

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

“Complementación funcional del gen *hog1* en una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen *tmk3* del hongo halotolerante *Trichoderma tlahuicanensis*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA.

PRESENTA:

IBt. JOSUÉ REBOLLEDO SALGADO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. El estrés osmótico en microorganismos.....	2
2.2. Estrategias de adaptación bajo estrés osmótico	3
2.3. Acumulación de iones (<i>Salt-in</i>).....	3
2.4. Solutos compatibles (<i>Salt-out</i>)	4
2.5. Vía de HOG y su papel en la adaptación a estrés osmótico.....	6
2.6. Hongos del género <i>Trichoderma</i> como modelo de estudio	7
2.7. Complementación génica como herramienta para el estudio funcional de genes	9
2.8. Biosensores como herramienta dinámica para monitorear los efectos del estrés osmótico.....	10
2.8.1. Biosensores codificados genéticamente	10
2.8.2. Biosensores basados en FRET	11
3. Antecedentes.....	13
4. Justificación	15
5. Hipótesis.....	15
6. Objetivos.....	15
6.1. Objetivo general.....	15
6.2. Objetivos específicos	15
7. Materiales y métodos.....	16
7.1. Materiales	16
7.1.1. Cepas utilizadas	16
7.1.2. Medios de cultivo	16
7.1.3. Antibióticos y aminoácidos.....	16
7.2. Métodos experimentales.....	17
7.2.1. Generación de las líneas complementantes de <i>S. cerevisiae hog1Δ</i> con el gen ortólogo de <i>T. tluhuicanensis</i> y el gen nativo de levadura.	17
7.2.2. Evaluación de la función osmorreguladora de las cepas complementantes en <i>S. cerevisiae hog1Δ</i> mediante inducción con galactosa	19
7.2.3. Evaluación de crecimiento en cultivo líquido mediante cinéticas bajo condiciones de estrés osmótico.....	19
7.2.4. Generación de líneas transgénicas de <i>T. atroviride</i> :pUE10:SED1 y <i>T. tluhuicanensis</i> : pUE10:SED1	20

7.2.5. Análisis de la respuesta del biosensor SED1 en <i>T. atroviride</i> +pUE10:SED1 y <i>T. tlahuicanensis</i> +pUE10:SED1 inducido por choque osmótico	21
8. Resultados.....	22
8.1. Identificación del gen ortólogo de <i>hog1</i> en especies de <i>Trichoderma</i>	22
8.2. Generación de la línea complementante de Hog1 de <i>S. cerevisiae hog1Δ</i> con el ortólogo de <i>T. tlahuicanensis</i>	24
8.3. Generación de las líneas complementantes de Hog1 en <i>S. cerevisiae hog1Δ</i>	29
8.4. Complementación funcional de la vía HOG en cepas <i>hog1Δ</i> bajo estrés osmótico.....	30
8.5. Análisis comparativo de la respuesta osmótica de las cepas WT, <i>hog1Δ</i> y complementantes mediante ensayos de crecimiento en placa y cinéticas en cultivo líquido..	33
8.6. Generación de la línea transformada <i>T. atroviride</i> y <i>T. tlahuicanensis</i> para la expresión del biosensor SED1.....	41
9. Discusión	47
10. Conclusión.....	51
11. Perspectivas.....	51
12. Anexos.	52
1. Preparación de células químicamente competentes de <i>E. coli</i> . Sambrook, J., & Russell, D. W., 2001.....	52
2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> por el método de acetato de litio. Gietz & Schiestl, 2007.	52
3. Purificación de DNA plasmídico mediante lisis alcalina con SDS. Sambrook, J., & Russell, D. W., 2001.	53
4. Condiciones de amplificación, digestiones enzimáticas y ligación.	54
5. Transformación por electroporación de conidias. (Sánchez & Aguirre, 1996).....	57
6. Transformación de <i>Trichoderma</i> por el método de protoplastos. Balcázar-López, 2014.....	58
7. Microcultivos. Anajared-Castrejon, 2023.	59
8. Alineamiento del resultado de secuenciación de TtTmk3 vs TtTmk3 predicho en AUGUSTUS	60
9. Análisis de varianza multifactorial para datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento en medio líquido	61
13. Referencias	64

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas las personas e instituciones que contribuyeron, de manera directa e indirecta, al desarrollo y culminación de este trabajo.

Expreso mi sincero agradecimiento al CEIB y al programa de posgrado por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica y profesional, así como por proporcionar el entorno y las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto.

Asimismo, agradezco a mis compañeros, profesores y colaboradores del CEIB por compartir sus conocimientos, experiencia y apoyo a lo largo de esta etapa. Su disposición y acompañamiento fueron fundamentales tanto para el desarrollo de este trabajo como para mi crecimiento personal y profesional.

Por último, agradezco al SECIHTI (antes Conahcyt) por la beca otorgada para llevar a cabo este trabajo.

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Contó con el financiamiento del proyecto CONACyT No. 252952 Fronteras de la Ciencia en Modalidad de Grupo “Desarrollo de biosensores fluorescentes codificados genéticamente para estudiar la regulación ambiental de la biología celular”.

1. Introducción

La adaptación celular a condiciones adversas es fundamental para la supervivencia de los organismos, especialmente en ambientes fluctuantes como en aquellos que tienen condiciones fisicoquímicas fuera de las estándar o conocidos como ambientes extremos, en los que organismos como bacterias, levaduras, hongos filamentosos entre otros, deben enfrentar variaciones constantes de temperatura, pH u osmolaridad. La vía HOG (por sus siglas en inglés, High-Osmolarity Glycerol) es una de las rutas de señalización mejor caracterizadas en eucariotas para responder al estrés osmótico, particularmente en *Saccharomyces cerevisiae*, donde la proteína quinasa Hog1 juega un papel central en la transducción de señales tras una variación en las condiciones osmóticas. Sin embargo, en distintas especies de hongos filamentosos como *Trichoderma*, los componentes de la vía HOG y la dinámica de esta no han sido profundamente caracterizados.

El estudio de ortólogos involucrados en la respuesta al estrés osmótico tiene una relevancia directa en la industria biotecnológica, ya que estos son relevantes en la regulación de procesos clave en la producción de metabolitos en la industria. En *Yarrowia lipolytica*, el ortólogo yHog1 desempeña un papel esencial en la respuesta al estrés hiperosmótico y en la producción de eritritol, un poliol de interés comercial, donde su activación es fundamental tanto en la tolerancia celular, como para la síntesis eficiente del metabolito. La delección del gen reduce significativamente la resistencia al estrés y la producción de eritritol (Rzechonek *et al.*, 2018). De manera similar, en *S. cerevisiae*, se ha demostrado que la delección de *hog1* afecta la capacidad de la célula para tolerar la presión osmótica generada durante fermentaciones con alta concentración de glucosa, impactando directamente el desempeño del proceso, sin embargo, esta modificación también puede alterar el metabolismo y mejorar la producción de etanol bajo ciertas condiciones, evidenciando el potencial de esta vía y el gran interés de estudio para ingeniería metabólica en aplicaciones industriales (Vikromvarasiri *et al.*, 2025). En conjunto, estos estudios demuestran que la caracterización de ortólogos de *hog1* no sólo permite entender la adaptación osmótica, sino que también es clave para optimizar microorganismos utilizados en procesos biotecnológicos.

Este proyecto tiene como objetivo evaluar la complementación funcional del gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* en una cepa mutante *hog1Δ* de *S. cerevisiae* bajo condiciones de estrés osmótico, con el fin de determinar su capacidad para restaurar la respuesta osmoadaptativa de *S. cerevisiae*. Para ello, se emplea una estrategia basada en la expresión del gen *tmk3* en la levadura, lo que permite analizar su funcionalidad en este contexto. De manera complementaria, se plantea explorar el uso de un biosensor genéticamente codificado basado en FRET como una nueva herramienta para el estudio de la respuesta osmótica en hongos, permitiendo evaluar en tiempo real los cambios

celulares asociados a la osmolaridad. En conjunto, estos enfoques buscan no solo validar la conservación funcional de *tmk3*, sino también establecer una herramienta que permita analizar los cambios dinámicos que ocurren en la adaptación osmótica en hongos filamentosos.

2. Marco teórico

2.1. El estrés osmótico en microorganismos

La osmolaridad es una condición fluctuante en el ambiente, lo que puede condicionar el desarrollo de los organismos, por lo que las células han generado mecanismos para regular y mantener el equilibrio iónico intracelular, a través de cambios en el metabolismo celular. Los mecanismos están ajustados a la osmolaridad y la composición iónica del entorno externo, por lo que, un cambio en la osmolaridad externa genera un estrés osmótico, afectando la concentración de macromoléculas, la velocidad de reacciones bioquímicas y la función celular (Kultz, 2000).

El estrés osmótico se da por diferentes condiciones fisicoquímicas como la salinidad, la sequía y el déficit hídrico, lo que conduce a respuestas celulares destinadas a mantener el equilibrio osmótico y la adaptación a condiciones ambientales desafiantes (Penna *et al.*, 2021). Este estrés lleva a la pérdida de agua por la condición hiperosmótica lo que disminuye la turgencia de la membrana a niveles fisiológicamente críticos. Por otro lado, la entrada excesiva de agua en condiciones hipoosmóticas pone en peligro la integridad celular debido al aumento de la turgencia. Ambos escenarios afectan la capacidad celular para llevar a cabo funciones bioquímicas esenciales, lo que hace necesario un control preciso de la entrada y salida de agua para regular la turgencia de la membrana (Bremer & Krämer, 2019).

Además, los microorganismos detectan, responden y se adaptan a otro tipo de estrés osmótico como el cambio en la actividad de agua en su entorno. La disminución del agua libre disponible en el espacio extracelular genera un gradiente osmótico que ocasiona la salida de agua intracelular (Hohmann, 2015). Esto disminuye el volumen celular lo cual provoca una ralentización en diferentes procesos celulares como la alteración de la estructura del citoesqueleto, la inducción de la remodelación de la cromatina y la detención del ciclo celular (Miermont *et al.*, 2013). Por esto, el equilibrio en la actividad del agua es un requisito crítico para que se lleven a cabo una amplia gama de funciones celulares (Strange, 2004)

Dado que ningún microorganismo tiene la capacidad de bombear activamente agua dentro o fuera del citoplasma para compensar los flujos de agua a través de la membrana a causa del estrés osmótico, el ajuste celular debe basarse en medidas o adaptaciones fisiológicas que permitan a la célula dirigir y escalar la entrada de agua a medida que

fluctúa la osmolaridad ambiental, para esto los microorganismos han adaptado diversas estrategias según las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan (Wood, 2011).

2.2. Estrategias de adaptación bajo estrés osmótico

La respuesta al estrés en las células se inicia cuando estas perciben señales externas o internas en su entorno, a través de receptores de membrana o sensores intracelulares que detectan cambios como daño térmico, estrés oxidativo o alteraciones en la pared celular. Estas señales desencadenan cascadas de señalización, incluyendo procesos de fosforilación y activación de factores reguladores, que conducen a la expresión de genes asociados a la adaptación celular (Dawan & Ahn, 2022). Estos mecanismos son ampliamente conservados en microorganismos como hongos, levaduras y bacterias, donde los receptores transmembranales desempeñan un papel clave al iniciar rutas de señalización que permiten a la célula responder y adaptarse eficientemente a condiciones de estrés (Branco et al., 2022)

Entre los diversos tipos de estrés, uno de los más desafiantes es el estrés salino. Algunos microorganismos como los halófilos y halotolerantes han desarrollado mecanismos especializados para prosperar bajo este tipo de condiciones. Estas adaptaciones les permiten excluir activamente los iones tóxicos (como el Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{2+} , Cl^- , Li^+ , entre otros) y evitar el flujo de agua del citoplasma al exterior para mantener la estabilidad de los procesos bioquímicos dentro de las células (Zajc *et al.*, 2014). Dentro de estas adaptaciones, destacan principalmente dos estrategias que permiten a las células mantener su viabilidad bajo estrés salino. Acumulación de iones (Salt-in) o acumulación de solutos compatibles (Salt-out) (Plemenitaš *et al.*, 2014).

2.3. Acumulación de iones (Salt-in)

La estrategia de adaptación salt-in principalmente utilizada por arqueas, implica la acumulación intracelular de altas concentraciones de sales inorgánicas, principalmente K^+ y Cl^- (Figura 1), para equilibrar la presión osmótica con respecto al medio externo. y equilibrar las concentraciones con el Na^+ extracelular lo que les permite vivir en ambientes hipersalinos (Gunde-Cimerman *et al.* 2018). Esta adaptación ha permitido la proliferación de microorganismos en ambientes hipersalinos, como *Halobacterium salinarum* y *Haloarcula marismortui*, dos organismos modelo en el estudio de la adaptación salina. En ambos se ha observado que los proteomas son altamente ácidos, optimizados para funcionar bajo condiciones de salinidad extrema, así como sistemas robustos de bombas de flujo iónico que contribuyen al mantenimiento del equilibrio osmótico (Eichler, 2023; Thombre *et al.*, 2016).

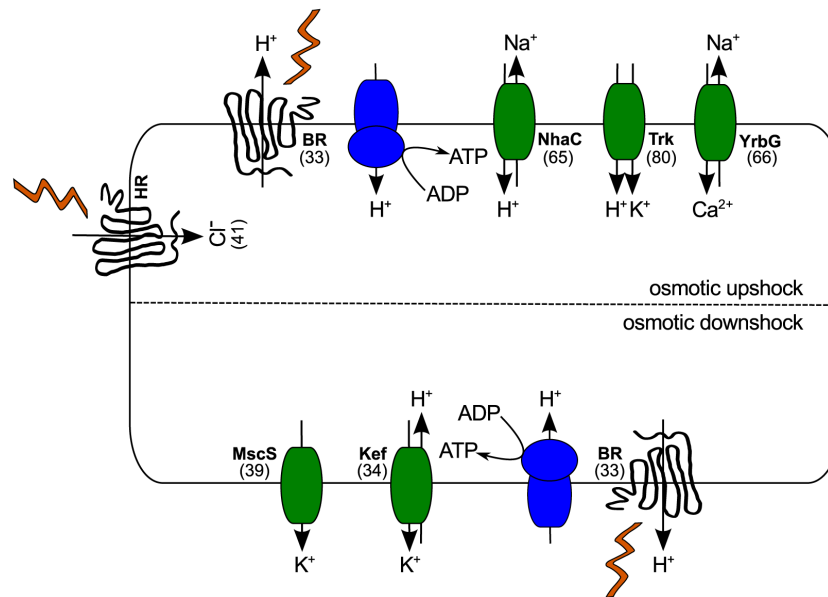


Figura 1: Modelo generalizado de osmoadaptación en haloarqueas que utilizan la estrategia salt-in. Durante un choque hiperosmótico (osmotic upshock), el potasio es importado a través de los transportadores de membrana tipo simporte TrK H^+/K^+ , y el sodio es expulsado utilizando una combinación del transportador tipo antiporte NhaC H^+/Na^+ y/o antiporte YrbG Ca^{2+}/Na^+ . Durante una disminución repentina de la osmolaridad (osmotic downshock), el exceso de potasio se elimina mediante una combinación de antiportes Kef H^+/K^+ y el canal MscS. Modificado de Becker *et al.*, 2014

2.4. Solutos compatibles (Salt-out)

En eucariotas, particularmente en *S. cerevisiae*, también se han reportado diferentes transportadores para la exclusión de iones Na^+ como el simportador de fosfato inorgánico, las Ena Na^+ -ATPasas y el portador Nha1 Na^+/H^+ , y Trk1 y Trk2 para absorción de K^+ (Arino *et al.*, 2010). Aunque es bien conocido que la estrategia principal en organismos eucariotas es la acumulación de moléculas orgánicas como solutos compatibles (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

La acumulación de solutos compatibles es una estrategia que utilizan los organismos para compensar la pérdida de agua. Estos se consideran compatibles debido a que son inertes respecto a los procesos que llevan a cabo las células, además de su función para remplazar el agua y/o revertir el gradiente osmótico y conducir el agua de regreso al interior de las células (Hohmann, 2015). Los solutos compatibles también pueden proteger a las proteínas y organelos intracelulares contra los efectos inhibidores provocados por el cambio de la fuerza iónica intracelular y la disponibilidad de agua (Welsh, 2000)

Los solutos compatibles pueden ser sintetizados por la célula o transportados al interior desde el medio de crecimiento por diversos transportadores de membrana. Estos se

dividen en tres categorías químicas generales: (i) solutos zwitteriónicos, son moléculas derivadas de aminoácidos que poseen simultáneamente cargas positivas y negativas en distintos grupos funcionales pero que en conjunto son de carga neutra. Entre este tipo de solutos se encuentran la betaína, ectoína e hidroxiectoína, entre otros. (ii) solutos no cargados, estos son moléculas que carecen de cargas formales como la trehalosa, sacarosa, glicerol, entre otros. (iii) solutos aniónicos, son aquellas moléculas que poseen carga negativa como el β -glutamato, β -hidroxibutirato y derivados, entre otros (Roberts, 2005).

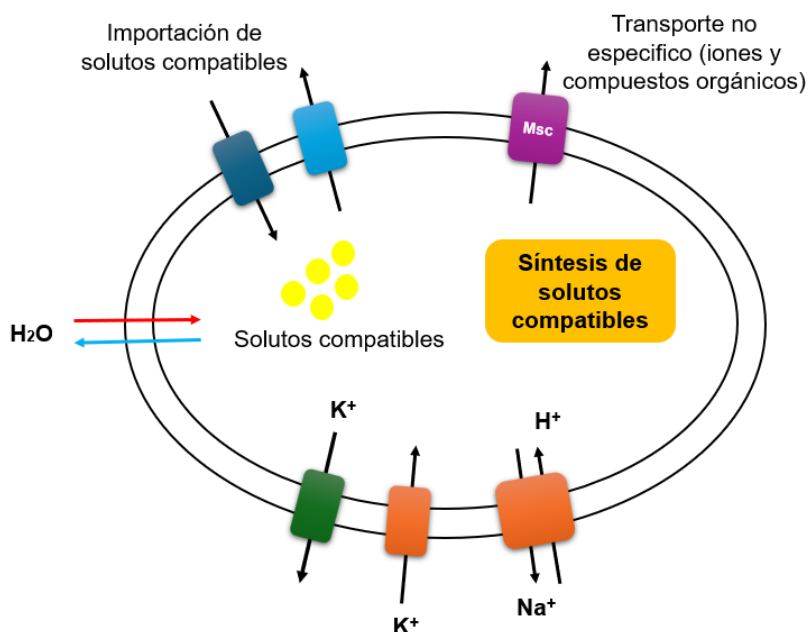


Figura 2: Estrategia de salt-out en respuesta al estrés osmótico agudo. La fase inicial implica la importación celular de potasio (K^+). Posteriormente, en la segunda fase, se produce la importación o síntesis de *novo* de solutos compatibles, acompañada de la exclusión de sodio (Na^+) y potasio (K^+) del citoplasma. Las células también poseen sistemas de eflujo para solutos compatibles y canales mecanosensibles (Msc) que actúan como válvulas de seguridad para la liberación rápida de iones y solutos orgánicos ante choques osmóticos descendentes repentinos. Modificado de Bonnaud *et al.*, 2024

Los solutos compatibles varían según el tipo de organismo. En bacterias, se encuentran principalmente sacarosa, trehalosa, ectoína, glicina y glutamato; en actinomicetos, ectoína, trehalosa y prolina; en levaduras, glicerol, arabitól y trehalosa; y en hongos, predomina el glicerol (Welsh, 2000; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

La acumulación y síntesis de glicerol está controlada principalmente por la vía de HOG, una vía de señalización de proteínas MAP quinasas (MAPK) utilizada por los eucariotas para transmitir señales como consecuencia de un estrés osmótico (Zi *et al.*, 2010).

2.5. Vía de HOG y su papel en la adaptación a estrés osmótico

La vía HOG es una de las rutas de señalización mejor estudiadas y caracterizadas en organismos eucariotas. Esta vía está mediada por una cascada de MAP quinasas (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK), las cuales son unidades de señalización conservadas evolutivamente que participan en diversas vías de transducción de señales intracelulares. Cada cascada de MAPK está compuesta por tres quinasas que se activan de forma secuencial mediante fosforilaciones sucesivas (Che et al., 2001).

En la vía HOG, la quinasa principal es Hog1, una proteína descubierta en levaduras que regula la respuesta adaptativa al estrés osmótico. Esta quinasa ha sido identificada como un componente central de las vías SAPK (Stress-Activated Protein Kinase), un conjunto de proteínas involucradas en la detección y respuesta a cambios ambientales potencialmente dañinos para las células (Brewster & Gustin, 2014).

