

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Centro de Investigación en Biotecnología

“Estudio de la línea mutante del gen de hidrofobina *sih2* del halófilo *Aspergillus sydowii*
en condiciones de estrés”

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestría en Biotecnología.

Presenta:

Biól. Mario Emiliano Martínez Flores

Director de Tesis:

Dra. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

CUERNAVACA, MORELOS

Mayo 2026

Agradecimientos

A mi asesora la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente por cada una de sus enseñanzas que me han ayudado a crecer como persona y como profesional.

A mis compañeros de Laboratorio Jesús, Tomas, Amairani, Libni, Leysa, Jasiel, Mike, Gaby, Josué y Fernando, por su ayuda que me permitió llevar a cabo este proyecto. Y al Dr. Germán, por su constante apoyo y su calidez humana, que hicieron del laboratorio no solo un espacio de trabajo, sino también de grandes momentos.

A mi madre Verónica Flores por ser mi modelo a seguir y apoyarme toda la vida. Por ser mi fuerza. Y a mi padre Mario Mtz, por estar presente en esta etapa e interesarse en mi trabajo.

A Naomi Valencia, por ser mi acompañante y por todo el apoyo brindado a lo largo de esta travesía. Gracias, mi amor.

A mis hermanos: Josh, Uri, Ram y Set por su compañía constante y ser parte fundamental de mi vida.

A mis sobrinos Mati, Aitana, Aizar, Sofi y mi prima Dani cuyo afecto fue mi impulso para seguir adelante y ser mejor cada día.

A mis amigos Emiliano Blash, Sammael Gamma, Gabriel Reynoso, Cristian García y Vanessa Vernal por ser mi inspiración para avanzar y seguir creciendo.

A mi abuela Leonarda Jaimes Catalán que llevo siempre en el corazón. Por todas las enseñanzas de vida. Cuyas palabras siguen resonando hasta hoy y procuro aplicar siempre.

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

Gracias a SECIHTI por la beca otorgada.

Resumen

Las hidrofobinas son proteínas producidas por hongos filamentosos, estas son de bajo peso molecular (5-20 kDa), anfipáticas, tienen diversas aplicaciones en el campo de la biotecnología como agentes emulsionantes, incrementadores de la biocompatibilidad de implantes médicos, recubrimiento de fármacos para su administración, recubrimiento de nanotubos de carbono, etc. La característica principal es que tienen ocho residuos de cisteína que forman cuatro puentes disulfuro, en una secuencia promedio de 100 aminoácidos. Estas se clasifican de acuerdo con sus características en clase I (secuencias no conservadas, espacios variables entre las cisteínas y una película que presenta la formación de estructuras fibrilares en forma de bastones tipo “rodlets”) y clase II (presentan secuencias y espacios conservados entre las cisteínas y no forman películas con morfología fibrilar con forma de bastones). Estas proteínas tienden a acumularse y autoensamblarse en interfases (entre una fase acuosa y una fase hidrofóbica), por ejemplo, entre el agua y el aire. Por otro lado, las hidrofobinas tienen múltiples funciones en el ciclo de vida de los hongos. Estas recubren la pared celular de los hongos, proporcionándoles resistencia ante la humedad y la desecación. Reducen la tensión superficial del agua, favoreciendo el crecimiento de las hifas en el aire. Además, su propiedad anfipática les permite la dispersión en el aire y adherencia de las esporas a superficies hidrofóbicas. Estas proteínas también son relevantes para patogenicidad de hongos como *Aspergillus fumigatus*, un patógeno de los humanos, porque se ha reportado *rodA*, una hidrofobina de clase I, genera estructuras en forma de bastones que recubren la superficie de los conidios y que el sistema inmune del hospedero puede detectar a las mutantes en este gen. En estudios de hidrofobinas en *Fusarium graminearum* la delección de *Fghyd2* y *Fghyd3* genera una reducción de adhesión del hongo a superficies hidrofóbicas, una disminución en la habilidad de las hifas para romper la tensión superficial del agua y en su capacidad para infectar a las espigas de trigo. Se ha sugerido que las hidrofobinas son indispensables para contender contra los ambientes hipersalinos en el hongo halófilo obligado *Wallemia ichthyophaga* debido a que se ha visto una expresión diferencial de estas en condiciones hipersalinas (2.6 M y 4.3 M), estos estudios son semejantes a lo reportado en nuestro laboratorio con *Aspergillus sydowii*. El análisis transcriptómico de este hongo crecido en condiciones

hiper (2 M NaCl) e 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*). Esto sugiere que la expresión de estas proteínas son una respuesta al estrés hipo e hiperosmótico, sin embargo, no existe evidencia experimental que sustente el papel que juegan éstas bajo dichas condiciones. Nuestro laboratorio está interesado en comprender el papel de estas durante el estrés (particularmente osmótico e iónico) en el hongo halófilo *A. sydowii*, nuestro modelo de estudio. Durante mi tesis de licenciatura se generaron los “cassettes” recombinantes de los genes *sih1*, *sih2* y *sih4* con el fin de obtener una delección de los genes silvestres de hidrofobinas y así determinar su función. En el presente trabajo se obtuvieron las cepas mutantes del halófilo *A. sydowii* a través de la transformación con el “cassette” recombinante del gen *sih2* y posteriormente se caracterizó su fenotipo en condiciones estresantes: estrés salino, osmótico y estrés en pared celular. El análisis de la expresión de las hidrofobinas en condiciones de estrés se propone para profundizar en los mecanismos moleculares involucrados, dado que se ha observado que las hidrofobinas permiten contender con diversas condiciones de estrés en múltiples hongos como *Beauveria bassiana* y *Cordyceps militaris*.

Palabras clave: hidrofobinas, halofilia, transformación, delección, mutantes por recombinación.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Organismos extremófilos y extremotolerantes	1
1.2. Hongos halófilos	1
1.3. Mecanismos de halofilia	2
1.3.1. Vía HOG	5
1.3.2. Transporte iónico	7
1.3.3. Adaptaciones en la pared celular	9
1.4. Características de las hidrofobinas	12
1.4.1. Estructura y función de las hidrofobinas	14
1.4.2. Técnicas de mutación en hongos	18
2. Antecedentes	21
2.1. Características de <i>A. sydowii</i>	21
2.2. Análisis transcriptómico de <i>A. sydowii</i>	21
3. Justificación	24
4. Hipótesis	24
5. Objetivo general	24
6. Objetivos específicos	24
7. Metodología	25
7.1. Cepas fúngicas y condiciones de cultivo	25
7.2. Medios de cultivo	25
7.3.- Evaluación de la respuesta a estrés osmótico y de pared celular mediante microcultivos en <i>A. sydowii</i> wt.....	26
7.4.- Cinética de crecimiento de la cepa silvestre de <i>A. sydowii</i> en Rojo Congo.....	28

7.5.- Velocidad de crecimiento de <i>A. sydowii</i> crecido en Rojo Congo.....	28
7.6.- Deleción del gen de hidrofobina <i>sih2</i>	29
7.7.- Tamizado de las cepas mutantes putativas <i>AsΔsih2_C1</i> y <i>AsΔsih2_C2</i>	32
7.8.- Análisis macroscópico comparativo de colonias de <i>A. sydowii</i> silvestre y mutantes de <i>sih2</i> en medio sólido.....	33
7.9. Ensayos de tolerancia a estrés.....	34
7.10.- Análisis de humectabilidad (wettability) en las mutantes putativas en <i>sih2</i> de <i>A.</i> <i>sydowii</i>	34
7.11.- Cuantificación de la producción de esporas en las cepas mutantes putativas y <i>A.</i> <i>sydowii</i> wt.....	34
7.12.- Análisis de la producción de esporas en las cepas mutantes putativas y <i>A. sydowii</i> wt.....	35
8. Resultados	36
8.1.- <i>A. sydowii</i> wt es sensible a estrés osmótico y de pared celular inducido por sorbitol y Rojo Congo	36
8.1.2.- Diferencias morfológicas macroscópicas de <i>A. sydowii</i> bajo estrés osmótico por sorbitol.....	36
8.1.3.- Diferencias microscópicas de <i>A. sydowii</i> wt son inducidas bajo estrés osmótico por sorbitol.....	40
8.1.4.- <i>A. sydowii</i> wt es sensible a estrés de pared celular inducido por RC y CFW.....	43
8.1.5.- Diferencias microscópicas de <i>A. sydowii</i> wt son inducidas bajo estrés de pared	

celular	por	Rojo
Congo.....		48
8.2.-Tamizaje de colonias transformantes positivas de <i>A. sydowii</i>		52
8.3.- Tamizado de las colonias mutantes putativas con el “cassette” recombinante de la <i>sih2</i> por PCR de colonia.....		53
8.4.- Purificación monospórica de <i>AsΔsih2_C1</i> y <i>AsΔsih2_C2</i>		54
8.5. Análisis de integración del “cassette” recombinante del gen <i>sih2</i>		57
8.6.- Análisis morfológico comparativo de colonias de <i>A. sydowii</i> silvestre y mutantes putativas del gen <i>sih2</i> en medio sólido.....		59
8.7. Evaluación de la tolerancia a estrés salino, osmótico y de pared celular en líneas mutantes putativas de la hidrofobina <i>sih2</i>		64
8.7.1.- Las colonias mutantes putativas no son sensibles a estrés hipersalino e hiperosmótico.....		64
8.7.2.- Las colonias mutantes putativas son sensibles a estrés de pared celular.....		67
8.8.- Ensayo de humectabilidad de <i>A. sydowii</i> wt y mutantes putativas <i>AsΔsih2_C1_5.3</i> y <i>C2_5.3</i>		69
8.9.- Efecto de la inserción del “cassette” recombinante del gen <i>sih2</i> en la producción de las esporas.....		71
9. Discusión		73

10. Conclusiones	91
11. Perspectivas.....	91
12. Referencias	92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las hidrofobinas de <i>A. sydowii</i>	21
Tabla 2. Oligonucleótidos quiméricos y oligonucleótidos para la amplificación de todo el fragmento de recombinación del gen de hidrofobina <i>sih2</i> de <i>A. sydowii</i> y el gen de resistencia a Higromicina (<i>hph</i>).....	30
Tabla 3. Condiciones utilizadas para la amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen <i>sih2</i> , y el gen <i>hph</i>	31
Tabla 4. Condiciones utilizadas en el termociclador en la reacción de empalme PCR Double Joining	31
Tabla 5. Condiciones utilizadas en el termociclador en la tercera reacción de PCR Double Joining	31
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para el PCR de colonia	32
Tabla 7. Tasa de crecimiento radial por día de <i>A. sydowi</i> en Rojo Congo.....	47
Tabla 8. Resultados de las amplificaciones del fragmento quimérico para identificar a las colonias mutantes. Lista de las colonias mutantes positivas con el amplicón de la construcción 5'arm - hyg RV.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organización estructural de la pared celular fúngica, mostrando disposición de β glucanos, quitina, α -glucanos y manoproteínas	10
Figura 2. Engrosamiento de la pared celular en <i>W. ichthyophaga</i> y <i>A. sydowii</i>	11
Figura 3. Representación de la hidrofobina de clase I EAS mostrando la superficie hidrofílica, y la superficie hidrofóbica	12
Figura 4. Hidrofobina de clase I tipo rodlets proveniente de <i>S. commune</i> (SC3) mostrando la disposición de la película formada por SC3	13
Figura 5. Modelos de la estructura secundaria de múltiples hidrofobinas de clase I y clase II.....	14
Figura 6. Alineamiento de secuencias de hidrofobinas de clase I y clase II	14
Figura 7. Expresión diferencial de genes de hidrofobinas en dos salinidades en <i>W. ichthyophaga</i>	17
Figura 8. Representación de las tres reacciones de PCR doble unión	19
Figura 9. Sistema CRISPR/Cas9 en hongos filamentosos	20
Figura 10. Expresión diferencial de las hidrofobinas SIH1, SIH2, SIH3 y SIH4 en diferentes concentraciones de sal	23
Figura 11. Ensamble de la cámara de incubación para micro cultivo	27
Figura 12. Representación de las tres reacciones de PCR doble unión	30
Figura 13. <i>A. sydowii</i> wt es sensible a estrés osmótico inducido por sorbitol	38
Figura 14. <i>A. sydowii</i> wt es sensible a estrés salino inducido por NaCl	39
Figura 15. El estrés osmótico afecta las características micro-morfológicas de <i>A. sydowii</i>	41
Figura 16. Diferencias microscópicas de <i>A. sydowii</i> con 2 días de incubación en diferentes concentraciones de sorbitol	42
Figura 17. Rango de crecimiento de <i>A. sydowii</i> en RC	44
Figura 18. <i>A. sydowii</i> tolera concentraciones elevadas de Rojo Congo y Calcofluor White.....	45

Figura 19. Cinética de crecimiento de <i>A. sydowii</i> en medio PDA suplementado con concentraciones de Rojo Congo durante 15 días	47
Figura 20. Evaluación de la tolerancia de <i>A. sydowii</i> en medio PDA suplementado con Rojo Congo mediante siembra de 1×10^4 conidias	47
Figura 21. Diferencias microscópicas de <i>A. sydowii</i> con dos días de incubación en diferentes concentraciones de RC a partir de microcultivos de esporas	49
Figura 22. El estrés de pared celular inducido por Rojo Congo afecta las características micro-morfológicas de <i>A. sydowii</i>	50
Figura 23. Desarrollo asexual abortivo de <i>A. sydowii</i> wt bajo estrés de pared celular inducido por RC	51
Figura 24. Obtención de cepas <i>AsΔSih2_C1</i> y <i>AsΔSih2_C2</i> de <i>A. sydowii</i>	52
Figura 25. Tamizaje de colonias transformantes mediante PCR de colonia amplificando el fragmento 5' <i>arm sih2</i> + <i>hph</i> del "cassette" recombinante de <i>sih2</i>	53
Figura 26. Tamizado de las colonias mutantes putativas <i>AsΔsih2_C1</i> y <i>AsΔsih2_C2</i> del pase monospórico 1.....	54
Figura 27. Tamizado de las colonias mutantes putativas <i>AsΔsih2_C1_2</i> y <i>AsΔsih2_C2_1</i> del pase monospórico 2.....	55
Figura 28. Tamizado de las colonias mutantes putativas <i>AsΔsih2_C1_5</i> y <i>AsΔsih2_C2_5</i> del pase monospórico 2.....	55
Figura 29. Identificación de mutantes putativas portadoras del "cassette" recombinante del gen <i>sih2</i>	58
Figura 30. Caracterización macroscópica de las colonias de la cepa silvestre (wt) y de las líneas mutantes putativas <i>AsΔsih2_C1_5.3</i> y <i>AsΔsih2_C2_5.3</i>	60
Figura 31. Análisis comparativo del desarrollo morfológico en <i>Aspergillus</i> wt y las líneas mutantes <i>AsΔsih2_C1_5.3</i> y <i>AsΔsih2_C2_5.3</i>	61
Figura 32. Análisis de la producción de micelio aéreo en la cepa silvestre (wt) y en las líneas mutantes <i>AsΔsih2_C1_5.3</i> y <i>AsΔsih2_C2_5.3</i>	63
Figura 33. Las cepas mutantes no son sensibles a estrés hipersalino.....	65
Figura 34. Las cepas mutantes no son sensibles a estrés hiperosmótico.....	66
Figura 35. Las cepas mutantes putativas de la <i>sih2</i> son susceptibles al estrés de la pared celular inducida por Rojo Congo.....	68
Figura 36. Las cepas mutantes putativas con la inserción de gen <i>sih2</i> son más hidrofílicas que la silvestre.....	70

Figura 37. La mutantes putativas presentan una disminución en la producción de esporas. Producción de esporas en <i>A. sydowii</i> wt y mutantes <i>AsΔsih2_C1</i> y <i>AsΔsih2_C2</i>	72
Figura 38. Esquema de la interconexión entre la vía de integridad de la pared celular (CWIS) y la regulación del desarrollo asexual en <i>A. nidulans</i>	82
Figura 39. Modelo propuesto de compensación funcional entre hidrofobinas en <i>A. sydowii</i>	84
Figura 40. Modelo propuesto de la alteración de la integridad de la pared celular asociada a la ausencia del gen de hidrofobina <i>sih2</i>	86
Figura 41. Modelo de disminución de hidrofobicidad basado en la absorción de gotas de agua en el mutante <i>Δsih2</i>	88
Figura 42. Modelo de las estructuras reproductivas de <i>A. sydowii</i> wt y mutantes <i>AsΔsih2_C1_5.3</i> y <i>AsΔsih2_C2_5.3</i>	90

1.- Introducción

1.1.- Organismos extremófilos y extremotolerantes

Los organismos extremófilos dominan los ambientes en condiciones fisicoquímicas que son desfavorables para el desarrollo de organismos con requerimientos similares a los humanos, ya que han generado adaptaciones que les permiten vivir exitosamente en estos ambientes. Por lo que aquellos organismos que toleran condiciones extremas pero cuyo óptimo de crecimiento se encuentra dentro de los parámetros considerados por los humanos como estándar se denominan extremotolerantes (Sánchez Íñigo, 2014), mientras que los que viven óptimamente en parámetros fuera del estándar son llamados extremófilos. Estos se clasifican de acuerdo con la condición ambiental a la que encuentran su óptimo de crecimiento en: basófilos ($\text{pH} > 9$), acidófilos ($\text{pH} < 3$), psicrófilos ($< 15^\circ\text{C}$), piezófilos (10 – 50 MPa), xerófilos ($< 0.85 \text{ Aw}$), termófilos (60 - 80 $^\circ\text{C}$) y halófilos ($> 0.2 \text{ M de NaCl}$) (Horikoshi, 1996; Baker-Austin y Dopson, 2007; Moyer *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2010; Pettersson y Su-lin, 2011; Wang *et al.*, 2015; Tse y Ma, 2016;). Los halófilos, tema central de este trabajo, han recibido gran atención gracias a su potencial biotecnológico como la producción de polímeros, enzimas y solutos compatibles, además de usos en biorremediación y biodegradación (Gupta *et al.*, 2014; Ventosa y Nieto, 1995). Dentro de estos, algunos de ellos se consideran también xerófilos, ya que estos requieren condiciones de baja actividad de agua (aw) lo que lleva a un estrés osmótico, pero no iónico como en el caso de los halófilos (Pettersson y Su-lin, 2011).

1.2.- Hongos halófilos

Los hongos halófilos se habían descrito únicamente como contaminantes de comida, pero a partir del año 2000 se describió la presencia de múltiples especies de ascomicetos en salinas solares, y en otros ambientes hipersalinos. Entre estos, levaduras como *Debaryomyces hansenii* y *Pichia membranifaciens*, y hongos filamentosos del género *Aspergillus* y hongos basidiomicetos como *W. ichthyophaga* (Gunde-Cimerman, *et al.*, 2009). De acuerdo con su requerimiento de cloruro de sodio (NaCl) los halófilos se clasifican en 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 hongos cuyo óptimo de crecimiento está en ausencia de NaCl, pero que crecen en condiciones elevadas de sal incluso hasta la saturación son llamados halotolerantes (Gupta *et al.*, 2014). Los hongos halófilos han proliferado en estas condiciones extremas gracias al desarrollo de diversas adaptaciones, dominando así nichos como lagos hipersalinos (como el lago del desierto de Kalahari, Sudáfrica), estanques de evaporación como la salina solar de Sečovlje, Eslovenia, suelos salinos, e incluso ambientes marinos muy profundos como la zona hadal (donde vive la cepa *Aspergillus sydowii* XTO612 en el intestino de anfípodos hádales) (Gunde-Cimerman *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2025).

1.3.- Mecanismos de halofilia

Existen dos estrategias principales en organismos halófilos para enfrentar el estrés osmótico. La primera, conocida como “salt in”, es empleada por arqueas en la que se acumula potasio (K^+) para igualar las concentraciones de sodio (Na^+) extracelular, a través de bombas dependientes de ATP, como ocurre en las arqueas halófilas del género *Halobacterium* (Madigan, 2015). Se ha sugerido que las cargas negativas de los aminoácidos ácidos en la superficie proteica son fundamentales para mantener su estabilidad, evitando fenómenos de desnaturalización, agregación y precipitación en condiciones de alta salinidad (Dym *et al.*, 1995).

En contraste, los eucariontes y bacterias halófilas emplean la estrategia “salt out”, mediante la cual mantienen la homeostasis hídrica a través de la acumulación intracelular de solutos compatibles, evitando la deshidratación celular bajo alta presión osmótica (Gupta *et al.*, 2014). Estos compuestos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular, generalmente neutras o zwitteriónicas, que no interfieren con la función proteica. Entre los más comunes se encuentran glicina betaína, ectoína, hidroxectoína, trehalosa y glicerol. De manera complementaria, estas células expulsan Na^+ mediante transportadores activos de membrana.

En eubacterias halotolerantes como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Halomonas elongata*, la adaptación osmótica implica además de la síntesis como la captación de solutos compatibles también se toma del medio extracelular. Por ejemplo, *H. elongata* sintetiza ectoína como principal osmoprotector, en contraste una bacteria no tolerante como *E. coli* utiliza sistemas de transporte como ProP y ProU para la captación de glicina betaína y prolina (Peters *et al.*, 1987; Lucht y Bremer, 1994). Estos sistemas pertenecen a las familias ABC (ATP-binding cassette) y MFS (major facilitator superfamily), además de incluir transportadores tipo TRAP, ampliamente representados en el genoma de *H. elongata* (Schwibbert *et al.*, 2011).

En organismos eucariontes como algas verdes y hongos, es común la acumulación de polioles como glicerol y manitol (Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021). En particular, el glicerol es el soluto compatible predominante en diversas levaduras y hongos halotolerantes como *W. ichthyophaga*, *D. hansenii* y *S. cerevisiae* bajo condiciones hipersalinas (Gunde *et al.*, 2009). Su acumulación está regulada por la vía de señalización HOG (High Osmolarity Glycerol), la cual coordina la respuesta celular frente al estrés osmótico.

Existen dos estrategias principales en organismos extremófilos para enfrentar el estrés osmótico. La primera conocida como “salt in”, empleada por arqueas, en la que se acumula potasio (K^+) para igualar las concentraciones de sodio (Na^+) extracelular, a través de bombas dependientes de ATP, como ocurre en las arqueas halófilas del género *Halobacterium* (Madigan, 2015). Se ha sugerido que las cargas negativas de los aminoácidos ácidos en la superficie proteica son fundamentales para mantener su estabilidad, evitando fenómenos de desnaturalización, agregación y precipitación, los cuales suelen presentarse cuando proteínas no halófilas se exponen a altas concentraciones salinas (Dym *et al.*, 1995).

En cambio, los eucariontes y bacterias halófilas emplean la estrategia “salt out”, en la que se alcanza una homeostasis hídrica, a través de la acumulación de compuestos osmoprotectores, evitando la deshidratación celular en condiciones de alta presión osmótica (Gupta *et al.*, 2014). Además, bombean Na^+ mediante transportadores activos de membrana hacia el exterior celular. Este mecanismo consiste en la acumulación

intracelular de moléculas orgánicas altamente solubles que no interfieren con la función proteica. Entre los solutos compatibles más comunes se encuentran la glicina betaína, ectoína, hidroxectoína, trehalosa y glicerol, los cuales permiten mantener el equilibrio osmótico sin alterar la estructura de macromoléculas celulares. En eubacterias halotolerantes como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Halomonas elongata*, la adaptación osmótica implica además de la síntesis de solutos compatibles también se toma del medio extracelular. Por ejemplo, *H. elongata* sintetiza ectoína como principal osmoprotector, en contraste una bacteria no tolerante como *E. coli* utiliza sistemas de transporte como ProP y ProU para la captación de glicina, betaína y prolina (Peters *et al.*, 1990; Lucht y Bremer, 1994). En este contexto, dichos sistemas de transporte pertenecen a las familias ABC (ATP-binding cassette) y MFS (major facilitator superfamily), además de incluir otros sistemas como los transportadores tipo TRAP, los cuales se encuentran ampliamente representados en el genoma de *H. elongata* y participan en el transporte de diversos solutos, incluyendo osmolitos compatibles (Schwibbert *et al.*, 2011).

Los solutos compatibles son moléculas de distinta naturaleza química (aminoácidos, carbohidratos, polialcoholes), de bajo peso molecular y generalmente neutras o zwitteriónicas, que no interfieren con el metabolismo celular (Yancey, 2005). Entre ellos se incluyen aminoácidos como prolina y glutamato, derivados como glicina betaína y ectoína, disacáridos como trehalosa y sacarosa, así como polioles tales como glicerol, manitol y arabitol (Morbach *et al.*, 2003; Antranikian, 1998). Particularmente, las algas verdes y los hongos almacenan polioles como glicerol y manitol (Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021), siendo el glicerol el soluto compatible predominante en diversas levaduras y hongos halotolerantes como *W. ichthyophaga*, *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, particularmente bajo condiciones hipersalinas (Gunde *et al.*, 2009). La acumulación de glicerol en estos organismos está regulada por mecanismos de señalización osmótica, la vía HOG (High Osmolarity Glycerol), responsable de coordinar la respuesta celular frente al estrés osmótico.

1.3.1.- Vía HOG.

Vía de señalización HOG (High Osmolarity Glycerol)

La vía de señalización HOG (High Osmolarity Glycerol) es una cascada tipo MAPK altamente conservada en hongos, incluyendo levaduras como *S. cerevisiae* y hongos filamentosos del género *Aspergillus*. Se activa en respuesta a cambios en la presión osmótica, como ocurre en ambientes con altas concentraciones de sal, mediante sensores de membrana que detectan el estrés extracelular y transmiten la señal al interior celular, desencadenando una cascada de eventos de fosforilación que culmina en la activación de la MAP cinasa Hog1p. La activación de Hog1p promueve su translocación al núcleo, donde fosforila diversas proteínas blanco, incluyendo factores de transcripción que inducen la expresión de genes implicados en la síntesis y acumulación de glicerol y otros solutos compatibles (Folch *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2025).

En la levadura *S. cerevisiae*, esta vía ha sido ampliamente caracterizada, donde los sensores Sln1p y Sho1p desempeñan un papel fundamental en la detección del estrés osmótico. Sln1p actúa como un regulador negativo de la vía, mientras que Sho1p participa en el reclutamiento de la MAPKK (Pbs2p) a la membrana plasmática, facilitando la activación de la cascada de señalización y la posterior translocación nuclear de Hog1p (Folch *et al.*, 2004).

En este contexto, Sln1p actúa como una histidina cinasa transmembranal tipo sistema de dos componentes. Este receptor forma dímeros capaces de autofosforilarse, iniciando una cascada de fosfotransferencia en la que el grupo fosfato se transfiere a Ypd1 y posteriormente a Ssk1. En condiciones iso-osmóticas, Sln1p se mantiene activo, promoviendo la fosforilación de Ssk1, lo que impide su interacción con las MAPKKs Ssk2 y Ssk22 y mantiene la vía reprimida. Sin embargo, bajo condiciones de alta osmolaridad, la actividad de Sln1p disminuye, permitiendo la desfosforilación de Ssk1 y su asociación con Ssk2 y Ssk22, lo que activa la cascada de señalización (Hohmann, 2009; Horie *et al.*, 2008; Tatebayashi *et al.*, 2007; Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Por otro lado, Sho1p es una proteína con cuatro dominios transmembranales y un dominio citoplásmico SH3 (Src Homology), que responde a cambios en la organización de la membrana bajo condiciones de estrés hiperosmótico. Este dominio permite su interacción con regiones ricas en prolina de proteínas como Pbs2, facilitando el ensamblaje de complejos de señalización en la membrana plasmática. Asimismo, Sho1p puede interactuar con Ste11 de manera independiente, actuando como una plataforma que organiza y ancla los componentes de la cascada, favoreciendo una activación eficiente de la vía en respuesta a altas salinidades (Raitt *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 1995; Zarrinpar *et al.*, 2004).

En hongos filamentosos como *A. sydowii*, la vía HOG conserva esta arquitectura básica, pero presenta una mayor complejidad funcional. Se ha reportado la existencia de múltiples homólogos de *Hog1*, incluyendo *Hog1*, *Hog2* y *MpkC*, lo que sugiere mecanismos redundantes o especializados para responder a distintos tipos de estrés (Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021). En este contexto, la vía no solo regula la homeostasis osmótica a través del control del metabolismo del glicerol y transportadores como Fps1, sino que también participa en la modulación de procesos fisiológicos más amplios.

De hecho, estudios recientes han demostrado que en *A. sydowii* la vía HOG actúa como un sistema integrador de señales de estrés ambiental. Por ejemplo, en condiciones de alta presión hidrostática, la activación de la MAPK Hog1p no solo influye en la respuesta osmótica, sino también en la regulación del estado redox, el metabolismo energético y la producción de metabolitos secundarios (Cao *et al.*, 2025). En ausencia de esta vía se observan alteraciones en el crecimiento, la producción de metabolitos secundarios y la homeostasis del glicerol, además de cambios en el equilibrio redox y en la respuesta al estrés oxidativo, lo que en conjunto compromete la capacidad de adaptación a condiciones extremas (Hu *et al.*, 2025). En conjunto, la regulación de la homeostasis osmótica por la vía HOG no sólo depende del metabolismo y transporte de osmolitos como el glicerol, sino que también implica ajustes en el transporte iónico a través de la membrana plasmática. Estos procesos permiten mantener el equilibrio osmótico y

electroquímico celular frente a condiciones de estrés, integrando de manera coordinada la acumulación de solutos compatibles y el flujo de iones para sostener la homeostasis celular bajo condiciones de estrés.

1.3.2.- Transporte iónico

Para contender contra el estrés iónico, los microorganismos halotolerantes han desarrollado sistemas especializados de transporte de cationes que permiten mantener la homeostasis intracelular bajo altas concentraciones de NaCl, particularmente mediante el control de la relación K^+/Na^+ . Estos sistemas incluyen transportadores de captación de K^+ , como Trk1 y Trk2 (codificados por los genes *TRK1* y *TRK2*), y mecanismos de expulsión de Na^+ , como las ATPasas tipo P de la familia Ena (codificadas por los genes *ENA1-ENA5*) y los antiportadores Na^+/H^+ (codificados por el gen *NHA1*), los cuales actúan de manera coordinada para evitar la acumulación tóxica de sodio (Ariño et al., 2010; Hohmann, 2009).

En la levadura *S. cerevisiae*, la homeostasis de cationes alcalinos depende del control de los procesos de transporte a través de la membrana plasmática, los cuales regulan la concentración intracelular de K^+ y Na^+ . La captación de K^+ está mediada principalmente por los transportadores de alta afinidad Trk1 y Trk2 (codificados por *TRK1* y *TRK2*), mientras que la extrusión de Na^+ depende de las ATPasas Ena (principalmente *ENA1*) y del antiportador Nha1 (codificado por *NHA1*). Estos sistemas están regulados por diversas vías de señalización, incluyendo la vía HOG y la calcineurina, las cuales modulan tanto la expresión como la actividad de estos transportadores, permitiendo una respuesta eficiente frente a cambios en la osmolaridad y la concentración iónica (Ariño et al., 2010). En hongos halotolerantes, estas mismas estrategias se diversifican de acuerdo con el organismo. En especies como *Hortaea werneckii*, el mantenimiento del equilibrio iónico se asocia con una expansión génica significativa de estos sistemas, incluyendo múltiples copias de Trk, Ena y Nha (homólogos de *TRK*, *ENA* y *NHA*), lo que sugiere una estrategia basada en redundancia funcional y regulación diferencial para tolerar ambientes hipersalinos (Plemenitas et al., 2014). En contraste, *W. ichthyophaga*

presenta un repertorio reducido y niveles de expresión más bajos de transportadores de cationes. No obstante, conserva sistemas esenciales como las ATPasas Ena, los antiportadores Nha y las ATPasas de protones Pma (homóloga a *PMA1* en *S. cerevisiae*), que generan el gradiente electroquímico necesario para el funcionamiento de los antiportadores, así como complejos V-ATPasa implicados en la regulación del pH intracelular. Además, se ha propuesto que su pared celular gruesa contribuye a limitar la entrada de sodio, representando una estrategia complementaria de adaptación al estrés iónico (Plemenitas *et al.*, 2016; Kralj *et al.*, 2010).

