



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Generación de construcciones para la obtención de líneas mutantes de  
hidrofobinas en el halófilo *Aspergillus sydowii***

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G O**

PRESENTA:

Mario Emiliano Martínez Flores

**DIRECTORA**

DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2023.

## **Agradecimientos**

A mi tutora la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente, por aceptarme como su alumno en el laboratorio de biología molecular de hongos. Por enseñarme el valor de la responsabilidad, por los consejos y los comentarios acertados en momentos necesarios. Por permitirme haber realizado este proyecto tan hermoso. Marcando un antes y un después en mi vida y mi forma de verla.

Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol por permitirme trabajar en su laboratorio y su calidez humana que me incentivo a seguir mejorando desde que tome su curso de biología molecular.

A mis compañeros de laboratorio. A Jesús, Amairani, Karlita, Fernando. A Omar Jasiel Quintero García y al maestro en Biotecnología Martín. Y a mi amiga Gabriela Gutiérrez, por los consejos, por la ayuda incondicional y por haber sido un apoyo moral en los momentos difíciles. Que sin ellos no hubiera llegado hasta este punto.

A Naomi Valencia, mi amor gracias, por ser mi apoyo moral desde el comienzo, por creer en mí, y por tus palabras de aliento en las malas y en las peores.

A mi madre, por ser mi pilar de apoyo desde siempre, por ser mi primera maestra, por sus consejos y enseñarme desde pequeño que soy capaz de lograr lo que me proponga. Y a mi padre, por interesarse en mi trabajo, brindándome apoyo moral.

A mi abuela Leonarda Jaimes Catalán que, a pesar de ya no estar presente, llevo sus consejos conmigo todos los días. Siendo este logro más suyo que mío.

A mí, por no rendirme, a pesar de las circunstancias adversas, por creer en mí. Y siempre soñar despierto.

Este proyecto se desarrolló bajo el apoyo económico proveniente de FORDECYT-PRONACES/263954/2020 y 252952.

## Resumen

Las hidrofobinas son proteínas de bajo peso molecular (5-20 kDa), son anfipáticas y tienen diversas aplicaciones en el campo de la biotecnología. Estas proteínas son producidas por hongos filamentosos y tienen diversas funciones en el ciclo de vida de estos, como la reducción de la tensión superficial del agua, permitiendo el crecimiento de las hifas en el aire. Las hidrofobinas recubren la pared celular de los hongos, este recubrimiento les proporciona resistencia ante la humedad y los protege de la desecación. Gracias a su propiedad anfipática se favorece la dispersión de las esporas por el aire, y la facilitación de su adherencia a superficies hidrofóbicas. Estas proteínas también se han involucrado en la patogenicidad de hongos como *Aspergillus fumigatus*, un patógeno de humanos, en el cual se ha encontrado que la hidrofobina *rodA*, al recubrir la superficie de los conidios, impide su detección por el sistema inmune. En muchos casos, su función se ha comprendido a través de la generación de mutantes como en el caso de la delección de dos genes de hidrofobinas: *Fghyd2* y *Fghyd3* de *Fusarium graminearum*, un patógeno de plantas, disminuye la adhesión del hongo a superficies hidrofóbicas, una reducción en la capacidad de las hifas para romper la tensión superficial del agua y disminuye su capacidad para infectar a las espigas de trigo.

Recientemente, se ha sugerido que las hidrofobinas son indispensables para contender contra la hipersalinidad en el hongo *Wallemia ichthyophaga* debido a que hay una correlación entre la expresión diferencial de las hidrofobinas que es dependiente de la salinidad 2.6 M y 4.3 M. En el Laboratorio de Biología Molecular, a través de un análisis transcriptómico del hongo halófilo *A. sydowii* en diferentes condiciones de salinidad (0, 0.5 y 2.0 M NaCl) se determinó que de 5 genes que codifican para hidrofobinas, 2 se sobreexpresan en 2.0 M de NaCl (*sih1* y *sih2*), mientras que *sih4* se sobreexpresa en ausencia de sal. Esto sugiere que la expresión de estas proteínas podría ser una respuesta al estrés hipo- u hiperosmótico, sin embargo, no existe evidencia experimental que sustente el papel de estas como una respuesta celular bajo dichas condiciones. Por tanto, el presente estudio tuvo como objetivo generar “cassettes” quiméricos constituidos por los

brazos 5´ y 3´ que flanquean a los genes de hidrofobinas, para que en medio de estas se coloque un gen de resistencia a higromicina (*hph*), con el fin de generar a las mutantes de las hidrofobinas *sih1*, *sih2* y *sih4* a través de la recombinación del “cassette” quimérico con el locus silvestre. Para lograr tal objetivo, se amplificaron los brazos 5´ y 3´ de las hidrofobinas *sih1*, *sih2* y *sih4* y el fragmento *hph*. Además, se unieron a través de la técnica de “Double Joining PCR (DJP)”. Los resultados muestran que hemos logrado generar a estos “cassettes” recombinantes brazo 5´:*hph*:brazo 3´ de *sih1*, *sih2* y *sih4*.

No obstante, aún falta transformar a *A. sydowii* con los “cassettes” y posteriormente tamizar a las colonias mutantes para continuar con el análisis del fenotipo de estas a la tolerancia a la salinidad.

**Palabras clave:** hidrofobinas, recombinación homóloga, “cassettes” recombinantes, halofilia, transformación.

## Índice

1.- Introducción.....	1
1.1.- Organismos extremófilos y extremotolerantes.....	1
1.2.- Hongos halófilos .....	1
1.3.- Mecanismos de halofilia .....	2
1.3.1.- Estrategias de halofilia .....	2
1.3.2.- Vía HOG.....	4
1.3.3.- Transporte iónico.....	4
1.3.4.- Adaptaciones en la pared celular.....	5
1.4.- Hidrofobinas.....	7
1.4.1.- Características.....	7
1.4.2.- Estructura de las hidrofobinas.....	9
1.4.3.- Funciones biológicas de las hidrofobinas.....	10
2.- Antecedentes.....	12
2.1.- Características del halófilo moderado <i>Aspergillus sydowii</i> .....	12
2.2.- Análisis transcriptómico de <i>A. sydowii</i> .....	12
3.- Justificación.....	14
4.- Hipótesis.....	14
5.- Objetivo general .....	14
6.- Objetivos específicos.....	14
7.- Metodología .....	15
7.1.- Cepas fúngicas y condiciones de cultivo .....	15
7.2.- Medios de cultivo .....	15
7.3.- Extracción de DNA genómico.....	16
7.4.- Generación de los “cassettes” recombinantes para la mutación por recombinación homóloga PCR doble unión .....	16
7.5.- Cinética de crecimiento de <i>A. sydowii</i> suplementado con sorbitol.....	21
7.6.- Velocidad de crecimiento de <i>A. sydowii</i> crecido en sorbitol.....	21
7.7.-Obtención de la actividad de agua del sorbitol.....	21
8.- Resultados .....	22
8.1.- Purificación de DNA genómico de <i>A. sydowii</i> .....	22
8.2.- Purificación del plásmido pUE10 para amplificar el gen de resistencia a higromicina ( <i>hph</i> ).....	23

8.3.- Amplificación de las regiones flanqueantes 5´ y 3´ de los genes <i>sih</i> , y el gen de resistencia a higromicina ( <i>hph</i> ).....	24
8.4.- Purificación de las regiones flanqueantes 5´ y 3´ de los genes <i>sih</i> , y el gen de resistencia a higromicina ( <i>hph</i> ).....	31
8.5.- Reacción de empalme PCR Double Joining .....	33
8.6.- Tercera reacción de la PCR Double Joining .....	36
9.- Cinética de crecimiento de <i>A. sydowii</i> en PDA suplementado con sorbitol .....	49
10.-Discusión.....	53
10.1.- Generación de los “cassettes” quiméricos de la <i>sih1</i> , <i>sih2</i> y <i>sih4</i> .....	53
10.2.- Tolerancia de <i>A. sydowii</i> a sorbitol.....	54
11.- Conclusiones .....	57
12.- Perspectivas .....	57
13.- Referencias .....	58
14.- Anexos.....	64

## 1.- Introducción

### 1.1.- Organismos extremófilos y extremotolerantes

En el planeta existen ambientes con condiciones fisicoquímicas que se consideran desfavorables para el desarrollo de la mayoría de los seres vivos (Orellana *et al.*, 2018). Sin embargo, existen microorganismos que pueden vivir en estas condiciones debido a que tienen adaptaciones moleculares, bioquímicas y celulares. A estos organismos cuyo óptimo de crecimiento se encuentra en condiciones fuera del estándar se denominan extremófilos, mientras que aquellos que toleran condiciones extremas pero cuyo óptimo de crecimiento está dentro de los parámetros estándar se denominan extremotolerantes (Sánchez Íñigo, 2014).

Los extremófilos se clasifican de acuerdo con la condición ambiental a la que encuentran su óptimo de crecimiento, entre los que se encuentran: termófilos (60 - 80 °C), psicrófilos (< 15 °C), xerófilos (< 0.85 aw), acidófilos (pH < 3), basófilos (pH > 9), piezófilos (10 – 50 MPa) y halófilos (> 0.2 M de NaCl) (Wang *et al.*, 2015; Moyer *et al.*, 2007; Pettersson y Su-lin, 2011; Baker-Austin y Dopson; Horikoshi, 1996; Fang *et al.*, 2010; Tse y Ma, 2016).

Los hongos halófilos, tema central del presente trabajo, son organismos cuyo óptimo de crecimiento se alcanza en concentraciones >0.25 M de NaCl. Estos existen en los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya, y han recibido una atención significativa debido a su amplio potencial biotecnológico (Gupta *et al.*, 2014). Los halófilos también pueden ser conocidos como xerófilos, pero no todos los xerófilos son halófilos, ya que los xerófilos requieren condiciones de baja actividad de agua (aw) (óptimo de crecimiento de 0.85 o menos) sin incrementar el estrés iónico como es el caso de los halófilos (Pettersson y Su-lin, 2011).

### 1.2.- Hongos halófilos

Hasta el año 2000, sólo se habían descrito hongos halófilos como contaminantes de comida, pero a partir de este año un gran número de reportes describen la presencia de diversas especies de ascomicetos como las levaduras como *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens*, *Candida glabrata*, *C. tropicalis*,

*C. parapsilosis* y *C. krusei*, además de *Aspergillus versicolor*, *A. niger* y *A. sydowii*, también hongos basidiomicetos como *W. Ichthyophaga*, *Cladosporium* (*Cladosporium sphaerospermum*) en salinas solares, entre otros ambientes hipersalinos (Gunde-Cimerman, *et al.*, 2009).

Estos hongos se clasifican de acuerdo con su requerimiento de cloruro de sodio (NaCl) en halófilos leves, moderados y extremos, cuyo óptimo de crecimiento se alcanza a concentraciones de 0.25 - 0.5 M, 0.5 - 2.0 M y 2 - 5 M, respectivamente. Mientras que los halotolerantes son aquellos cuyo óptimo de crecimiento es en ausencia de NaCl pero pueden seguir creciendo incluso en condiciones de saturación (Gupta *et al.*, 2014).

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura halotolerante que puede crecer en concentraciones de hasta 1 M NaCl (Folch *et al.*, 2004). Sin embargo, hay especies que han sido aisladas de medios hipersalinos como *D. hansenii* y *Hortaea werneckii* las que pueden crecer en concentraciones de hasta 5 M de NaCl, y *W. ichthyophaga* un halófilo obligado (>1.7 M de NaCl), debido a que han desarrollado estrategias para soportar el estrés iónico y el estrés osmótico (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009).

### 1.3.- Mecanismos de halofilia

Los ambientes hipersalinos causan la inactivación de proteínas, pérdida de agua, y la producción de especies reactivas de oxígeno en organismos no adaptados, mientras que células adaptadas a estas condiciones como las de los organismos halófilos, crecen óptimamente en estos ambientes gracias a las estrategias moleculares y celulares con las que cuentan (Gómez *et al.*, 2020).

#### 1.3.1.- Estrategias de halofilia

Se han descrito dos principales estrategias para enfrentar el estrés osmótico: la primera denominada "salt in", utilizada principalmente por las arqueas, en las que se acumula potasio ( $K^+$ ) en concentraciones equivalentes al sodio ( $Na^+$ ) extracelular. Por ejemplo, *Halobacterium* bombea grandes cantidades de iones de potasio ( $K^+$ ) al espacio intracelular para mantener un balance osmótico (Madigan, 2015). Se



propone que las cargas negativas de los aminoácidos ácidos que se encuentran en la superficie de sus proteínas son importantes para evitar su desnaturalización, agregación y precipitación, la que suele producirse cuando las proteínas no halófilas son expuestas a altas concentraciones de sal (Dym *et al.*, 1995).

En contraste, las eubacterias y los eucariontes halófilos utilizan el mecanismo “salt out” también conocido como de solutos compatibles. Este mecanismo consiste en que las células para alcanzar un equilibrio hídrico acumulan solutos compatibles que evitan la deshidratación de la célula en condiciones de alta presión osmótica (Gupta *et al.*, 2014). Además bombean el Na<sup>+</sup> fuera de la célula usando transportadores activos de membrana (Zajc *et al.*, 2013).

Los solutos compatibles son moléculas zwitteriónicas o sin carga de distinta naturaleza química (carbohidratos, aminoácidos, polialcoholes) y de bajo peso molecular que no interfieren en los procesos metabólicos (Yancey 2005). De tal manera que hongos y algas verdes acumulan polioles como manitol y glicerol, mientras que muchas bacterias halófilas y halotolerantes acumulan glicina, betaina y ectoína (Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021).

Cuando un halófilo como *A. sydowii* crece en condiciones óptimas de crecimiento (0.5 M NaCl) acumula metabolitos como manitol, eritriol y arabitol. Pero únicamente en condiciones de hipersalinidad (2.0 M NaCl) se presenta un aumento en la concentración de eritritol y glicerol (Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021). También *S. cerevisiae*, *W. ichthyophaga*, *H. werneckii*, *D. hansenii* acumulan glicerol como su principal soluto compatible en condiciones hipersalinas (Gunde *et al.*, 2009).

### 1.3.2.- Vía HOG

La vía de HOG por sus siglas en inglés (High Osmolarity Glicerol), es una cascada de señalización que se activa mediante receptores extracelulares que detectan cambios en la presión osmótica, que en el caso de los halófilos se dan por las altas concentraciones de sal. Las señales emitidas al medio intracelular desencadenan la activación del sistema (HOG) que lleva a la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de glicerol (Folch *et al.*, 2004), entre otras respuestas.

Esta vía está extensamente descrita en la levadura *S. cerevisiae* donde Sln1p y Sho1p, proteínas localizadas en la membrana plasmática, juegan el papel de receptores. Sln1p actúa como un regulador negativo de la vía de HOG, es decir, cuando esta proteína está activa la vía de HOG está inactiva y viceversa. Mientras que Sho1p cumple la función de anclar la MAPKK también conocida Pbs2p a la membrana plasmática. Una vez fosforilada la MAPKK, por la MAPKKK, va a fosforilar a la MAP cinasa conocida como Hog1p, esta fosforilación da lugar a una translocación al núcleo donde activa factores de transcripción que llevan a la expresión de genes implicados en la síntesis de glicerol entre otros solutos compatibles, estos evitan la pérdida de agua de la célula, haciendo frente al estrés osmótico (Folch *et al.*, 2004).

### 1.3.3.- Transporte iónico

Como se ha mencionado, la hipersalinidad lleva al estrés iónico, sin embargo, las células cuentan con transportadores de membrana. En el caso de *H. werneckii*, la homeostasis de iones en el espacio intra- y extracelular es mantenida por transportadores de K<sup>+</sup> y de Na<sup>+</sup>. El halotolerante moderado *Aureobasidium spp*, también tiene transportadores y alta abundancia de acuaporinas, los cuales son canales que permiten el paso suficiente de agua (Plemenitas, *et al.*, 2016). En *W. ichthyophaga*, estos transportadores son expresados en bajos niveles, pero estudios de la estructura de su pared celular indican que puede prevenir la entrada de sodio mediante la restructuración de la pared celular (Plemenitas *et al.*, 2016).

#### 1.3.4.- Adaptaciones en la pared celular

La pared celular en los hongos halófilos se modifica en condiciones hipersalinas generalmente aumentando su grosor, como en *W. ichthyophaga*, el cual al pasar de un medio con 15% a un 25% de NaCl (2.6 M y 4.3 M, respectivamente) aumenta el grosor de la pared celular hasta 1.6 veces (Figura 1a) (Kralj *et al.*, 2010). En *A. sydowii* también se observa un incremento en el grosor de su pared celular cuando este es sometido a un ambiente hiperosmótico (Figura 1b), lo que correlaciona con la expresión de transcritos que codifican para enzimas que actúan en su remodelación (endoquitinasa, ECM33, CRH glicosidasa, glucosiltransferasas de la familia GEL). Esta expresión diferencial sugiere que, en presencia de estrés hiperosmótico, hay un aumento en el contenido de  $\beta$ -glucanos, mientras que el contenido de quitina se reduce (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

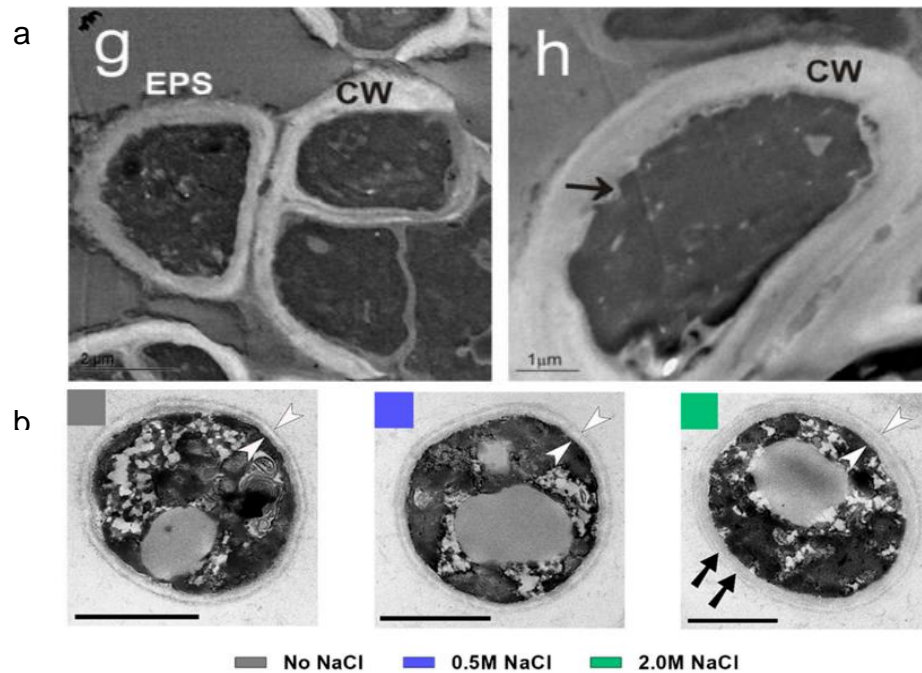


Figura 1. Engrosamiento de la pared celular en (a) *W. ichthyophaga* (izquierda 15% de NaCl; derecha 25% de NaCl) (Kralj *et al.*, 2010) y (b) *A. sydowii* (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

Se ha reportado que *W. ichthyophaga* y *A. sydowii* expresan diferencialmente los transcritos de algunas hidrofobinas, proteínas cuya función es de recubrir a la pared celular. Pérez-Llano y colaboradores (2020) encontraron que los genes *sih1* y *sih2* de *A. sydowii* se sobreexpresan en una condición hipersalina (2 M NaCl), mientras que el gen *sih4* se regula positivamente en ausencia de sal. Es interesante hacer notar que *W. ichthyophaga*, un halófilo obligado, tiene hasta 26 genes de hidrofobinas en un genoma relativamente pequeño de 9 Mb, comparado con el promedio de otros hongos. De manera interesante, este expresa diferencialmente 4 hidrofobinas en hipersalinidad y otras 8 en baja salinidad (Plemenitas *et al.*, 2014; Zajc *et al.*, 2013). Zajc y colaboradores (2013) hipotetizan que el incremento de genes de las hidrofobinas sugiere un papel relevante de estas en el estilo de vida del hongo.