La activación de la vía de HOG ocurre a través de dos ramas de señalización distintas, denominadas Sln1 y Sho1. El módulo inicial en ambas ramas está compuesto por una MAP quinasa-quinasa-quinasa (MAPKKK), esta se activa por fosforilación de una quinasa río arriba o por unión de una proteína activadora. La rama Sln1 activa las dos MAPKKK redundantes Ssk2 y Ssk22, mientras que la rama Sho1 activa a Ste11. Ambas ramas convergen en una quinasa común, Pbs2 (MAPKK), que es el activador específico de Hog1 (MAPK) (Saito & Posas, 2012).

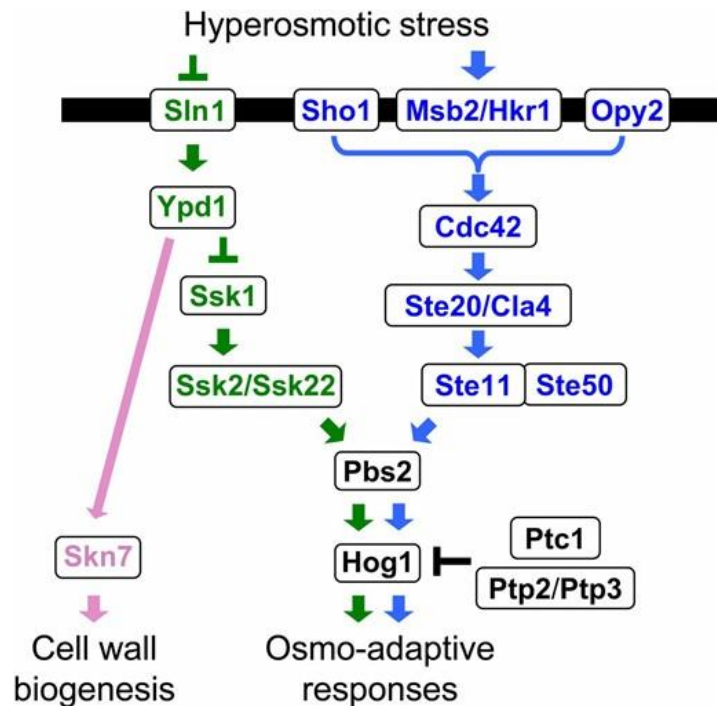


Figura 3: Diagrama esquemático de la vía HOG en *S. cerevisiae*. Los nombres de las proteínas funcionalmente redundantes están separados por un /. La barra horizontal negra representa la

membrana plasmática. Las flechas indican activación, mientras que las barras en forma de T representan inhibición. Tomado de Saito & Posas, 2012.

Ante un choque osmótico, Hog1 se activa y se transloca al núcleo, donde regula la expresión de genes osmoresponsivos, ya sea directamente o mediante factores de transcripción como Msn2/4, Hot1, Smp1 y Sko1 (Bai *et al.*, 2015). Una respuesta clave mediada por Hog1 es la acumulación de glicerol, que implica la inducción de genes como *GPD1/GPD2* (codifican glicerol-3-fosfato deshidrogenasas), *GPH1* (glucógeno fosforilasa) y *TDH1* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isoenzima 1), todos ellos involucrados en el metabolismo de azúcares. En condiciones de baja glucosa, las levaduras canalizan estos azúcares hacia la vía HOG, lo que les permite hacer frente a la elevada osmolaridad (Shen *et al.*, 2022).

Además de inducir la transcripción, Hog1 regula otros procesos moleculares como la remodelación de la cromatina, el reclutamiento de la RNA polimerasa II, así como la elongación y exportación nuclear del RNAm. Asimismo, durante el estrés osmótico, Hog1 fosforila diversas proteínas citoplasmáticas, entre ellas canales de hierro, la aquaglicerolporina Fps1, la quinasa Rck2 y otras proteínas involucradas en múltiples funciones celulares (Yaakoub *et al.*, 2022).

La vía de HOG también puede activarse por tensiones no osmóticas tales como el estrés por frío, estrés por calor, hipoxia, ácido acético, pH bajo, entre otros. En estos casos, la activación de Hog1 suele ser moderada y con una cinética de fosforilación distinta, y generalmente, solo una de las dos ramas está implicada en la activación (Saito & Posas, 2012). Este tipo de regulación ha sido ampliamente descrito en *S. cerevisiae* y en levaduras halófilas como *Hortaea werneckii* (Gostinčar *et al.*, 2011; Lenassi *et al.*, 2013) y *Debaryomyces hansenii* (Sánchez *et al.*, 2020), así como en hongos filamentosos modelo como *Aspergillus nidulans* (Lara-Rojas *et al.*, 2011) y *Aspergillus fumigatus* (Furukawa *et al.*, 2005), donde Hog1 participa en la respuesta a diversos tipos de estrés ambiental más allá de la osmoadaptación. Sin embargo, aún es limitado el conocimiento sobre la regulación de Hog1 en otros hongos, particularmente en aquellos con relevancia agrícola.

2.6. Hongos del género *Trichoderma* como modelo de estudio

Dentro del género *Trichoderma* se ubican hongos saprófitos de amplia distribución geográfica que frecuentemente establecen relaciones endofíticas con plantas leñosas. Este género alberga una notable diversidad de especies que poseen un elevado potencial biotecnológico. Específicamente, se han empleado especies como *T. harzianum*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. gamsii*, *T. asperelloides* y *T. atroviride* aplicaciones que abarcan la producción de enzimas hidrolíticas, las cuales descomponen carbohidratos tales como celulosa, hemicelulosas y quitina, en la producción de enzimas para la industria de la pulpa y el papel, en la producción de fitohormonas para estimular

el crecimiento de las plantas y algunos antibacterianos, además de tener la capacidad de ser agentes de control biológico frente a organismos fitopatógenos (Jaklitsch, 2009).

Diversas cepas de *Trichoderma* spp. establecen interacciones simbióticas con plantas, desencadenando una serie de respuestas beneficiosas. Estas respuestas incluyen la estimulación de los mecanismos de defensa de las plantas, la promoción del desarrollo radicular, el estímulo del crecimiento vegetal, la activación de la germinación de semillas, la mejora en la disponibilidad y absorción de nutrientes, y la resistencia mejorada frente a condiciones de estrés abiótico, entre otros efectos positivos (Nicolás *et al.*, 2014).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* han sido aisladas como saprofitos del suelo, aunque también se han reportado algunas especies que se encuentran como endófitos en plantas o provenientes de ecosistemas acuáticos. Tradicionalmente, la identificación de estas especies se realizaba mediante estudios morfológicos; sin embargo, debido a la alta similitud entre ellas, se ha recurrido al análisis de secuencias de DNA como un método más rápido y preciso para su identificación (Zheng *et al.*, 2021).

Trichoderma atroviride es un micoparásito necrotrófico que antagoniza y se alimenta de una amplia gama de fitopatógenos fúngicos, además es una de las especies que actúa beneficiosamente sobre las plantas al mejorar el crecimiento de raíces y brotes e inducir resistencia sistémica (Speckbacher *et al.*, 2020). En estudios recientes, se ha reportado que *Trichoderma* induce tolerancia contra el estrés abiótico provocado por factores como la salinidad, la sequía, la acumulación de metales pesados y temperaturas extremas, además de mejorar el crecimiento en diferentes cultivos como el de rábano, pepino, calabaza, entre otros. Estas acciones benéficas para las plantas se dan debido a los compuestos que producen estas especies como las auxinas, giberelinas, enzimas vegetales, antioxidantes y fenoles (Hidangmayum & Dwivedi, 2018).

Algunos efectos que brindan los hongos a las plantas que habitan en suelos con alto contenido de sales es mejorar la capacidad para modular la expresión génica de la planta huésped para modificar su fenotipo con el fin de mejorar la tolerancia a la salinidad del suelo. Un ejemplo de esto es la expresión de las proteínas NHX, involucradas en el mantenimiento de la turgencia celular a través del control del equilibrio iónico (Otlewska *et al.*, 2020).

En diversos estudios se ha reportado el uso de cepas de *Trichoderma* para mitigar los efectos de la salinidad en plantas. Por ejemplo, se ha demostrado que *T. atroviride* puede contrarrestar los efectos adversos del estrés salino y promover el crecimiento, particularmente a nivel radicular, en cultivos como pepino, donde se ha observado un incremento en biomasa y una disminución en la severidad de enfermedades bajo condiciones de NaCl (Zhang *et al.*, 2022). De manera similar, otras especies del género han mostrado la capacidad de mejorar la tolerancia al estrés salino mediante la activación de sistemas antioxidantes, la regulación del balance osmótico y la modulación de

respuestas fisiológicas en plantas (Santoyo *et al.*, 2024). A nivel molecular, estos efectos han sido asociados con la participación de rutas de señalización conservadas como la vía HOG. En especies como *T. atroviride* y *T. reesei*, el estudio de ortólogos de Hog1, como Tmk3, mediante la generación de mutantes knockout del gen y análisis de expresión génica, ha permitido evidenciar su papel en la respuesta a estrés osmótico, oxidativo y otros estímulos ambientales, así como en procesos de desarrollo y adaptación (Schmoll *et al.*, 2010; Druzhinina *et al.*, 2011). Asimismo, el uso de herramientas como análisis transcriptómicos y evaluación de la activación de MAP quinasas ha sido clave para dilucidar la regulación de estas rutas en *Trichoderma* (Li *et al.*, 2021; Atanasova *et al.*, 2023). No obstante, a pesar de estos avances, resulta necesario complementar estos enfoques mediante estrategias como la complementación génica en sistemas modelo, que permitan evaluar directamente la conservación, funcionalidad y eficiencia de estos ortólogos en la respuesta al estrés osmótico, dada la relevancia agrícola de este género de hongos (Harman *et al.*, 2004; Bischof *et al.*, 2016).

2.7. Complementación génica como herramienta para el estudio funcional de genes

Para estudiar los genes y su función celular se emplean diversos enfoques, entre ellos los análisis genéticos, genómicos y bioquímicos. Uno de los métodos más valiosos para el análisis funcional de genes dentro de una vía de señalización y respuesta a un tipo específico de estrés es la complementación genética. Este enfoque permite restaurar un fenotipo normal o idéntico al de un organismo no modificado, en mutantes que carecen de un gen específico (Hughes, 2013).

Esta herramienta ha demostrado ser valiosa para identificar elementos putativos en diversos organismos asociados con la vía de señalización HOG en *Saccharomyces cerevisiae*. Si bien su aplicación presenta ciertas limitaciones debido a la menor complejidad genética de la levadura. Muchos de los principios básicos que rigen la regulación génica como la remodelación de la cromatina, se encuentran altamente conservados entre levaduras y organismos eucariotas superiores. Esto abre la posibilidad de una complementación funcional efectiva incluso en procesos de regulación transcripcional bajo condiciones de estrés (Mehlmer *et al.*, 2009).

Este enfoque ha permitido aislar y caracterizar funcionalmente al homólogo de Hog1 de la levadura en diversos organismos, como el endófito radicular *Piriformospora indica* (Jogawat *et al.*, 2016), la levadura *Debaryomyces hansenii* (Sánchez *et al.*, 2020), la levadura dimorfa *Yarrowia lipolytica* (Rzechonek *et al.*, 2023), *Cryptococcus neoformans* (Bahn *et al.*, 2005), entre otros. Además, ha sido útil para identificar el papel y la importancia de otros genes pertenecientes a la misma cascada de señalización en especies como *Wallemia ichthyophaga* (Konte *et al.*, 2016) y *Kluyveromyces lactis*

(Velázquez-Zavala *et al.*, 2016), entre otros. La caracterización de estas complementantes se realiza mediante análisis bioquímicos y moleculares que incluyen la cuantificación de solutos compatibles, la evaluación de la fosforilación de Hog1, así como la inducción de genes blanco asociados a la respuesta osmótica (de Nadal *et al.*, 2022; Babazadeh *et al.*, 2014). Sin embargo, estos enfoques suelen limitarse a mediciones en puntos finales o estados estacionarios, por lo que se requiere implementar estrategias que permitan monitorear cambios en tiempo real de forma no invasiva para detectar eventos dinámicos tempranos, como el ajuste osmótico inicial, que ocurre en las primeras etapas de la respuesta al estrés osmótico (Zi *et al.*, 2010; Miermont *et al.*, 2011).

2.8. Biosensores como herramienta dinámica para monitorear los efectos del estrés osmótico

Los biosensores se describen como moléculas o células con la capacidad de identificar y registrar la presencia de analitos o fenómenos en sistemas biológicos en su entorno circundante. Se han reportado diversos tipos de biosensores aplicados a diferentes campos como el militar, de atención médica, el monitoreo ambiental, el control de calidad en la industria alimentaria y la microbiología (Banerjee *et al.*, 2021).

Además, esta tecnología permite la cuantificación en tiempo real de los cambios locales de iones, señales intermedias y metabolitos en organismos vivos. Los componentes fundamentales que componen un biosensor convencional constan de un bioreceptor, que se define como una molécula de reconocimiento específico para el analito de interés, un elemento transductor encargado de la conversión de una forma de energía en una señal medible, y un sistema de visualización que permite la interpretación de las señales resultantes en términos numéricos o gráficos (Sakiko *et al.*, 2012). Existen diversos tipos de biosensores, como los biosensores térmicos o calorimétricos, los biosensores piezoeléctricos, y los biosensores ópticos, en donde se encuentran los biosensores basados en FRET (Mehrotra, 2016).

2.8.1. Biosensores codificados genéticamente

Un tipo de biosensor óptico son los biosensores fluorescentes codificados genéticamente (GEFB, por sus siglas en inglés), estos se definen como proteínas quiméricas que pueden expresarse intracelularmente y están diseñados para monitorear la transducción de señales. Para los biosensores fluorescentes esto significa convertir las diversas actividades de señalización (como la concentración de mensajeros intracelulares, presencia de compuestos metabólicos y otros analitos, cambios conformacionales y/o de actividad de las proteínas de señalización) en una o varias señales fluorescentes (Greenwald *et al.*, 2018).

La fluorescencia es un proceso químico de dos etapas que implica la absorción de luz con longitud de onda corta por un fluoróforo químico como una proteína o un carotenoide (excitación), seguida de la liberación de parte de la energía absorbida como luz en una longitud de onda más larga (emisión). En la mayoría de los ejemplos que se han reportado los objetos se excitan con luz azul o azul/verde, lo que da lugar a una fluorescencia verde, amarilla o roja (Marshall & Johnsen, 2017).

Los biosensores permiten la visualización directa de la actividad de las moléculas de señalización dentro del contexto celular nativo. Por lo general, los biosensores fluorescentes codificados genéticamente constan de dos componentes esenciales: una unidad de biodetección y una unidad informativa. La unidad de detección es responsable de detectar los cambios en eventos biológicos objetivo o de interés, mientras que la unidad informativa es responsable de convertir estos cambios en señales medibles. Las unidades de detección que se utilizan comúnmente son derivadas de proteínas endógenas o secuencias peptídicas sensibles a un evento biológico como por ejemplo la fosforilación. La unidad informativa consta de una o más proteínas fluorescentes (FP, por sus siglas en inglés) o luciferasas configuradas para traducir cambios inducidos por señalización en la unidad de detección en uno o varios tipos de señales cuantificables como intensidad de fluorescencia, intensidad de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), intensidad de la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) (Zhou *et al.*, 2020).

2.8.2. Biosensores basados en FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es un proceso físico dependiente de la distancia, en el que la energía se transfiere de forma no radiativa por un fluoróforo o por una molécula excitada (donante) a otro fluoróforo (aceptor) mediante un acoplamiento intermolecular dipolo-dipolo (Hochreiter *et al.*, 2015). La ventaja que ofrecen los biosensores FRET sobre otro tipo de biosensores es que la biodetección se realiza ópticamente lo que permite un análisis en células vivas de forma no destructiva y poco invasiva.

Los biosensores basados en FRET se han clasificado de acuerdo con dos criterios que se enlistan a continuación.

1. Biosensores FRET de tipo intramolecular: en los fluoróforos donantes y aceptores están unidos a la misma molécula por lo que los cambios conformacionales en la molécula inducen cambios FRET.
2. Biosensores FRET de tipo intermolecular: en el que los fluoróforos donantes y aceptores se fusionan con diferentes moléculas y los cambios FRET ocurren cuando las moléculas independientes se acercan mucho (Figura 4).

En los biosensores fluorescentes basados en FRET la clave es la elección de los pares de fluoróforos o proteínas fluorescentes (aceptor y donante) para obtener un rendimiento óptimo en células vivas (Bajar *et al.*, 2016).

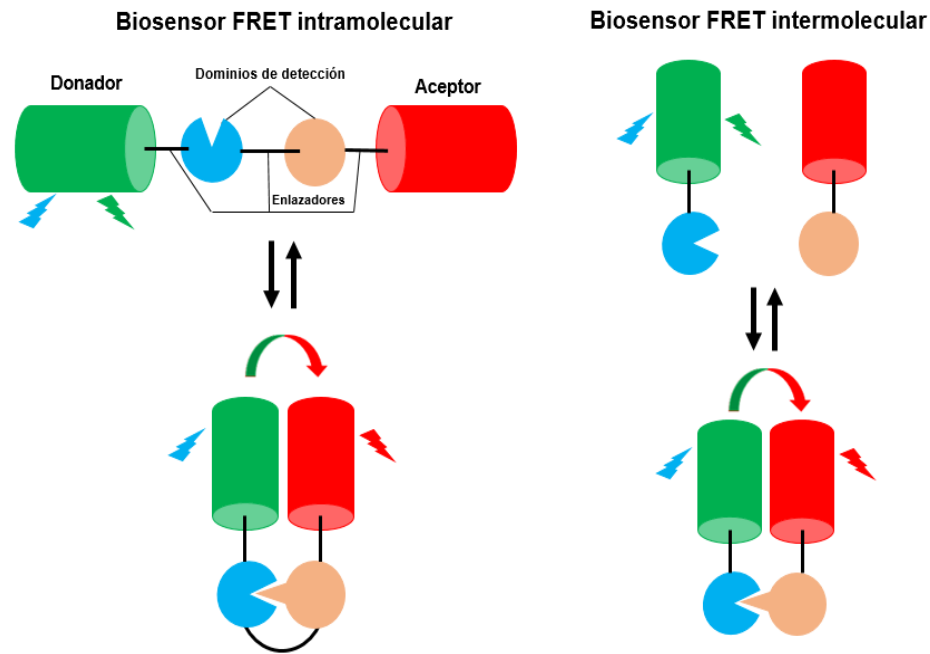


Figura 4: Esquema de los tipos de biosensores basados en FRET. Los biosensores intramoleculares contienen un fluoróforo donador y uno aceptor unidos en una misma proteína mediante dominios sensoriales y secuencias enlazadoras, donde cambios conformacionales modifican la eficiencia de transferencia de energía. En los biosensores intermoleculares, la señal FRET depende de la interacción entre moléculas independientes que aproximan ambos fluoróforos. Modificada de Bajar *et al.*, 2016

3. Antecedentes

El laboratorio de Biología Molecular de Hongos está interesado en aislar cepas de hongos que crecen en ambientes extremos. Previamente se evaluó la tolerancia de *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma tlahuicanensis* (una nueva especie de *Trichoderma*, aislada a partir de una milpa en el Estado de Morelos), frente a estrés osmótico inducido por NaCl y sorbitol, (Rebolledo-Salgado, 2022; Iza-Arteaga *et al.*, 2025). Los resultados indican que *T. atroviride* es más sensible a estos agentes osmóticos a partir de una concentración de 1 M, en comparación con *T. tlahuicanensis*, lo que sugiere que esta cepa se ha adaptado mejor al estrés osmótico. Estas diferencias apuntan a la posible participación de mecanismos moleculares asociados a la respuesta osmótica, entre ellos la vía de HOG, en la cual la proteína Tmk3, homóloga de Hog1, desempeña un papel relevante. Por ello, resulta de gran interés investigar si el gen *tmk3* puede complementar a la cepa de *S. cerevisiae hog1Δ* y si esta le confiere mayor tolerancia osmótica, como se ha demostrado en otros hongos halófilos, como *W. ichthyophaga*, donde uno de los ortólogos de Hog1 restaura la función en mutantes de levadura y aumenta la tolerancia a altas concentraciones de sal (Konte & Plemenitas, 2013).