1.3.3.- Adaptaciones en la pared celular

La pared celular fúngica es una estructura dinámica y rígida localizada externamente a la membrana plasmática, cuya función principal es proporcionar soporte estructural y protección frente a condiciones ambientales adversas. Está compuesta principalmente por una red compleja de polisacáridos y glicoproteínas, donde los β -1,3-glucanos constituyen el componente mayoritario de la matriz interna, enlazados mediante β -1,6-glucanos que contribuyen a la organización tridimensional de la red. En esta misma capa interna se localiza la quitina, la cual refuerza la estructura polisacarídica y aporta rigidez adicional. Por su parte, los α -glucanos, cuando están presentes, forman parte de la fracción fibrilar de la pared y pueden contribuir tanto a la integridad estructural como al enmascaramiento de otros componentes, modulando la interacción con el entorno. Finalmente, las manoproteínas se disponen en la capa más externa, donde participan en procesos de adhesión, reconocimiento y respuesta a estímulos ambientales (Free *et al.*, 2013). Adicionalmente, la organización de la pared celular no es uniforme entre los distintos grupos de hongos, sino que presenta variaciones en la proporción y disposición de sus componentes. En levaduras, la pared suele mostrar una estructura bien definida en capas, con una matriz interna rica en β -glucanos y quitina, recubierta por una capa externa abundante en manoproteínas. En contraste, en hongos filamentosos como *Aspergillus spp.*, la pared celular presenta una arquitectura más compleja y dinámica, en la que los α -glucanos pueden adquirir un papel más relevante en la organización de la superficie celular. Asimismo, en estructuras especializadas como los conidios, la pared puede incorporar componentes adicionales, como hidrofobinas y melaninas, que confieren propiedades específicas como hidrofobicidad, resistencia a la desecación y protección frente a agentes externos. Estas diferencias estructurales, así como la disposición de polisacáridos como mananos, β -glucanos y α -glucanos, también se ilustran en la Figura 1. Estas variaciones reflejan la capacidad de la pared celular para adaptarse a diferentes estados de desarrollo y condiciones ambientales, funcionando no solo como una barrera estructural, sino también como una interfaz dinámica de interacción con el entorno (Gow *et al.*, 2017).

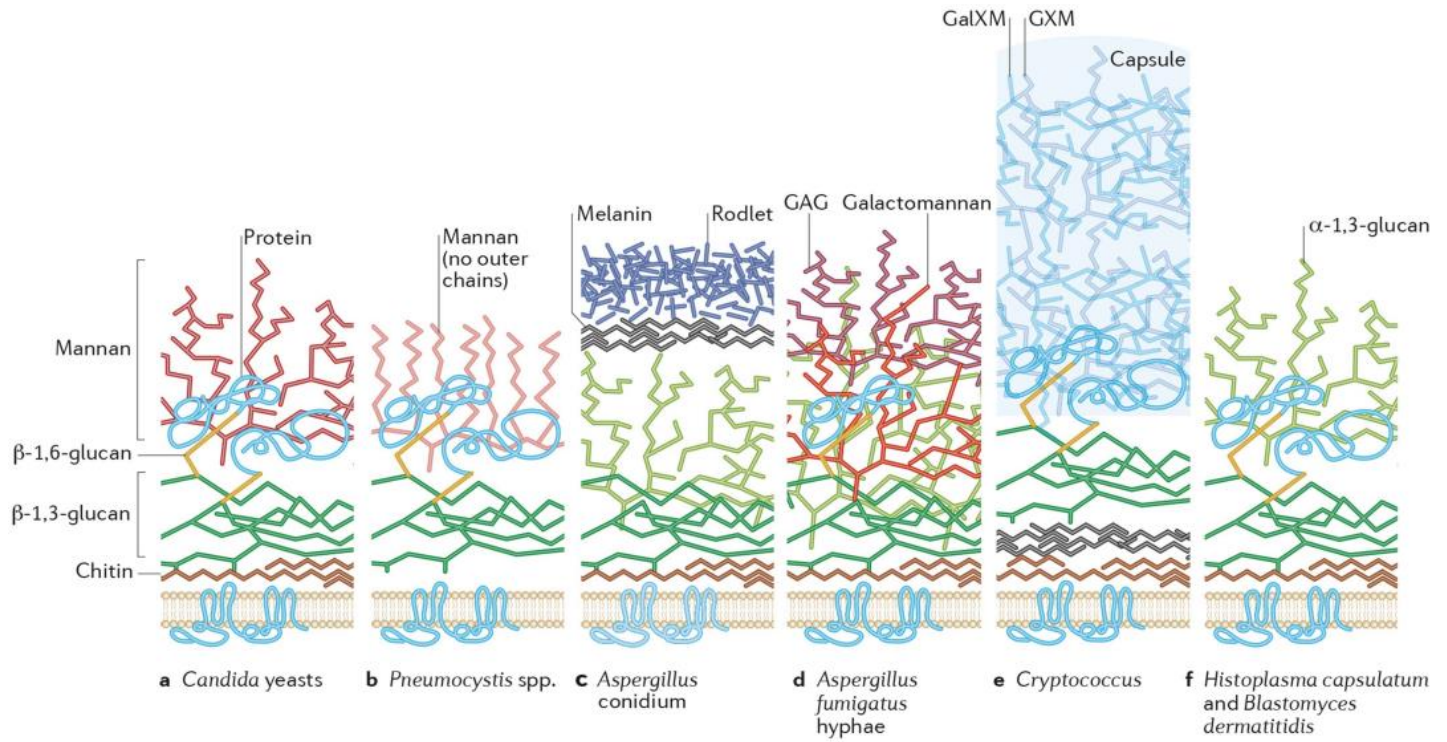


Figura 1. Organización estructural de la pared celular fúngica, mostrando la disposición de β -glucanos, quitina, α -glucanos y manoproteínas. Tomada de Gow *et al.* (2017).

Se ha observado en organismos como *W. ichthyophaga* modificaciones de su pared celular en condiciones hipersalinas. Al pasar de un medio con 2.6 M a un 4.3 M de NaCl, el grosor de su pared celular aumenta hasta 1.6 veces (Figura 2a) (Kralj *et al.*, 2010). También la pared celular del halófilo moderado *A. sydowii* se engrosa cuando es sometido a estrés osmótico (Figura 2b). Lo que correlaciona con la sobre-expresión de transcritos que expresan enzimas que tienen un rol en su remodelación (la endoquitinasa, la ECM33, la CRH glicosidasa, la glucosiltransferasa de la familia GEL). Dicha expresión diferencial sugiere que, al crecer en un ambiente hiperosmótico, se incrementa el contenido de β -glucanos, mientras que el contenido de quitina se reduce (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

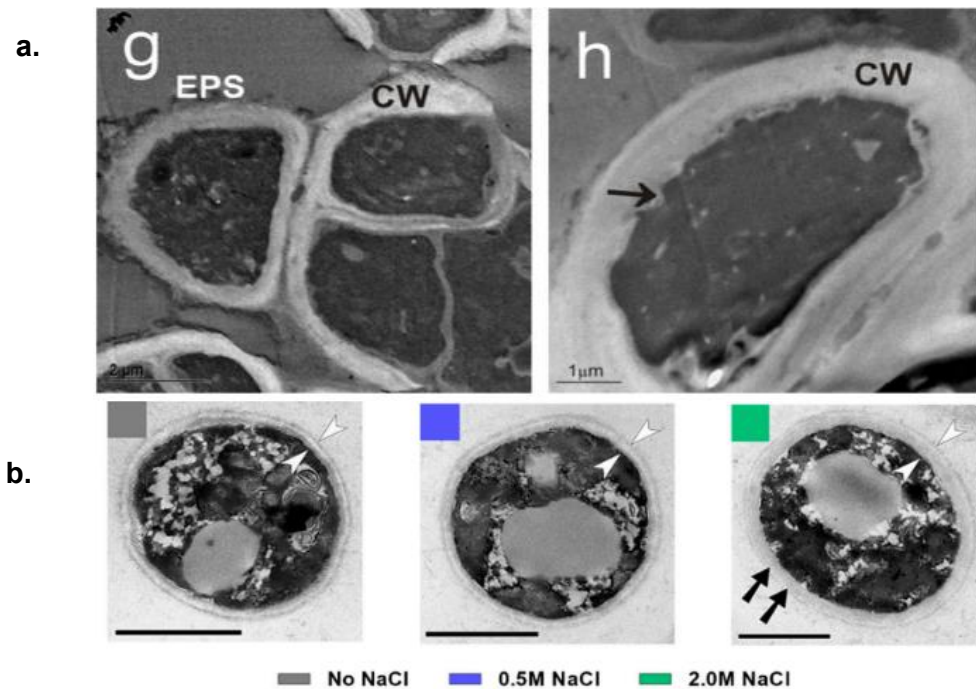


Figura 2. Engrosamiento de la pared celular en (a) *Wallemia ichthyophaga* (izquierda 15% de NaCl; derecha 25% de NaCl) (Kralj *et al.*, 2009) y (b) *A. sydowii* (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

Como se ha mencionado arriba, la pared celular presenta en su región más externa una capa de hidrofobinas, la cual, a pesar de su carácter hidrofóbico, permite el intercambio de gases. Asimismo, se ha reportado la expresión diferencial de transcritos de estas proteínas en *W. ichthyophaga* y *A. sydowii*. Pérez-Llano y colaboradores (2020) mostraron que los genes *sih1* y *sih2* de *A. sydowii* se sobreexpresan en una condición hipersalina (2 M NaCl), y, por otro lado, el gen *sih4* se regula de forma positiva en ausencia de sal. Es interesante que *W. ichthyophaga*, un halófilo obligado, que tiene un genoma relativamente pequeño (9 Mb) comparado con el promedio de otros hongos, presenta hasta 26 genes de hidrofobinas, y expresa diferencialmente 8 hidrofobinas en baja salinidad y otras 4 en hipersalinidad (Plemenitas *et al.*, 2014; Zajc *et al.*, 2013). Zajc y colaboradores (2013) hipotetizan que el incremento de genes de las hidrofobinas podría tener un papel relevante en el estilo de vida del hongo en un ambiente salino, sin embargo, no existe hasta el momento evidencia experimental que sustente la participación de estas como un protector frente al estrés hipersalino.

1.4.1- Características de las hidrofobinas

Las hidrofobinas son proteínas pequeñas (5-20 kDa) producidas por hongos filamentosos. Y tienen múltiples aplicaciones en el campo de la biotecnología como agentes emulsionantes, como incrementadores de la biocompatibilidad de implantes médicos, en la administración de fármacos recubiertos por hidrofobinas, en el recubrimiento de nanotubos de carbono, útiles en la purificación de proteínas, etc (Macindoe *et al.*, 2012). Éstas son anfipáticas (figura 3), y son denominadas hidrofobinas haciendo referencia a su hidrofobicidad (ver Plemenitas *et al.*, 2014). Su característica principal es tener ocho residuos de cisteínas que forman cuatro puentes disulfuro, en una secuencia promedio de 100 aminoácidos (Linder *et al.*, 2005). Éstas se autoensamblan en interfaces hidrofílicas-hidrofóbicas, formando películas anfipáticas.

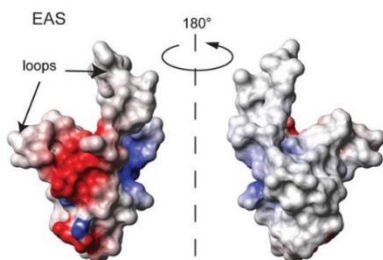


Figura 3. Representación de la hidrofobina de clase I EAS mostrando la superficie hidrofílica (izquierda), y la superficie hidrofóbica (derecha). Residuos hidrofóbicos de color gris, mientras que los positivos y negativos coloreados de azul y rojo, respectivamente (Ren *et al.*, 2013).

Las hidrofobinas son clasificadas en clase I y clase II. Las de clase I tienen secuencias de aminoácidos no conservados, espacios variables entre las cisteínas y una película que presenta la formación de estructuras fibrilares en forma de bastones tipo “rodlets” (Figura 4), son altamente estables e insolubles en SDS, pero se disuelven en solventes ácidos como el ácido fórmico (Linder *et al.*, 2005). Las de clase II poseen secuencias de aminoácidos y espacios conservados entre las cisteínas (ver figura 5), son menos estables y no forman películas tipo bastón. Se ha propuesto la existencia de una tercera clase de hidrofobinas con propiedades intermedias entre las clases I y II. Estas presentan un patrón de espaciamiento entre residuos de cisteína 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). Este patrón difiere del consenso descrito para 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 del característico de la clase II (X? - C - X9-10 - C - C - X11 - C - X16 - C - X8-9 - C - C - X10 - C - X6-7), aunque conserva similitudes parciales con ambas (Littlejohn *et al.*, 2012).

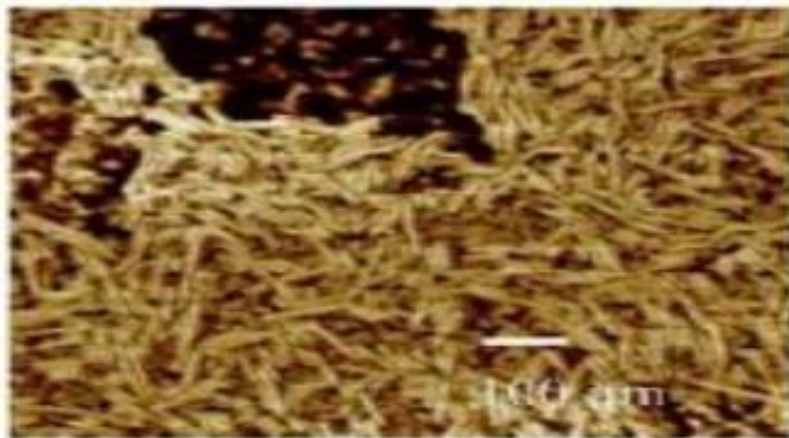


Figura 4. Hidrofobina de clase I tipo rodlets proveniente de *S. commune* (SC3) mostrando la disposición de la película formada por SC3 (Linder *et al.*, 2005).

1.4.2.- Estructura y función de las hidrofobinas

Las hidrofobinas están compuestas por cuatro hebras β antiparalelas formando un núcleo barril β central, estas hebras β son rodeadas de otros elementos de estructura secundaria (como α hélices) y bucles bien definidos (L1, L2 y L3), y regiones relativamente flexibles (Figura 5) (Ren *et al.*, 2013).

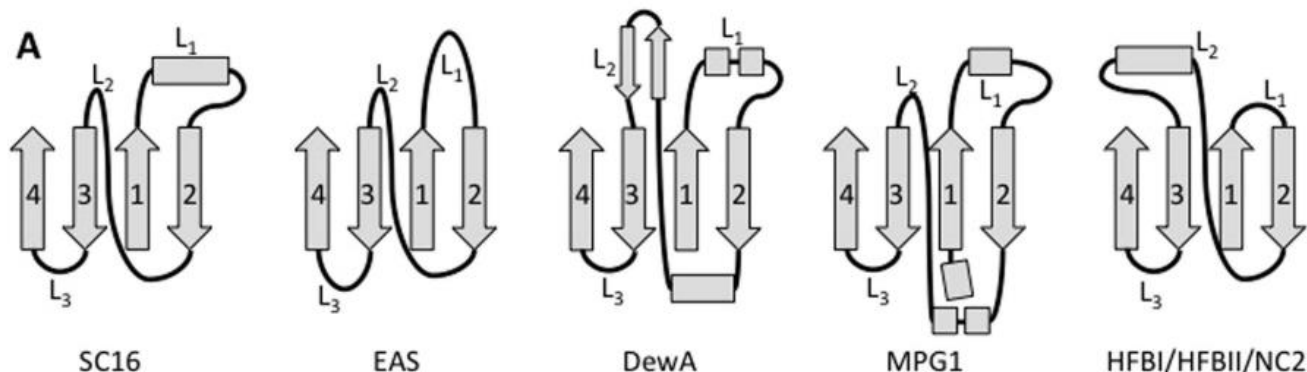


Figura 5. Modelos de la estructura secundaria de múltiples hidrofobinas. Las cuatro hojas β están numeradas (del 1 al 4) y los bucles están representados como L1, L2 y L3. Hidrofobinas de clase I: SC16 de *S. commune*, EAS de *Neurospora crassa*, DewA de *A. nidulans* y MPG1 de *Magnaporthe grisea*,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

Class I hydrophobins

	C#	1	23		4		5	67	8
EAS		IGFNTCSIDDKPYCCQSMSPAG	SPG	LLNL	IPVDLS	ASLGC	VVG	SQCG	ASVKCKDDVTNTGNSFLIINAANCA
RodA		QATEKCGDQAQ	LSCCNKATYAGDVIDE	GILAGT	LKNLIGGGS	GTEGLGLFNQCS	NVDLQ	IPVIGIPIQALVNQCKQN	IACQNSPSPDASGSLIGLGLP
MPG1		MAQQKCGAEK	VVSCCNKSKELKN	SKSGA	EIPI	DVLSGECKN	IPINILTIQ	LIPINNFC	DTVSCCS
RodB		QAQNKCGEHTT	LSCCNHVS	KVGDITAFNYGLNG	LLGNAISGPEGV	GILSGCQKISVTA	IGVDDLLNKQ	CQ	QNVACQDNKSVATGGLINIATPACVALDSII
SC3		AAGGTCTTGS	LSCCNQVQSAS	SSP	VTALGLL	GIVLSDNLVVGISCSPLT	IGVGG	SGCS	AQTVCC
Hyd3		NNQPACSAQSS	NVCCN			GLGCLVQ	IG	AGCS	TKSYCCQSDAPLAVGALVYNALNCVVL
DewA		AEGTTCNVGS	IACCN	SPAETNND	LLSGLLG	AGLLNG	LSGNTGSACAKASLIDQ	GLLALVDHTEEGPVCK	NIVACCPEGTTN

Class II hydrophobins

	C#	1	23	4	5	67	8
Hyd5		YIFCSG	LYGTS	CCATDVLGVADLDCG	NFPSTPANATDS	SAVCSAIGQR	ARCCVLPILDQGLCNTPTGVQD
MHP1		YIFCSG	LYGTS	CCATDVLGVADLDCG	QSDAFVDADN	SEICAAIGQR	ARCCVLPILDQGLCNTPTAGVTP
NC2		YIFCSG	LYGTS	CCATDVLGVADLDCAN	FPATLANATH	ESTCAAIGQR	ARCCVLPILDQGLCNTPTAGL
CU		YDFCTG	LLQKSP	CCNTDILGVANLDC	HGHP	PSVPTSPSQ	QASCVDGGRSARCC
CFTH1		YQPCFAG	LYSNP	CCATDVLGVADLDC	KNSSA	PMGDN	KSICNAV
CPPH1		YKPCPSG	LYSNP	CCSNVLGVADLDC	KNCKT	SFAPTS	FQSKSACS
HCF6		VELCPAN	RVF	CCQLSVLGVADLDC	AS	SSGLTSVSA	EAD

Figura 6. 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.

Las hidrofobinas son clave para el ciclo de vida de los hongos. Reducen la tensión superficial del agua, permitiendo el crecimiento de las hifas en el aire, y recubren a las esporas para protegerlas de la desecación (Linder *et al.*, 2005) debido a que las vuelven impermeables, pero permiten el intercambio gaseoso (Ren *et al.*, 2013). Debido a que se autoensamblan en interfases hidrofóbicas – hidrofílicas (confiriéndoles una propiedad hidrofóbica), las esporas pueden adherirse a superficies hidrofóbicas. Las funciones de estas proteínas han sido descritas mediante la remoción de los genes que codifican hidrofobinas por ingeniería genética. Por ejemplo, la cepa mutante del gen *hfb1* en *Trichoderma reesei* presenta defectos en el desarrollo de las hifas, mientras que las mutantes del gen *hfb2* muestran una reducción del 50% en la esporulación (Askolin *et al.*, 2005). Asimismo, en otros hongos filamentosos se ha observado que deleciones de genes de hidrofobinas, como *hyd1* de *Beauveria bassiana*, *Cmhyd1* de *Cordyceps militaris*, *hfb2* de *T. reesei* y *hyd1/hyd3* de *Clonostachys rosea*, alteran propiedades de la superficie conidial, afectando procesos como la adherencia y la hidrofobicidad (Zhang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2021; Askolin *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2014).

Además, también se han implicado en la patogenicidad de diversos hongos. Por ejemplo, la delección del gen *rodA*, que codifica una hidrofobina en *A. fumigatus*, un patógeno oportunista de humanos, provoca que los conidios sean más fácilmente reconocidos por el sistema inmune del hospedero. De manera similar, la eliminación de los genes *Fghyd2* y *Fghyd3* en *Fusarium graminearum* reduce significativamente su capacidad de infectar espigas de trigo (Paris *et al.*, 2003; Quarantin *et al.*, 2019).

Por otra parte, se ha propuesto que la abundancia de aminoácidos ácidos en la superficie de ciertas proteínas es crucial para su estabilidad en ambientes con alta salinidad. Ya que se ha sugerido que las cargas negativas aportadas por estos residuos favorecen la interacción con moléculas de agua y cationes del medio, lo que ayuda a prevenir la desnaturalización, agregación y precipitación proteica, fenómenos comunes cuando proteínas no halófilas son expuestas a concentraciones elevadas de sal (Dym *et al.*, 1995). En este contexto, resulta particularmente interesante que en el hongo halófilo obligado *W. ichthyophaga* se hayan identificado hidrofobinas con un mayor contenido de aminoácidos ácidos en comparación con sus homólogas de hongos no halófilos. Este

enriquecimiento podría facilitar la interacción con cationes presentes en el medio hipersalino, contribuyendo a modular su distribución y posiblemente limitando su entrada al interior celular. En conjunto, estas características sugieren que las hidrofobinas de *W. ichthyophaga* (un hongo halófilo obligado) podrían representar una adaptación molecular clave para el crecimiento y la estabilidad estructural en condiciones de alta salinidad (Plemenitaš *et al.*, 2014). Además, se ha observado que *W. ichthyophaga* sobreexpresa algunos de los transcritos de las hidrofobinas en condiciones de baja y alta salinidad, posiblemente cumpliendo papeles funcionales en diversas condiciones ambientales o etapas de desarrollo (Figura 7).

De manera interesante, este patrón de regulación parece estar correlacionado con lo observado en *A. sydowii*, donde también se ha identificado una expresión diferencial de genes que codifican hidrofobinas en respuesta a cambios en la salinidad. En la Tabla 1 se describen las características de estos genes en la cepa BMH004, así como el tamaño predicho de sus proteínas. Estudios transcriptómicos de *A. sydowii* realizados por Pérez Llano y colaboradores (2020), han demostrado que los genes que codifican hidrofobinas presentan una expresión diferencial en dependencia de la salinidad. En particular, tres hidrofobinas (*sih1*, *sih2* y *sih4*) mostraron una expresión diferencial bajo condiciones hipo- e hiperosmóticas, pero no durante el crecimiento en salinidad óptima. Mientras que *sih4* se sobreexpresa en ausencia de NaCl, *sih1* y *sih2* incrementan su transcripción en condiciones de alta salinidad (2.0 M NaCl) (Pérez Llano *et al.*, 2020). En conjunto, estos patrones de expresión sugieren una posible participación de las hidrofobinas en la respuesta a la salinidad; sin embargo, su función específica aún no ha sido caracterizada. Por lo tanto, el estudio funcional de estas proteínas se basa en la generación de mutantes de delección, lo que permite evaluar su contribución directa a la tolerancia al estrés.

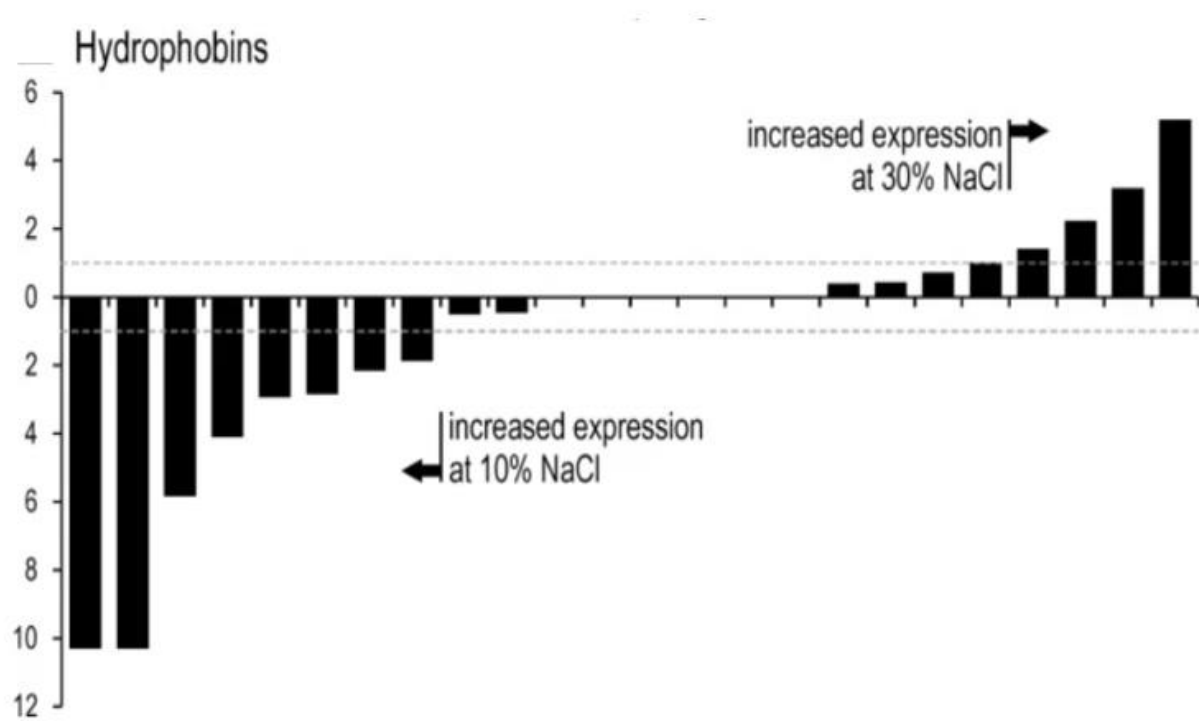


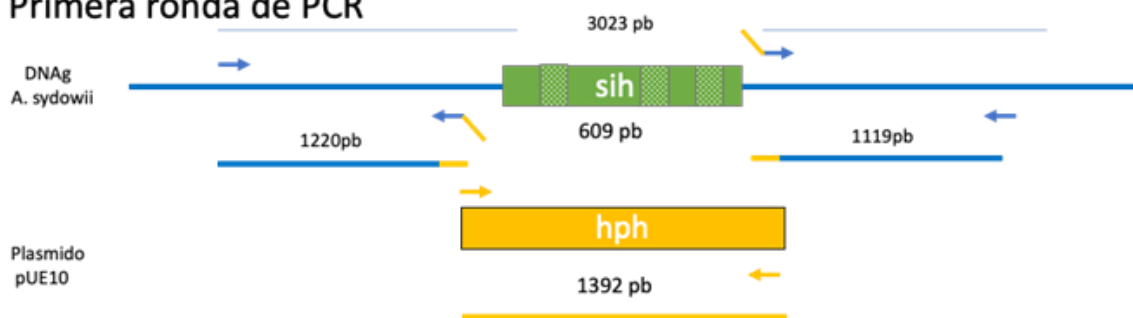
Figura 7. Expresión diferencial de genes de hidrofobinas en dos salinidades (izquierda 10% NaCl, derecha 30%) en *W. ichthyophaga*. El eje x representa los diferentes transcritos de cada hidrofobinas y el eje y representa el cambio de la expresión en escala logarítmica (Tomado de Zajc *et al.*, 2013).

1.4.3.- Técnicas de mutación en hongos filamentosos

Existen dos métodos para generar mutaciones (la cual es una alteración de una secuencia de DNA) en hongos filamentosos y en otros organismos. Una es a través de recombinación homóloga utilizando la técnica de PCR de doble unión (en inglés Double Joining PCR). En la que se llevan a cabo tres rondas de PCR, utilizando de tres pares de oligonucleótidos para la generación de construcciones que serán introducidas en hongos filamentosos (Figura 8) (Yu *et al.*, 2004). El segundo método es a través del sistema CRISPR Cas, el cual está compuesto por una endonucleasa de restricción conocida como Cas9 y el RNA guía (sgRNA, single chimeric guide RNA). En el que la especificidad de la endonucleasa Cas9 está determinada por el sgRNA, cuya secuencia guía reconoce por complementariedad de bases una región específica del ADN. La escisión de doble cadena se produce exclusivamente cuando dicha región se localiza inmediatamente adyacente a un motivo PAM (protospacer adjacent motif), el cual es una corta secuencia de nucleótidos indispensable para la actividad nucleasa de Cas9 (por ejemplo, la secuencia NGG en el sistema derivado de *Streptococcus pyogenes*). La dirección específica de la endonucleasa Cas9 está guiada por el sgRNA. El protoespaciador (fragmento de 20 nucleótidos) que forma parte del sgRNA, se une por complementariedad de bases a una secuencia diana. Una vez que este se aparea con la secuencia complementaria, la endonucleasa Cas9 induce un corte de doble cadena en el ADN. En ausencia de un molde homólogo, el corte de doble cadena es reparado por la unión final no homóloga (NHEJ) que genera deleciones en el sitio de corte (Nødvig *et al.*, 2015) (Figura 9 C). Recientemente, Chang y colaboradores (2023) desarrollaron un sistema CRISPR/Cas9 optimizado para especies del género *Aspergillus*, particularmente para miembros de la sección *Flavi*, el cual representa una mejora significativa respecto a metodologías previas. Este sistema permitió alcanzar frecuencias altas de direccionamiento génico (mayores al 95%) en *Aspergillus flavus*, sin necesidad de utilizar cepas deficientes en la vía NHEJ ni ADN donador homólogo. A diferencia de sistemas anteriores que dependían de cepas mutantes en NHEJ, múltiples marcadores de selección o diseños vectoriales complejos, la versión desarrollada por Chang simplifica el proceso al emplear un vector que contiene una secuencia AMA1 funcional para replicación autónoma y un sistema eficiente de expresión de Cas9 y del sgRNA bajo

promotores fúngicos adecuados. Esta estrategia elimina la necesidad de generar receptores auxotróficos o cepas NHEJ-deficientes, lo que reduce significativamente el tiempo y la complejidad experimental.

a. Primera ronda de PCR



b. Segunda ronda de PCR



c. Tercera ronda de PCR



Figura 8. Representación de las tres reacciones de PCR doble unión (Figura tomada y modificada de Yu *et al*, 2004).

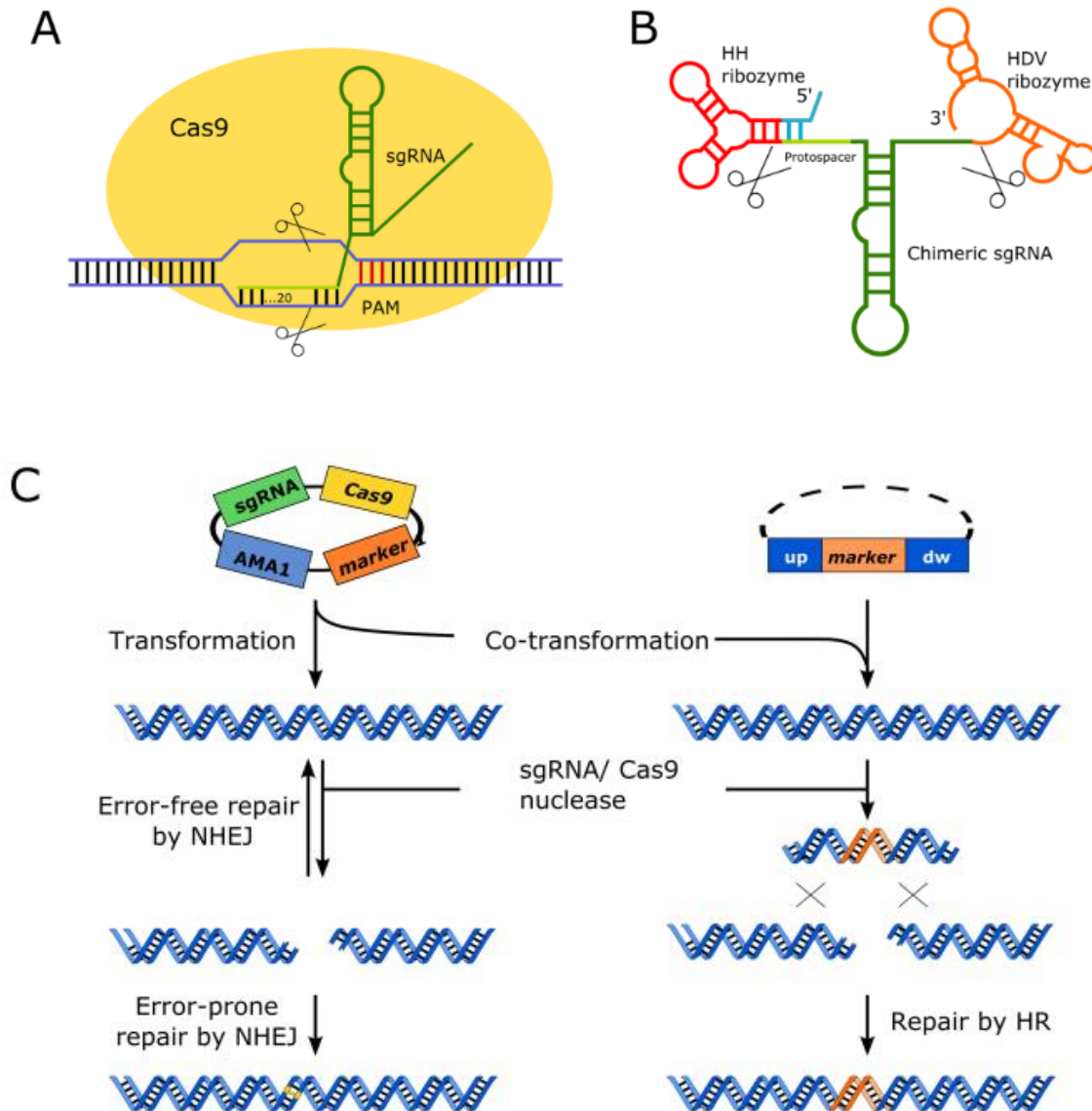


Figura 9. Sistema CRISPR/Cas9 en hongos filamentosos. A) Cas9 dirigida por el RNA guía (sgRNA). B) Liberación del sgRNA, representado en verde y verde/claro. C) Vector fúngico basado en AMA1 que contiene genes que codifican Cas9 y sgRNA. Este complejo induce un corte de doble cadena en el ADN. En ausencia de un molde homólogo para la reparación por recombinación homóloga HR (figura de la izquierda), el DSB de ADN es reparado por la unión final no homóloga (NHEJ) que resulta en mutaciones como se indica en las pares de bases amarillas (figura de la derecha) (Nødvig *et al.*, 2015).

