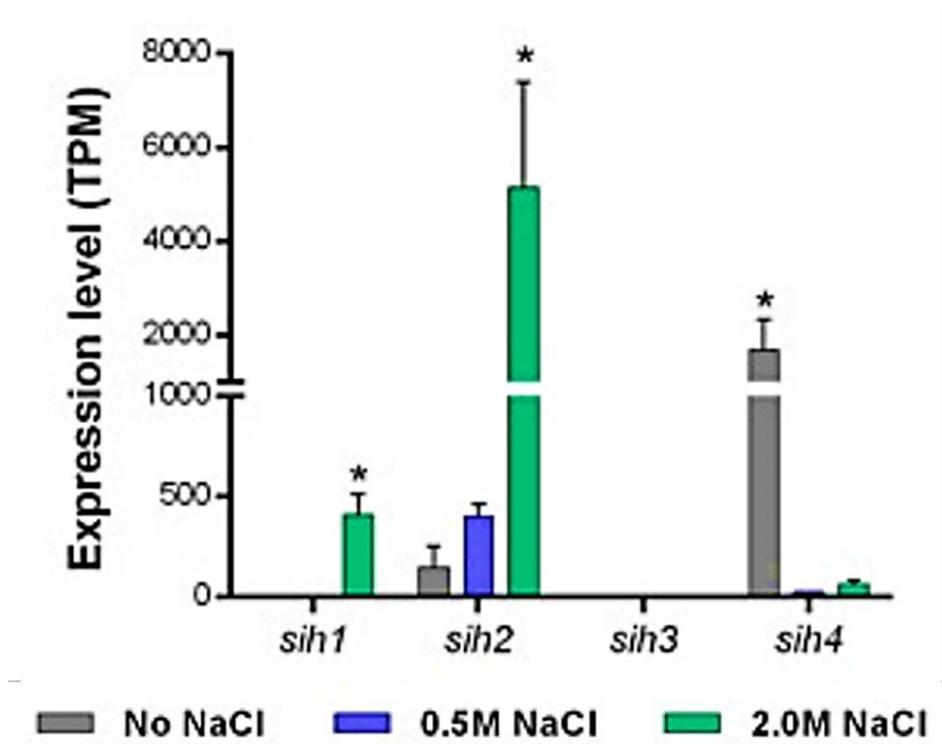
**Figura 5.** Cinética de crecimiento de *A. sydowii* en diferentes condiciones de salinidad (0, 0.5 M, 1 M y 2 M de NaCl). Se cultivó en un medio con glucosa como única fuente de carbono. Las barras de error indican la desviación estándar (n=3) (Rodríguez-Pupo et al., 2021).

### 3.2 Análisis transcriptómico en condiciones óptimas e hipersalinas

En 2020, Pérez-Llano y col., realizaron el análisis transcriptómico de *Aspergillus sydowii* BMH-0004 al ser cultivado en diferentes condiciones de salinidad (0 M, 0.5 M o 2 M NaCl). Los resultados indicaron que la respuesta transcripcional es similar en ausencia de sal y en 2 M de NaCl, en contraste a la condición óptima de crecimiento (0.5 M). Donde la respuesta ante el estrés iónico y osmótico es la transcripción de genes de transportadores (como *ena2* y *atc9*), enzimas de remodelado de la pared celular y membrana (como *chi* y *gel*). Donde en la condición de 2 M de NaCl, observaron la hiperregulación de los genes anteriormente mencionados, además de una expresión diferencial de tres genes que codifican para hidrofobinas (*sih1*, *sih2* y *sih4*). Donde *sih1* y *sih2*, se sobreexpresan en hipersalinidad (2 M

de NaCl), mientras que *sih4* se sobreexpresa en ausencia de sal, como se observa en la figura 6 (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

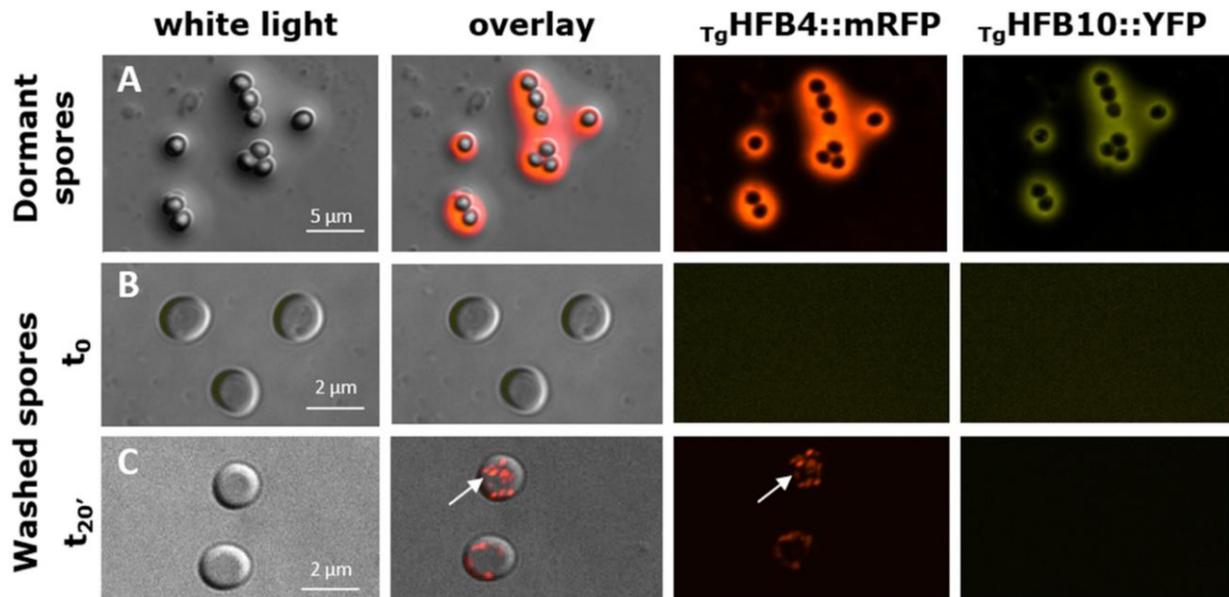
Esta regulación diferencial de las hidrofobinas concuerda con lo reportado para *W. ichthyophaga*, en el que se observó la expresión de diferentes transcritos en dependencia de la salinidad. Si bien estos estudios muestran una correlación de la presencia de ciertos transcritos de las hidrofobinas en condiciones salinas, la transcriptómica no nos permite determinar la localización subcelular de éstas, la temporalidad de su expresión y tampoco si se encuentran localizados en el mismo compartimento (co-localización). Por tanto, se requiere realizar estudios que permitan la visualización de éstas en el hongo para poder especular el papel que pudieran tener en la respuesta de los hongos frente a un estrés salino.



**Figura 6.** Niveles de expresión (TPM) de hidrofobinas identificadas en el transcriptoma de *A. sydowii*. TPM: transcritos por millón (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

### 3.3 Localización de hidrofobinas por marcaje de proteínas fluorescentes

Existen pocos estudios referentes a la localización de distintas hidrofobinas, entre estos Cai y col., (2021) marcaron a las hidrofobinas HFB4 y HFB10 de *T. guizhouense* y *T. harzianum* con las proteínas fluorescentes mRFP y YFP respectivamente. Los autores observaron que había una localización sobrelapada en cuerpos lipídicos, hifas aéreas y esporas (Figura 7).



**Figura 7.** HFB4::mRFP y HFB10::YFP de *T. guizhouense*. A) Esporas en dormancias en portaobjetos, B) Esporas lavadas previamente para retirar a las HFBs, observadas en el microscopio confocal, C) Igual que en (B) pero después de una incubación de 20 min ( $t_{20'}$ ) en exceso de agua. La síntesis de HFB4::mRFP se hizo visible (flechas) (Cai et al., 2021).

## 4 Justificación

El análisis transcriptómico del hongo halófilo moderado *Aspergillus sydowii* muestra la expresión diferencial de tres hidrofobinas (SIH1, SIH2 y SIH4) en dependencia de la salinidad del medio. Se ha hipotetizado que estas proteínas podrían jugar un papel importante en la resistencia del hongo a condiciones de estrés salino y podrían ser un posible mecanismo de halofilia. Sin embargo, estas ideas no han sido demostradas, por ejemplo, a través del uso de mutantes y tampoco se ha determinado la localización subcelular de éstas, por lo que es necesario realizar un estudio que permita determinar la localización y/o co-localización de

las hidrofobinas generando proteínas fusionadas con proteínas fluorescentes, para determinar si esta localización en *A. sydowii* cambia en respuesta a las condiciones salinas del medio.

## **5 Hipótesis**

Las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 tendrán una localización diferencial en las estructuras del hongo en función de la concentración de NaCl.

## **6 Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Estandarizar microcultivos de *A. sydowii* para la localización de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 fusionadas con proteínas fluorescentes.

### **6.2 Objetivos particulares**

- Estandarizar el microcultivo para *A. sydowii*.
- Estandarizar la tinción de la pared celular y núcleos.
- Determinar cambios en la morfología del hongo dependientes del estrés salino:
  - Longitud y ancho de las hifas
  - Número de septos y ramificaciones
- Generar los modelos de las estructuras de las hidrofobinas fusionadas con las proteínas fluorescentes.
- Construir los cassettes de las hidrofobinas marcadas con las diferentes proteínas fluorescentes.

## **7 Materiales y métodos**

### **7.1 Cultivo de *A. sydowii* en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) en ausencia y presencia de NaCl**

Se cultivaron esporas de *Aspergillus sydowii* BMH-0004 en medio PDA 0.5 M de NaCl, a partir de stocks de glicerol depositados en la Colección de Cultivos Fúngicos del CEIB, UAEM. Los cultivos se incubaron por 7 días a 28 °C, posteriormente se tomaron discos de

la parte externa (micelio joven) y se sembraron en medio PDA suplementado con 0 M, 0.5 M o 2 M de NaCl, y se incubaron de igual manera a 28 °C por 7 días para su uso posterior.

## 7.2 Microcultivos de *Aspergillus sydowii*

### 7.2.1 Ensamble de la cámara de incubación

Los microcultivos se realizaron sobre portaobjetos, para lo cual se preparó una cámara de incubación. Esta consistió de una caja de Petri de 100 x 15 mm de vidrio, en su interior se colocó una base de papel filtro, sobre éste una varilla de vidrio donde se colocan el portaobjetos y el cubreobjetos, y se incorporó un algodón, el cual fue humedecido con una solución de agua destilada o soluciones con distintas concentraciones de NaCl (0 M, 0.5 M y 2 M) hasta el momento de su uso (Figura 8). Una vez armadas, estas cajas se envuelven en papel aluminio, se esterilizan en la autoclave, se dejan secar en el horno por 4 días hasta su uso.

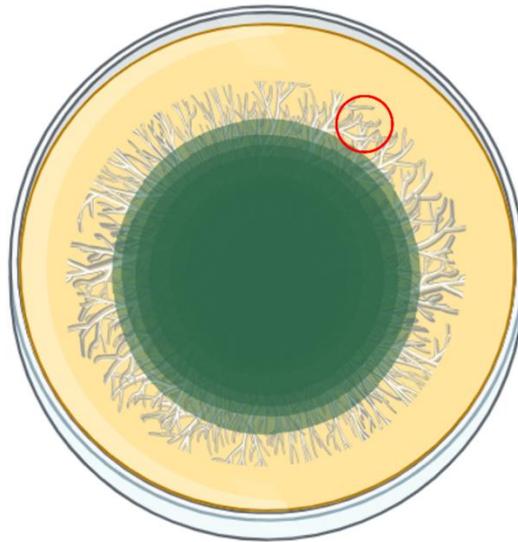


**Figura 8.** Ensamble de la cámara de incubación para micro cultivo.

### 7.2.2 Microcultivo

Se montaron los microcultivos dentro de la campana de flujo. Brevemente, se tomaron porciones de micelio de 5mm del extremo de los cultivos de *A. sydowii* crecidos en medio

PDA (Figura 9). Las porciones tomadas se colocaron en el portaobjetos, de modo que el micelio esté en la parte superior y se le colocó un cubreobjetos sobre cada porción de medio con micelio joven. Se humedeció el algodón y el papel filtro con la solución de agua destilada y NaCl a 0 M, 0.5 M o 2 M. La humedad de la cámara y el crecimiento del hongo se monitorean cada 24 horas.



**Figura 9.** Zona de la colonia donde se tomaron los inóculos para los experimentos en microcultivos.

### 7.2.3 Tinción de núcleos y pared celular

Los cultivos se monitorearon cada 24 horas y se tiñeron con calcoflúor, un colorante de pared celular (Ex: 347 nm- Em:450 nm) y con DAPI (Ex:359 nm - Em: 461nm) un compuesto que tiñe el núcleo. La tinción se realizó al colocar “Calcofluor White Stain” diluido en hidróxido de potasio (10%) sobre el cubreobjetos para colocarlo sobre la muestra, se incubó 10 minutos, y posteriormente se observó en el microscopio de fluorescencia Zeiss (Juego de filtros 49 DAPI shift free). Igualmente se realizó la tinción con DAPI (25 µg/mL) que se disolvió en PBS 1%, previamente se fijó el micelio con etanol absoluto.

### 7.3 Extracción de ADN genómico de *Aspergillus sydowii*

Para generar las construcciones de las regiones codificantes de las hidrofobinas fusionadas con las proteínas fluorescentes, se extrajo ADN genómico de *A. sydowii* para amplificar los brazos 5' y 3'. Se obtuvo micelio del hongo crecido en PDA suplementado con 0.5 M de NaCl. Este se congeló en nitrógeno líquido y se maceró en un mortero hasta obtener un polvo fino, evitando que se descongelara. Posteriormente se transfirieron 100 Mg del micelio a un tubo Eppendorf donde se añadió 500 µL del buffer de extracción (Tabla 1) suplementado con RNAsa (0.1mg/mL, Thermo Scientific RNasa), se homogenizó con vortex por 3 minutos y se incubó durante una hora a 37°C. Después se centrifugó (10000 g) por 5 min para precipitar los restos celulares, se tomó el sobrenadante y se pasó a otro tubo al que se le adicionaron 500 µL de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (24:24:1), se mezcló por vortex por 30 segundos y se centrifugó por media hora.

Se tomó la fase acuosa y se le añadió un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1), se mezcló por vortex y se centrifugó a 10000 g por 5 min, nuevamente se tomó la fase acuosa y se adicionó un volumen igual de isopropanol, para precipitar a -20°C por 1 hora, se centrifugó por 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70% frío dos veces, centrifugando por 5 min entre cada lavado. La pastilla se dejó secar y se resuspendió en 20 µL de agua MilliQ. Se determinó la concentración del ADNg por la lectura a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (Epoch, Bioteck), y su integridad se determinó haciendo una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 2 MM Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O)

**Tabla 1.** Componentes del buffer de extracción de DNAg

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final
Tris- HCl pH 8.5	1M	200 MM

EDTA	0.5 M	25mM
NaCl	0.5 M	250 MM
SDS	10%	0.5%
Agua MilliQ	-	-

---

## 7.4 Purificación de plásmidos

Para amplificar las secuencias de las proteínas fluorescentes, el gen de resistencia a higromicina, así como las secuencias codificantes de las hidrofobinas (SIH1, SIH2 y SIH4), se requirió la purificación de los plásmidos que utilizamos como templado.

### 7.4.1 Transformación de *E. coli* 1116 con pPICZ $\alpha$ ::mCherry, pDR::SED1

Se realizó la transformación de *E. coli* 1116 (químicamente competentes) con los plásmidos pPICZ $\alpha$ ::mCherry, pDR::SED1. Se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L de *E. coli* 1116 competentes y se añadió 1  $\mu$ L (20 ng/  $\mu$ L) de plásmido y las células se incubaron por 30 min en hielo, entonces se colocaron en un termobloque a 42°C por un minuto y se añadieron 500  $\mu$ L de LB (sin antibiótico) y se incubaron a 37°C por 30 minutos, posteriormente se procedió a sembrar con perlas en medio LB con el antibiótico correspondiente (Tabla 3). El cultivo celular se dividió en dos partes, 50  $\mu$ L (10%) se sembraron en una caja y los 450  $\mu$ L restantes se centrifugaron a 1000 g por 2 minutos, se procedió a retirar 400  $\mu$ L de medio, se dejaron 50  $\mu$ L para resuspender a las células, esa resuspensión se sembró con perlas nuevamente en una segunda caja. Los cultivos se dejaron incubando por 16 horas a 37°C.

### 7.4.2 Cultivo de *E. coli* para la obtención de plásmidos

Las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contienen a los plásmidos: pDR::SED1 (Cuevas-Velazquez *et al.*, 2021), pPICZ $\alpha$ ::mCherry, pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, pPICZ $\alpha$ ::SIH4 (Yuan *et al.*, 2015, Pérez-Llano, Y., 2017) y pFC332 (Nodvig *et al.*, 2015), se crecieron en 5 mL de LB (Tabla 2) con el antibiótico correspondiente (Tabla 3) según el plásmido. Se utilizó medio LB bajo en sales, el cual lleva la mitad de NaCl (5g/L) que el medio LB normal, para crecer a las bacterias que contienen a los plásmidos con resistencia a la zeocina. Los cultivos se incubaron por 16 horas (overnight) a 37°C, posteriormente se colectó a las células en tubos de 1.5 mL por centrifugación a 1000 g por 5 minutos.

**Tabla 2.** Componentes del medio LB (Luria-Bertani Medium) y LB bajo en sales

Componentes	LB	LB bajo en sales
	g/L	g/L
Bacto-tryptona	10g	10g
Extracto de levadura	5g	5g
NaCl	10g	5g

**Tabla 3.** Antibióticos de selección para las colonias.

Plásmido	Antibiótico	Concentración Final
pPICZ $\alpha$ ::SIH1	Zeocina	25 $\mu$ g/mL
pPICZ $\alpha$ ::SIH2		

pPICZ $\alpha$ ::SIH4

pPICZ $\alpha$ ::mCherry

---

pFC332	Ampicilina	50 $\mu$ g/mL
pDR::SED1		

---

### 7.4.3 Extracción de plásmidos

Una vez obtenida la pastilla celular se procedió a extraer el plásmido por el método de lisis alcalina. La pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ L de la solución I (Tabla 4) más 3  $\mu$ L de RNasa (Thermo Scientific RNasa, 0.1mg/mL), se mezcló por vortex y se incubó a 37°C por 30 minutos. Terminado este tiempo se adicionaron 200  $\mu$ L de la solución II (Tabla 4) y se mezcló suavemente por inversión. Posteriormente, para neutralizar la reacción se agregaron 200  $\mu$ L de la solución III (Tabla 4) y se dejaron reposar en hielo por 5 min (Sanbrook *et al.*,1989). Al terminar el tiempo se realizó el método de extracción por fase orgánica como se ha descrito en la sección anterior (sección 7.3).

Este procedimiento se realizó para todos los plásmidos mencionados arriba.

**Tabla 4.** Composición de las soluciones para la extracción de plásmido por lisis alcalina.

---

Solución	Componentes
	50 mM Glucosa
Solución I (Resuspensión)	25 mM Tris-Cl (pH 8)
	10 mM EDTA (pH 8)

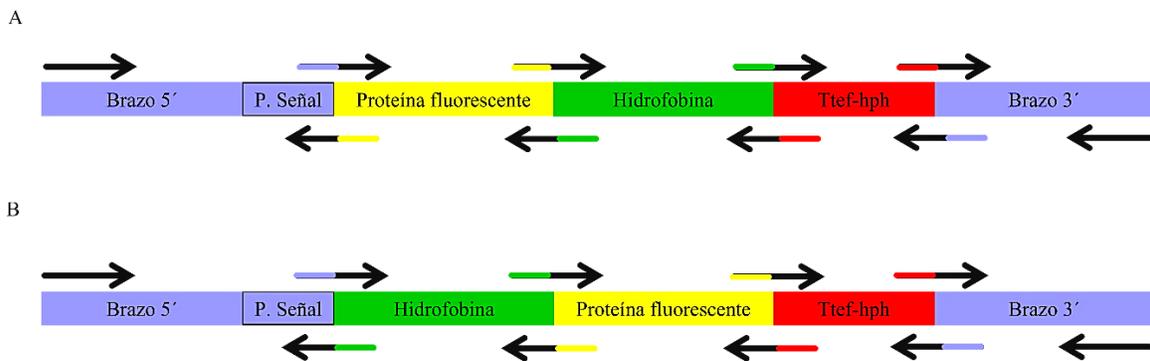
Solución II (Lisis)	0.2N NaOH
	1% SDS
	5M Acetato de potasio
Solución III	Ácido acético glacial
	H <sub>2</sub> O

## 7.5 Construcción de los cassettes usando la técnica de “Double-joint PCR”

### 7.5.1 Diseño de oligonucleótidos quiméricos

Para generar las construcciones de las proteínas quiméricas, se requiere amplificar los brazos 5' y 3' flanqueantes de los genes de las hidrofobinas (*sih1*, *sih2* y *sih4*), la secuencia codificante de la hidrofobina la cual se obtuvo de los plásmidos pPICZ $\alpha$ ::SIH, pPICZ $\alpha$ ::SIH2 y pPICZ $\alpha$ ::SIH4, las secuencias de las proteínas fluorescentes obtenidas de los plásmidos SED1 (citrina y mCerulean), pPICZ $\alpha$ ::mCherry (mCherry), el terminador Ttef y el gen de resistencia a higromicina obtenidos del plásmido pFC332, por lo cual se diseñaron oligonucleótidos quiméricos para cada una de las secuencias. Se diseñaron las construcciones de estas proteínas quiméricas en dos sentidos, el primero donde la proteína fluorescente está en el extremo amino terminal y la hidrofobina en el extremo carboxilo terminal(A) y el segundo donde la hidrofobina este en el extremo amino terminal y la proteína fluorescente en el extremo carboxilo terminal (B), como se muestra en la Figura 10.