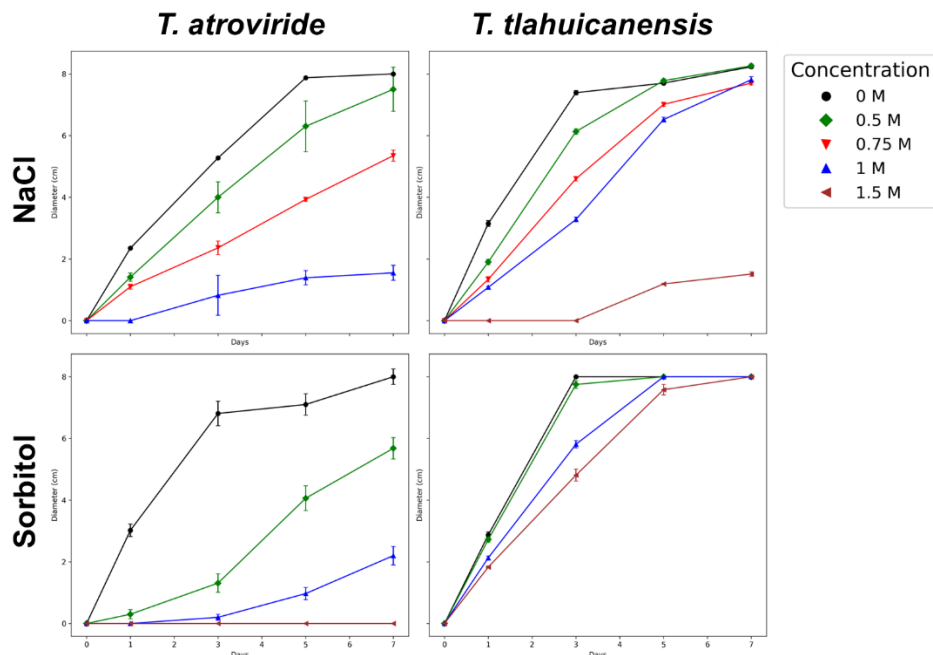


Figura 5: Cinética de crecimiento de *T. atroviride* y *T. tlahuicanensis* en medio sólido con diferentes concentraciones de NaCl o sorbitol.

De manera complementaria, el desarrollo de herramientas moleculares que permiten monitorear en tiempo real la respuesta celular al estrés osmótico contribuye a una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en este proceso. En 2021, Cuevas-Velázquez y colaboradores desarrollaron al biosensor SED1 (sensor que expresa a la proteína desordenada), basado en FRET, con el fin de monitorear los efectos del estrés osmótico en células vivas. Este utiliza a la proteína AtLEA4-5 como dominio de detección, la cual pertenece al grupo de proteínas abundantes de embriogénesis tardía (LEA) de *Arabidopsis thaliana*, las que generalmente tienen una estructura desordenada

En respuesta a la alta osmolaridad celular, AtLEA4-5 forma estructuras α -hélice en su extremo N-terminal, mientras que el extremo C-terminal permanece desordenado, la cual está flanqueada por las proteínas fluorescentes mCerulean3 (donador) y Citrine (aceptor) para generar un biosensor basado en FRET. Para probar la eficacia de este, se indujo el incremento en el hacinamiento macromolecular intracelular utilizando diversas soluciones químicas *in vivo*, lo que resultó en la compactación de la proteína LEA. Además, se evaluó la respuesta del biosensor en cepas mutantes de Hog1 y Pbs2 (componentes de la vía de HOG) de *S. cerevisiae*. Los resultados demostraron una mayor relación de FRET en las cepas mutantes de Hog1 y Pbs2 comparadas con la cepa silvestre cuando estas se someten a un choque osmótico con concentraciones menores de 1M de NaCl, lo que sugiere una mayor sensibilidad al estrés hiperosmótico en las líneas mutantes.

Con el objetivo de determinar si el biosensor SED1 expresado en los organismos halotolerantes *T. atroviride* y *T. tlahuicanensis* responde al hacinamiento molecular inducido por estrés hiperosmótico de manera comparable a lo observado en levadura, se generaron cepas transformadas con el biosensor para posteriormente determinar la respuesta de este frente a las condiciones mencionadas previamente.

4. Justificación

El monitoreo de los cambios en la presión osmótica es fundamental para comprender los mecanismos mediante los cuales las células perciben, responden y se adaptan a variaciones ambientales. Dada la relevancia de los hongos del género *Trichoderma* en la industria biotecnológica, resulta necesario evaluar si los genes ortólogos a *hog1* son capaces de complementar la función del gen silvestre en levadura, e incluso determinar si confieren una mayor halotolerancia. Esto constituye una primera aproximación para comprender los mecanismos que permiten, en particular, a *T. tlahuicanensis* tolerar mayores concentraciones de NaCl. Si bien se han descrito diferencias en la tolerancia al estrés osmótico entre especies de *Trichoderma*, las metodologías tradicionales limitan el análisis dinámico de estas respuestas. En este contexto, el uso del biosensor SED1, basado en FRET, permite monitorear en tiempo real las fluctuaciones osmóticas intracelulares.

5. Hipótesis

El gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* es capaz de complementar la función de *hog1* en *S. cerevisiae hog1Δ*, restaurando la respuesta frente al estrés osmótico

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar la complementación funcional del gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* en una cepa mutante *hog1Δ* de *S. cerevisiae* bajo condiciones de estrés osmótico

6.2. Objetivos específicos

- Generar las líneas complementantes del gen *hog1* en *Saccharomyces cerevisiae hog1Δ*, incorporando el gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* para evaluar su funcionalidad en la vía de HOG.
- Comparar la respuesta a estrés salino de la cepa complementante de Hog1 en *S. cerevisiae hog1Δ* con el gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* y la endógena de la levadura, a través de la evaluación de tolerancia a estrés osmótico.

- Generar las líneas sobreexpresantes del biosensor SED1 en *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma tlahuicanensis*.
- Determinar el encendido del biosensor SED1 mediante un choque hiperosmóticos en las dos cepas de *Trichoderma*.

7. Materiales y métodos

7.1. Materiales

7.1.1. Cepas utilizadas

Saccharomyces cerevisiae BY4742 (*MAT* α , *his3* Δ 1, *leu2* Δ 0, *lys2* Δ 0, *ura3* Δ 0)

Saccharomyces cerevisiae BY4742 *hog1* Δ (*MAT* α , *his3* Δ 1, *leu2* Δ 0, *lys2* Δ 0, *ura3* Δ 0, *hog1* Δ ::*kanMX*)

Escherichia coli TOP10 (F- *mcrA* (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) 80*lacZ* M15 *lacX*74 *recA*1 *ara*139 (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA*1 *nupG*)

Trichoderma atroviride IMI 206040 (GenBank Assembly: GCA_019297715.1)

Trichoderma tlahuicanensis BMH-0061 (GenBank Assembly: GCA_030015385.1)

7.1.2. Medios de cultivo

Papa Dextrosa Agar (PDA): 0.4 % extracto de papa, 2% de dextrosa y 1.5% de agar bacteriológico.

Agar extracto de Malta (MEA): 0.3% extracto de malta, 1.5% agar bacteriológico.

Agar YPD: 1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 2% dextrosa y 1.5% agar bacteriológico.

Yeast Nitrogen Base (YNB): 6.7% YNB, 2% glucosa o galactosa, según se necesite, 1.5% agar bacteriológico.

Medio sintético de levadura sin uracilo (SD-*ura*): 6.7% medio, 2% galactosa

Luria-Bertani (LB): 1% peptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl

7.1.3. Antibióticos y aminoácidos

Cloranfenicol 50 μ g/mL

Ampicilina: 50 μ g/mL – 100 μ g/mL

Higromicina: 100-150 μ g/mL

L-histidina: 20 µg/mL

L-metionina: 40 µg/mL

L-leucina: 20 µg/mL

7.2. Métodos experimentales

7.2.1. Generación de las líneas complementantes de *S. cerevisiae* *hog1*Δ con el gen ortólogo de *T. tlahuicanensis* y el gen nativo de levadura.

Para complementar la delección del gen *hog1* en *S. cerevisiae* BY4742 *hog1*Δ, se generaron dos construcciones usando el vector pYES2 (Invitrogen), uno que se le inserta el gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis*, y en la otra, el gen *hog1* nativo de *S. cerevisiae*, el plásmido contiene el promotor GAL1 y el terminador CYC1, permitiendo la expresión regulada en levadura.

La construcción que contiene el ORF de TMK3 se obtuvo a partir de RNA total, el cual fue extraído mediante el método de TRIzol. Posteriormente, se sintetizó el cDNA utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, #K1621), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ORF fue amplificado por PCR empleando oligonucleótidos específicos: forward FwTmk3TtEcoRI 5'-TATTTGAATTCATGGCCGAGTTTGTGCGTG C-3' y reverse RvTmk3TtXbaI 5'-GTCTCTAGACTATTGTGTGGCTATTGTGTGGGGAATTGCTCC-3', los cuales incluyen los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* (señalado en rojo), respectivamente, con el objetivo de facilitar su posterior inserción en el vector.

Tanto el vector pYES2 como el inserto fueron sometidos a una doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, seguida de su purificación. El vector digerido se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y posterior extracción de la banda correspondiente utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific, #K0691, #K0692). Por su parte, el inserto digerido se purificó empleando el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, #D4005). Finalmente, la ligación del inserto al vector se llevó a cabo utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, #EL0011), incubando la reacción a 20 °C durante toda la noche; posteriormente, la enzima se inactivó a 65 °C por 10 minutos.

La construcción recombinante se transformó en células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 (Anexo 1), y las colonias transformadas fueron seleccionadas en placas de medio LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL).

En paralelo, se generó una segunda construcción que contendrá al gen HOG1 de la cepa de referencia *S. cerevisiae* BY4742. En este caso, la secuencia codificante se amplificó

a partir de DNA genómico, ya que el gen carece de intrones. Para esta construcción se utilizaron los siguientes cebadores: forward FwHog1ScBamHI 5'-AATC**GGATCC**ATGAC CACTAACGAGGAATTC-3' y reverso RvHog1ScXbaI 5'-ATACT**CTAG**ATTACTGTTGGAAGCTCATTAG-3', con los sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I, respectivamente. Esta construcción se utilizó como control para validar la funcionalidad del sistema de expresión inducible bajo el promotor GAL1 (Figura 6b).

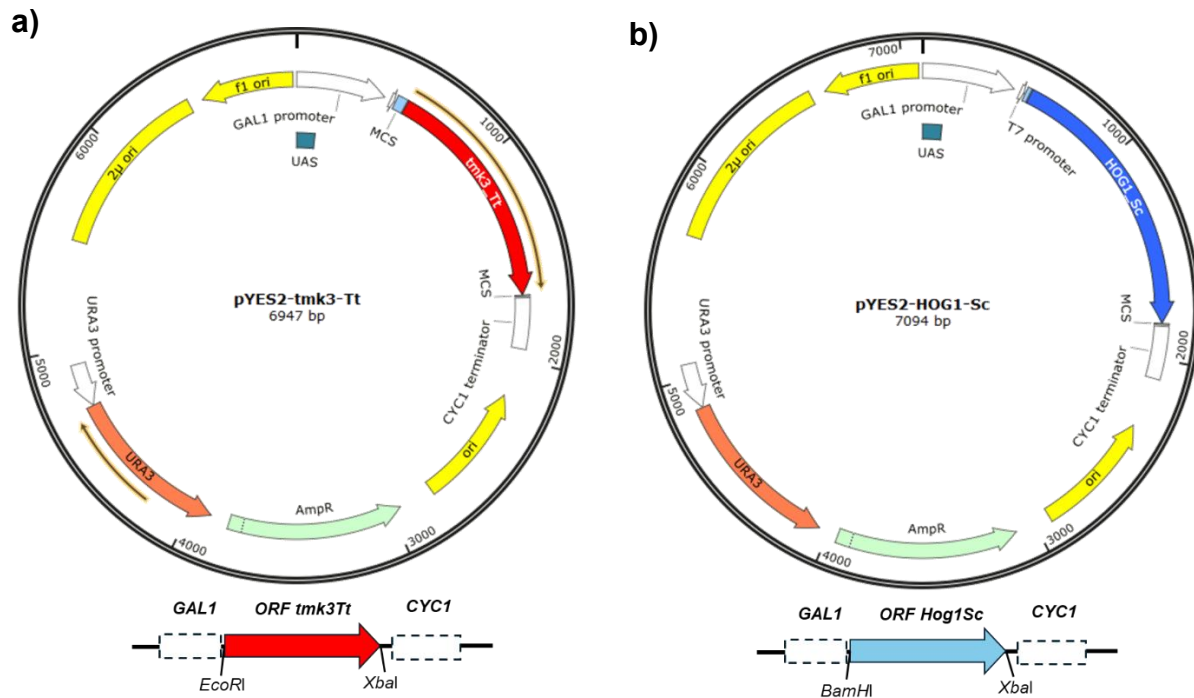


Figura 6: Construcciones genéticas para obtener el DNA recombinante a) del marco de lectura del gen TMK3 de *T. tlahuicanensis* y b) del HOG1 nativo en *S. cerevisiae hog1Δ*, bajo el promotor GAL1 y el terminador CYC1.

Posteriormente, se realizó la transformación de ambas construcciones en la cepa *S. cerevisiae hog1Δ* utilizando el protocolo de transformación de acetato de litio (Anexo. 2), y para la selección de las colonias positivas se utilizó el marcador de auxotrofia URA3. Una vez que se obtuvieron las cepas complementantes *S. cerevisiae hog1Δ*+pYES2:TtTmk3 y *S. cerevisiae hog1Δ*+pYES2:ScHog1 se realizaron los ensayos de osmotolerancia mediante su crecimiento en YNB suplementado con aminoácidos (YNB+AA) y medio sintético SD -uracilo, según sea el caso, suplementados con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.5M, 0.75M, 1M), KCl (0, 0.5M, 0.75M, 1M) y Sorbitol (0, 0.5M, 0.75M, 1M, 1.5M y 2M).

Como controles experimentales, las cepas *S. cerevisiae* WT BY4742 y *S. cerevisiae* BY4742 *hog1Δ* también fueron transformadas con el plásmido vacío pYES2 y evaluadas bajo las mismas condiciones de cultivo. Estas se verificaron por PCR amplificando el

promotor GAL1 de 472 pb con los oligos GAL promotor_Hog1C_fwd: 5' ctatagaacgcggccgccagCGGATTAGAAGCCGCCGAG 3', y el reverso GAL promotor_Hog1C_rev: 5' attccgcatCTCCTTGACGTAAAGTATAGAGGTATATTAAC 3'.

7.2.2. Evaluación de la función osmorreguladora de las cepas complementantes en *S. cerevisiae* hog1Δ mediante inducción con galactosa

Las cepas se cultivaron inicialmente en medio YNB con 2% de glucosa como fuente de carbono suplementado con los aminoácidos L-histidina, L-leucina y L-metionina a la concentración adecuada (Sección 7.1.3. Antibióticos y aminoácidos), y se incubaron a 30 °C con agitación a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (O.D.₆₀₀) de 0.3–0.5.

Para inducir la expresión de los genes bajo el promotor GAL1, las células se recolectaron por centrifugación a 4,000 rpm durante 5 minutos, se lavaron dos veces con PBS 1X estéril y se resuspendieron en 10 mL de medio YNB+AA con 2% de galactosa como única fuente de carbono. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación a 250 rpm durante 6 horas, periodo tras el cual se realizó la evaluación de la respuesta al estrés osmótico.

Una vez inducida la expresión génica con galactosa, se ajustó la densidad óptica de cada cultivo a O.D.₆₀₀ = 0.5, y se prepararon diluciones seriadas 1:10 hasta una dilución final de 10⁻⁴. De cada dilución se sembraron 3 µL sobre placas de agar YNB+AA con 2% de galactosa, suplementadas con NaCl, Sorbitol y KCl hasta una concentración final de 1 M, como agentes inductores de estrés osmótico.

Las placas se incubaron a 30 °C durante 48-72 horas, y se evaluó el crecimiento comparativo entre cepas para determinar la capacidad de respuesta y tolerancia osmótica.

7.2.3. Evaluación de crecimiento en cultivo líquido mediante cinéticas bajo condiciones de estrés osmótico

Se seleccionó una colonia proveniente del medio selectivo de cada una de las cepas complementantes junto con la cepa WT y *hog1Δ*, se inocularon en 5 mL de medio selectivo SD-ura suplementado con 2% de galactosa como fuente de carbono, y se incubaron a 30 °C bajo agitación de 250 rpm durante la noche. Posteriormente, los cultivos fueron diluidos en medio fresco SD-ura con 2% de galactosa hasta alcanzar una densidad óptica inicial de OD₆₀₀ = 0.3, en un volumen final de 30 mL, y se incubaron nuevamente en las mismas condiciones.

El crecimiento celular fue monitoreado hasta alcanzar una fase exponencial media OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.8. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 5

minutos y el pellet celular fue lavado con agua destilada estéril, los lavados se repitieron 3 veces. Finalmente, el pellet se resuspendió en medio SD-ura con 2% de galactosa y a partir de este punto, los cultivos fueron utilizados directamente para las cinéticas de crecimiento bajo las distintas condiciones de estrés osmótico evaluadas.

Las cinéticas se llevaron a cabo en placas de 96 pozos a un volumen final de 200 µl, partiendo de una O.D.₆₀₀ de 0.05, se incubaron a 30°C a 200 rpm durante 24 hrs. Cada cepa evaluada se evaluó por triplicado (Modificado de Szymanski, & Kersc, 2013).

7.2.4. Generación de líneas transgénicas de *T. atroviride*:pUE10:SED1 y *T.*

tlahuicanensis: pUE10:SED1

Se generó una línea transgénica de *T. atroviride* y *T. tlahuicanensis* que contiene el biosensor SED1 para utilizarlo como fondo genético en posteriores experimentos. Se utilizó esta construcción pUE10:SED1 (SED1: mCerulean3:AtLea4-5:Citrine) para la transformación de ambos hongos. Este vector contiene al promotor constitutivo *pki1* (piruvato quinasa) y el terminador blu17 de *T. atroviride* (Figura 7). La transformación se realizó por el método de electroporación de conidias siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 5. La identificación de las colonias transformadas se llevó a cabo por medio de microscopía de fluorescencia y por PCR de colonia. De las transformantes obtenidas se hicieron tres pases monospóricos para obtener líneas transformantes homogéneas.

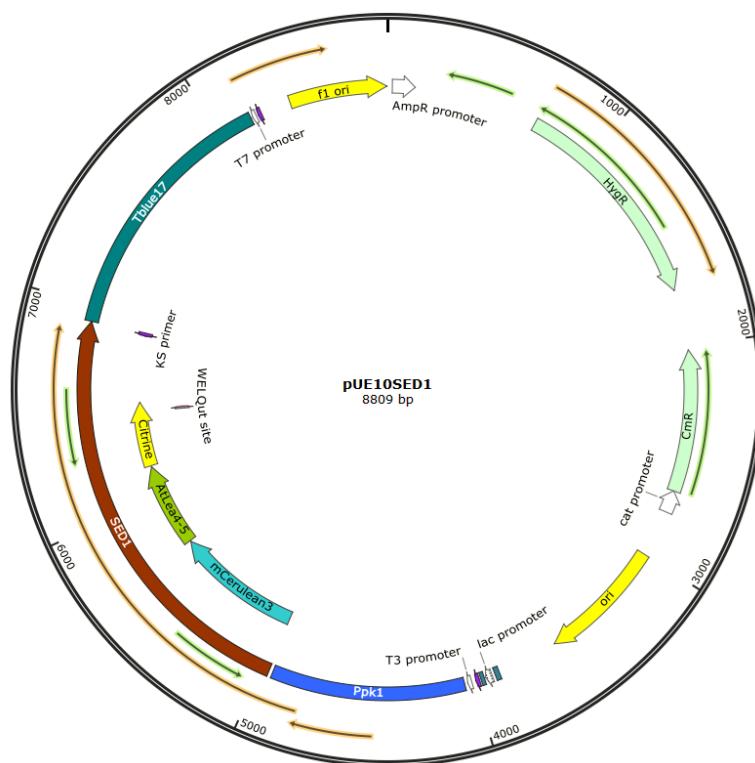


Figura 7: Construcción del vector pUE10:SED1 para la expresión del biosensor SED1 en *T. atroviride*. El vector contiene al promotor constitutivo pki1 de *T. reesei* (piruvato quinasa) y el terminador blu17, flanqueada por una región homologa al genoma de *T. atroviride*.