2.- Antecedentes

2.1.- Características del halófilo moderado *A. sydowii*

En el laboratorio de biología molecular de hongos, se aisló el hongo *A. sydowii* a partir de una fermentación de bagazo de caña suplementado con 2.0 M de NaCl. Se determinó que su crecimiento óptimo se obtiene cuando se suplementa con 0.5 y 1.0 M de NaCl, por lo que se clasificó como un halófilo moderado.

2.2.- Análisis transcriptómico de *A. sydowii*

El análisis transcriptómico de *A. sydowii* crecido en paja de trigo bajo condiciones hiposmóticas (0 M NaCl), hiperosmóticas (2 M NaCl) y salinidad óptima (0.5 M NaCl) reveló que, de los cinco genes anotados como hidrofobinas en su genoma, tres (*sih1*, *sih2* y *sih4*) presentaron sobreexpresión diferencial en respuesta a cambios en la concentración de NaCl (Figura 9) (Pérez-Llano *et al.*, 2020). Por el contrario, *sih3* mostró niveles de expresión bajos, por lo que no fue considerado en el análisis funcional. En la tabla 1 se describen las características de los genes de las hidrofobinas y el tamaño de las proteínas de *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
<i>sih1</i>	1	2	3	1	2	129	Sin clasificar
	277 pb	98 pb	57 pb	99 pb	77 pb		
<i>sih2</i>	1	2	3	1	2	137	Clase 2
	328 pb	80 pb	57 pb	53 pb	52 pb		
<i>sih4</i>	1	2	3	1	2	117	Sin clasificar
	407pb	56pb	39 pb	55 pb	50 pb		

La regulación diferencial de estas hidrofobinas, correlacionada con la salinidad del medio, sugiere que podrían participar como mediadores en la respuesta al estrés salino. Sin embargo, su función específica en la adaptación a la salinidad y los mecanismos que

determinan su regulación diferencial aún no se comprenden completamente. Además, existen pocos estudios que exploren el papel de las hidrofobinas como posibles componentes en los mecanismos de halotolerancia, lo que resalta la importancia de profundizar en el estudio funcional de estas proteínas (Méndez Ortega, 2021).

En particular, se ha observado que mientras *sih4* se sobreexpresa en ausencia de NaCl, *sih1* y *sih2* incrementan su transcripción en condiciones de alta salinidad (2.0 M NaCl), lo que sugiere una respuesta diferencial dependiente de la osmolaridad (Pérez-Llano *et al.*, 2020). Este patrón indica que *sih2* podría estar directamente implicada en la adaptación a condiciones hiperosmóticas, a diferencia de otras hidrofobinas que responden a condiciones opuestas o más generales.

En conjunto, estos antecedentes sugieren que las hidrofobinas podrían desempeñar funciones clave en la adaptación a cambios osmóticos; no obstante, estas funciones aún requieren validación experimental. Por lo que este trabajo tiene como objetivo generar una delección del gen de hidrofobina *sih2* en *A. sydowii*, nuestro modelo de estudio, con el fin de determinar si este es indispensable para la tolerancia a estrés osmótico e iónico.

Por tanto, para comprender si las hidrofobinas sobreexpresadas en condiciones hipersalinas son cruciales para la tolerancia del hongo a ambientes hipersalinos, se deben generar cepas mutantes para evidenciar si tienen relación con la tolerancia del hongo a estas condiciones. Durante mi tesis de licenciatura se generaron los “cassettes” recombinantes de los genes *sih1*, *sih2* y *sih4* con el fin de obtener cepas mutantes de estos genes de hidrofobinas de *A. sydowii* y determinar su función frente a condiciones de estrés osmótico. Esto resulta pertinente, ya que se ha observado que cepas mutantes de hidrofobinas, como en *C. militaris*, tienen menor tolerancia a estrés osmótico, oxidativo y de pared celular, inducido por SDS, H₂O₂ y Rojo Congo, respectivamente. Mientras que la sobreexpresión de la hidrofobina HFB2 del hongo *Trichoderma guizhouense* induce la resistencia al estrés osmótico inducido tanto por NaCl como por sorbitol en concentraciones de 0.75 M, 1.0 M y 1.5 M (Cai *et al.*, 2021).

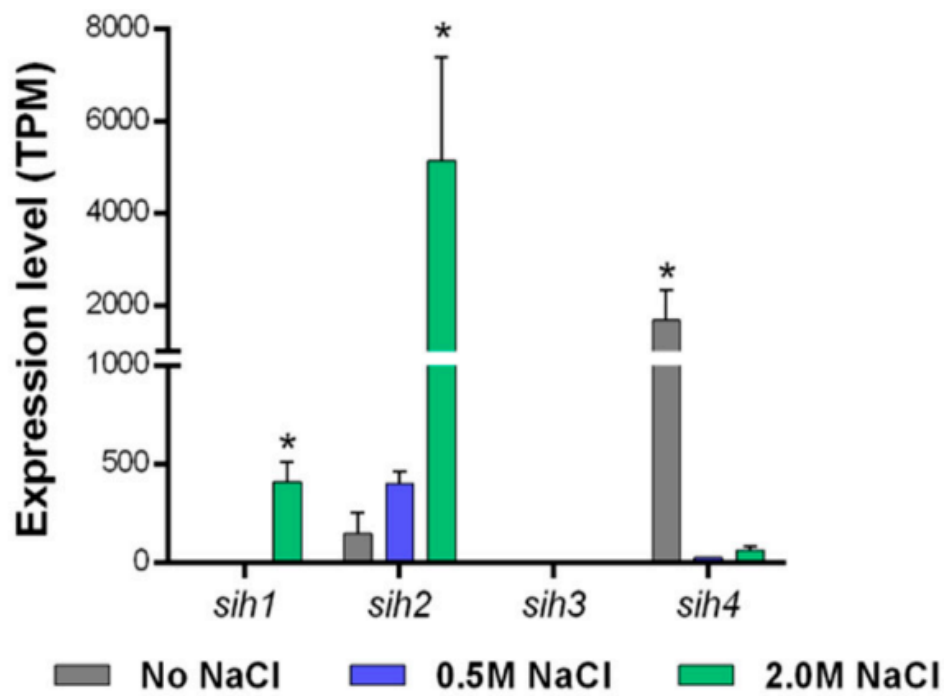


Figura 10. Expresión diferencial de transcritos que codifican para las hidrofobinas SIH1, SIH2, SIH3 y SIH4 en diferentes concentraciones de sal (Tomado de Pérez-Llano *et al.*, 2020).

3.- Justificación

Se ha hipotetizado que las hidrofobinas podrían ser clave para contender con el estrés osmótico como en ambientes donde se desarrollan *W. ichthyophaga* y *A. sydowii* (nuestro modelo de estudio). Este último con un potencial biotecnológico por su capacidad para degradar biomasa vegetal y ser fuente de enzimas halotolerantes, debido a que se ha visto una correlación de la expresión diferencial de genes de hidrofobinas con la salinidad. Sin embargo, no existe hasta el momento evidencia experimental que sustente su participación como una respuesta a estrés. Por lo tanto, es pertinente generar líneas mutantes de los genes *sih1*, *sih2* y *sih4* del hongo halófilo *A. sydowii* para determinar si estos juegan un papel importante en la tolerancia de estos hongos al estrés hipo- o hiperosmótico o bien a otros tipos de estrés. Particularmente, será interesante determinar si la *sih2* es la hidrofobina que permite contender con el estrés hiperosmótico dada su alta expresión observada por transcriptómica y RT-qPCR en condiciones hipersalinas.

4.- Hipótesis

La *sih2* es indispensable para la tolerancia de *A. sydowii* a hipersalinidad y a otros tipos de estrés como al de pared celular.

5.- Objetivo general

Caracterizar la línea mutante de hidrofobina codificada por el gen *sih2* de *A. sydowii* bajo condiciones de estrés.

6.- Objetivos específicos

6.1.- Determinar la tolerancia de *A. sydowii* wt a estrés osmótico y de pared celular.

6.2.- Generar línea mutante de hidrofobina del gen *sih2* de *A. sydowii* a través de recombinación homóloga.

6.3.- Caracterizar fenotípicamente la tolerancia de las líneas mutantes de la hidrofobina *sih2* bajo condiciones de estrés salino, osmótico, y de pared celular.

6.4.- Determinar la hidrofobicidad y la producción de esporas de la línea mutante *sih2*.

7.- Metodología

7.1.- Cepas fúngicas y condiciones de cultivo

Se utilizó a la cepa *Aspergillus sydowii* BMH-0004 (Pérez-Llano *et al.*, 2020) del 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 el mantenimiento y proliferación de la cepa *A. sydowii* se usó el medio sólido PDA (20 % de papa, 2% de dextrosa y 1.5% de agar) (Pérez-Llano *et al.*, 2020), en el cual se inoculó al hongo con 10,000 conidios en el centro de la caja y se incubó por alrededor de 7 días a 28 °C. Posteriormente los cultivos se mantuvieron a 4 °C hasta su re-siembra.

Medio Caldo, Papa y Dextrosa (PDB, por sus siglas en inglés); utilizado para el crecimiento de *A. sydowii* en cultivo líquido y la obtención de biomasa fúngica para extracciones de ADN.

7.2.1.- Preservación de *A. sydowii* en glicerol

A) Preservación de esporas: Partiendo de cultivos de *A. sydowii* crecidos en PDA por 7 días, las esporas se recolectaron con 750 µl PBS (8.06 g de NaCl, 0.22 g de KCl, 1.15 g de Na₂HPO₄, 0.20 g de KH₂HPO₄) y Tween-20 al 0.1%. Posteriormente, se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml, y se añadieron 250 µl de glicerol (25 % final). Esto se almacenó a -80 °C.

B) Preservación de micelio: *A. sydowii* también se mantuvo tomando tres cilindros de aproximadamente 0.7 mm (utilizando 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.- Evaluación de la respuesta a estrés osmótico y de pared celular mediante microcultivos en *A. sydowii* wt

Para observar cambios a nivel micro morfológico, como cambios en la longitud de las hifas, a partir de precultivos de *A. sydowii* crecido en medio PDA suplementado con diferentes concentraciones de sorbitol (0 M, 0.5, 2 y 3 M), se llevaron a cabo microcultivos. Los cuales se realizaron de la siguiente manera:

- Se obtuvo el levantamiento de esporas a partir de un precultivo fresco en medio PDA empleando PBS 1X con 0.1 % de Tween, utilizando un asa triangular de vidrio. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas y se contaron las esporas en la cámara de Neubauer, con el fin de obtener una dilución que contuviera 10 esporas en 10 μ L.
- Una vez obtenida la dilución, se vertieron aproximadamente 1 mL de medio PDA con sorbitol estéril directamente sobre cada uno de los portaobjetos y se dejaron solidificar, con el fin de generar una superficie uniforme para el crecimiento de las hifas. Esta modificación permitió la visualización de una mayor cantidad de hifas bien separadas.
- Una vez solidificado el medio PDA vertido directamente sobre los portaobjetos, se aplicaron las esporas sobre la superficie del PDA solidificado, específicamente en el borde y en el centro donde fue el área de inoculación.
- Posteriormente, se colocó el cubreobjetos con un tamaño de 22 $\times$ 22 mm con ayuda de pinzas y se presionó ligeramente.
- Una vez colocado el cubreobjetos, se adicionaron 2 mL de agua destilada sobre el papel filtro o sanita y la torunda de algodón. Finalmente, se cerró la cámara de incubación y se envolvió en papel aluminio. En la figura 11 se muestra el ensamblaje de la cámara de incubación (Figura 11).
- La cámara se incubó a 28 °C durante 2 días, y se mantuvo la humedad añadiendo agua estéril cada 24 horas. Los experimentos de microcultivos se realizaron con tres réplicas independientes por condición experimental.

Los datos obtenidos fueron organizados y procesados utilizando el software RStudio versión 4.4.3 (Castrejón, 2024).



Figura 11. Ensamble de la cámara de incubación para micro cultivo.

7.4.- Cinética de crecimiento de la cepa silvestre de *A. sydowii* en Rojo Congo

Con el fin de evaluar la tolerancia de la cepa silvestre de *A. sydowii* al Rojo Congo, utilizado para visualizar la pared celular de hongos, se realizó la cinética de crecimiento en medio PDA suplementado con diferentes concentraciones de este compuesto (0.5, 2.5 y 5 mg/mL). Para lo cual se inocularon 10,000 esporas en 10 µl en el centro de la caja, a partir de haber colectado esporas de un precultivo del hongo crecido por 7 días en PDA.

Una vez que se inocularon las esporas, el cultivo se incubó a 28 °C y el crecimiento fue monitoreado mediante la medición del diámetro de la colonia cada tercer día durante un periodo de 15 días. Este análisis permitió evaluar la dinámica de crecimiento en función de la concentración inicial de inóculo.

7.5.- Velocidad de crecimiento de *A. sydowii* crecido en Rojo Congo

A partir de los cultivos de *A. sydowii* en PDA suplementado con Rojo Congo, se analizaron los datos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento. La velocidad de crecimiento se determinó a partir de la pendiente de la recta ajustada a los datos de esta fase, utilizando los puntos seleccionados dentro del intervalo lineal de crecimiento. Esta pendiente se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

7.6.- Delección del gen de hidrofobina *sih2*

La delección del gen de hidrofobina *sih2*, cuyas secuencias fueron obtenidas de la base de datos de NCBI, fue realizada mediante el uso de un “cassette” de recombinación. Para la construcción del “cassette”, las regiones flanqueantes de la hidrofobina (Yu et al., 2004) y el gen de resistencia a higromicina (Hyg) se amplificaron del genoma de *A. sydowii* y del plásmido pUE10 de *E. coli*, respectivamente. En la Figura 10 se muestra la representación de las tres reacciones de PCR de doble unión. Los oligonucleótidos que se utilizaron para la generación de los “cassettes” recombinantes se muestran en la tabla 2. Este “cassette” de recombinación que contiene la región flanqueante 5’ de *sih2* – marcador de selección *hph* – región flanqueante 3’ de *sih2*, fue utilizado para la transformación de la cepa (Yu et al., 2004; Sánchez y Aguirre, 1996). Posteriormente, el “cassette” fue introducido en *A. sydowii* mediante electroporación de germínulas, donde ocurre la recombinación homóloga con el locus silvestre, generando la delección del gen de hidrofobina *sih2*. Se tamizaron aquellas colonias que crecieron en presencia de medio PDA selectivo con higromicina (100 µg/mL). Después de dos pases monospóricos, seleccionando las colonias resistentes al antibiótico, estas se verificaron mediante PCR de colonia. En la tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados para realizar el PCR de colonia. En las tablas 3, 4 y 5 se presentan las condiciones utilizadas para generar el “cassette” recombinante del gen *sih2*.

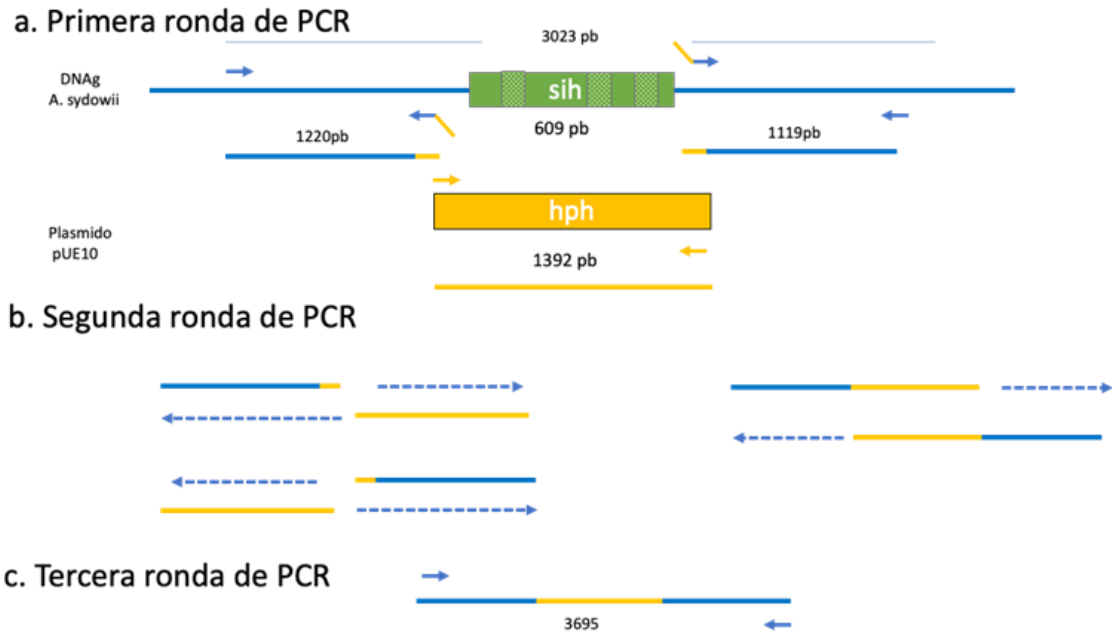


Figura 12. Representación de las tres reacciones de PCR doble unión (Figura tomada y modificada de Yu *et al.*, 2004).

Tabla 2. Oligonucleótidos quiméricos y oligonucleótidos para la amplificación de todo el fragmento de recombinación del gen de hidrofobina *sih2* de *A. sydowii* y el gen de resistencia a Higromicina (*hph*).

<i>Sih2</i>	QuimSih2 Forward	CAGCAGGTTGGAAGCTCATCGATCGACGTTA ACTGATATTGAAGG
	QuimSih2 Reverse	CAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGCTG TCATTGCCACCGAGAAG
	Nested Forward	CTGTACACTATGCAGACCTATTG
	Nested Reverse	GCGAGAGTAGTCCCAAATACG

<i>hph</i>	
hph Forward	GATCGACGTTAACTGATATTGAAGG
hph Reverse	GATCGACGTTAACTGATATTGAAGG

Tabla 3. Condiciones utilizadas para la amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *sih2*, 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

Tabla 4. 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 (Verifi) 68 °C (Platinum)	5 minutos

Tabla 5. 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

7.7.- Tamizado de las cepas mutantes putativas *As Δ sih2_C1* y *As Δ sih2_C2*

Para confirmar la integración del “cassette” de delección en el locus del gen *sih2*, se realizaron PCR de colonia en transformantes de *A. sydowii*. Se emplearon oligonucleótidos flanqueantes del brazo 5' del gen, en la región río arriba, y una región interna del gen de resistencia a higromicina (*hph*) (Tabla 6), amplificando un fragmento correspondiente a 5'-*sih2* + *hph*, con un tamaño esperado de 842 pb.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para el PCR de colonia.

	Primer Fw HFB 5´	5´ AAGGTTTTGCCTCCCTTCC3´
Cassette mutante de la	Primer Fw Hyg	5´ CCAACATCCTCTTCTGGAGG 3´
<i>Sih2</i>	Primer Rv Hyg	5´ GCTGAAAGCACGAGATTCTTCG 3´
	Primer Rv HFB 3´	5´ GTTGAGTTAGCAGTCCAAGTGTG 3´

7.8.- Análisis macroscópico comparativo de colonias de *Aspergillus sydowii* silvestre y mutantes de *sih2* en medio sólido

Las características macroscópicas de *A. sydowii* silvestre (wt) y de dos cepas mutantes derivadas (*As Δ sih2_C1_5.3* y *As Δ sih2_C2_5.3*) fueron evaluadas tras 9 días de incubación. Las cepas se cultivaron en medio PDA (Papa Dextrosa Agar), en placas de Petri de 10 cm de diámetro a 28 °C, bajo condiciones estáticas y en oscuridad.

Estas se documentaron fotográficamente para determinar las siguientes características macroscópicas:

- Morfología de la colonia: se evaluaron las características del anverso y reverso. En el anverso se observó el color, la pigmentación, la distribución del micelio y la presencia de estructuras reproductivas (conidios y conidióforos). En el reverso se evaluó la producción de metabolitos secundarios difusibles, así como la presencia de estrías en el micelio.
- Textura: se observó la estructura general del micelio y su compactación.
- Perímetro micelial: se observó la disposición y estructura del borde de las colonias para identificar diferencias en crecimiento apical, organización y densidad de las hifas.
- Exudados (gotas de gutación): se observaron las gotas secretadas sobre la superficie micelial en cuanto a cantidad, tamaño, color y distribución.

Las fotografías se tomaron en condiciones de luz blanca uniforme y fondo negro para mejorar el contraste, a una distancia aproximada de 1 cm entre la muestra y el sistema de captura del microscopio. Para asegurar la comparabilidad entre las imágenes, se utilizó una regla como referencia, manteniendo constantes la altura y la distancia de captura. Estas observaciones se realizaron empleando un microscopio estereoscópico, lo que permitió complementar el análisis morfológico.

7.9.- Ensayos de tolerancia a estrés

El efecto en el crecimiento de la línea silvestre y las líneas mutantes de *A. sydowii* bajo estrés osmótico, iónico y de pared celular se evaluó cualitativamente en medios PDA con agentes estresantes como sorbitol (Sigma-Aldrich, No. de catálogo S6021) a concentraciones de 0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 M, NaCl (0, 0.5 y 2.0 M) y Rojo Congo (0.5, 2.5 y 5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Cat. No. C6767), respectivamente. Asimismo, el crecimiento fue analizado a partir de la inoculación de un número distinto de esporas, aproximadamente 10, 100, 1,000 y 10,000 esporas por caja mediante diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000). Las colonias se incubaron a 28 °C y el crecimiento fue monitoreado visualmente a las 48, 72 y 96 horas de incubación, para registrar diferencias en el tamaño, densidad y morfología de las colonias entre las cepas y condiciones evaluadas.

7.10.- Análisis de humectabilidad (wettability) en las mutantes putativas en *sih2* de *A. sydowii*

Para evaluar las propiedades hidrofóbicas del micelio, se realizó un ensayo de humectabilidad en colonias de *A. sydowii* cultivadas durante 9 días. Se aplicaron 20 µL de agua estéril y de una solución de PBS con 0.1% de Tween 20, directamente sobre la superficie del micelio. Las gotas fueron fotografiadas inmediatamente después de la aplicación (0 min) y después de 30 min de incubación a temperatura ambiente. El comportamiento de las gotas sobre el micelio se utilizó como indicador cualitativo de la hidrofobicidad de la superficie, permitiendo evaluar visualmente diferencias en la retención y/o absorción del líquido, asociadas a posibles cambios en las propiedades de la superficie fúngica. Como se menciona en Li y colaboradores en 2021.

7.11.- Cuantificación de la producción de esporas en las cepas mutantes putativas y *A. sydowii* wt

Para evaluar la capacidad de esporulación, se cuantificó la producción de esporas en *A. sydowii* silvestre (*wt*) y en las cepas mutantes putativas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3*. Las cepas fueron cultivadas en placas de Petri con medio PDA, inoculando 10,000 esporas por placa, e incubadas a 28 °C. La evaluación se realizó el día 4 y el día 8 de crecimiento.

Para cuantificar las esporas:

A una colonia de *A. sydowii* crecida en medio PDA se añadió 1 mL de solución estéril de PBS (8.06 g de NaCl, 0.22 g de KCl, 1.15 g de Na₂HPO₄, 0.20 g de KH₂HPO₄) + Tween 20 al 0.75 % sobre la superficie de cada colonia. Posteriormente, se frotó suavemente la superficie con un asa de vidrio estéril para recuperar las esporas. A partir de la suspensión obtenida se realizaron diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000. Las esporas fueron cuantificadas utilizando una cámara de Neubauer en el microscopio óptico. Los resultados se expresaron como número de esporas por mL.

7.12.- Análisis de la producción de esporas en las cepas mutantes putativas y *A. sydowii* wt

Para evaluar la producción de esporas de las cepas analizadas *A. sydowii* (wt) y mutantes (*AsΔsih2_C1_5.3* y *C2_5.3*), se emplearon cinco réplicas biológicas independientes por cepa. Las esporas se recolectaron de colonias crecidas en medio PDA en los días 4 y 8 post-inoculación. Las esporas recolectadas fueron cuantificadas y los datos se transformaron a log₁₀ para normalizar la distribución. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey, con el objetivo de identificar diferencias significativas en la producción de esporas entre las cepas en cada uno de los días evaluados, esto se llevó a cabo utilizando RStudio versión 4.4.3.

8.- Resultados

8.1.- *A. sydowii* wt es sensible a estrés osmótico y de pared celular inducido por sorbitol y Rojo Congo

8.1.2.- Diferencias morfológicas macroscópicas de *A. sydowii* bajo estrés osmótico por sorbitol

El presente trabajo forma parte de un proyecto cuyo propósito es analizar el comportamiento de mutantes en el gen de hidrofobina *sih2*, y de otras hidrofobinas, de *A. sydowii* bajo condiciones de estrés salino, particularmente a concentraciones superiores a su rango óptimo de crecimiento (0.5 – 1.0 M), como 2.0 y 3.0 M de NaCl. No obstante, también resulta fundamental evaluar la respuesta de estas mutantes frente al estrés osmótico generado por otros solutos, como el sorbitol o el glicerol, los cuales, a diferencia del NaCl, no inducen estrés iónico. En este contexto, se busca determinar si la delección de hidrofobinas afecta la tolerancia a cambios en la osmolaridad del medio, independientemente del tipo de estrés ya sea osmótico o iónico. En este sentido, se ha reportado que la sobreexpresión de la hidrofobina HFB2 de *Trichoderma guizhouense* es resistente tanto a estrés salino como osmótico en un rango de 0.75 a 1.5 M (Cai *et al.*, 2021). Por lo tanto, resulta pertinente analizar la tolerancia de *A. sydowii* a concentraciones elevadas de solutos como el sorbitol. Debido a que no conocíamos la tolerancia de *A. sydowii* a sorbitol, Se estandarizó el rango de concentración que tolera *A. sydowii* silvestre en sorbitol (0, 0.5, 2 y 3 M) (Figura 13) como agente de estrés osmótico. También, se incluyó NaCl con el fin de comparar la respuesta de la cepa ante estrés osmótico e iónico, permitiendo diferenciar entre efectos asociados a la osmolaridad y al desequilibrio iónico (Figura 14). En el ensayo de crecimiento utilizando diferentes concentraciones de esporas, los experimentos se realizaron en tres réplicas independientes y se monitorearon a las 48, 72 y 96 horas. Se observa que el incremento en la concentración de sorbitol afecta de manera dependiente el crecimiento de las colonias, evidenciado por una disminución en su tamaño y densidad. En ausencia de sorbitol (0 M), las colonias mostraron una expansión radial sostenida. No obstante, en 0.5 y 2.0 M se observó mayor crecimiento en comparación con el control, lo que sugiere una respuesta adaptativa ante incrementos moderados de la osmolaridad. En contraste,

a 3 M el crecimiento disminuyó notablemente desde las primeras horas de incubación y se mantuvo restringido hasta las 96 h, evidenciando una limitación marcada durante todo el periodo de evaluación. Las cuatro líneas de colonias corresponden a diluciones seriadas (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 esporas), utilizadas para evaluar la capacidad de crecimiento bajo cada condición.

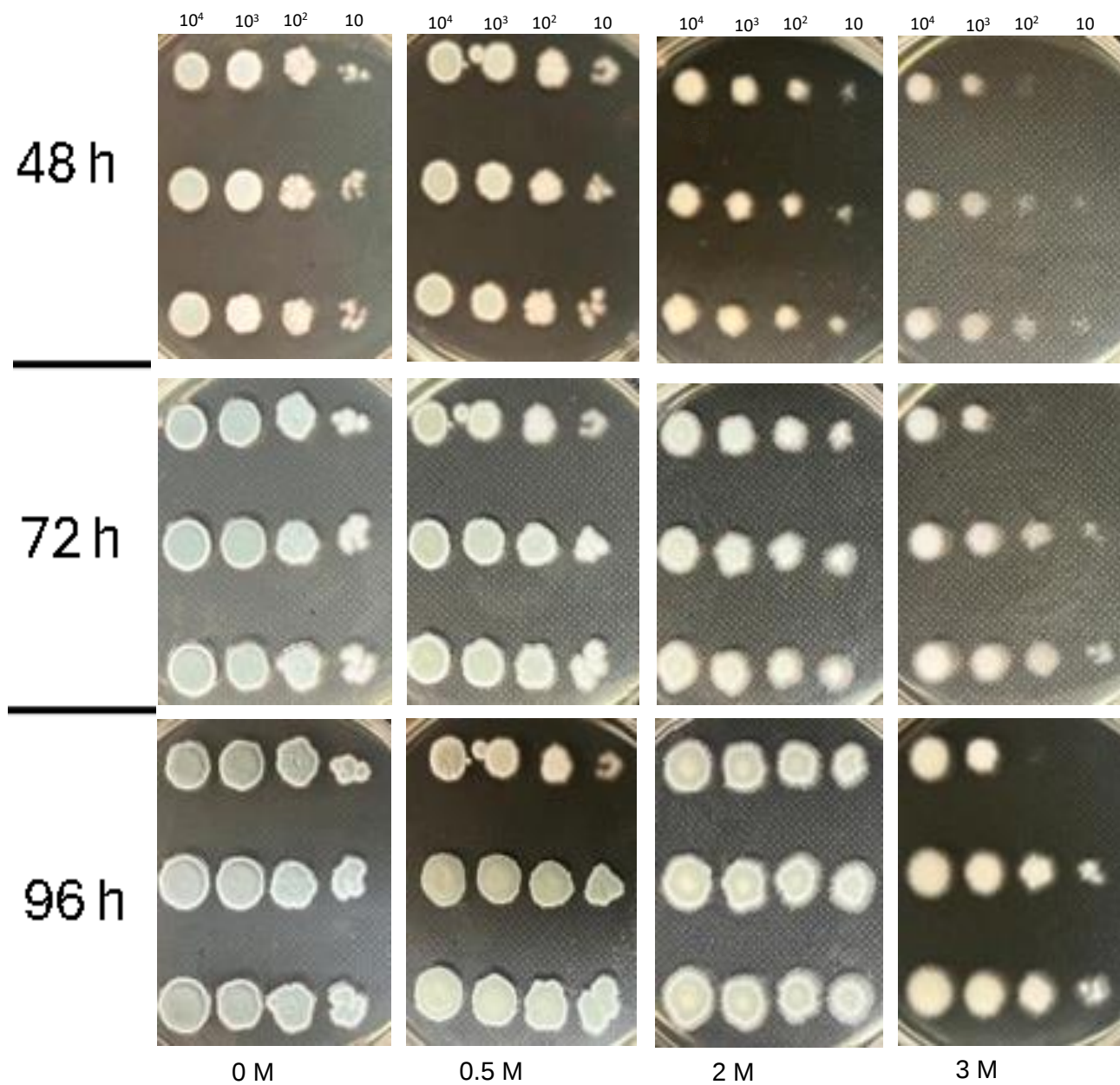


Figura 13. *A. sydowii* wt es sensible a estrés osmótico inducido por sorbitol.