En el diseño de oligonucleótidos quiméricos se consideró la longitud mínima (15-30 pb), mencionada en Kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix/ NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit, y la longitud mínima (500 pb) de los brazos 5' y 3' para *Aspergillus*, según Yu *et al.*, 2004.



**Figura 10.** Diseño de las construcciones para generar hidrofobinas en marco con proteínas fluorescentes. Oligonucleótidos quiméricos diseñados para la amplificación de las secuencias para la construcción en los dos diferentes órdenes. A) Construcción con la proteína fluorescente ubicada en el amino terminal. B) Construcción con la proteína fluorescente ubicada en el carboxilo terminal.

## 7.5.2 “Double- joint PCR” para la construcción de los cassettes para la generación de transformantes

### 7.5.2.1 Primera ronda del “Double- joint PCR”

En la primera ronda se obtuvo la amplificación de los fragmentos con los oligonucleótidos quiméricos descritos en la sección 7.5.1 y usando la “PCRBIO VeriFi™ Polymerase”, con la mezcla de componentes que se muestra en la tabla 5. Posteriormente se purificaron a partir de banda de agarosa, según la sección 7.5.3, para proceder con las siguientes rondas del “Double-joint PCR”.

**Tabla 5.** Componentes de la mezcla para la reacción de PCR.

Componente	Volumen (µL)
PCRBIO VeriFi™ Buffer (5X)	5 µL
VeriMax Enhancer (10X)	2.5 µL

Forward primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L
Templado (10ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
PCRBIO VeriFi™ POLYMERASE (2U/ $\mu$ L)	0.25 $\mu$ L
Agua grado molecular	13.25 $\mu$ L
Volumen total	25 $\mu$ L

---

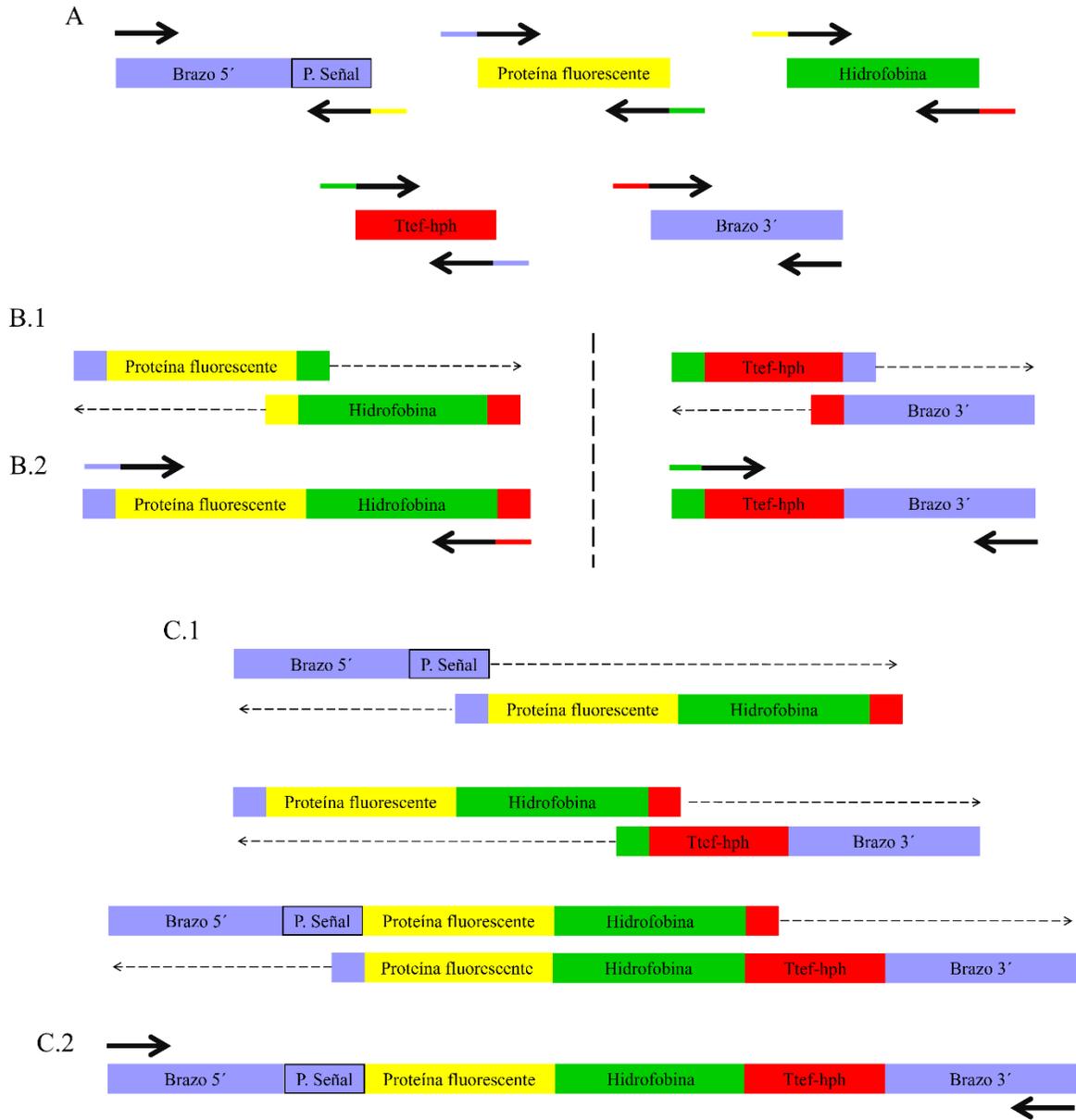
### **7.5.2.2 Segunda ronda del “Double- joint PCR”**

En esta ronda se llevó a cabo el empalme de los fragmentos (Figura 11, B1 y C1). Es decir que del cassette ensamblado se dividió en dos partes: un ensamble consiste de las secuencias que codifican a la proteína fluorescente (PF) con la hidrofobina (HFB), el segundo ensamble de Ttef-hph con el brazo 3' (Figura 11, B1). Este procedimiento se realizó para la construcción de los cassettes de las hidrofobinas SIH1 y SIH2

Posteriormente de haber realizado la tercera ronda descrita en la próxima sección (7.5.2.3) de la primera unión de los amplicones anteriormente mencionado, el amplicón se purificó a partir de banda de agarosa de los fragmentos empalmados, según lo descrito en la sección 7.5.3. Y nuevamente se realizó la segunda ronda, esta vez para unir los fragmentos previamente empalmados y el brazo 5' (Figura 11, C1).

### **7.5.2.3 Tercera ronda del “Double- joint PCR”**

En la tercera ronda se llevó a cabo la reamplificación de los fragmentos empalmados en la ronda anteriormente descrita, usando los oligonucleótidos correspondientes a los extremos de los fragmentos unidos (Figura 11, B.2 y C.2).



**Figura 11.** Ensamblaje de los cassettes usando “Double- joint PCR”. A) Amplificación de los fragmentos con los oligonucleótidos quiméricos diseñados (primera ronda), B) Empalme y amplificación de los fragmentos (segunda ronda) de la PF con la HFB, y el Ttef-hph con el brazo 3’. C) Reamplificación del empalme.

### **7.5.3 Purificación de ADN a partir de banda**

Una vez verificada la presencia de los amplicones y la especificidad de la reacción en geles de agarosa al 1% diluido en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 2 MM Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O), se tiñeron con bromuro de etidio (0.5µg/mL, por 10 min.). Una vez que se verificó la presencia del amplicon se cargó el resto de las reacciones de PCR en geles de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio nuevamente. Posteriormente se cortó el fragmento en el que se ubica el amplicón del tamaño esperado, y se colocó en un tubo de 1.5mL, se pesó y se procedió a purificar con el kit “NYZGelpure” de nzytech genes &enzymes (Catalog Nos. MB01101), en el que se adicionaron 300 µL de “Binding Buffer” por cada 100 Mg de agarosa, posteriormente se incubaron a 57 °C por 10 minutos, una vez terminada la incubación se transfirió a la columna “NZYTech spin” y se centrifugó por 1 minuto a 12000 g, se desechó el flujo resultante y se adicionaron 600 µL de “Wash Buffer” a la columna, nuevamente se centrifugó. Este último paso se realizó nuevamente para descartar residuos de etanol, una vez descartados, se pasó la columna a un tubo de 1.5 mL y se le adicionó 50 µL de Agua MilliQ y se incubó a temperatura ambiente por un minuto, posteriormente se obtuvo el DNA al centrifugar nuevamente.

## **7.6 Transformación de *A. sydowii***

### **7.6.1 Curva de resistencia de *Aspergillus sydowii* a higromicina**

Para determinar la tolerancia del hongo a la higromicina y establecer la concentración que se utilizará para la selección de las transformantes, se realizaron cultivos de *A. sydowii* en PDA suplementado con las siguientes concentraciones de higromicina: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL y 200 µg/mL. Estos se incubaron a 28 °C y monitorearon por 7 días.

### **7.6.2 Determinación del tiempo de incubación para la obtención de germínulas**

Para determinar el tiempo de incubación donde se obtiene el mayor porcentaje de germínulas, se inocularon  $1 \times 10^8$  de esporas de *A. sydowii* en 100 ml de medio PDB en matraces de 250 ml, éstas se incubaron a 28 °C. Se analizó la geminación de los conidios a las 6, 8 y 10 horas, colocando 20 µL en un portaobjetos y cubriéndolo con un cubreobjetos.

## 8 Resultados y discusión

### 8.1 Microcultivos de *A. sydowii*

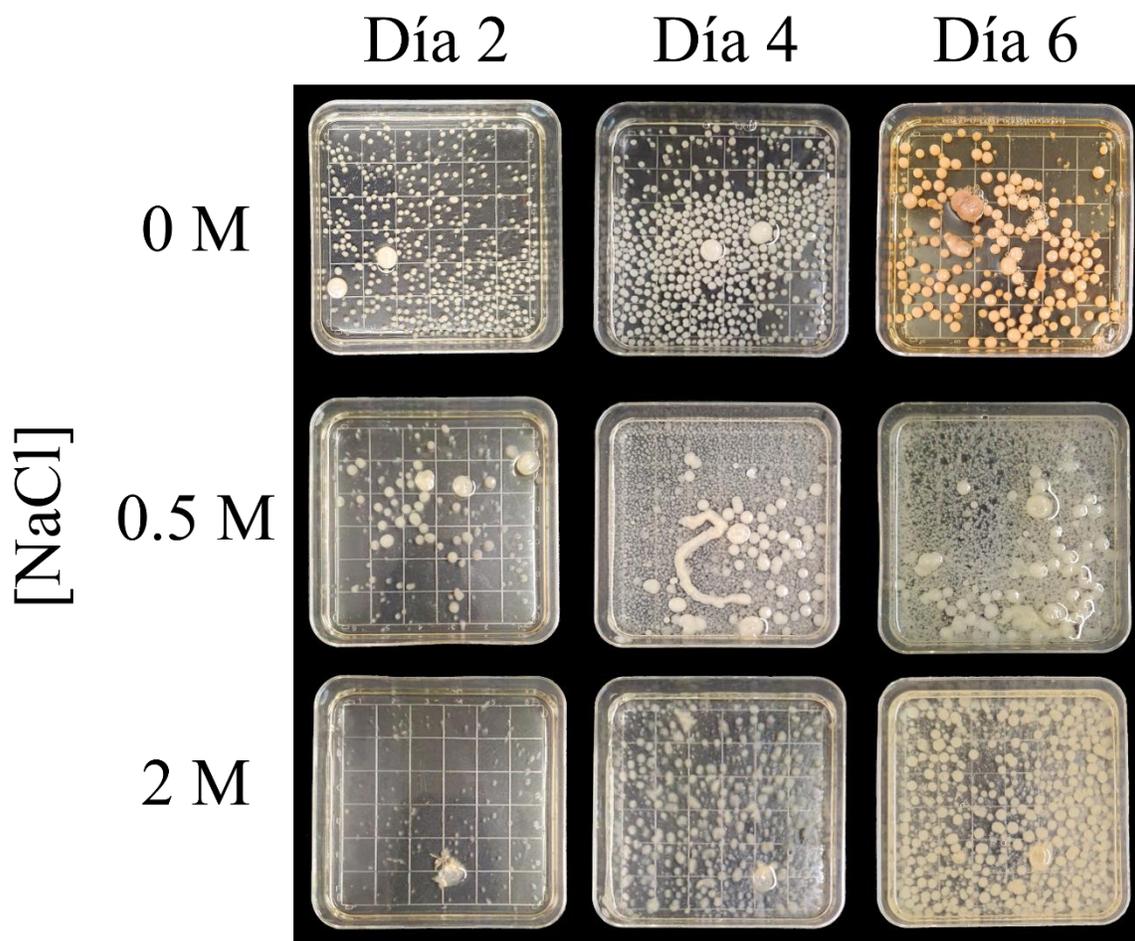
#### 8.1.1 Estandarización de microcultivos de *A. sydowii*

A partir de los pre-cultivos de *A. sydowii* en medio PDA suplementado con NaCl (0 M, 0.5 M y 2 M), se llevaron a cabo los microcultivos en la cámara de incubación descrita en la sección de metodología. Primeramente, se tomaron muestras del micelio joven de un cultivo del hongo crecido en la condición óptima (0.5 M de NaCl), se colocaron sobre el portaobjetos dentro la cámara a la que se añaden 2 mL de una solución de 0.5 M de NaCl, se incubaron a 28 °C y se monitorearon cada 24 horas.

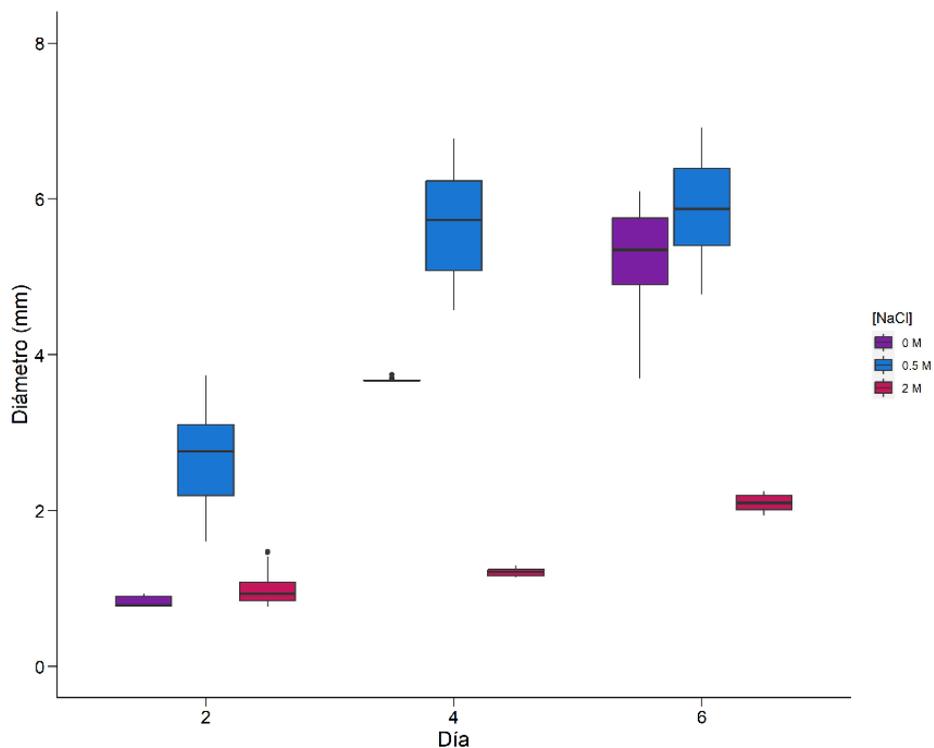
Después de cuatro días el micelio había crecido de manera que era visible a la vista en la condición sin sal y con 0.5 M NaCl, se procedió con la tinción de pared celular, en ambas condiciones se observaron estructuras reproductoras. Sin embargo, para la condición de crecimiento de 2 M de NaCl se observó crecimiento similar a las otras condiciones hasta el sexto día.

Debido a que el crecimiento del micelio no era homogéneo, se decidió hacer microcultivos utilizando micelio proveniente de cultivo líquido en el que el hongo crece formando agrupaciones con forman de perlas. De tal manera que se coloca una sola perla a la mitad del bloque de PDA. Para tal propósito, se estandarizó el tiempo de incubación requerido para obtener perlas de micelio con un tamaño homogéneo en todas las condiciones. Por tanto, se inoculó una porción de micelio joven a partir de un pre-cultivo crecido en medio sólido (PDA) en 28 mL de PDB (al que se añadió lo siguiente: 0 M, 0.5 M y 2 M de NaCl) y se midió el diámetro de las perlas de micelio cada dos días. Los resultados muestran que todas las condiciones llegan a tener un diámetro máximo de 2 Mm aproximadamente, pero este tamaño se alcanza en diferentes días. Mientras que en la condición de 0.5 M de NaCl se alcanzan los 2 Mm en 2 días, en 0 M de NaCl este llega al mismo tamaño a los 3 días y en 2 M de NaCl es hasta el sexto día (Figuras 12 y 13). Se dejó de medir al sexto día porque el cultivo de la condición de 0.5 M de NaCl se encontraba saturado. Al finalizar las mediciones se decidió usar perlas de micelio de 2 Mm de diámetro, porque este es el tamaño máximo

que alcanzan con 2 M de NaCl a los 6 días (Figura 13). Por lo tanto, se tomaron perlas de cada condición en los días mencionados arriba en los que alcanzaban los 2 Mm de diámetro (Tabla 6).



**Figura 12.** Diferencia en el tamaño de las perlas de micelio de *A. sydowii* cultivado en PDB con las diferentes condiciones (0 M, 0.5 M y 2 M de NaCl) por 6 días. La cuadrícula es de 1 cm x 1cm.



**Figura 13.** Diámetro de las perlas de micelio de *A. sydowii* cultivadas en medio líquido PDB sin NaCl (0 M) y suplementado con 0.5 M y 2 M NaCl sal en los días 2, 4 y 6 de incubación. n= 100.

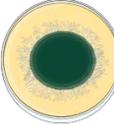
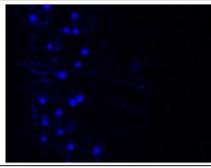
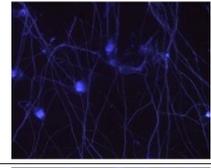
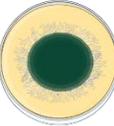
**Tabla 6.** Condiciones utilizadas en los microcultivos de *A. sydowii*.

Condición [NaCl]	0 M	0.5 M	2 M
Pre-cultivo en PDB (perlas de micelio)	2-4 días	2 días	4 días
Días de incubación			
Tiempo de crecimiento del micelio en microcultivo	4 días	4 días	6 días (para observar conidios)

Para la estandarización de los microcultivos, se realizaron las metodologías anteriormente descritas. Debido a que no encontramos protocolos detallados para generar microcultivos se estandarizaron las condiciones que garantizaran la obtención de resultados adecuados, relacionados al crecimiento de la hifa de manera que en el microscopio se pueda visualizar y medir (sin la saturación del campo visual). Por lo que la primera metodología, en la cual se usó una porción de micelio joven se descartó. La siguiente estrategia fue usar las perlas miceliales con un tamaño de 2 Mm. Los resultados indican que este precultivo mejora la nitidez y separación de las hifas, aunque aún es difícil determinar el inicio de estas.

Finalmente, la última estrategia fue utilizar esporas para iniciar el microcultivo con esporas, obteniendo una mejora significativa al facilitar la identificación del inicio, por lo que se optó por utilizar esta metodología (Tabla 7) para la medición de las hifas. Además de reducir los días de incubación para evitar un desarrollo mayor de conidios en la condición de 0.5 M. No obstante, se propone continuar con el mejoramiento de los microcultivos llevándolos a cabo con un número menor de esporas y cambiando el bloque de medio por una película de este, con el propósito de que las esporas tengan una mayor superficie en la cual dispersarse, causando un mayor espacio entre ellas y mejorando su observación bajo el microscopio.

**Tabla 7.** Estandarización de microcultivos de *A. sydowii* para la medición y seguimiento de las hifas.

Precultivo	Microcultivo	Días de incubación	Resultado	Aplicación
 Cultivo sólido	 Porción de 1x1 cm de micelio joven	4		Estandarización de la tinción
 Cultivo líquido	 Porción de PDA de 1x1 cm con perla de micelio de ~2 mm	4		Seguimiento de las hifas con identificación de su inicio
 Cultivo sólido	 Porción de PDA de 1x1 cm con 20 esporas en 10 µL	2		Seguimiento de hifa con la identificación de su inicio

### 8.1.2 Diferencias morfológicas macro y microscópicas de *A. sydowii*

Los resultados a partir del cultivo de las perlas de micelio muestran diferencias morfológicas entre las condiciones analizadas. En la condición óptima de crecimiento (0.5 M NaCl), las perlas de micelio crecen con mayor rapidez lo cual es consistente con lo reportado previamente, aunque usando una fermentación sólida (Batista-García *et al.*, 2014) además de que la compactación de la colonia no fue tan compacta comparada con la observada en las condiciones de 0 M de NaCl (estrés hipo osmótico) y 2 M de NaCl (estrés hiperosmótico), donde las perlas se observaron compactas. De manera similar Lui y col. (2017) reportaron que en medio YPD, el halófilo *A. montevicensis*, la compactación del micelio aumentaba conforme disminuía la concentración de la sal; aunque en este estudio utilizaron medio sólido en contraste con nuestro trabajo en el que utilizamos medio líquido. No obstante, el cambio morfológico en cuanto a la compactación del micelio es similar en ambos hongos a pesar de las diferencias en el tipo de cultivo.