7.2.5. Análisis de la respuesta del biosensor SED1 en *T. atroviride*+pUE10:SED1 y *T. tlahuicanensis*+pUE10:SED1 inducido por choque osmótico

Para la preparación de los conidios de *Trichoderma*+pUE10:SED1 para los ensayos FRET. Se inocularon 10,000 conidios de *Trichoderma atroviride* o *T. tlahuicanensis* transformadas con el plásmido pUE10:SED1 en 10 mL de medio líquido PDB (potato dextrose broth). Estas se incubaron a 28 °C con agitación constante a 180 rpm durante 10 horas. Transcurrido este tiempo, se observó al microscopio óptico para verificar que las conidias se encuentren en la etapa de germinula. Entonces, se procedió a centrifugar el cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se retiró cuidadosamente con micropipeta y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de tampón MES 50 mM, pH 6. Posteriormente, se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado una vez más. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL del mismo tampón MES y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento de la lectura.

Una vez tratadas las células, se colocan 50 µL de la suspensión celular en placas de 96 pocillos, por triplicado, en los que previamente se añaden 200 µL de las soluciones que contienen NaCl y sorbitol en concentraciones crecientes de 0, 0.5, 0.75 y 1 M.

Las lecturas se realizan utilizando un lector de microplacas usando las longitudes de onda correspondientes para cada proteína fluorescente, empleando placas de 96 pocillos con fondo plano. La medición se configura para registrar la intensidad de fluorescencia (FI) en modo espectral. El escaneo se realiza a lo largo de 91 puntos de longitud de onda, con una excitación centrada en 433 nm y un ancho de banda de excitación de 10 nm. La emisión se mide entre 460 y 550 nm, con incrementos de 1 nm y un ancho de banda de 10 nm. La altura focal se ajusta automáticamente, estableciendo una referencia de 5 mm. La longitud de onda utilizada para el ajuste de ganancia es de 490 nm. El tiempo de estabilización se configura en 0.1 segundos, y la lectura se realiza de manera unidireccional, de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. La ganancia se ajusta manualmente en cada ensayo utilizando el pocillo que presenta la mayor intensidad de fluorescencia. (Enriquez-Toledo *et al.*, 2024).

8. Resultados

8.1. Identificación del gen ortólogo de *hog1* en especies de *Trichoderma*

Con el objetivo de identificar el gen ortólogo de HOG1 en especies del género *Trichoderma*, se descargaron los genomas completos de *T. atroviride* IMI 206040 y *T. tlahuicanensis* BMH-0061 de la base de datos NCBI. A partir de estas secuencias genómicas, se realizó la predicción de regiones codificantes y de las secuencias de aminoácidos correspondientes utilizando el servidor AUGUSTUS ([Bioinformatics Web Server - University of Greifswald](#)). A partir del conjunto total de secuencias codificantes predichas, se realizó la búsqueda de genes ortólogos de HOG1, y se encontró que sólo hay una única secuencia en cada genoma con un E-value reportado como $1E^{-100}$, lo que indica una similitud significativa. En *T. tlahuicanensis*, la secuencia predicha corresponde a un gen de 1696 pb, de 9 exones separados por 8 intrones, cuyo ORF codifica una proteína de 356 aminoácidos. En el caso de *T. atroviride*, se identificó un gen de 1746 pb, con la misma organización exón/intrón, y que codifica una proteína de 357 aminoácidos. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente para Tmk3 en *T. atroviride* y con otros ortólogos de Hog1 descritos en especies del género *Trichoderma* (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016; Delgado-Jarana *et al.*, 2006).

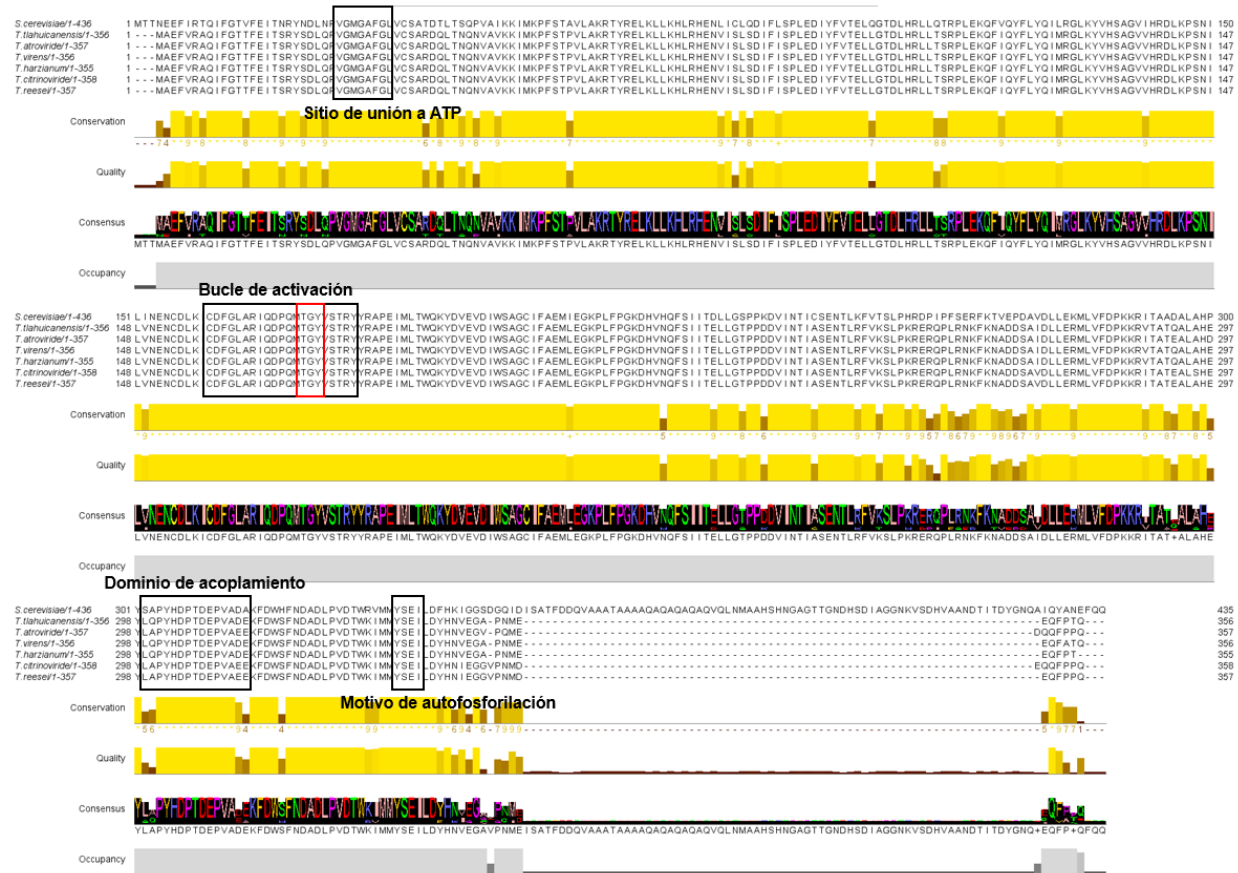


Figura 8: Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de HOG1 de *S. cerevisiae* y de las proteínas TMK3 de *T. atroviride*, *T. tluhuicanensis* y otras especies del género *Trichoderma*. El alineamiento se realizó con el algoritmo MUSCLE y se visualizó en Jalview. Se indican las regiones conservadas correspondientes al sitio de unión a ATP, el bucle de activación con el motivo TGY, el dominio catalítico de serina/treonina quinasa y el motivo de autofosforilación. Las barras inferiores representan los niveles de conservación y calidad del alineamiento.

Finalmente, con el fin de evaluar el grado de conservación de las proteínas, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de Tmk3 de *T. atroviride* (TaTmk3) y *T. tluhuicanensis* (TtTmk3), junto con la secuencia de Hog1 de *S. cerevisiae* y con ortólogos a Hog1 de otras especies del género *Trichoderma* previamente descritas (Figura 8). El análisis de identidad por pares realizado en Jalview mostró que la proteína TtTmk3 comparte un 79.78 % de identidad con Hog1 de *S. cerevisiae*, mientras que TaTmk3 presentó un 79.74 % de identidad. El alineamiento reveló una alta conservación en regiones funcionales características de las MAP quinastas (MAPK), incluyendo el sitio de unión a ATP, el sitio catalítico y el motivo de activación TGY, lo que respalda la identificación de Tmk3 como el ortólogo de Hog1 en las especies de *Trichoderma* analizadas.

8.2. Generación de la línea complementante de Hog1 de *S. cerevisiae*

hog1Δ con el ortólogo de *T. tlahuicanensis*

Para generar la construcción que contiene el ORF del gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* en el vector pYES2, se obtuvo RNA total a partir de micelio cultivado en medio PDB. La extracción con Trizol permitió obtener RNA íntegro, lo cual fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. (Figura 9).

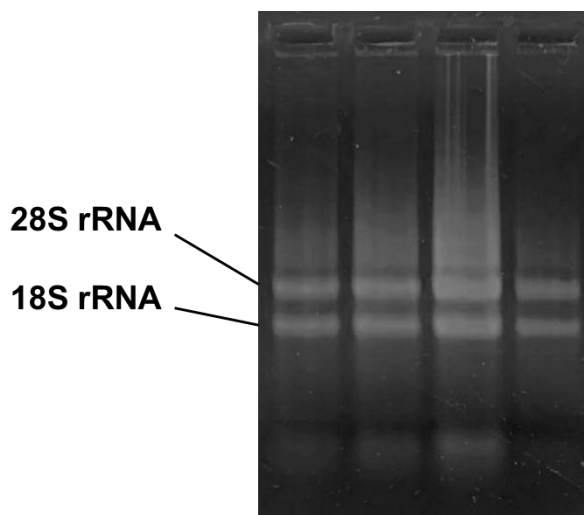


Figura 9: Integridad del RNA total purificado. La purificación se realizó por cuadruplicado, y se observan en todas las muestras las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S, que se visualiza en la electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

A partir del RNA total obtenido se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA). Previamente, el RNA fue tratado con DNAsa (100 µg/mL) con el fin de eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico. Posteriormente, se empleó 1 µg de RNA como molde para la síntesis del cDNA. A partir del cDNA generado, se llevó a cabo la amplificación del marco abierto de lectura (ORF) del gen *tmk3* mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos FwTmk3TtEcoRI y RvTmk3TtXbaI (descritos en la sección 7.2.1). La reacción de amplificación se realizó bajo las condiciones previamente establecidas, consistentes en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 61 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos, concluyendo con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos (Figura 10).

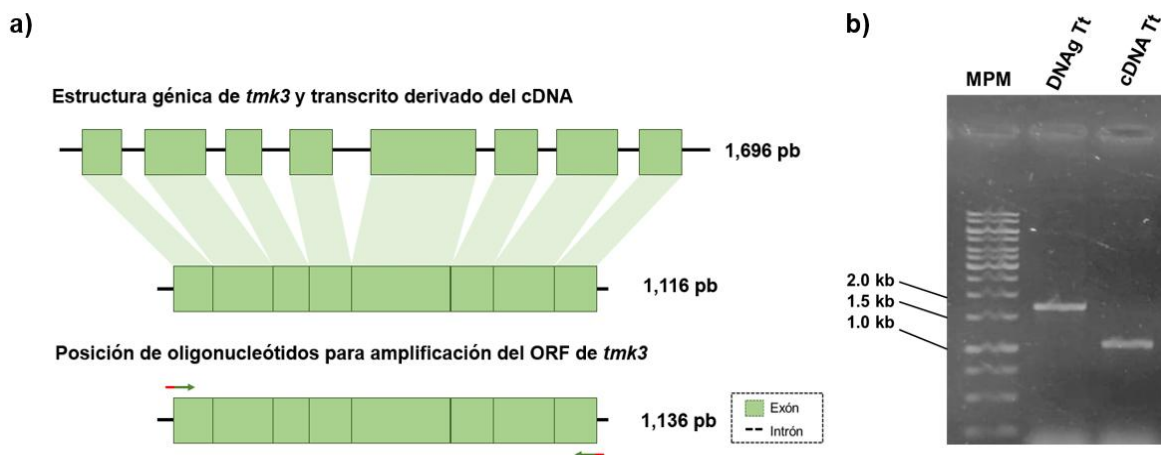


Figura 10: (a) Esquema de la estructura génica de *tmk3* y del transcrito derivado de cDNA, indicando la ubicación de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del ORF. (b) Amplicones obtenidos del ORF de *tmk3* de *T. tlahuicanensis* a partir de DNA genómico (1,696 pb) y cDNA sintetizado (1,136 pb). Se realizaron tres reacciones: la primera como control positivo utilizando DNA genómico como molde y la segunda utilizando cDNA total. MPM: Marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb.

Una vez obtenido el amplicón correspondiente al ORF del gen *tmk3*, se repitió la amplificación utilizando la enzima VeriFi Polymerase (PCR Biosystems, N° Cat. PB10.42), la cual posee actividad de alta fidelidad para minimizar errores durante la amplificación. El producto amplificado fue posteriormente digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, al igual que el plásmido pYES2 (Figura 11, ver condiciones de digestión en el Anexo 4). Finalmente, se realizó la reacción de ligación con una relación 3:1 inserto:vector, previamente digeridos y purificados, con lo que se obtuvo el constructo recombinante para su posterior transformación. La reacción de ligación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del manual de la enzima T4 DNA Ligase, el cual recomienda el uso de 100 ng de vector. No obstante, debido a las pérdidas de concentración generadas durante la purificación tanto del inserto como del vector, las reacciones se ajustaron a las concentraciones finales obtenidas, manteniendo siempre la relación 3:1 inserto:vector. Para ver las condiciones de amplificación y ligación ver Anexo 4.

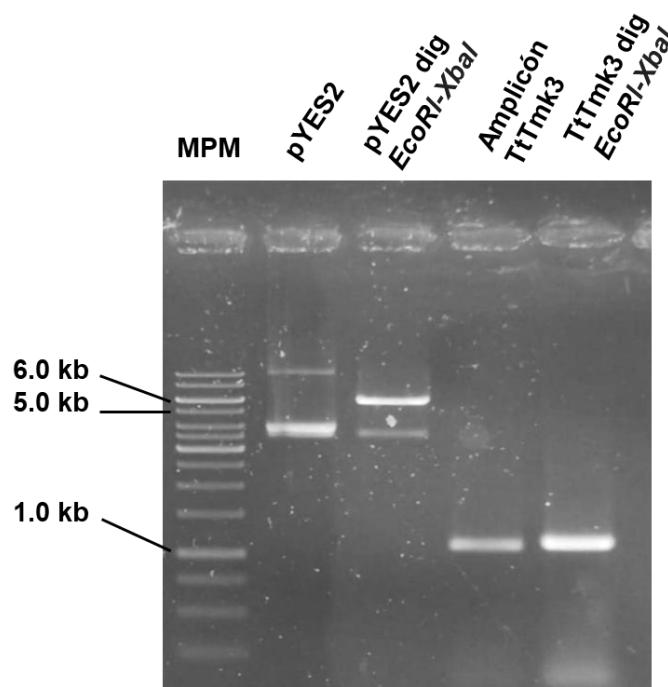


Figura 11: Productos de la digestión enzimática del vector y del inserto con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. El vector presenta un tamaño de 5856 pb y el inserto de 1116 pb. Los fragmentos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X. MPM: Marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb.

Finalmente, se llevó a cabo la transformación del plásmido recombinante utilizando 5 μ l del producto de ligación en células químicamente competentes de *E. coli* TOP10. Las colonias transformadas se seleccionaron en medio LB suplementado con ampicilina (50 μ g/mL). Las colonias que mostraron crecimiento fueron analizadas mediante PCR de colonia (Figura 12.a), utilizando el programa de amplificación previamente descrito. Posteriormente, se realizó la purificación del DNA plasmídico y se verificó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, las mismas utilizadas para su clonación. Adicionalmente, se realizó una digestión con las enzimas *XbaI* y *BglI* con el propósito de confirmar la orientación del inserto en el vector (Figura 12.b). Para ver condiciones de digestión y amplificación por PCR ver Anexo 4.

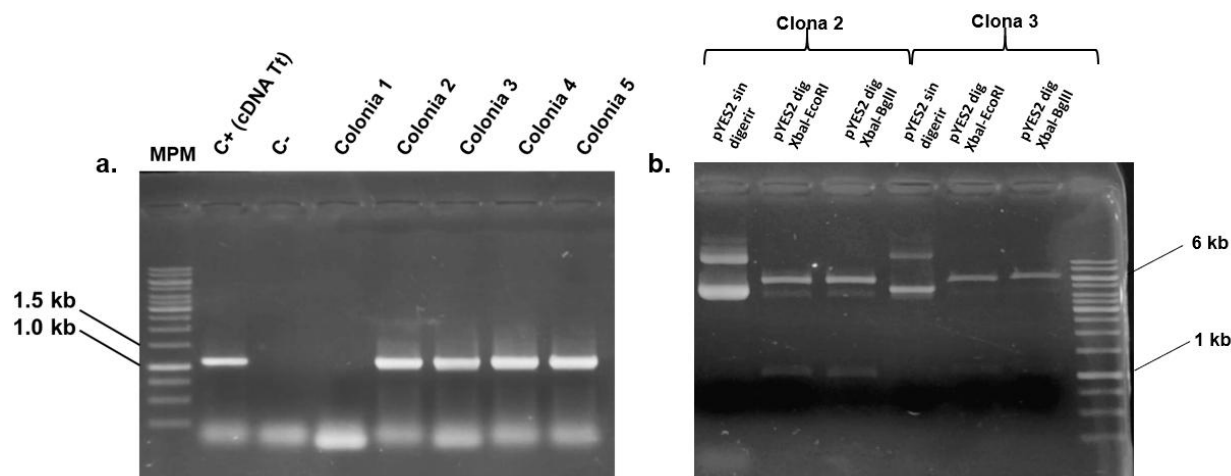


Figura 12: Selección y verificación de colonias transformadas con el plásmido pYES2:TtTmk3. (a) Electroforesis en gel de agarosa del PCR de colonia para la detección del inserto TtTmk3 en distintas colonias transformadas y (b) verificación de la orientación del inserto en las clonas 2 y 3 mediante digestión enzimática y análisis en gel de agarosa. MPM: Marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb.

Para corroborar que la inserción del ORF fue adecuada, se secuenció el plásmido con el inserto en ambas direcciones por separado, utilizando los mismos oligonucleótidos empleados para amplificar el ORF. Posteriormente, las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia codificante del gen *tmk3*, obteniéndose un porcentaje de similitud del 99 % en ambas direcciones (Anexo 8).

Para obtener al constructo con el ORF de *hog1* nativo de *S. cerevisiae* BY4742 en el plásmido pYES2 se realizó la misma metodología descrita previamente, con algunas modificaciones. En este caso, la secuencia codificante se amplificó a partir de DNA genómico, ya que el gen *hog1* está compuesto únicamente por un exón, sin intrones (N° de referencia NCBI: NM_001182000.1). En los oligonucleótidos utilizados se incluyeron los sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I (descritos en la Metodología 7.2.1.), y para verificar las colonias transformadas que contenían la inserción del ORF de *hog1* en el vector, se realizó una PCR de colonia utilizando los mismos cebadores usados para amplificar el gen. Posteriormente, a partir de las colonias positivas se purificó el plásmido y se digirió con las mismas enzimas de restricción (Figura 13). Para ver condiciones de digestión y amplificación por PCR ver Anexo 4.