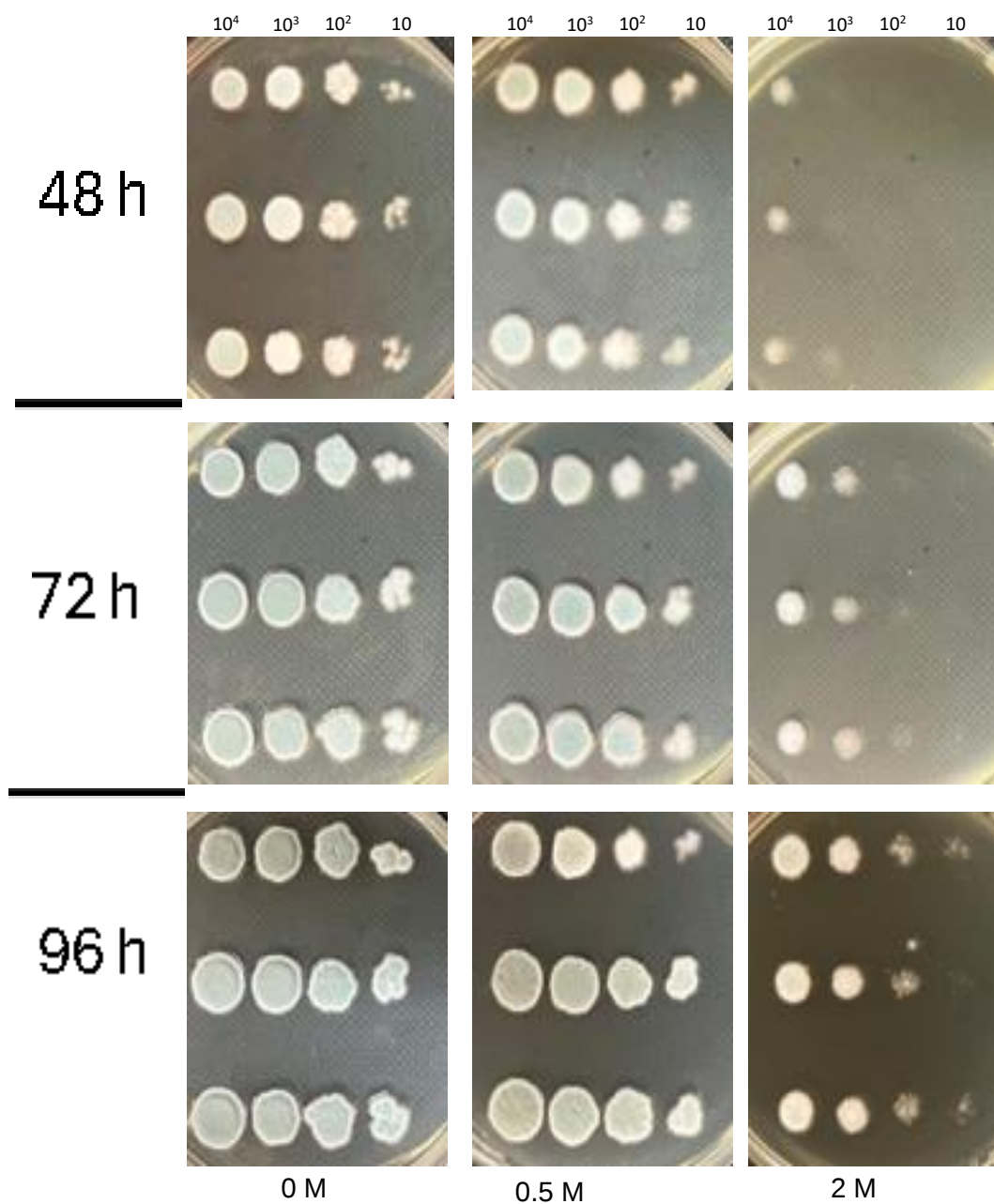


Figura 14. *A. sydowii* wt es sensible a estrés salino inducido por NaCl.

8.1.3.- Diferencias microscópicas de *A. sydowii* wt son inducidas bajo estrés osmótico por sorbitol

Con el objetivo de evaluar el efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento hifal de *A. sydowii* wt y posteriormente realizar los experimentos en las mutantes putativas del gen *sih2*, se analizaron microscópicamente las hifas de *A. sydowii* en presencia de diferentes concentraciones de sorbitol (0, 0.5, 2 y 3 M). El crecimiento se determinó mediante la medición de la longitud hifal (tres réplicas por condición) y se calculó el promedio. En la condición control (0M), las hifas de *A. sydowii* presentaron valores de crecimiento homogéneos característicos de *A. sydowii*. En 0.5 y 2 M, se observó un incremento en la longitud hifal promedio respecto al control, lo que sugiere una respuesta adaptativa a condiciones de menor actividad de agua, con un mayor número de ramificaciones en la condición de 0.5 M. Finalmente, a 3 M el crecimiento fue consistentemente bajo, indicando que el estrés osmótico inducido por sorbitol compromete el crecimiento hifal, observándose hifas más cortas y menos desarrolladas (Figura 15). En conjunto, estos resultados sugieren que esta concentración supera el umbral de tolerancia de *A. sydowii*, resultando en una inhibición generalizada del crecimiento hifal con evidentes diferencias microscópicas bajo estrés osmótico (Figura 16).

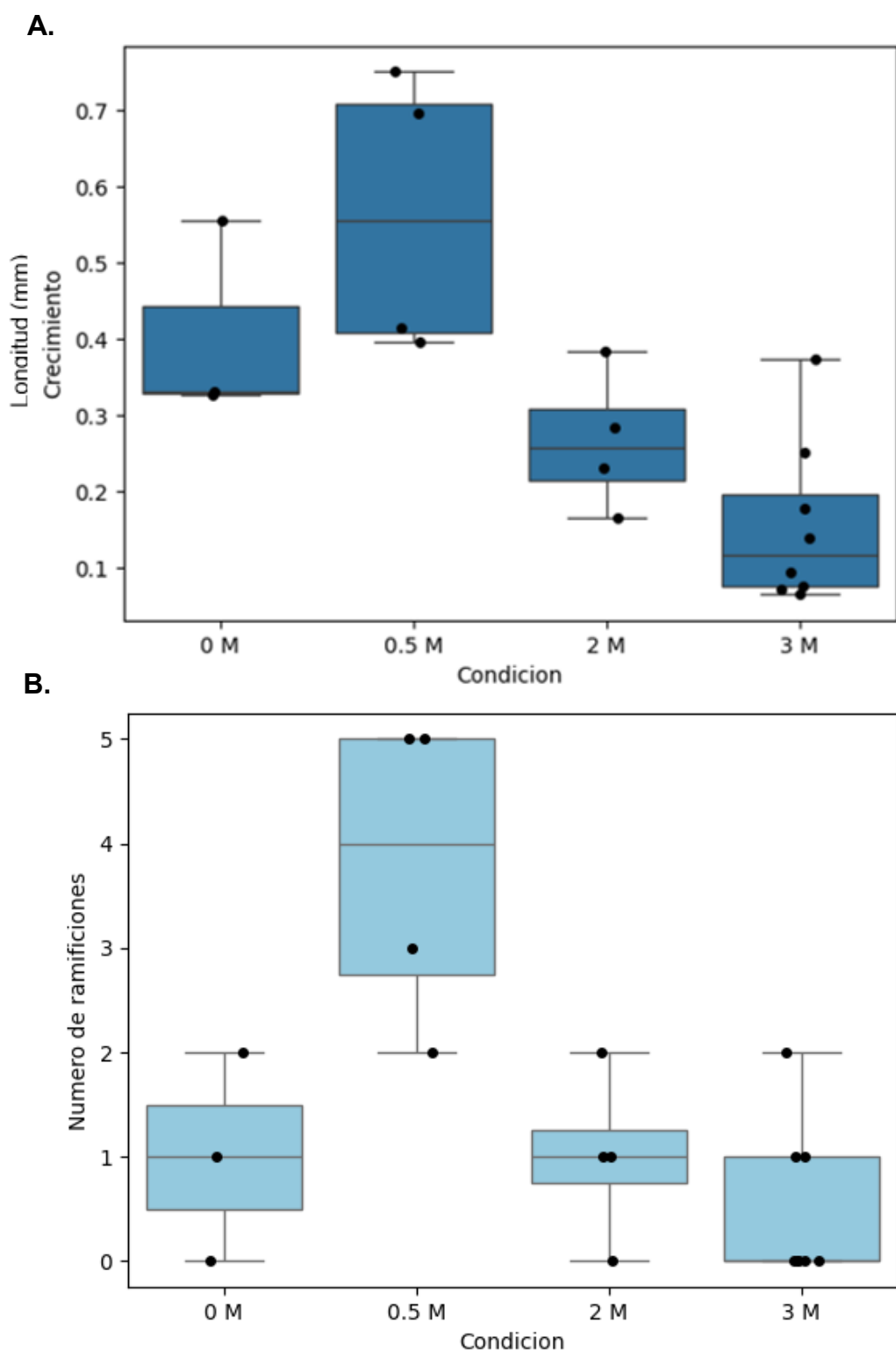


Figura 15. El estrés osmótico afecta las características micro-morfológicas de *A. sydowii*. A) Longitud de las hifas del hongo después de dos días de incubación en mm. B) Número de ramificaciones. El incremento de la concentración osmótica se asoció con una reducción progresiva del crecimiento, siendo más marcada a 3 M.

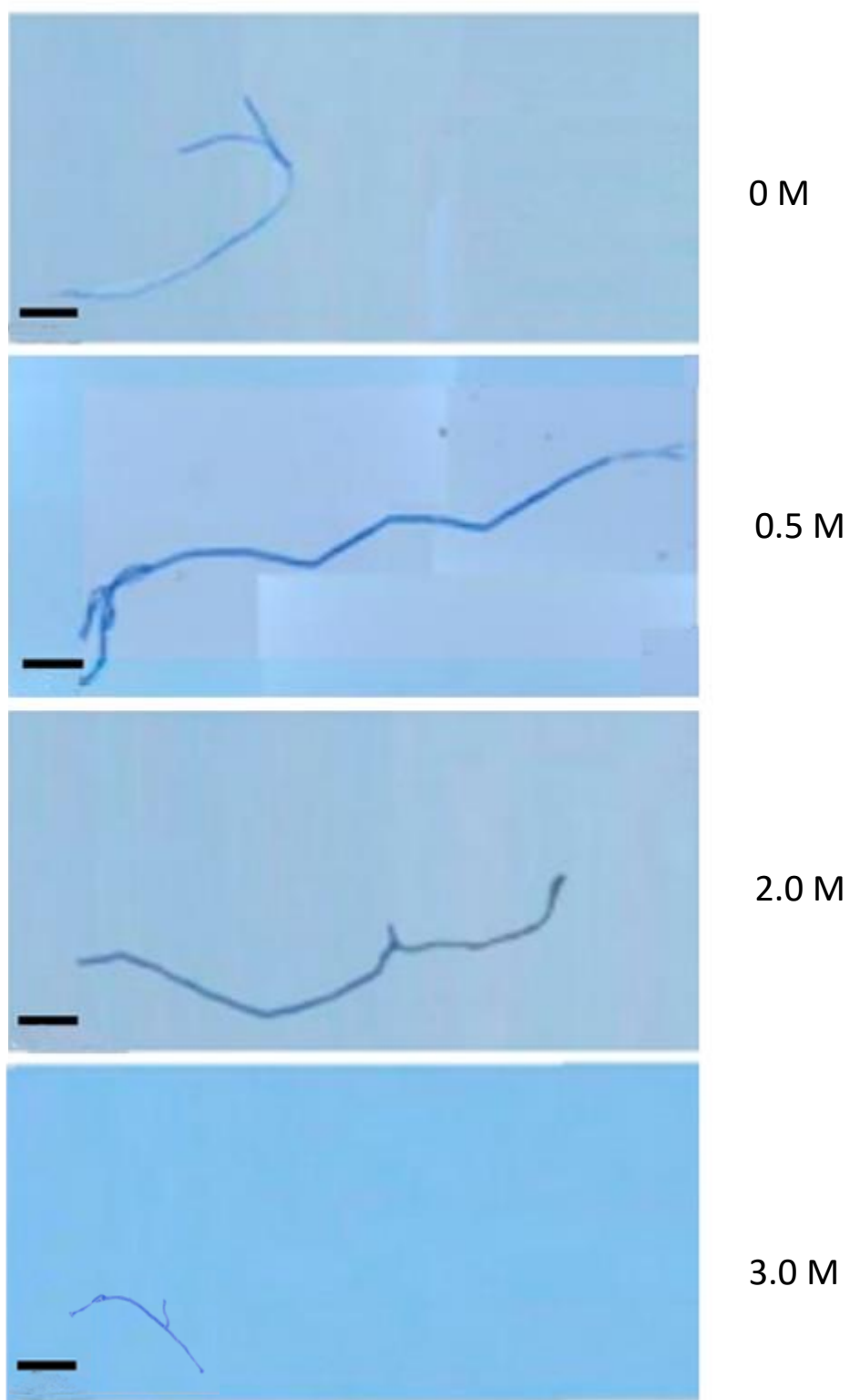


Figura 16. Diferencias microscópicas de *A. sydowii* con 2 días de incubación en diferentes concentraciones de sorbitol, a partir de microcultivos de esporas. Barras = 0.05 mm

8.1.4.- *A. sydowii* wt es sensible a estrés de pared celular inducido por Rojo Congo y Calcofluor White

Dado que las hidrofobinas son proteínas que recubren la pared celular y que el estrés inducido a esta estructura es una limitante en el crecimiento del hongo, se decidió evaluar la tolerancia de *A. sydowii* silvestre al Rojo Congo (RC) y al Calcofluor White, dos colorantes que tiñen pared celular pero que causan estrés. En estudios previos en especies del género *Aspergillus*, como *A. nidulans*, se ha reportado que concentraciones de 0.1 mg/mL de Calcofluor White son suficientes para afectar el crecimiento. Asimismo, en *A. nidulans* y *A. niger*, el Rojo Congo ha sido evaluado en un rango de 0 a 0.6 mg/mL, observándose efectos inhibitorios a partir de 0.1 mg/mL tras 10 días de incubación (Pancaldi *et al.*, 1984; Spence *et al.*, 2022; Csillag *et al.*, 2023).

Con base en estos antecedentes, se realizó una curva de sensibilidad incrementando gradualmente la concentración de ambos compuestos para determinar el rango de tolerancia de *A. sydowii* wt. Las concentraciones inicialmente evaluadas fueron de 0.05, 0.1, y 0.2 mg/ml (datos no mostrados) pero no hubo diferencias respecto al crecimiento en la condición sin el estresante. Posteriormente se evaluaron las concentraciones de 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg/mL, observándose una disminución progresiva en el crecimiento conforme aumentó la concentración de los agentes estresantes, siendo más evidente en la condición de 3.2 mg/mL, particularmente en la dilución que contiene 10 conidios, donde se observa que el crecimiento se inhibe desde las 48 h y se mantiene así hasta las 96 h, sin que las colonias lleguen a tocarse (Figura 17).

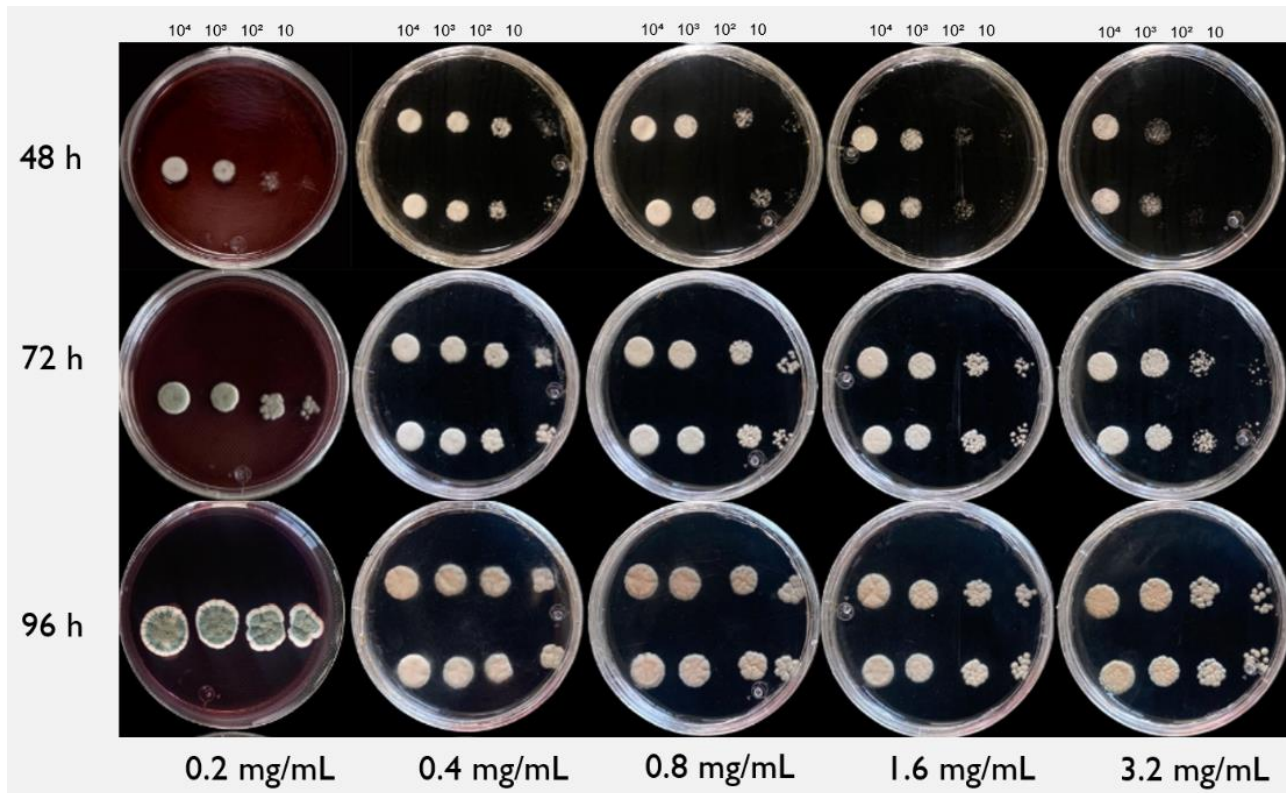


Figura 17. Rango de crecimiento de *A. sydowii* en RC. tolera concentraciones elevadas de Rojo Congo.

Después de haber estandarizado el rango de crecimiento de *A. sydowii* en Rojo Congo, se evaluaron de manera conjunta los efectos de Rojo Congo (0, 0.25, 2.5 y 5 mg/mL) y Calcofluor White (0, 0.25 y 0.5 mg/mL). El ensayo consistió en sembrar por goteo 10000, 1000, 100 y 10 esporas en cajas con diferentes concentraciones de ambos agentes. En este ensayo se observó de forma consistente en ambos compuestos una disminución progresiva del crecimiento conforme aumentó la concentración de los agentes estresantes, siendo más notable en la condición de 5.0 y 0.50 mg/ml en RC y CFW, respectivamente. Este efecto fue particularmente claro en la dilución con 10 conidios, donde el crecimiento se inhibió desde las 48 h y se mantuvo hasta las 96 h, sin que las colonias se fusionaran en ambas condiciones. En contraste, en el control, estas 10 colonias crecieron hasta formar una sola colonia (Figura 18). Adicionalmente, la Figura 18 muestra la cinética de crecimiento de *A. sydowii* en presencia de Rojo Congo,

mostrando que este hongo presenta tolerancia a este compuesto. En ausencia de Rojo Congo (0 mg/ml), las colonias de *A. sydowii* mostraron una expansión radial progresiva, con crecimiento homogéneo. En contraste, la presencia del compuesto redujo el crecimiento radial de manera dependiente de la concentración. En 0.5 mg/mL se observó una disminución evidente en el diámetro de las colonias respecto al control. Mientras que a 2.5 y 5 mg/mL el crecimiento fue severamente limitado, con escasa expansión hasta el día 11, seguido de un ligero desarrollo en los días 13 y 15. Es interesante mencionar que *A. sydowii* tolera concentraciones altas de hasta 5.0 y 0.50 mg/mL de RC y Calcofluor White, respectivamente. En comparación a otros estudios de otros hongos del género *Aspergillus* como *A. nidulans* que tolera 0.15 mg/mL y 0.1 mg/mL de RC y Calcofluor, respectivamente (Pancaldi *et al.*, 1984; Spence *et al.* 2022).

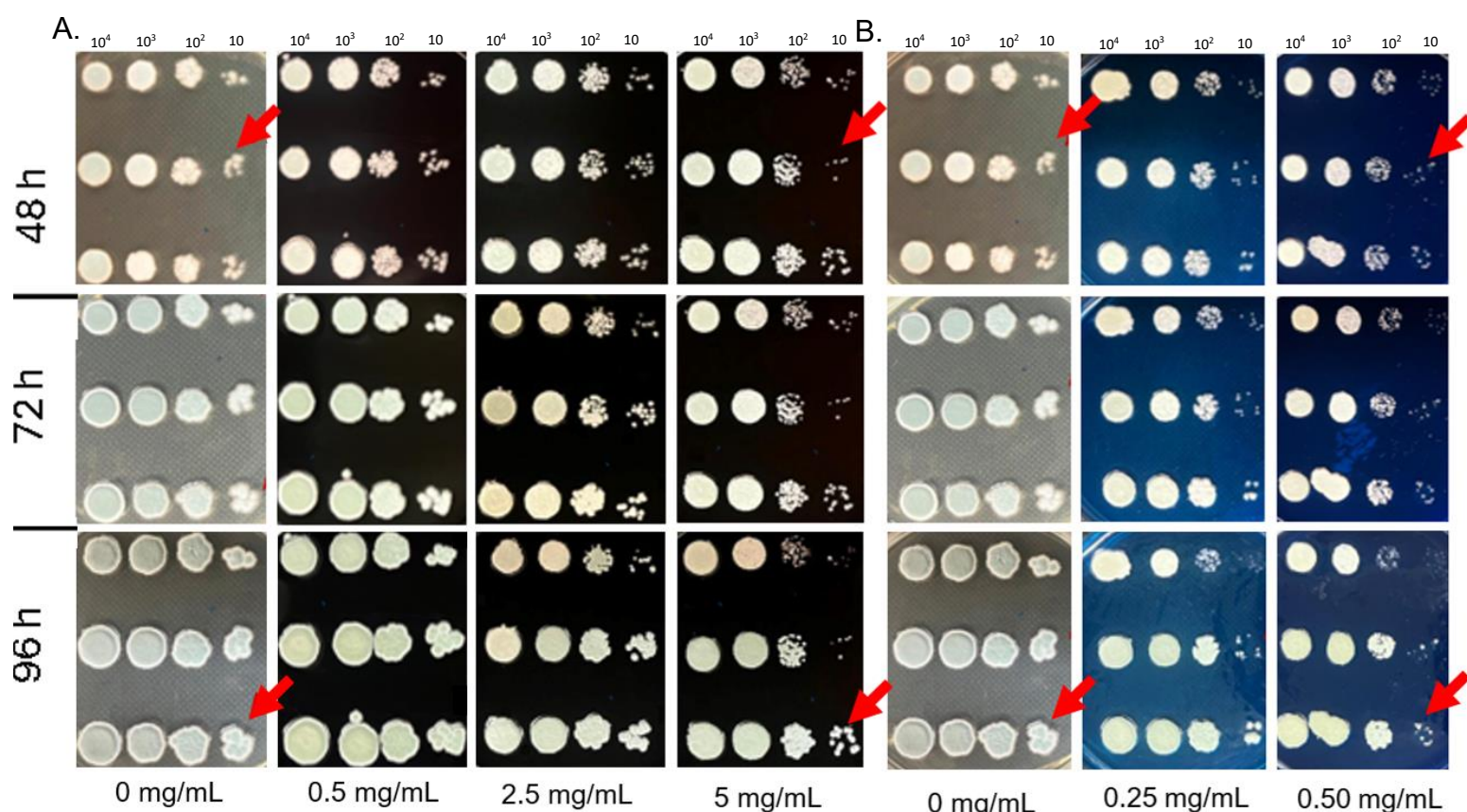


Figura 18. *A. sydowii* tolera concentraciones elevadas de A) Rojo Congo y B) Calcofluor White.

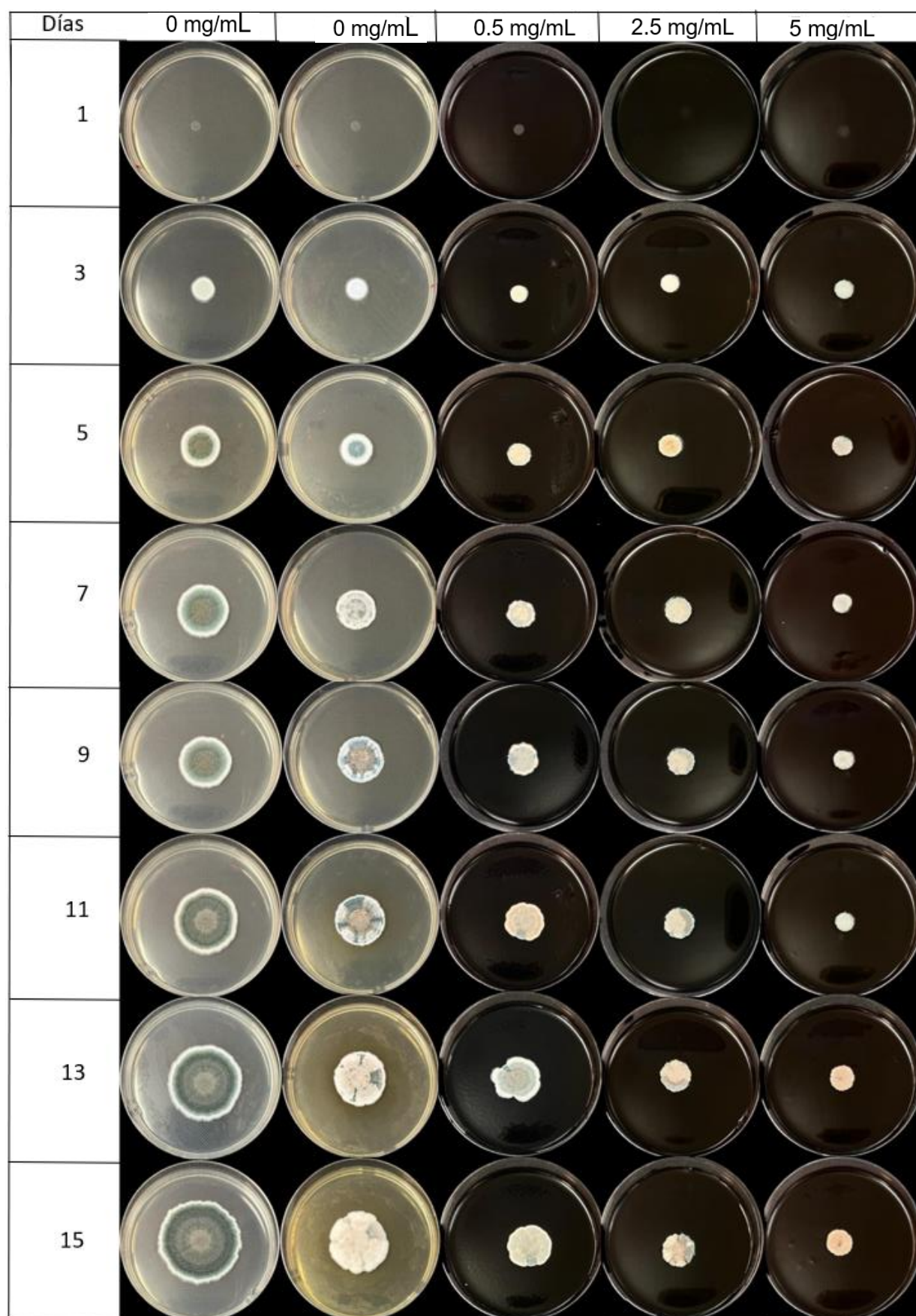


Figura 19. Cinética de crecimiento de *A. sydowii* en medio PDA suplementado con concentraciones crecientes de rojo Congo (0, 0.5, 2.5 y 5 mg/mL) durante 15 días. El diámetro de las colonias se midió cada tercer día. Las dos primeras columnas (0 mg/mL) corresponden a los controles: en condiciones de oscuridad (derecha, colonias blancas) y luz (izquierda, colonias verdes). Las demás condiciones fueron incubadas en oscuridad. Se observa que *A. sydowii* es tolerante a altas concentraciones de rojo Congo a lo largo del tiempo. Tras 17 días de incubación (incluyendo 2 días adicionales en luz), las colonias inicialmente mantenidas en oscuridad desarrollaron pigmentación verde.

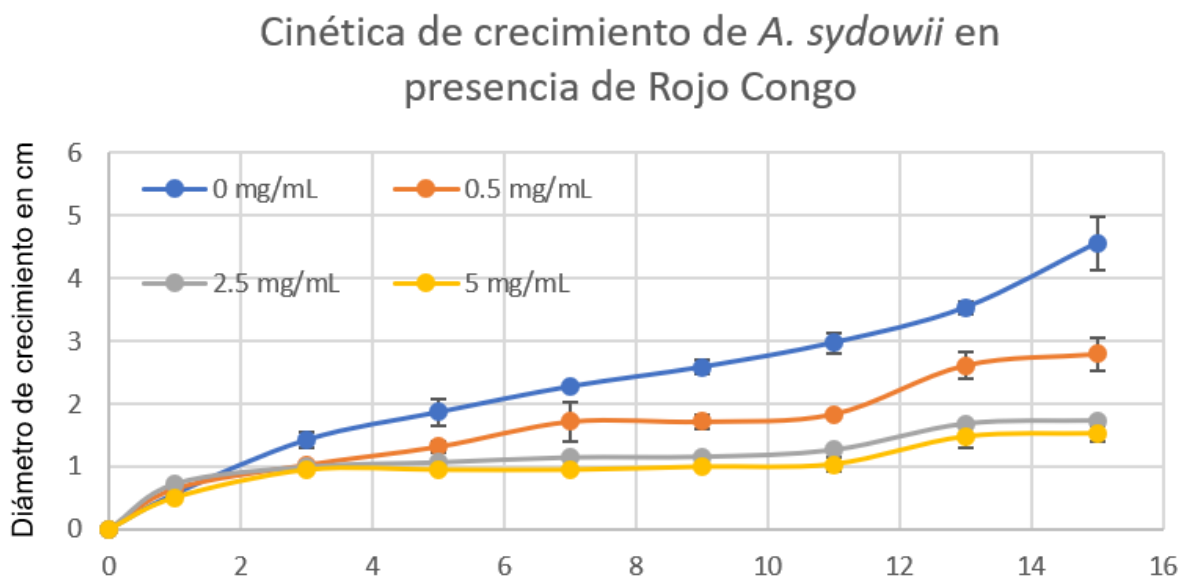


Figura 20. Evaluación de la tolerancia de *A. sydowii* en medio PDA suplementado con Rojo Congo mediante siembra de 1×10^4 conidias.

Tabla 7. Tasa de crecimiento radial por día de *A. sydowi* en Rojo Congo.

Condición	Cm/día
0 mg/mL	0.467 ± 0.019
0.5 mg/mL	0.157 ± 0.020
2.5 mg/mL	0.105 ± 0.019
5 mg/mL	0.053 ± 0.068

8.1.5.- Diferencias microscópicas de *A. sydowii* wt son inducidas bajo estrés de pared celular por Rojo Congo

Con el fin de estandarizar las condiciones de microcultivo en la cepa silvestre (wt) de *A. sydowii*, se realizaron los ensayos de tolerancia a estrés de pared celular mediante microcultivo en medio PDA con Rojo Congo.

Las hifas expuestas a Rojo Congo mostraron diferencias microscópicas evidentes conforme aumentó la concentración del compuesto (Figura 21). Las hifas crecidas en RC mostraron una disminución progresiva en la longitud de crecimiento conforme aumentó la concentración del compuesto. En la condición control (0 mg/mL), se observó un crecimiento continuo, con hifas alargadas y morfología característica de la cepa. A 0.5 mg/mL, el crecimiento se mantuvo similar al control, sin diferencias evidentes en la elongación hifal. En la concentración de 2.5 mg/mL, el efecto fue más evidente, con una disminución notable en la longitud de las hifas. Finalmente, a 5 mg/mL, se observó el mayor grado de inhibición del crecimiento, correspondiente a la condición de mayor estrés evaluada, donde las hifas presentaron una marcada reducción en su elongación (Figura 22). Adicionalmente, se detectaron alteraciones morfológicas dependientes de la concentración, incluyendo un aumento en el diámetro de las hifas (Figura 22) y la formación de protuberancias en el ápice (datos no mostrados) lo que sugiere modificaciones en la organización de la pared celular. También hubo la aparición de estructuras conidiales abortivas. La remodelación de la pared celular se asocia con el inicio del desarrollo asexual; sin embargo, bajo condiciones de estrés estructural, este proceso puede desviarse hacia una conidiación abortiva (Figura 23).