También hemos observado diferencias micro morfológicas utilizando microcultivos de *A. sydowii* crecido en las condiciones ya mencionadas. Nosotros realizamos las evaluaciones de las diferencias microscópicas en los microcultivos del hongo al crecer en PDA en las diferentes condiciones (0 M, 0.5 M y 2 M de NaCl), utilizando esporas y observándolos a los 2 días. Esta modificación se realizó debido a que, al cuarto día de incubación, el que normalmente se tomaba era difícil observar en la condición óptima de crecimiento el inicio de hifa por la aglomeración, por lo que se redujo el tiempo de incubación. La otra modificación fue cambiar las perlas de micelio por esporas como pre-cultivo para facilitar la identificación del inicio de la hifa la que germina a partir de la espora.

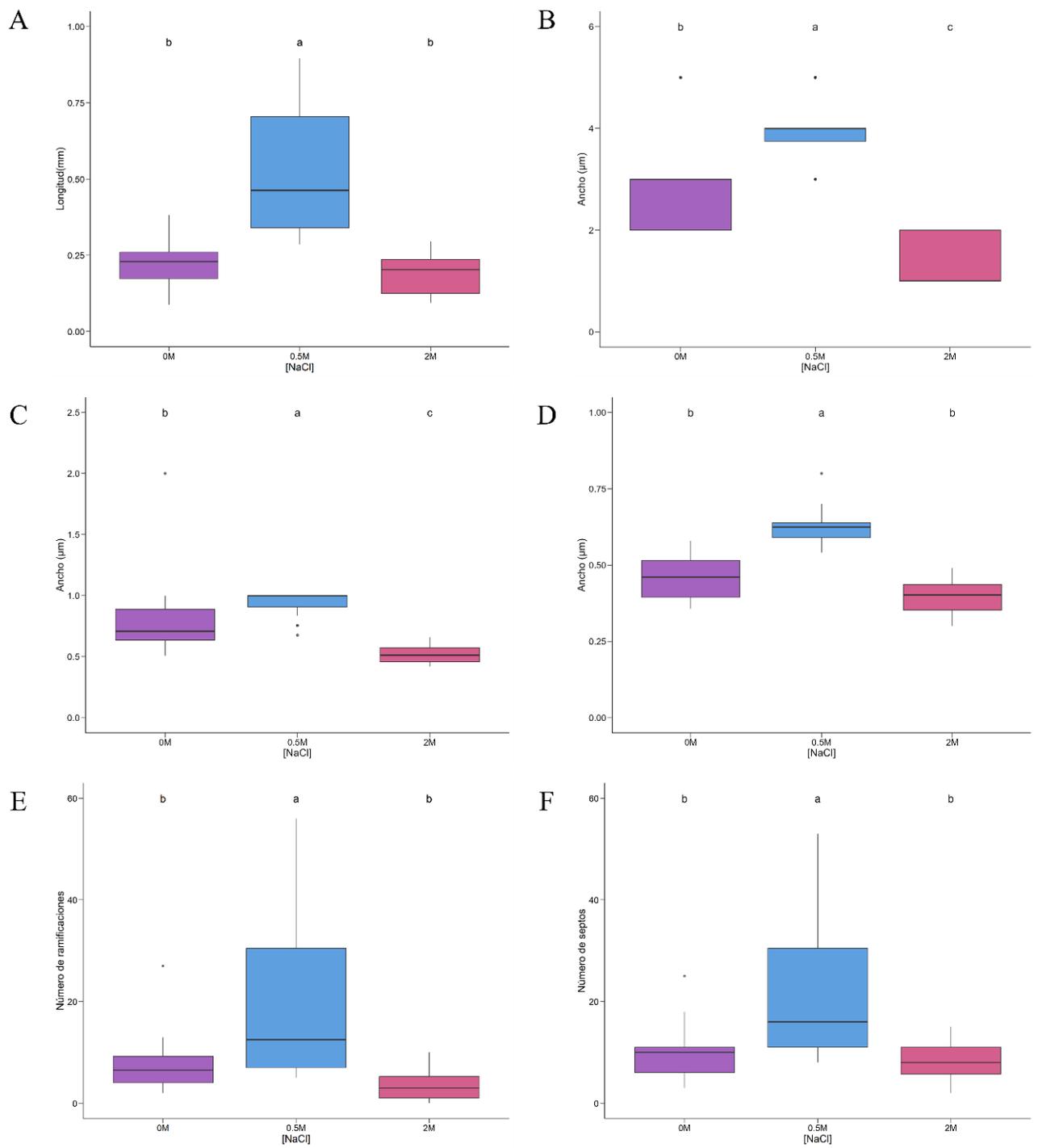
Una vez que se estandarizó el cultivo, se determinaron las diferencias de la longitud de las hifas, el ancho de la hifa en tres posiciones diferentes (inicio, mitad y final respecto a la hifa), número de ramificaciones y septos en las condiciones que hemos evaluado (Figura 15). De manera general observamos que es en la condición de crecimiento óptimo (0.5 M de NaCl), donde las hifas son más largas (0.52 Mm), más anchas (3.95  $\mu\text{m}$  al inicio, 0.93  $\mu\text{m}$  al medio y 0.62  $\mu\text{m}$  al final), con mayor número de ramificaciones y número de septos (Figura 15).

Mientras que en las condiciones de estrés hipo e hiper- osmótico (2 M y 0 M de NaCl) eran menores en todas las características evaluadas.



**Figura 14.** Diferencias microscópicas de *A. sydowii* con 2 días de incubación y a partir de microcultivos de esporas, observadas con tinción de pared celular (Calcoflúor 2%).

Anteriormente Jiménez-Gómez y col. en 2022, reportaron los cambios morfológicos de *A. sydowii* al ser cultivado en medio YMA (Yeast Mannitol Agar) al que se le añadió NaCl (0 M, 1M y 5.13 M de NaCl). En este estudio se analizaron los cambios macro- morfológicos (medición del diámetro de la colonia) y micro- morfológicos (índice de ramificación de las hifas, de núcleos, diámetro de las hifas y septación) que fueron evaluados a los 10 días de incubación. Los autores observaron que en la condición óptima de crecimiento (1 M de NaCl) el diámetro de la colonia fue de 42 a 45 mm, que el diámetro de las hifas fue mayor ( $>4 \mu\text{m}$ ), mientras que la septación se daba cada  $162 \mu\text{m}$  y el índice de ramificación (cantidad de ramificaciones) y de núcleos (número de núcleos) fue menor en comparación a las otras condiciones. En contraste, en las condiciones de 0 M y 5.13 M de NaCl, el diámetro de la colonia y de las hifas era menor, con un índice mayor de ramificación y un incremento en el número de núcleos.



**Figura 15.** El estrés osmótico afecta las características micro-morfológicas de *A. sydowii*. A) Longitud de las hifas del hongo después de dos días de incubación en mm. B, C y D) Ancho en µm de las hifas en tres posiciones diferentes respecto a la hifa (Inicio, Mitad y Final

respectivamente) E y F) Número de ramificaciones y septos. Las letras indican que difieren significativamente (Tukey,  $P < 0.05$ ).

El cambio en la morfología que hemos observado en las distintas condiciones de salinidad se debe a las diferentes respuestas ante el estrés, como se ha reportado en otros hongos como, *W. sebi* (5%), *W. muriae* (20%) (Kunčič *et al.*, 2010), donde la longitud de las hifas es mayor cuando el hongo crece en 5% de NaCl, mientras que el diámetro máximo se presenta en la condición de 20% de NaCl. Por otro lado, Ide-Pérez y col. (2020) también observaron que *Exophiala sp.* tiene un cambio dimórfico porque transita de una morfología filamentosa a una levaduriforme cuando crece en un medio con 0.5 M de NaCl. De forma similar, *Candida albicans* al crecer con 5% de sulfato de zinc cambia de un estado morfológico levaduriforme a uno pseudomiceliar (Nausa, J.G.,2015) mientras que *Rhizopus stolonifer* al crecer en quitosano (0.5 mg/mL, 1mg/mL y 2 mg/mL) se produce un engrosamiento y acortamiento de las hifas en relación con el aumento de la concentración de este compuesto (Alfaro-Gutiérrez, I., 2011).

De manera interesante, la septación en los hongos es regulada por la ruta RAM (por sus siglas en inglés “Regulation of Ace2 and Morphogenesis”) y depende de la síntesis de quitina, la cual está regulada por las vías PKC, HOG y  $Ca^{2+}$ / calcineurina (Walker *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2015). Se ha reportado en *S. cerevisiae* que al encontrarse osmo-estrés (0.4 M de NaCl) tienen un retraso en la metafase lo que es dependiente de Hog1 (Tognetti *et al.*, 2020). Por lo que podemos sugerir que las diferencias observadas tanto en la morfología de las colonias en el cultivo líquido (perlas de micelio) y las hifas (diferencia en la ramificación, septación, diámetro y longitud) en los microcultivos expuestos a las diferentes condiciones de NaCl son la consecuencia del estrés hiper- o hipoosmótico.

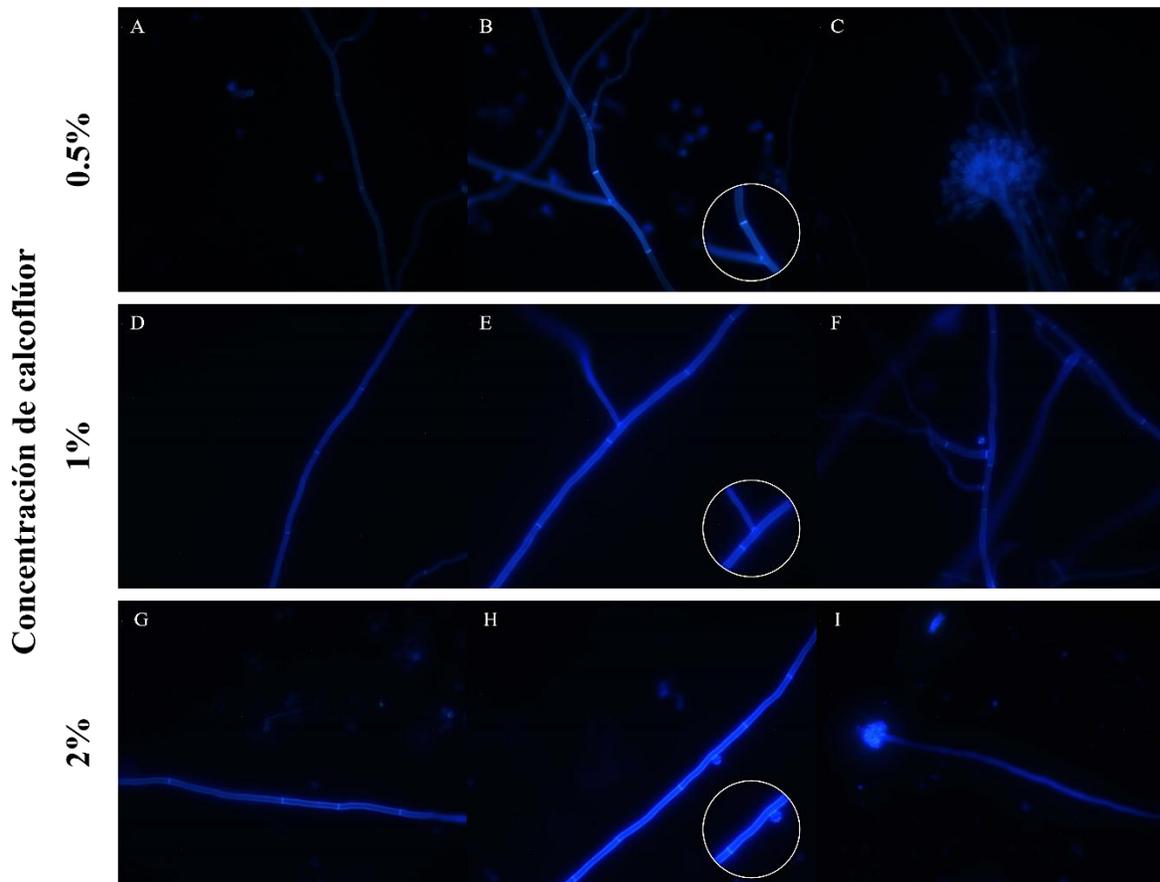
### **8.1.3 Estandarización de la tinción de núcleos y pared celular de *A. sydowii***

Para estandarizar la tinción de la pared celular con el fluoróforo “Calcofluor White” y la tinción de núcleos con DAPI en los microcultivos de *A. sydowii*, se realizaron pruebas de tinción usando distintas concentraciones de ambos. El microcultivo se realizó a partir de un pre-inóculo del hongo crecido en la condición de su óptimo de crecimiento (0.5 M de NaCl).

La concentración inicial para ambas tinciones fueron las reportadas, 0.1% para el Calcoflúor (Bonifaz *et al.*, 2013) y 1µg/mL para el DAPI (Stojković *et al.*, 2017). Estas se añadieron al microcultivo y se incubaron por 10 min y se observaron en un microscopio de fluorescencia ZEISS con los objetivos 20X y 40X. En este primer intento no se observó tinción, por lo que se hicieron algunas modificaciones.

#### **8.1.3.1 Tinción de la pared celular de *A. sydowii***

De acuerdo con el instructivo del proveedor del Calcoflúor, se debe utilizar una solución de KOH al 10% y añadir el calcoflúor, por lo que se usaron las siguientes concentraciones: 0.5%, 1% y 2% de calcoflúor en una proporción 2:1 con el KOH (Calcoflúor: KOH) y se incubaron 10 min. Los resultados muestran que la tinción de los septos comienza a ser visible con 0.5 % de calcoflúor, sin embargo, esta no es homogénea y es poco nítida. Por tanto, se incrementó la concentración de la tinción a 1% y 2%, en esta última es donde los septos se observan nítidos y la tinción es uniforme (ver Figura 16). Además, 2% de calcoflúor fue eficiente para teñir a las paredes celulares tanto en la condición sin sal como en 2 M de NaCl.



**Figura 16.** Estandarización de la tinción de pared celular de *A. sydowii*. Las tinciones se realizaron con una proporción 2:1 (Calcoflúor: KOH 10%) con las diferentes concentraciones de calcoflúor y una incubación de 10 minutos. A-C) *A. sydowii* teñido con calcoflúor al 0.5%. D-F) *A. sydowii* teñido con calcoflúor al 1%. G-I) *A. sydowii* teñido con calcoflúor al 2%. Los círculos marcan la tinción de septos.

### 8.1.3.2 Tinción de *A. sydowii* con DAPI

Se intentó teñir a los núcleos usando DAPI en diferentes concentraciones: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A partir de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observa fluorescencia, pero esta se observa en la pared celular (Figura 17), probablemente porque la tinción no permeó a la célula. Se planeaba realizar pretratamientos, para permeabilizar la membrana sin embargo esto no se realizó porque el objetivo de la tinción era tener referencias de estructuras celulares una vez que tengamos a la cepa de *A. sydowii* expresando a las hidrofobinas fluorescentes. Por tanto, si se permeabiliza a las células es posible que las

hidrofobinas puedan ser removidas por el pretratamiento. Esto se debe a que el calor o la fijación con solventes (etanol, metanol o acetona) podrían afectar la película que forman las HFBS (hidrofobinas) e inclusive a la desnaturalización de éstas, ya que los solventes como el etanol son fijadores coagulantes deshidratantes, los cuales actúan eliminando el agua libre de la célula, ocasionando la desnaturalización de las proteínas (Poveda Ayala, K. *et al.*, 2021). También la temperatura es un factor de desnaturalización de las proteínas, debido a que a cierta temperatura éstas son termodinámicamente estables ( $\Delta G > 0$ ) y fuera de este intervalo estas pueden desnaturalizarse espontáneamente (Romero-Romero *et al.*, 2018). Por lo que consideramos que el uso de fijadores o altas temperaturas podría causar la desnaturalización de las HFBS o de las proteínas fluorescentes y cambiar su localización. Por tanto, ya no se continuó con la estandarización de la tinción de núcleos.



**Figura 17.** Tinción de *A. sydowii* con DAPI a 25  $\mu\text{g/mL}$ .

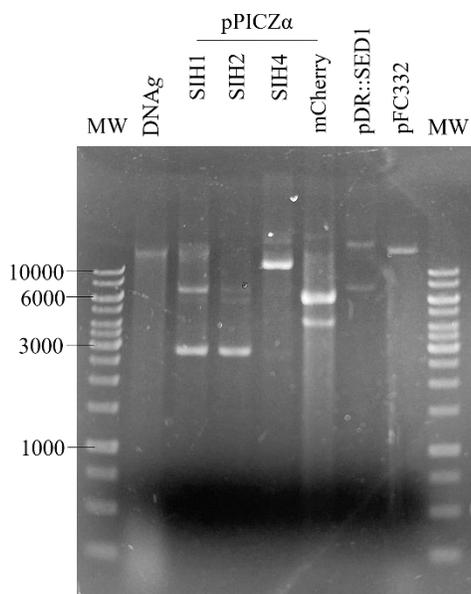
## 8.2 Construcción de los cassettes para la fusión de las HFBS con proteínas fluorescentes

### 8.2.1 Extracción de ADNg de *A. sydowii* y de los plásmidos pDR::SED1, pPICZ $\alpha$ ::mCherry, pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, pPICZ $\alpha$ ::SIH4 y pFC332

Para obtener los templados que utilizamos para amplificar los brazos flanqueantes 5' y 3' de los genes de las hidrofobinas, así como la secuencia sin intrones de las hidrofobinas y las secuencias de término de la transcripción junto con el gen de resistencia, se procedió a la purificación de ADNg de *A. sydowii* y de los plásmidos que contienen estas secuencias. Se realizaron mínimo dos extracciones de cada templado y el promedio de cada extracción se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8.** Concentración promedio del ADNg de *A. sydowii* y de los plásmidos obtenida en la extracción.

Extracción	Concentración promedio
ADNg de <i>A. sydowii</i>	185.7 ng/ $\mu$ L
pPICZ $\alpha$ ::SIH1	66 ng/ $\mu$ L
pPICZ $\alpha$ ::SIH2	77.4 ng/ $\mu$ L
pPICZ $\alpha$ ::SIH4	70.2 ng/ $\mu$ L
pPICZ $\alpha$ ::mCherry	66.8 ng/ $\mu$ L
pDR::SED1	77.635 ng/ $\mu$ L



**Figura 18.** Integridad del ADNg de *A. sydowii* y de los plásmidos pDR::SED1, pPICZ $\alpha$ ::mCherry, pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, pPICZ $\alpha$ ::SIH4 y pFC332 usados como templados.

**Tabla 9.** Peso molecular de los plásmidos que se utilizaron como templados.

Plásmido	Peso molecular (pb)
pPICZ $\alpha$ ::SIH1	3965
pPICZ $\alpha$ ::SIH2	3991
pPICZ $\alpha$ ::SIH4	3029
pPICZ $\alpha$ ::mCherry	4910

SED1

8312

pFC332

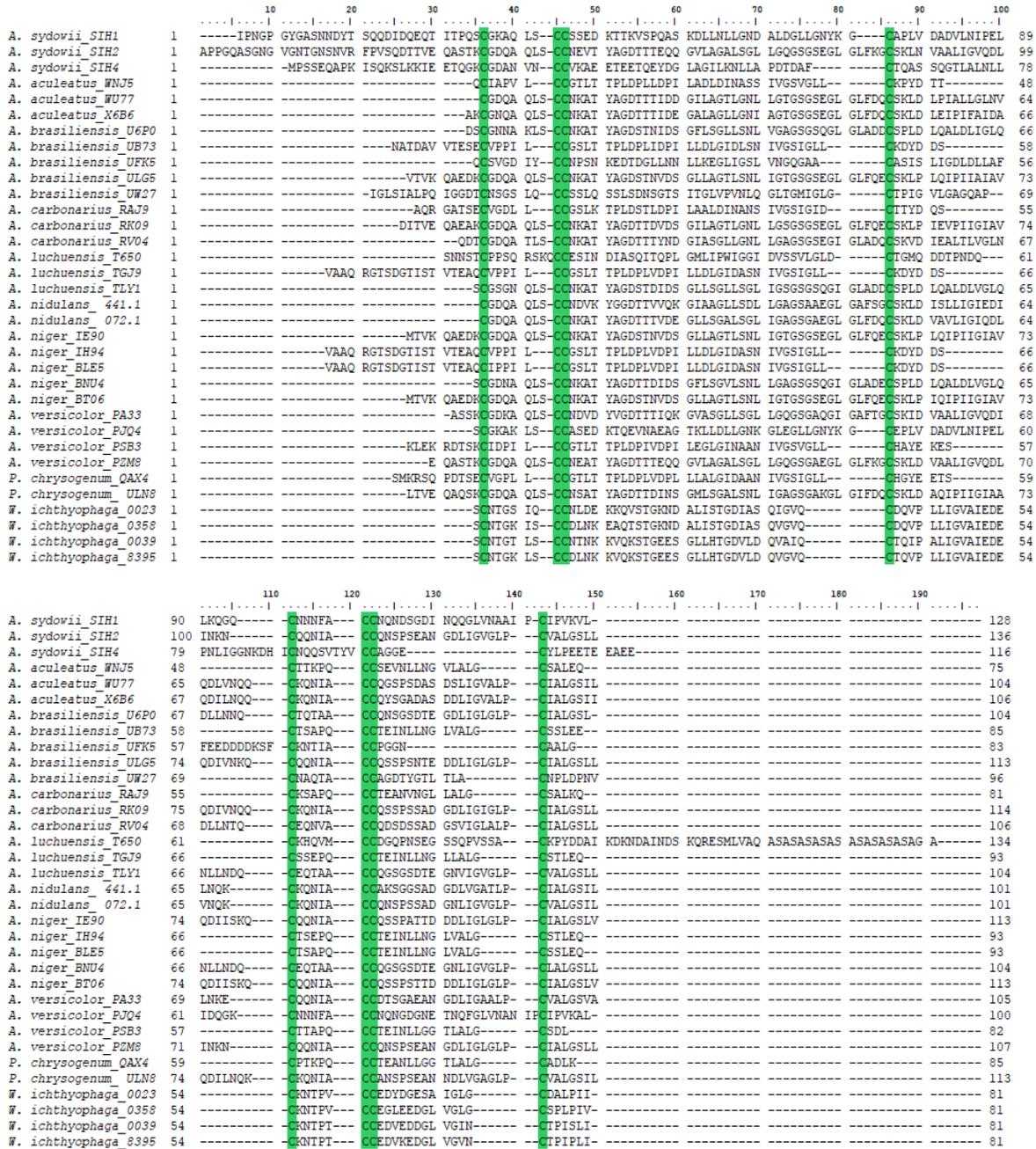
15,561

---

### **8.2.2 Elección del sitio de fusión de la posición de la proteína fluorescente**

En general durante el diseño para construir proteínas fluorescentes (PF) con sus contrapartes fluorescentes se realiza para el lado carboxilo y el lado amino de la proteína, en este caso de las hidrofobinas (Joensuu *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2021). Particularmente para éstas los reportes en los que se han fusionado con PF las posicionan en su lado amino terminal. Cai y col. (2021) reportaron la fusión de las hidrofobinas de *T. guizahuense* de ambos lados, pero en los experimentos mostrados la versión utilizada fue la unida al amino terminal. Por otra parte, en Gutiérrez y col. (2013) unieron a las HFBS con PF usando un “linker” ubicado entre ellas.