## 1.4.- Hidrofobinas

### 1.4.1.- Características

Las hidrofobinas son proteínas pequeñas ( $\leq 20$  kDa) localizadas en la pared de hongos filamentosos. Éstas son anfipáticas (figura 2), propiedad que le permite a los hongos adherirse a superficies hidrofóbicas, y son denominadas hidrofobinas aludiendo a su hidrofobicidad (ver Plemenitas *et al.*, 2014).

La característica principal de éstas es tener ocho residuos de cisteínas que forman cuatro puentes disulfuro, en una secuencia promedio de 100 aminoácidos (Linder *et al.*, 2005). Las hidrofobinas se autoensamblan en interfaces hidrofílicas-hidrofóbicas, formando películas anfipáticas y disminuyendo la tensión superficial del agua.

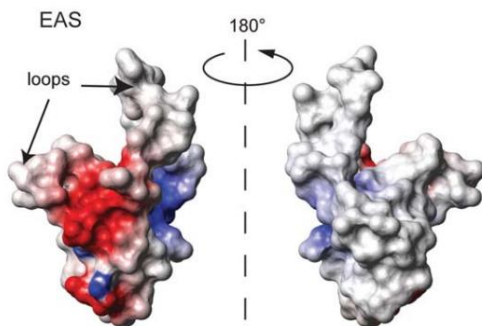


Figura 2: Representación de la hidrofobina de clase I EAS mostrando la superficie hidrofílica (izquierda), y la superficie hidrofóbica (derecha). Residuos hidrofóbicos de color gris, mientras que los positivos y negativos coloreados de azul y rojo, respectivamente (Ren *et al.*, 2013).

Estas proteínas se clasifican en clase I y clase II de acuerdo con las características que se mencionan a continuación. Las de clase I poseen secuencias no conservadas, espacios variables entre las cisteínas y una película que presenta la formación de estructuras fibrilares en forma de bastones tipo “rodlets” (Figura 3), los cuales son altamente estables e insolubles en dodecilsulfato de sodio (SDS), pero que se disuelven en solventes ácidos como el ácido fórmico (Linder *et al.*, 2005). Mientras que las de clase II son menos estables y no forman películas con

morfología fibrilar con forma de “rodlets” o bastones. Además presentan secuencias y espacios conservados entre las cisteínas (ver figura 4).

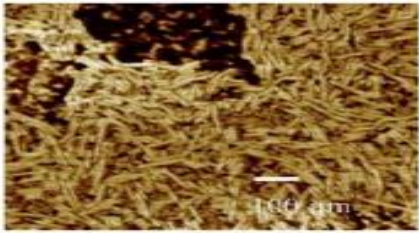


Figura 3: Microscopia de fuerza atómica de hidrofobina de clase I tipo rodlets proveniente de *S. commune* (SC3) mostrando la disposición de la película formada por SC3 (Linder, 2005).

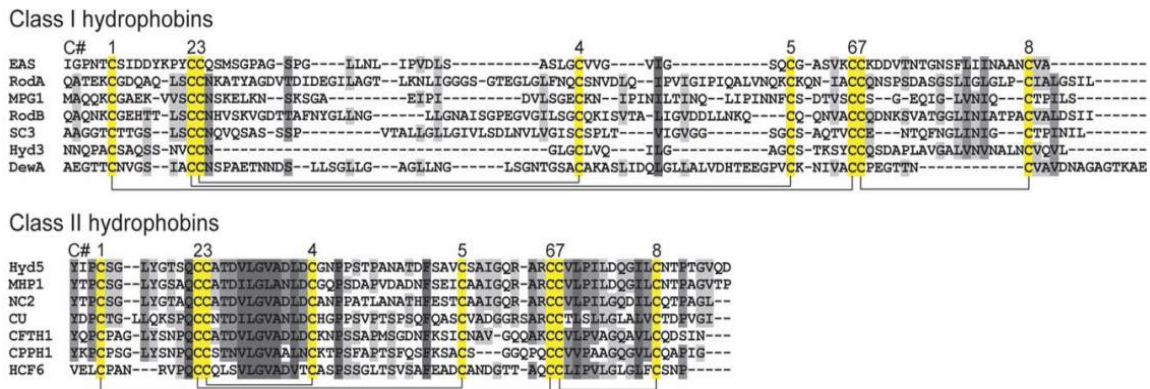


Figura 4: Alineamiento de secuencias de hidrofobinas de clase I y clase II (Ren *et al.*, 2013). Los residuos de cisteína están marcados en color amarillo. Los residuos conservados están marcados con un tono oscuro. La formación de puentes disulfuro están indicados con corchetes bajo las secuencias.

A través de análisis bioinformáticos se determinó que existen hidrofobinas con propiedades intermedias a las de clase I y II por lo que se les incluyó en una nueva categoría, la clase III, la cual presenta un patrón entre las cisteínas distinto (X? - C - X8, 11-14 - C - C - X5-17, 40-42 - C -X3-8, 23-41 - C - X4, 6-9 - C - C - X4, 5, 21-35 - C - - X14-457) al que es común en las hidrofobinas de clase I (X? - C - X5-7 - C - C - X19-39 - C -X8-23 - C - X5 - C - C - X6-18 - C--X2-13) y clase II (X? - C - X9-10 - C - C - X11 - C -X16 - C - X8-9 - C - C - X10 - C--X6-7) (Littlejohn *et al.*, 2012).

Una diferencia entre estas clases está en la solubilidad de los agregados que forman. Los agregados de clase I sólo se disuelven en ácidos fuertes como el ácido trifluoroacético (TFA) (Wösten, 2001). Mientras que los agregados de clase II pueden disolverse usando solventes orgánicos como etanol al 60% o SDS al 2% (Linder *et al.*, 2005; Wösten *et al.*, 2000). Estas también tienen actividad lectina (unen polisacáridos de la pared celular) en su región hidrofílica, por lo cual se piensa que intervienen en el crecimiento y la morfogénesis de los hongos, así como en la formación de estructuras aéreas y la adhesión de los conidios a superficies hidrofóbicas (Linder *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.- Estructura de las hidrofobinas

Las hidrofobinas presentan una estructura barril  $\beta$  central, compuesto por cuatro hebras  $\beta$  antiparalelas, rodeadas de otros elementos de estructura secundaria regular y bucles bien definidos (L1, L2 y L3), con regiones relativamente flexibles (Figura 5) (Ren *et al.*, 2013).

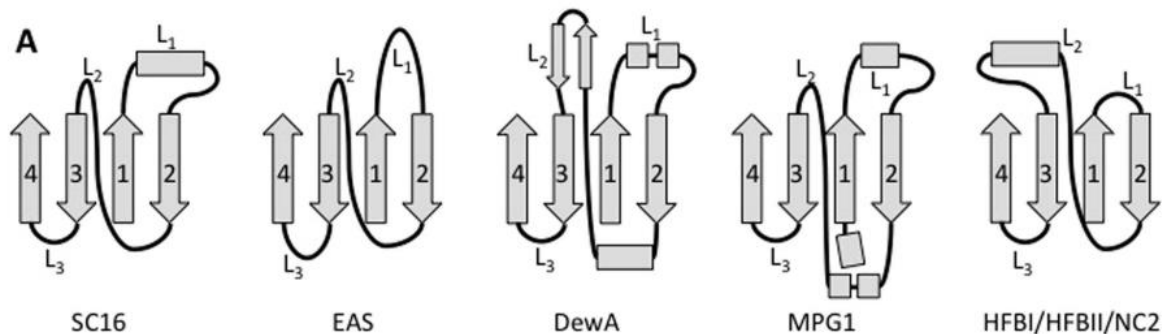


Figura 5: Modelos de las estructuras secundarias de diversas hidrofobinas. Las cuatro hojas  $\beta$  están numeradas (del 1 al 4) y los bucles están representados como L1, L2 y L3. Hidrofobinas de clase I: SC16 de *S. commune*, EAS de *Neurospora crassa*, DewA de *A. nidulans* y MPG1 de *Magnaporthe grisea*, y las hidrofobinas de clase II: HFB I y HFB II de *T. reesei* y NC2 de *N. crassa* (Gandier *et al.*, 2017).

#### 1.4.3.- Funciones biológicas de las hidrofobinas

Las hidrofobinas tienen diversas funciones en el ciclo de vida de los hongos, tal como la reducción de la tensión superficial del agua, lo que permite el crecimiento de las hifas en el aire, además recubren a las esporas protegiéndolas de la desecación (Linder *et al.*, 2005), ya que las vuelven impermeables y al mismo tiempo permiten el intercambio gaseoso (Ren *et al.*, 2013). Estas proteínas se encuentran recubriendo la pared celular de las esporas, también conocidas como conidios, y en las hifas, es decir que al recubrir a las estructuras fúngicas brindan protección a los hongos ante las condiciones ambientales. Debido a que pueden autoensamblarse en interfases hidrofóbicas – hidrofílicas (característica que les da la propiedad hidrofóbica), se facilita la adherencia de las esporas a superficies hidrofóbicas.

Las diversas funciones que tienen estas proteínas han sido probadas a través de la ingeniería genética, principalmente mutando o removiendo a los genes de hidrofobinas. Por ejemplo, las cepas mutantes de *Trichoderma reesei* de los genes *hfb1* tienen defectos en el desarrollo de las hifas, mientras que las mutantes del gen *hfb2*, presentan una colonia con un fenotipo de apariencia húmeda y esporulación reducida al 50%, comparada con la cepa silvestre (Askolin *et al.*, 2005).

Estas proteínas también se han involucrado en la patogenicidad de hongos como *Aspergillus fumigatus*, un patógeno de humanos. Se ha encontrado que el gen *rodA*, que codifica para una hidrofobina, genera estructuras en forma de bastones, recubriendo la superficie de los conidios. Al ser deletado *rodA* se produce una menor resistencia de los conidios ante los macrófagos alveolares del hospedero (Paris *et al.*, 2003). Otro ejemplo es la delección de los genes *Fghyd2* y *Fghyd3* que codifican para hidrofobinas, del patógeno de plantas *Fusarium graminearum*, lo que provoca una disminución en la adhesión del hongo a superficies hidrofóbicas, una reducción en la capacidad de las hifas para romper la tensión superficial del agua y disminuye su capacidad para infectar a las espigas de trigo (Quarantin *et al.*, 2019).

De manera interesante, las hidrofobinas del hongo halófilo *W. ichthyophaga* presentan mayor porcentaje de aminoácidos ácidos respecto a sus homólogos en hongos no halófilos. Estos aminoácidos al encontrarse en su superficie podrían ser



afines a los cationes en el medio, de tal manera que evitarían que éstos entren al medio intracelular, por lo que se ha sugerido que esto podría ser una adaptación para crecer en medios hipersalinos (Plemenitaš *et al.*, 2014).

Adicionalmente, se ha observado que este hongo sobreexpresa algunos transcritos codificantes para hidrofobinas en condiciones de alta y baja salinidad, posiblemente debido a los diferentes papeles funcionales que juegan en las diversas condiciones ambientales o etapas de desarrollo (Figura 6). Y como se ha mencionado antes, es interesante notar que *W. ichthyophaga* tiene un número inusual de hidrofobinas respecto al tamaño de su genoma (Zajc *et al.*, 2013).

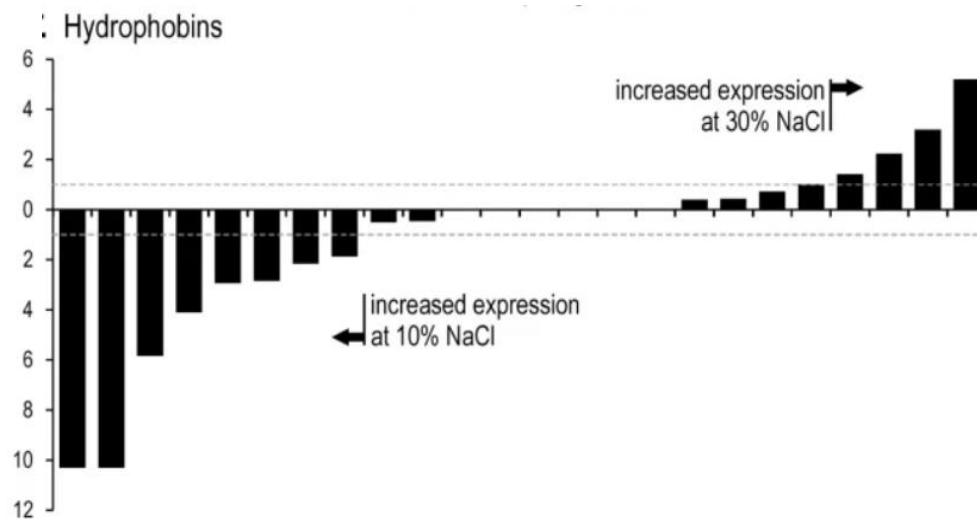


Figura 6. Expresión diferencial de hidrofobinas en dos salinidades (izquierda 10% NaCl, derecha 30%). El eje x representa los diferentes transcritos de cada hidrofobinas y el eje y representa el cambio de la expresión en escala logarítmica (Tomado de Zajc *et al.*, 2013).

Esto mismo podría ocurrir en el halófilo moderado *A. sydowii* que también expresa diferencialmente algunas hidrofobinas cuando es sometido a condiciones de estrés hiperosmótico (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

## 2.- Antecedentes

### 2.1.- Características del halófilo moderado *Aspergillus sydowii*

*A. sydowii* fue aislado en el laboratorio de biología molecular de hongos a partir de una fermentación de bagazo de caña suplementado con 2.0 M de NaCl. Su óptimo de crecimiento en diferentes medios suplementados con NaCl se encuentra entre 0.5 y 1.0 M, lo que indica que es un halófilo moderado. A través de un análisis morfológico y transcriptómico se observó que, bajo condiciones de estrés hipersalino, la pared celular se engrosa, y que transcritos relacionados a la vía de síntesis de glicerol se sobreexpresan. Mientras que de los 5 genes de hidrofobinas, 2 se sobreexpresan en 2.0 M de NaCl y uno en ausencia de sal (Figura 8).

La tabla 1 muestra las características de los genes y proteínas de las hidrofobinas expresadas diferencialmente en *A. sydowii* BMH004.

Tabla 1. Características de las hidrofobinas de *A. sydowii*.

Gen	Tamaño de exones			Tamaño de intrones		Tamaño de la proteína (aa)	Clasificación
	1	2	3	1	2		
<i>sih1</i>	277 pb	98 pb	57 pb	99 pb	77 pb	129	Sin clasificar
	1	2	3	1	2		
<i>sih2</i>	328 pb	80 pb	57 pb	53 pb	52 pb	137	Clase 2
	1	2	3	1	2		
<i>sih4</i>	407pb	56pb	39 pb	55 pb	50 pb	117	Sin clasificar
	1	2	3	1	2		

### 2.2.- Análisis transcriptómico de *A. sydowii*

El análisis transcriptómico de *A. sydowii* crecido en condiciones hiperosmóticas (2 M NaCl), hipo-osmóticas (sin NaCl) estresantes, y condiciones óptimas (0.5 NaCl) mostró que 3 de 5 genes que codifican para hidrofobinas se expresan de manera diferencial (*sih1*, *sih2* y *sih4*). Los resultados mostraron que el gen *sih4* se expresó en ausencia de sal, mientras que *sih1* y *sih2* se expresaron en 2.0 M de NaCl, mientras que en 0.5 M (crecimiento óptimo) los niveles de estos transcritos fueron muy bajos (Figura 8). Por último, los niveles de expresión de *sih3* fueron

significativamente bajos por lo que no se consideraron en el estudio. Esta expresión diferencial estrechamente relacionada con la salinidad del medio sugiere que, las hidrofobinas podrían funcionar como efectores en la respuesta a estrés salino, pero no se entiende completamente su función en la adaptación a la salinidad, ni la selectividad en su expresión, sin mencionar que existen pocos estudios que aborden el papel de las hidrofobinas en la halofilia por lo que resulta relevante el estudio de estas proteínas (Méndez Ortega, 2021). Para conocer si efectivamente las hidrofobinas sobreexpresadas en condiciones hipersalinas son relevantes para la tolerancia del hongo a ambientes hipersalinos es necesario generar cepas mutantes de éstas.

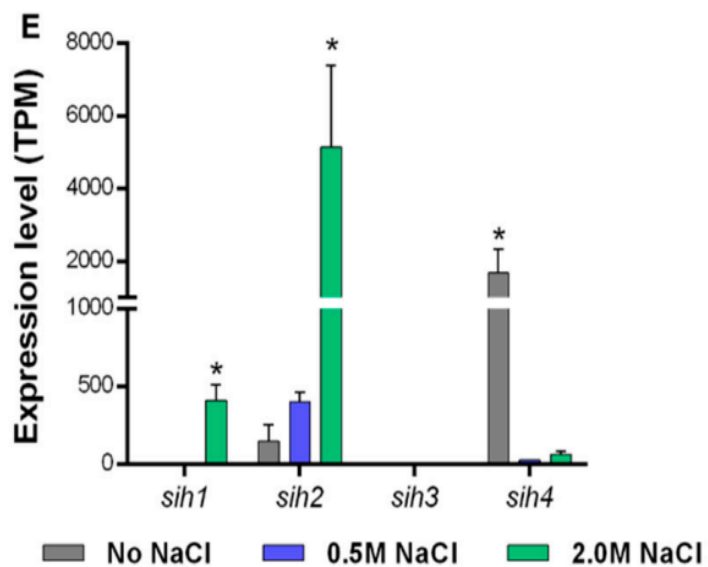


Figura 8. Expresión diferencial de transcritos que codifican para las hidrofobinas SIH1, SIH2, SIH3 y SIH4 en diferentes concentraciones de sal (Tomado de Pérez-Llano *et al.*, 2020).

### 3.- Justificación

Si bien se ha hipotetizado que las hidrofobinas podrían ser indispensables en la resistencia a alta salinidad tanto en *W. ichthyophaga* como en nuestro modelo de estudio *A. sydowii*, este último con un alto potencial biotecnológico por su capacidad para degradar biomasa vegetal y ser fuente de enzimas halotolerantes, debido a la correlación de la expresión diferencial de estas proteínas con la salinidad no existe hasta ahora evidencia experimental que sustente la participación de estas como un protector frente a este tipo de estrés. Por tanto, es pertinente generar líneas mutantes de los genes *sih1*, *sih2* y *sih4* del hongo halófilo *A. sydowii* y determinar si efectivamente estas juegan un rol importante en la contención al estrés hipo- o hiperosmótico.

### 4.- Hipótesis

Las hidrofobinas *sih1* y *sih2*, pero no la *sih4* son indispensables en la tolerancia de *A. sydowii* a hipersalinidad.