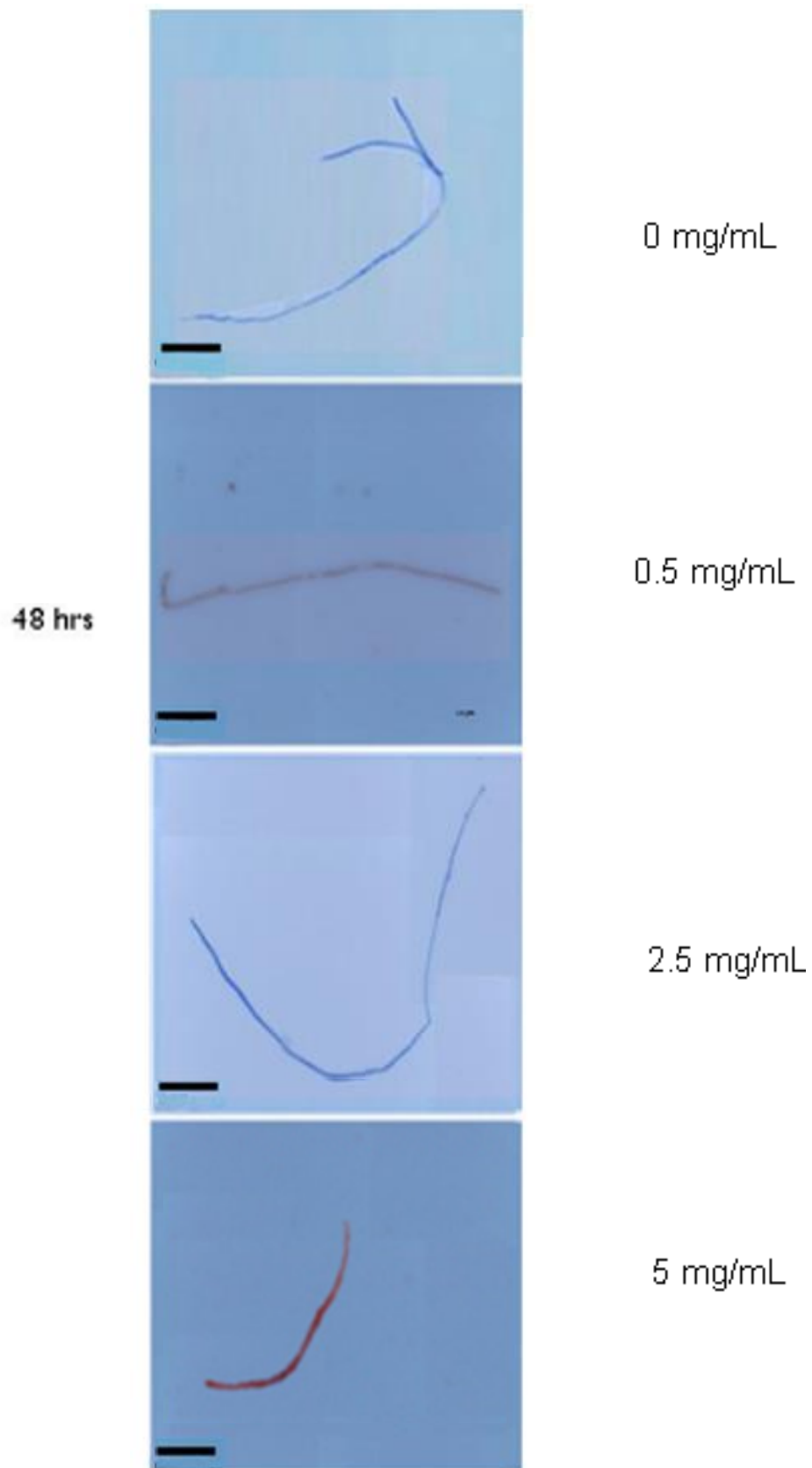


Figura 21. Diferencias microscópicas de *A. sydowii* con 2 días de incubación en diferentes concentraciones de Rojo Congo (0, 0.5, 2.5 y 5 mg/mL), a partir de microcultivos de esporas. Barras = 0.05 mm.

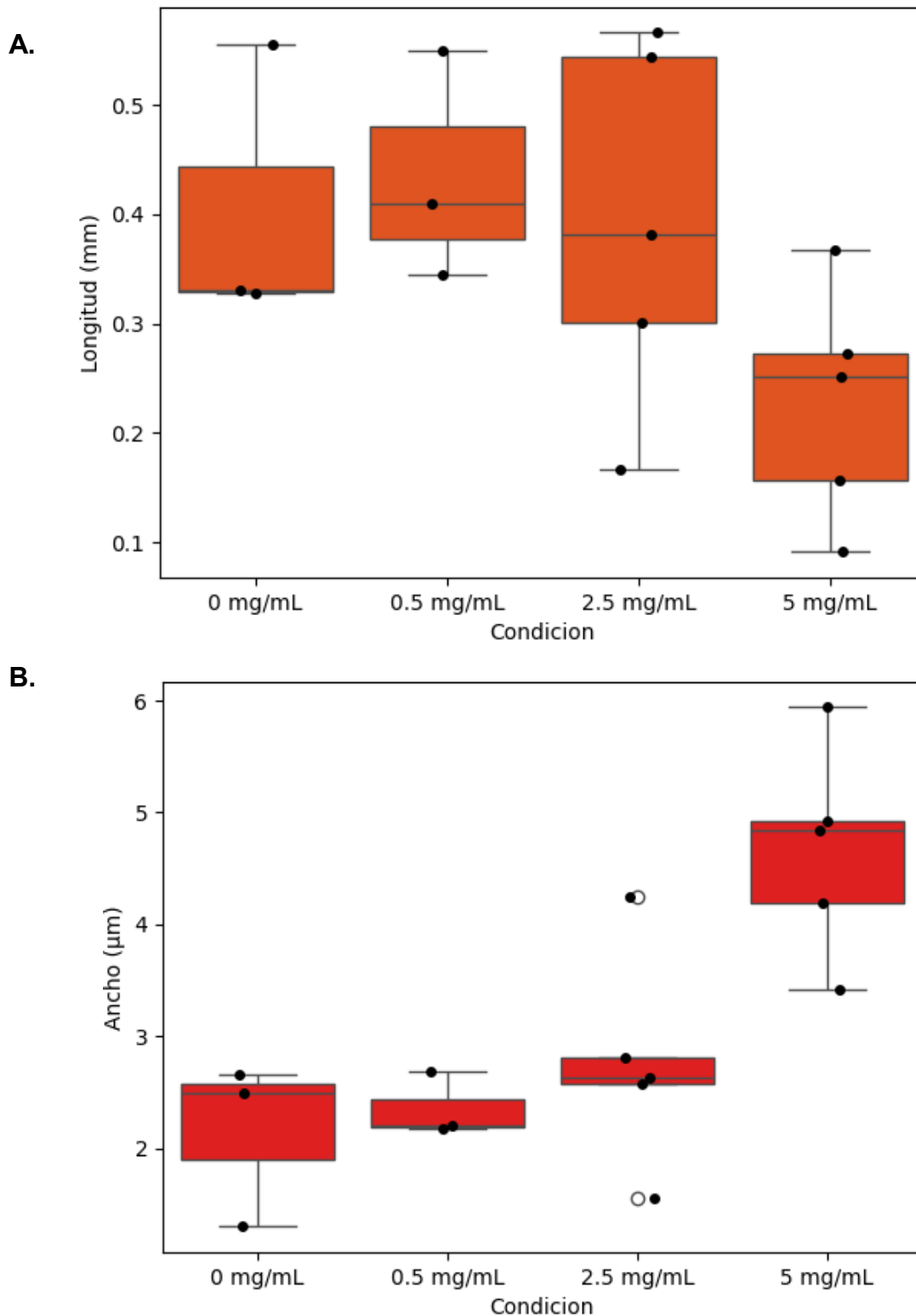


Figura 22. El estrés de pared celular inducido por Rojo Congo afecta las características micro-morfológicas de *A. sydowii*. A) Longitud de las hifas del hongo después de dos días de incubación (mm). B) Análisis del diámetro de las hifas (μm) de *A. sydowii* bajo diferentes concentraciones de RC. Se analizaron tres réplicas de hifas por tratamiento. Se observa una tendencia a la disminución de crecimiento, acompañada de un incremento del ancho hifal a 5 mg/mL de RC.

En la Figura 23 se observan hifas de *A. sydowii* wt cultivados en RC (5 mg/mL). La remodelación de la pared celular se asocia con el inicio del desarrollo asexual, pero bajo condiciones de estrés estructural el proceso se desvía hacia una conidiación abortiva.

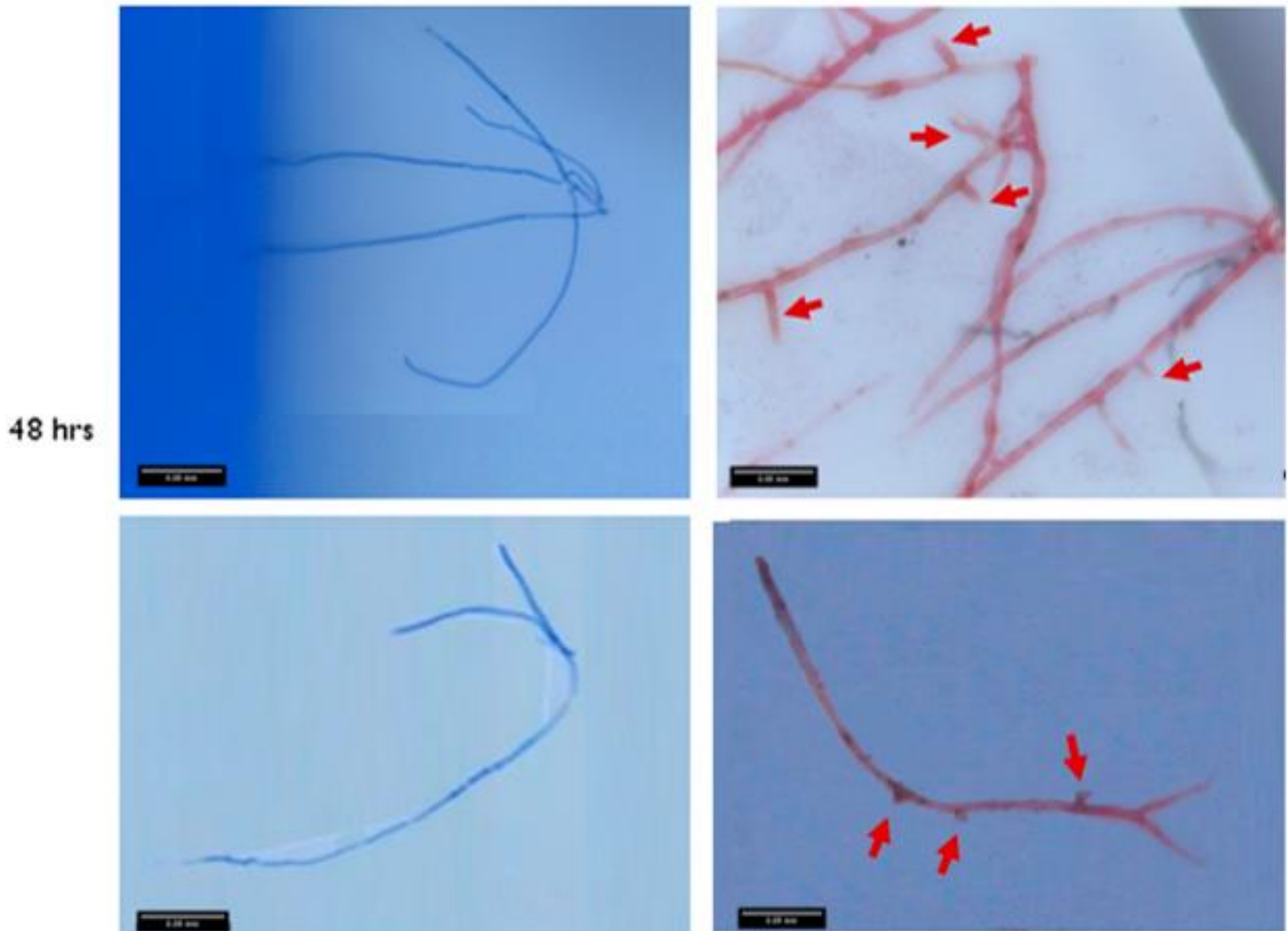


Figura 23. Desarrollo asexual abortivo de *A. sydowii* wt bajo estrés de pared celular inducido por RC. En el panel A). se observan los conidióforos abortivos siendo señalado con las flechas rojas. Panel B) como control mostrando ausencia de conidióforos abortivos. Barras = 0.05 mm.

8.2.-Tamizaje de colonias transformantes positivas de *A. sydowii*

El primer paso para obtener a las colonias mutantes de la *sih2* fue la transformación de *A. sydowii* con 1 µg del “cassette” recombinante 5’arm *sih2*–*hyg*–3’arm *sih2* mediante el método de transformación de germínulas (Sánchez y Aguirre, 1996). En este método, el hongo se encuentra en estado mononuclear, lo que favorece la obtención de transformantes genéticamente homogéneas. Para ello, los conidios se incubaron hasta alcanzar el estado de germínula y se incubaron con medio YED tamponado (1% extracto de levadura, 1% glucosa, 20 mM HEPES ajustado con Tris a pH 8.0; opcionalmente suplementado con 12.5 mM DTT) en condiciones frías. A estas se añadió 1 µg de ADN del “cassette” recombinante y se electroporó con un pulso eléctrico de 1,000 V, a 25 µF y 400 Ω. Tras la electroporación, las células se recuperaron en medio YED tamponado, el cual proporciona condiciones suaves que favorecen la reparación del daño causado por el pulso eléctrico. Posteriormente, las células recuperadas fueron inoculadas en medio PDA suplementado con higromicina (100 µg/mL) y se incubaron por 6 días a 28 °C. En la Figura 24 se muestran las posibles colonias transformantes de *A. sydowii* con el “cassette” de recombinación, de las cuales se obtuvieron dos colonias, las cuales fueron nombradas como *AsΔsih2_C1* y *AsΔsih2_C2*. También se muestran las germínulas de *A. sydowii* wt electroporadas sin el “cassette” recombinante, donde no se observa crecimiento, confirmando que la resistencia al antibiótico depende de la integración del ADN exógeno en el genoma.



Figura 24. Obtención de cepas *AsΔSiH2_C1* y *AsΔSiH2_C2* de *A. sydowii*. Dos colonias transformantes de *A. sydowii* obtenidas tras la transformación con el “cassette” recombinante 5’arm *sih2*–*hyg*–3’arm *sih2* y seleccionadas en PDA + 100 µg/mL de higromicina. Se muestran dos cepas mutantes (*AsΔSiH2_C1* y *AsΔSiH2_C2*) y la cepa silvestre como control negativo (Ct -).

8.3.- Tamizado de las colonias mutantes putativas con el “cassette” recombinante de la *sih2* por PCR de colonia

Para confirmar que las colonias obtenidas de la transformación contienen el “cassette” recombinante para la mutación de la hidrofobina *sih2*, se amplificó un fragmento de 842 pb comprendido entre la región 5' *sih2* y la secuencia *hph* (ver figura 25 A). Además, como un control de integridad del ADN se amplificó la región ITS (interspaced ribosomal región) tanto de la cepa silvestre y transformantes *AsΔSiH2_C1*, *AsΔSiH2_C2* (Figura 25 B).

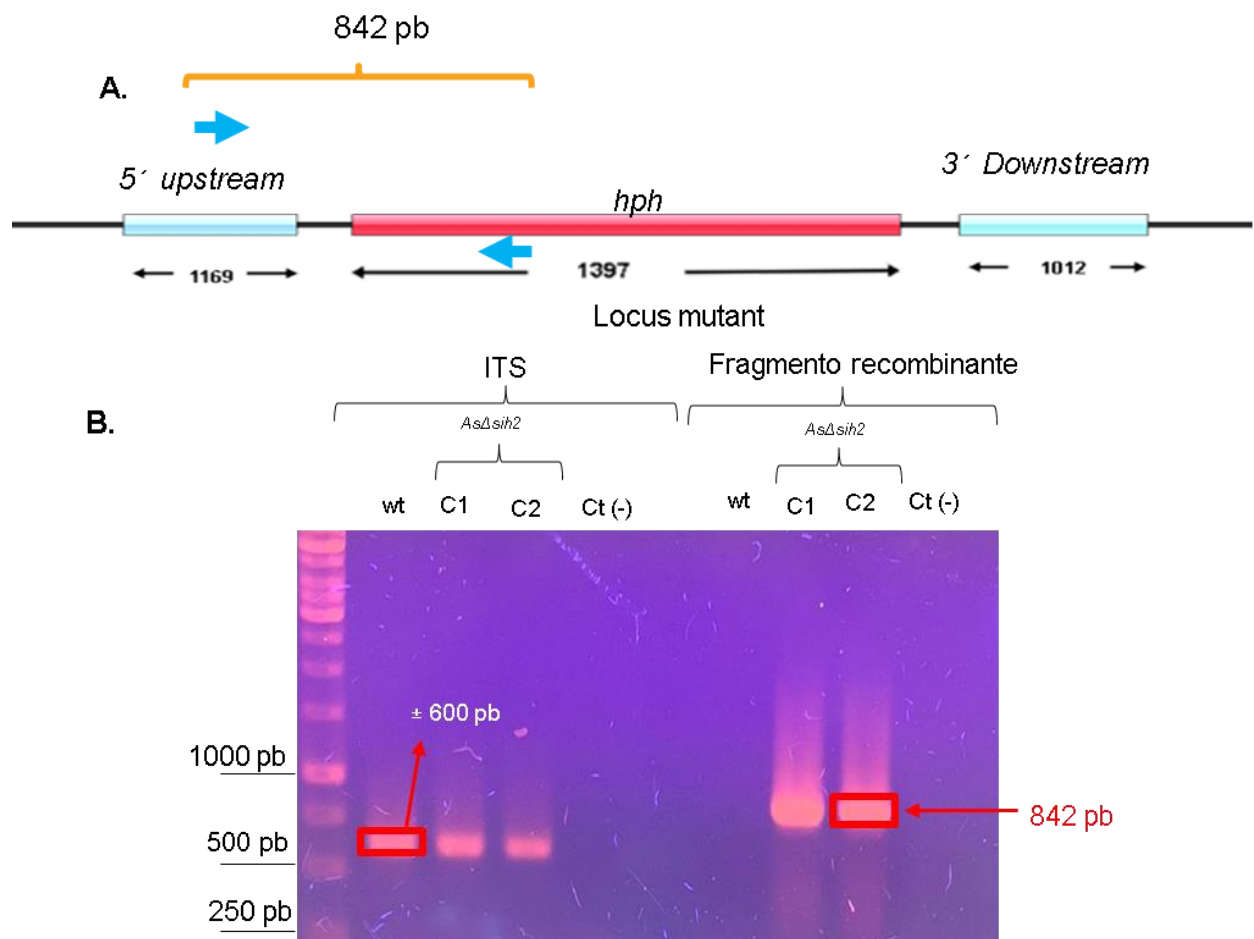


Figura 25. Tamizaje de colonias transformantes mediante PCR de colonia amplificando el fragmento 5' *arm* *sih2* + *hph* del “cassette” recombinante de *sih2*. **A.** Representación esquemática de la amplificación del fragmento del “cassette” recombinante del gen de hidrofobina *sih2* (842 pb) utilizando los oligonucleótidos 5' *sih2*shortFw y HygRv (flechas azules). Asimismo, se muestra la amplificación del fragmento del “cassette” recombinante del gen *sih2* (842 pb) en las cepas wt y en las transformantes *AsΔsih2_C1-ht* y *AsΔsih2_C2-ht*. **B.** Amplificación del fragmento ITS (Internal Transcribed Spacer), presente en el locus silvestre tanto en la cepa wt como en las transformantes (≈600 pb), utilizado como control de la integridad del ADNg.

8.4.- Purificación monospórica de *AsΔsih2_C1* y *AsΔsih2_C2*

Para homogenizar el fondo genético de la cepa y asegurarnos que no tenemos una población heterogénea de hifas silvestres y mutantes, a partir de las colonias *AsΔsih2_C1* y *AsΔsih2_C2*, se realizaron dos pases monospóricos sucesivos y se tamizaron 5 colonias de cada cepa independiente. Se realizaron PCRs de colonia del fragmento *sih2* recombinante y de la región ITS. En las figuras 26 y 27 se muestran los resultados del tamizaje correspondientes al primer y segundo paso monospórico.

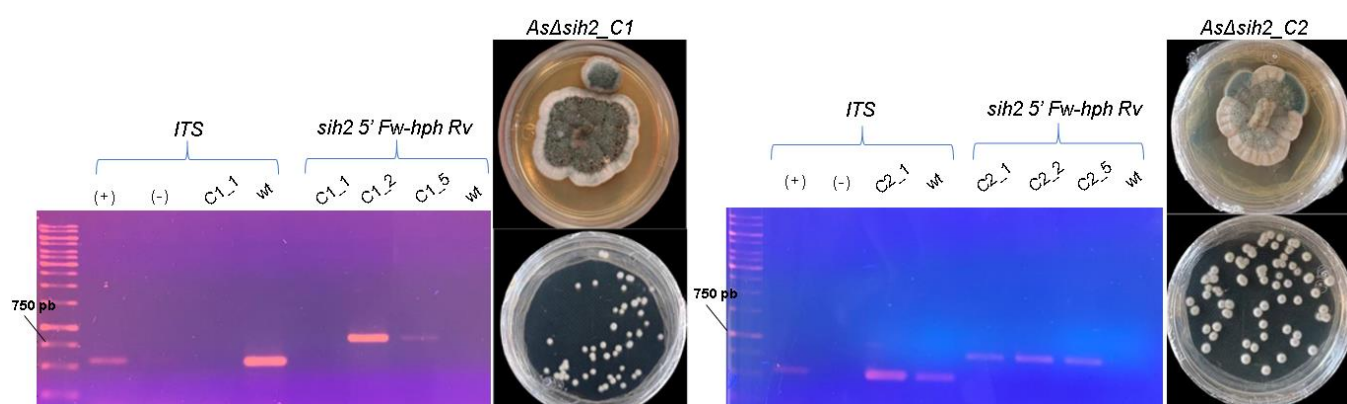


Figura 26. Tamizado de las colonias mutantes putativas *AsΔsih2_C1* y *AsΔsih2_C2* del pase monospórico 1. Amplificación del fragmento del “cassette” recombinante del gen de hidrofobina *sih2* (842pb) con los oligonucleótidos 5' *sih2shortFw* y *HygRv*. Amplificación del fragmento ITS (“Internal Transcribed Spacer” en inglés) (presente en el locus silvestre en las cepas wt y mutantes putativas) (± 600 pb), un control de amplificación de la integridad de ADNg de *A. sydowii*.

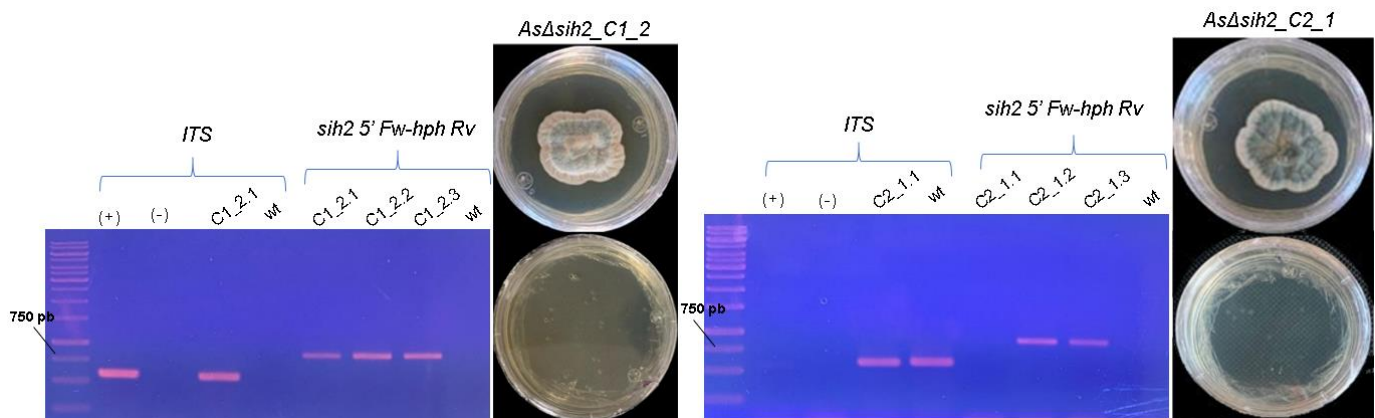


Figura 27. Tamizado de las colonias mutantes putativas *AsΔsih2_C1_2* y *AsΔsih2_C2_1* del pase monospórico 2. Amplificación del fragmento del “cassette” recombinante del gen de hidrofobina *sih2* (842pb). Amplificación del fragmento ITS (“Internal Transcribed Spacer” en inglés) (presente en el locus silvestre en las cepas wt y mutantes mutantes putativas) ($\pm$ 600 pb), un control de amplificación de la integridad de ADNg en la cepa silvestre.

Se llevó a cabo el segundo pase monospórico de las cepas *AsΔsih2_C1_5* y *AsΔsih2_C2_5* (Figura 28).

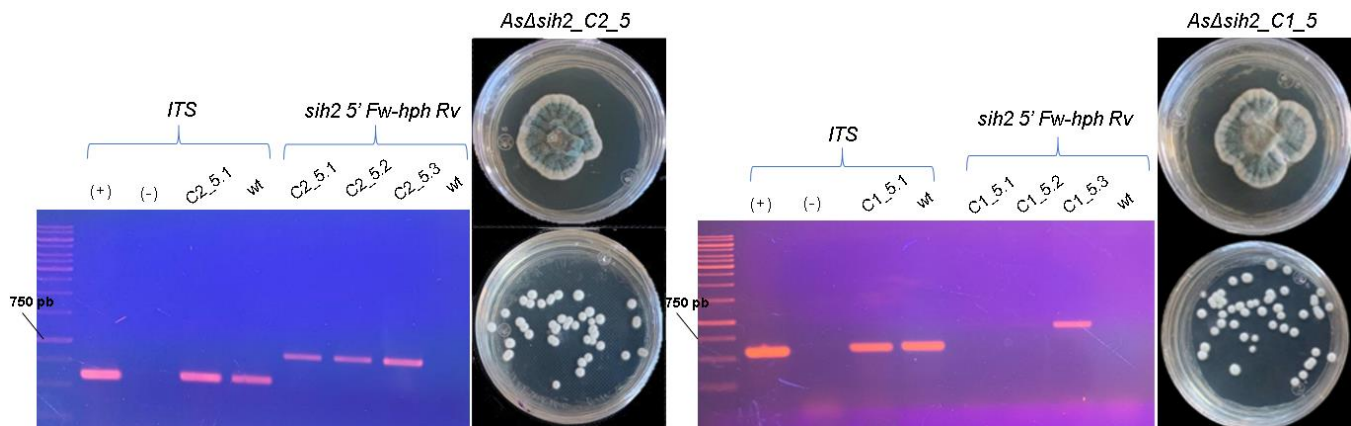


Figura 28. Tamizado de las colonias mutantes putativas *AsΔsih2_C1_5* y *AsΔsih2_C2_5* del pase monospórico 2. Amplificación del fragmento del “cassette” recombinante del gen de hidrofobina *sih2* (842pb). Amplificación del fragmento ITS (“Internal Transcribed Spacer” en inglés) (presente en el locus silvestre en las cepas wt y mutantes putativas) ($\pm$ 600 pb), un control de amplificación de la integridad de ADNg.

Una vez que seleccionamos y corroboramos las cepas obtenidas del segundo pase monospórico, se utilizaron las cepas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* para llevar a cabo los experimentos orientados a caracterizar los efectos fenotípicos asociados a la construcción dirigida al gen *sih2*. En la Tabla 8 se muestra la lista de colonias positivas con el amplicón de la construcción 5'arm–hyg RV.

Tabla 8.- Resultados de las amplificaciones del fragmento quimérico para identificar a las colonias mutantes. Lista de las colonias mutantes positivas con el amplicón de la construcción 5'arm - hyg RV.

	P-M1	P-M2
		<i>AsΔsih2_C1_2.1 (+)</i>
		<i>AsΔsih2_C1_2.2 (+)</i>
		<i>AsΔsih2_C1_2.3 (+)</i>
		<i>AsΔsih2_C1_5.1 (-)</i>
	<i>AsΔsih2_C1_1 (-)</i>	<i>AsΔsih2_C1_5.2 (+)</i>
	<i>AsΔsih2_C1_2 (+) *</i>	<i>AsΔsih2_C1_5.3 (+) **</i>
<i>AsΔsih2_C1</i>	<i>AsΔsih2_C1_5 (+) *</i>	
	<i>AsΔsih2_C2_1 (+) *</i>	<i>AsΔsih2_C2_1.1 (-)</i>
	<i>AsΔsih2_C2_3 (+)</i>	<i>AsΔsih2_C2_1.2 (+)</i>
<i>AsΔsih2_C1</i>	<i>AsΔsih2_C2_5 (+) *</i>	<i>AsΔsih2_C2_1.3 (+)</i>
		<i>AsΔsih2_C2_5.1 (+)</i>
		<i>AsΔsih2_C2_5.2 (+)</i>
		<i>AsΔsih2_C2_5.3 (+) **</i>

8.5. Análisis de integración del “cassette” recombinante del gen *sih2*

Para verificar si las líneas obtenidas correspondían a mutantes del gen *sih2*, se realizó la amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos dirigidos a las regiones que flanquean los brazos 5' y 3', con el fin de detectar tanto el locus silvestre (wt) como el “cassette” recombinante. De esta manera, se evaluó si las cepas correspondían a mutantes knockout del gen *sih2* o a transformantes con integración aleatoria del “cassette” recombinante. En la Figura 29 se muestra la amplificación del “cassette” recombinante y del locus silvestre del gen *sih2* en las cepas analizadas. Los resultados evidenciaron la amplificación del locus silvestre y el “cassette” recombinante del gen *sih2*, lo que indica que las cepas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* corresponden a transformantes con integración no dirigida del “cassette” recombinante.

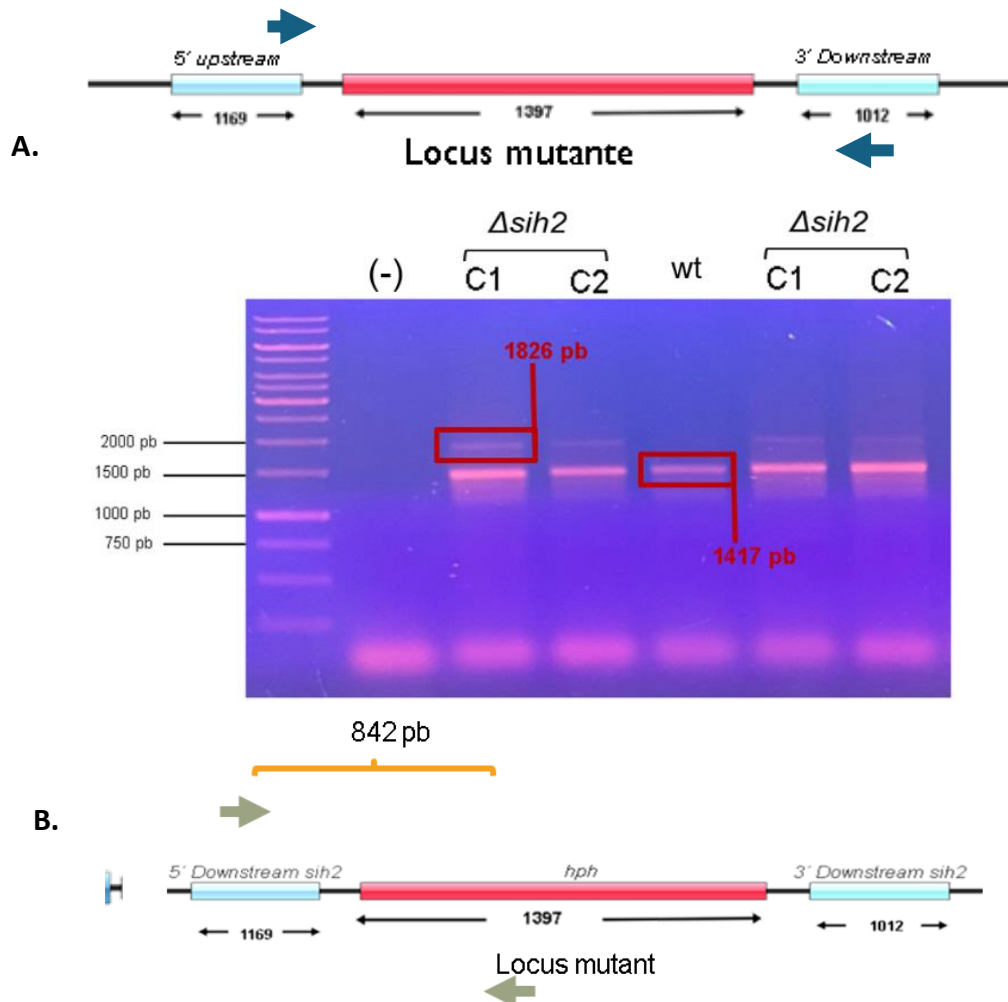


Figura 29. Identificación de mutantes putativas portadoras del “cassette” recombinante del gen *sih2*. En el panel (A) se muestra el mapa de oligonucleótidos utilizados para amplificar desde las regiones flanqueantes 5' y 3' del locus mutante y se muestra la amplificación del “cassette” recombinante correspondiente a las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *sih2*. Mediante PCR se detectaron las bandas correspondientes al “cassette” recombinante de *sih2* (1826 pb) y al locus silvestre (1417 pb). Las cepas mutantes putativas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* presentaron ambas bandas, lo que indica que el “cassette” recombinante no reemplazó al locus silvestre, sugiriendo una Integración aleatoria. La cepa *A. sydowii* wt se utilizó como control. En el panel (B) se muestra el mapa de oligonucleótidos diseñados para amplificar la región 5' + el gen de resistencia *hph*.