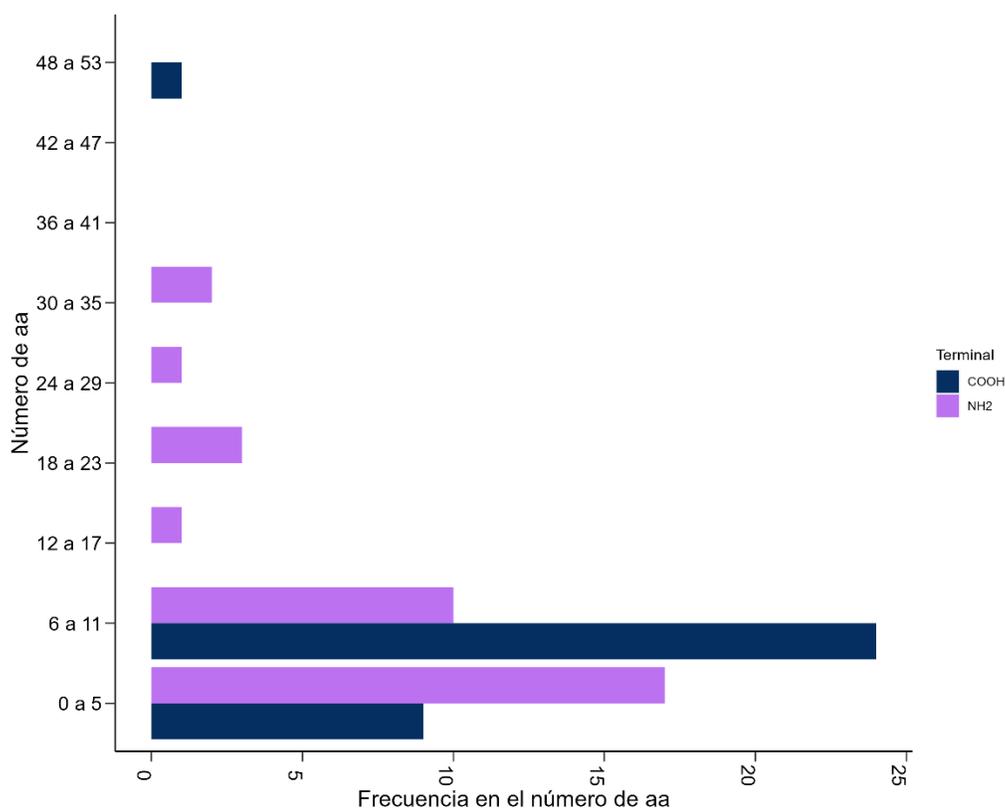
Análisis previos de alineamiento de algunas secuencias de hidrofobinas habían sugerido que la longitud del carboxilo terminal a partir de la última cisteína se conserva en un tamaño aproximado de 10 aa, lo que sugiere que una longitud conservada es importante para su estructura y función. Por tanto, para tener la certeza de la posición en la que debemos fusionar nuestras proteínas para evitar un posible efecto en el plegamiento o en el ensamblaje se realizó un alineamiento de 34 secuencias de hidrofobinas sin péptido señal (Figura 19), para verificar la longitud del lado amino y carboxilo, a partir de las bases de datos Interpro y NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). Para este análisis se anclaron a los ocho residuos Cys (resaltadas en verde), una característica conservada en las hidrofobinas. Los números de acceso se encuentran en la sección de anexos.



**Figura 19.** Alineamiento de 34 secuencias de hidrofobinas sin péptido señal basadas en el anclaje de sus ocho Cys (resaltados en verde) a partir de la base de datos de Interpro y NCBI.

Después de realizar el alineamiento, se determinó la diferencia en el número de aminoácidos antes de la primera y después de la última cisteína (Figura 20). Los resultados mostraron que la longitud del lado amino terminal es más variable ya que va de 0 a 35 aa, en comparación

al lado carboxilo terminal, donde el 99% de las secuencias poseen una longitud de entre 3 y 11 aminoácidos (Figura 20). Además, Fokina y col., (2016) realizó la inmovilización de la lacasa LccC de *A. nidullans* fusionándola al carboxilo terminal de la hidrofobina DewA (hidrofobina de clase I), y por medio de análisis estructurales *in silico* determinaron que la fusión de ambas proteínas no se vería afectada, sin embargo, *in vivo* hubo una reducción de la hidrofobicidad de DewA posiblemente ocasionada por la fusión con la lacasa. Esto nos llevó a sugerir que es posible que esta conservación de la longitud del lado carboxilo terminal sea importante para la estructura de la proteína y el ensamblaje de las capas, por lo que se mantuvo la decisión de trabajar con la construcción del cassette donde se coloca a la PF en el lado amino terminal de la hidrofobina; no obstante, diseñamos los oligonucleótidos quiméricos para ambas versiones, con el propósito de que en un futuro se pueda realizar al menos la construcción de una fusionada con una PF en el lado carboxilo terminal y comparar si esto afecta la localización y las propiedades de las HFBs.



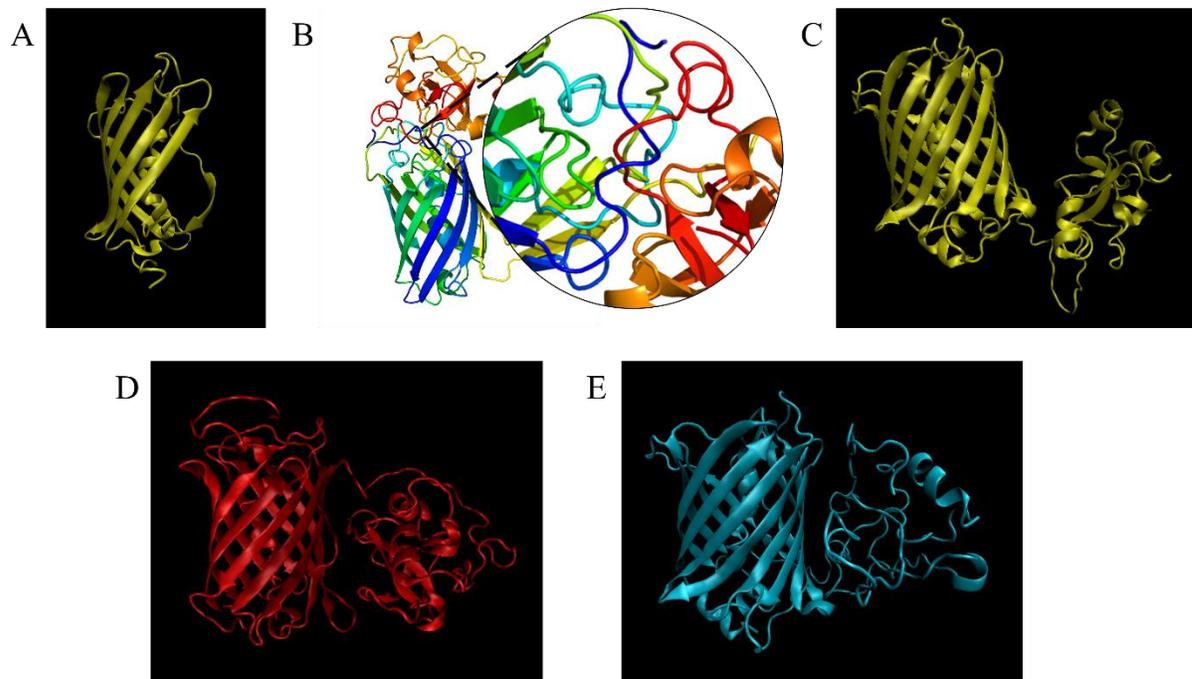
**Figura 20.** Diferencia entre la longitud del lado amino terminal y el lado carboxilo terminal de las 34 secuencias alineadas.

### **8.2.3 Predicción de las estructuras de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 fusionadas con las proteínas fluorescentes seleccionadas (Citrina, mCherry y mCerulean) aquí.**

Se llevó a cabo la predicción de las estructuras de las hidrofobinas fusionada con las PF con el propósito de obtener una representación tridimensional que nos pudieran sugerir si habría efectos en el plegamiento de nuestras proteínas. Las secuencias de las proteínas fusionadas se ingresaron a Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>), el cual genera el modelo usando criterios de homología. Los resultados del modelaje de las fusiones obtenidos fueron los siguientes para:

- Citrina\_SIH1 se obtuvo un >90% de confianza para el 98% de los residuos modelados.
- mCherry\_SIH2 se obtuvo un >90% de confianza para el 90% de los residuos modelados.
- mCerulean\_SIH4 se obtuvo un >90% de confianza para el 66% de los residuos modelados.

Sin embargo, para el modelaje de la fusión de Citrina\_SIH1 se descartó la primera predicción, debido a que al visualizarla en el software VMD, a partir de la estructura proporcionada por Phyre<sup>2</sup>, solo se observa una parte del barril beta de la PF citrina (Figura 21, A), debido a que se genera un entrecruzamiento con los loops de la hidrofobina. Se repitió el procedimiento por segunda vez, obteniendo una predicción de la estructura sin entrecruzamiento.



**Figura 21.** Predicción de las estructuras de las hidrofobinas fusionadas con proteínas fluorescentes. Estructura predicha de la fusión de A) Citrina, B) Citrina::SIH1 entrelazadas entre sí, C) Citrina::SIH, D) mCherry::SIH2 y E) mCerulean::SIH4.

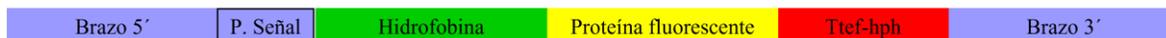
#### 8.2.4 Diseño de oligonucleótidos quiméricos para generar la construcción

Para diseñar los oligonucleótidos requeridos para generar las construcciones quiméricas descritas en la metodología, se tomaron las secuencias del terminador Ttef y el gen hph incluyendo el promotor del plásmido pFC332, las secuencias que codifican para las proteínas fluorescentes de los plásmidos SED1 y pPICZ $\alpha$ ::mCherry, las secuencias de las hidrofobinas de los plásmidos pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, pPICZ $\alpha$ ::SIH4 y pFC332, y por último las secuencias de los brazos flanqueantes de las hidrofobinas del genoma de *A. sydowii*. Estas secuencias se introdujeron al programa SnapGene ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)) y se unieron según el orden de la construcción deseada. Una vez que las secuencias se ensamblaron, se diseñaron los oligonucleótidos quiméricos los que consisten de una longitud mínima de empalme de 20 pb según las especificaciones del kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix/NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB #E2621S/L/X) y una longitud mínima de los brazos 5' y 3' de 500 pb para *Aspergillus* como lo recomienda Yu *et al.*, (2004)

A



B



**Figura 22.** Esquema representativo del empalme de las secuencias para el diseño de los oligonucleótidos quiméricos.

Una vez que se eligieron a los oligonucleótidos quiméricos (Tabla 10), se verificó que éstos tuvieran temperaturas de fusión ( $T_m$ ) similares, para esto se consideró la parte de la secuencia complementaria que pertenece a la secuencia a amplificar y no la parte quimérica. Se verificó que la diferencia de  $T_m$  no fuera mayor a 4 °C entre los oligonucleótidos sentido (Fw) y antisentido (Rv). De tal manera que si no se cumplía este criterio se ajustaba la longitud de las secuencias hasta encontrar una temperatura y longitud similar para ambos oligonucleótidos.

**Tabla 10.** Oligonucleótidos diseñados para la generación de las construcciones de las hidrofobinas (SIH1, SIH2 y SIH4) fusionadas con proteínas fluorescentes (Citrina, mCherry y Cerulean). Las letras mayúsculas corresponden a la secuencia que amplifica y las minúsculas corresponden a la parte quimérica con la que se unirá a la siguiente secuencia.

HFB	Orden del cassette	Oligonucleótido	Secuencia	$T_m$ (°C)	Peso molecular (pb)	Fragmento amplificado
SIH1	A5_Citrina_SIH1_HPH_A3	A5_SP_sih1_Fw(CO2H)	CTCGACCGGGATGACTTCCGTGCC	64.2	1361	Brazo 5'
		Sih1_A5quimsih1_Rv	ttcctcacctttgacacatGGCCAGGGCAGTGGCGGCGA	64.1		
		Sih1_sih1quimA5_Fw	ctegcgcactgccctggccATGGTGTCAAAAGGTGAGGAACTG	55.7	760	Citrina
		Sih1_sih1quimCitrine_Rv	cgtagccaggccgtgggatTTGTACAGCTCGTCCATGCCC	56.7		
		Sih1_Citrinequimsih1_Fw	gcattggcagcagctgtacaaaATCCCCAACGGCCCTGGCTAC	60.2	427	SIH1
		Sih1_Citrinequimhph_Rv	ggcataaatgaatgtccgcCTAGAGAACCTTGACGGGAATGCAAG	59.5		
		Sih1_HPHquimCitrina_Fw	cattcccgtcaaggttctctagGCGGACATTCGATTTATGCCGTTATG	58	1895	Ttef-hph
		Sih1_HPHquimA3_Rv(CO2H)	cccaggcaagtgggtccgtCGGTCGGCATCTACTCTATTCCTTTG	59.5		
		Sih1_A3quimHPH_Fw(CO2H)	gaatagatagatgccaccgACGGACCCGACTTGCTGGGTCC	64.2	1357	Brazo 3'
		A3_sih1_Rv(CO2H)	GAAACAAACTCGGAGTCGCAACAGGCACC	64.3		

SIH1	A5_SIH1_mCerulean_HPH_A3	A5_SP_sih1_Fw(NH2)	GGGATGACTTCCGTGCCTCATTTTACG	61.3	1363	Braço 5'
		Sih1_A5quimCitrine_Rv	gctggcaccgtagccagggcCGTTGGGGATGGCCAGGGCAGTG	64.2		
		Sih1_CitrinequimA5_Fw	ctcgcgcactgcctggccATCCCCAACGGCCCTGGCTACG	62.3	425	SIH1
		Sih1_Citrinequimsih1_Rv	tcctcacctttgacacatGAGAACCTTGACGGGAATGCAAGGGATG	62.9		
		Sih1_sih1quimCitrine_Fw	gcattcccgtcaaggtctcATGGTGTCAAAGGTGAGGAAC	53	760	Citrina
		Sih1_sih1quimhph_Rv	ggcataaatcgaatgtccgcTTATTTGTACAGCTCGTCCATGC	53.5		
		Sih1_HPHquimsih1_Fw	tggacgagctgtacaataaGCGGACATTCGATTTATGCCG	54.4	1893	Ttef-hph
		Sih1_HPHquimA3_Rv(NH2)	cccaggcaagtcgggtccgtCGGTCGGCATCTACTCTATTC	54.4		
		Sih1_A3quimHPH_Fw(NH2)	ggaatagatagatgccaccgACGGACCCGACTTGCCTGGGTC	62.3	1358	Braço 3'
		A3_sih1_Rv(NH2)	GAAACAAACTCGGAGTCGCAACAGGCAC	62.9		
SIH2	A5_Cherry_SIH2_HPH_A3	A5_SP_sih2_Fw(CO2H)	CGACTTCCAGGGATCCCGTCGAG	62.4	1422	Braço 5'
		Sih2_A5quimsih2_Rv	tcctgccttctcaccatAGCCACGACGGAGGCGGCGC	64.1		
		Sih2_sih2quimA5_Fw	gcgcgcctccgtctgtgctATGGTGAGCAAGGGCGAGG	55.4	748	Cherry
		Sih2_sih2quimCherry_Rv	gaggcctggccggggggagcCTTGTACAGCTCGTCCATGC	53.8		
		Sih2_Cherryquimsih2_Fw	gcatggacgagctgtacaagGCTCCCCCGGCCAGGCC	64	451	SIH2
		Sih2_Cherryquimhph_Rv	ggcataaatcgaatgtccgcTTAGAGAAGAGAACCAAGAGCAACGCAAGGAAGAC	64.4		
		Sih2_HPHquimCherry_Fw	ctcttggttctctctaaGCGGACATTCGATTTATGCCGTTATGAC	59.9	1893	Ttef-hph
		Sih2_HPHquimA3_Rv(CO2H)	cacaccagcattgacgagcCGGTCGGCATCTACTCTATTCCTTTG	59.5		
		Sih2_A3quimhph_Fw(CO2H)	ggaatagatagatgccaccgGCTCGTCAATGCTGGGTGTGCTTG	60.8	1452	Braço 3'
		A3_sih2_Rv(CO2H)	CTTGGGGACAGCAGCAGCAGC	60.2		
	A5_SIH2_Cherry_HPH_A3	A5_SP_sih2_Fw(NH2)	CGTGTGTACACTATGCAGACCTATTG	59.7	1542	Braço 5'
		Sih2_A5quimCherry_Rv	gttgcgttaccagtttccGACACCGTTGCCAGAGGCCTG	60.2		
		Sih2_CherryquimA5_Fw	gcgcgcctccgtctgtgctGCTCCCCCGGCCAGGCCTC	66.1	448	SIH2
		Sih2_Cherryquimsih2_Rv	tcctgccttctcaccatGAGAAGAGAACCAAGAGCAACGCAAGGAAGACC	65.6		
		Sih2_sih2quimCherry_Fw	gttgccttggttctctcATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	58.3	752	Cherry
		Sih2_sih2quimhph_Rv	ggcataaatcgaatgtccgcCTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	57.1		
		Sih2_hphquimsih2_Fw	tggacgagctgtacaagtagGCGGACATTCGATTTATGCCGTTATG	58	1893	Ttef-hph
		Sih2_hphquimA3_Rv(NH2)	cacaccagcattgacgagcCGGTCGGCATCTACTCTATTCCTTTG	59.5		
		Sih2_A3quimhph_Fw(NH2)	aatagatagatgccaccgGCTCGTCAATGCTGGGTGTGCTTG	60.8	1450	Braço 3'
		ASA3_sih2_Rv(NH2)	CTTGGGGACAGCAGCAGCAGC	60.2		
SIH4	A5_mCerulean_SIH4_HPH_A3	A5_SP_sih4_Fw(CO2H)	CCATGGTCCACAAAGGTCTACATGCCG	62.8	1452	Braço 5'
		Sih4_A5quimsih4_Rv	gttcttcaccttctcaccatGGCAGCAGCAGCCGCAACGAG	62.2		
		Sih4_sih4quimA5_Fw	cctcgttgcggctgtctgccATGGTGAGCAAAGGTGAAGAAC	53	759	mCerulean
		Sih4_sih4quimCerulean_Rv	gcctgctcgaggaggaatTTTATACAGTTTCATCCATACCCAG	52.3		
		Sih4_Ceruleanquimsih4_Fw	ggtatggatgaactgtataaATGCCCTTCTCCGAGCAG	52.6	392	SIH4
		Sih4_Ceruleanquimhph_Rv	ggcataaatcgaatgtccgcTTACTCTCGCCTCTCTC	52.6		
		Sih4_hphquimCerulean_Fw	gggaggaagcagaggaatagGCGGACATTCGATTTATGCCGTTATGAC	59.9	1893	Ttef-hph
		Sih4_hphquimA3_Rv(CO2H)	gacacaagaggttagaacCGGTCGGCATCTACTCTATTCCTTTG	59.5		
		Sih4_A3quimhph_Fw(CO2H)	ggaatagatagatgccaccgGTTTCTAAACCTTGTGTCTGTCTAGAAACACCC	63.3	1446	Braço 3'
		A3_sih4Rv(CO2H)	CGATGGATAATTTATTATTTAAACACCCCGGAAACATCAGC	63.5		
A5_SIH4_m	A5_SP_sih4_Fw(NH2)	GCCATGGTCCACAAAGGTCTACATGCG	62.8	1441	Braço 5'	