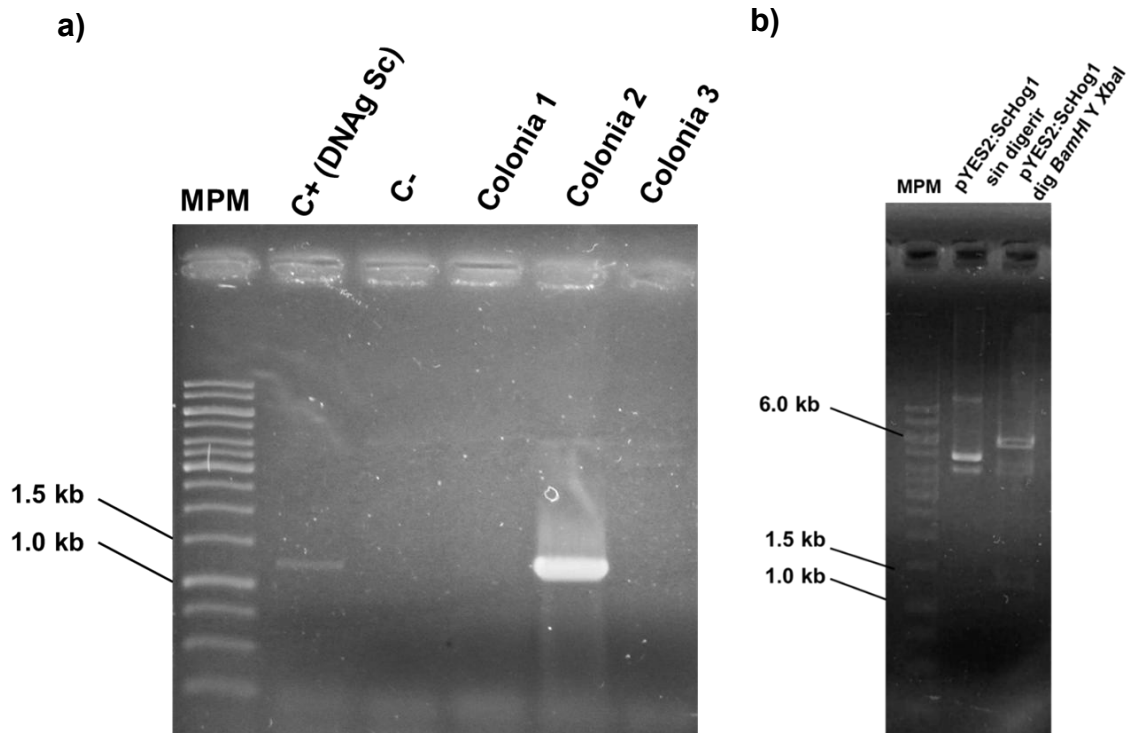


Figura 13: Verificación de la construcción pYES2:SchHog1. (a) Detección por PCR de colonias transformadas; se analizaron tres colonias, de las cuales una resultó positiva. (b) Confirmación del inserto mediante digestión enzimática del plásmido aislado con *Bam*HI y *Xba*I, liberando un fragmento de 1308 pb, analizado mediante electroforesis en gel de agarosa. MPM: Marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb.

8.3. Generación de las líneas complementantes de Hog1 en *S. cerevisiae*

hog1 Δ

Una vez obtenidas las construcciones que contienen las secuencias codificantes de *tmk3* y de *hog1* en el plásmido pYES2, se procedió a realizar la transformación de la cepa *S. cerevisiae hog1* Δ siguiendo el protocolo descrito previamente en la metodología. Las células transformadas fueron sembradas en medio mínimo YNB+aa sin uracilo, permitiendo la selección de transformantes mediante el marcador de auxotrofia URA3 del vector. Las colonias que crecieron en el medio selectivo fueron aisladas y analizadas mediante PCR para confirmar la presencia del inserto correspondiente, ya fuera *tmk3* o *hog1* (Figura 20). Además, como control, se transformó el plásmido vacío.

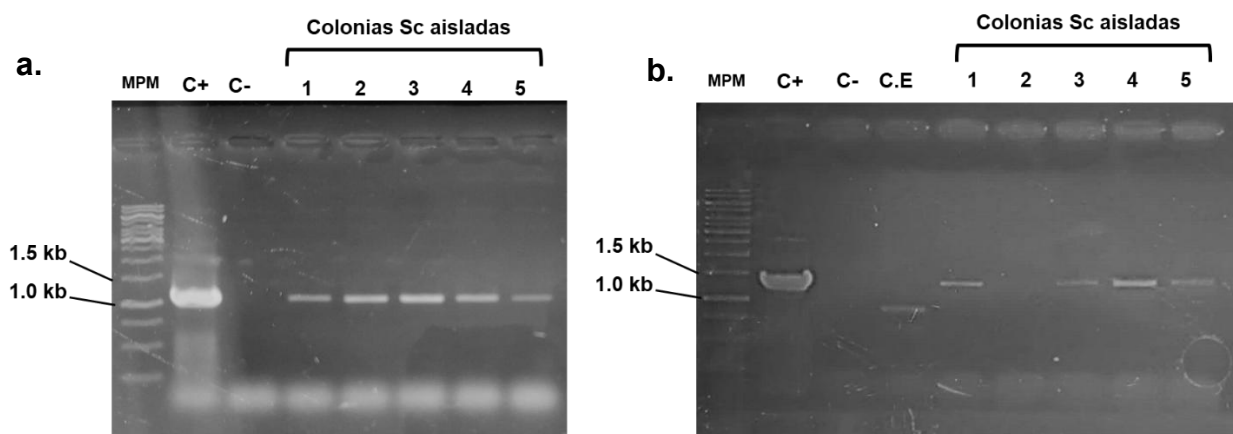


Figura 20: Selección de colonias transformadas de *S. cerevisiae hog1* Δ con a) la inserción del plásmido pYES2:TtTmk3, teniendo un amplicón de 1151 pb y b) el plásmido pYES2:ScHog1 dando un amplicón de 1329 pb. MPM: Marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb.

Asimismo, las colonias seleccionadas de la transformación con el plásmido pYES2 vacío fueron también analizadas mediante PCR de colonia, utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar el promotor GAL1, con el fin de confirmar la presencia del vector. Como se esperaba, se obtuvieron colonias positivas dando un producto de PCR de 472 pb que corresponde al promotor GAL1, lo que corroboró que dichas cepas portaban el plásmido (Figura 21). Esta cepa transformada con el plásmido vacío se utilizó como control negativo en los ensayos posteriores de tolerancia al estrés osmótico.

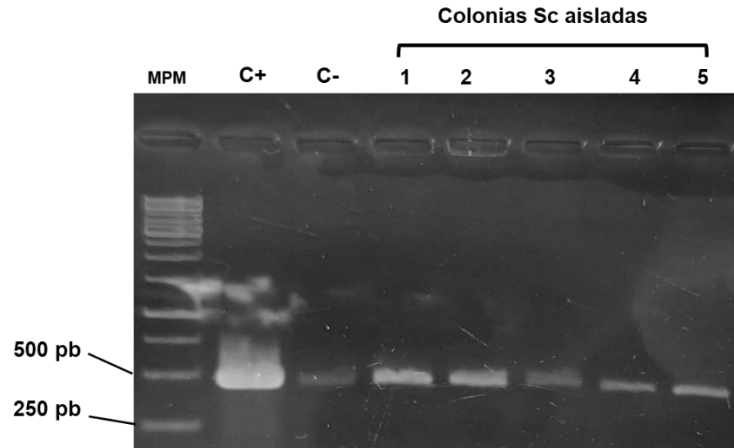


Figura 21: Selección de cepas de *S. cerevisiae* *hog1Δ* transformadas con el plásmido pYES2 vacío por PCR de colonia. MPM: Marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb.

8.4. Complementación funcional de la vía HOG en cepas *hog1Δ* bajo estrés osmótico

Para analizar si las cepas de *S. cerevisiae* *hog1Δ* complementada con *tmk3* o con *hog1* endógeno recuperan la tolerancia frente a una concentración moderada de sal. Se realizaron ensayos de dilución en placa para que las cepas se expongan a concentraciones crecientes de NaCl (0, 0.5, 0.75 y 1 M) en medio YNB+aa, 2 % galactosa. En ausencia de sal, todas las cepas WTBY4742, *hog1Δ*, *hog1Δ*:pYES2, *hog1Δ*:ScHog1 y *hog1Δ*:TtTmk3 crecieron de manera similar y con el mismo tamaño de colonia en las cuatro diluciones seriadas, confirmando que las cepas son viables y que el promotor GAL1 indujo lo que se esperaba. La exposición de las cepas *hog1Δ* y *hog1Δ*:pYES2 a 0.5 M de NaCl limita el crecimiento de las levaduras, ya que no se observaron colonias visibles, lo que indica su sensibilidad al estrés salino. La complementación con ScHog1 restauró casi por completo la tolerancia, con el crecimiento de las colonias similar a la cepa silvestre. En cambio, la cepa *hog1Δ*:TtTmk3 exhibió un fenotipo intermedio: crecimiento claro en la dilución 10^{-2} , reducido en 10^{-3} y ausente en 10^{-4} , indicando una recuperación parcial de la vía HOG. De manera similar, al exponer a la cepa silvestre (WT), *hog1Δ* y del vector vacío (pYES2) con la concentración de 0.75 M NaCl estas no crecen, mientras que las cepas *hog1Δ*:ScHog1 y *hog1Δ*:TtTmk3 tienen un crecimiento ligero. A 1 M NaCl no se observa un crecimiento claro, únicamente un ligero crecimiento en la complementante con Tmk3 y en las demás parece letal esta condición (Figura 22).

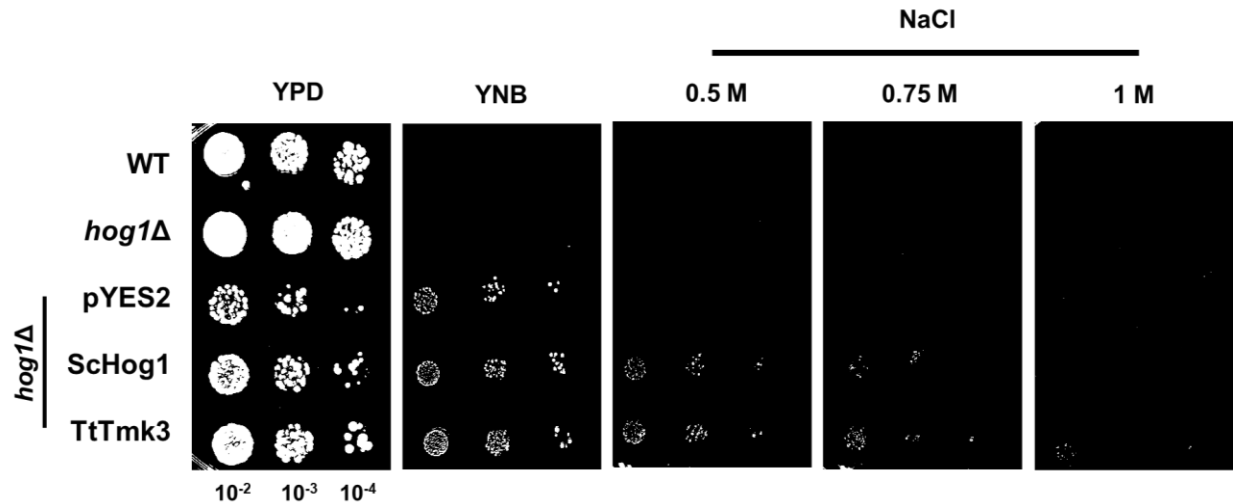


Figura 22: Las cepas mutantes y complementadas de *S. cerevisiae* *hog1Δ* toleran hasta 1 M de NaCl. Ensayo por goteo en medio YNB + galactosa (sin uracilo) con 0, 0.5, 0.75 y 1 M de NaCl. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁴ y se plaquearon 3 µl de cada dilución.

En contraste, las cepas crecen mejor en sorbitol, lo cual se explica a que este agente induce exclusivamente estrés osmótico, mientras que el NaCl produce también estrés iónico. Aunque la tendencia de crecimiento en sorbitol es similar a lo que se observó con las distintas concentraciones de NaCl, donde las cepas *hog1Δ* y aquellas que portan el vector vacío (*hog1Δ*:pYES2), mostraron sensibilidad a partir de 0.5 M de sorbitol. En cambio, la cepa complementante con TtTmk3 es tolerante hasta con 1M, similar al efecto del gen nativo de *S. cerevisiae*, lo que en conjunto indica que TtTmk3 complementa la vía HOG en este organismo. Asimismo, los datos corroboraron el efecto diferencial entre el estrés iónico causado por NaCl y el osmótico inducido por el sorbitol. Dado que la cepa complementada con ScHog1 fue utilizada como control positivo, y que las células recuperan la tolerancia tanto a sal como al sorbitol, alcanzando niveles cercanos a los de la cepa silvestre en ambas condiciones, esto valida el sistema de expresión y confirma la especificidad funcional de Hog1 en la adaptación osmótica (Figura 23).

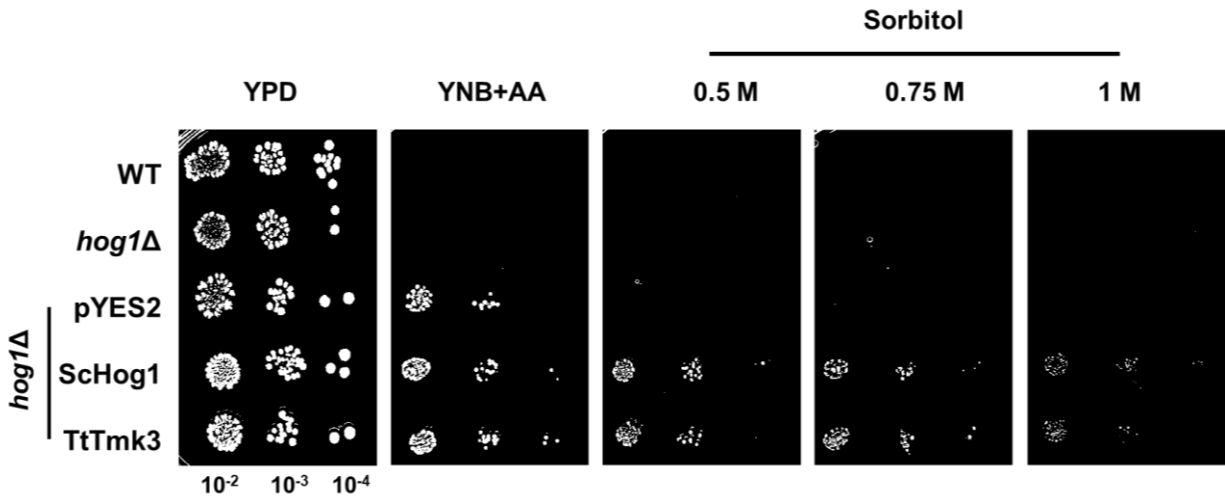


Figura 23: Cepas complementantes de *S. cerevisiae* *hog1Δ* con Tmk3Tt recuperan la tolerancia al estrés osmótico inducido por sorbitol. Las cepas fueron cultivadas en YNB + galactosa (sin uracilo) con concentraciones crecientes de sorbitol (0 a 1 M). Se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁴ y se colocaron 3 µl de cada dilución.

Además, se evaluó la tolerancia osmótica al KCl que, al igual que el NaCl, ejerce presión iónica y osmótica (Figura 24). En ausencia de KCl, todas las cepas mostraron crecimiento, indicando viabilidad en las células. A 0.5 M de KCl, se observó la reducción en el crecimiento de la cepa *hog1Δ* con el plásmido vacío. A 0.75 M el crecimiento de la cepa mutante fue drásticamente afectado, mientras que las cepas complementadas mantienen la capacidad de crecimiento. En 1M las únicas células que muestran crecimiento son las complementantes en la dilución 10⁻².

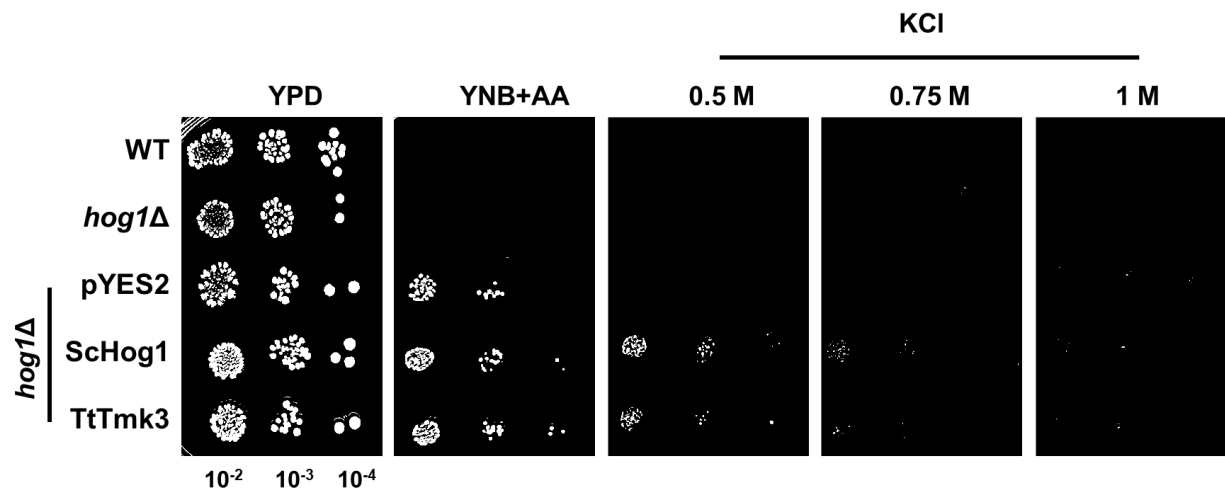


Figura 24: Las cepas complementantes de *S. cerevisiae* *hog1Δ* con TtTmk3 recuperan la tolerancia a estrés iónico y osmótico inducido por KCl. Las cepas fueron cultivadas en YNB + galactosa (sin uracilo) con concentraciones crecientes de KCl (0 a 1 M).

Comparando los tres ensayos (NaCl, Sorbitol y KCl), se observa que el efecto del estrés depende del tipo de soluto aplicado. El sorbitol inhibe el crecimiento de manera gradual, probablemente debido a la ausencia de toxicidad iónica. En contraste, el NaCl es más tóxico para la cepa mutante para *hog1*, y solo las cepas complementadas recuperan significativamente el crecimiento, evidenciando la participación crítica del gen *hog1* en la respuesta a estrés salino.

El KCl presenta un patrón de respuesta similar al NaCl, aunque en general las cepas toleran mejor las concentraciones moderadas de KCl, lo que puede atribuirse a que el sodio es más tóxico para las células que el potasio. Estos resultados muestran de forma cualitativa que el NaCl es más tóxico que el KCl o el sorbitol, y que las células contrarrestan mejor solo el estrés osmótico.

En conjunto, estos resultados indican que la expresión de TtTmk3 en cepas *hog1Δ* permite recuperar parcialmente la tolerancia frente a solutos osmóticos e iónicos en *S. cerevisiae*.

8.5. Análisis comparativo de la respuesta osmótica de las cepas WT, *hog1Δ* y complementantes mediante ensayos de crecimiento en placa y cinéticas en cultivo líquido

Los ensayos en placa nos permitieron determinar que hubo complementación en la cepa mutante de *hog1* de la levadura con el gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* restaurando el fenotipo de tolerancia. Con el fin de establecer una comparación directa entre todas las cepas evaluadas en las mismas condiciones de crecimiento, se realizaron nuevos ensayos de crecimiento por goteo incluyendo, la cepa WT con el plásmido vacío, la cepa *hog1Δ* con el plásmido vacío (nombrada PV) y sus complementantes (Schog1 y TtTmk3). De esta manera, todas las cepas analizadas portaron el mismo sistema de expresión. Los ensayos se llevaron a cabo en medio SD-ura suplementado con cada osmolito.

Se observaron diferencias en la densidad y tamaño de las colonias entre las cepas, como se observan en las distintas diluciones seriadas que se expusieron a concentraciones crecientes de NaCl (Figura 25). En ausencia de NaCl, todas las cepas crecieron de manera similar. A 0.25 M, la cepa mutante (PV) creció menos en comparación con la cepa silvestre y las cepas complementadas. En 0.5 M, se observa la disminución marcada del crecimiento en la mutante, mientras que las colonias de las cepas WT, Schog1 y TtTmk3 crecieron de manera similar. En 0.75 M y 1 M, el crecimiento de la PV fue prácticamente nulo, mientras que las otras tuvieron crecimiento limitado en las gotas con mayor número de células, por otro lado, se observan colonias pequeñas y escasas en las cepas complementadas en la dilución 10^{-4} .