8.6.- Análisis morfológico comparativo de colonias de *A. sydowii* silvestre y mutantes putativas del gen *sih2* en medio sólido.

Se comparó el fenotipo de las cepas mutantes *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* utilizando como control la cepa silvestre, mediante un análisis morfológico por microscopía estereoscópica. De manera consistente, la cepa wt de *A. sydowii* mostró una superficie homogénea con pigmentación y esporulación abundantes, conidióforos bien desarrollados, una cara inferior con mayor pigmentación en el centro de la colonia y una textura claramente estratificada. En contraste, ambas líneas mutantes presentaron una superficie menos pigmentada con esporulación reducida, conidióforos poco evidentes y con morfología distorsionada, además de una cara inferior con pigmentación uniforme, alteraciones en la textura y menor desarrollo de micelio aéreo. En conjunto, estos cambios sugieren que la inserción del “cassette” recombinante afecta la organización macroscópica del micelio, la pigmentación conidial y la producción de estructuras aéreas (Figura 30). En *A. fumigatus*, la DHN-melanina es responsable del color gris-verdoso característico de los conidios, un pigmento común en especies del género *Aspergillus* (Heinekamp *et al.*, 2013).

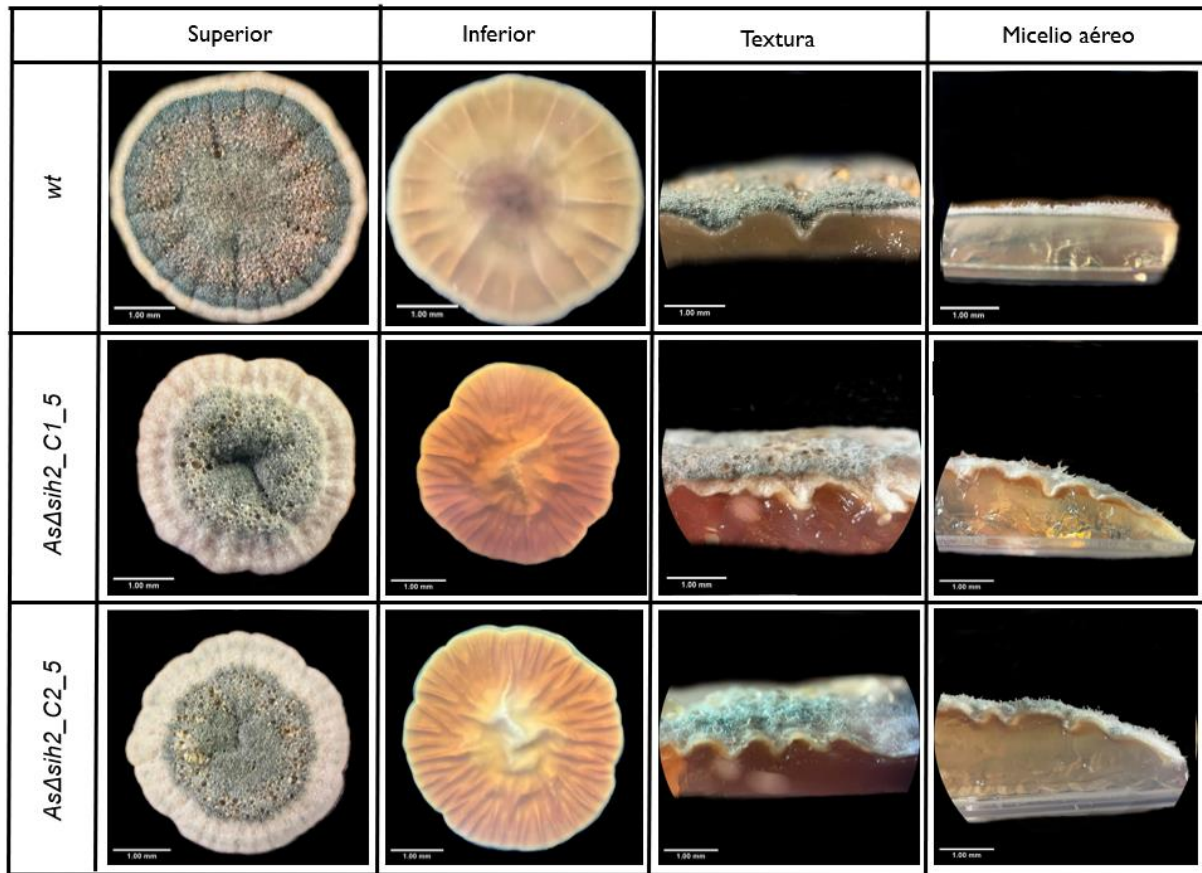


Figura 30. Caracterización macroscópica de las colonias de la cepa silvestre (wt) y de las líneas mutantes putativas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3*. Se evaluaron cuatro parámetros morfológicos: superficie de la colonia, cara inferior, textura y micelio aéreo, mediante microscopía estereoscópica. Barras de escala: 1 mm.

En la Figura 31 se muestra que la cepa wt presenta un borde de la colonia continuo y bien delimitado, con esporulación densa y definida, formación de exudados y un desarrollo típico de conidióforos. En contraste, ambas líneas $\Delta sih2$ presentaron un borde de la colonia difuso y menos pigmentado, mayor producción de exudados y una organización menos homogénea de los conidióforos, indicando alteraciones morfológicas asociadas a la integración del “cassette” recombinante del gen *sih2*.

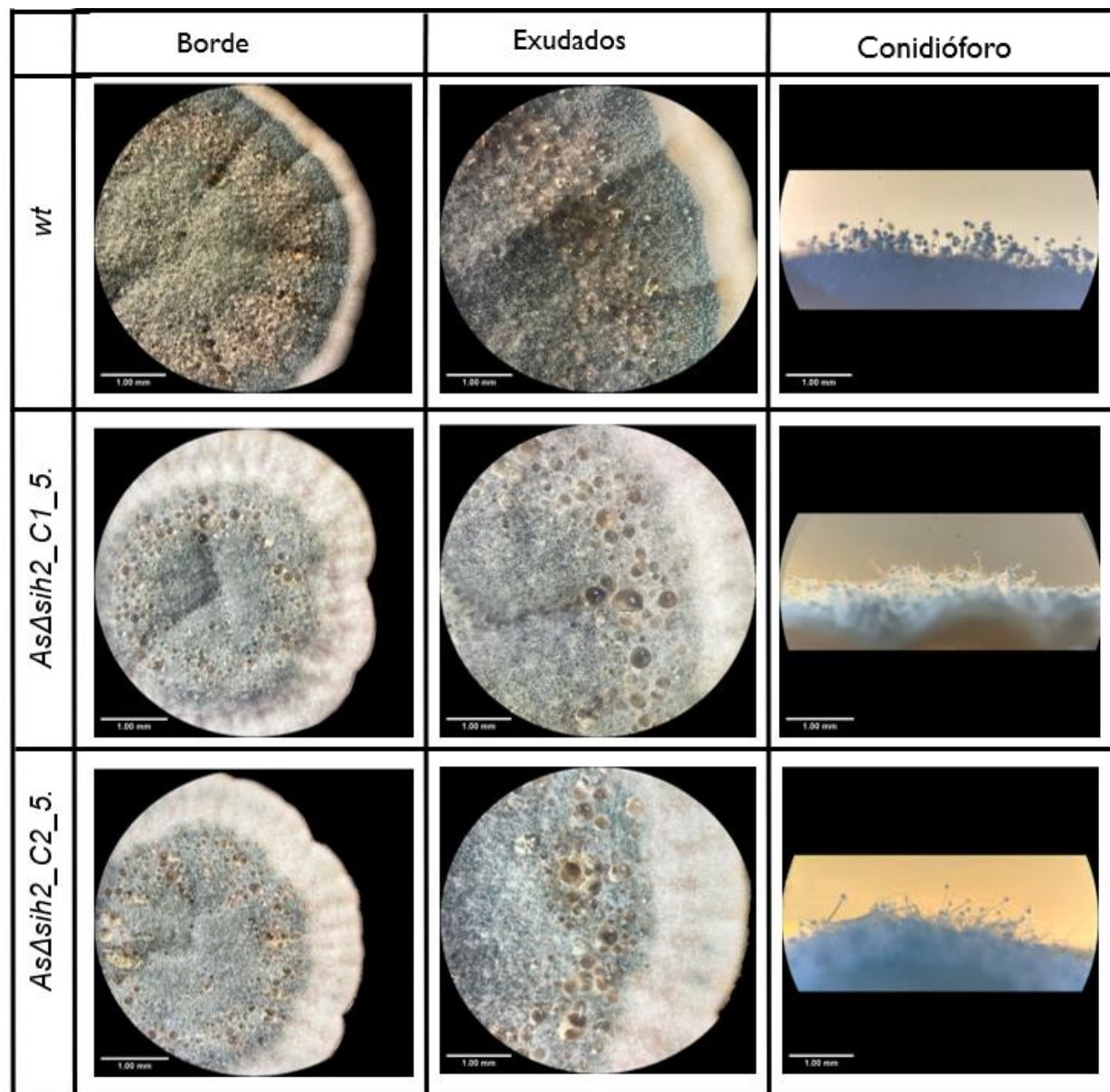


Figura 31. Análisis comparativo del desarrollo morfológico en *Aspergillus* wt y las líneas mutantes *As $\Delta sih2$ _C1_5.3* y *As $\Delta sih2$ _C2_5.3*. Se evaluaron tres regiones de la colonia: perímetro, exudados y conidióforos, mediante microscopía estereoscópica. Barras de escala: 1 mm

En el hongo *C. militaris*, se ha reportado que la mutación del gen de la hidrofobina *cmhyd1* afecta el desarrollo de las hifas aéreas (Li *et al.*, 2021). Con base en estos antecedentes, se evaluó si las colonias *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* obtenidas en este estudio presentaban un fenotipo similar. Por lo que se realizaron experimentos para analizar la formación de micelio aéreo utilizando cultivos de PDA en tubos de ensayo. Se observó una disminución en la producción de micelio aéreo en la mutante putativa *AsΔsih2_C2_5.3* en comparación con la cepa silvestre (wt), siendo esta diferencia estadísticamente significativa, mientras que la cepa *AsΔsih2_C1_5.3* no mostró diferencias significativas respecto a la wt (Figura 32).

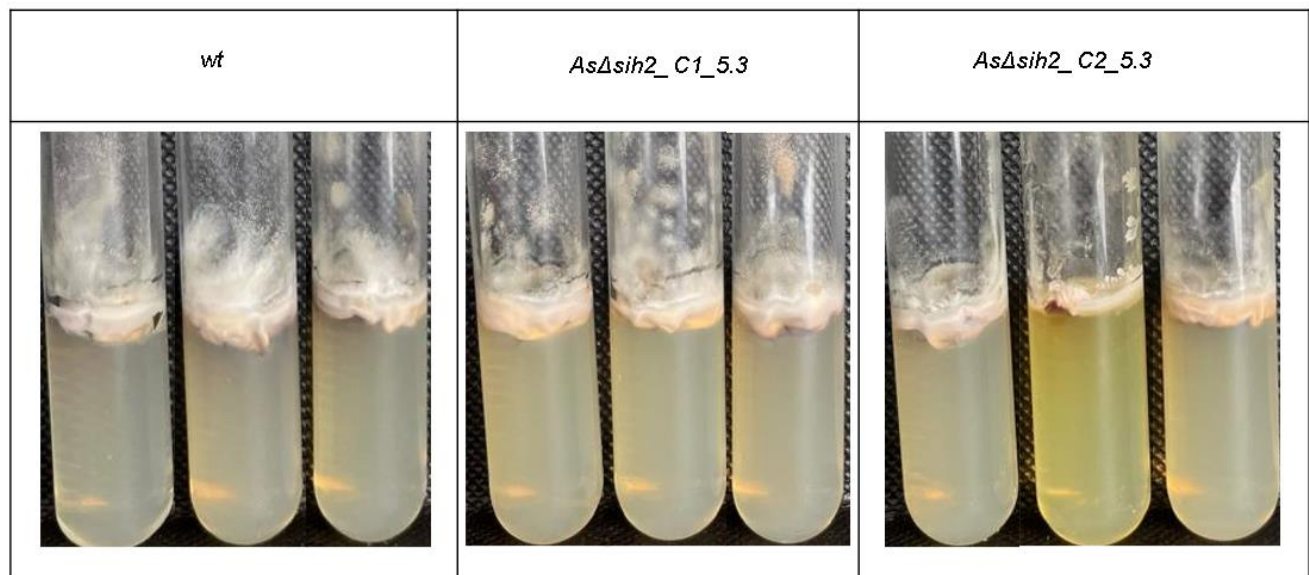
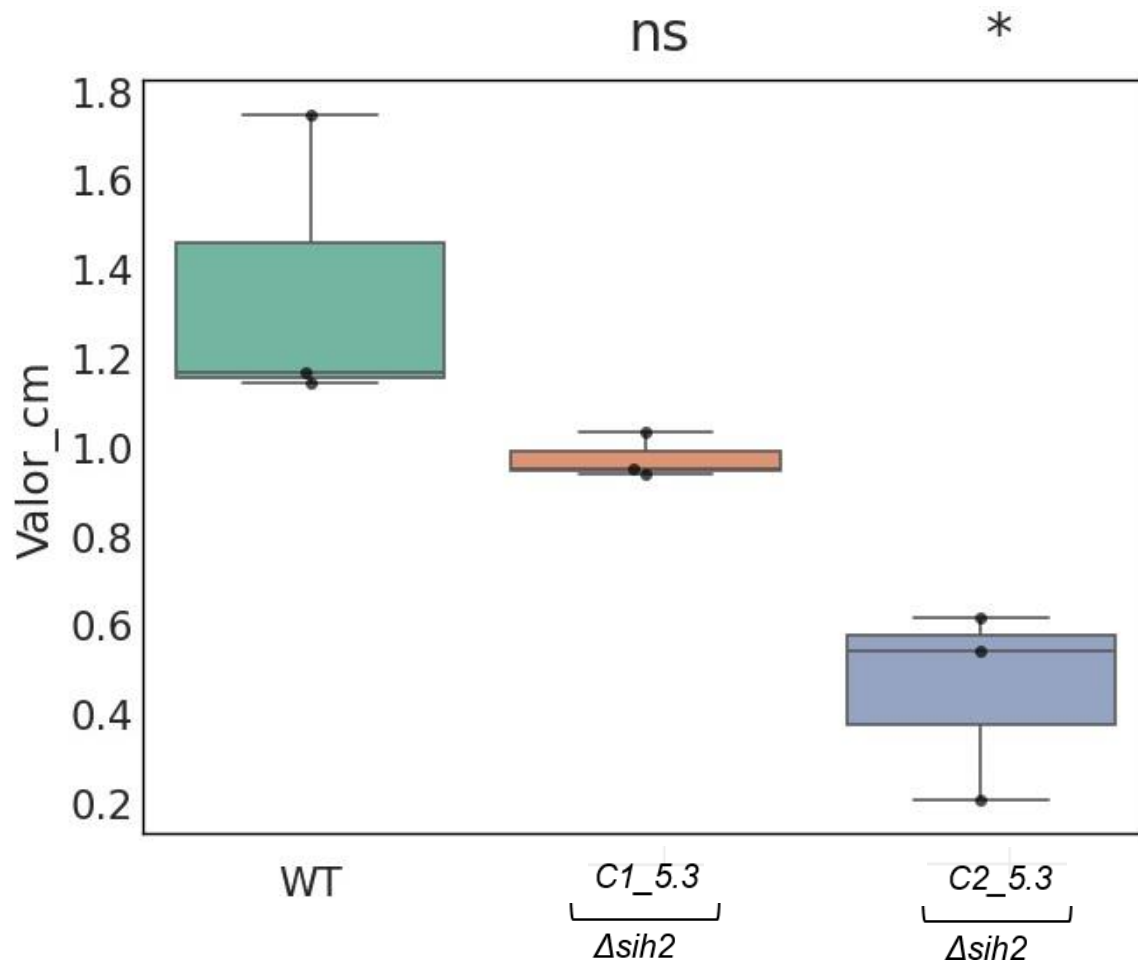


Figura 32. Análisis de la producción de micelio aéreo en la cepa silvestre (*wt*) y en las líneas mutantes *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3*. A) Cepas analizadas en el eje x. Los valores en el eje y representan la cantidad de micelio producido (cm). El análisis estadístico entre grupos se realizó mediante prueba ANOVA seguida de comparaciones múltiples (Tukey). Las anotaciones superiores indican la significancia estadística observada (ns = no significativo; * = $p < 0.05$).

8.7.- Evaluación de la tolerancia a estrés salino, osmótico y de pared celular en líneas mutantes putativas de la hidrofobina *sih2*

8.7.1.- Las colonias mutantes putativas no son sensibles a estrés hipersalino e hiperosmótico.

Se evaluó si la inserción no dirigida y la posible alteración en la regulación de las hidrofobinas afectan la tolerancia al estrés hipersalino. Para ello, se realizaron ensayos de crecimiento en medio PDA suplementado con NaCl (0, 0.5 y 2 M). En la figura 33 se observó que las mutantes putativas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* no presentan diferencias evidentes en la tasa de crecimiento con respecto a la cepa silvestre bajo las condiciones evaluadas. Aunque en condiciones hiperosmóticas (2 M de NaCl) la cepa silvestre parece mostrar una ligera reducción en el crecimiento, esta tendencia no es consistente, por lo que se requieren experimentos adicionales para confirmarla.

Se decidió evaluar si la inserción del “cassette” recombinante del gen *sih2* podría influir en la respuesta al estrés osmótico. También se evaluó la tolerancia de estas mutantes frente a estrés osmótico por sorbitol. Se realizaron ensayos de crecimiento en medio PDA con sorbitol con diferentes concentraciones: 0, 0.5, 2 y 3 M. Como se observa en la figura 34, las cepas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* crecen de manera similar a la cepa silvestre. Sin embargo, en condiciones hiperosmóticas (3 M de sorbitol) la cepa silvestre muestra una aparente disminución leve en el crecimiento. Aunque se requieren más experimentos para determinar si esta tendencia se conserva.

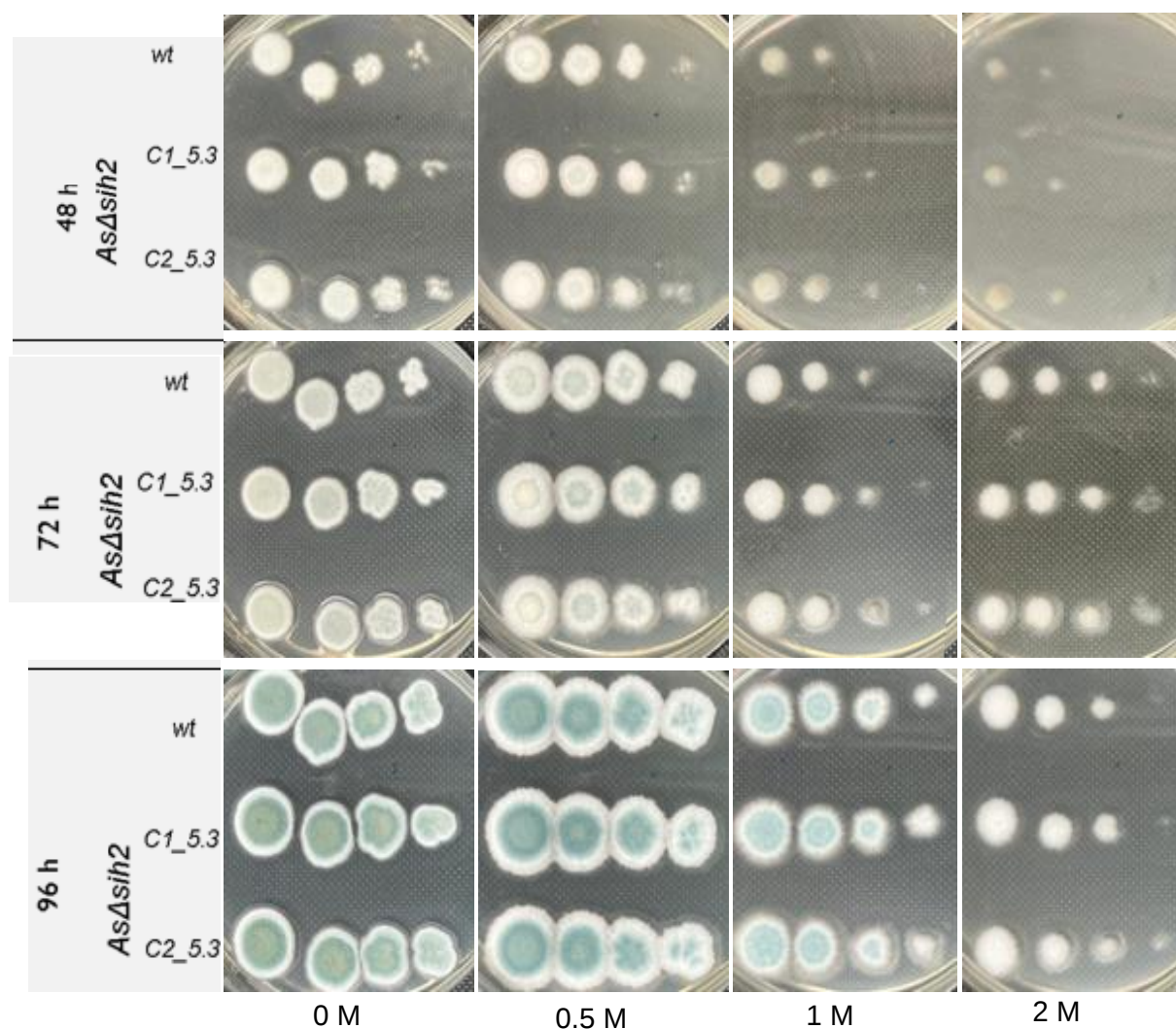


Figura 33. Las cepas mutantes no son sensibles a estrés hipersalino. Ensayo de tolerancia a estrés hipersalino (0, 0.5, 2 M de NaCl) en las cepas mutantes *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* y *A. sydowii* wt, como control.

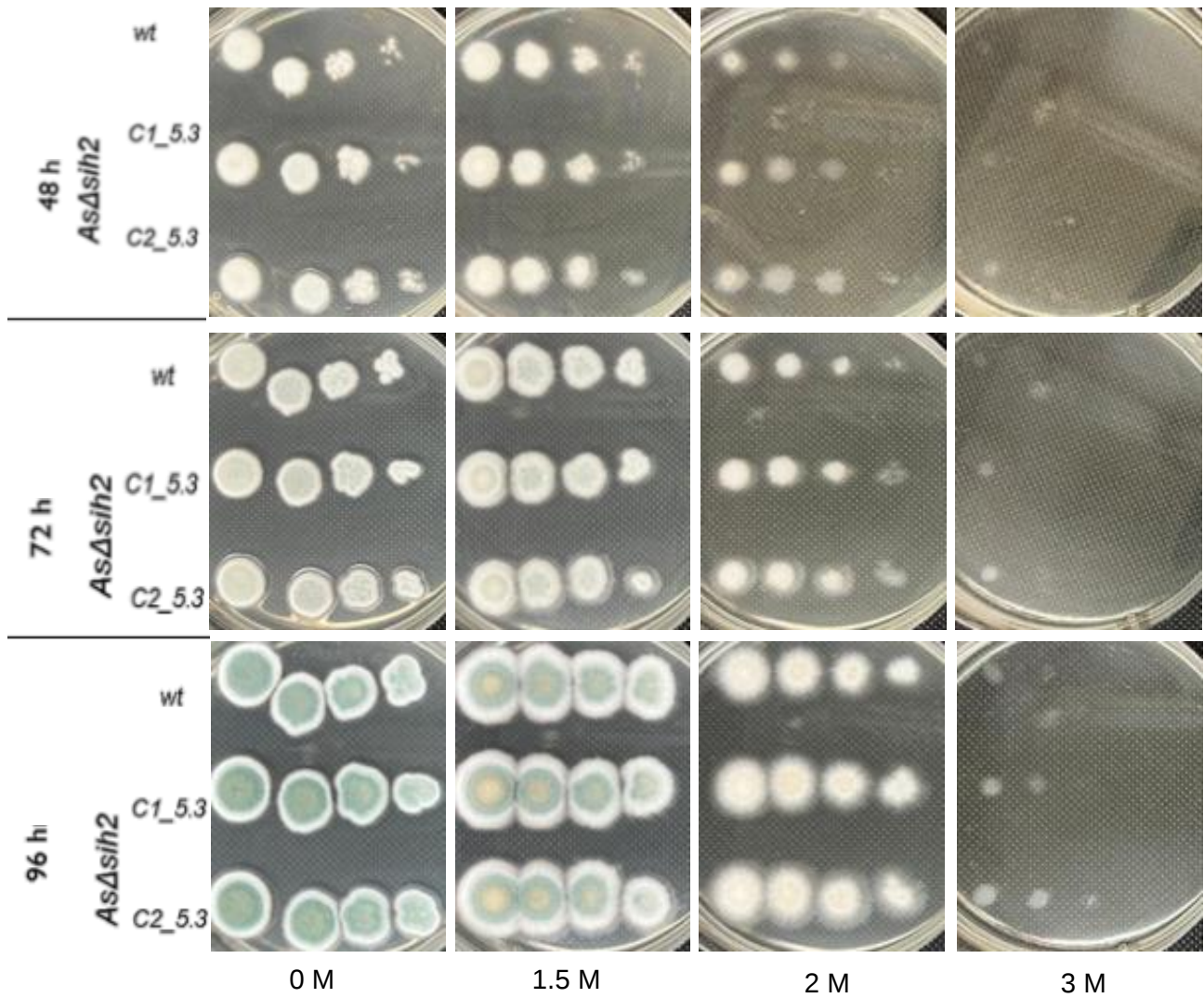


Figura 34. Las cepas mutantes no son sensibles a estrés hiperosmótico. Ensayo de tolerancia a estrés osmótico (0, 0.5, 2, 3 M de sorbitol) en las cepas mutantes *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* y *A. sydowii* wt, como control.

8.7.2.- Las colonias mutantes putativas son sensibles a estrés de pared celular.

Se evaluó si la integración pudo provocar alteraciones posicionales asociadas a cambios en la expresión de *sih2*, mediante ensayos de tolerancia a estrés de pared celular inducido por Rojo Congo (RC). En la Figura 35 se observa que las cepas mutantes putativas de *A. sydowii* presentan una mayor susceptibilidad a la presencia de RC en comparación con la cepa silvestre. A las 48 h, la cepa silvestre muestra crecimiento visible incluso en diluciones de 10^3 – 10^4 esporas, mientras que en las cepas mutantes (*As Δ sih2_C1_5.3* y *As Δ sih2_C2_5.3*) el crecimiento es más limitado, observándose colonias principalmente en las diluciones más concentradas (10^4), con una reducción evidente en el tamaño y densidad en dichas colonias (indicadas con flechas rojas). A las 72 h, la cepa silvestre presenta un crecimiento más robusto en todas las diluciones evaluadas, mientras que las mutantes continúan mostrando un crecimiento reducido, especialmente en las diluciones más bajas (10^2 - 10^1), donde la formación de colonias es menos eficiente. A las 96 h, aunque todas las cepas muestran un incremento en el crecimiento, las cepas mutantes aún presentan diferencias respecto a la silvestre, evidenciadas por colonias menos densas y una menor eficiencia de crecimiento, particularmente en la dilución de 10^3 esporas en al menos una de las réplicas. En conjunto, estos resultados indican que las cepas mutantes putativas presentan una mayor sensibilidad al estrés de pared celular inducido por Rojo Congo, lo que sugiere una posible alteración en la integridad de la pared celular.

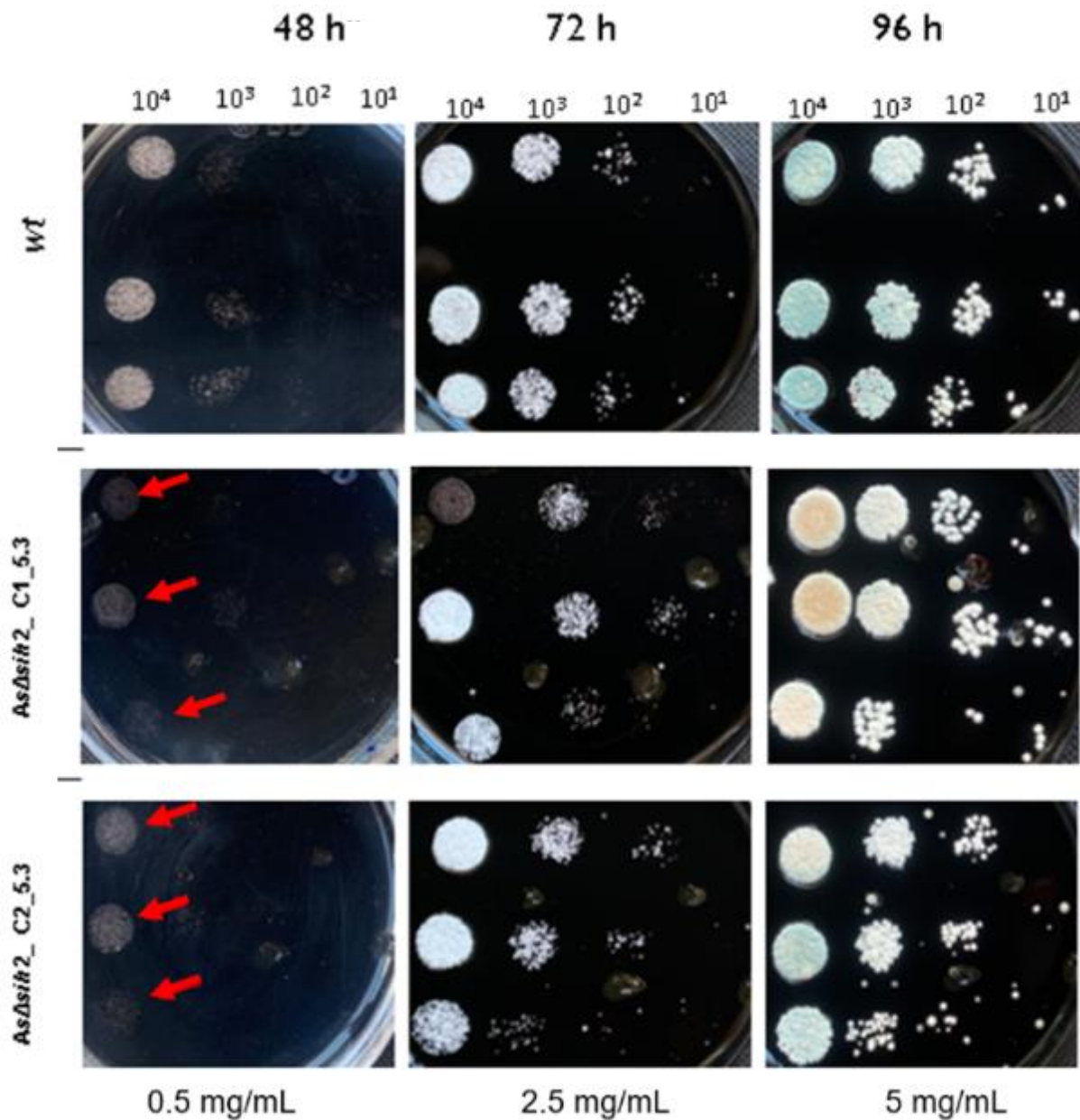


Figura 35. Las cepas mutantes putativas de la *sih2* son susceptibles al estrés de la pared celular inducida por Rojo Congo. Ensayo de tolerancia a estrés de pared celular en las cepas de *A. sydowii* wt y mutantes *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3*. En PDA + Rojo Congo (0.5, 2.5, 5 mg/mL).