Sih4_A5quimCerulean_Rv	gcctgctgggaggaagcatGGCAGCAGCAGCCGCAACGAG	62.2		
Sih4_CeruelanquimA5_Fw	cctcgttgcggtgctgctgcCATGCCTTCCTCCCAGCAGG	57.9	392	SIH4
Sih4_Ceruelanquimsih4_Rv	gttcttcaccttgctcaccatTTCCTCTGCTTCCTCCCCCTC	58.3		
Sih4_sih4quimCerulean_Fw	ggagggggaggaagcagaggaaATGGTGAGCAAAGGTGAAGAAC	53	759	mCerulean
Sih4_sih4quimhph_Rv	ggcataaatcgaatgcccgcTTATTTATACAGTTCATCCATACCCAG	53.7		
Sih4_hphquimsih4_Fw	gtatggatgaactgataaaTAGGCGGACATTTCGATTTATGCCGTTATG	60.1	1893	Ttef-hph
Sih4_hphquimA3_Rv(NH2)	gacacaagaggttagaaacCGGTCCGCATCTACTCTATTCCTTTG	59.5		
Sih4_A3quimhph_Fw(NH2)	ggaatagatagatcccgaccgGTTTCTAAACCTTTGTGTCTGTCTAGAAACACCC	63.3	1447	Brazo 3'
A3_sih4_Rv(NH2)	GCGATGGATAATTTATTATTTAAACACCCCGAAACATCAG	63.5		

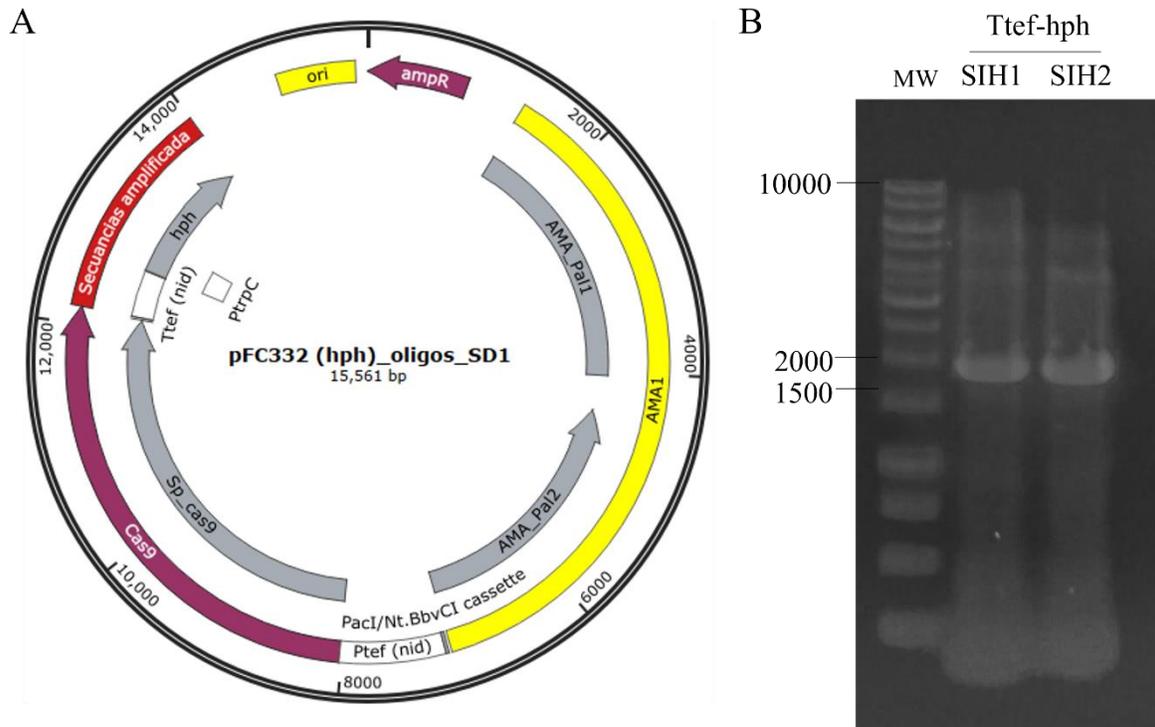
### 8.2.5 Amplificación de los templados para la construcción de las hidrofobinas SIH1 y SIH2 marcadas con PF.

Una vez que se diseñaron los oligonucleótidos, estos se enviaron a sintetizar y entonces se procedió a amplificar los brazos 5' y 3' de las hidrofobinas SIH1 y SIH2, y las proteínas fluorescentes (mCherry y Citrina), y el Ttef\_hph para cada construcción, usando a los plásmidos y oligonucleótidos con las condiciones mencionadas en la Tabla 5 de la sección de metodología.

Se amplificaron los fragmentos correspondientes al terminador Ttef y hph, usando como templado al plásmido pFC332 y los oligonucleótidos que se utilizaron para la construcción de los cassettes de ambas hidrofobinas, fueron:

- SIH1
  - Fw: Sih1\_HPHquimCitrina\_Fw
  - Rv: Sih1\_HPHquimA3\_Rv(CO2H)
- SIH2
  - Fw: Sih2\_HPHquimCherry\_Fw
  - Rv: Sih2\_HPHquimA3\_Rv(CO2H)

El tamaño de Ttef\_hph para la SIH1 es 1895 pb y de 1893 pb para SIH2, lo que se verificó en un gel de agarosa al 1% (Figura 23)



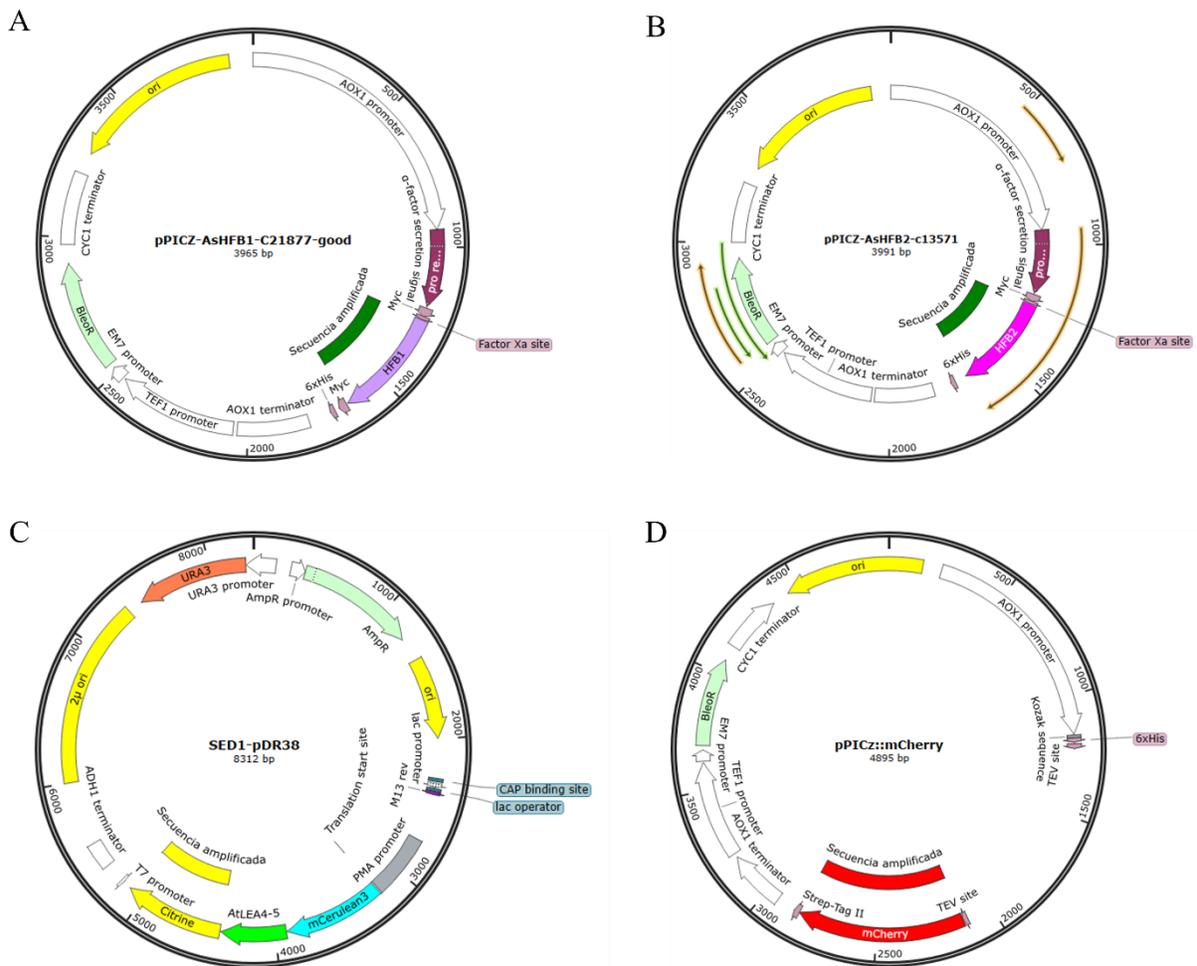
**Figura 23.** Amplicones de los fragmentos de Ttef-hph a partir del plásmido. A) Plásmido pFC332 con la región amplificada marcada en rojo, B) Amplificación del Ttef-hph para ambas HFBs. Gel de agarosa 1% en TAE 1X.

La amplificación de las hidrofobinas SIH1 y SIH2, y las proteínas fluorescentes Citrina y mCherry (Figura 24), se llevó a cabo usando como templado a los plásmidos pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, SED1 y pPICZ $\alpha$ ::mCherry, con los siguientes oligonucleótidos:

- SIH1
  - Sih1\_Citrinequimsih1\_Fw
  - Sih1\_Citrinequimhph\_Rv
- SIH2
  - Sih2\_Cherryquimsih2\_Fw
  - Sih2\_Cherryquimhph\_Rv
- Citrina
  - Sih1\_sih1quimA5\_Fw
  - Sih1\_sih1quimCitrine\_Rv

- mCherry
  - Sih2\_sih2quimA5\_Fw
  - Sih2\_sih2quimCherry\_Rv

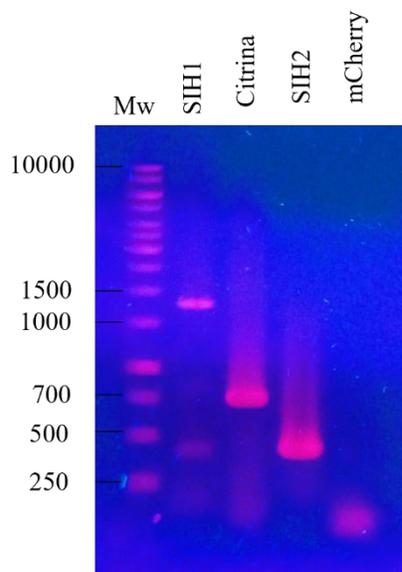
Se obtuvieron los amplicones de las hidrofobinas SIH1 y SIH2, con un tamaño de 427 pb y 451 pb respectivamente (Figura 24). Para el caso de la hidrofobina SIH1 se obtuvieron bandas inespecíficas como se observa en el carril 2 del gel en la Figura 25.



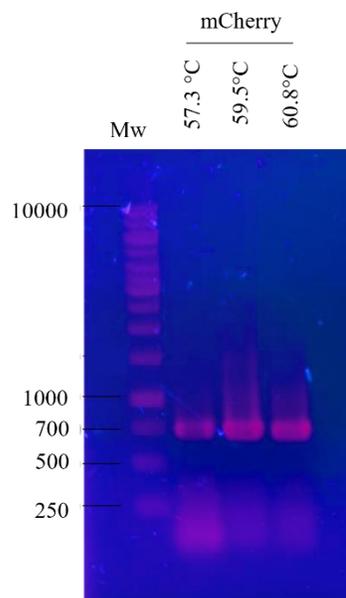
**Figura 24.** Secuencias amplificadas de las HFBs y de las PF indicadas en el plásmido de templado.

También se amplificaron las secuencias codificantes para las proteínas fluorescentes, pero sólo se obtuvo el amplicón de la Citrina (Figura 25) con un peso de 760pb. Dado que no hubo

amplificación de mCherry (Figura 24), se volvió a amplificar realizando un gradiente de temperatura y usando a la Taq polimerasa (Tabla 11) previo a usar la polimerasa de alta fidelidad mencionada anteriormente (Tabla 9), además de que se utilizó otra alícuota del plásmido templado pPICZ $\alpha$ ::mCherry (Figura 26). Los resultados muestran que la temperatura de su alineamiento fue 60.8°C



**Figura 25.** Amplificación de los fragmentos de SIH1, SIH2 Citrina y mCherry a partir de los plásmidos pPICZ $\alpha$ ::SIH1, pPICZ $\alpha$ ::SIH2, SED1 y pPICZ $\alpha$ ::mCherry. Con un tamaño de amplicones de: SIH1 de 427 pb, Citrina de 760 pb, SIH2 de 451 pb y mCherry de 748 pb. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermoscientific.



**Figura 26.** Amplificación de mCherry a partir del plásmido pPICZ $\alpha$ ::mCherry por la Taq polimerasa y a diferentes temperaturas de alineamiento (57.3°C, a 59.5 °C y a 60.8 °C). Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermoscientific.

**Tabla 11.** Mezcla de los componentes para estandarización de la amplificación de mCherry.

Componente	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer de Taq (10X)	2 $\mu$ L
dNTPds(2 MM)	2 $\mu$ L
Forward primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Templado (10ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.6 μL
“Amplificasa” (5U/ μL)	0.4μL
Agua grado molecular	16 μL

---

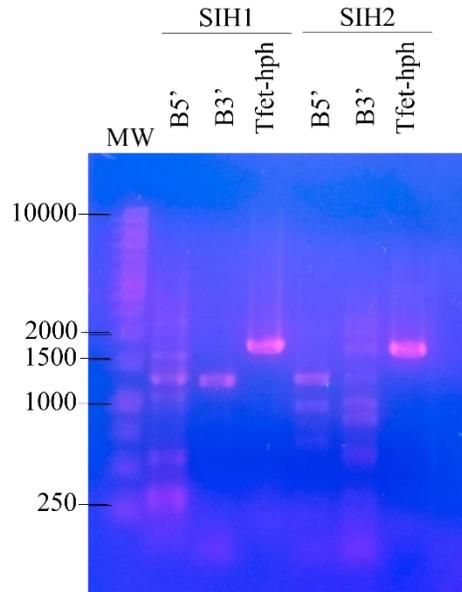
Para la amplificación de los brazos 5’ y 3’ de ambas hidrofobinas se utilizó como templado el DNAg de *A. sydowii* y los oligonucleótidos correspondientes para cada región. Los brazos de la SIH1 se amplificaron usando los siguientes oligonucleótidos:

- Brazo 5’
  - A5\_SP\_sih1\_Fw(CO2H)
  - Sih1\_A5quimsih1\_Rv
- Brazo 3’
  - Sih1\_A3quimHPH\_Fw(CO2H)
  - A3\_sih1\_Rv(CO2H)

Para la amplificación de los brazos de la SIH2, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

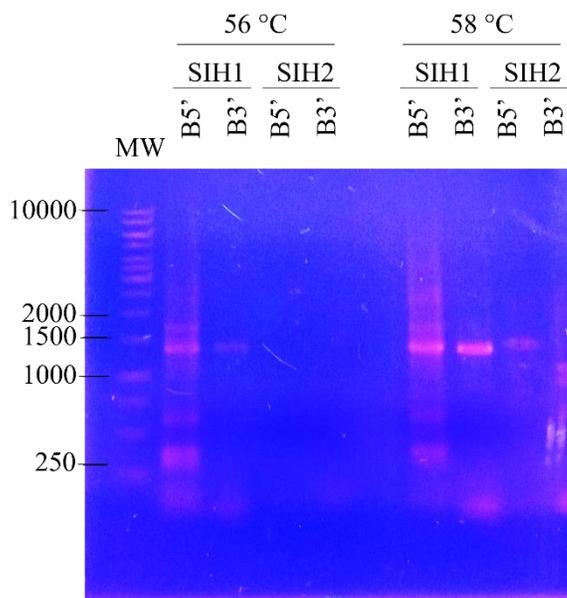
- Brazo 5’
  - A5\_SP\_sih2\_Fw(CO2H)
  - Sih2\_A5quimsih2\_Rv
- Brazo 3’
  - Sih2\_A3quimhph\_Fw(CO2H)
  - A3\_sih2\_Rv(CO2H)

Se logró amplificar a todos los brazos de ambas hidrofobinas, pero se obtuvieron bandas inespecíficas, particularmente del brazo 5’ de la SIH1 y los brazos de la SIH2, probablemente por el pegado inespecífico de los oligonucleótidos a otros sitios en el DNAg.



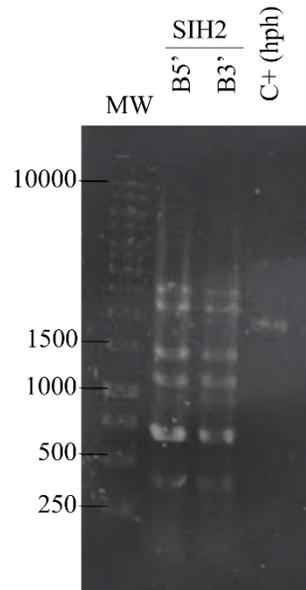
**Figura 27.** Amplicones de los brazos 5' y 3' de las hidrofobinas SIH1 y SIH2 usando DNAg como templado. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de ThermoScientific.

Debido a que se observan bandas inespecíficas en las amplificaciones de los brazos flanqueantes de las hidrofobinas y en la amplificación de la hidrofobinas SIH1, se repitieron los PCRs modificando la temperatura del alineamiento a 56°C y 58°C en lugar de 55 °C. De esta manera obtuvimos amplicones de los brazos de SIH1 en 58°C. Mientras que para la SIH2 no mejoró la especificidad ni en 58°C.



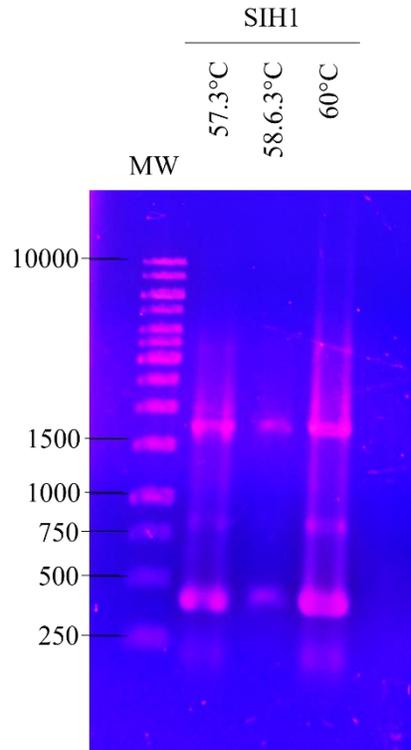
**Figura 28.** Estandarización de la amplificación de los fragmentos de los brazos 5' y 3' de las hidrofobinas SIH1 y SIH2 usando DNAg como templado usando dos temperaturas de alineamiento. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermoscientific.

Dado que se obtuvo una baja cantidad de los amplicones de los brazos 5' y 3' de SIH2 se realizó otro PCR incrementando la concentración de oligonucleótidos a 1.2  $\mu$ M.



**Figura 29.** Amplicones de los brazos 5' y 3' de las hidrofobinas SIH2 usando DNAg como templado y 1.2  $\mu$ M de oligonucleótidos. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermoscientific.

Para la amplificación de la SIH1 se probaron las siguientes temperaturas: 57.3 °, 58.6 °C y 60°C, donde la mejor amplificación fue a 60 °C (Figura 25).



**Figura 30.** Amplificación de SIH1 usando pPICZ $\alpha$ ::SIH1 como templado a diferentes temperaturas. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermoscientific.

Por tanto, logramos amplificar a todos los fragmentos requeridos para proceder a su ensamble.

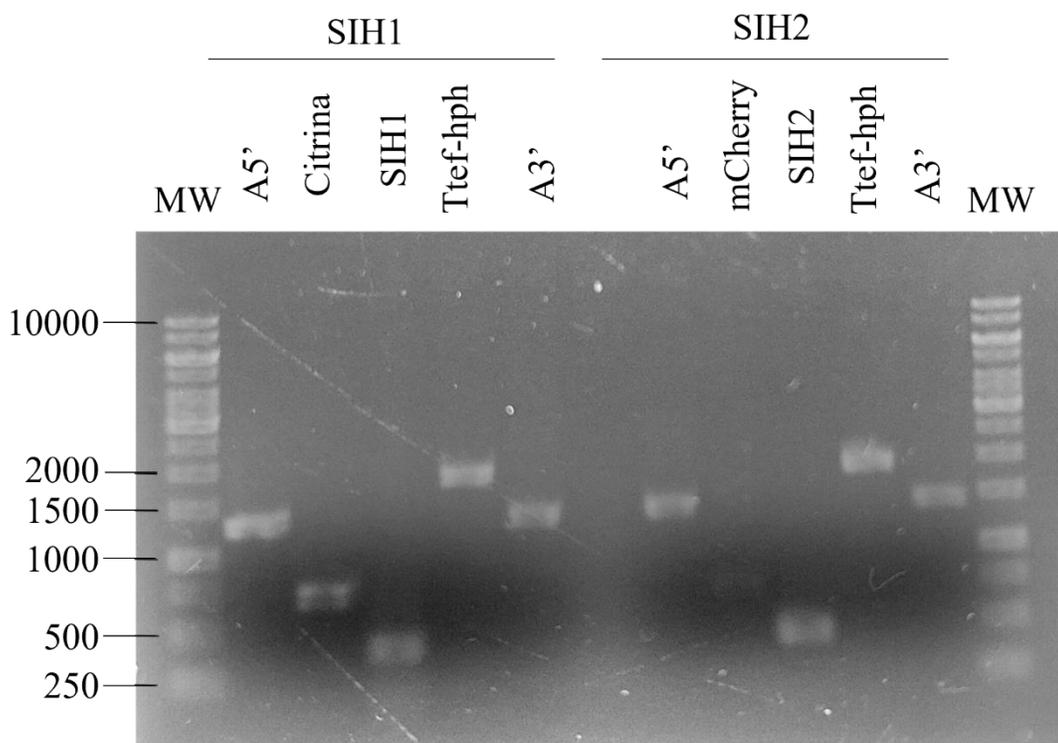
### 8.2.6 Purificación de los amplicones ADN a partir de bandas de agarosa.