### 5.- Objetivo general

Generar líneas mutantes de las hidrofobinas codificadas por los genes *sih1*, *sih2* y *sih4* de *Aspergillus sydowii* a través de recombinación homóloga.

### 6.- Objetivos específicos

Diseñar oligonucleótidos quiméricos para amplificar los fragmentos requeridos para la construcción de las hidrofobinas mutantes.

Generar las amplificaciones de las regiones flanqueantes de los genes de hidrofobinas y el gen de resistencia a higromicina para hacer la recombinación homóloga.

Determinar la tolerancia al estrés osmótico de *A. sydowii* por sorbitol.

Generar colonias mutantes de las *sih1*, *sih2*, *sih4* de *A. sydowii*.

## 7.- Metodología

### 7.1.- Cepas fúngicas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa *Aspergillus sydowii* BMH-0004 aislada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Mor, México.

### 7.2.- Medios de cultivo

#### **Medio Agar, papa y dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés)**

Para la propagación y mantenimiento de la cepa *A. sydowii* se utilizó medio sólido PDA (2% de papa, 2% de dextrosa y 1.5% de agar) en el que se sembró un inóculo del hongo por aproximadamente 7 días a 28 °C. Posteriormente los cultivos se mantuvieron a 4 °C y se resiembraron cada 15 días.

#### **Glicerol de *A. sydowii***

A partir de cultivos de *A. sydowii* crecidos en PDA por 7 días se recolectaron las esporas con 800 µl PBS (8.06 g de NaCl, 0.22 g de KCl, 1.15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.20 g de KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y Tween-20 al 0.1% y una vez que se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml, se añaden 200 µl de glicerol (25 % final). Esto se almacenó a -80 °C.

Otro protocolo para preservar a *A. sydowii* se realizó de la siguiente manera: se tomaron tres cilindros de aproximadamente 0.7 mm (usando la parte posterior de una punta amarilla para micropipetas de 200 µl) de un micelio crecido en medio PDA suplementado con 0.5 M de NaCl e incubado por 7 días a 28 °C. Estos cilindros se colocaron en solución de glicerol (30% glicerol, 70 % medio PDB) y se guardaron en REVCO a -80 °C.

### 7.3.- Extracción de DNA genómico

Para la amplificación de las regiones genómicas de las hidrofobinas, se utilizó ADN cromosomal de *A. sydowii*. Este se obtuvo de la siguiente manera:

A partir de un cultivo PDA se tomó el micelio y se congeló en N<sub>2</sub> líquido para luego macerarlo en un mortero hasta obtener un polvo fino, siempre manteniéndolo congelado. Posteriormente se transfirieron 100 mg de micelio macerado a un tubo Eppendorf y se agregaron 500 µl de buffer de extracción (0.5 % SDS, 200 mM Tris pH 8.5, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl). Se homogenizó con vórtex por 3 minutos.

El lisado se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1), se agitó suavemente por alrededor de 1 - 2 minutos, seguido de centrifugación a 12000 rpm por 30 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadió un volumen igual de cloroformo:isoamílico, esto se mezcló con vortex por 1 - 2 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm. Nuevamente se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de isopropanol (1 vol), y se mezcló por inversión. Se incubó 1 hora a -20 °C y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con 500 µl EtOH al 70 %, posteriormente se secó y se resuspendió en 30 µl de agua Mili Q.

### 7.4.- Generación de los “cassettes” recombinantes para la mutación por recombinación homóloga PCR doble unión

En esta técnica se emplean seis oligonucleótidos: el 5'-Forward, el 5'-Reverso + la secuencia de *hph* 5' (primer quimérico), el 3'-Forward + secuencia de *hph*, el 3'-Reverso, y los oligonucleótidos para amplificar el gen de resistencia a higromicina (*hph*) (Tabla 2) (Yu *et al*, 2004).

Para la amplificación del gen *hph* se utilizaron los oligonucleótidos que flanquean a este gen y se usó como molde el plásmido pUE10 (Figura 9). Para lograr este objetivo se hizo una purificación del plásmido con el método de lisis alcalina (Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001).

Los oligonucleótidos quiméricos permiten generar un amplicón con un extremo que complementa al siguiente amplicón y de esta manera se pueden utilizar como “cebadores” en la reacción de elongación con una DNA polimerasa de alta fidelidad en el PCR de doble unión (double joining PCR) el que genera una molécula quimérica que contiene a las regiones flanqueantes homólogas al locus del gen *sih*, y en medio de estas el gen *hph* que sustituye a la *sih* (Figura 10) (Yu *et al*, 2004). La *hph* al funcionar como marcador de resistencia a higromicina, es decir las colonias que crecen son aquellas que incorporaron la construcción pues se vuelven resistentes al antibiótico. En la tabla 2 se muestran los cebadores requeridos para generar los fragmentos quiméricos.

Tabla 2: Oligonucleótidos quiméricos y anidados para la generación de los fragmentos recombinantes de los genes de las hidrofobinas *sih1*, *sih2* y *sih4* de *A. sydowii* y el gen de resistencia a Higromicina (*hph*).

<i>Sih1</i>	QuimSih1 Forward	CTCAGCATCAAAGCCAGTCTGATCGACGTTA ACTGATATTGAAGG
	QuimSih1 Reverse	CAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGGA CTGCCTGGTCCTGAC
	Nested Forward	GGGATGACTCCGTGCCTC
	Nested Reverse	CTCATGCACCATCCATACCAAG
<i>Sih2</i>	QuimSih2 Forward	CAGCAGGTTGGAAGCTCATCGATCGACGTTA ACTGATATTGAAGG
	QuimSih2 Reverse	CAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGCTG TCATTGCCACCGAGAAG
	Nested Forward	CTGTACACTATGCAGACCTATTG
	Nested Reverse	GCGAGAGTAGTCCCAAATACG
<i>Sih4</i>	QuimSih4 Forward	GGTCGACTGAAGTCTGCGTCGATCGACGTTA ACTGATATTGAAGG
	QuimSih4 Reverse	CAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGCG CAAGGGAGCATTGACAGC
	Nested Forward	ATGGTCCCAAAGGTCTACATGC
	Nested Reverse	GACGTCGTACAGGATTTGTCC
<i>hph</i>	<i>hph</i> Forward	GATCGACGTTAACTGATATTGAAGG
	<i>hph</i> Reverse	CAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG

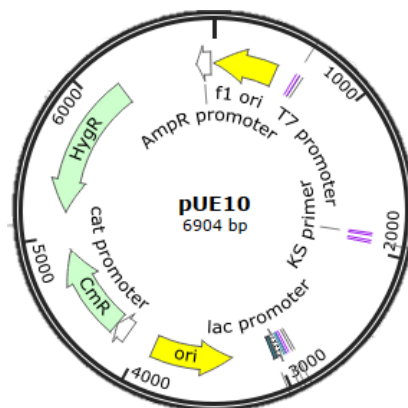


Figura 9. Plásmido pUE10 utilizado como templado para la amplificación del gen de resistencia a higromicina (Balcázar-López *et al.*, 2016).



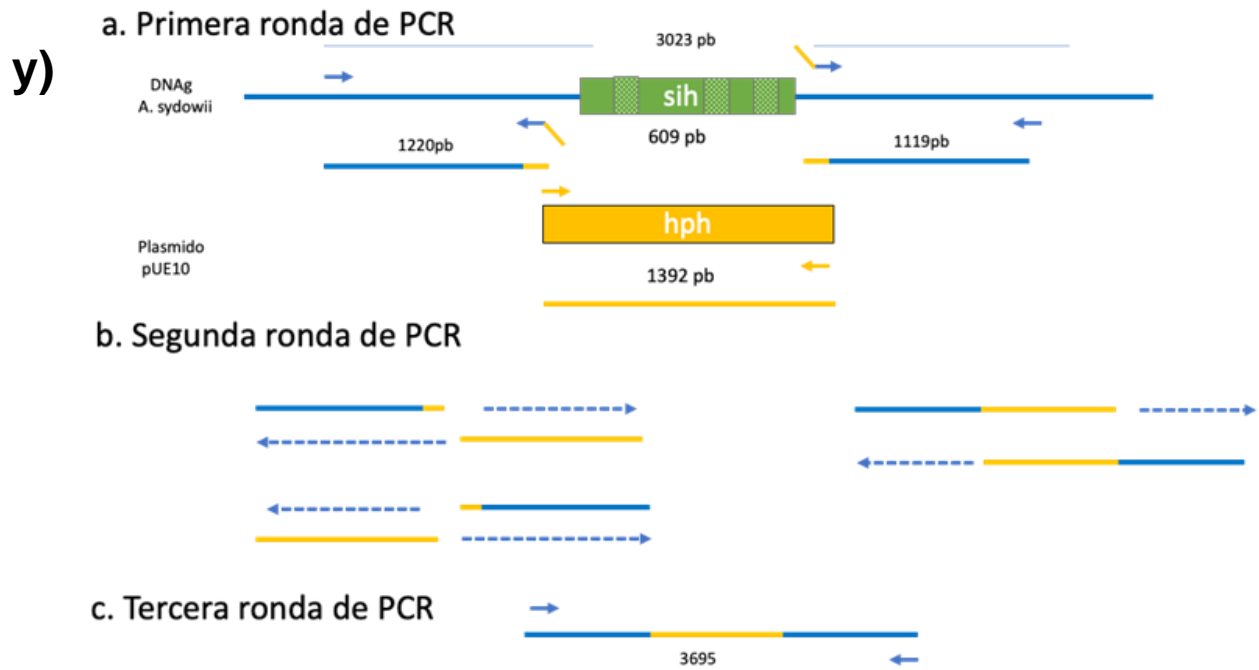
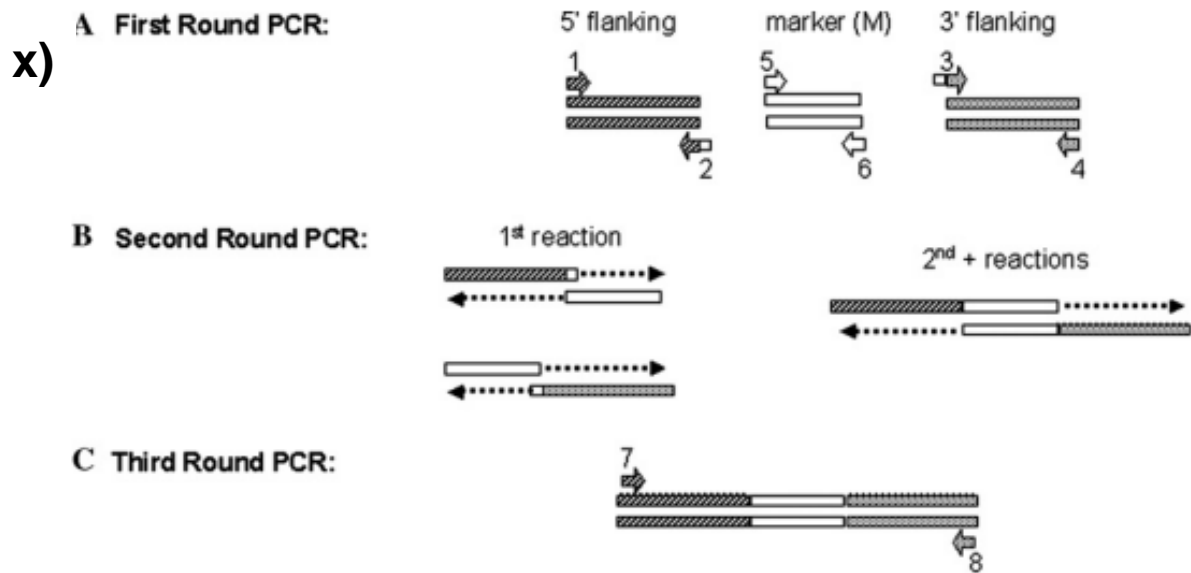


Figura 10. Representación de las tres reacciones de PCR doble unión (Figura tomada (x) y modificada (y) de Yu *et al*, 2004).

Estos tres fragmentos se purificaron y mezclaron para la segunda ronda de PCR, la cual genera el fragmento quimérico, y los oligonucleótidos 5'Nest y 3'Nest utilizados en la tercera reacción amplifican a los "cassettes" recombinantes que comprenden: región 5' *sih* - *hph* - región 3' *sih* con tamaños de 3736 pb, 3578 pb, 3848 pb (Figura 11) para los "cassettes" *sih1*, *sih2* y *sih4* respectivamente. Una vez que se ha obtenido a las construcciones quiméricas, estas se deben obtener en cantidades suficientes para después transformarlos en *A. sydowii* por el método de protoplastos. Las transformantes serán obtenidas y analizadas a través de PCR de colonia para comprobar si efectivamente son positivas a dicho fragmento.

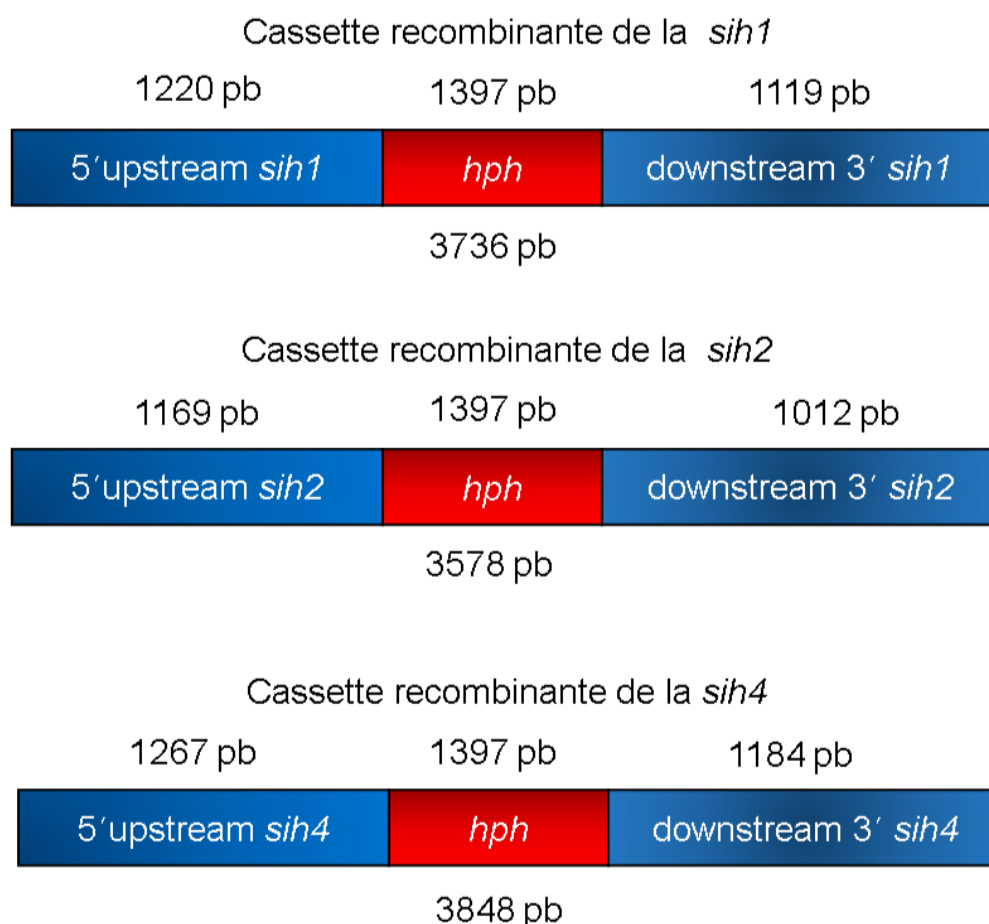


Figura 11. Representación de los "cassettes" recombinantes de las *sih1*, *sih2*, *sih4* que se obtuvieron en la PCR doble unión, con la región codificante de la hidrofobina ya deletada. Gen de resistencia a higromicina (color rojo) y regiones flanqueantes homólogas al locus de las *sih* necesarios para la recombinación (color azul).

#### 7.5.- Cinética de crecimiento de *A. sydowii* suplementado con sorbitol

A partir de cultivos de *A. sydowii* crecidos en PDA por 7 días a 28 °C se tomaron cilindros de aproximadamente 0.7 mm (usando la parte posterior de una punta amarilla para micropipetas de 200 µl) para ser sembrados en cajas de PDA suplementado con sorbitol en una concentración de: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 M. Posteriormente se midió el diámetro de las colonias cada tercer día en un periodo de 15 días.

#### 7.6.- Velocidad de crecimiento de *A. sydowii* crecido en sorbitol

A partir de los cultivos de *A. sydowii* sobre PDA con sorbitol se tomaron los datos de la fase exponencial y se determinó la velocidad de crecimiento tomando las coordenadas de dos puntos, para posteriormente sustituirlos en la siguiente fórmula:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

esta nos permitió determinar la pendiente de la recta, la cual es igual a la velocidad de crecimiento.

#### 7.7.-Obtención de la actividad de agua del sorbitol

Para obtener la  $a_w$  del sorbitol se usó la siguiente formula:

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

la cual se basa en la ley de Raoult para soluciones ideales y solo se toma las interacciones del soluto con el agua. Donde:  $n_1$  son los moles de solvente (agua) y  $n_2$  son los moles de soluto;  $P$ , es la presión de vapor de la solución y  $P_0$  es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (Grant 2004).

## 8.- Resultados

Como paso inicial se purificó el DNA genómico de *A. sydowii* y el plásmido pUE10 de *E. coli* para utilizarlos como molde en la amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' de los genes *sih*, y del gen de resistencia a higromicina (*hph*) respectivamente, para entonces unir a los fragmentos a través del PCR doble unión y obtener al menos 1 µg del producto quimérico de las regiones flanqueantes de las *sih* con el gen *hph* para entonces ser transformados en *A. sydowii*.

### 8.1.- Purificación de DNA genómico de *A. sydowii*

En la figura 12 A se muestra el resultado de la purificación del DNA genómico (DNAg) de *A. sydowii* obtenido sin haber tratado con RNasa, mientras que en la figura 12 B está la muestra ya tratada con RNasa, en la que se obtuvieron 41.910 ng/µl.

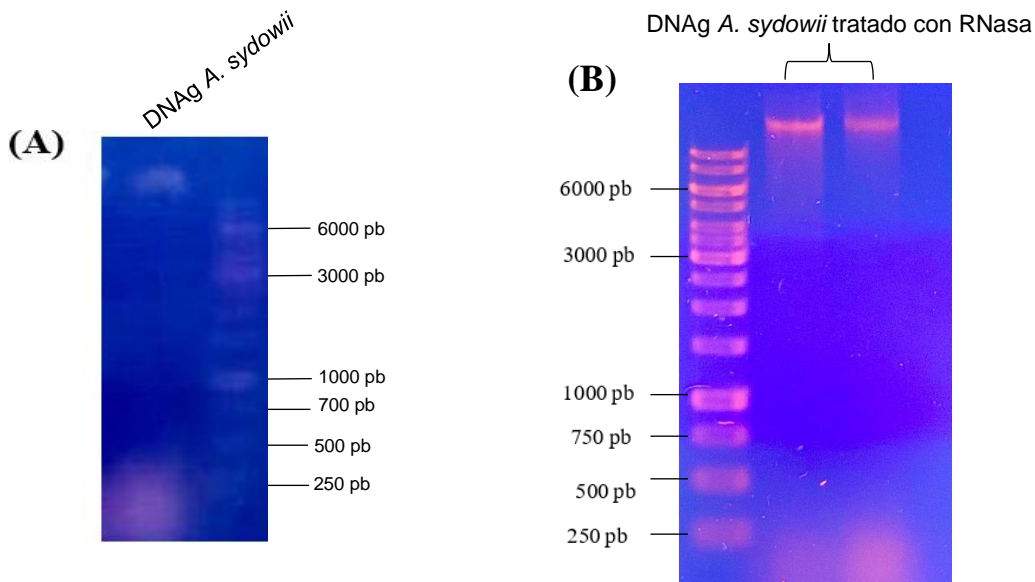


Figura 12: Purificación de DNA genómico. (A) Purificación del DNAg de *A. sydowii*. (B) DNAg de *A. sydowii* tratado con RNasa, obteniendo una concentración de 41.910 ng/µl. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

8.2.- Purificación del plásmido pUE10 para amplificar el gen de resistencia a higromicina (*hph*)

También se purificó al plásmido pUE10 (por el método de lisis alcalina por columna) para usarlo como molde en la amplificación del gen de resistencia a higromicina (*hph*).