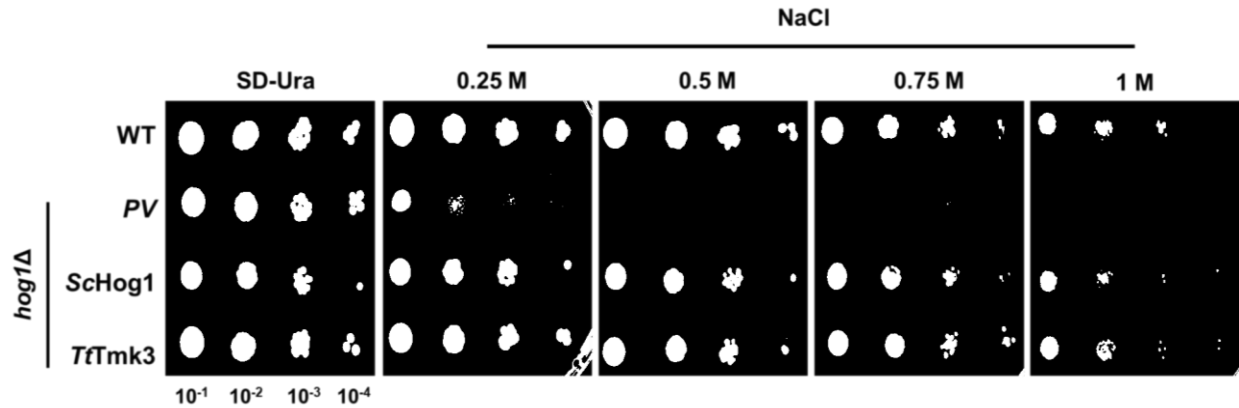


Figura 25: Las cepas complementadas recuperan parcialmente el crecimiento bajo estrés osmótico inducido por NaCl. Se analizaron la cepa silvestre (WT), la cepa *hog1Δ* transformada con el plásmido vacío (PV) y las cepas complementadas con ScHog1 y TtTmk3. Las cepas fueron cultivadas en SD-ura con concentraciones crecientes de NaCl.

Para el caso de KCl, las cepas mostraron diferencias en el tamaño y densidad de las colonias conforme aumentó la concentración del soluto, comportamiento similar a lo obtenido en NaCl (Figura 26). A 0.5 M y 0.75 M, la cepa PV no presenta crecimiento, mientras que las cepas ScHog1 y TtTmk3 mantuvieron una mayor densidad celular en las condiciones en las que hay 10⁻² y 10⁻³, aunque con menor tamaño en comparación con la cepa silvestre. A 1 M, el crecimiento fue limitado en todas las cepas; particularmente en las colonias inoculadas con 10⁻³ y 10⁻⁴. Al comparar la concentración de 0.25 M de NaCl vs KCl se observa que la cepa mutante tolera mejor el KCl. Estas diferencias en el tamaño y densidad de las colonias pueden reflejar la activación de la vía HOG, la cual regula la adaptación osmótica mediante la acumulación de glicerol y ajustes en el ciclo celular, afectando la tasa de proliferación y el tamaño de las colonias. Asimismo, el KCl altera el balance intracelular de iones, contribuyendo a la disminución en la viabilidad, un efecto similar que ocurre con NaCl.

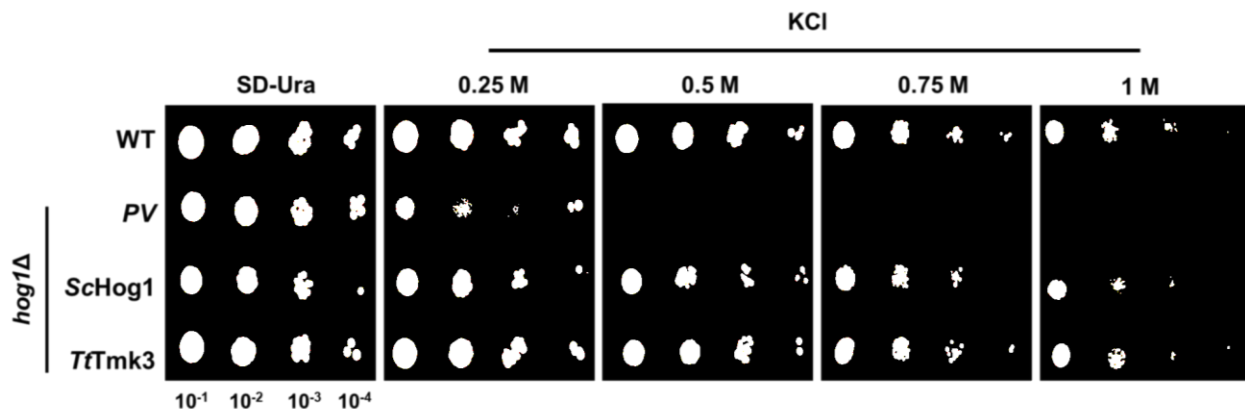


Figura 26: Las cepas complementadas recuperan parcialmente el crecimiento bajo estrés osmótico inducido por KCl. Se analizaron la cepa silvestre (WT), la cepa *hog1Δ* transformada con el plásmido vacío (PV) y las cepas complementadas con ScHog1 y TtTmk3. Las cepas fueron cultivadas en SD-ura con concentraciones crecientes de NaCl.

Para el caso de sorbitol, las cepas mostraron un patrón de crecimiento distinto al observado con NaCl y KCl, las concentraciones empleadas (0.5, 1, 1.5 y 2 M). A partir de 1.5 M, se evidenció un aglutinamiento celular en todas las cepas, observable como una mayor compactación de cada gota, particularmente en las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , en contraste con la dispersión observada en condiciones iónicas (Figura 27).. A diferencia de NaCl y KCl, el sorbitol no genera desequilibrio iónico, lo que permite mantener la viabilidad celular, aunque con una reducción en la expansión de las colonias y un aumento en la agregación celular. Este comportamiento resalta las diferencias en la respuesta fisiológica de las células frente a estrés osmótico exclusivo en comparación con el estrés osmótico/iónico.

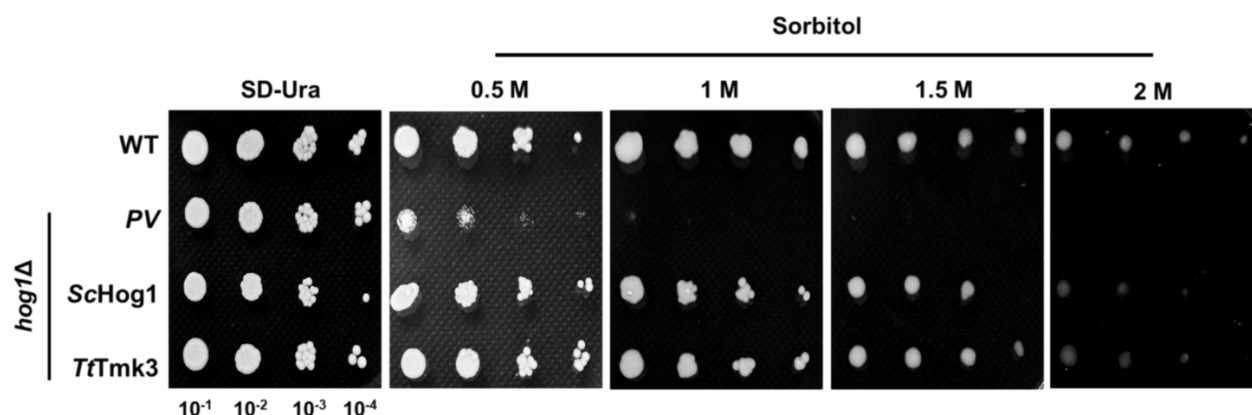


Figura 27: El sorbitol induce agregación celular a concentraciones mayores a 1 M y mantiene el crecimiento bajo estrés osmótico. Se analizaron la cepa silvestre (WT), la cepa *hog1Δ* transformada con el plásmido vacío (PV) y las cepas complementadas con ScHog1 y TtTmk3. Las cepas fueron cultivadas en SD-ura con concentraciones crecientes de NaCl.

Finalmente, en un último estudio se evaluó por medio de cinéticas de crecimiento en medio líquido, el comportamiento en el crecimiento de las cepas y usando las mismas condiciones que en los ensayos en placa (Figura 28. b). El análisis mostró diferencias entre cada tratamiento y las cepas evaluadas. En medio control (SD-ura), las cepas presentaron un incremento sostenido en la densidad óptica, sin embargo, la cepa WT mostró una tasa de crecimiento limitada en comparación con las cepas transformadas. Bajo condiciones de 1 M NaCl y 1 M KCl, la concentración más alta evaluada para estas dos sales, se observó una reducción significativa en la tasa de crecimiento en todas las cepas, siendo más pronunciada en la cepa mutante (PV), como mostraron los datos de crecimiento en placa, mientras que las cepas complementadas con ScHog1 y TtTmk3 mostraron una recuperación parcial del crecimiento. En contraste, en la condición

osmolarmente equiparable a las anteriores que es de 2 M de sorbitol, el crecimiento fue menos afectado, particularmente en la cepa ScHog1, lo que concuerda con estudios que indican que el estrés osmótico no iónico activa la vía HOG sin alterar el balance iónico intracelular, permitiendo mantener la viabilidad celular (Figura 28). Las diferencias observadas entre NaCl/KCl y sorbitol reflejan la contribución adicional del componente iónico en las sales, el cual impacta procesos como el equilibrio electroquímico y la homeostasis celular, resultando en una mayor inhibición del crecimiento. En conjunto, estos resultados evidencian que la complementación con TtTmk3 reproduce de manera funcional la respuesta mediada por Hog1, permitiendo una adaptación más eficiente frente a condiciones de estrés osmótico.

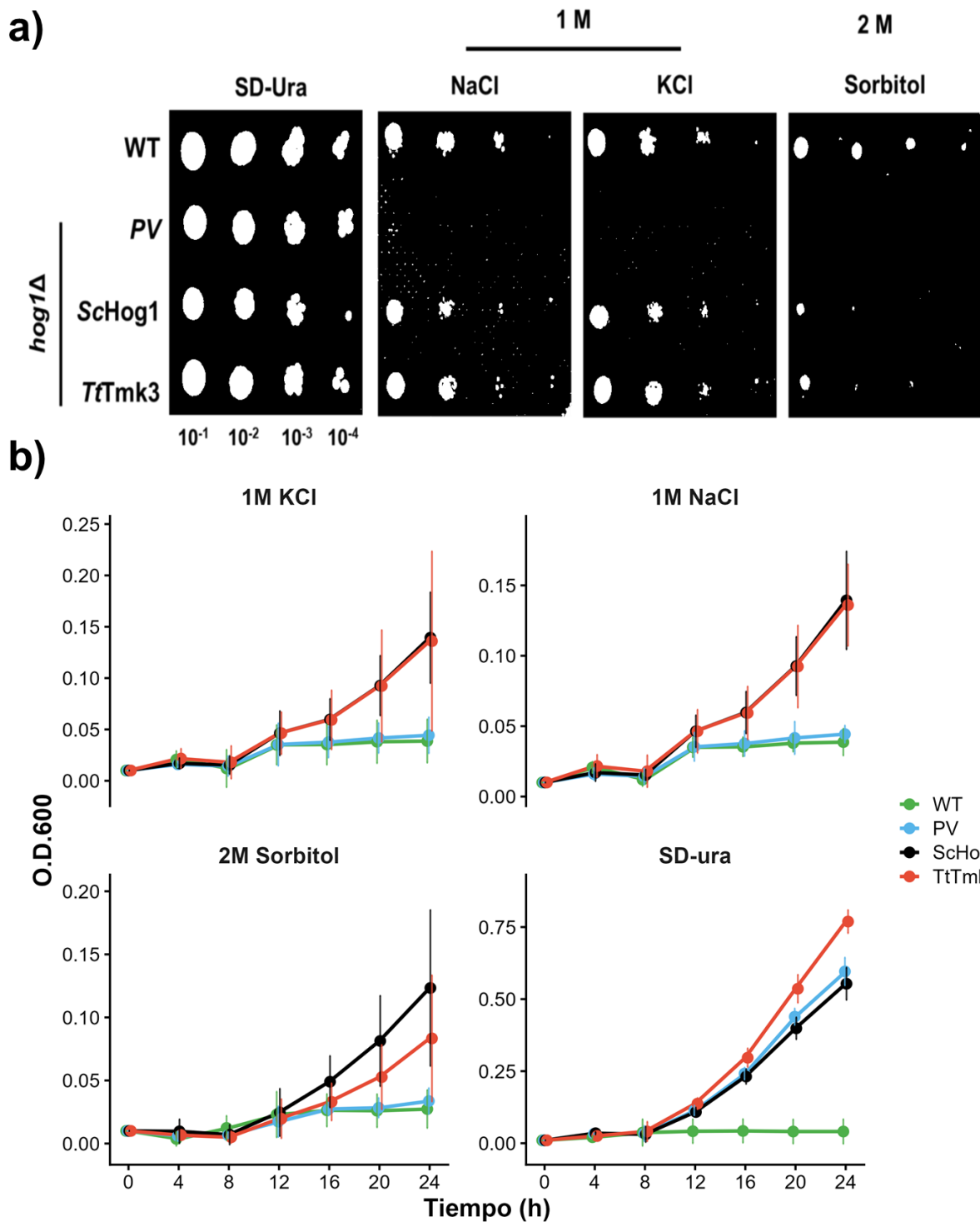


Figura 28: La complementación con ScHog1 y TtTmk3 mejora el crecimiento bajo estrés osmótico, particularmente en presencia de sales. Ensayos de crecimiento por goteo en medio SD-ura y en presencia de 1 M NaCl, 1 M KCl y 2 M sorbitol, utilizando diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-4}). Se analizaron la cepa silvestre (WT), la cepa *hog1Δ* transformada con el plásmido vacío

(PV) y las cepas complementadas. Las gráficas muestran las cinéticas de crecimiento (OD_{600}) en las mismas condiciones experimentales.

Por último, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial seguido de una prueba post hoc de Tukey para analizar todos los datos obtenidos a partir de las cinéticas de crecimiento (Figura 29). El análisis mostró que el modelo general fue altamente significativo ($p < 0.001$). Asimismo, el diagrama de Pareto de efectos estandarizados (Anexo 9) indicó que los factores principales (osmolito, concentración de osmolito, tiempo de lectura y cepa), así como sus interacciones dobles, triples y cuádruple, presentaron efectos significativos.

Las comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey revelaron que los tres osmolitos evaluados (NaCl, KCl y sorbitol) no presentaron diferencias significativas entre sí, ya que se agruparon en el mismo grupo estadístico (grupo b). De manera similar, para la concentración del osmolito, las concentraciones intermedias (0.75 M para NaCl y KCl, y 1.5 M para sorbitol) y más alta evaluadas se agruparon en el mismo grupo estadístico (grupo b), mientras que la concentración más baja (0.5 M para NaCl y KCl, y 1 M para sorbitol) mostró una respuesta significativamente mayor. Por esta razón, los datos correspondientes a las concentraciones intermedias fueron excluidos con la finalidad de facilitar la comparación entre los tratamientos.

Respecto a las cepas evaluadas, la cepa WT presentó el menor crecimiento promedio, seguida de la cepa PV. En contraste, las cepas complementadas Schog1 y TtTmk3 se agruparon conjuntamente en el grupo a, sin diferencias significativas entre ellas. Estos resultados indican que ambas construcciones restauraron de manera similar la respuesta al estrés osmótico en la cepa mutante utilizada.

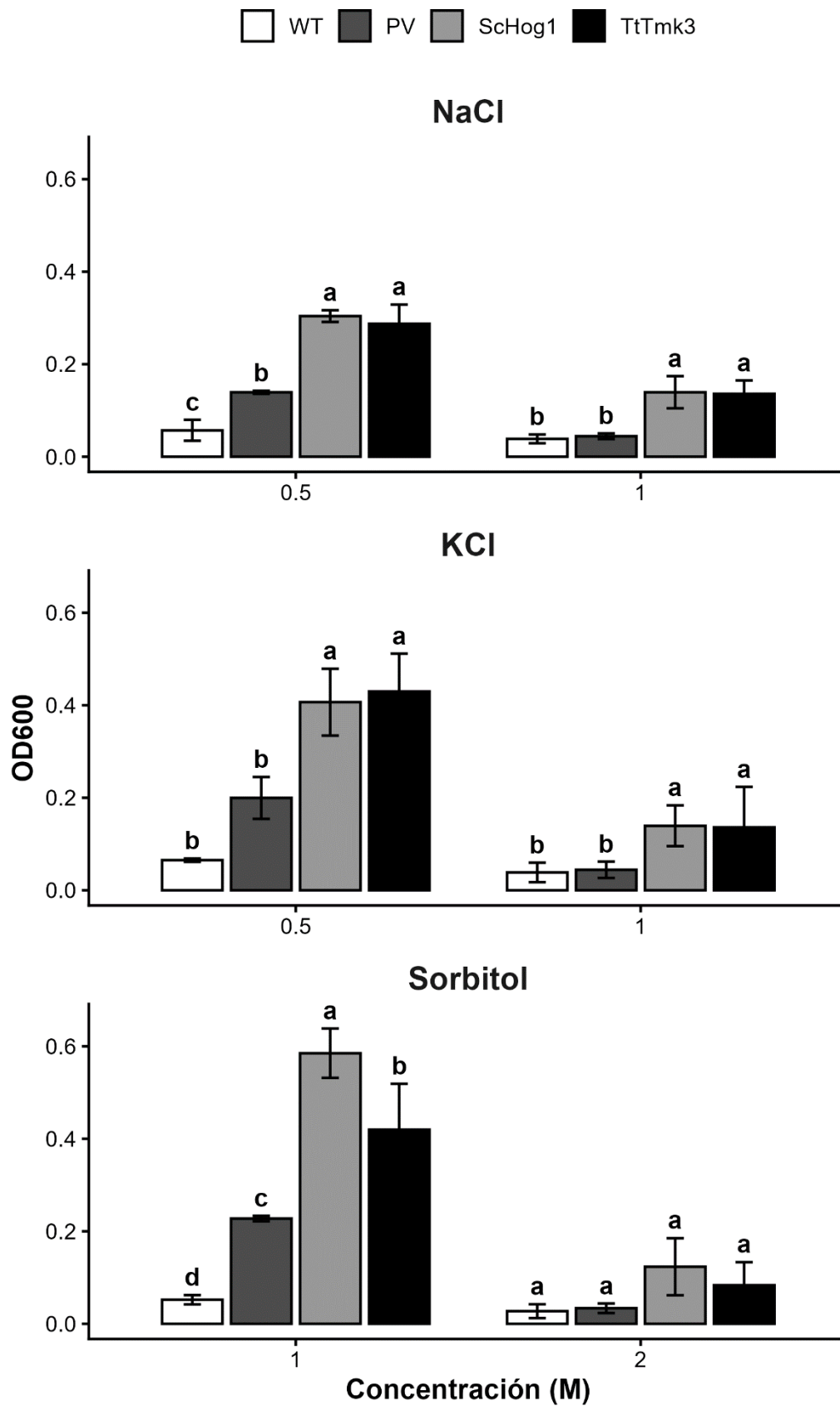


Figura 29: Comparación del crecimiento celular de la cepa silvestre (WT), la cepa *hog1Δ* transformada con el plásmido vacío (PV) y las cepas complementadas bajo estrés osmótico a diferentes concentraciones de NaCl, KCl y sorbitol. Los valores de OD₆₀₀ corresponden a mediciones a las 24 h en cultivo líquido. Las barras representan la media ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas dentro de cada tratamiento, determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$).

Las cepas complementadas ScHog1 y TtTmk3 mostraron patrones de crecimiento comparables frente al incremento en la concentración de los distintos solutos, manteniendo mayores niveles de crecimiento a lo largo de todas las condiciones evaluadas en comparación con la cepa PV, aunque con una disminución progresiva a medida que aumentó el estrés osmótico. Este comportamiento sugiere una respuesta funcional conservada entre ambas construcciones, con variaciones dependientes del tipo de soluto. En contraste, la cepa PV presentó una marcada reducción en el crecimiento a partir de concentraciones superiores a 0.5 M, estos resultados concuerdan con lo observado en los ensayos de crecimiento en placa.

Las cepas complementadas ScHog1 y TtTmk3 mostraron patrones de crecimiento similares frente al incremento en la concentración de los distintos osmolitos, manteniendo en todas las condiciones evaluadas niveles de crecimiento superiores a los observados en la cepa portadora del vector vacío (PV). Aunque ambas cepas presentaron una disminución gradual del crecimiento conforme aumentó el estrés osmótico, conservaron una mayor capacidad de adaptación en comparación con los controles. Este comportamiento coincide con los resultados del análisis estadístico, donde ScHog1 y TtTmk3 se agruparon en el mismo grupo estadístico (grupo a), sin diferencias significativas entre ellas, mientras que PV presentó una respuesta significativamente menor (grupo b) y la cepa WT la menor respuesta promedio (grupo c). De igual manera, las comparaciones de Tukey realizadas para cada tratamiento mostraron que ScHog1 y TtTmk3 compartieron la misma agrupación estadística en la mayoría de las condiciones evaluadas, particularmente en los tratamientos con NaCl y KCl, donde ambas cepas se ubicaron en el grupo de mayor crecimiento. En 1 M de sorbitol se observó una diferencia significativa entre ambas cepas, con ScHog1 clasificada en el grupo a y TtTmk3 en el grupo b, sin embargo, ambas mantuvieron valores de crecimiento superiores a los registrados para PV y WT. En conjunto, estos resultados indican que la complementación de TtTmk3 restaura la respuesta al estrés osmótico de manera comparable a la obtenida con el gen endógeno de la levadura, sugiriendo una conservación funcional entre ambas quinasas.