Los amplicones obtenidos se purificaron para proseguir con el ensamble de los fragmentos, para lo cual se realizó la separación de los fragmentos en geles de agarosa al 1%, se cortaron los amplicones requeridos y se purificaron según lo descrito en la sección 7.5.3.

En la tabla 12 se muestra la concentración de los amplicones purificados y en la figura 30 la integridad de éstos.

**Tabla 12.** Peso molecular y concentración de los amplicones para los cassettes de SIH1 y SIH2.

HFB	Amplicon	Peso molecular (pb)	Concentración (ng/ μL)
	Brazo 5'	1361	9.35
	Citrina	760	32.9
	SIH1	427	45.7
	Ttef-hph	1895	29.1
	Brazo 3'	1357	15.55
	Brazo 5'	1422	11
	mCherry	748	17.05
	SIH2	451	24.9
	Ttef-hph	1893	40.15
	Brazo 3'	1452	13.22

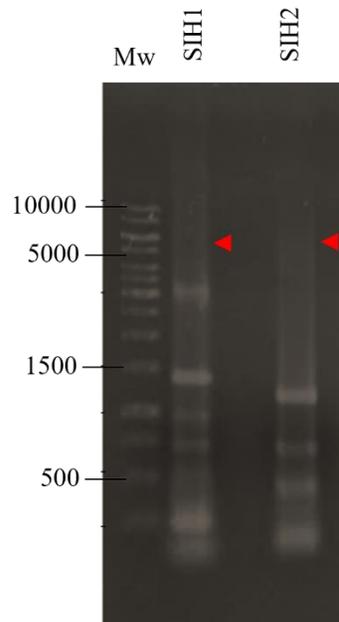


**Figura 31.** Amplicones purificados para generar los cassettes de SIH1 y SIH2 para su posterior transformación en *A. sydowii*. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermoscientific.

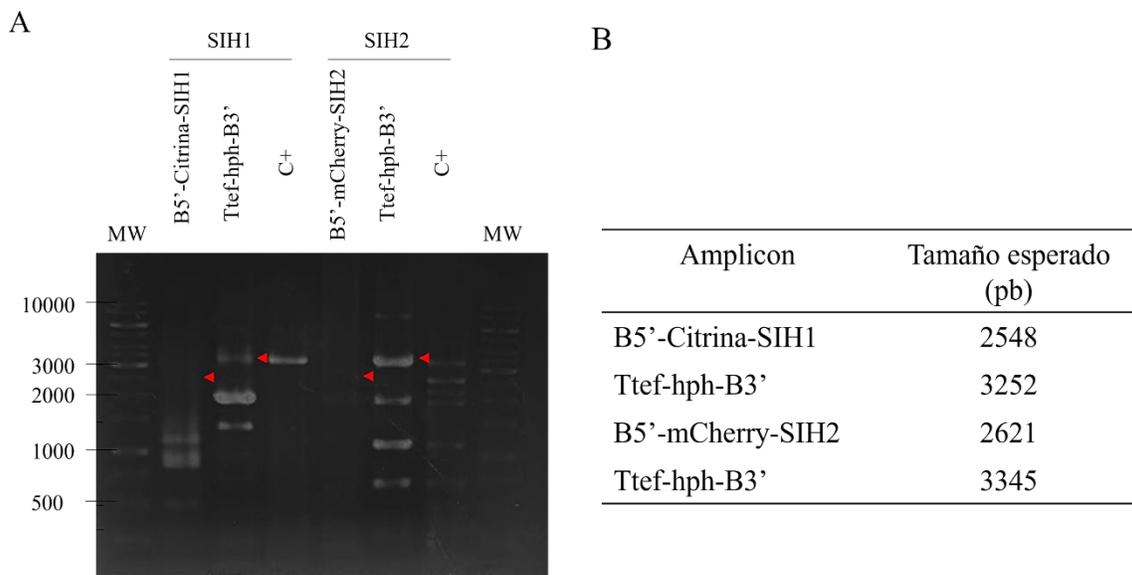
### 8.2.7 Ensamblado de los cassetes de SIH1 y SIH2 usando la técnica de “DJ-PCR”

Una vez que se obtuvieron todos los amplicones que conforman a los cassetes diseñados para la SIH1 y SIH2, se intentó ensamblarlos con el Kit de NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix NEB #E2621S/L/X, sin embargo, no obtuvimos ningún producto ensamblado, por lo que se procedió a utilizar la técnica de “DJ-PCR” (Yu *et al.*, 2004). El diseño inicial para el ensamblado de los 5 amplicones en una sola reacción fue utilizar una proporción 1:3:1 de acuerdo con el protocolo Yu y col. (2004), pero al tener 5 fragmentos la proporción de 3 se dividió entre tres de los amplicones del centro (PF, HFB y Ttef-hph). Finalmente, la proporción de estos fragmentos fue 1:1:1. Sin embargo, como se observa en la Figura 31 en este intento no se obtuvo el ensamblaje requerido (5800 pb para SIH1 y 5966 pb para SIH2), además de bandas inespecíficas. Por lo que se decidió realizar el ensamblado en dos partes, realizando una reacción “DJ-PCR” para unir el brazo 5’-PF-HFB y el Ttef-hph-brazo 3’

(Figura 33). En este ensamblaje solo se obtuvo la unión del Ttef-hph-brazo 3' de ambas hidrofobinas.

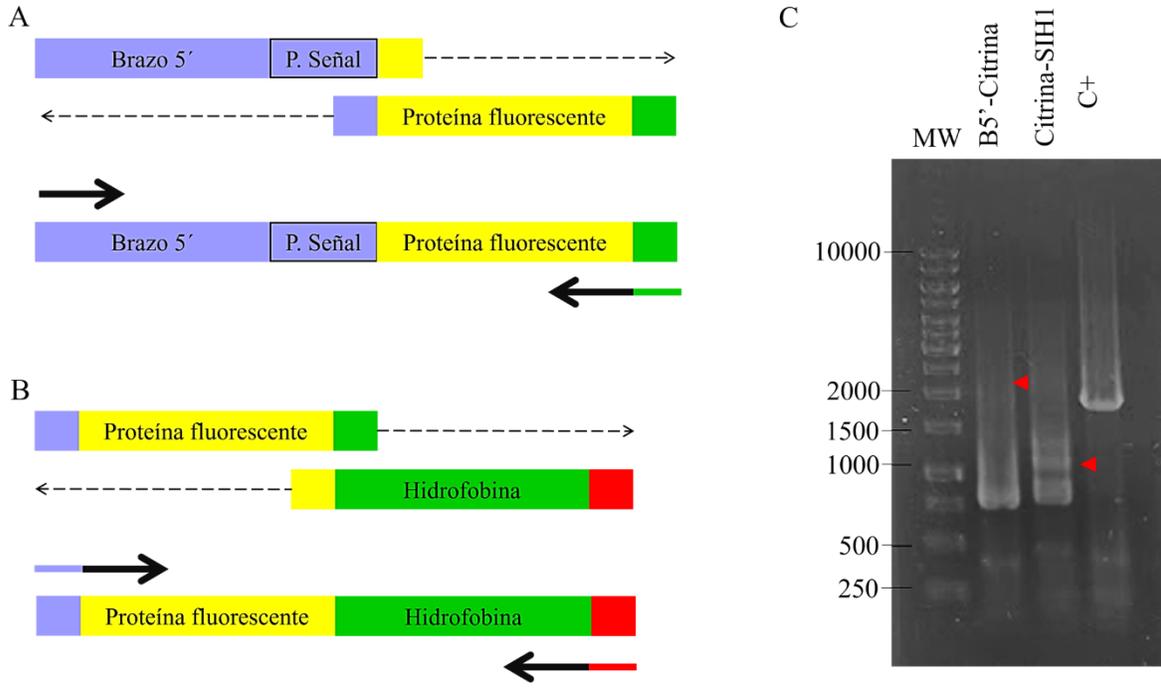


**Figura 32.** Ensamble de los cassettes quiméricos de la SIH1 y la SIH2 por medio de “DJ-PCR”. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermoscientific. Las flechas rojas indican dónde se espera observar bandas según la unión realizada.



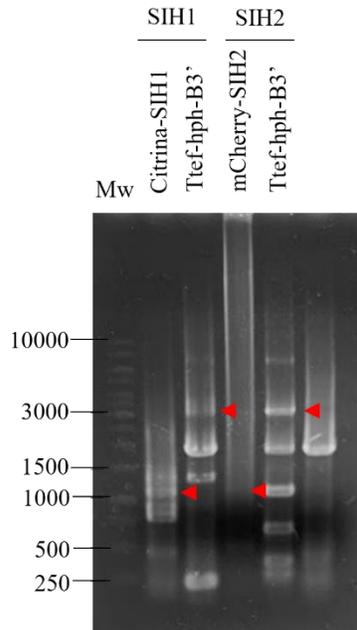
**Figura 33.** Amplicones obtenidos de la unión de fragmentos en dos partes (B5'-PF-HFB y Ttef-hph-B3'). A) Amplificaciones obtenidas, B) Tamaño esperado de los amplicones. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermoscientific. Las flechas rojas indican dónde se espera observar bandas según la unión realizada.

Una vez que se obtuvo la unión de Ttef-hph-B3' para ambas hidrofobinas se procedió al ensamblado de los otros fragmentos: B5'-PF y PF-HFB (Figura 34, A y B), para obtener amplicones de un tamaño similar. Esta prueba se realizó solamente con la SIH, esperando así un tamaño de 2121 pb para la unión del B5' y Citrina, y de 1187 pb para Citrina y SIH, la amplificación correcta sólo se obtuvo en la unión de Citrina-HFB (Figura 34 C). Entonces se procedió a trabajar con este mismo ensamble de la SIH2 (Figura 35), sin embargo, no se obtuvo la amplificación de mCherry-SIH2. Los tamaños esperados son: mCherry-SIH2 de 1200 pb y Ttef-hph-B3' de 3345 pb.



**Figura 34.** Ensamble de fragmentos de tamaño similar. A) Predicción de la unión de B5'-PF, B) Predicción de la unión de PF-HFB y C) amplicones obtenidos con los ensambles realizados. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de ThermoScientific. Las flechas rojas indican dónde se espera observar bandas según la unión realizada.

En la tabla 13 se muestra un resumen de todos los cambios realizados para generar los amplicones.



**Figura 35.** Amplicones de la unión de PF-HFB y Tef-B3' de SIH1 y SIH2. Gel de agarosa 1% en TAE 1X. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermo scientific. Las flechas rojas indican dónde se espera observar bandas según la unión realizada.

**Tabla 13.** Condiciones de la tercera ronda del “DJ-PCR” con las diferentes variantes probadas.

HFB	Unión de amplicones	Polimerasa	Modificación	Resultado
SIH1	Todos	VeriFi	60° C T <sub>m</sub> Proporción 1:1:1:1:1	-

			60° C T <sub>m</sub>		
			Proporción 1:2:3:1:1		-
			1.2 mM		
		Phusion	60° C T <sub>m</sub>		-
		Takara	50 ng por amplicon		-
	Brazo 5'-Citrina-SIH1	VeriFi	60 fmol	0.4 μM	-
			1:1:1	0.8 μM.	-
	Ttef-hph-Brazo 3'	VeriFi	60 fmol	0.4 μM	+
			1:1	0.8 μM.	++
	Brazo 5'-Citrina-SIH1	VeriFi	60 fmol		-
			1:3:1		
			0.8 μM		
	Brazo 5'-Citrina-SIH1	VeriFi	60 fmol	55°C T <sub>m</sub>	-
			1:3:1	58°C T <sub>m</sub>	-

			0.8 $\mu$ M	60°C T <sub>m</sub>	-
	Brazo 5'-Citrina	VeriFi	60 fmol 1:1 0.8 $\mu$ M		-
	Citrina-SIH1	VeriFi	60 fmol 1:1 0.8 $\mu$ M		+
	Citrina-SIH1	VeriFi	60 fmol 1:1 0.8 $\mu$ M	58°C T <sub>m</sub>	+
				60°C T <sub>m</sub>	++
				62°C T <sub>m</sub>	+
	SIH2	Todos	VeriFi	60° C T <sub>m</sub>	
Phusion			60° C T <sub>m</sub>		-
Takara			50 ng por amplicon		-
Brazo 5'-mCherry-SIH2		VeriFi	60 fmol 1:1:1	0.4 $\mu$ M 0.8 $\mu$ M.	- -

	Ttef-hph-Brazo 3'	VeriFi	60 fmol 1:1	0.4 $\mu$ M	+
				0.8 $\mu$ M.	++
	Brazo 5'-mCherry-SIH2	VeriFi	60 fmol 1:3:1 2 $\mu$ L		-
	Brazo 5'-mCherry-SIH2	VeriFi	60 fmol 1:3:1 0.8 $\mu$ M	55°C T <sub>m</sub>	-
				58°C T <sub>m</sub>	-
				60°C T <sub>m</sub>	-
	mCherry-SIH2	VeriFi	60 fmol 1:1 0.8 $\mu$ M		-

El signo “-“ indica que la amplificación no fue obtenida y los signos “+” indican la obtención de la amplificación (entre más signos la amplificación se obtuvo y fue específica)

Para la construcción de los cassettes se utilizaron DNAPolimerasas de alta fidelidad como la VeriFi Pol, dado que estas cometen pocos errores durante la polimerización de tal manera que se obtienen amplicones sin cambios de nucleótidos para evitar que los cassettes que se generen sean fieles a su origen y así evitar cambios en la secuencia de aminoácidos de nuestras proteínas de interés. Además, esta polimerasa fue diseñada también con otras características, como el funcionar pasando por ciclos de desnaturalización de hasta 100 °C

para optimizar la separación de fragmentos ricos en CG, lo cual se puede probar en trabajos posteriores (pasar de 98°C a 100°C), de manera que los amplicones ricos en CG se separen de una manera eficiente, mejorando la unión de la polimerasa y en consecuencia la amplificación de los fragmentos en el “DJ-PCR”, la que también ha sido propuesto por Sathyan y col. (2020). Por otro lado, también podemos modificar la temperatura de alineamiento en la tercera ronda del “DJ-PCR”, para mejorar la especificidad de los oligonucleótidos como se realizó con la amplificación de los templados iniciales.

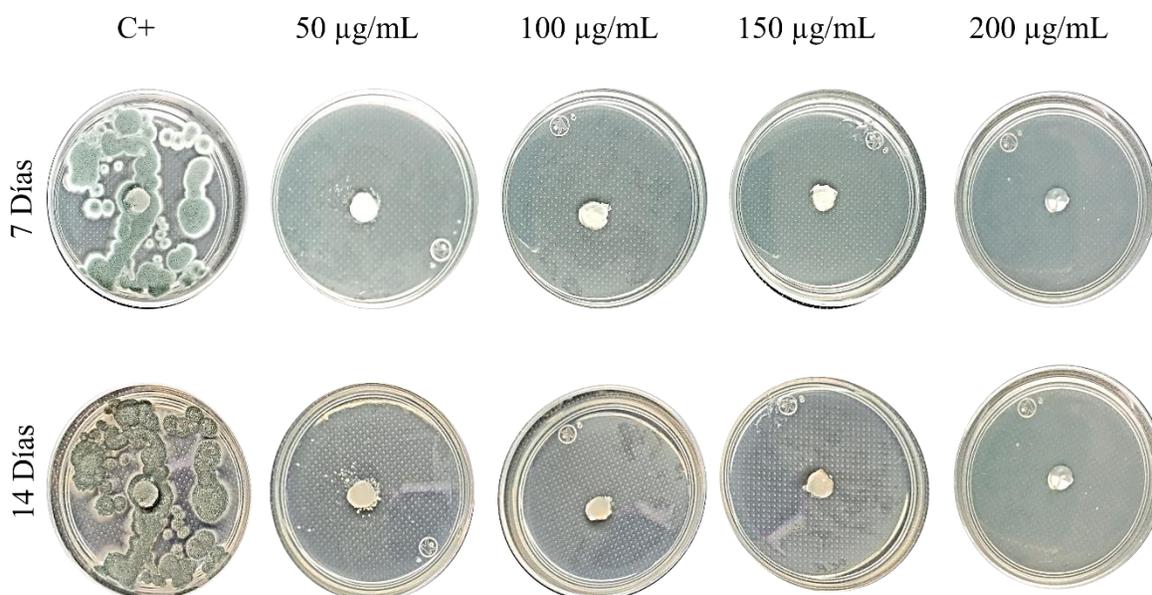
A pesar de que el “DJ-PCR” es una técnica muy usada para la generación de transformantes, e incluso en el laboratorio se han realizado trabajos con ellas, regularmente estos ensambles consideran 3 fragmentos con un tamaño similar (en algunos casos 4). En contraste nuestra construcción considera la unión de 5 fragmentos de tamaños que van desde las 400 pb hasta las 1890 pb aproximadamente, con un porcentaje de CG variable entre ellos, así como de los oligonucleótidos para su amplificación. Por lo que si las modificaciones en el cambio de las temperaturas de desnaturalización y alineamiento, la adición de “enhancers” (en la estandarización con la TaqPol), el cambio de la concentración de los oligonucleótidos en el “DJ-PCR” no funcionan, se buscará otra metodología para la generación de la construcción. Una estrategia sería construir el esqueleto de un plásmido con el terminador Ttef y el gen hph para luego insertar los siguientes fragmentos, para finalmente obtener la construcción requerida y transformarlo en *A. sydowii*.

### **8.3 Estandarización de los parámetros para la transformación de *A. sydowii***

#### **8.3.1 Curva de resistencia a higromicina**

Para determinar la concentración de higromicina requerida para seleccionar a las clonas que se transformarán con las construcciones, se determinó la curva de tolerancia de *A. sydowii* a este antibiótico. Esta se realizó al inocular al hongo en PDA suplementado con 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL y 200 µg/mL de higromicina y se observó su crecimiento a los 7 días y 14 días, teniendo como control positivo un cultivo sin antibiótico. Se observó que el crecimiento de *A. sydowii* se inhibe a partir de suplementar al medio con 100 µg/mL de

higromicina (Figura 36). Por lo que se utilizará esta concentración de higromicina para la selección de las transformantes una vez que se obtengan los cassettes.



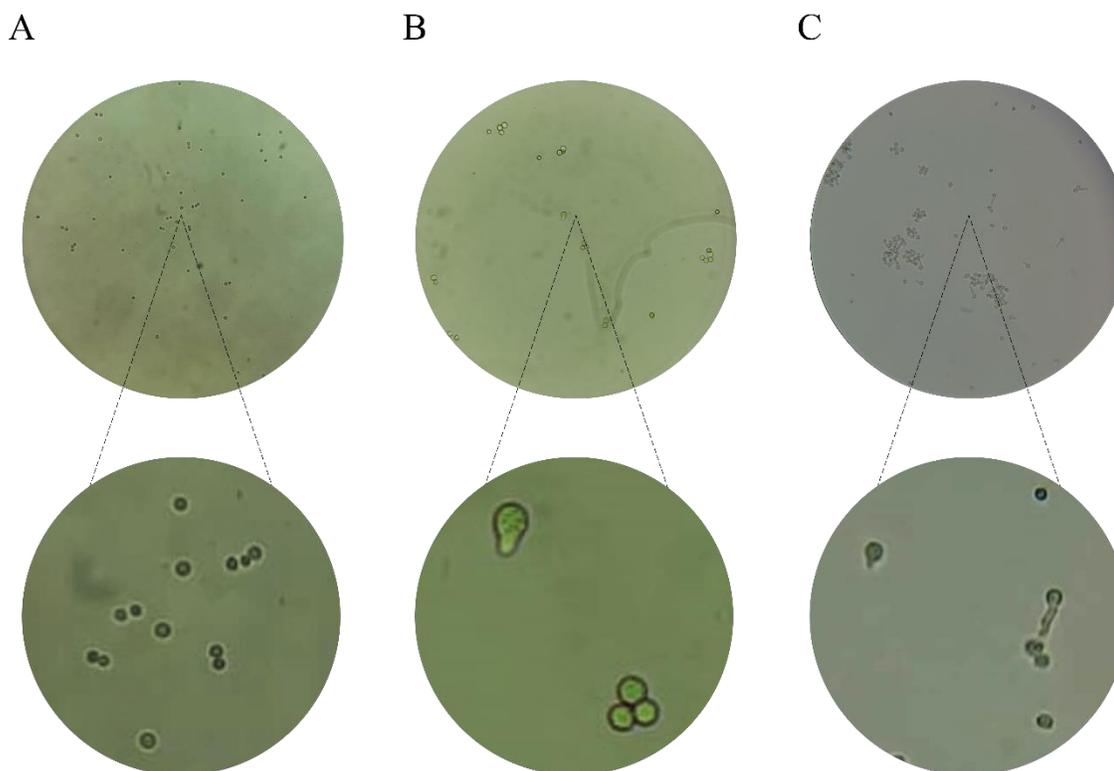
**Figura 36.** Tolerancia de *A. sydowii* a higromicina. Cultivo de *A. sydowii* en A) PDA sin higromicina (C+), PDA suplementado con 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL y 200 µg/mL de higromicina, incubado por 7 y 14 días a 28°C.