8.8.- Ensayo de humectabilidad de *A. sydwi* wt y mutantes putativas *AsΔsih2_C1_5.3* y *C2_5.3*

Se realizó el análisis de humectabilidad en las cepas mutantes putativas *AsΔsih2_C1_5.3*, *AsΔsih2_C2_5.3* y la cepa silvestre (wt). Sobre la superficie del micelio se depositó una gota de H₂O o PBS suplementado con Tween 20 (0.1 %) y se dejó reposar durante 30 min para evaluar su absorción. En el panel A (gota de agua), se observa que no hay absorción en ninguna de las cepas, incluyendo tanto la silvestre como las mutantes, por lo que bajo esta condición no se detectan diferencias en la humectabilidad. Esto podría atribuirse a la presencia de proteínas hidrofóbicas residuales, como ceroplatininas u otras hidrofobinas aún presentes. En contraste, en el panel B (PBS + Tween 20), se evidencian diferencias entre las cepas, observándose una mayor absorción en las cepas mutantes putativas. En particular, en la cepa *AsΔsih2_C1_5.3* la gota se absorbió completamente en al menos uno de los triplicados, mientras que en *AsΔsih2_C2_5.3* la absorción fue más rápida y el ángulo de la gota fue menor en comparación con la cepa silvestre (Figuras 36). En conjunto, estos resultados sugieren un aumento en la humectabilidad (disminución de la hidrofobicidad superficial) en las cepas mutantes putativas, posiblemente asociado a una reducción en la hidrofobicidad superficial derivada de la inserción del “cassette” recombinante del gen de hidrofobina *sih2*.

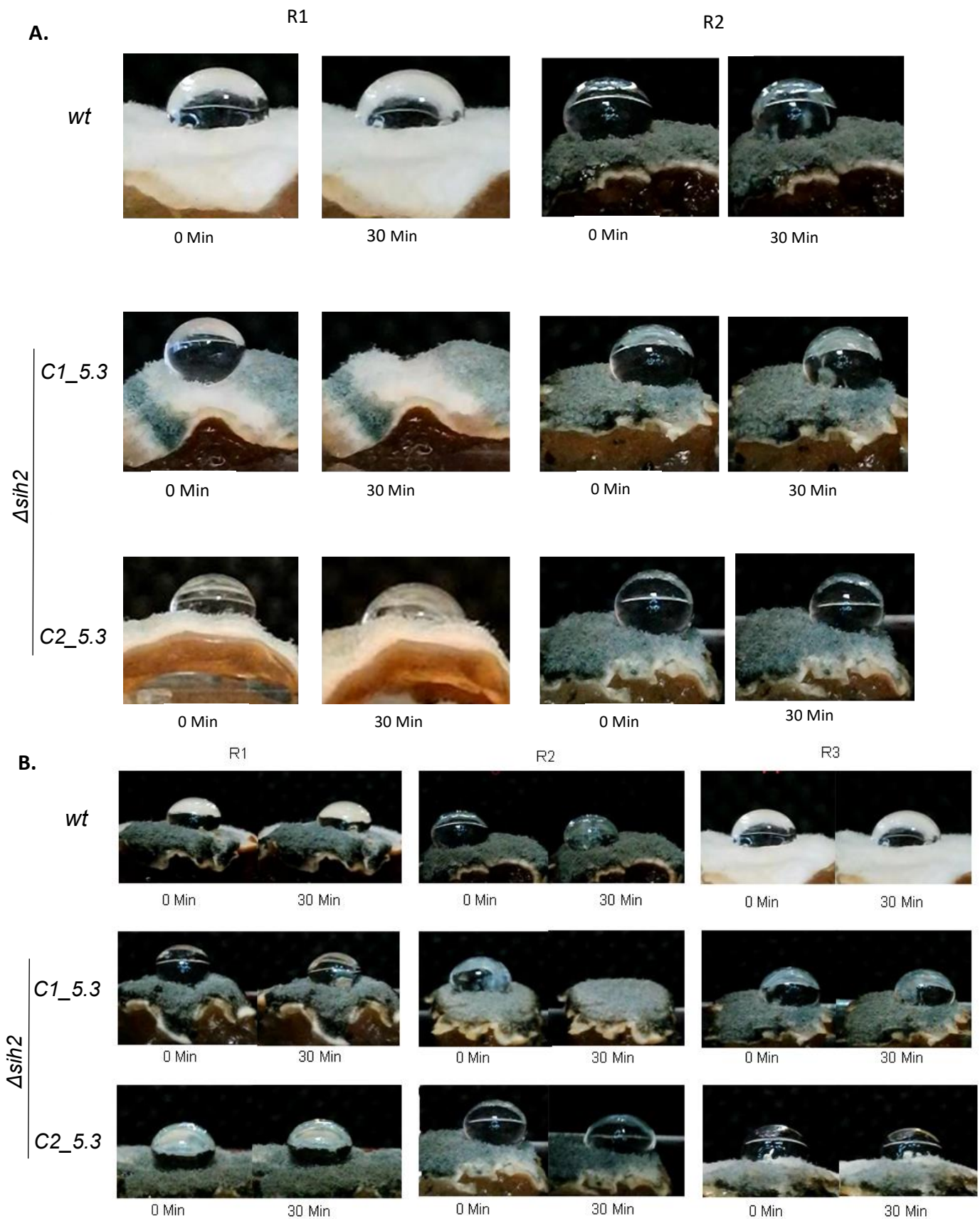


Figura 36. Las cepas mutantes putativas con la inserción de gen *sih2* son más hidrofílicas que la silvestre. Ensayo de análisis de hidrofobicidad de micelio en las cepas mutantes *As Δ sih2_C1_5.3* y *As Δ sih2_C2_5.3*, usando como control *A. sydowii* wt. A) Absorción de gotas de agua pura y B) absorción de gota de agua y PBS + Tween 20 (0.1 %).

8.9.- Efecto de la inserción del “cassette” recombinante del gen *sih2* en la producción de las esporas

En reportes previos se ha observado que la mutación del gen de hidrofobina *rodA*, en el hongo *A. fumigatus*, provoca una disminución en la producción de esporas (Valsecchi *et al*, 2017). Con base en esto, se evaluó la producción de esporas en las cepas mutantes putativas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* con respecto a *A. sydowii* wt. Para ello, se inocularon cajas con 10,000 esporas en medio PDA, y se incubaron durante 4 y 8 días. En la figura 37 se observa una reducción significativa en la producción de esporas en las cepas mutantes con respecto a la silvestre al día 8, mientras que al día 4 no se detectan diferencias evidentes entre las cepas.

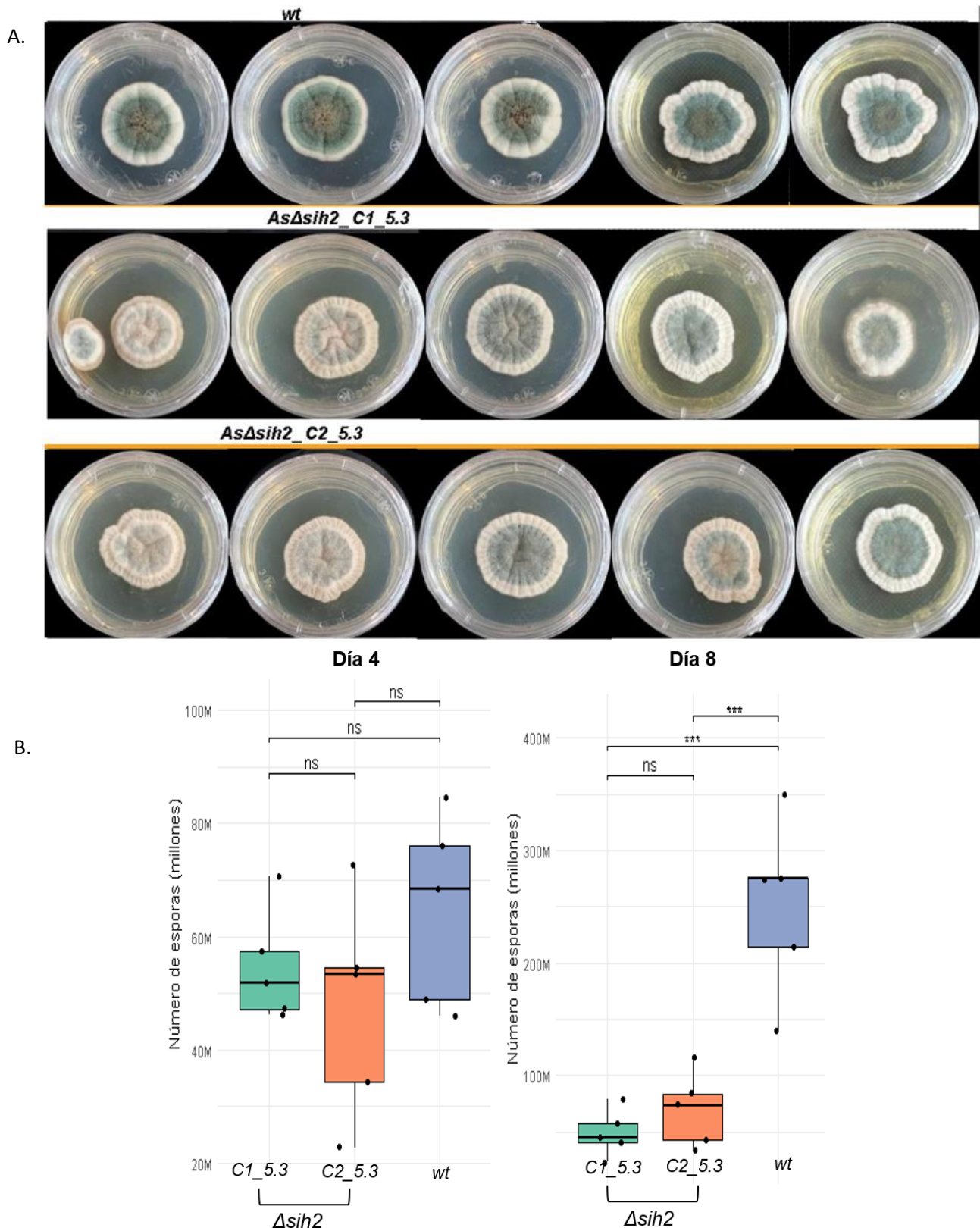


Figura 37. La mutantes putativas presentan una disminución en la producción de esporas. Producción de esporas en *A. sydowii* wt y mutantes *AsΔsih2_C1* y *AsΔsih2_C2*. A partir de cultivos de PDA en el día 4 y 8. (A) Réplicas experimentales de la producción de esporas. (B) Análisis estadístico de los datos. En el Día 4, el análisis ANOVA no mostró diferencias significativas entre grupos ($F(2,12) = 1.57$, $p = 0.248$). En Día 8, el ANOVA fue significativo ($F(2,12) = 19.90$, $p < 0.001$), y el post-hoc de Tukey indicó diferencias significativas entre WT y C1 ($p < 0.001$), y entre WT y C2 ($p < 0.01$), pero no entre C1 y C2. Los asteriscos indican comparaciones con diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

9.- Discusión

9.1.- Ensayos de tolerancia de *A. sydowii* wt bajo estrés osmótico y de pared celular

La estandarización de ensayos de tolerancia a distintos tipos de estrés permite caracterizar la respuesta morfológica de hongos filamentosos frente a condiciones ambientales adversas en cepas silvestres en comparación con cepas mutantes en genes que pueden estar relacionados a las respuestas al estrés. En este estudio, la cepa silvestre de *A. sydowii* mostró respuestas diferenciadas frente a estrés hipersalino, hiperosmótico y de pared celular, evidenciadas en cambios en el crecimiento y la expansión de las colonias, así como en la aparición de alteraciones tempranas asociadas a cada condición.

9.1.1.- Respuesta a estrés hiperosmótico de las colonias de *A. sydowii* silvestre wt

Los ensayos de tolerancia a estrés osmótico inducido por sorbitol mostraron que *A. sydowii* wt presenta una respuesta dependiente de la concentración, caracterizada por una estimulación del crecimiento a concentraciones intermedias (0.5 y 2 M) y una marcada reducción de crecimiento a concentraciones elevadas (3 M), lo que sugiere un rango óptimo de osmolaridad que favorece su desarrollo. En condiciones control (0 M), las colonias presentaron una expansión radial continua; sin embargo, a 0.5 y 2 M de sorbitol el crecimiento fue mayor en comparación con la condición control, indicando una capacidad de adaptación inicial a incrementos relativamente altos de osmolaridad. Por el contrario, a 3 M el crecimiento se redujo de manera evidente desde las primeras horas de incubación y se mantuvo limitado hasta las 96 h, condición en la que el crecimiento permaneció severamente restringido durante todo el periodo de monitoreo. Este comportamiento fue consistente tanto a nivel macroscópico como en los microcultivos.

Este patrón sugiere que *A. sydowii* no solo tolera el estrés osmótico, sino que puede beneficiarse de condiciones moderadamente hiperosmóticas, lo cual es consistente con su naturaleza halófila y su adaptación a ambientes con alta salinidad. En este contexto, se ha descrito que *A. sydowii* es capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones salinas, mostrando una tolerancia superior en comparación con muchos hongos no halófilos, lo que implica la presencia de mecanismos eficientes de osmorregulación y

homeostasis iónica. Esta capacidad diferencial podría explicar por qué, a diferencia de otros hongos, el estrés osmótico moderado no resulta limitante, sino que puede activar rutas metabólicas que favorecen el crecimiento.

Este comportamiento es consistente con lo reportado en el hongo osmotolerante *Aspergillus chevalieri*, donde bajo concentraciones intermedias de solutos osmóticos (50% sacarosa) la tasa de crecimiento puede incrementarse hasta 1.5 veces respecto al control. En dicho sistema, el aumento del crecimiento se asocia con una intensificación del metabolismo energético, evidenciada por un incremento en la respiración celular, la actividad de enzimas de la cadena respiratoria y la biogénesis mitocondrial. En *A. chevalieri*, el estrés osmótico moderado induce un aumento significativo en el contenido de proteínas y lípidos mitocondriales, así como una mayor actividad de enzimas respiratorias clave, particularmente la NADH deshidrogenasa. Además, se observa una expansión del tamaño mitocondrial y un incremento en el RNA mitocondrial, lo que indica una reprogramación metabólica activa orientada a sostener la elevada demanda energética requerida para la adaptación osmótica (Hefnawy *et al.*, 2001). Estos antecedentes apoyan la idea de que el incremento en el crecimiento observado en *A. sydowii* a 0.5 y 2 M de sorbitol podría estar asociado a una reprogramación metabólica similar.

Sin embargo, a la concentración más alta evaluada (3 M), *A. sydowii* presentó un crecimiento consistentemente bajo, indicando que el estrés osmótico excede su capacidad adaptativa. Este patrón también es congruente con lo descrito en *A. chevalieri*, donde a concentraciones extremas de sacarosa (80%) el crecimiento se reduce drásticamente hasta aproximadamente el 30% con respecto al control, a pesar de que la maquinaria mitocondrial y respiratoria se encuentra altamente activada (Hefnawy *et al.*, 2002). Esto sugiere que, bajo estrés osmótico severo, el costo energético de la adaptación supera la capacidad de respuesta celular, resultando en una inhibición generalizada del crecimiento.

Por otro lado, estudios previos han demostrado que las hidrofobinas pueden estar implicadas en la respuesta a estrés osmótico. Un ejemplo es el trabajo de Cai *et al.*

(2021), donde la sobreexpresión del gen *hfb2* en *T. guizhouense* incrementa el crecimiento en presencia de NaCl, sacarosa y glicerol, sugiriendo su participación en la resistencia tanto a estrés iónico como osmótico. De manera similar, Zhang *et al.* (2022) observaron que una mutante del gen de hidrofobina *VdHP1* de *Verticillium dahliae* presenta reducción en el crecimiento bajo NaCl, pero no bajo sorbitol o KCl, lo que indica una respuesta diferencial dependiendo del tipo de estrés.

Adicionalmente, se ha reportado que el estrés osmótico puede inducir cambios en la composición de la pared celular. En *Trichoderma reesei*, el sorbitol a 1 M provoca alteraciones morfológicas y en la pared celular, asociadas con la activación de la vía HOG, lo que incrementa el consumo de glucosa para la síntesis de glicerol y reduce la disponibilidad de precursores para la formación de glucanos (Górka-Nieć *et al.*, 2010). En concordancia con esto, en *A. sydowii* se ha observado que el estrés hiper salino (2.0 M NaCl) induce un remodelamiento significativo de la pared celular, caracterizado por un aumento en su grosor y la formación de una estructura lamelar, acompañado de una disminución en el contenido de quitina y un incremento de β -glucanos (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

En conjunto, estos resultados sugieren que la adaptación osmótica no solo implica una redistribución de recursos metabólicos, como el desvío de glucosa hacia la síntesis de glicerol, sino también una reorganización estructural de la pared celular que contribuye a mantener la integridad celular bajo condiciones de estrés, impactando tanto la morfología como el crecimiento colonial

En el caso del estrés salino, la inhibición del crecimiento observada a 2 M de NaCl puede atribuirse a la acumulación intracelular de iones, la cual altera el equilibrio iónico y compromete las interacciones estructurales de proteínas y otras macromoléculas. En *A. sydowii*, la exposición a NaCl induce tanto estrés osmótico como estrés iónico; el Na^+ puede desplazar al potasio de los sitios activos enzimáticos, afectando su función (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), lo que le confiere una mayor capacidad de interacción con moléculas de agua e intensifica la reducción de la actividad de agua.

En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que *A. sydowii* posee una elevada tolerancia tanto al estrés osmótico en comparación con otros hongos. No obstante, la disminución del crecimiento a condiciones hiperosmóticas indica la existencia de límites fisiológicos definidos.

.

9.2.- Respuesta de *A. sydowii* a estrés de pared celular

Los resultados obtenidos indican que *A. sydowii* presenta una alta tolerancia al estrés de pared celular, manteniendo el crecimiento incluso en altas concentraciones de Rojo Congo (RC) y Calcofluor White (CFW), aunque con una reducción en la tasa de crecimiento y alteraciones morfológicas asociadas a la pérdida de integridad estructural. Bajo condiciones control, las colonias de *A. sydowii* *wt* mostraron una tasa de crecimiento constante, de tal forma que, a las 96 h de incubación, las colonias derivadas de una dilución inicial de 10 conidios ya se encontraban en contacto, formando una masa micelial continua. Este comportamiento es consistente con un desarrollo vegetativo característico de la especie y con una adecuada integridad de la pared celular.

En contraste, en presencia de Rojo Congo (RC) a una concentración de 5 mg/mL se observó una reducción evidente en la tasa de crecimiento desde las 48 h de incubación, particularmente en la condición correspondiente a la dilución de 10 colonias. Esta diferencia se hizo aún más marcada a las 96 h, cuando las colonias permanecieron claramente separadas entre sí, mientras que en el control ya se había producido una colonia continua. Estos resultados indican que el estrés de pared celular inducido por RC no solo afecta la expansión radial del micelio, sino que también limita la dinámica de crecimiento coordinado entre hifas.

A nivel microscópico, este efecto se acompaña de alteraciones morfológicas específicas. A 5 mg/mL de RC, se observaron hinchamientos en el ápice de las hifas, así como un incremento en el ancho hifal de aproximadamente 2–3 μm respecto al control en múltiples réplicas a las 48 h. Estas modificaciones son consistentes con un debilitamiento localizado de la pared celular que favorece la entrada excesiva de agua y conduce a expansión apical descontrolada. Fenómenos similares han sido descritos en *Aspergillus niger*, donde el Rojo Congo interfiere con la cristalización de la quitina al unirse a glicanos en el ápice hifal; sin embargo, estos efectos se presentan a concentraciones considerablemente menores (≈ 0.15 mg/mL) (Rese *et al.*, 2021), lo que sugiere una mayor tolerancia de *A. sydowii* a la perturbación de la pared celular.

El incremento en el grosor hifal sugiere la activación de mecanismos compensatorios de remodelación de la pared celular en respuesta al estrés inducido por RC, más que un

cambio generalizado en el patrón de crecimiento. Este resultado es consistente con estudios previos que demuestran que el Rojo Congo interfiere con la organización de los β -1,3-glucanos al formar complejos con regiones helicoidales de estos polisacáridos, impidiendo su agregación lateral en microfibrillas y comprometiendo la integridad estructural de la pared celular, lo que da lugar a paredes menos rígidas y morfológicamente aberrantes (Kopecká & Gabriel, 1992).

De manera consistente, ensayos con Calcofluor White (CFW) mostraron una inhibición del crecimiento comparable a la inducida por RC, a concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/mL. Dado que el CFW se une preferentemente a la quitina, mientras que el RC interactúa con β -1,3-glucanos, la similitud entre estos fenotipos sugiere que la alteración de distintas capas de la pared celular converge en una consecuencia funcional común: la pérdida de integridad estructural y la reducción del crecimiento micelial (Wong *et al.*, 2021).

Este patrón de respuesta es consistente con lo reportado en otras especies del género *Aspergillus*. Por ejemplo, en *A. fumigatus* y *A. flavus*, donde el tratamiento con Rojo Congo en concentraciones de 0.05–0.25 mg/mL provoca una reducción progresiva del crecimiento radial en *A. fumigatus*, alcanzando aproximadamente un 40% de inhibición a 0.25 mg/mL, mientras que el calcofluor white genera reducciones de hasta 80% a 0.15 mg/mL y una inhibición completa del crecimiento a concentraciones superiores a 0.2 mg/mL. En contraste, *A. flavus* presenta una mayor tolerancia relativa a ambos agentes bajo condiciones similares (Wong *et al.*, 2021).

El efecto inhibitorio del RC y del CFW es consistente con la activación de la vía de integridad de la pared celular (CWIS), como se ha descrito en *A. nidulans*, donde esta respuesta implica ajustes en el crecimiento, alteraciones morfológicas y regulación transcripcional asociada a la integridad de la pared celular (Figura 37).

En este contexto, Rojo Congo actúa principalmente como un estresor de la integridad de la pared celular más que como un agente letal, ya que su efecto se basa en la desorganización estructural de polisacáridos clave como quitina y β -glucanos, respectivamente, generando defectos en la arquitectura celular y en procesos como la saltación y la separación celular (Kopecká & Gabriel, 1992). En concordancia con lo anterior, la tolerancia observada en *A. sydowii* puede explicarse por su capacidad de

adaptación a condiciones extremas. Estudios comparativos han demostrado que la tolerancia a este compuesto varía ampliamente entre especies fúngicas y puede estar asociada a su nicho ecológico. Por ejemplo, hongos entomopatógenos como *Metarhizium acridum* y *Cordyceps fumosorosea* muestran una marcada reducción del crecimiento desde 50–100 mg/mL, siendo *C. fumosorosea* la única especie que presentó una concentración mínima inhibitoria (MIC) dentro de ese rango. En contraste, hongos saprótrofos como *A. niger* y *Trichoderma atroviride* mantienen crecimiento incluso a concentraciones de hasta 600 mg/mL (Lima *et al.*, 2021).

En el presente trabajo, *A. sydowii* fue capaz de tolerar concentraciones de hasta 5 mg/mL de RC, lo que refuerza su carácter poliextremófilo y sugiere la presencia de mecanismos de adaptación estructural y fisiológica. De hecho, cepas de *A. sydowii* han sido aisladas de ambientes extremos, incluyendo ecosistemas marinos profundos como la zona hadal, lo que respalda su elevada plasticidad fisiológica (Wang *et al.*, 2025). En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que el aumento del grosor hifal bajo altas concentraciones de Rojo Congo es una consecuencia directa de la activación de mecanismos de remodelación de la pared celular en respuesta al estrés estructural.

9.3.- La vía de remodelación de pared puede inducir el inicio del desarrollo asexual, pero bajo estrés estructural el proceso se desvía hacia una conidiación abortiva en *A. sydowii* wt

Los resultados obtenidos indican que el estrés de pared celular en *A. sydowii* induce la activación temprana del programa de desarrollo asexual; sin embargo, bajo condiciones de daño estructural, este proceso no se completa y se desvía hacia la formación de conidióforos abortivos.

A las 48 h de incubación, los microcultivos de la condición control de *A. sydowii* wt mostraron hifas con crecimiento vegetativo continuo y sin evidencia de ramificaciones asociadas a estructuras reproductivas, lo que indica un desarrollo micelial normal en ausencia de estrés de pared celular. La falta de conidióforos abortivos en esta condición sugiere que el programa de desarrollo asexual no fue activado de manera prematura ni alterada.

En contraste, en los microcultivos expuestos a Rojo Congo (RC) a 5 mg/mL se observaron alteraciones morfológicas claras, caracterizadas por la presencia de conidióforos inmaduros. Estos cambios son consistentes con un escenario de daño estructural en la pared celular, en el que la integridad de la hifa y la progresión normal del desarrollo se ven comprometidas.

Este comportamiento es consistente con lo reportado en otros hongos del género *Aspergillus*. Anomalías morfológicas similares han sido observadas en *A. niger*, donde estos fenotipos se presentan a concentraciones más bajas de RC (≈ 0.15 mg/mL), mientras que en *A. sydowii* son visibles a concentraciones más altas (hasta 5 mg/mL). Esta diferencia sugiere variaciones interespecíficas en la sensibilidad o en la capacidad de respuesta al daño de pared celular, aunque la conservación del fenotipo indica la activación de mecanismos morfogenéticos comunes (Pancaldi *et al.*, 1984; Spence *et al.* 2022).

A nivel molecular, estos resultados pueden explicarse por la activación de la vía CWIS. La presencia de conidios inmaduros en *A. sydowii* bajo estrés inducido por RC concuerda con lo reportado por Rese *et al.* (2021), donde en *A. nidulans* el daño de pared celular

activa esta vía, promoviendo la inducción temprana de reguladores del desarrollo asexual como *brlA*, sin que se complete la expresión secuencial de los genes aguas abajo *abaA* y *wetA* (genes involucrados en la maduración conidial) lo que resulta en la detención del proceso de conidiación en fases tempranas y en la formación de estructuras abortivas (Figura 38).

Adicionalmente, Spence *et al.* (2022) demostraron en *A. nidulans* la respuesta al estrés de pared celular depende de manera crítica de la formación de septos. En este estudio, mutantes defectivos en septación mostraron una mayor susceptibilidad a agentes como el Rojo Congo, lo que indica que los septos permiten compartimentalizar el daño estructural y limitar su propagación a lo largo de la hifa. En conjunto, estos antecedentes respaldan que los fenotipos observados en *A. sydowii* no solo reflejan daño estructural, sino también una reprogramación del desarrollo celular en respuesta al estrés. Por lo tanto, la conidiación abortiva observada podría interpretarse como una estrategia adaptativa en la que el hongo inicia la diferenciación reproductiva, pero prioriza la supervivencia celular mediante la activación de mecanismos de mantenimiento estructural, incluyendo la compartimentalización del daño y la remodelación de la pared celular.

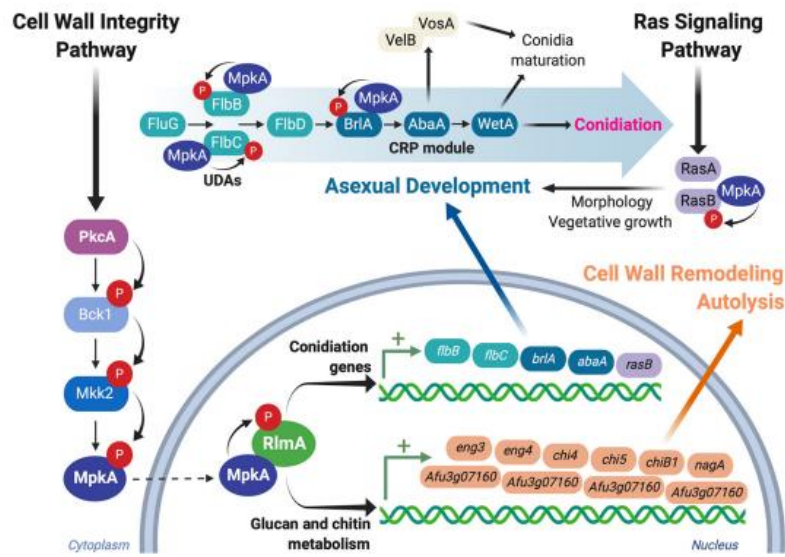


Figura 38. Esquema de la interconexión entre la vía de integridad de la pared celular (CWIS) y la regulación del desarrollo asexual en *A. nidulans*. La activación de la cascada MAPK (Bck1–Mkk2–MpkA) en respuesta a daño de pared celular induce la expresión de genes implicados en remodelación de pared y puede estimular de manera prematura el módulo central de conidiación (briA–abaA–wetA) (Rese *et al.*, 2021; Rocha *et al.*, 2020).

9.4- Ensayos de tolerancia a estrés hipersalino, hiperosmótico y de pared celular de las colonias mutantes putativas del gen *sih2* de *A. sydowii* y *A. sydowii* silvestre wt

9.4.1.- Ensayos de tolerancia a estrés hipersalino e hiperosmótico de las colonias mutantes putativas del gen *sih2* de *A. sydowii*, y *A. sydowii* silvestre wt

Los resultados obtenidos indican que la alteración del gen *sih2* no genera un fenotipo evidente de sensibilidad al estrés hiperosmótico ni hipersalino, lo que sugiere que este gen no es esencial de manera individual para la respuesta a estas condiciones en *A. sydowii*. Cuando las cepas fueron cultivadas en presencia de NaCl o sorbitol, las mutantes putativas no mostraron una mayor sensibilidad al estrés osmótico ni salino en comparación con la cepa silvestre. Aunque la inserción del “cassette” recombinante ocurrió de forma aleatoria y no sustituyó al gen *sih2* en su locus nativo, no puede descartarse que dicha integración haya interferido con la correcta expresión del gen *sih2*, ya sea por efectos de posición o por la alteración de regiones reguladoras como el promotor. Adicionalmente, la ausencia de un fenotipo claro sugiere la posible existencia de mecanismos de redundancia funcional entre hidrofobinas. Este tipo de comportamiento ha sido reportado previamente en otros hongos filamentosos. Por ejemplo, en *Fusarium graminearum*, la eliminación individual de genes de hidrofobinas no genera alteraciones evidentes en el crecimiento o en la respuesta al estrés, mientras que la acumulación de múltiples deleciones (mutantes dobles o triples) sí conduce a fenotipos claros, como la inhibición del crecimiento en condiciones de estrés (Quarantin *et al.*, 2019). En conjunto, estos antecedentes apoyan la hipótesis de que, en *A. sydowii*, la función de *sih2* podría estar parcialmente compensada por otras hidrofobinas. Bajo este escenario, la ausencia de un fenotipo de sensibilidad al estrés en las cepas mutantes putativas podría explicarse por un mecanismo de compensación funcional mediado por otras hidrofobinas, particularmente *sih1* y *sih4*, cuyos productos biológicos podrían suplir parcial o totalmente la función de *sih2* en la protección frente a estrés osmótico e hipersalino, como se propone en el modelo de la Figura 39.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el análisis funcional de *sih2* requiere la generación de mutantes dobles y triples para evidenciar su contribución específica dentro de la red de hidrofobinas involucradas en la respuesta al estrés.