Este paso permitió generar un “cassette”: flanqueante *sih* 5´ - *hph* - flanqueante *sih* 3´ a través del PCR doble unión. En la figura 13 se muestra el plásmido pUE10 purificado con una concentración de 553.238 ng/µl.

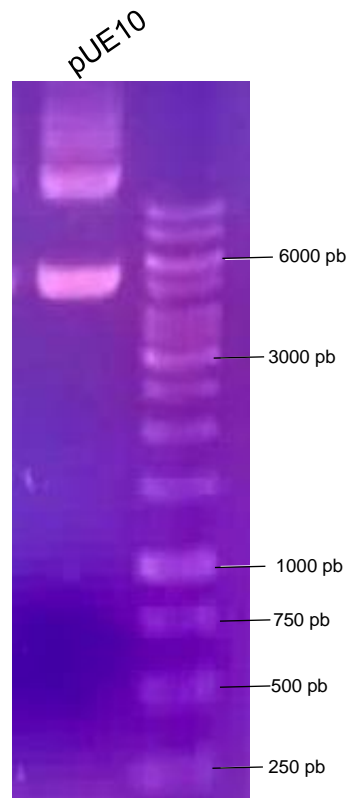


Figura 13: Purificación del plásmido pUE10. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

### 8.3.- Amplificación de las regiones flanqueantes 5´ y 3´ de los genes *sih*, y el gen de resistencia a higromicina (*hph*)

En la Figura 14 se muestra una electroforesis en gel de agarosa donde se observa la amplificación de las regiones flanqueantes 5´ y 3´ de los genes de las hidrofobinas (*sih1*, *sih2*, *sih4*), con la DNA polimerasa Amplicasa. Se observa que no se obtuvieron todos los amplicones, posiblemente porque las condiciones de la reacción y de la amplificación no eran las adecuadas. Se utilizó una concentración de 4.191 ng/µl de DNAg y 55.323 ng/µl del plásmido pUE10 para amplificar a *hph*. Como control de la integridad y de pureza del ADNg se amplificó la región ribosomal *its* (interspaced ribosomal region). En la tabla 3 se observa las condiciones utilizadas para la amplificación de las regiones flanqueantes 5´ y 3´ de los genes *sih*, y el gen *hph*.

Tabla 3. Condiciones utilizadas en el termociclador para la amplificación de las regiones flanqueantes 5´ y 3´ de los genes *sih*, y el gen *hph*.

Condiciones de PCR	Temperatura	Tiempo
Temperatura de Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Temperatura de alineamiento	55 °C	20 segundos
Temperatura de extensión	72 °C (Verifi) 72 °C (Amplicasa)	45 segundos 1.3 minutos

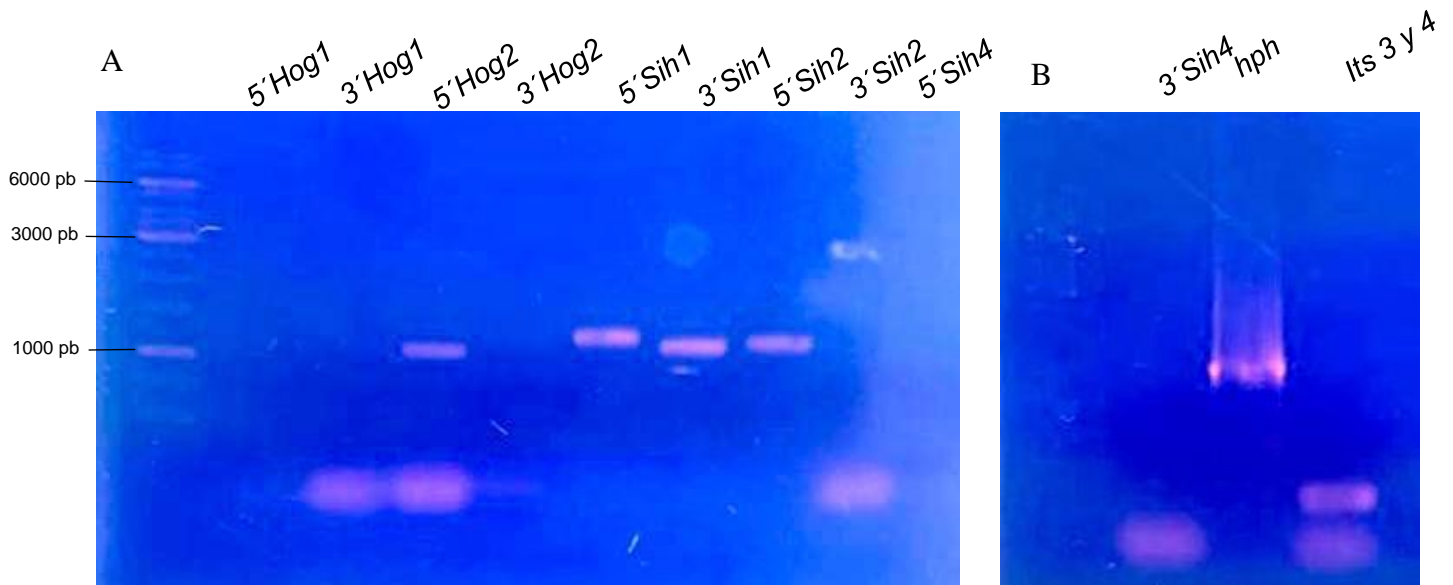


Figura 14: Amplicones obtenidos de los brazos 5' y 3' de las regiones flanqueantes de las hidrofobinas y el gen de la *hph*. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Debido a que no se amplificaron las regiones flanqueantes 3´*sih2*, 5´*sih4* y 3´*sih4*, se incrementó la concentración de oligonucleótidos, de 0.5 µM a 1.5 µM y DNAg, de 4.15 ng/ µl a 8.38 ng/µl, utilizando a la DNA polimerasa Amplicasa. En la Figura 15 se observan los amplicones obtenidos de las regiones flanqueantes ausentes 3´*sih2*, 5´*sih4* pero no el amplicón del gen *hph*.

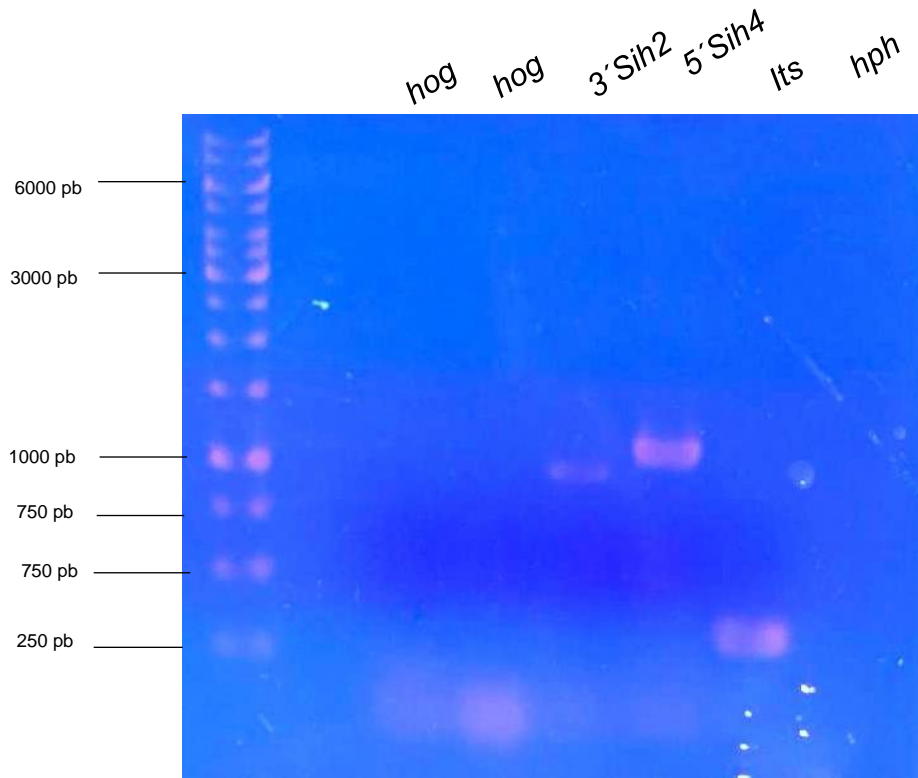


Figura 15: Amplificación de las regiones flanqueantes 5´ y 3´ de las hidrofobinas de *A. sydowii* (*sih2* y *sih4*) y del gen *hph*. Como se observa en el gel, los amplicones obtenidos fueron 3´*sih2*, 5´*sih4* esta vez con ausencia del gen de resistencia a higromicina (*hph*). Teniendo como control positivo a la región ribosomal *its* 3 y 4. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).



Por tanto, la región que faltaba por amplificar era 3´*sih4*. En este experimento, se incrementó la concentración de oligonucleótidos a 2 µM, utilizando nuevamente a la DNA polimerasa Amplicasa, sin embargo no hubo amplificación. Se observa que en este si se obtuvo el amplicón del gen *hph*, en esta amplificación se usaron 12.1 ng/µl del plásmido molde (Figura 16).

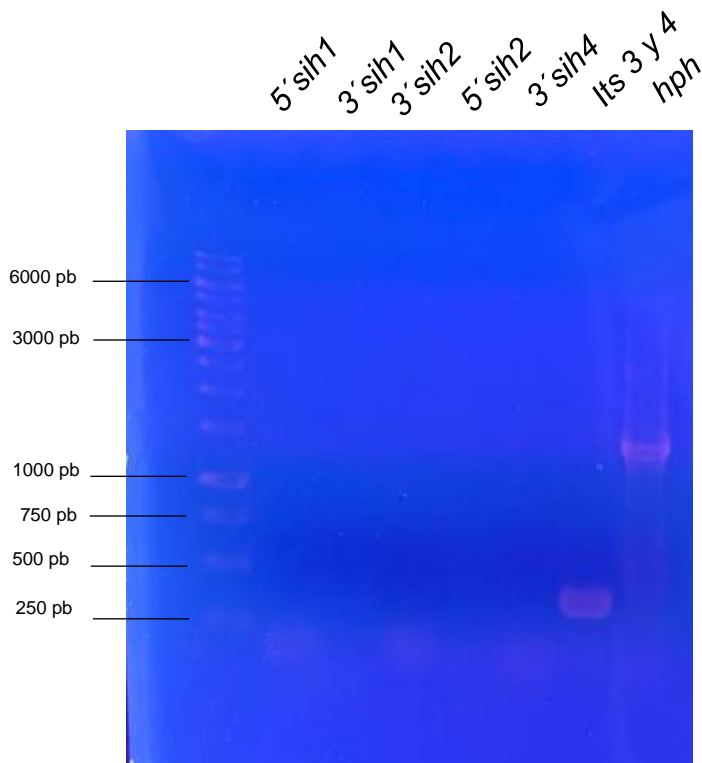


Figura 16: Amplificación de las regiones flanqueantes de las hidrofobinas. Control positivo de *Its 3 y 4* (carril 7). Gen de resistencia a higromicina (*hph*) (carril 8). Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

En la figura 17 se muestran los fragmentos amplificados de las regiones flanqueantes 5' y 3' de la *sih1*, *sih2*, *sih4* excepto la región flanqueante 3' *sih4*. La tabla 4 muestra un resumen de los experimentos realizados para la estandarización de la amplificación de los fragmentos.

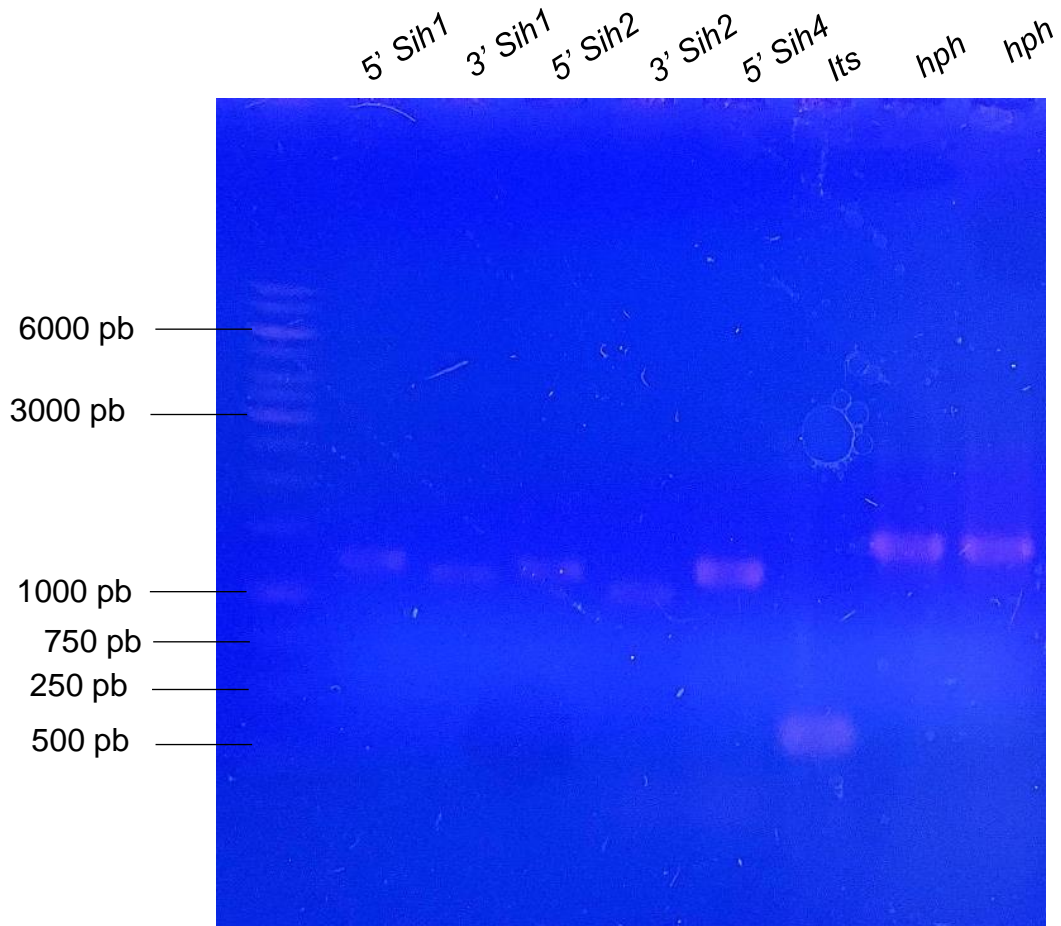


Figura 17: Amplificación de las regiones 5' y 3' flanqueantes de las *sih1*, *sih2* y *sih4*. Región ribosomal *Its* como control positivo (carril 7). Electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x. Marcador de peso molecular (MPM).

Tabla 4. Amplificación de las regiones flanqueantes con sus respectivas condiciones

Amplificón	5' <i>sih1</i> 3' <i>sih1</i> 5' <i>sih2</i> 3' <i>sih2</i> 5' <i>sih4</i> 3' <i>sih4</i> <i>hph</i> 03/10/22	5' <i>sih4</i> 3' <i>sih2</i> 02/11/22	3' <i>SiH4</i> 17/02/23	5' <i>sih1</i> 3' <i>sih1</i> 5' <i>sih2</i> 3' <i>sih2</i> 5' <i>sih4</i> 3' <i>sih4</i> <i>hph</i> 08/11/22
DNA Polimerasa	Amplicasa	Amplicasa	Amplicasa	Verifi
Temperatura de alineamiento	55 °C 35"	55 °C 35"	55 °C 35"	55 °C 20"
[ ] Molde	DNAg A. sydowii (4.2 ng) Pue10 (55 ng)	DNAg A. sydowii (8.3 ng) Pue10 (55 ng)	DNAg A. sydowii (8.3 ng) Pue10 (55 ng)	DNAg A. sydowii (8.3 ng) Pue10 (55 ng)
[ ] oligonucleótidos	1 µl = 0.5 µM 0.5 µM ( <i>hph</i> )	3 µl = 1.5 µM	2 µl = 2 µM	3 µl = 1.5 µM 0.5 µM ( <i>hph</i> )
¿Amplificó?	<b>Si</b> (5' <i>sih1</i> , 3' <i>sih1</i> y 5' <i>sih2</i> , 3' <i>sih4</i> ) <b>Si</b> ( <i>hph</i> ) No (5' <i>sih4</i> y 3' <i>sih2</i> )	<b>Si</b>	No	<b>Si</b>

Por tanto, una vez que establecimos las condiciones necesarias para la amplificación de las regiones flanqueantes de hidrofobinas utilizando a la Amplicasa (Taq pol, una polimerasa que no es de alta fidelidad) (*sih1*, *sih2*, *sih4*) (Tabla 5), se repitió la amplificación ahora usando a la polimerasa de alta fidelidad PCR BIO HS Verifi™ Polimerase (PCR BIOSYSTEMS). La que tiene una tasa de error menor (100 veces menos) y mayor velocidad que la Taq polimerasa, de 30 s/1 kb vs 1 kb/ mn. Esta polimerasa de alta fidelidad disminuye la inespecificidad y la formación de dímeros en los oligonucleótidos. En la figura 18 se muestran las amplificaciones de las regiones previamente mencionadas. En este se observa que se obtuvieron todos los fragmentos de las regiones genómicas, así como del gen *hph* con los tamaños esperados.