8.6. Generación de la línea transformada *T. atroviride* y *T. tlahuicanensis* para la expresión del biosensor SED1.

Se realizó la purificación por lisis alcalina del plásmido pUE10:SED1, construcción que se generó durante el desarrollo de mi tesis de licenciatura (ver Anexo 3). Posteriormente, se linealizaron 5 µg del plásmido con la enzima *Bgl*I (Figura 30). Una vez linealizado, se precipitó añadiendo isopropanol y acetato de sodio 3 M. Finalmente, el DNA precipitado fue lavado con etanol al 70 % con el objetivo de eliminar impurezas y restos de reactivos utilizados durante el proceso de digestión y precipitación.

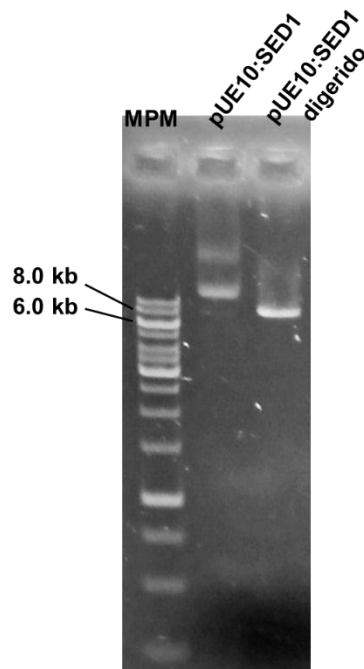


Figura 30: Patrón de restricción obtenido por la digestión del plásmido pUE10:SED1 con la enzima de restricción *Bgl*I. El tamaño esperado del plásmido digerido es de 8809 pb. Se cargo también el plásmido superenrollado.

Este plásmido lineal se transformó tanto en *T. atroviride* como en *T. tlahuicanensis* siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 5. Para cada hongo se prepararon tres mezclas distintas: en la primera, se combinaron protoplastos con plásmido en su forma lineal; en la segunda, conidias con 5 µg plásmido en forma circular (superenrollado); y en la tercera, se utilizaron únicamente conidias suspendidas en agua Milli-Q, sirviendo como control negativo. Esta última mezcla se sembró en dos placas de Petri, una suplementada con antibiótico (higromicina a 100 µg/mL o 150 µg/mL, dependiendo del caso), y otra sin antibiótico, con el objetivo de observar la viabilidad de las conidias después de la electroporación y la especificidad de la selección de colonias transformadas.

En el caso de *T. atroviride*, se obtuvieron nueve colonias transformadas, las cuales fueron posteriormente aisladas en cultivos individuales en medio PDA suplementado con higromicina (100 µg/mL). Por otro lado, en *T. thalhuicanensis*, se obtuvo una única colonia transformada, proveniente de la mezcla con el plásmido en su forma superenrollada. Para confirmar la integración del constructo, se realizó la amplificación de un fragmento del biosensor comprendido entre las secuencias que codifican para mCerulean3 y AtLEA4-5, obteniéndose un producto de 395 pb (Figura 31).

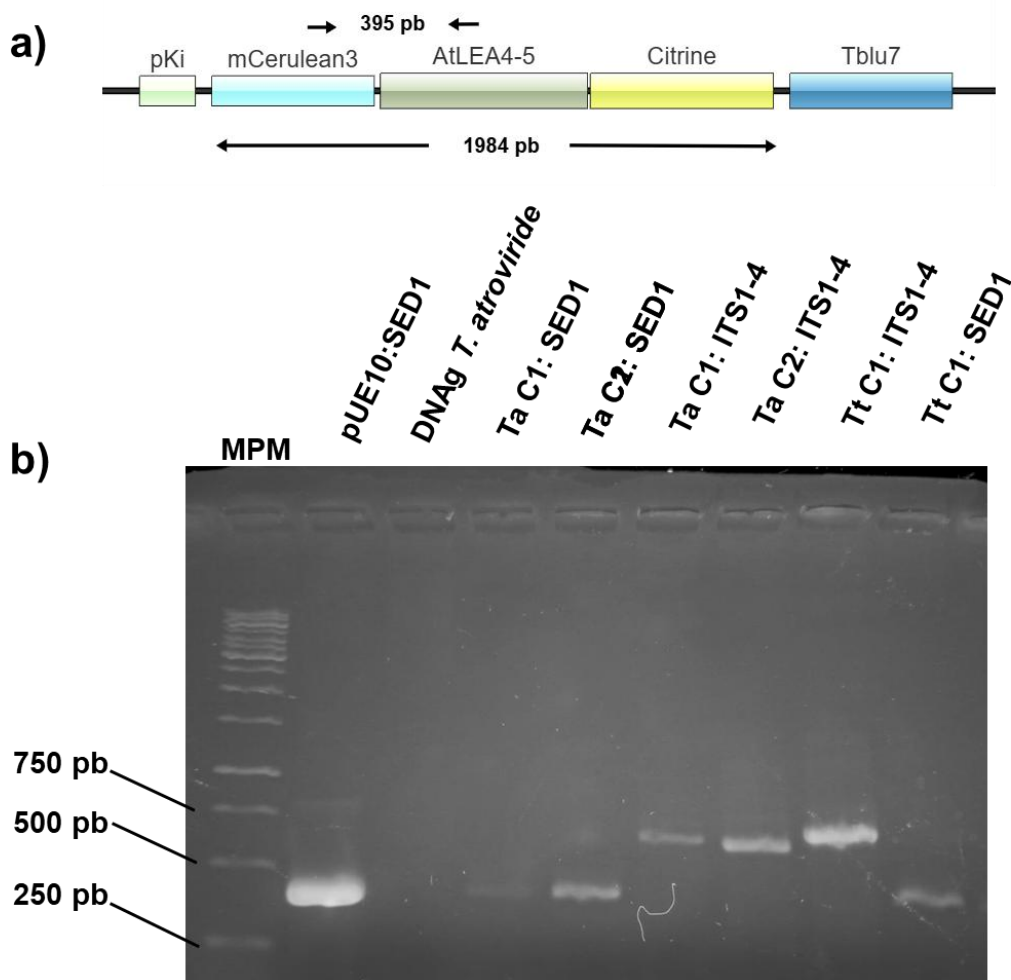


Figura 31: a) Esquema de los elementos que componen al biosensor SED1 en el plásmido pUE10:SED1 con la región que se amplifica con los oligo internos y b) selección de colonias positivas de las dos cepas de *Trichoderma* que muestran la amplificación de una región del biosensor SED1. Se utilizaron como controles el DNA plasmídico de pUE10:SED1, la secuencia ITS1-4 como control de la extracción de DNA en la PCR de colonia, y como control negativo, el DNA genómico de *T. atroviride*. Ta= *T. atroviride*, Tt=*T. thalhuicanensis*.

De las colonias positivas obtenidas de *T. atroviride*, se llevaron a cabo microcultivos con el fin de seleccionar aquellas que tuvieran fluorescencia homogénea en las hifas. Los

microcultivos se dejaron creciendo durante 7 días a 28 °C, ya que las colonias transformadas muestran un crecimiento lento. (Figura 32).

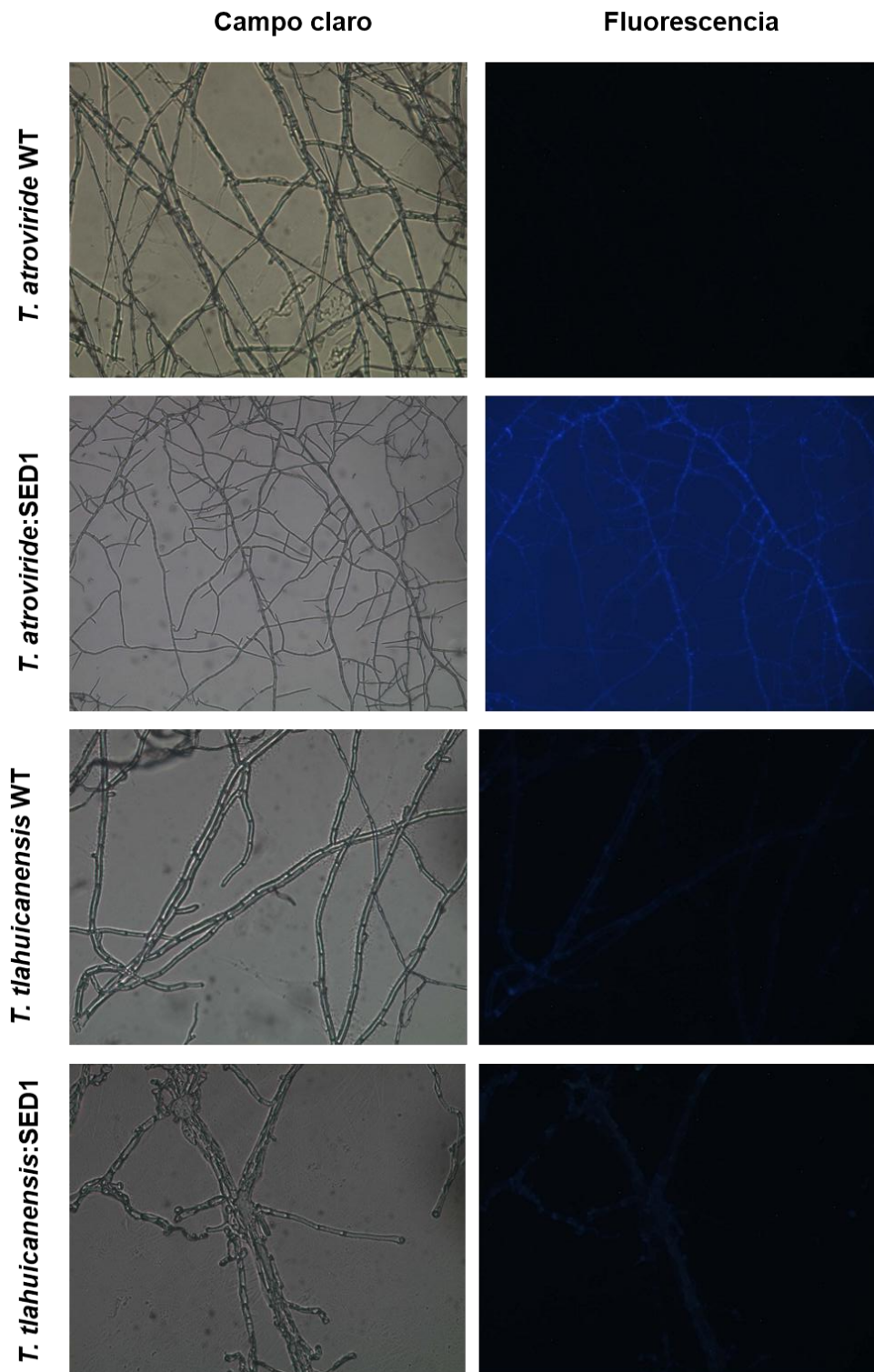


Figura 32: Selección de colonias transformadas con el plásmido pUE10:SED1 por microscopía de fluorescencia. La fluorescencia es emitida por la proteína mCerulean3 que actúa como donadora en el fenómeno FRET. Filtro de excitación DAPI (Ex: 358 nm, Em: 463 nm), este permite la excitación de la proteína fluorescente mCerulean3 (donante FRET). Microscopio de fluorescencia ZEISS Axio Observer 5.

Dado que las cepas de *Trichoderma* transformadas con el biosensor SED1 no esporularon en los medios de cultivo empleados inicialmente, se optó por evaluar nuevas condiciones que favorezcan la esporulación. Para ello, se utilizaron medios alternativos a los óptimos para hongos como medio V8 (jugo de verduras V8 30 % (v/v), 0.2% CaCO₃, 1.5 % agar bacteriológico), utilizado para la inducción de estructuras reproductivas en hongos filamentosos (Figura 33). Además, se aplicaron lesiones mecánicas controladas sobre el micelio en desarrollo, con el objetivo de inducir una respuesta fisiológica que favorezca la formación de esporas. Estas estrategias buscaron obtener esporas para llevar a cabo los ensayos de FRET, necesarios para analizar los cambios en la respuesta osmótica en estas cepas.

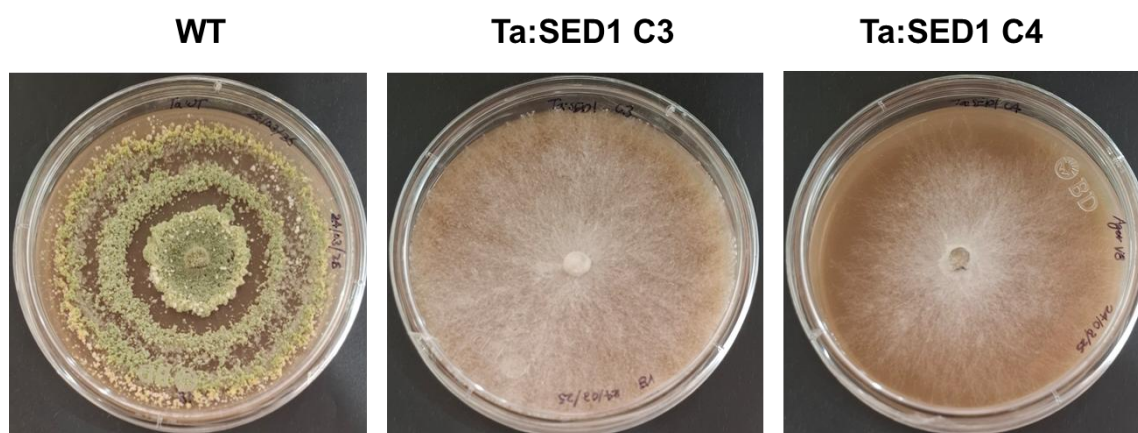


Figura 33: Comparación entre la cepa WT de *T. atroviride* con esporulación evidente (izquierda) y clonas sin esporulación (derecha) cultivadas en medio V8. Se observa la incapacidad de las clonas para formar estructuras reproductivas bajo las condiciones evaluadas.

Debido a las limitaciones que presentaron estas clonas para la esporulación, así como a su crecimiento micelial atípico en hongos de *Trichoderma*, se optó por realizar una nueva transformación empleando un protocolo alternativo que incrementa la eficiencia en la obtención de clonas. Este protocolo, estandarizado para hongos del género *Trichoderma*, se basa en la generación de protoplastos (Anexo 6). La transformación se llevó a cabo con los dos hongos. En este caso, el plásmido pUE10:SED1 no fue linealizado, ya que, al contar con un único sitio de recombinación, correspondiente al terminador *blu17*, no es necesario utilizar el plásmido en forma lineal (Figura 34.a). Es importante señalar que este sitio de recombinación es único en *T. atroviride*, por lo tanto, se espera que en las clonas de *T. tlahuicacensis* la inserción suceda aleatoriamente o que la integración ocurra

de

manera

ectópica.

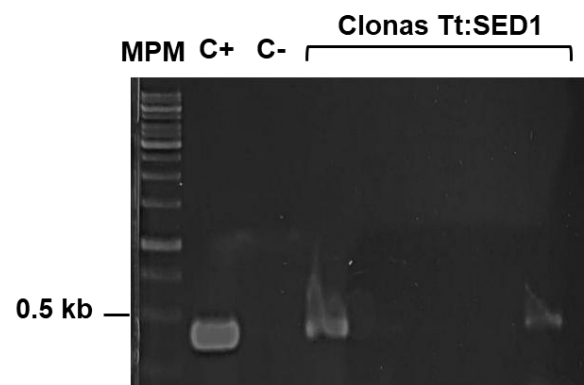
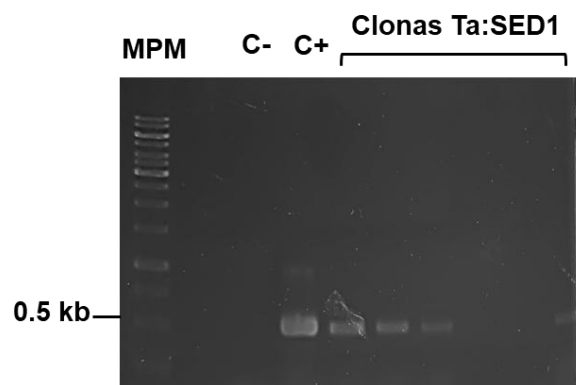
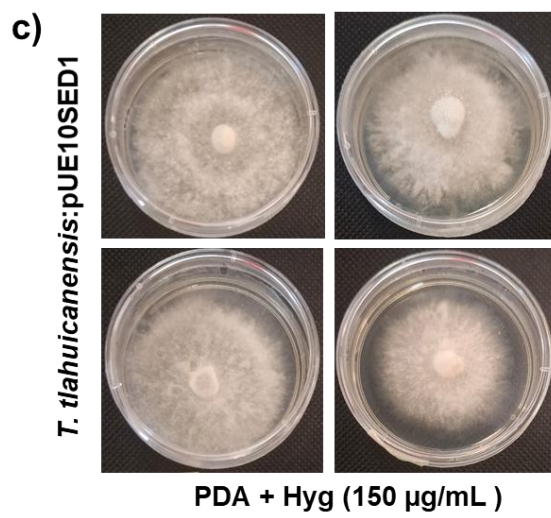
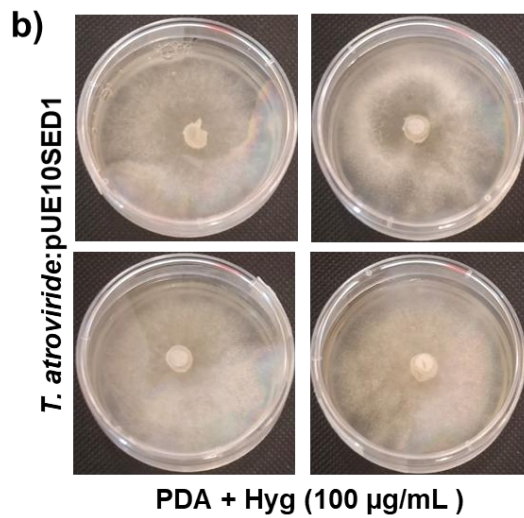
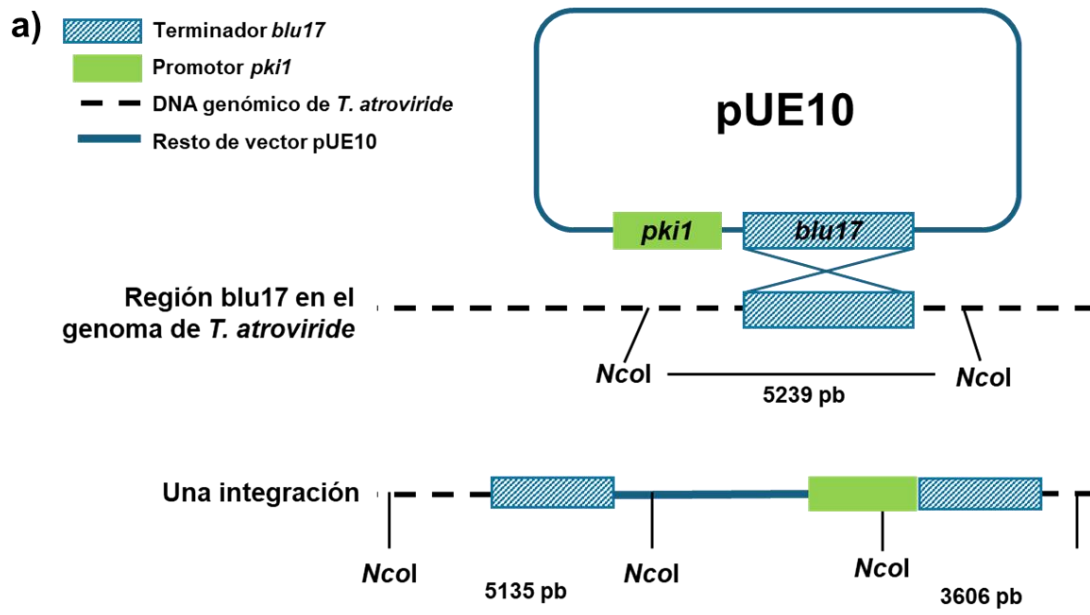


Figura 34: Obtención de clonas transformadas de *T. atroviride* y *T. tlahuicanensis* por el método de protoplastos. a) Patrón de integración del plásmido pUE10 en el genoma de *T. atroviride* (Modificado de Balcázar-López, 2014. Tesis de doctorado, Balcázar-López *et al.*, 2016). Crecimiento de 5 días clonas transformadas y selección por PCR de b) *T. atroviride* creciendo en PDA suplementado con 100 µg/ml de Higromicina B y c) *T. tlahuicanensis* crecidas en 150 µg/mL del mismo antibiótico. MPM: Marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb.