### 8.3.2 Tiempo de la germinación de las esporas de *A. sydowii*

Dado que en el laboratorio aún no se ha transformado a *A. sydowii*, se decidió determinar el tiempo de germinación de las esporas para obtener las germínulas que se usarán para transformar al hongo. Se realizó un ensayo en el cual se tomaron  $14.5 \times 10^6$  esporas obtenidas de un cultivo fresco de *A. sydowii* en medio PDA. Éstas se inocularon en 50 mL de PDB y se incubaron a 28 °C y se tomaron muestras a las 12, 14 y 16 horas que se observaron en el microscopio para identificar la presencia del mayor número de germínulas.

A las 12 horas de incubación en una muestra de 10 µL, se observó una espora y 8 germínulas, y la mayor parte eran hifas con poco desarrollo temprano (42 esporas germinadas). A partir de las 14 horas, únicamente se observaron hifas con poco desarrollo; con esta primera observación se decidió observar el desarrollo de las esporas a las 6, 8 y 10 horas. A las 6 horas solamente observamos la presencia de esporas y a partir de las 8 horas se observó la

presencia de 2 germínulas, mientras que a las 10 horas se observó el mayor número de germínulas (Figura 37). Por lo tanto, se determinó que el mejor tiempo para realizar la transformación del hongo es a las 10 horas de incubación.



**Figura 37.** Cinética de germinación de las esporas de *A. sydowii* cultivadas en PDB en los tiempos de incubación de: A) 6 horas, B) 8 horas y C) 10 horas, con su acercamiento respectivo.

## 9 Conclusiones

- Se determinó que la concentración adecuada para la tinción de la pared celular de *A. sydowii* fue con 2% de calcoflúor en una proporción 2:1 de Calcoflúor:KOH 10%.
- No obtuvimos las condiciones adecuadas para la tinción de núcleos con DAPI debido a que los pretratamientos (calor o agentes desnaturizantes) podrían afectar la localización de las hidrofobinas una vez obtenidas las líneas transformadas del hongo.
- Se estandarizó el microcultivo de *A. sydowii*, en el que las esporas son el mejor pre-inóculo.

- El estrés hipo osmótico (0 M de NaCl) e hiperosmótico (2 M de NaCl) ocasionan diferencias macro- y micro- morfológicas en *A. sydowii*, como:
  - La compactación de las perlas miceliares
  - Reducción de tamaño, ancho, número de septos y ramificaciones de las hifas.
  - Perlas miceliares de menor tamaño cultivadas en medio líquido
  - Diferencia en el tiempo de crecimiento, ya que es necesario un mayor número de días en las condiciones estresante para alcanzar el diámetro promedio entre éstas
- Se diseñaron los oligonucleótidos quiméricos para las secuencias tanto de las hidrofobinas (SIH1, SIH2 y SIH4), sus brazos flanqueantes 5' y 3', así como de las proteínas fluorescentes (citrina, mCherry y mCerulean) y de los Ttef-hph para cada hidrofobina.
- Se obtuvieron los amplicones: Ttef- hph de SIH1, Ttef-hph de SIH2, SIH2, citrina y mCherry, con los oligonucleótidos previamente mencionados.
- Se mejoró la amplificación específica de los brazos 5' y 3' de las hidrofobinas SIH1 y SIH2, y de la SIH1, modificando la  $T_m$  y usando a la Taq polimerasa, posteriormente se amplificaron con la “VeriFi Polymerase”, que es una polimerasa de alta fidelidad.
- Se obtuvo la unión de los fragmentos de Citrina-SIH1 y Ttef-hph-A3' de la hidrofobina SIH1, mientras que para SIH2 solamente se obtuvo la unión de Ttef-hph-A3'.
- Se determinó que 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina inhibe el crecimiento de *A. sydowii*.
- Se estableció que a las 10 horas de incubación de las esporas se obtiene el mayor número de germínulas.

## 10 Perspectivas

- Se realizarán las tinciones con calcoflúor al 2% de *A. sydowii* en diferentes condiciones de crecimiento (0 M y 2 M de NaCl) y en condiciones de choque osmótico.

- Se realizarán las amplificaciones de las secuencias que formarán la construcción de la SIH4 marcada con mCerulean y se purificarán a partir de banda.
- Se rediseñará la metodología para la generación de las construcciones, una de las propuestas es el construir el esqueleto de un plásmido con el terminador Ttef y el gen hph para luego insertar los siguientes fragmentos.
- Se realizará la transformación de las germínulas de *A. sydowii* con las construcciones que se obtengan utilizando un rango de concentración de entre 3-5 µg.
- Se seleccionarán las colonias transformadas con 100 µg/mL de higromicina y posteriormente se harán tres pases monospóricos.
- Para verificar la presencia de las construcciones en los loci de las hidrofobinas se diseñarán oligonucleótidos que permitan la amplificación de la mitad de la proteína fluorescente a la mitad de la hidrofobina, posteriormente con estos se harán PCRs de colonia.

## 11 Referencias

- Alker, A. P., Smith, G. W. & Kim, K. (2001). Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *The Ecology and Etiology of Newly Emerging Marine Diseases*, 105-111. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-3284-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-017-3284-0_9)
- Alfaro- Gutiérrez, I. (2011). Cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en *rhizopus stolonifer* (ehrenb.:fr.) vuill. por efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales. [Tesis de maestría]. Instituto Politécnico Nacional. <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/9136/1/tesis.pdf>
- 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), e105893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105893>

- Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M. & Latgé, J. P. (2012). Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002700. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002700>
- Beltrán-Hernández, R. I., Lucho-Constantino, C. A., Vázquez-Rodríguez, G. A., Coronel-Olivares, C., González-Sandoval, M. D. R. & Lizárraga-Mendiola, L. (2016). Disponibilidad de metales tóxicos en suelos salino-sódicos tratados con lodos residuales y biosólidos. *PÄDI Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 3(6). <https://doi.org/10.29057/icbi.v3i6.566>
- Bonifaz, A., Ríos-Yuil, J. M., Arenas, R., Araiza, J., Fernández, R. A., Mercadillo-Pérez, P., & Ponce-Olivera, R. M. (2013). Comparison of direct microscopy, culture and Calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis. *Revista Iberoamericana De Micología*, 30(2), 109-111. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.07.001>
- Cai, F., Zhao, Z., Gao, R., Chen, P., Ding, M., Jiang, S., Fu, Z., Xu, P., Chenthamara, K., Shen, Q., Bayram Akcapinar, G. & Druzhinina, I. S. (2021). The pleiotropic functions of intracellular hydrophobins in aerial hyphae and fungal spores. *PLOS Genetics*, 17(11), e1009924. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009924>
- Coker, J. A. (2019). Recent advances in understanding extremophiles. *F1000Research*, 8, 1917. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20765.1>
- Cuevas-Velazquez, C. L., Velloso, T., Guadalupe, K., Schmidt, B., Yu, F., Moses, D., Brophy, J. A. N., Cosío-Acosta, D., Das, A., Wang, L., Jones, A. M., Covarrubias, A. A., Sukenik, S., & Dinneny, J. R. (2021). Intrinsically disordered protein biosensor tracks the physical-chemical effects of osmotic stress on cells. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25736-8>
- DasSarma, S. & Arora, P. (2002). Halophiles. *eLS*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000394>
- Fokina, O., Fenchel, A., Winandy, L., & Fischer, R. (2016). Immobilization of LCCC laccase from *Aspergillus nidulans* on hard surfaces via fungal hydrophobins. *Applied and*

<https://doi.org/10.1128/aem.01413-16>

Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F. & Covarrubias-Robles, A.. (2003). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46, 24-46.

Gehlot, P. & Singh, J. (2018). *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives (English Edition)* (1st ed. 2018). Springer.

González-Hernández J. & Peña, A. (2001). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44, 137-156.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S. and Plemenitaš, A. (2000), Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235-240. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00716.x>

Gunde-Cimerman, N., Ramos, J. & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113(11), 1231-1241.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>

Gunde-Cimerman, N., & Zalar, P. (2014). Extremely Halotolerant and Halophilic Fungi Inhabit Brine in Solar Salterns Around the Globe. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*  
<https://doaj.org/article/d77930308cf94952ab73963041622ae1>

Ide-Pérez, M. R., Fernández-López, M. G., Sánchez-Reyes, A., Leija, A., Batista-García, R. A., Folch-Mallol, J. L., & Del Rayo Sánchez-Carbente, M. (2020). Aromatic hydrocarbon removal by novel extremotolerant *Exophiala* and *Rhodotorula* Spp.

- from an oil polluted site in Mexico. *Journal of Fungi*, 6(3), 135.  
<https://doi.org/10.3390/jof6030135>
- Jiménez-Gómez, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Perlín, T., Mouriño-Pérez, R. R., Del Rayo Sánchez-Carbente, M., Folch-Mallol, J. L., Pérez-Llano, Y., Gunde-Cimerman, N., Del C Sánchez, N., & Batista-García, R. A. (2020). Haloadaptative responses of *Aspergillus sydowii* to extreme water deprivation: morphology, compatible solutes, and oxidative stress at NaCl saturation. *Journal of Fungi*, 6(4), 316.  
<https://doi.org/10.3390/jof6040316>
- Kunčič, M. K., Kogej, T., Drobne, D., & Gunde-Cimerman, N. (2010). Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 329-337. <https://doi.org/10.1128/aem.02318-09>
- Lin, J., Idnurm, A., & Lin, X. (2015). Morphology and its underlying genetic regulation impact the interaction between cryptococcus neoformans and its hosts. *Medical Mycology*, 53(5), 493-504. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv012>
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T. & Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 877-896. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.004>
- Liu, K., Ding, X., Rao, M. P. N., Zhang, B., Zhang, Y., Liu, F., Liu, B., Xiao, M., & Li, W. (2017). Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01789>

- Liu, D., Zhu, H., Chen, Y., Zheng, L., Chen, L. & Ma, A. (2018). Cloning and heterologous expression of a hydrophobin gene Ltr.hyd from the tiger milk mushroom *Lentinus tuber-regium* in yeast-like cells of *Tremella fuciformis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 32, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.12.003>
- Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A. & Ventosa, A. (2010). Halophiles 2010: Life in Saline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 6971-6981. <https://doi.org/10.1128/aem.01868-10>
- Meseguer-Soria, I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e Investigación*, 7(2), 13-17. <https://doi.org/10.15381/ci.v7i2.3363>
- Nausa, J. G. (2015). Cambios morfológicos e inhibición del crecimiento de *Candida albicans* en presencia de una solución de sulfato de zinc. *Nova*, 13(23), 9. <https://doi.org/10.22490/24629448.1370>
- Nodvig, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>
- Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valencia, R., Rojas, C. & Seeger, M. (2018). Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>
- Pennacchio, A., Cicatiello, P., Notomista, E., Giardina, P. & Piscitelli, A. (2018). New clues into the self-assembly of Vmh2, a basidiomycota class I hydrophobin. *Biological Chemistry*, 399(8), 895-901. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0124>
- 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., Batista-García, R. A. & Sánchez-Carbente, M. D. R. (2020). Stress Reshapes the

- Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells*, 9(3), 525.  
<https://doi.org/10.3390/cells9030525>
- Pérez-Llano, Y. (2017). “Análisis transcriptómico de la respuesta de *Aspergillus Caesiellus* a condiciones halófilas en fermentación lignocelulósica semi-sólida ” [Tesis de maestría]. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS.
- PlemenitaĀ, A., Lenassi, M., Konte, T., KejĀ¼ar, A., Zajc, J., GostinĀ• ar, C. & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00199>
- Poveda Ayala, K., y Calvache Perafán, Z. (2021). Conocimiento sobre la técnica de fijación de muestras anatomopatológicas por parte del personal que labora en una institución prestadora de servicios de salud Hospital San José. Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud - FUCS.
- Przylucka, A., Akcapinar, G. B., Bonazza, K., Mello-de-Sousa, T. M., Mach-Aigner, A. R., Lobanov, V., Grothe, H., Kubicek, C. P., Reimhult, E. & Druzhinina, I. S. (2017). Comparative physiochemical analysis of hydrophobins produced in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 913-923.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.058>
- Quarantin, A., Haderler, B., Kröger, C., Schäfer, W., Favaron, F., Sella, L. & Martínez-Rocha, A. L. (2019). Different Hydrophobins of *Fusarium graminearum* Are Involved in Hyphal Growth, Attachment, Water-Air Interface Penetration and Plant Infection. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00751>
- Ramírez D., N., Serrano R., J. A., & Sandoval T., H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56-71.
- Rodríguez-Pupo, E. (2021). “Estrategias moleculares del halófilo moderado *Aspergillus sydowii* como respuesta a condiciones hipo- e hipersalinas” [Tesis de doctorado,

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS]. RIAA UAEM.  
<http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/2000>

- 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., Sánchez, O., Aguirre, J., Batista-García, R. A., Folch-Mallol, J. L. & Sánchez-Carbente, M. D. R. (2021). Osmolyte Signatures for the Protection of *Aspergillus sydowii* Cells under Halophilic Conditions and Osmotic Shock. *Journal of Fungi*, 7(6), 414. <https://doi.org/10.3390/jof7060414>
- Romero-Romero, S., Velasco, D. A. F., & Costas, M. (2018). Estabilidad termodinámica de proteínas. *Educación Química*. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2018.3.64699>
- Salwan, R. & Sharma, V. (2020). *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. Elsevier Gezondheidszorg.
- Sathyan, K. M., Scott, T. G., & Guertin, M. J. (2020). ARF-AID: a rapidly inducible protein degradation system that preserves basal endogenous protein levels. *Current protocols in molecular biology*, 132(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.124>
- Schröder, C., Burkhardt, C. & Antranikian, G. (2020). What we learn from extremophiles. *ChemTexts*, 6(1). <https://doi.org/10.1007/s40828-020-0103-6>
- Stojković, D., Kovacevic-Grujicic, N., Reis, F. S., Davidović, S., Barros, L., Popović, J., Petrović, I., Zhao, Y., Glamočlija, J., Ćirić, A., Stevanovic, M., Ferreira, I. C., & Soković, M. (2017). Chemical composition of the mushroom *Meripilus giganteus* Karst. and bioactive properties of its methanolic extract. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 79, 454-462. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.045>
- Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T. & Linder, M. B. (2006). Behavior of *Trichoderma reesei* Hydrophobins in Solution: Interactions, Dynamics, and Multimer Formation. *Biochemistry*, 45(28), 8590-8598. <https://doi.org/10.1021/bi060620y>

- Thomas, C. (1992) Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. *Trends Biotechnol.* 10:343–348. doi:10.1016/0167-7799(92)90266-X
- The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis Kelley LA *et al.*, *Nature Protocols* 10, 845-858 (2015)
- Tognetti, S., Jiménez, J., Viganò, M., Duch, A., Queralt, E., De Nadal, E., & Posas, F. (2020). HOG1 activation delays mitotic exit via phosphorylation of NET1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(16), 8924-8933. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918308117>
- Torkkeli, M., Serimaa, R., Ikkala, O. & Linder, M. (2002). Aggregation and Self-Assembly of Hydrophobins from *Trichoderma reesei*: Low-Resolution Structural Models. *Biophysical Journal*, 83(4), 2240-2247. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)73984-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)73984-2)
- Turk, M., Montiel, V., Žigon, D., Plemenitaš, A. & Ramos, J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology*, 153(10), 3586-3592. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009563-0>
- Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
- Walker, L. A., Lenardon, M. D., Preechasuth, K., Munro, C. A., & Gow, N. A. R. (2013). Cell wall stress induces alternative fungal cytokinesis and septation strategies. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.118885>
- Wösten, H. A. B. & Scholtmeijer, K. (2015). Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1587-1597. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6319-x>
- Yuan, H., Du, Q., Sturm, M. B., & Schramm, V. L. (2015). Soapwort Saporin L3 Expression in Yeast, Mutagenesis, and RNA Substrate Specificity. *Biochemistry*, 54(29), 4565-4574. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00405>

Zajc, J., Liu, Y., Dai, W., Yang, Z., Hu, J., Gostinčar, C. & Gunde-Cimerman, N. (2013). Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-617>

## 12 Anexos

### 12.1 Secuencias utilizadas para el alineamiento

Las secuencias utilizadas para el alineamiento se obtuvieron de las bases de Interpro y NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). En la base de Interpro se obtuvieron las secuencias de las HFB con el PFAM PF01185, siendo así que la base de datos te marca el péptido señal (PS) el cual fue excluido para el alineamiento. Se usaron secuencias de 7 especies del género *Aspergillus*, de *P.chrysogenum* y de *W. ichthyophaga* (estas fueron proporcionadas por el equipo de trabajo y se buscaron en la base de datos NCBI, y posteriormente se ingresaron a la base de Interpro para la determinación del PS.

**Tabla 14.** Número de acceso de las secuencias utilizadas en el alineamiento.

Espece	Número de acceso	Base de datos
	A0A1L9WNJ5	Interpro
<i>A. acuelatus</i>	A0A1L9WU77	Interpro
	A0A1L9X6B6	Interpro
	A0A1L9U6P0	Interpro
<i>A. brasiliensis</i>	A0A1L9UB73	Interpro

	A0A1L9UFK5	Interpro
	A0A1L9ULG5	Interpro
	A0A1L9UW27	Interpro
	A0A1R3RAJ9	Interpro
<i>A. carbonarius</i>	A0A1R3RK09	Interpro
	A0A1R3RV04	Interpro
	A0A1M3T650	Interpro
	A0A1M3TGJ9	Interpro
<i>A. luchuensis</i>	A0A1M3TLY1	Interpro
	A0A1M3TUB2	Interpro
	XP_659441.1	NCBI
<i>A. nidulans</i>	XP_682072.1	NCBI
	A0A100IE90	Interpro
<i>A. niger</i>	A0A100IH94	Interpro

	A0A370BLE5	Interpro
	A0A370BNU4	Interpro
	A0A370BT06	Interpro
	A0A1L9PA33	Interpro
<i>A. versicolor</i>	A0A1L9PJQ4	Interpro
	A0A1L9PSB3	Interpro
	A0A1L9PZM8	Interpro
	A0A167QAX4	Interpro
<i>P. chrysogenum</i>	A0A167ULN8	Interpro
	A0A167W183	Interpro
	XP_009270358	NCBI
	XP_009270023	NCBI
<i>W. ichthyophaga</i>	XP_009270039	NCBI
	XP_009268395	NCBI

---

Las secuencias de *A. sydowii* utilizadas en el alineamiento son las siguientes:

- *A. sydowii*\_SIH1

IPNGPGYGASNNDYTSQQDIDQEQTITPQSCGKAQLSCCSEDKTTKVSPQASKDLL  
NLLGNDALDGLLGNYKGCAPLVDADVLNIPPELLKQGQCNNNFACCNQNDSGDIN  
QQGLVNAAIPCIPVKVL

- *A. sydowii*\_SIH2

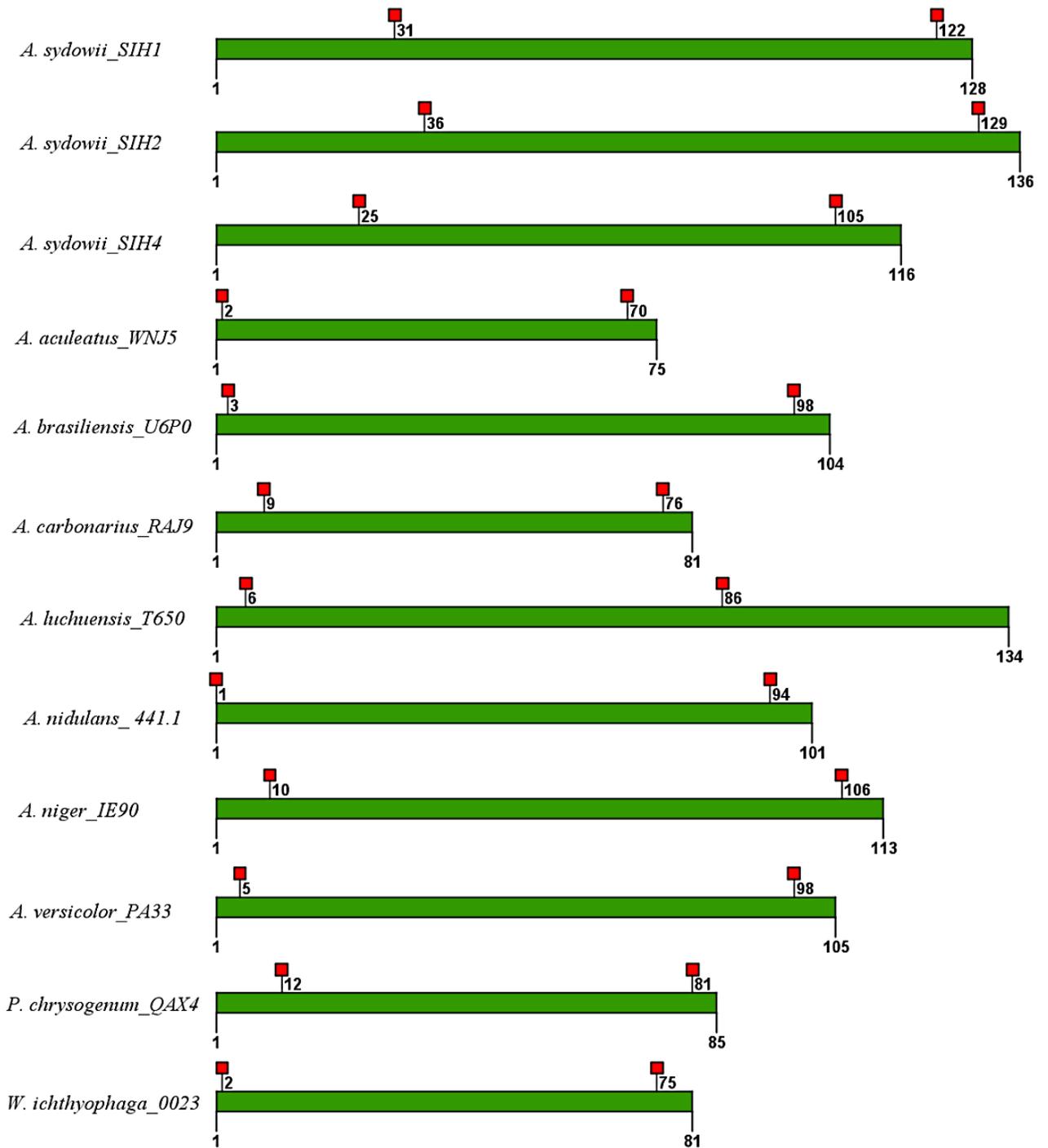
APPGQASGNGVGNTGNSNVRFPVSQDTTVEQASTKCGDQAQLSCCNEVTYAGDT  
TTEQQGVLGALSGLLGQGSSEGLGLFKGCSKLNVAALIGVQDLINKNCQQNIA  
CCQNSPSEANGDLIGVGLPCVALGSL