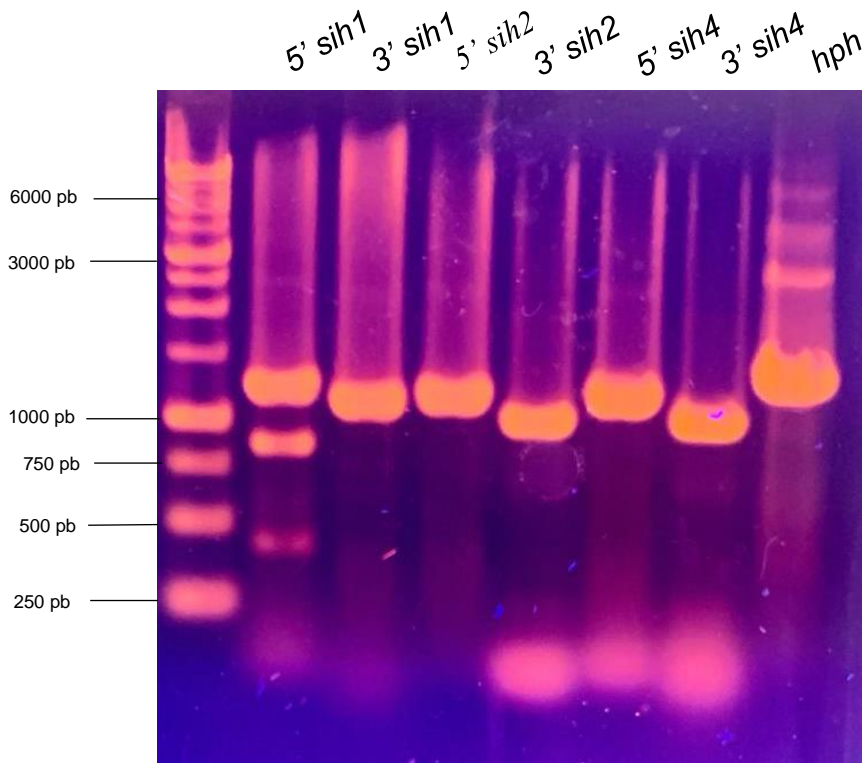


Figura 18: Amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' de las hidrofobinas (*sih1*, *sih2* y *sih4*). Y del gen de resistencia a higromicina (*hph*) obtenidas de la PCR realizada con la PCR BIO HS Verifi™ Polimerase. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

#### 8.4.- Purificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' de los genes *sih*, y el gen de resistencia a higromicina (*hph*)

Debido a que se observan bandas inespecíficas en la amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' (Figura 18), se procedió a purificar los fragmentos de tamaño predicho (Figura 19), cortando la banda correspondiente y se purificó con el kit (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit). Una vez purificados, se cuantifica (Tabla 5) y se revisa la integridad de los fragmentos (Figura 20).

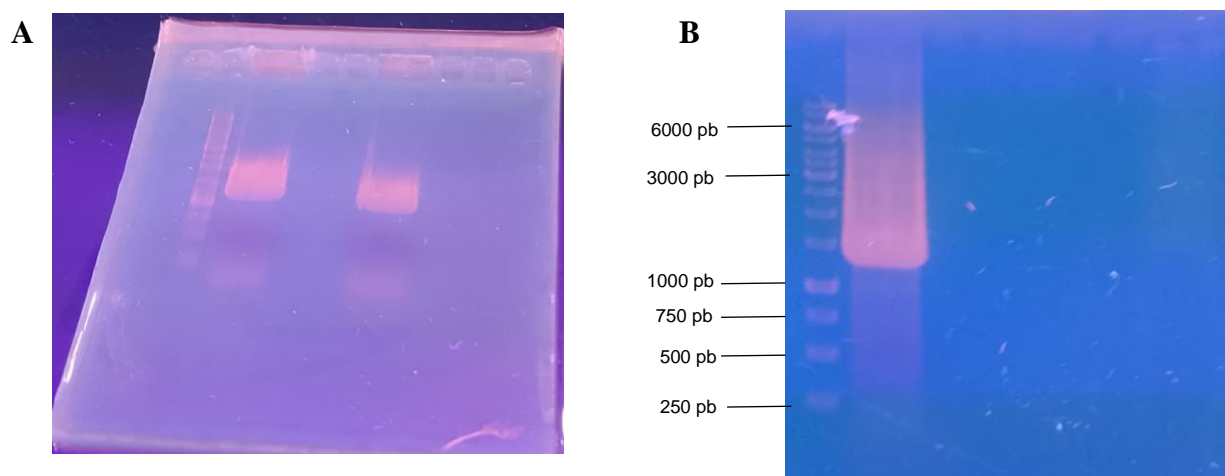


Figura 19. Purificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' de los genes de hidrofobinas y el gen de resistencia a higromicina (*hph*). Geles preparativos para la purificación de los amplicones de las regiones flanqueantes (A) y el gen *hph* (B). Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Tabla 5. Tamaño de los amplicones de las regiones flanqueantes de las hidrofobinas y del gen de resistencia a higromicina, y las concentraciones obtenidas después de la purificación.

Amplicones	Tamaño	Concentración (ng/ul)
5' <i>sih1</i>	1220 pb	16.5 ng
3' <i>sih1</i>	1119 pb	11.5 ng
5' <i>sih2</i>	1169 pb	10 ng
3' <i>sih2</i>	1012 pb	4.2 ng
5' <i>sih4</i>	1267 pb	19.3 ng
3' <i>sih4</i>	1184 pb	7.4 ng
<i>hph</i>	1397 pb	50.9 ng

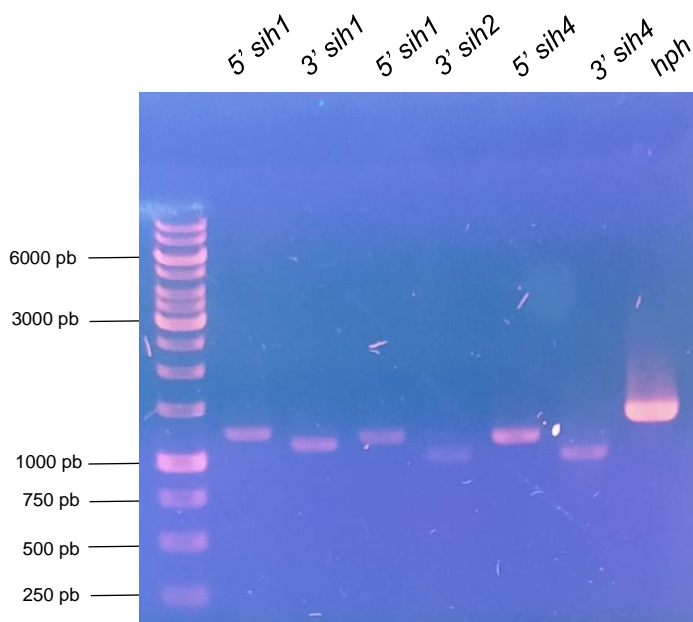


Figura 20. Purificación de los amplicones de las regiones flanqueantes 5' y 3' de los genes *sih* y el gen *hph* con el kit (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit). Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

#### 8.5.- Reacción de empalme PCR Double Joining

Una vez que se amplificaron las regiones flanqueantes 5' y 3' de los genes *sih1*, *sih2* y *sih4* se procedió a realizar el PCR de doble unión o reacción de empalme. La relación molar utilizada fue de 1:3:1 correspondiente al "cassette" 5' *sih* - *hph* - *sih* 3' y con una cantidad total de DNA de 200 ng y un tiempo de alineamiento de 10 minutos para el protocolo original, que se redujo a 5 minutos porque la polimerasa utilizada en este estudio polimeriza 1kb/30sg (Yu *et al*, 2004). En la tabla 6 se muestra las condiciones utilizadas en el termociclador en esta reacción.

Se realizaron los cálculos pertinentes para hacer la mezcla de reacción. En la tabla 7 se observan los experimentos y las modificaciones realizadas para encontrar las condiciones más eficientes para generar el producto quimérico. Lo que observamos de manera recurrente es que la reacción de amplificación a partir de las reacciones de empalme fue más eficiente al utilizar la polimerasa Platinum Taq (Thermo Scientific). En la tabla 8 se muestra una comparativa de todas las DNA polimerasas utilizadas en el presente proyecto.

Tabla 6. Condiciones utilizadas en el termociclador en la reacción de empalme PCR Double Joining.

Condiciones de PCR	Temperatura	Tiempo
Temperatura de Desnaturalización	98 °C	30 segundos
Temperatura de alineamiento	58 °C	5 minutos
Temperatura de extensión	72 °C (Verify) 68 °C (Platinum)	5 minutos

Tabla 7. Condiciones utilizadas en cada experimento en la segunda reacción de PCR doble unión (reacción de doble empalme).

Gen	<i>sih1</i> 21/12/22	<i>sih2</i> 11/01/22	(Ensamble) <i>sih1</i> 12/01/23 (Ensamble)	<i>sih1</i> 14/02/23	<i>sih4</i> 22/02/23	<i>sih2</i> 22/02/23	<i>sih1</i> 29/03/23	<i>sih4</i> 29/03/23	<i>sih1</i> 10/02/23	<i>sih2</i> 10/02/23
Polimerasa	Verify	Verify	Ligasa	Verify	Verify	Verify	Platinum	Platinum	Platinum	Platinum
Temperatura de alineamiento	58 °C .10''	58 °C .20''	-	58 °C .20''	58 °C .20''	58 °C .20''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C 5'	58 °C 5'
{} Molde	5' <i>sih1</i> (56 ng) 3' <i>sih1</i> (54 ng) <i>hph</i> (183 ng)	5' <i>sih1</i> (51 ng) 3' <i>sih1</i> (43 ng) <i>hph</i> (185 ng)	5' <i>sih1</i> (50 fmol) 3' <i>sih1</i> (50 fmol) <i>hph</i> (50 fmol)	5' <i>sih1</i> (51 ng) 3' <i>sih1</i> (48 ng) <i>hph</i> (185 ng)	5' <i>sih4</i> (58 ng) 3' <i>sih4</i> (7 ng) <i>hph</i> (50 ng)	5' <i>sih2</i> (38 ng) 3' <i>sih2</i> (32.7 ng) <i>hph</i> (138 ng)	5' <i>sih1</i> (52 ng) 3' <i>sih1</i> (48 ng) <i>hph</i> (185 ng)	5' <i>sih4</i> (58 ng) 3' <i>sih4</i> (50.7 ng) <i>hph</i> (191 ng)	5' <i>sih1</i> (49 ng) 3' <i>sih1</i> (43.5 ng) <i>hph</i> (184 ng)	5' <i>sih2</i> (38 ng) 3' <i>sih2</i> (33 ng) <i>hph</i> (138 ng)
¿Amplificó?	No	No	No	<b>Sí</b>	No	No	No	<b>Sí</b>	No	No



Tabla 8. Tabla comparativa de las DNA Polimerasas utilizadas en las reacciones de PCR Double joining.

DNA Polimerasas	Tiempo de extensión	Actividad de exonucleasa 3' → 5'	Capacidad de extensión	Fidelidad	Tecnología "hot star"	Actividad de desoxinucleotidil transferasa terminal
Amplicasa	1 min/1kb	Ausente	5 kb	Baja	Ausente	Presente
Verifi	30s/1Kb	Presente	17,5 kb>	Alta (100 veces más que la Amplicasa)	Ausente	Ausente
Platinum	1 min/1kb	Presente	12-20 kb	Alta ( 6 veces más que la Amplicasa)	Presente	Presente

### 8.6.- Tercera reacción de la PCR Double Joining

Una vez que se realizó la reacción de empalme de los “cassettes” quiméricos *sih1*, *sih2* y *sih4* se procedió a hacer la tercera reacción, es decir, se amplifica al fragmento quimérico usando oligonucleótidos flanqueantes 5´ y 3´ de los genes *sih*. En la tabla 9, se muestran las condiciones de amplificación en el termociclador y en la figura 21 se observa el resultado de la amplificación del “cassette” quimérico de la *sih1*, usando la enzima PCR HS Verifi™ Polymerase, en la que se utilizaron 11.3 ng de molde y 0.4 µM de oligonucleótidos, se incluyó como un control positivo de la amplificación al “cassette” silvestre del locus *sih1* del genoma de *A. sydowii*.

Tabla 9. Condiciones utilizadas en el termociclador en la tercera reacción de PCR Double Joining.

Condiciones de PCR	Temperatura	Tiempo
Temperatura de Desnaturalización	94 °C	20 segundos
Temperatura de alineamiento	58 °C	30 segundos
Temperatura de extensión	72 °C (Verifi) 68 °C (Platinum)	2 minutos 4 minutos

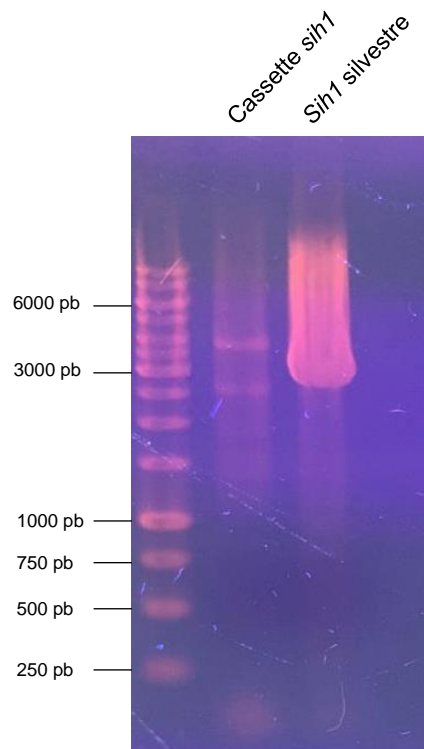


Figura 21. Amplificación del “cassette” quimérico de la *sih1* con un tamaño esperado de 3736 pb. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Dado que no hubo una amplificación eficiente, se hizo una segunda reacción con la Verifi™ Polymerase, incrementando a 1.0  $\mu$ M los oligonucleótidos, y con una concentración del templado de 11.3 o 22.6 ng para el “cassette” *sih1*. En la figura 22, se muestra la amplificación del “cassette” quimérico de la *sih1*, donde con 22.6 ng se observa mejor al amplicón.

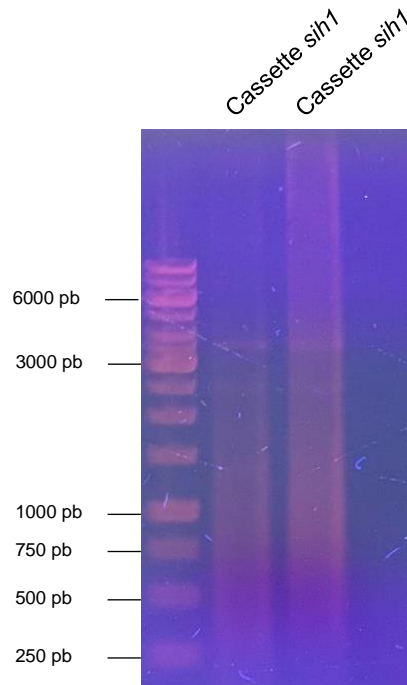


Figura 22. Amplificación del “cassette” quimérico de la *sih1* con una concentración de 11.3 (pocillo 2) y 22.6 ng de templado (pocillo 3). Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Dado que los productos para generar a los “cassettes” quiméricos se terminaron, se realizó otra amplificación y purificación del gen *hph*. En la figura 23 A se puede observar el gel de agarosa en el que se cargó la reacción de la *hph*, así como el fragmento quimérico de la *sih1* para su purificación. En la figura 23 B se observa que logramos purificar el amplicón de la *hph* pero no el “cassette” quimérico de la *sih1*.

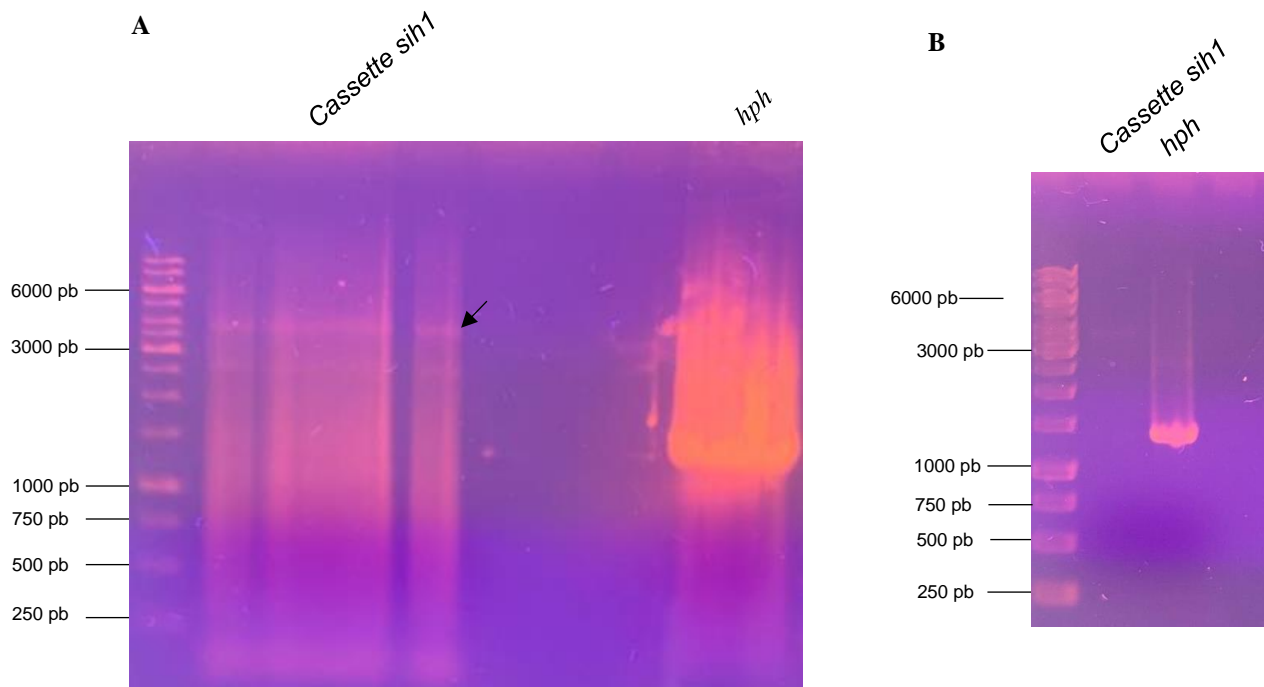


Figura 23. Purificación del “cassette” de la *sih1* y el gen *hph*. A) Gel preparativo para purificar el “cassette” quimérico de la *sih1* (señalado con la flecha de color negro) y el gen *hph*. B) Gen *hph* purificado con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Aun cuando se obtuvo la amplificación del “cassette” quimérico de la *sih1*, esta no fue eficiente, por lo que se realizó otro experimento usando a la PCR HS Verifi™ Polymerase. Se hicieron dos reacciones de amplificación para la quimera de la *sih1* y *sih4*, una en la que se añadió un reactivo que mejora la reacción (enhancer) y otra reacción sin enhancer, así como dos temperaturas de alineamiento (58 °C y 60 °C). En la figura 24 se observa que no hubo amplificación del “cassette” *sih1* y aunque hay un amplicón en la reacción para la *sih4*, este no corresponde al tamaño esperado (3848 pb).