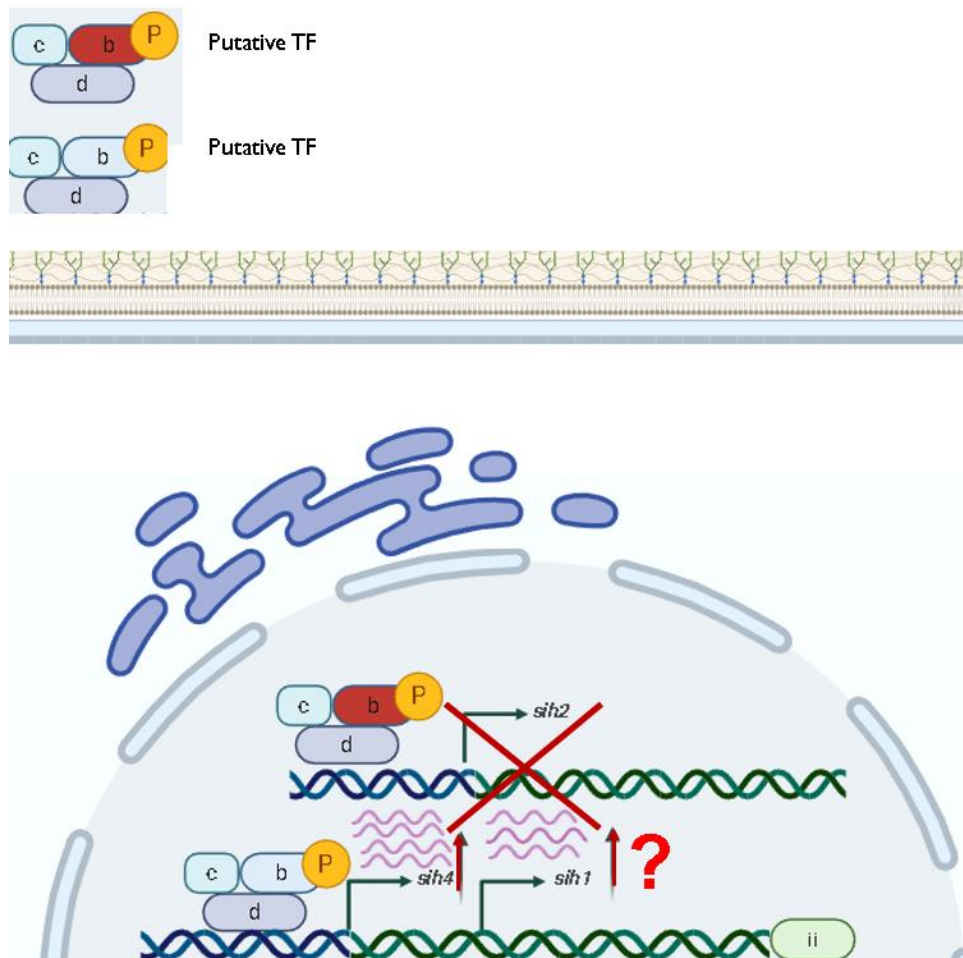


Figura 39. Modelo propuesto de compensación funcional entre hidrofobinas en *A. sydowii*. La integración al azar del “cassette” recombinante podría interferir con la expresión del gen *sih2*, mientras que otras hidrofobinas, como *sih1* y *sih4*, podrían compensar su función bajo condiciones de estrés, evitando la aparición de un fenotipo sensible ante estrés iónico y osmótico.

9.4.2.- Ensayos de tolerancia a estrés de pared celular de las colonias mutantes putativas del gen *sih2* de *A. sydowii* y *A. sydowii* wt

Los resultados obtenidos indican que las cepas mutantes putativas presentan una mayor sensibilidad al estrés de pared celular inducido por Rojo Congo, lo que sugiere una alteración en la organización y/o recubrimiento superficial de la pared celular.

En el presente estudio se observó que las cepas mutantes putativas *As Δ sih2_C1_5.3* y *As Δ sih2_C2_5.3* de *A. sydowii* presentan un retardo en el crecimiento a las 48 h cuando se cultivan en medio PDA con Rojo Congo a 5 mg/mL, en comparación con la cepa silvestre. Este fenotipo sugiere una posible alteración o ausencia en el recubrimiento de la pared celular por hidrofobinas.

Este comportamiento es consistente con lo reportado para el gen de hidrofobina *Cmhyd1* de *Cordyceps militaris*, donde su eliminación provoca un incremento en la sensibilidad a al Rojo Congo (Li *et al.*, 2021). Estos resultados apoyan la idea de que las hidrofobinas desempeñan un papel clave en la integridad y protección de la pared celular, actuando como una capa superficial que modula la interacción con el entorno. Sin embargo, dado que en estas cepas el “cassette” recombinante se integró de manera al azar y el gen *sih2* silvestre continúa presente, los cambios observados no pueden atribuirse directamente a la pérdida del gen, sino más probablemente a efectos posicionales derivados de la inserción. En este sentido, la integración del “cassette” podría estar afectando la expresión local o la regulación del propio gen *sih2*.

El aumento en la sensibilidad al Rojo Congo podría indicar que la superficie celular de las mutantes presenta una mayor accesibilidad al colorante. Este compuesto aniónico se une a componentes de la pared celular (Ortiz-Ramírez *et al.*, 2022), por lo que una mayor afinidad puede reflejar un defecto en el recubrimiento por hidrofobinas. Con base en estas observaciones, se propone un modelo en el que la ausencia del gen de hidrofobina *sih2* compromete la organización de las capas externas de la pared celular, favoreciendo una mayor interacción del Rojo Congo con los β -glucanos y, en consecuencia, un aumento del estrés de pared celular (Figura 40).

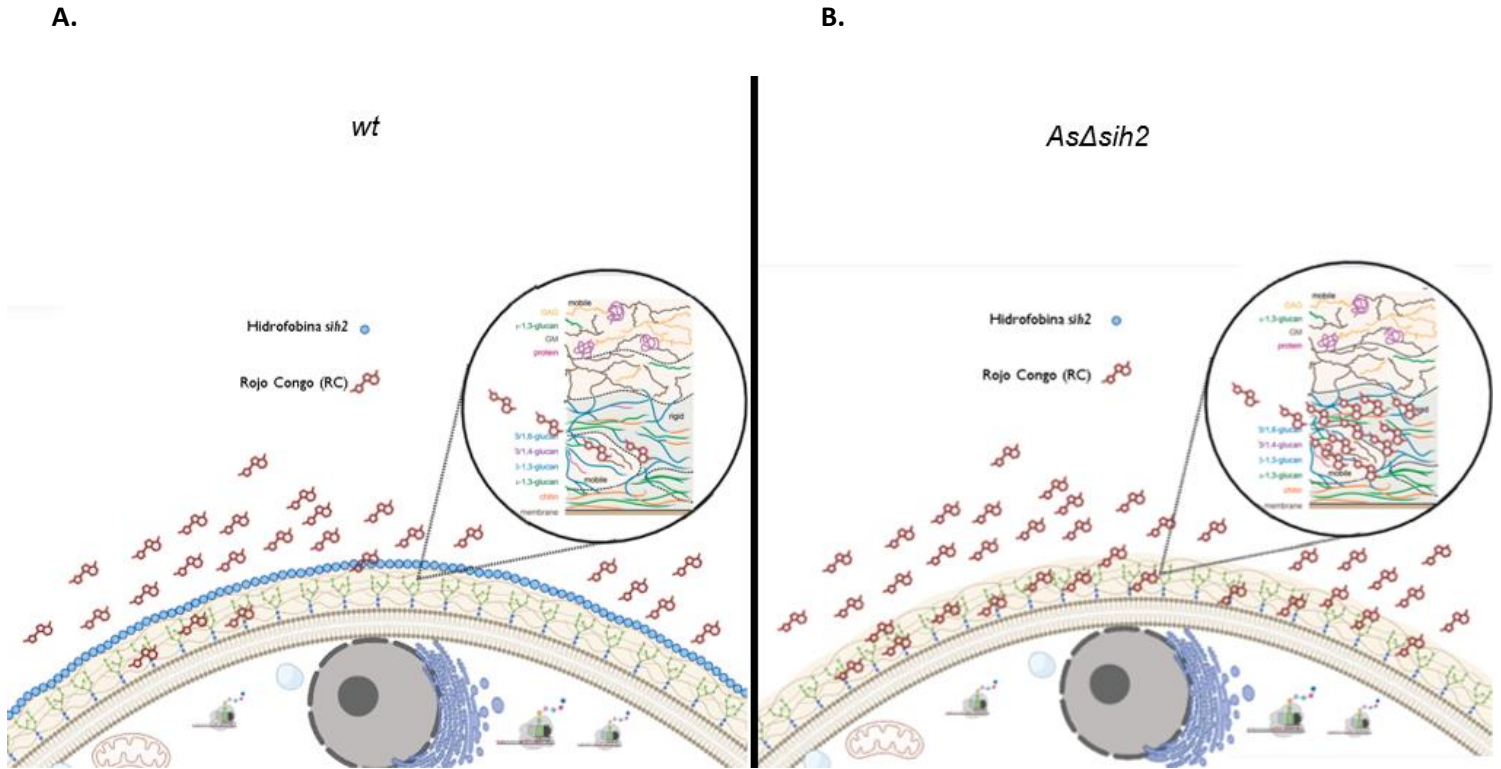


Figura 40. Modelo propuesto de la alteración de la integridad de la pared celular asociada a la ausencia del gen de hidrofobina *sih2*. Panel A) WT, Panel B) mutantes putativas *AsΔ*sih2*_C1_5.3* y *AsΔ*sih2*_C2_5.3*. En condiciones normales, la hidrofobina SIH2 contribuiría a la organización de la capa externa de la pared celular, limitando la interacción de agentes como el Rojo Congo con los β -1,3-glucanos. En ausencia del gen *sih2*, la ausencia de esta capa de hidrofobinas favorecería una mayor susceptibilidad al estrés de pared celular.

9.5.- Análisis de hidrofobicidad del micelio y producción de micelio aéreo en las colonias mutantes putativas del gen *sih2* de *A. sydowii* y *A. sydowii* silvestre wt

Los resultados obtenidos sugieren que la integración del “cassette” recombinante en las cepas mutantes putativas de *A. sydowii* está asociada con una disminución de la hidrofobicidad superficial y alteraciones en la producción de micelio aéreo.

En el presente trabajo, las cepas *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3* de *A. sydowii* no corresponden a mutantes de delección del gen nativo *sih2*; sin embargo, es relevante que la cepa mutante putativa *AsΔsih2_C2_5.3* mostró una menor formación de micelio aéreo, mientras que *AsΔsih2_C1_5.3* presentó un fenotipo húmedo. Como se esquematiza en la Figura 41, en *A. sydowii* la integración del “cassette” recombinante se asocia con una disminución de la hidrofobicidad superficial. Estos cambios fenotípicos sugieren que la integración al azar pudo alterar la propiedad hidrofóbica y la diferenciación de hifas aéreas. Si bien estos efectos no pueden atribuirse directamente a la pérdida funcional de *sih2*, sí indican una posible perturbación en los mecanismos que regulan la hidrofobicidad micelial y producción de micelio aéreo. Este patrón es consistente con lo reportado en otros hongos filamentosos. En *C. militaris*, la delección del gen de hidrofobina *cmhyd1* provoca pérdida de hidrofobicidad y alteraciones en la producción de micelio aéreo en comparación con la cepa silvestre (Li *et al.*, 2021).

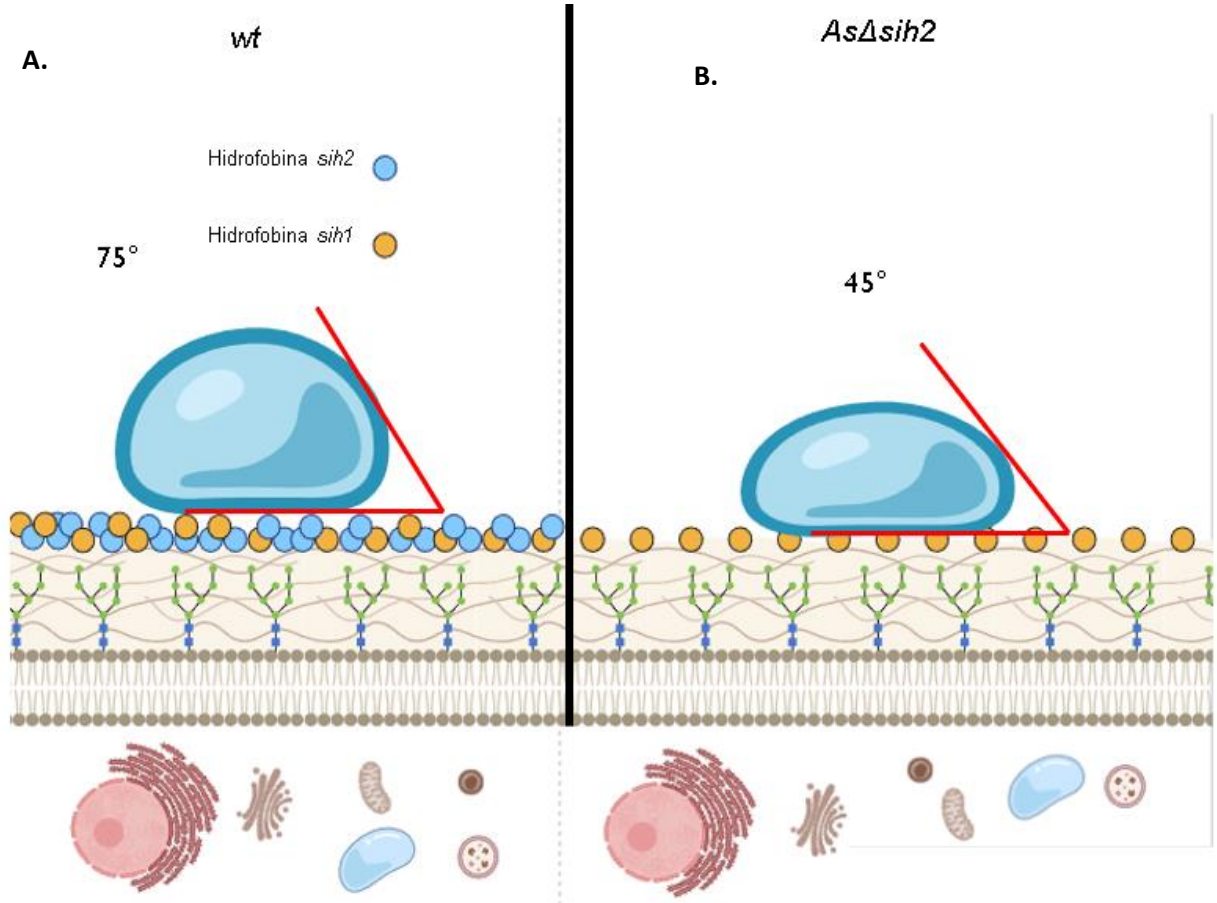


Figura 41. Modelo de disminución de hidrofobicidad basado en la absorción de gotas de agua en el mutante $\Delta sih2$. Panel A). *wt*, panel B) *AsΔsih2*.

9.6.- Análisis de la producción de esporas en las cepas mutantes putativas *As Δ sih2_C1* y *As Δ sih2_C2* y *A. sydowii* wt en medio sólido PDA

Los resultados obtenidos indican que las mutantes putativas *As Δ sih2_C1* y *As Δ sih2_C2* presentan una disminución en la producción de esporas, lo que sugiere una alteración en procesos relacionados con la morfogénesis y diferenciación del conidióforo en *A. sydowii*.

En este estudio se observó que las mutantes putativas *As Δ sih2_C1* y *As Δ sih2_C2* de *A. sydowii* presentan una menor producción de esporas al día 8 de cultivo en comparación con la cepa silvestre.

Sin embargo, dado que en estas cepas el “cassette” recombinante se integró de forma al azar y el gen *sih2* silvestre permanece en el genoma, la reducción en la esporulación no puede atribuirse directamente a la pérdida del gen, sino que probablemente deriva de efectos posicionales asociados a la inserción. En este sentido, la integración al azar podría afectar la regulación local del locus wt e incluso la expresión del propio gen *sih2*.

Este fenotipo puede explicarse como consecuencia de alteraciones en la estructura o en la organización del conidióforo, lo cual impacta directamente la eficiencia de la esporulación. Este tipo de alteraciones han sido descritas en *Penicillium expansum*, donde la delección de genes de hidrofobinas, incluyendo *hfbA* y el mutante múltiple Δ *sep*, provoca conidióforos estructuralmente anómalos, con cadenas de conidios agrupadas y conidios de morfología irregular (Luciano-Rosario *et al.*, 2022), lo que se asocia con una reducción en la eficiencia de dispersión.

De manera consistente, en otros hongos filamentosos se ha demostrado que las hidrofobinas funcionales participan en el desarrollo de estructuras conidiogénicas. En *A. fumigatus*, Valsecchi *et al.* (2017) demostraron que la delección de *RodA* ocasiona una disminución de la esporulación y una afectación severa en la hidrofobicidad de las conidias, siendo este gen esencial para la formación de rodlets. De manera similar, en *C. militaris*, Li *et al.* (2021) reportaron que la delección de *Cmhyd1* conduce a una reducción marcada en la conidiación. No obstante, la participación de las hidrofobinas en la esporulación no es universal. Por contraste, en *F. graminearum*, Quarantin *et al.* (2019)

observaron que la eliminación de genes *FgHyd1–5* no afecta significativamente la esporulación, lo que indica que la relevancia de estas proteínas puede variar entre especies.

En conjunto, los resultados obtenidos en *A. sydowii* sugieren que la integración del “cassette” recombinante pudo interferir indirectamente con componentes estructurales o superficiales de la pared celular, afectando la organización del conidióforo y, en consecuencia, la eficiencia reproductiva asexual.

Por analogía, es posible que en las mutantes putativas la inserción haya alterado procesos asociados a la morfogénesis, lo que impacta tanto la formación como la liberación de conidios. La Figura 42 presenta un modelo propuesto que ilustra los posibles cambios estructurales en los conidióforos de las mutantes putativas en comparación con la cepa silvestre.

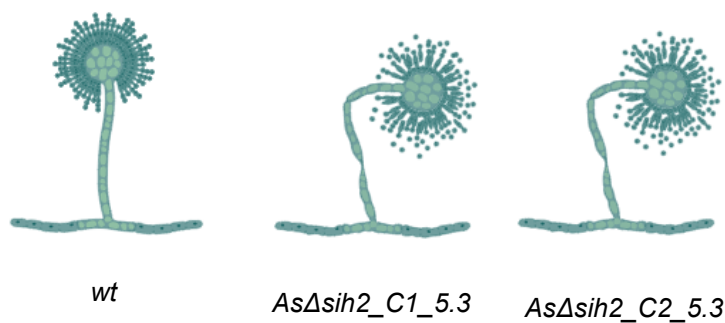


Figura 42. Modelo de las estructuras reproductivas de *A. sydowii wt* y mutantes *AsΔsih2_C1_5.3* y *AsΔsih2_C2_5.3*.

10.- Conclusiones

A. sydowii wt tiene una alta resistencia al estrés de pared celular inducido por RC y Calcofluor, anteriormente no observada en otros hongos del género *Aspergillus*.

Las mutantes putativas *As Δ sih2_C1* y *As Δ sih2_C2* de *A. sydowii* no mostraron sensibilidad al estrés osmótico ni al estrés hipersalino inducido por sorbitol y NaCl, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre.

Las cepas *As Δ sih2_C1* y *As Δ sih2_C2* son menos tolerantes al estrés de pared celular inducido por Rojo Congo, así como una reducción en la producción de conidios al día 8 de cultivo respecto a la cepa silvestre. Una disminución en la producción de micelio aéreo y disminución en la hidrofobicidad del micelio.

11.- Perspectivas

Generar líneas mutantes puras (knockout) del gen *sih2* mediante el sistema CRISPR-Cas9 y, posteriormente, reproducir los experimentos realizados en este proyecto para determinar si los resultados obtenidos coinciden con los fenotipos observados en las cepas *As Δ sih2_C1* y *As Δ sih2_C2*.

Generar mutantes simples, dobles y triples de los genes de hidrofobinas *sih1*, *sih2* y *sih4* de *A. sydowii* mediante el sistema CRISPR-Cas9.

Realizar ensayos de tolerancia a estrés hipersalino, osmótico y de pared celular en mutantes simples, dobles y triples de los genes de hidrofobinas *sih1*, *sih2* y *sih4*, mediante microcultivos y ensayos a partir de la inoculación controlada de esporas, con el fin de evaluar comparativamente el crecimiento y la resistencia fenotípica bajo condiciones de estrés.

Llevar a cabo el análisis de la hidrofobicidad y la evaluación morfológica de conidios e hifas en mutantes simples, dobles y triples de hidrofobinas de *A. sydowii* mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Realizar análisis de RT-qPCR en las cepas mutantes simples, dobles y triples en condiciones de estrés hipersalino y osmótico, para evaluar los niveles de expresión génica y posibles mecanismos de compensación entre hidrofobinas.

12.- Referencias

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

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

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

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

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

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.

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

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.

Ventosa, A., & Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(1), 85-94.

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

Zeng, J., Cao, Y., Xu, Q., Ran, Y., Guo, Y., Jiao, P., ... & Cao, Y. (2025). The sugar transporter AsSTL is regulated by the kinase Hog1 and is involved in glycerol transport and the response to osmotic stress in the salt-tolerant ascomycete *Aspergillus sydowii* H-1. *Fungal Genetics and Biology*, 179, 103986.

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

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>

Larsen, P. I., Sydnese, L. K., Landfald, B., & Strøm, A. R. (1987). Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Archives of microbiology*, 147(1), 1-7.

Lucht, J. M., & Bremer, E. (1994). Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS microbiology reviews*, 14(1), 3-20.

Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., ... & Kunte, H. J. (2011). A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Environmental microbiology*, 13(8), 1973-1994.

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.

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.

Rönsch, H., Krämer, R., & Morbach, S. (2003). Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *Journal of biotechnology*, 104(1-3), 87-97.

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.

Cao, Y., et al. (2025). STL-1 regulates glycerol metabolism through the HOG pathway in *Aspergillus sydowii* under salt stress.

Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 583(24), 4025-4029.

Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., & Saito, H. (2008). Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Molecular and cellular biology*, 28(17), 5172-5183.

Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H. Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., ... & Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO journal*, 26(15), 3521.

Raitt, D. C., Posas, F., & Saito, H. (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *The EMBO journal*, 19(17), 4623-4631. Ramos-Moreno, L.; Ramos, J.; Michán, C. (2019). Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1–13.

Maeda, T., Takekawa, M., & Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269(5223), 554-558.

Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R. P., Nittler, M. P., & Lim, W. A. (2004). Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Molecular cell*, 14(6), 825-832.

Hu, X., et al. (2025). The HOG signaling pathway mediates survival strategies in piezotolerant *Aspergillus sydowii* under high hydrostatic pressure.

Arino, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Fungal ion homeostasis: mechanisms and regulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 478–502.

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., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2016). Adaptation of *Wallemia ichthyophaga* to hypersaline environments. *Fungal Biology Reviews*, 30(1), 1–12.

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

Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in genetics*, 81, 33-82.

Gow, N. A., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology spectrum*, 5(3), 10-1128.

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., BatistaGarcía, R. A., & Sánchez-Carbente, M. D. R. (2020). Stress reshapes the physiological response of halophile fungi to salinity. *Cells (Basel, Switzerland)*, 9(3), 525.

Castrejón Nojerón, L. (2024). *Estandarización de microcultivos de Aspergillus sydowii para la localización de hidrofobinas fusionadas con proteínas fluorescentes*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

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

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.

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>

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

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>

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.

Zhang, S., Xia, Y. X., Kim, B., & Keyhani, N. O. (2011). Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular microbiology*, 80(3), 811-826.

Li, X., Wang, F., Liu, M., & Dong, C. (2021). Hydrophobin CmHYD1 is involved in conidiation, infection and primordium formation, and regulated by GATA transcription factor CmAreA in edible fungus, *Cordyceps militaris*. *Journal of Fungi*, 7(8), 674.

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.

Dubey, M. K., Jensen, D. F., & Karlsson, M. (2014). Hydrophobins are required for conidial hydrophobicity and plant root colonization in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *BMC microbiology*, 14(1), 1-14.

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.

Quarantin, A., Hadel, 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.

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.

Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS ONE*, 10(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>

Chang, P. K. (2023). A simple CRISPR/Cas9 system for efficiently targeting genes of *Aspergillus* section *Flavi* species, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, and *Aspergillus niger*. *Microbiology spectrum*, 11(1), e04648-22.

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.

Pancaldi, S., Poli, F., & Sacchi, G. A. (1984). Effects of Congo red on cell wall synthesis and morphogenesis in filamentous fungi. *Journal of General Microbiology*, 130(9), 2315–2324.

Spence, C. A., Jordan, R. M., & Harris, S. D. (2022). Septation protects hyphae against cell wall stress in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 159, 103661. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2022.103661>

Csillag, K., Emri, T., Rangel, D. E., & Pócsi, I. (2023). pH-dependent effect of Congo Red on the growth of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. *Fungal biology*, 127(7-8), 1180-1186.

Sanchez, O., & Aguirre, J. (1996). Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genetics Reports*, 43(1), 48-51.

Heinekamp, T., Thywißen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2013). *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Frontiers in microbiology*, 3, 440.

Valsecchi, I., Dupres, V., Stephen-Victor, E., Guijarro, J. I., Gibbons, J., Beau, R., ... & Beauvais, A. (2017). Role of hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of fungi*, 4(1), 2.

Hefnawy, M. A. (2001). Effect of osmotic stress on *Aspergillus chevalieri* respiratory system. *Folia microbiologica*, 46(5), 407-412.

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.

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.

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

Kopecká, M., & Gabriel, M. (1992). The influence of Congo red on the cell wall and (1→3)- β -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 158(2), 115–126. <https://doi.org/10.1007/BF00245214>

Wong, S. S. W., Venugopalan, L. P., Beaussart, A., Karnam, A., Mohammed, M. R. S., Jayapal, J. M., ... & Aimananda, V. (2021). Species-specific immunological reactivities depend on the cell-wall organization of the two *Aspergillus*, *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 643312.

Lima, D. M., Costa, T. P., Emri, T., Pócsi, I., Pupin, B., & Rangel, D. E. (2021). Fungal tolerance to Congo red, a cell wall integrity stress, as a promising indicator of ecological niche. *Fungal Biology*, 125(8), 646-657.

Wang, Z., Cui, Y., Fang, J., & Yu, X. (2025). Niche-Specific Osmotic Stress Responses and Regulatory Mechanisms Under Hypo-Osmotic Conditions in *Aspergillus sydowii* Across Hadal Zone Habitats.

Ortiz-Ramírez, J. A., Cuéllar-Cruz, M., & López-Romero, E. (2022). Cell compensatory responses of fungi to damage of the cell wall induced by Calcofluor White and Congo Red with emphasis on *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix globosa*. A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 976924.

Luciano-Rosario, D., Eagan, J. L., Aryal, N., Dominguez, E. G., Hull, C. M., & Keller, N. P. (2022). The hydrophobin gene family confers a fitness trade-off between spore dispersal and host colonization in *Penicillium expansum*. *Mbio*, 13(6), e02754-22.

Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitaš, A. (2011). Genome evolution in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108(10), 3639–3644.

Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 300–372.

Hohmann, S. (2015) 'An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system', *Current Genetics*, 61(3), pp. 373–382. doi: 10.1007/s00294-015-0475-0.

Macindoe, I., Kwan, A. H., Ren, Q., Morris, V. K., Yang, W., Mackay, J. P., & Sunde, M. (2012). Self-assembly of functional, amphipathic amyloid monolayers by the fungal hydrophobin EAS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), E804-E811.

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.

Hansberg, W., Aguirre, J., & colaboradores. (2017). Fungal tolerance to Congo red, a cell wall integrity stress, as a function of ecological niche. *Fungal Biology*.

Liu, Z., Raj, S., Van Rhijn, N., Fraczek, M., Michel, J. P., Sismeiro, O., ... & Latgé, J. P. (2021). Functional genomic and biochemical analysis reveals pleiotropic effect of Congo red on *Aspergillus fumigatus*. *MBio*, 12(3), 10-1128.

Mellado E, García-Rubio R, Cuenca-Estrella M, et al. Species-specific differences in cell wall organization determine differential responses to cell wall–perturbing agents in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:795054. doi:10.3389/fcimb.2021.795054.

Rocha, M. C., Fabri, J. H. T. M., Franco de Godoy, K., Alves de Castro, P., Hori, J. I., Ferreira da Cunha, A., ... Goldman, G. H. (2020). The cell wall integrity pathway contributes to *Aspergillus niger* virulence and stress responses. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1253. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01253>

Rese, M. H., Oakley, C. E., & Oakley, B. R. (2021). Cell wall stress induces premature asexual development through the cell wall integrity pathway in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 115(3), 514–531. <https://doi.org/10.1111/mmi.14631>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 27 de abril del 2026.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: "Estudio de la línea mutante del gen de hidrofobina *sih2* del halófilo *Aspergillus sydowii* en condiciones de estrés". Que presenta el **C. Mario Emiliano Martínez Flores**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección de la DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE (DIRECTORA DE TESIS, CEIB UAEM)

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL (CEIB-UAEM)

DR. EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ (UdeG)

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO (CEIB-UAEM)

DRA. ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA (INIFAP)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2026-05-04 14:11:18 | FIRMANTE

PbmS9eipQ63R+gm581hAjKAYzfVMJ/WLi5kP24RibK7M8mh09jDjSSi2veevNNK3cg+VJNnF4pX14U6p+8urGXyXqQy9i8wEx1C9qmFnptwSztze69MZ5kgO4dFtTamOTLxHuTXdkOTeSd8bo0u4bQ8Wn6NRMACn+PL84sn4KNV8h58jRAHpaFyN+H1o6nGkdK09RI/v2Xt4eSPRSD6G/YBrwZW0pb5wMa2OZ4P8yTf/Bhg8bE+TGRFYwnU2AT2WSR0sj0pmONTYnTO+vyG4EAVAVs+oTsEq6wlzESQiFStWdi/mQbXUCGzVmJeT5jyO8YTOhkiVJ6YvTU4nKZd79w==

EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ | Fecha:2026-05-04 14:52:49 | FIRMANTE

fEKwSDtzSCPT5S0mmLukvHDQ70WPBr9hp4dyOxLf+EHd76j4ByyQhH1qyw7rS5W7Jq+Eez/kndHsyZ6qouZ7jNnJkB/bPgOhPcmBTlx9kX1nXRLueWWWctndxdjjsGC8AiF6Pnwzo3bLh8Jm3RkVPRXf/F0u7leC5YIAZlgV+NYAEgc6plughQU6oaWvySxltzXaWeqfANwYtyslswT/nmZzFJ4Txakt+bMpwdC6MB/JyPimFnKS7XV5dGc4UtMIENhKZSqnNBCCOn+WNXDxDLEQhQjvmlx4JJ5Gh6Q+4WE8R8fch0S7Rt3r/OkzU0GeYylgYl7PIUVt/52sg==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2026-05-04 15:09:12 | FIRMANTE

ckFFoC7oeKX1LWL9ZldoyQM+pvsXVUFFi1RSns2cr+D3aymOR7eO4+WIOBpb0G0RX6jCZMI8WMjWiK71RZsplcUGSnJfEE2dfbLzaxID2qNVtifghWVRno1gNcaRbrklpEiXtKXoDphdyaRb/zQv+djOxRQMjfoDpvYKDzi7hhP52VbFMcqpcCrCQzYlJROW4UdtVYLTmbShOXEGkJtin7ebVYA1eIlBeExtjullI9pVPc77UurtMvr7ss5CgwNPM+iL3O2sAGW1CnOkd+OUG7CvlluV3kOkZInSxpAO8qSLYr2qpF11L5qfT242MnVEuQ8d0Zl9V9YOxcTrM3Sg==

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2026-05-04 17:38:51 | FIRMANTE

AQ6n1fxfl1LSjx6yAt2m9/Jif1NkVRk9XLz2dKaCvxfocyl7OtdBtdSq4RwqHwA+hMfF5KW3ps+aplSITCSAtePcQTEC/7mllo1amBFH2d1qW30smfLcc29fwqDYwHngT+vyid3JoKARKIZiJ5fjMGTFbxdyzCUhbCEhCZARFp7ZohBWf1Z4o4fxqKFkmnl5B2dzE2bkvyhw2xtm0gmUx7luS9+MaE+k4UgO39b440RzPTGclg1tvEfsHhg8rEq2CLfyCkPewAWWd1yloklef26247YAgQ1efoFSeWtXCOD6H8f2rvViGgChOJsMnjU57Eccnr4wRkYg4vdLn3Yg==

ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA | Fecha:2026-05-06 11:33:35 | FIRMANTE

nZxhceBI9xVkaQihLY1yYTsbmXRPV1pcmf4Mcvmo6B4MoMPPQfgmNRYC3BBSp9Qm/L7jYsl9c6xd4RCKKx7Lzs8mmJMd5yivvRmoOukaNOeTBdTSEiArlOmMYgKTXD43kGIIANhVpKhFSg4gVoV9cMCNnEoaOhgDsDJGrg5pqmG81fJefbF8k5qPM/jvnotYvV8+s3XC3sew47lkueo5LpO9edE01ueaewlyl+f7BQEvsCPog2DXEtF6ZTOpGAewZ+uJP2/OKYBjQywwBjCL6dqZKokSAV/9GSu0kg9tscM/i7AN1J4W3gCzRRpqROSjikYOWw1Hp5fhePfmw4qA==

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



WLtHRiFn5

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sUhGmAuupuhOwTVOHAGgVAWeQ3pZ4QA4r>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029