- *A. sydowii*\_SIH4

MPSSEQAPKISQKSLKKIEETQGKCGDANVNCCVKAETEETQEYDGLAGILKNLL  
APDTDAFCTQASSQGTALNLLPNLIGGNKDHICNQQSVTYVCCAGGECYLPEETE  
EAEE

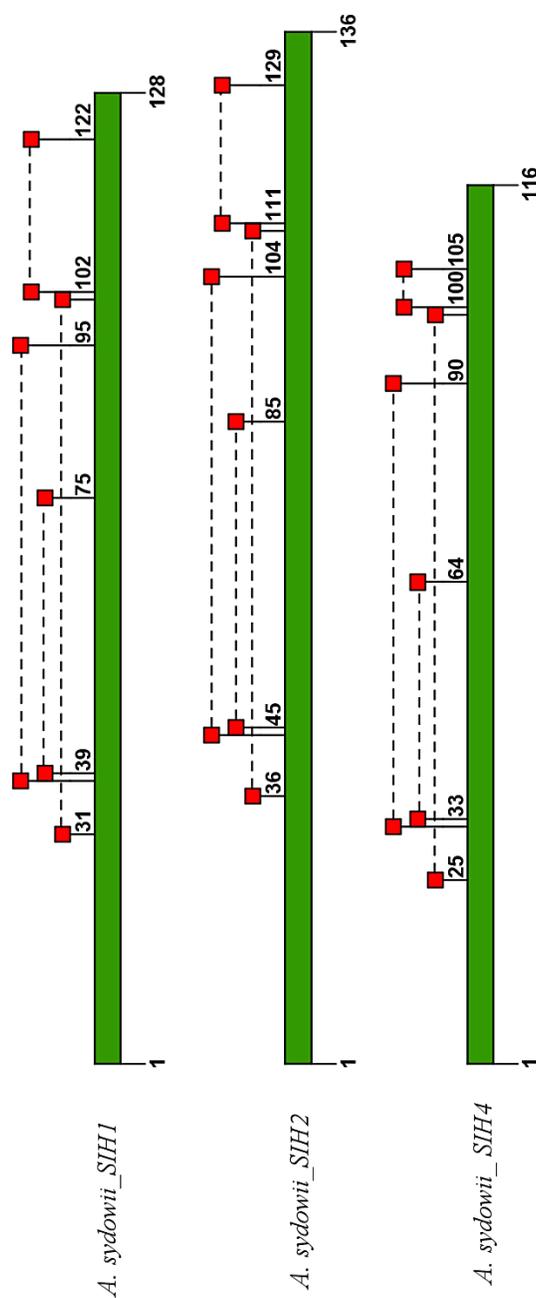
## 12.2 Alineamiento visual de HFBS

A partir del alineamiento de las 34 secuencias de HFBS usando ClustalW de MEGA X (Figura 19), se realizó también la representación visual (Figura 38) de las tres hidrofobinas de *A. sydowii* y una de cada especie usada en el alineamiento, con el objetivo de proporcionar un recurso sobre la diferencia entre el número de aa previos a la primera Cys (Cuadro rojo) y el número de aa posteriores a la última Cys.



**Figura 38.** Representación visual del alineamiento de las HFBs usadas en el alineamiento. Los cuatro caracteres posteriores al “\_” son pertenecientes al número de acceso de la secuencia. Los cuadros rojos indican la posición de la primera y última Cys.

### 12.3 Puentes disulfuro formados con los 8 residuos de Cys en las hidrofobinas de *A. sydowii*



**Figura 39.** Puentes disulfuro formados por los 8 residuos de Cys en la HFB de *A. sydowii*. Los cuadros rojos indican la posición de las Cys y las líneas punteadas el puente disulfuro formado entre ellas.

## 12.4 Condiciones de PCR

**Tabla 15.** Condiciones finales PCR para la amplificación de los fragmentos.

Paso		Temperatura (°C)		Tiempo	
Desnaturalización inicial		94		5'	
35 Ciclos	Desnaturalización	94		15''	
	Alineamiento	60.8	mCherry	15''	
		60	SIH1		
			SIH2		
			Brazos 5' y 3' de SIH2		
58	Citrina	Brazos 5' y 3' de SIH1			
55	Ttef-hph				
Extensión	72		Brazos 5' y 3'	1'	

			Ttef-hph	1'
			PF	25''
			HFB	25''
Extensión final		72	5'	

**Tabla 16.** Condiciones de la segunda ronda del “DJ-PCR”.

Paso		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		94	5'
15 Ciclos	Desnaturalización	94	30''
	Alineamiento	58	10''
	Extensión	72	5.2'
Extensión final		71	10'

**Tabla 17.** Condiciones de la tercera ronda del “DJ-PCR”.

Paso		Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial		94	2'	
35 Ciclos	Desnaturalización	94	15''	
	Alineamiento	58	26''	
	Extensión	72	Todos	3'
			B5'-PF-HFB	2'
			Ttef-hph-A3'	2'
PF-HFB			40''	
Extensión final		72	5'	

**Tabla 18.** Condiciones de la segunda ronda del “DJ-PCR” con el cambio de relaciones molares (1:2:3:1:1) de los fragmentos.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5'

7 Ciclos	Desnaturalización	94	30''
	Alineamiento	60	2'
	Extensión	72	5'
Extensión final		71	10'

**Tabla 19.** Condiciones de la tercera ronda del “DJ-PCR” ” con el cambio de relaciones molares (1:2:3:1:1) de los fragmentos.

Paso		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		94	2'
35 Ciclos	Desnaturalización	94	15''
	Alineamiento	60	26''
	Extensión	72	5'
Extensión final		72	5'

## 12.5 Protocolos de microcultivos

Materiales:

- 70 ml de PDA \*
- 70 ml de medio PDB \* (protocolo 2)
- Cajas de Petri de vidrio de 100 mm x 15mm
- Caja Petri desechable de 100 mm x 15mm
- Puntas Azules
- Pipetas de 1000  $\mu$ L
- Filtro "Cell Strainer" (40  $\mu$ m)
- Bisturi
- Pinzas planas para microscopio
- Algodón
- Rectángulos de 8 cm de largo por 3.5 de ancho (aproximadamente) de papel filtro (20 a 25  $\mu$ m)
- Palillos de madera o varilla de vidrio
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Cultivo fresco del hongo
- Papel aluminio
- Vaso precipitado de 50 ml (protocolo 2)

Soluciones:

- 50 mL de Agua destilada\*

\* los medios PDA y PDB, junto con la solución de Agua destilada pueden ser suplementadas con algún soluto (Ej. NaCl) manteniendo la misma concentración en los medios y la solución.

Preparación de la cámara de incubación

La cámara de incubación consta de una caja Petri de 100 x 15 mm de vidrio, en su interior se coloca una base de papel filtro, sobre la base se monta un soporte de varilla de vidrio (o palillos), que servirán para colocar el portaobjetos y los cubreobjetos, a manera de que no

toquen el filtro, y se incorpora una torunda seca y pequeña de algodón en la orilla de la caja. Una vez armadas, estas cajas se envuelven en papel aluminio y se esterilizan en la autoclave y se dejan secar en el horno por 4 días aproximadamente (ver Figura 8).

#### **12.5.1 Protocolo de microcultivo a partir de porción de micelio joven**

- Colocar en las cámaras de incubación descritas anteriormente, cuadros de aproximadamente un 1cm x 1cm de medio PDA con micelio joven (la parte exterior de la colonia) el cual debió ser cultivado previamente. De manera que en cada extremo del portaobjetos este una porción de micelio.
- Posteriormente con las pinzas se coloca el cubreobjetos sobre un cuadro de PDA con micelio y se presiona un poco.
- Una vez colocado el cubreobjetos, se adicionan 2 mL de agua destilada (o solución salina) al papel filtro y a la torunda de algodón. Y finalmente se cierra la cámara de incubación y envuelve en el papel de aluminio (este no debe ser sacado de la cámara de flujo laminar para no perder la esterilidad)
- Incubar a 28 °C por cuadro días verificando la humedad cada 24 horas.

Notas:

- Este protocolo se recomienda para la estandarización de tinciones u observación de estructuras, sin embargo, el campo visual suele estar saturado por lo que se recomienda observar en las orillas del microcultivo.
- Para la optimización del trabajo se recomienda no sacar la caja del aluminio, solamente desdoblar para poder manipular y volver a cerrar cuando sea necesario, para evitar el uso de espacio innecesario dentro de la campana.

#### **12.5.2 Protocolo de microcultivos a partir de perla de micelio**

- Previamente al microcultivo se debe cultivar el pre-inóculo (perla de micelio). Por lo que se inocula en 28 ml de medio PDB en un matraz de 50 ml al hongo. El inóculo se tomará a partir de un precultivocultivo fresco usando una punta de micropipeta de

0.5 Mm de diámetro, incubándolo a 28°C a 180 rpm los días necesarios para que la perla de micelio tenga aproximadamente 2 Mm de diámetro.

- Los días de incubación pueden cambiar según la velocidad de crecimiento del hongo por lo que se recomienda primero caracterizar el crecimiento. Si la morfología de crecimiento es diferente a una perla de micelio, sólo dejar crecer lo suficiente para tomar lo que quepa en el ojo del asa.
- Una vez que el cultivo en medio líquido haya crecido se filtra con “Cell Strainer” (40 µm), colocando un vaso de precipitado abajo del filtro para recolectar el medio PDB, mientras que el micelio se queda en el filtro.
- Una vez filtradas las perlas de micelio, se recomienda colocarlas en cajas Petri estériles vacías para cubrirlas y así evitar contaminación, en lo que se realizan los siguientes pasos.
- Una vez filtradas las perlas de micelio, se colocan con la ayuda de un asa de siembra una perla de micelio en los cuadros de 1 cm x 1cm de medio PDA sin microorganismos (estéril), previamente hechos en una caja Petri y cortados con el bisturí, los cuales se colocan en los extremos del portaobjetos de la cámara de incubación.
- Posteriormente se coloca con las pinzas el cubreobjetos y se presiona un poco.
- Una vez colocado el cubreobjetos, se adicionan 2 mL de agua destilada (o solución salina) al papel filtro y a la torunda de algodón. Y finalmente se cierra la cámara de incubación y se envuelve en el papel de aluminio.
- Incubar a 28 °C por dos días verificando la humedad cada 24 horas.

Nota:

- Este protocolo a partir de la perla de micelio permite la obtención de campos visuales menos saturados, pero sin la identificación específica del inicio de la hifa, sin embargo, para la observación de estructuras es recomendable el uso de este protocolo.

### 12.5.3 Protocolo de microcultivos a partir de espora con porción de micelio

- Se realiza el levantamiento de esporas a partir de un precultivocultivo fresco usando PBS 1 X con TWEEN al 0.1%, con un asa triangular de vidrio. Se realizan diluciones seriadas para contar las esporas en la cámara de Neubauer, para poder realizar una dilución en la que haya 10 esporas en 10  $\mu$ L.
- Una vez realizada la dilución, se cortan y colocan en los cuadros de 1 cm x 1cm de medio PDA sin microorganismos (estéril), previamente hechos en una caja Petri y cortados con el bisturí, los cuales se colocan en los extremos del portaobjetos de la cámara de incubación.
- Una vez colocados los cuadros de medio PDA, se colocan 10  $\mu$ L de la dilución en cada cuadro de medio, se recomienda colocarlo en la orilla de cada cuadro y no en el centro.
- Posteriormente se coloca con las pinzas el cubreobjetos y se presiona un poco.
- Una vez colocado el cubreobjetos, se adicionan 2 mL de agua destilada (o solución salina) al papel filtro y a la torunda de algodón. Y finalmente se cierra la cámara de incubación y se envuelve en el papel de aluminio (este no debe ser sacado de la cámara de flujo laminar para no perder la esterilidad)
- Incubar a 28 °C por dos días verificando la humedad cada 24 horas.

#### Notas:

- La recomendación de colocar a las esporas en la orilla, esto porque si son colocadas en el centro del cuadro de medio existe la posibilidad de que al retirar el cubreobjetos para observar se puede romper la hifa, ocasionando que la identificación del inicio de la hifa (espora germinada) se pierda.
- Este protocolo tiene como ventaja la identificación del inicio de la hifa y la obtención de campos visuales con menor saturación, por lo que es recomendable si se desea realizar un seguimiento del crecimiento y desarrollo de estructuras.

#### **12.5.4 Protocolo de microcultivos a partir de espora con el cubreobjetos cubierto de PDA.**

- Primeramente, se debe realizar el recubrimiento del cubreobjetos con PDA, por lo cual este debe estar en estado líquido. Con la ayuda de unas pinzas se toma el cubreobjetos y lentamente se introduce en el PDA líquido.
- Una vez que el cubreobjetos este recubierto de PDA, se deja solidificar dentro de la cámara de incubación, colocándolo sobre el portaobjetos (colocar solo la mitad del cubreobjetos sobre el portaobjetos. Se recomienda en este momento adicionar el agua o la solución salina, para evitar la deshidratación del medio.
- Una vez listas las cámaras de incubación, se realiza el levantamiento de esporas a partir de un precultivocultivo fresco usando PBS 1 X con TWEEN al 0.1%, con un asa triangular de vidrio. Se realizan diluciones seriadas para contar las esporas en la cámara de Neubauer, para poder realizar una dilución en la que haya 10 esporas en 10  $\mu$ L.
- Teniendo la dilución correcta, se procede a colocar 10  $\mu$ L de esta en los cubreobjetos recubiertos de PDA. Estos se dejarán así, para la oxigenación de las esporas.
- Finalmente se cierra la cámara de incubación y se envuelve en el papel de aluminio (este no debe ser sacado de la cámara de flujo laminar para no perder la esterilidad)
- Incubar a 28 °C por dos días verificando la humedad cada 24 horas.

#### Notas:

- El PDA para recubrir se debe encontrar en estado líquido, como se mencionó anteriormente, por lo que se recomienda usarlo al volver a calentarlo o recién salido de la autoclave, ya que entre más líquido se encuentre menor es la posibilidad de la formación de grandes burbujas.
- Se recomienda de una a dos recubrimientos del cubreobjetos con PDA.
- Si llegara a haber la formación de burbujas, con la ayuda de las pinzas girar el cubreobjetos dentro del PDA líquido o volverlo a sumergir, para quitarlas.
- Los 10  $\mu$ L pueden ser dejados en gota o ser esparcidos con la ayuda de un asa de siembra de manera de que no se desprenda el recubrimiento de PDA.

- Este procedimiento se puede realizar de igual manera cubriendo el cubreobjetos, dando una mayor área para el crecimiento de las hifas, pero teniendo como consecuencia de que al buscar las esporas (cuando se desean observar su germinación) sea más tardado obteniendo la deshidratación del medio y la formación de cristales en el caso del PDA suplementado con NaCl.
- Al realizar la observación, solamente con la ayuda de las pinzas levantar el cubreobjetos y colocarlo en un portaobjetos volteado, limpiando el lado contrario del que se colocaron las esporas.

#### **12.5.5 Votos aprobatorios**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Mor., 19 de abril del 2024

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**

P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. Castrejón Nogueroñ Libni Anajared**, con el título del trabajo: **Estandarización de microcultivos de *Aspergillus sydowii* para la localización de hidrofobinas fusionadas con proteínas fluorescentes**. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

PRESIDENTE: DRA. ROSA ESTELA QIRÓZ CASTAÑEDA

SECRETARIO: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

VOCAL: DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE

SUPLENTE: DR. EDGAR BALCAZAR LÓPEZ

SUPLENTE: DRA. LUCIA PEREZGÁSGA CISCOMANI

**FIRMA**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Unidad Biomédica,  
Tel. (777) 329 7047, 329 7000, Ext. 3527 / titulaciones.biologia@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



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

**EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ | Fecha:2024-04-19 10:23:01 | FIRMANTE**

xm9uYfJmqTRKTSUXe2fv1cD+F3fjHKeUIE768a7KAIZuuE/laKR0qB1JcnBRCa1lu0Xi4I2o6btmLLbnyGxUtYtN3nmLrKjKyda9oM5UvV9cu9NULJmUTJ1c2a1A8ey+asDpZQVSG99z1qgJpl9ILBmw/yNegEOJ9FgG1gaYrd1bAt9oiolUCPESw4KXAbLP18idS8eUFH1rHrHckwdObj8xB7MkP/tdAQcW4ZtX0sgfwlfbB4oU49ltQHJF9isHzYQl2im1ih3vd/Xav3bQQnNArGIUmLyKSh4UHKWZRfbNVBzrPNllMrLn1bGDwUFYifjE7x0TjtsfDQUo4ag==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2024-04-19 11:31:16 | FIRMANTE**

E0lcBc4d4nDJJ3XatLSI4fLYIEWuNE6swp8oLD/pgw4c26cBhQI9XEU1Wp3VGnHTvAhpsr3MKUFOVj8jBAUM7Z7cm83vNrQx2FymovpuDSCsiqO4Adet7QhC/lc9RVItUkU0T/1liw dhTXP2LBSHeqvfa48I5KBbvsfJrRj0lo+vArmD3t9gb9CHTCY+XeE5hDyGoYksl7JCGiE0PB+Hlmo0W0Q0M1E6MFqql3CeYxJ76nL8bg4AuBts6zHp37W9HmcBJnurYppXoO8jUit 0mdD4DUcNcctGamYmflRMDmQ7AUJoiOQk+x46etgzuVvK3TR5ub/BKRLLMqnKQwLA==

**LUCÍA PEREZGASGA CISCOMANI | Fecha:2024-04-19 14:27:37 | FIRMANTE**

NMFFXFC2ROCSX+YTyfBWd1mVE0NaRMOfX9bZQDzTihMIXvX2ZZBLFymPXurQpegGZFnF4+rLGGjl4WrTAWWbDwZ4zQTR3cp8zzFr7/GLibMwYVbcXii0YetsezmdJd9S6hdJ3Lbbe87o5kzJmmBhKRb5WjR9hHyE3FwpCr3BllhJJCpeikKDYQlytssp/ZK1q6rdqUnyV/a+2Fxyg473wODOLfa+XBUDl+5s+wQKqS+DSrisekRh1ficm2y2FYaTh+qYpcE/r09XF7+Y9kiEtv+KlxoWMC9S9yPgJJ7longzcBLiOjowFDCfmdVPQEekg/tlNrdDirTTqeLIGf+Q==

**JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2024-04-19 20:28:42 | FIRMANTE**

GxN+C95pDO9FzLo0ljsldtrbJ+Oeq8CRaJCyxE8nK0iYMNmJae/MaT7J+XUboK8ISI5CWFponoYuR2qN7Ed/u6U15Ygr7tnAkdCyxEpWPpdkAQfA6Y7H/RRyPOxaOH8cW0VvfdlGvir2e3adT056iVfIsRavk+X0AUGmp7Wt9bZY+cUNSCZpS023bFV5+jVJPJ1WytpQeaG1VLF5pkuvbYikDOHnMkj92w/grCDKHulR1z6Wcxbo7mSfCE9BmBLbrDI4fmDel900D35dVQoPKBxFULLxGvie7fM/383La/nM2ikMjW0KleNGXYGqjCndqyOHPzWjHk9fy4PqYcCg==

**ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA | Fecha:2024-04-20 14:10:56 | FIRMANTE**

ckF6KluisN7Xo2eBu1QYj5pil4n9GvkMC3vRoW3SJR+s4CnN5tYoWjg1yL6R+sdv+g8diZleu92XuFmHZLPU5DNAUEqGnU8suXTuFpnNf83lqgZrNSfCVjwDeAILLiwPo4IQFDW1VDxvmXvs1+ZhaxOWe470+seA9Bc0qw6raZRQ/paQIKWd53PI+G+Bfne3+ZF1mkDHLv2wUqjKtpkloaXNaqx9cgfJLkrHBWBvwKNYWP9iKQE4ISF2mYThyLdawSngAb9GhkaVd fFQ6Qm8Jl17IHAF8vdkPWbfbY8Bwzo/H0Lv4/TOIDObJvzn5pn+6cuDFrRwJYazERB6xGGA==

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



VCyUSQ4qg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nXleeFDV0RWmCwulePXSrKiEIPWRo2Fo>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029