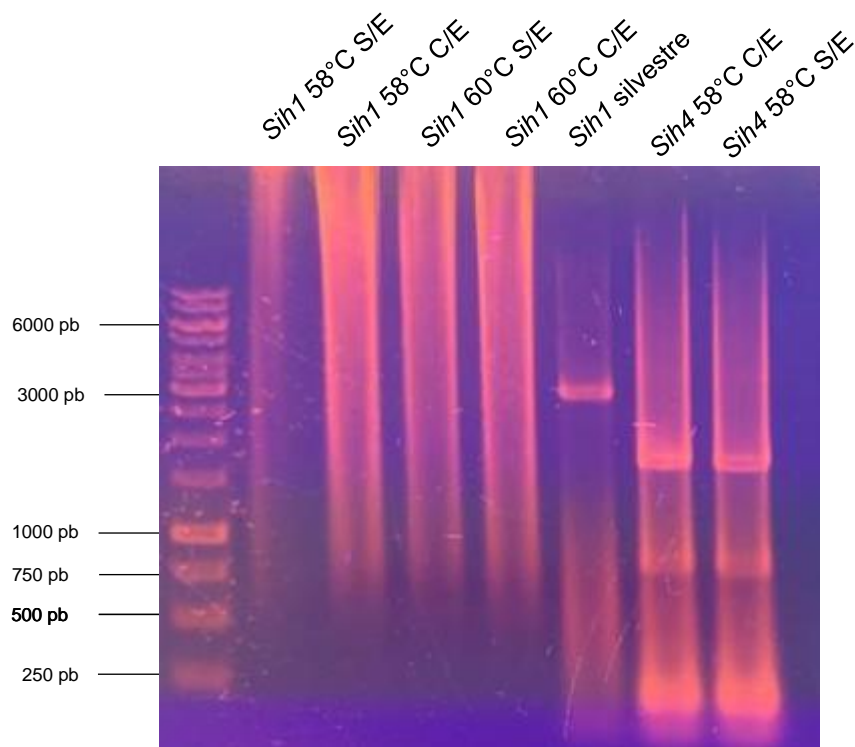


Figura 24. Productos inespecíficos generados, con dos temperaturas de alineamiento para el “cassette” quimérico de la *sih1* (58 °C y 60 °C) y *sih4* con y sin enhacer. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Posteriormente se realizó otro experimento de PCR para amplificar el “cassette” *sih1* usando diferentes moldes (molde del producto de la reacción de ensamble original, molde de una purificación previa y una re-amplificación usando como molde un producto de PCR del “cassette” *sih1*) a diferentes concentraciones, y utilizando la polimerasa Platinum Taq (Thermoscientific) (Figura 25).

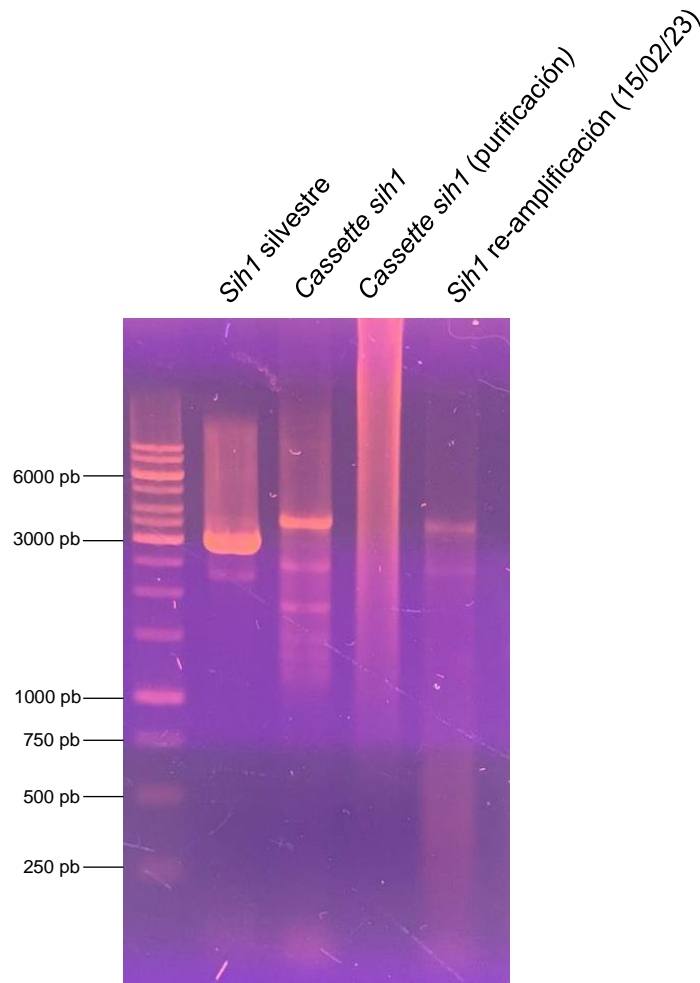


Figura 25. Amplificación del “cassette” recombinante de la *sih1*. La *sih1* silvestre como control (pocillo 2), los “cassettes” quiméricos de la *sih1* con un molde proveniente del producto de la reacción de ensamble original (pocillo 3), molde de la purificación previa (pocillo 4) y una re-amplificación usando como molde un producto de PCR del “cassette” recombinante de la *sih1* (pocillo 5). Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Se analizaron las reacciones que se habían llevado a cabo (Tabla 10), y se determinó que 0.2  $\mu\text{M}$  de oligonucleótidos, 22.6 ng de templado y utilizando la enzima Platinum Taq mejora la amplificación del “cassette” *sih1*.

Tabla 10. Condiciones utilizadas en cada experimento en la tercera reacción de PCR doble unión.

Gen	<i>sih2</i> <i>sih1</i> 09/02/23	<i>sih1</i> 15/02/23	<i>sih1</i> 17/02/23	<i>sih4</i> <i>sih1</i> <i>sih2</i> <i>hog1</i> 22/02/23	<i>sih1</i> <i>sih4</i> 24/02/23	<i>sih1</i> <i>sih4</i> 25/02/23	<i>sih1</i> <i>sih1</i> 28/02/23	<i>sih1</i> 02/03/23	<i>sih1</i> 03/03/23	<i>sih1</i> 06/03/23	<i>sih1</i> <i>sih4</i> 07/03/23	<i>sih1</i> <i>sih2</i> 14/03/23
Polimerasa	Verifi	Verifi	Verifi	Verifi	Verifi	Verifi	Verifi	Platinum	Platinum	Platinum	Platinum	Platinum
Temperatura de alineamiento	58 °C .20''	58 °C .20''	58 °C .20''	58 °C .20''	58 °C y 60 58 °C .20''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''
[ ] Molde	<i>Si</i> h2 DJ (11.2 ng) <i>Si</i> h1 DJ (11.3 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (11.3 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (22.3 ng) <i>Si</i> h2 DJ (11.3 ng)	<i>Si</i> h4 DJ (11.79 ng) <i>Si</i> h1 DJ (11.3 ng) <i>Si</i> h2 DJ (11.2 ng)	Cassette <i>sih1</i> Purificado (16 ng) <i>Si</i> h4 DJ (23.592 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (22.6 ng) <i>Si</i> h4 DJ (23.59 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (22.6 ng) Cassette <i>sih1</i> purificado. (24.9 ng) (11.3 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (9 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (22.6 ng) <i>sih</i> re-amplificación (-)	<i>Si</i> h1 DJ (22.6 ng) <i>Si</i> h4 DJ (33.9 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (11.3 ng) <i>Si</i> h4 DJ (11.79 ng) <i>Si</i> h2 DJ (23.592 ng) <i>Si</i> h4 DJ (35.38 ng)	<i>sih1</i> (22.6 ng) <i>sih2</i> (31.3 ng)
[ ] Oligonucleótidos	1 $\mu\text{l}$ = 0.4 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$ = 0.4 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{l}$ = 0.8 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$ = 0.4 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$ = 0.4 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.15 $\mu\text{M}$ 0.3 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$
¿Amplificó?	No	<b>Si</b>	<b>Si</b>	No ( <i>sih4</i> ) No ( <i>sih1</i> ) No ( <i>Si</i> h2) <b>Si</b> ( <i>hog1</i> )	No	No	<b>Si</b> ( <i>Si</i> h1 DJ) No (cassette <i>sih1</i> purificado) <b>Si</b> (Reamplificación del cassette <i>sih1</i> )	No	<b>Si</b> ( <i>Si</i> h1 DJ) No ( <i>sih</i> re-amplificación)	<b>Si</b>	<b>Si</b> ( <i>sih1</i> ) No ( <i>sih4</i> )	No

Gen	<i>sih1</i> <i>sih4</i> 29/03/23	<i>sih1</i> <i>sih4</i> 30/03/23	<i>sih1</i> <i>sih4</i> 31/03/23	<i>sih4</i> 17/04/23	<i>sih1</i> <i>sih2</i> 19/04/23	<i>sih1</i> <i>sih2</i> 26/04/23	<i>sih1</i> <i>sih4</i> 27/04/23	<i>sih1</i> <i>sih2</i> 25/05/23	<i>sih1</i> 31/05/23
Polimerasa	Platinum	Platinum	Platinum	Platinum	Verify	Verifi	Verifi Platinum	Verifi	Verifi
Temperatura de alineamiento	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''	58 °C .30''
[ ] Molde	<i>Si</i> h4 DJ (30 ng) (28.58 ng)	Re-amplificación del cassette <i>sih1</i> (-) <i>si</i> h4 DJ (28.58 ng)	<i>sih1</i> purificado 24 ng <i>Si</i> h4 DJ 28.58 ng	<i>Si</i> h4 DJ (28.58 ng)	<i>sih1</i> (2.3 ng) <i>si</i> h2 (20.9 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (22.6 ng) <i>Si</i> h4 DJ (22 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (22.6 ng) <i>Si</i> h4 DJ 28.58 ng	<i>Si</i> h1 DJ (22.8 ng) <i>Si</i> h2 DJ (22 ng)	<i>Si</i> h1 DJ (22.8 ng) <i>Si</i> h1 DJ (22 ng)
[ ] Oligonucleótidos	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{l}$ = 0.2 $\mu\text{M}$
¿Amplificó?	No ( <i>sih1</i> ) <b>Si</b> ( <i>sih4</i> )	<b>Si</b>	No ( <i>sih1</i> ) <b>Si</b> ( <i>sih4</i> )	<b>Si</b>	No	<b>Si</b> ( <i>sih2</i> ) No ( <i>sih1</i> )	No ( <i>sih1</i> ) <b>Si</b> ( <i>sih4</i> )	No ( <i>sih1</i> ) No ( <i>sih2</i> )	No



Una vez que se determinaron las condiciones ideales para la amplificación de los “cassettes” recombinantes, se llevaron a cabo las reacciones de amplificación de los “cassettes” quiméricos de la *sih1*, *sih2* y *sih4* (Figura 26).

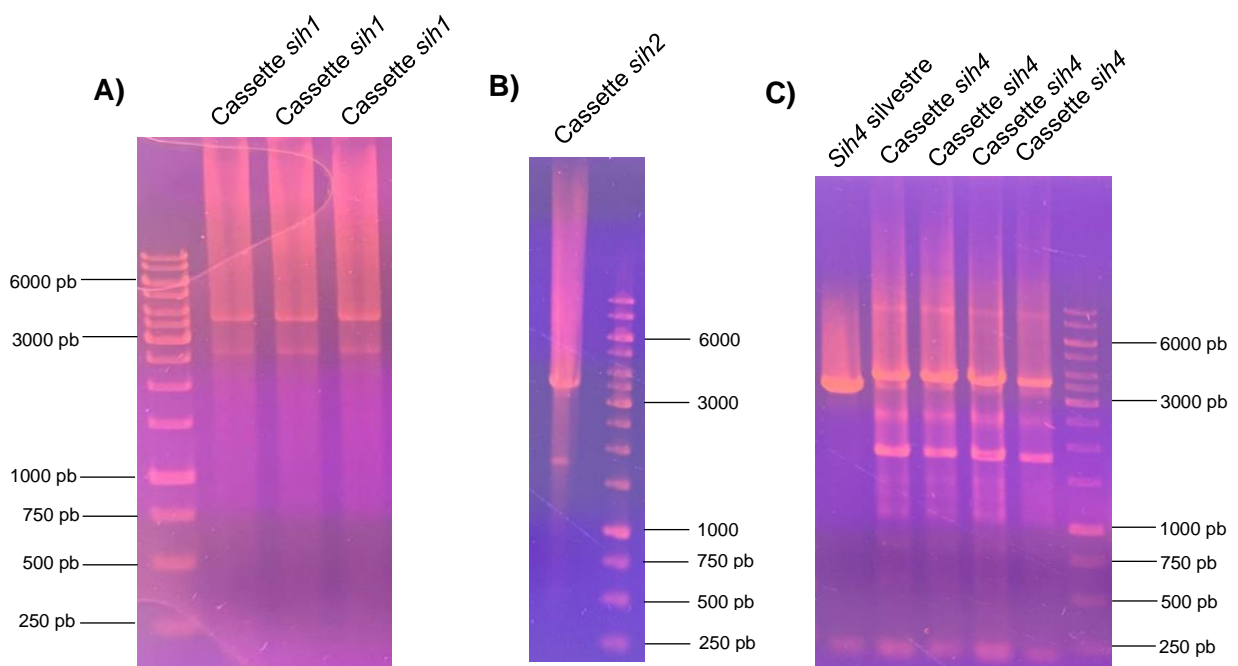


Figura 26. Amplificación de los “cassettes” recombinantes de la *sih1*, *sih2* y *sih4*. A) “Cassette” quimérico de la *sih1* (3736 pb), B) “cassette” quimérico de la *sih2* (3578 pb), C) “cassette” quimérico de la *sih4* (3848 pb). Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Una vez que se han amplificado los “cassettes” quiméricos, estos deben purificarse. Para tal propósito se realizó una comparación de la purificación del gen de resistencia a higromicina (*hph*) con diferentes kits de purificación para geles: 1) GeneJET gel extracción Kit Thermo Scientific, 2) NZYGelpure Kit y 3) Zymoclean TM Gel DNA Recovery Kit (Zymo) para usar el más eficiente en la purificación de los fragmentos recombinantes. En la figura 27 se observa la integridad de los amplicones de la *hph* purificados, en los que se obtuvieron con las siguientes concentraciones: 31.7 ng/μl (volumen final 30 μl) y 20 ng/μl (volumen final 20 μl) para el GeneJET gel extracción Kit Thermo Scientific; 41 ng/μl (volumen final 30 μl) y 13.69 ng/μl (volumen final 20 μl) correspondiente al NZYGelpure Kit; 51.5 (volumen final 20 μl) y 10.96 ng/μl (volumen final 30 μl) correspondiente al Zymoclean TM Gel DNA Recovery Kit (Zymo) (Tabla 11).

Tabla 11. Concentraciones obtenidas de cada purificación del gen de resistencia a higromicina (*hph*) con su respectivo kit de purificación.

Kit de purificación	[ ]
<b>GeneJET gel extracción Kit Thermo Scientific</b> (Volumen final: 30 ul)	31.7 ng/μl
<b>GeneJET gel extracción Kit Thermo Scientific</b> (Volumen final: 20 ul)	20 ng/μl
<b>NZYGelpure Kit</b> (Volumen final: 30 ul)	41 ng/μl
<b>NZYGelpure Kit</b> (Volumen final: 20 ul)	13.69 ng/μl
<b>Zymoclean TM Gel DNA Recovery Kit (Zymo)</b> (Volumen final: 30 ul)	10.96 ng/μl
<b>Zymoclean TM Gel DNA Recovery Kit (Zymo)</b> Volumen final: 20 ul)	51.5 ng/μl

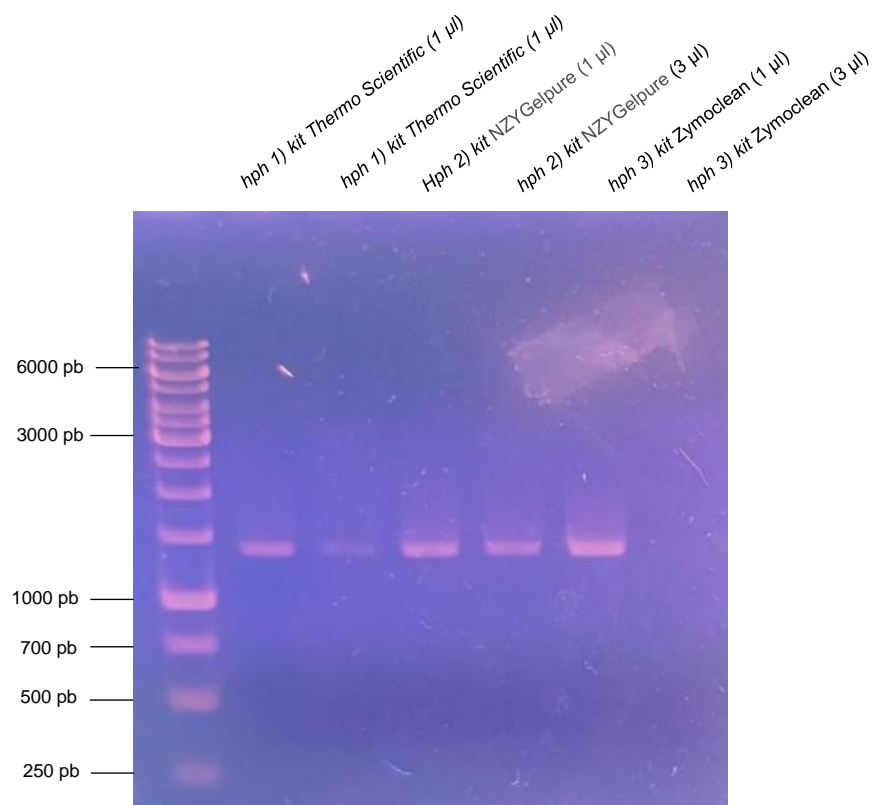


Figura 27. Fragmentos del gen de resistencia a higromicina (*hph*) purificados. Utilizando los kits: 1) GeneJET gel extracción Kit Thermo Scientific, 2) NZYGelpure Kit y 3) Zymoclean TM Gel DNA Recovery Kit (Zymo). Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

También se hizo una purificación de banda del gen *hph* extrayendo con: 1) fenol 2x, 2) con fenol 3x y 3) fenol 2x y cloroformo 1x, obteniendo las siguientes concentraciones: 55 ng/μl, 119 ng/μl y 205 ng/μl, respectivamente (Tabla 12). Posteriormente se verificó la integridad de cada amplicón (Figura 28).

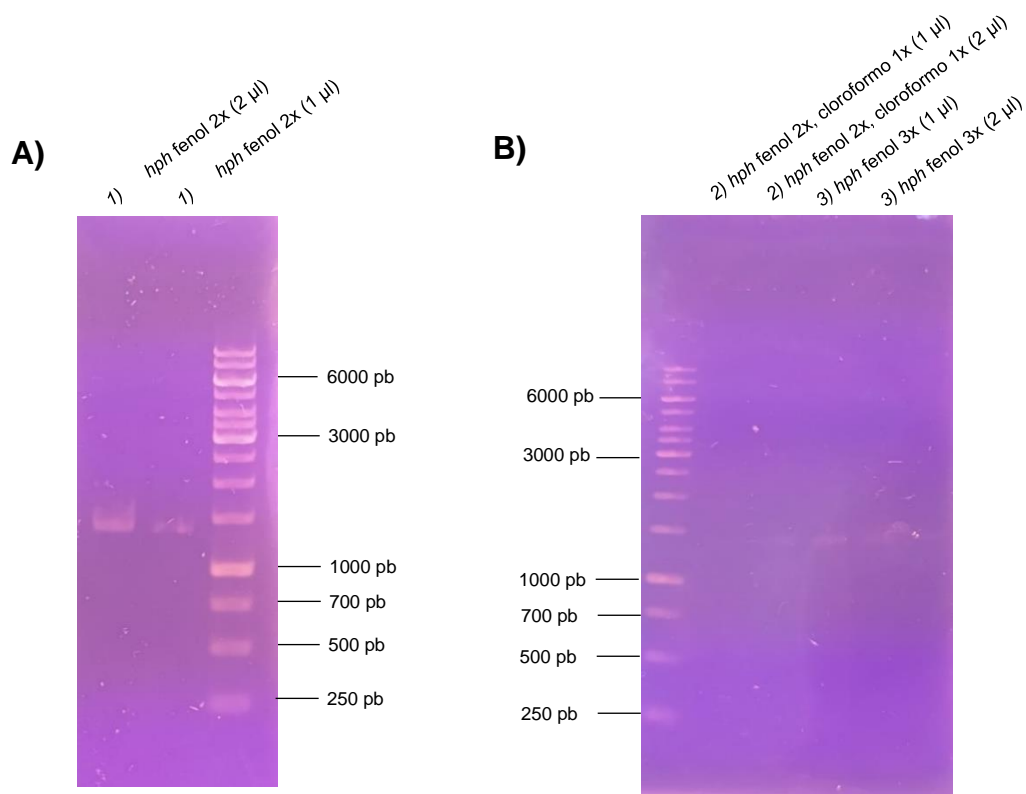


Figura 28. Fragmentos del gen de resistencia a higromicina (*hph*) purificados. A) Extrayendo con: 1) fenol 2x (pocillo 1 y 2), y B) 2) con fenol 2x y cloroformo 1x (pocillo 2 y 3), y 3) fenol 3x (pocillo 4 y 5). Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

Tabla 12. Concentraciones obtenidas de cada purificación del gen de resistencia a higromicina (*hph*) con su respectivo tipo de extracción.

Purificación con su respectivo tipo de extracción	Extracción con fenol 2x	Extracción con fenol 3x	Extracción con fenol 2x y cloroformo 1x
[ ]	55 ng/μl	119 ng/μl	205 ng/μl

Una vez que se obtuvo una concentración de más de 1 microgramo de los “cassettes” quiméricos, estos deben concentrarse para después transformar a *A. sydowii*. En la figura 29 se muestra los fragmentos quiméricos purificados de la *sih1*, *sih2* y con el kit de purificación de GeneJET gel extracción Kit Thermo Scientific y se obtuvieron las concentraciones que se indican en la Tabla 12.

Tabla 13. Concentraciones obtenidas en la purificación de los “cassettes” recombinantes.

Cassette recombinante	[ ]
<b><i>sih1</i></b>	9.33 ng/ $\mu$ l
<b><i>sih2</i></b>	19.128 ng/ $\mu$ l
<b><i>sih4</i></b>	14.32 ng/ $\mu$ l

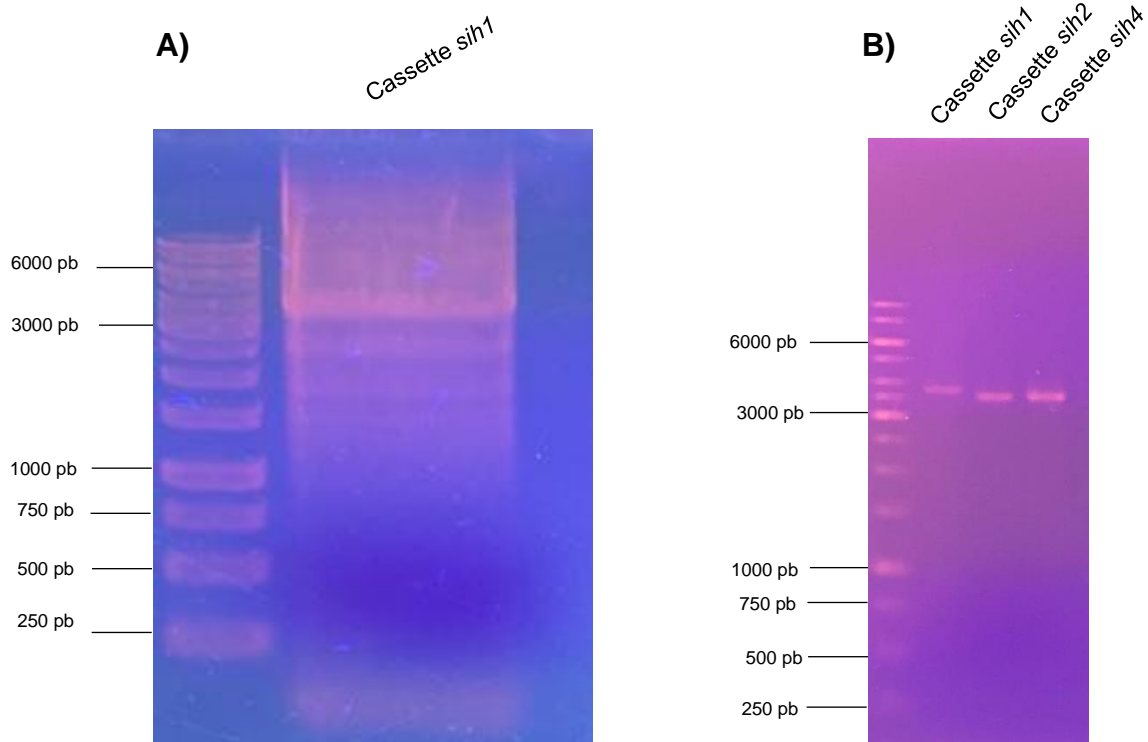


Figura 29. Purificación de los “cassetes” recombinantes de las hidrofobinas *sih1*, *sih2* y *sih4*. A) Gel preparativo de un ejemplo de un “cassette” quimérico de la hidrofobina *sih1*. B) “Cassetes” quiméricos purificados de la *sih1*, *sih2* y *sih4*. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng).

### 9.- Cinética de crecimiento de *A. sydowii* en PDA suplementado con sorbitol

El proyecto en el que se inserta la presente tesis tiene como objetivo evaluar el comportamiento de las mutantes de las hidrofobinas de *A. sydowii* frente al estrés salino impuesto por concentraciones mayores a la de su óptimo de crecimiento (0.5 – 1.0 M), es decir 1.5, 2.0 o 3.0 M de NaCl. Sin embargo, también es importante evaluar la respuesta de estas mutantes frente al estrés osmótico impuesto por otros solutos como el sorbitol o el glicerol, los cuáles no generan estrés iónico en contraste con el NaCl, debido a que la misma vía de HOG sensa el estrés osmótico inducido por solutos con o sin carga. De manera interesante, el hongo *Trichoderma guizhouense* que sobreexpresa a la hidrofobina HFB2 (0.75 M, 1.0 M y 1.5 M) es resistente a estrés osmótico tanto por NaCl como por sorbitol (Cai, *et al*, 2021). Por lo tanto, es relevante evaluar la tolerancia de *A. sydowii* a concentraciones elevadas de solutos como el sorbitol (Figura 30). Dado que no conocemos cuál es la tolerancia de *A. sydowii* frente al estrés osmótico impuesto por este poliol se realizó una cinética de crecimiento utilizando concentraciones crecientes de sorbitol (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 M) en medio PDA y como control la condición sin sorbitol. La figura 31 muestra que este hongo es también tolerante a sorbitol y que su óptimo de crecimiento en este soluto se da en las concentraciones de 1.0 y 1.5 M de sorbitol, y que incluso tolera hasta 3.0 M.

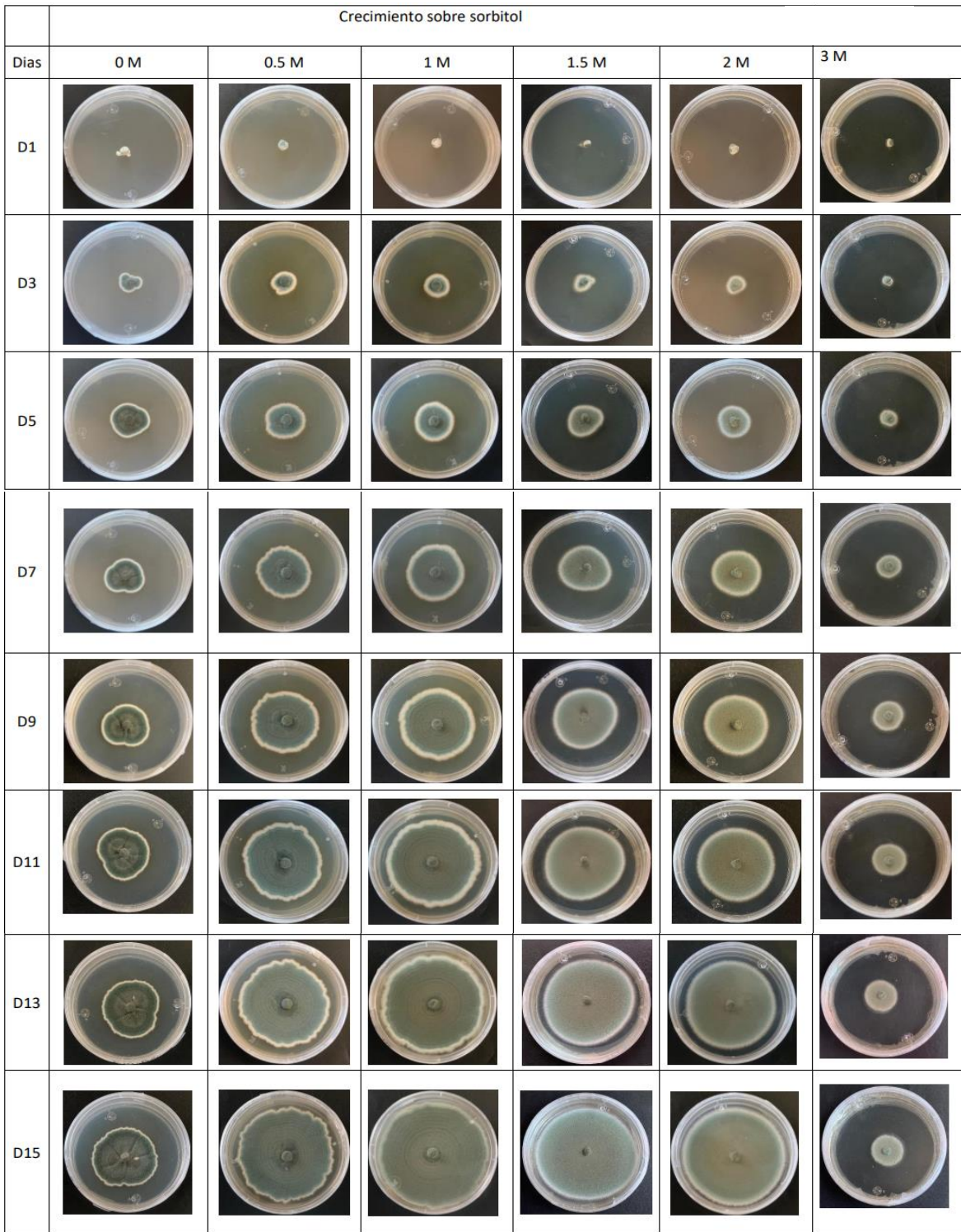


Figura 30. Cinética de crecimiento de *A. sydowii* en concentraciones crecientes de sorbitol. El hongo se creció en medio PDA suplementado en las concentraciones de sorbitol que se indican en la figura por 15 días, se tomó la medida del diámetro cada tercer día. Se observa que *A. sydowii* es tolerante a altas concentraciones de sorbitol en diferentes días.



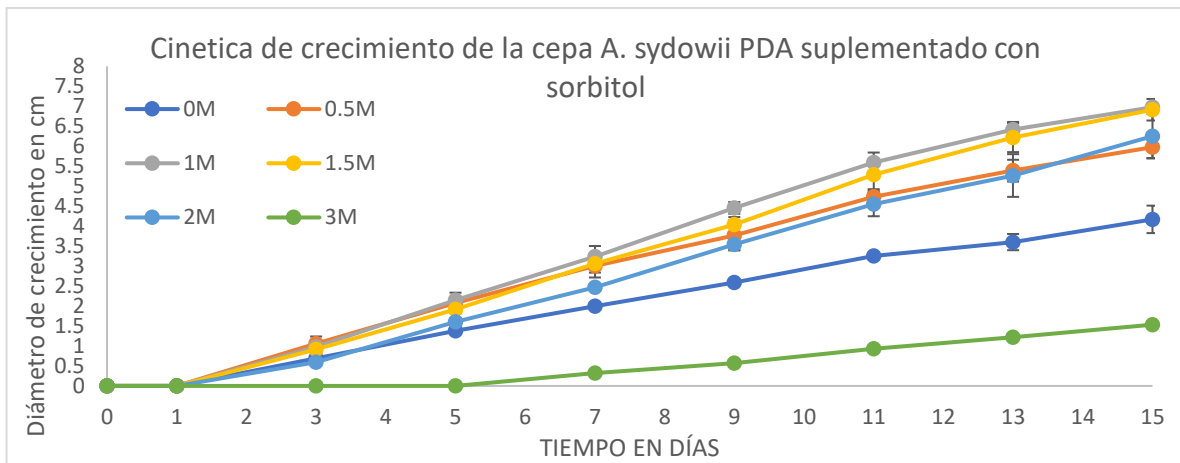


Figura 31. Tolerancia de *A. sydowii* a sorbitol.

Tabla 14. Promedio de crecimiento por día de *A. sydowii* en sorbitol.

Condición	Cm/día
0 M	0.285 ± 0.025
0.5 M	0.432 ± 0.023
1.0 M	0.49 ± 0.050
1.5 M	0.489 ± 0.025
2 M	0.469 ± 0.049
3 M	0.154 ± 0.013

Tabla 15. Actividad de agua del sorbitol y cloruro de sodio de acuerdo con sus respectivas concentraciones.

Compuesto	[ ]	Aw
Sorbitol	0 M	1.0
	1.0 M	0.98
	1.5 M	0.97
	2.0 M	0.96
	3.0 M	0.94
NaCl	0 M	1.0
	0.5 M	0.98
	1.0 M	0.96
	1.5 M	0.94
	2.0 M	0.91
	3.0 M	0.86

## 10.- Discusión

### 10.1.- Generación de los “cassettes” quiméricos de la *sih1*, *sih2* y *sih4*.

Un factor fundamental para poder generar a las líneas mutantes de las hidrofobinas es amplificar los “cassettes” recombinantes de la *sih1*, *sih2* y *sih4*, lo cual es un reto debido a que se requiere amplificar secuencias problemáticas como las ricas en G-C. Para la amplificación de estas secuencias, se requiere que al diseñar los oligonucleótidos se ponga atención en la especificidad, especialmente en sus extremos 3', además se debe analizar que estos no generen dímeros, para evitar amplificaciones inespecíficas, así como diseñarlos de preferencia con longitudes de entre 20 y 30 nucleótidos, un contenido de G-C de 40 a 60% y con una T<sub>m</sub> preferencialmente entre los 55 y 65°C (Salazar *et al*, 2013). En el presente estudio, la longitud de los oligonucleótidos utilizados oscila entre los 19 y 48 pb, con una T<sub>m</sub> que va desde los 55 a 60 °C y un porcentaje de C-G de 43 a 55 %, con excepción del cebador anidado sentido de la *sih1*, el cual tiene un porcentaje de 63% de G-C. A pesar de su alto contenido de GC, el “cassette” quimérico de la *sih1* se amplificó eficientemente. Por otro lado, los oligonucleótidos quiméricos poseen un alto contenido de nucleótidos; sin embargo, esto no afectó la correcta amplificación de los “cassettes”. Otro factor para obtener una cantidad suficiente de amplicones quiméricos, es el tipo de ADN polimerasa elegida. En este estudio se utilizaron diversas ADN polimerasas. Inicialmente, se utilizó a la Taq polimerasa (utilizada en la amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3') para estandarizar las condiciones de amplificación de los fragmentos requeridos. Posteriormente, se utilizó la PCR BIO HS Verifi™ Polymerase, una de alta fidelidad, dado que la tasa de error de esta es menor (100 veces menor). Esta enzima también disminuye la formación de dímeros en los oligonucleótidos, reduciendo la inespecificidad. Aunado a esto, se evaluó la eficacia de la amplificación con la adición del reactivo “Enhancer”, el cual permite amplificar secuencias problemáticas y/o ricas en GC. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la amplificación de los “cassettes” quiméricos de las *sih* cuando se añadía o no. Es importante destacar que, para la reacción de “Double Joining” PCR se sugiere una concentración de entre 100 a 1000 ng de ADN total (de los tres fragmentos) (Yu *et al*, 2004). En

nuestro estudio utilizamos una concentración de ADN total de  $284 \pm 15.7$  ng. Con dichas concentraciones de ADN, logramos amplificar los fragmentos con los tamaños esperados (3736 pb, 3578 pb y 3848 pb para la *sih1*, *sih2* y *sih4* respectivamente), dado que tanto la PCR BIO HS Verifi™ Polymerase como la Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity” son polimerasas cuyo límite de amplificación es de 17.5 y 12 – 20 kb, respectivamente, no se esperaba tener problemas. En la mayoría de los casos, los amplicones obtenidos fueron amplificados usando la “Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity”, esta tiene 6 veces más actividad de corrección de errores (actividad exonucleasa 3' → 5') y por la tecnología “hot star”, es decir que tiene acoplado un anticuerpo que impide su actividad a temperaturas menores a la óptima, se disminuye la generación de productos inespecíficos. De tal manera, que al inicio de la amplificación tuvimos que ajustar los parámetros de la reacción, pero obtuvimos los fragmentos requeridos y se realizó el DJP, del que se purificó el fragmento esperado. Finalmente, tenemos suficientes amplicones del “cassette” quimérico de la *sih1*, *sih2* y *sih4* para realizar la transformación en *A. sydowii*.

#### 10.2.- Tolerancia de *A. sydowii* a sorbitol

Como se mencionó en la sección de resultados, obtuvimos la curva de crecimiento de *A. sydowii* en presencia de diferentes concentraciones de sorbitol. Esto es importante porque las mutantes de las hidrofobinas podrían no solo ser sensibles a altas concentraciones de NaCl sino a un estrés osmótico en general. Un ejemplo que respalda esta hipótesis es el estudio realizado por Cai y colaboradores en el 2021, donde se observó que la sobreexpresante del gen *hfb2* de *T. guizhouense* crece más rápido en concentraciones altas de NaCl (0.75 M, 1.0 M y 1.5 M), sacarosa (1.0 M y 2.0 M) y glicerol (2.0 M), sugiriendo que dicha HFB está involucrada en mecanismos de la resistencia tanto a estrés iónico como osmótico. Por otro lado, Zhang y colaboradores (2022) compararon la tasa de crecimiento del hongo *Verticillium dahliae* silvestre y a una mutante del gen *VdHP1* que codifica para una hidrofobina, en PDA suplementado con 0.4 M de NaCl, 0.8 M KCl y 1.2 M de sorbitol. Los resultados muestran que el diámetro de la colonia de la cepa mutante crecida en NaCl se redujo en comparación con la cepa silvestre. Sin

embargo, en presencia de KCl y sorbitol la reducción en su crecimiento no fue significativamente diferente.

En el presente trabajo, se observó que la morfología de la colonia de *A. sydowii* cambia de un fenotipo con estrías cuando crece en 0.5 y 1.0 M, a un fenotipo liso al crecer en concentraciones mayores (1.5 y 2.0 M de sorbitol) (Figura 30). De manera similar, en el estudio realizado por Górkanić *et al.*, 2010, analizaron el efecto de sorbitol a 1.0 M en el crecimiento de *Trichoderma reesei* y se observó que este polialcohol provoca una alteración en la morfología y composición de la pared celular. Los autores sugieren que, al someter a *T. reesei* a estrés osmótico se activa la vía HOG, lo que provoca mayor requerimiento de glucosa para la síntesis de glicerol y, por lo tanto, una deficiencia en la formación de los glucanos de la pared celular. Esto podría sugerir que en nuestro estudio, *A. sydowii* al estar en condiciones de estrés osmótico impuesto por sorbitol podría afectar de forma similar la composición de la pared y la morfología celular, viéndose reflejado en el fenotipo de la colonia, similar a lo observado en *T. reesei*.

Se ha determinado que *A. sydowii* en NaCl presenta un óptimo de crecimiento de 0.5 y 1.0 M (Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021), mientras que su óptimo de crecimiento en sorbitol es de 1.0 M y 1.5 M. Y de manera interesante, sigue creciendo hasta con 3.0 M de sorbitol, pero su velocidad de crecimiento disminuye considerablemente. Esto podría deberse a que el sorbitol es menos tóxico que el cloruro de sodio, dado que *A. sydowii* sólo estaría sometido a un estrés osmótico, pero no iónico, ya que este polialcohol es una molécula zwitteriónica (molécula con carga neta neutra) con seis carbonos que no produce alteraciones en el metabolismo normal de la célula (Yancey 2005). En contraste, en *A. sydowii* la presencia de NaCl conduce estrés osmótico (provocando así la deshidratación celular), sino también a un estrés iónico donde el Na<sup>+</sup> puede modificar las interacciones estructurales de las macromoléculas celulares y desplazar al potasio de los sitios activos de algunas enzimas produciendo su inhibición (Jiménez Gómez, 2022). Además, el NaCl al disociarse en solución acuosa es capaz de unirse a 14 moléculas de agua, en comparación con el sorbitol, que se asocia con 6 (Peidro Guzmán, 2022). Por lo tanto, el efecto

de este polialcohol en la disminución de la actividad de agua no es tan significativo en comparación con el cloruro de sodio.

Por lo anteriormente dicho, *A. sydowii* es un modelo de halofilia y se requiere continuar con la generación de las mutantes de las hidrofobinas para tener datos que permitan dilucidar si estas son parte de los mecanismos de halofilia de este hongo o solo son una respuesta a estrés en general.

## 11.- Conclusiones

Se logró amplificar y purificar las regiones flanqueantes 5´ y 3´ de los genes *sih1*, *sih2*, *sih4* y el gen de resistencia a higromicina (*hph*). Esto permitió continuar con las reacciones de empalme.

Se amplificaron los “cassettes” quiméricos de las regiones 5´ y 3´ de los genes *sih1*, *sih2* y *sih4*, las que flanquean al gen de resistencia *hph*. Se requiere obtener al menos 1 µg de los “cassettes” quiméricos de la *sih1*, *sih2* y *sih4* para continuar con la transformación de *A. sydowii*.

*A. sydowii* tiene tolerancia a concentraciones elevadas de sorbitol y se determinó que su óptimo de crecimiento en esta condición está entre 1.0 y 1.5 M, por lo que este hongo es un xerófilo.

## 12.- Perspectivas

A) Se requiere concentrar los “cassettes” a 1 µg de DNA quimérico para llevar a cabo la transformación de *A. sydowii* con los “cassettes” recombinantes de la *sih1*, *sih2* y *sih4*. Posteriormente se tamizará a las colonias transformantes.

B) Determinar el fenotipo de tolerancia a salinidad de las mutantes *sih1*, *sih2* y *sih4* de *A. sydowii*, a través de ensayos de determinación de tamaño y velocidad de crecimiento, así como determinar la humectabilidad de las cepas.

C) Generar dobles o triples mutantes de estas hidrofobinas.

D) Caracterizar el fenotipo de las dobles y triples mutantes de hidrofobinas de *A. sydowii* frente a diferentes tipos de estrés.

E) Evaluar la expresión de los cinco genes de las hidrofobinas en las mutantes sencillas de la *sih1*, *sih2* y *sih4* de *A. sydowii* para determinar si hay compensación de la mutante por los otros genes.

### 13.- Referencias

Askolin, S., Penttilä, M., Wösten, H. A., & Nakari-Setälä, T. (2005). The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development. *FEMS microbiology letters*, 253(2), 281-288.

Baker-Austin, C., & Dopson, M. (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in microbiology*, 15(4), 165-171.

Beuchat, L., & Pitt, J. (1990). Influence of solute, pH, and incubation temperature on recovery of heat-stressed *Wallemia sebi* conidia. *Appl Environ Microbiol*, 2545-2550.

Balcázar-López, E., Méndez-Lorenzo, L. H., Batista-García, R. A., Esquivel-Naranjo, U., Ayala, M., Kumar, V. V., Savary, O., Cabana, H., Herrera-Estrella, A., & Folch-Mallol, J. L. (2016). Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. *PLoS One*, 11(2), e0147997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147997>

Cai, F., Zhao, Z., Gao, R., Chen, P., Ding, M., Jiang, S., ... & Druzhinina, I. S. (2021). The pleiotropic functions of intracellular hydrophobins in aerial hyphae and fungal spores. *PLoS Genetics*, 17(11), e1009924.

Dym, O., Mevarech, M., & Sussman, J. L. (1995). Structural Features That Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an Archaeobacterium. *Science*, 267(5202), 1344-1346. <https://doi.org/10.1126/science.267.5202.1344>

Fang, J., Zhang, L., & Bazylinski, D. A. (2010). Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. *Trends in microbiology*, 18(9), 413-422.



Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de microbiología*, 46(1-2), 24-46.

Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological research*, 113(11), 1231-1241.

Gandier, J. A., Langelaan, D. N., Won, A., O'Donnell, K., Grondin, J. L., Spencer, H. L., ... & Master, E. R. (2017). Characterization of a Basidiomycota hydrophobin reveals the structural basis for a high-similarity Class I subdivision. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.

Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K., & Prakash, V. (2014). Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), 371.

Grant, W. 2004. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359 (1448):1249-1267.

Górka-Nieć, W., Perlińska-Lenart, U., Zembek, P., Palamarczyk, G., & Kruszewska, S. (2010). Influence of sorbitol on protein production and glycosylation and cell wall formation in *Trichoderma reesei*. *Fungal Biology*, 855-862.

Grünbacher, A., Thom, T., Seidel, C., Gutt, B., Röhrig, J., Strunk, T., ... & Fischer, R. (2014). Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PloS one*, 9(4), e94546.

Horikoshi, K. (1996). Alkaliphiles—from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 259-270.

Jiménez-Gómez, I. (2022). Respuestas osmoadaptativas del halófilo *Aspergillus sydowii* en condición saturada de NaCl. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Kralj Kunčič, M., 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.

Littlejohn, K. A., Hooley, P., & Cox, P. W. (2012). Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 503-516.

Linder, M.B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M.E., 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 877–896. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.004>.

Moyer, C. L., & Morita, R. Y. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs. *Encyclopedia of life sciences*, 1(6).

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms*, fourteenth.

Méndez-Ortega, W. (2021). Herramientas moleculares para el estudio de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 del hongo halófilo *Aspergillus sydowii*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valencia, R., ... & Seeger, M. (2018). Living at the frontiers of life: extremophiles in Chile and their potential for bioremediation. *Frontiers in microbiology*, 9, 2309.

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 (Basel, Switzerland)*, 9(3), 525.

Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, 5, 199.

Plemenitaš, A., Konte, T., Gostinčar, C., & Cimerman, N. G. (2016). Transport systems in halophilic fungi. *Yeast membrane transport*, 307-325.

Paris, S., Debeaupuis, J. P., Crameri, R., Carey, M., Charles, F., Prévost, M. C., ... & Latgé, J. P. (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), 1581-1588.

Peidro-Guzmán, H. (2022). Análisis morfológico, fisiológico y transcripcional del hongo halófilo *Aspergillus sydowii* durante su exposición a condiciones poliaromáticas y extremas de baja actividad de agua. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Quarantin, A., Haderer, 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, 751.

Ren, Q., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2013). Two forms and two faces, multiple states and multiple uses: Properties and applications of the self-assembling fungal hydrophobins. *Peptide Science*, 100(6), 601-612. <https://doi.org/10.1002/bip.22259>

Rodríguez-Pupo, E. C., Pérez-Llano, Y., Tinoco-Valencia, J. R., Sánchez, N. S., Padilla-Garfias, F., Calahorra, M., ... & 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.

Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). *Biología molecular fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México: McGrawHill Interamericana.

Sánchez Íñigo, F. J. (2014). Estudio de los mecanismos de resistencia de los líquenes a ambientes extremos relevantes para investigación espacial y cuerpos planetarios.

Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beever, R. E., & Mackay, J. P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron* (Oxford, England: 1993), 39(7), 773–784.

Sambrook, J., & Russell, D. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn, 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Tse, C., & Ma, K. (2016). Growth and metabolism of extremophilic microorganisms. *Biotechnology of Extremophiles*:, 1-46.

Vinnere Pettersson, O., & Leong, S. L. (2011). Fungal Xerophiles (Osmophiles). En *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000376.pub2>

Wang, Q., Cen, Z., & Zhao, J. (2015). The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: an angle of omics. *Physiology*, 30(2), 97-106.

Wösten, H. A., & de Vocht, M. L. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(2), 79-86.

Wösten, H. A. (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual review of microbiology*, 55, 625-646.

Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 41(11), 973-981.

Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology*, 208(Pt 15), 2819–2830.

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), 1-21.

Zajc, J., Kogej, T., Galinski, E. A., Ramos, J., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Applied and environmental microbiology*, 80(1), 247-256.

Zhang, X., Zhao, L., Liu, S., Zhou, J., Wu, Y., Feng, Z., ... & Feng, H. (2022). Identification and functional analysis of a novel hydrophobic protein VdHP1 from *Verticillium dahliae*. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e02478-21.

#### 14.- Anexos

Transformación de *A. sydowii* por el método de protoplastos.

Se inocularán  $1 \times 10^8$  conidios / ml en 100 ml de medio (GYEC) (1.5 g glucosa, 0.3 g de extracto de levadura y 0.5 g de hidrolizado de caseína) y se incubarán a 28°C durante 10 horas con agitación constante (180 rpm) hasta obtener germínulas. Estas se colectarán por filtración en un embudo con cono de tela tipo magitel estéril. Se pesarán 0.2 g de germínulas y se agregarán en un tubo falcón de 50 ml, después se agregarán 6 ml de extracto enzimático (mezcla de isoenzimas con actividad  $\beta 1,3$  glucanasa, actividad celulasa, proteasa y quitinasa). Para preparar este extracto se pesan 0.08 g de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma no. cat. I-1412) y se resuspenden en 6 ml de solución isoosmótica. Inmediatamente se mezclan con vórtex por 10 segundos. Las germínulas se incuban con el extracto enzimático por dos horas a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente se observará la presencia de protoplastos en microscopio.

Recuperación de protoplastos.

La suspensión de protoplastos se filtrará utilizando dos filtros Miradoth (100 y 50  $\mu\text{m}$ ) y se lavarán con 2 ml de solución isoosmótica (50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 M Manitol, 50 mM MES pH 5.5). Entonces estos se colocarán en tubos de 1.5 ml y se centrifugarán por 10 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante se desechará por decantación y la pastilla de protoplastos se resuspenderá mezclando suavemente en un volumen mínimo de solución osmótica de 200  $\mu\text{l}$ . Los protoplastos se cuantifican en un microscopio haciendo el uso de una cámara de Neubauer, la concentración de protoplastos debe estar entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$ .

Reacción de transformación.

240  $\mu\text{l}$  de protoplastos.

20  $\mu\text{l}$  de construcción (1 - 2  $\mu\text{g}$  de DNA resuspendidos en solución isoosmótica).

Reacción de transformación control.

240  $\mu\text{l}$  de protoplastos.

20  $\mu\text{l}$  de solución isoosmótica.

Los protoplastos obtenidos se transformarán con 1 - 2  $\mu\text{g}$  de la construcción quimérica y se re-suspenderán en solución isoosmótica (50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 M Manitol, 50 mM MES), luego se incubarán en hielo durante 20 minutos y se agregarán 260  $\mu\text{l}$  de polietilenglicol (4000-8000 g/mol) al 40% (el polietilenglicol debe estar a 42°C), se mezclarán suavemente y se incubarán por 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se colocarán 250  $\mu\text{l}$  de la reacción de protoplastos + polietilenglicol en un tubo falcón de 15 ml y se les adicionará 8 ml de PDA suave (dos tubos para el control y 2 tubos para la reacción con DNA de interés) con el objetivo de que las transformantes puedan recuperarse.

Después los tubos con protoplastos + DNA se verterán en dos placas con PDA selectivo; los tubos control se verterán de la siguiente manera: uno en una placa con PDA selectivo (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y el otro en PDA selectivo sin higromicina. Estos controles serán importantes debido a que podremos analizar la viabilidad de los protoplastos al final del experimento y así verificar que las transformantes obtenidas se deben a la incorporación de la construcción que contiene el gen de resistencia a higromicina.

Pases monospóricos.

Debido a que las células de este hongo son dicariontas (presentan dos núcleos) y al generar protoplastos se pueden fusionar diferentes células es necesario realizar pasos monospóricos para asegurar la homogeneidad genética de las transformantes, y esto se logra diluyendo las esporas hasta tener una concentración tal que cada espora genere una colonia, esto se repite tres veces. Para realizar los pases monospóricos, a partir de una colonia se colectarán esporas con ayuda de una solución con 1% SDS, 20% glicerol, y agua. Posteriormente se realizarán diluciones seriadas (1/10; 1/100; 1/1000) y se verterán 20  $\mu$ l de la dilución 1/1000 en una caja Petri. Las esporas se distribuirán con un asa de cristal sobre medio PDA con higromicina (100  $\mu$ g/ml) y se incubará a 28 °C, a partir de ello se generarán colonias aisladas con características específicas como la capacidad de poder desarrollarse en un medio con higromicina.



PCR de colonia.

Para verificar que el fragmento quimérico se insertó en el genoma de *A. sydowii* se realizarán PCRs de colonia para lo cual se utilizarán los oligonucleótidos que se mencionan “nested” en la Tabla 16, y se espera obtener los fragmentos correspondientes a los loci mutantes de la *sih1*, *sih2*, *sih4* con un tamaño de 3736 pb, 3578 pb, 3848 pb respectivamente, que corresponden al tamaño del fragmento que reemplaza al locus silvestre por la *hph*.

Tabla 16. Oligonucleótidos requeridos para realizar el PCR de colonia.

<b><i>Sih1</i></b>	<b>Sih1F</b>	<b>GGGATGACTTCCGTGCCTC</b>
	<b>Sih1R</b>	<b>CTCATGCACCATCCATACCAAG</b>
<b><i>Sih2</i></b>	<b>Sih2F</b>	<b>CTGTACACTATGCAGACCTATTG</b>
	<b>Sih2R</b>	<b>GCGAGAGTAGTCCCAAATACG</b>
<b><i>Sih4</i></b>	<b>Sih4F</b>	<b>ATGGTCCACAAAGGTCTACATGC</b>
	<b>Sih4R</b>	<b>GACGTCGTACAGGAGTTTGTCC</b>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología



Cuernavaca, Morelos a 09 de octubre de 2023

**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 el Pasante de Biólogo: **C. Martínez Flores Mario Emiliano**, con el título del trabajo: **Generación de construcciones para la obtención de líneas mutantes de hidrofobinas en el halófilo *Aspergillus sydowii***

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.

**A T E N T A M E N T E**

*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DRA. ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: BIOL. HUGO SUAREZ CONTRERAS

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ

\_\_\_\_\_



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:2023-10-10 21:07:42 | Firmante

gE30Jq8XYjy12J2xnMpmEFKfLKKJKI78vYdsUmJH4q/lwkU8QbZ0Z6aGUK1xrJUSS530x6QBKdqjNTM66wPBIbPrNcV+r19tJ/LvlokWBSwyHBxyWgTqGLoeUBLtnHGvnjll/iuckE4tuV7rBM2cL1gWcW6NzGQWktoHtObm1zSNcrOJL6pwwgayb+QceBYpj8KdiMuEeKsL19gKTXZB8XnSWS3xWrxNUIhKfNh+QD6RAMuMtUJjuieqc6b0iS45qw0/KcpMM53xPofQhGzt9miNX3KYgNU1/N5b0zKEBYxa30vLeDBiq8ysnGmN/7Bha615VjM2IFZY2E3ooA==

**JORGE LUIS FOLCH MALLOL** | Fecha:2023-10-11 08:24:45 | Firmante

KkWFs9VJmhZ2rWHibKqNRDsA96XKSse7R4TlgtGRw881jNio1b/svCfUtrKhrmJpiH3GpjX+RbEi7U79czc6yfY6QrzXduhBFJcmV4cz3z0LX31c3VlttB335EYHojLYnC/3vOelFck/a7oHfGKWOCciscjriu6aW4HRXpBql+UIOaPrJ1JOMPYbmS5TOO3WyYHw6+Char/3NMZ3DCDIXtCabTodCxHUOGajogI3gVbHsKrmw9Hqjf5TDMW1r1Gm7ULOYDdWgjc4zIcXnkPcNiOrJE4z7bcTAU8Cm2X3NtSd7Bsn3zAzJMM2Pgw70fnBznOHn1NR9p6j3AgIQ==

**ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA** | Fecha:2023-10-14 11:30:55 | Firmante

HS29fVdJ+UsFmH/dH7rLdACfr+Kqck0t08C0zPLLRktOHmTwsmdtK6Nud+iIb71Hc5QfSMFy7wvmOqbOlsv8smC2GF7ufqQ3SmAw8wOWEpmVHs53Ri+Kd6jbPoYUgaCnofcWG6TYNP/Riz+Rw1oZcURjtMF8kBT0uzkUBLG56L4mV50/0TmNnyGHZJ9CaSaDoNubW2LUMw6eh+TbkvqkMFZ0nPG30Xg3MFSC3YIE1RZn0pcHIEYOcGdFg81/4Vefos7M6hxTWjI7jYyojanRdbW0jhXA5Bnrl2n9xccbn2oUV+DK/Wz/mr2FlvgHFewyWLxh3hUGOPEZibFg==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE** | Fecha:2023-10-16 09:48:38 | Firmante

Dah7a4QhYIq3VxiY7DXnVSGm6K3A6XFCaQ7LATqr6JU4rg/oDnVrCrlVdYh5/fEJBKfvr/iW9Lj+eNn3KwMEiMX6zAPpT8VAR0VqQoriTViySs0xbSLHaYybvkbwnKG4F5e44gfQZyp8ldR27g40zuMdwY3Sc+w/TtQh4B05U/9T9dUIH7OmuWoa9lQT8QdbJ6kpaJggE7+RmL79fZ812HjLY9l8YGsdFNecnS+itKexyPaCsF+JfqQ2A8ftJCqyFeQFuRxCNhy+J8uO/loOFAUc1yRX/+BIVjot+mFljFmi+5ezVRRi6GGOpViu/47NEr1K7ZrhBivlbnXANrUw==

**HUGO SUAREZ CONTRERAS** | Fecha:2023-10-16 11:43:23 | Firmante

t+zgSOru8peUVjwvsj8YhP2NQ8AEF7V5Y6E33Eh7A61qtjqnqeLOj53RU+UoNIP6NLcGh88kb0/a7mSMGbynvfWYhd4gMg221OxukAILKOFK3/hvfoZwpl4mHmZGzjWwI5U49UflVonyV/z1G03rsn3TRcoby+4H28+Zj7AkPUdEchRHFQWvDj3xLmTTqr0G9fRYFmRpHoX+2nouG6jHJZ6JGbrKl2bdI9M2iArwd55+Z6MkF3ngELdwFSavBaDzQHq1XA5qXjR8BzWvP2p0mKUP648A5w00bl+m+4CGAWm35bdewL5u8sHijOkD3Kit4nDQVI4O2IFkcS/mKhzg==

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



mxdVKFPce

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/M4VsGAIsqC8rM7b8h3v1R4NPv2hmMcv>