La transformación en *T. atroviride* dio como resultado la obtención de 9 clonas aisladas en medio selectivo con higromicina. Adicionalmente, al realizar una reacción suplementada con espermatozoos de salmón (2 mg/mL), se obtuvieron 13 colonias. En el caso de *T. tlahuicanensis*, se obtuvieron 21 colonias, mientras que en la condición con espermatozoos de salmón se recuperaron 3 colonias. La confirmación de clonas positivas se llevó a cabo mediante PCR, amplificando una región del biosensor de 395 pb; en *T. tlahuicanensis* únicamente se obtuvieron 3 colonias positivas (Figura 34. b y c).

Una vez seleccionadas por PCR, se realizaron microcultivos con el objetivo de verificar la fluorescencia y seleccionar aquellas clonas que presentaran una señal más uniforme a lo largo de las hifas. Sin embargo, en los microcultivos no se observó fluorescencia en ninguna de las clonas, a diferencia de las cepas WT, donde se detectó una ligera autofluorescencia. Debido a esta limitación observada en la microscopía de fluorescencia y a la presencia de autofluorescencia, se optó por realizar una prueba en el espectrofluorómetro bajo las condiciones descritas en la metodología (7.2.5), empleando esferas de micelio crecidas en medio PDB con higromicina. Los espectros de emisión obtenidos tras la excitación a 433 nm mostraron que la cepa silvestre presentó una señal basal atribuible a autofluorescencia. En *T. atroviride*:SED1 no se observó un incremento significativo en la emisión, lo que sugiere una baja expresión o funcionalidad limitada del biosensor en esta especie. En contraste, *T. tlahuicanensis*:SED1 mostró un aumento moderado en la intensidad de emisión, particularmente en la región correspondiente al donador (480 nm), así como una ligera señal en la región del aceptor (520-530 nm). Sin embargo, no se detectó un incremento marcado en la emisión del aceptor que indique una transferencia de energía eficiente, sugiriendo una baja eficiencia de FRET bajo las condiciones evaluadas. Estos datos concuerdan con los resultados de microscopía, donde no se observa una fluorescencia clara en las clonas.

9. Discusión

La vía de respuesta a alta osmolaridad (HOG) es una vía de señalización altamente conservada en los organismos eucariotas, la cual permite la respuesta y adaptación a condiciones osmóticas fluctuantes mediante la activación de la MAP quinasa Hog1. Esta proteína regula diversos procesos celulares, tales como la acumulación de glicerol, la reprogramación transcripcional, la adaptación fisiológica, entre otros (Brewster *et al.*, 1993; Hohmann, 2002; Saito & Posas, 2012). En este contexto, la caracterización funcional de proteínas ortólogas a Hog1 en otros organismos resulta relevante para comprender el grado de conservación y las variaciones en la respuesta osmótica entre especies. Además, se ha descrito que esta vía no solo responde al estrés osmótico, sino que actúa como un sistema integrador de múltiples señales ambientales, incluyendo estrés oxidativo, térmico y de pared celular, coordinando respuestas fisiológicas complejas a través de la regulación transcripcional y metabólica (Gasch *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2002; Yaakoub *et al.*, 2022).

Bajo este marco, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* es capaz de restaurar la tolerancia al estrés osmótico en la cepa *hog1Δ* de *S. cerevisiae*, lo que sugiere que conserva la función de las MAP quinasa tipo Hog1. Sin embargo, la recuperación observada es ligeramente menor que el nivel del gen nativo ScHog1, lo que podría evidenciar diferencias en la eficiencia de la señalización dentro de un contexto heterólogo. Este comportamiento se observa de manera consistente en los ensayos de crecimiento en placa, donde la cepa silvestre mostró el mayor crecimiento a lo largo de todas las diluciones, seguida por la complementada con ScHog1 y, en menor medida, por la complementada con TtTmk3, lo que refuerza que la eficiencia funcional difiere entre estas variantes. Este comportamiento no es exclusivo de este ortólogo, ya que en el hongo halófilo *W. ichthyophaga* se han descrito dos ortólogos de Hog1 (WiHog1A y WiHog1B) con diferencias funcionales mostradas en los ensayos de complementación en *S. cerevisiae*, en estos, ambos genes fueron capaces de restaurar parcialmente el fenotipo de osmotolerancia, sin embargo, WiHog1B mostró una mayor eficiencia en la recuperación del crecimiento bajo condiciones de alta salinidad en comparación con WiHog1A. Estas diferencias se asociaron con variaciones en la activación y la regulación de la vía de HOG, particularmente en la dinámica de fosforilación y localización celular de las proteínas (Lenassi *et al.*, 2013). De manera similar, en la levadura halotolerante *D. hansenii* se ha demostrado que su ortólogo presenta un patrón de activación distinto al observado en otros organismos. Los estudios funcionales han mostrado que DhHog1 permanece fosforilado durante periodos prolongados bajo condiciones de alta salinidad, lo que contrasta con la activación transitoria reportada en la mayoría de organismos. Este comportamiento se asocia con una mayor capacidad de adaptación y crecimiento en ambientes con elevadas concentraciones de NaCl. Esto es relevante en el contexto de este trabajo, ya que

refuerza la idea de que no solo la presencia Hog1 es clave, sino también su dinámica de activación influye directamente en la eficiencia de la respuesta osmótica. Evidencia en hongos halófilos sugiere que estas diferencias también pueden originarse en la regulación de los componentes río arriba de la vía HOG. En *W. ichthyophaga*, se ha descrito que esta vía presenta un patrón de regulación distinto al observado en *S. cerevisiae*, caracterizado por niveles basales elevados de fosforilación de Hog1 incluso en ausencia de estrés osmótico (Lenassi *et al.*, 2013). A diferencia del modelo clásico, donde la activación de Hog1 ocurre de manera transitoria en respuesta a cambios en la osmolaridad, en este organismo la activación es sostenida, lo que se ha asociado con su adaptación a ambientes hipersalinos. Estos resultados sugieren que la regulación de los componentes río arriba de la vía, como Pbs2, difiere funcionalmente, aunque los mecanismos específicos aún no están completamente caracterizados (Konte *et al.*, 2016). En concordancia, la menor eficiencia observada para TtTmk3 podría estar relacionada con diferencias en su regulación o activación dentro del sistema heterólogo, lo que limita su capacidad para sostener una respuesta adaptativa robusta frente al estrés (Román *et al.*, 2007). Por otro lado, en la levadura *Kluyveromyces lactis* se ha reportado que la activación de Hog1 en respuesta a estrés osmótico es menos eficiente en comparación con *S. cerevisiae*. Estos estudios demostraron que, bajo condiciones de alta osmolaridad, la fosforilación de Hog1 es menor, lo que se traduce en una respuesta celular limitada frente al estrés osmótico. Esto se asocia con una capacidad reducida de adaptación osmótica, evidenciando nuevamente que la regulación de la vía HOG varía entre especies. Este comportamiento se puede comparar con lo observado en este trabajo, ya que, a pesar de que TtTmk3 es funcional, no se observa la misma capacidad para restaurar de la misma forma que con el gen endógeno de la levadura, lo que sugiere diferencias en la activación o eficiencia de señalización (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015).

En el caso específico del género *Trichoderma*, estudios en *T. harzianum* han demostrado que el ortólogo de Hog1 (ThHog1) es esencial para la respuesta a estrés osmótico. En este trabajo, las mutantes carentes del gen *hog1* evidenciaron una reducción significativa en el crecimiento bajo condiciones de estrés salino y osmótico, en comparación con la cepa silvestre, lo que confirma su papel en la adaptación a estos ambientes (Delgado-Jarana *et al.*, 2006). Todos estos estudios respaldan la conservación funcional de esta MAP quinasa en hongos filamentosos y levaduras, y son consistentes con lo observado en este estudio, donde la expresión de TtTmk3 en *S. cerevisiae hog1Δ* permitió recuperar parcialmente la tolerancia al estrés osmótico. Sin embargo, la recuperación parcial sugiere que, aunque la función está conservada, su eficiencia depende de la integración adecuada del ortólogo en la vía de señalización del hospedero y de la conservación de los motivos típicos en su secuencia.

En este sentido, las diferencias observadas pueden atribuirse a la naturaleza altamente específica de la vía HOG, la cual depende de interacciones proteína-proteína finamente

reguladas. En *S. cerevisiae*, Hog1 se integra en una red de señalización compleja que incluye sensores osmóticos, proteínas adaptadoras y factores de transcripción, cuya coordinación es determinante para una respuesta eficiente (Posas *et al.*, 1996; de Nadal & Posas, 2010; Hohmann, 2015). Por lo tanto, la integración de Tmk3 en este sistema heterólogo podría estar limitada, afectando su capacidad para reproducir completamente la respuesta nativa. Un estudio que apoya esta interpretación ha sido reportado en *Trichosporonoides megachiliensis*, donde se expresó TmHog1 en una cepa *hog1Δ* de *S. cerevisiae* que permitió restaurar el crecimiento bajo estrés osmótico; sin embargo, el análisis de variantes con mutaciones demostró que alteraciones en el motivo de fosforilación y en el dominio catalítico comprometen esta capacidad, evidenciando que la funcionalidad depende críticamente de la correcta activación de la quinasa y de la integridad de sus dominios estructurales (Yoshida *et al.*, 2013). Estos resultados muestran que diferencias en la activación o en la interacción de dominios funcionales pueden contribuir a la menor eficiencia de osmoadaptación.

La expresión de *tmk3* en este trabajo fue regulada bajo el control del promotor GAL1, cuya actividad puede generar variaciones en los niveles de expresión dependiendo las condiciones fisiológicas de la célula (Stockwell *et al.*, 2015). Dado que no se evaluaron directamente los niveles de proteína mediante técnicas como Western blot, tampoco es posible descartar diferencias en la acumulación proteica entre las cepas complementadas. No obstante, la mayor recuperación del fenotipo observada en la cepa complementada podría indicar que las diferencias fenotípicas responden principalmente a la funcionalidad del gen más que al sistema de expresión o la acumulación de la proteína.

Por otra parte, el análisis comparativo de los distintos solutos evidenció que la respuesta celular depende no solo de la osmolaridad, sino también de la naturaleza del agente estresante. El NaCl generó una mayor inhibición del crecimiento, lo cual es consistente con su efecto osmótico/iónico, asociado a alteraciones en la homeostasis celular (Arino *et al.*, 2010). Este comportamiento ha sido descrito en levaduras halotolerantes, donde la adaptación a NaCl implica tanto la activación de la vía HOG como mecanismos de regulación iónica. En contraste, el KCl presentó un impacto menos severo, en concordancia con el papel fisiológico del potasio como principal catión intracelular (Cyert & Philpott, 2013). Por su parte, el sorbitol indujo una respuesta predominantemente osmótica, reflejada en la disminución progresiva del crecimiento con el incremento de la concentración, lo que es consistente con la activación de la vía HOG y la acumulación de glicerol como mecanismo de adaptación (Mager & Siderius, 2002). Adicionalmente, la diferencia en la respuesta celular frente a estos solutos se explica por su comportamiento en solución y su interacción con el agua y las macromoléculas, ya que los iones provenientes de NaCl y KCl generan capas de hidratación que afectan la estructura y estabilidad de proteínas y membranas, en contraste con compuestos no iónicos como el

sorbitol, cuyo efecto se limita principalmente a la reducción del potencial hídrico del medio. Estos efectos diferenciales han sido descritos en el contexto de la serie de Hofmeister, donde los iones presentan capacidades distintas para estabilizar o desestabilizar estructuras biomoleculares, influyendo en la tolerancia celular a condiciones de alta salinidad (Zhang & Cremer, 2006; Oren, 2011).

Asimismo, se ha descrito que proteínas tipo Hog1 pueden desempeñar funciones más amplias dependiendo del contexto biológico. En el hongo endófito *Piriformospora indica*, se ha demostrado que PiHog1 participa en la respuesta a estrés salino, ya que al expresar PiHog1 en plantas de arroz se observó un incremento en la tolerancia a estrés por salinidad, evidenciando una mejor supervivencia y crecimiento bajo estas condiciones. Este efecto se relaciona con una mayor capacidad antioxidante y una regulación más eficiente de genes relacionados con la respuesta a estrés, lo que sugiere que PiHog1 contribuye a modular los mecanismos moleculares y celulares que favorecen la adaptación a condiciones adversas (Jogawat *et al.*, 2016).

Finalmente, la correlación entre los ensayos de crecimiento en placa y en cultivo líquido confirma la consistencia de los fenotipos observados. La comparación entre las cepas complementadas y la cepa silvestre evidenció diferencias claras en la capacidad de adaptación al estrés osmótico, donde la WT mantuvo el mayor crecimiento a lo largo de las condiciones evaluadas en los ensayos en placa, mientras que las cepas complementadas mostraron una recuperación parcial. Estos resultados indican que, aunque la complementación permite restaurar la respuesta al estrés, la eficiencia funcional no alcanza la del sistema nativo.

Un aspecto adicional abordado en este trabajo fue la evaluación de un biosensor fluorescente tipo FRET en *Trichoderma* como una nueva herramienta para estudiar la respuesta a estrés en estos hongos. Aunque la presencia del transgén fue confirmada mediante PCR, no se detectó señal de fluorescencia, lo que sugiere limitaciones a nivel de expresión o funcionalidad proteica. Este fenómeno ha sido descrito en hongos filamentosos, donde la expresión de proteínas fluorescentes depende de factores como el contexto celular y el plegamiento adecuado de la proteína (Lorang *et al.*, 2001). Además, la expresión heteróloga puede resultar ineficiente y presentar limitaciones en su producción y procesamiento (Meyer, 2008), y la correcta maduración del fluoróforo es indispensable para su detección (Nevalainen & Peterson, 2014). Estas limitaciones son particularmente críticas en biosensores basados en FRET, cuya señal depende de la orientación y proximidad precisa de los fluoróforos. Para esclarecer el origen de esta limitación, sería necesario evaluar la expresión del transgén mediante RT-qPCR y confirmar la presencia de la proteína por Western blot. Asimismo, la optimización del sistema mediante el uso de fluoróforos más estables podría mejorar la detección de la señal (Shaner *et al.*, 2005).

10. Conclusión

El gen *tmk3* de *T. tlahuicanensis* complementa la función de Hog1 en *S. cerevisiae*, confirmando su conservación funcional, evaluada por ensayos de crecimiento en placa y cinéticas de crecimiento.

La respuesta al estrés varió según el soluto, siendo NaCl el que produjo el mayor efecto inhibitorio, seguido de KCl y sorbitol.

Los ensayos en placa y líquido mostraron resultados consistentes en las comparativa de las cepas complementantes.

Las diferencias observadas se deben a la funcionalidad del ortólogo y no al sistema de expresión GAL1.

Los hongos portadores del biosensor SED1 no mostraron fluorescencia, evidenciando limitaciones en la expresión o funcionalidad en *Trichoderma*.

11. Perspectivas

Obtener la cepa complementada con Tmk3 de *T. atroviride* permitirá comparar la eficiencia funcional entre especies halotolerantes del mismo género.

Optimizar y mejorar las condiciones de crecimiento de la cepa WT en cultivo líquido para obtener mediciones más precisas y evitar variaciones en las cinéticas.

Evaluar la activación de la vía mediante fosforilación de Tmk3 o cuantificación de glicerol permitirá correlacionar los fenotipos observados con mecanismos moleculares y bioquímicos específicos.

Confirmar la integración del biosensor en el sitio específico del genoma de *T. atroviride* (blu17) y evaluar su expresión a nivel transcripcional y proteico, ya que permitirá determinar si la ausencia de señal FRET se debe a fallas de expresión o funcionalidad.

12. Anexos.

1. Preparación de células químicamente competentes de *E. coli*. Sambrook, J., & Russell, D. W., 2001.

La preparación de células competentes de *Escherichia coli* TOP10 se lleva a cabo a partir de una colonia aislada obtenida de una placa fresca, incubada previamente entre 16 y 20 horas a 37 °C en medio LB con ácido nalidíxico (50 µl/mL). Dicha colonia se transfiere a 5 mL de medio LB contenido en un tubo de ensayo estéril y se incuba durante toda la noche (12–18 horas) a 37 °C con agitación orbital de 200 rpm. Posteriormente, se inoculan 100 mL de medio LB en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 1 mL del cultivo nocturno. El cultivo se incuba a 37 °C durante aproximadamente 3 horas, hasta alcanzar una densidad óptica (O.D.) medida a 650 nm de entre 0.4 y 0.5, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. Una vez alcanzada la D.O. requerida, el cultivo se transfiere a tubos de polipropileno estériles y se coloca en hielo durante 10 minutos. A partir de este punto y durante el resto del procedimiento, todas las manipulaciones se realizan manteniendo las células en hielo. Asimismo, se evita el uso de vortex para no comprometer la integridad celular; la resuspensión de las pastillas celulares se realiza suavemente mediante pipeteo repetido utilizando la misma punta de micropipeta. Las células se recuperan mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante es cuidadosamente descartado y la pastilla celular se resuspende en 30 mL de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M. La suspensión se incuba en hielo durante 15 minutos y posteriormente se centrifuga nuevamente a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Tras la segunda centrifugación, la pastilla celular se resuspende en 2 mL de una solución fría compuesta por CaCl₂ 0.1 M suplementada con 14 % de glicerol, por cada 50 mL de cultivo original. Finalmente, la suspensión de células competentes se alícuota en volúmenes de 400 µL en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL y se almacena a -70 °C hasta su uso.

2. Transformación de *S. cerevisiae* por el método de acetato de litio. Gietz & Schiestl, 2007.

Para hacer células competentes de *S. cerevisiae*, se cultiva cada cepa durante la noche en YPD o medio selectivo, utilizando matraces para asegurar una adecuada aireación. Se mide la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) y, si es mayor o igual a 1.0, se diluyen las células a una OD₆₀₀ de 0.1 para continuar el crecimiento por 4-6 horas; si está entre 0.2 y 1.0, se usan inmediatamente o se diluyen para uso posterior; si es menor a 0.2, se continúa el crecimiento. Las células se transfieren a tubos cónicos de 50 mL, se centrifugan por 3-5 minutos a 2500 RPM, se elimina el medio y se resuspende el pellet en 10 mL de tampón 1x LiOAc mediante vortex. Posteriormente, se centrifugan

nuevamente por 3 minutos a 2500 RPM, se descarta el líquido y se resuspende el pellet en 0.5-1.0 mL de tampón 1x LiOAc. Se dividen en alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf y se procede a la transformación. Para transformar las células, se prepara DNA portador de cadena sencilla, descongelándolo en hielo, hirviéndolo por 3 minutos y enfriándolo nuevamente en hielo. En cada tubo se combinan 100 µl de células competentes con 10 µl de DNA portador (10 mg/mL) y 5 µg de DNA plasmídico o un 25% de una PCR eficiente (máximo 10 µl de volumen total), añadiendo 280 µl de solución de PEG y mezclando vigorosamente. Se incuba por 20-45 minutos a temperatura ambiente, se agregan 43 µl de DMSO, mezclando bien, y se incuba por 5-15 minutos a 42°C, repitiendo estos dos últimos pasos una vez más. Luego, se enfría inmediatamente en hielo por 3 minutos, se centrifugan las células por 2 minutos a 1250 RPM, eliminando el líquido, y se resuspenden en 0.5 mL de agua estéril, vortexeando brevemente, centrifugando y eliminando el líquido nuevamente. Para selección auxotrófica, se resuspenden en TE buffer (200-1000 µl según el tamaño del pellet) y, para selección antifúngica, en 200 µl de YPD. Finalmente, se esparcen en placas selectivas apropiadas y se incuban por 2-3 días, considerando el uso de galactosa preferentemente para inducir la expresión del plásmido pYES2 y las auxotrofías de la cepa utilizada.

3. Purificación de DNA plasmídico mediante lisis alcalina con SDS. Sambrook, J., & Russell, D. W., 2001.

Se realiza un inóculo con la cepa de interés en 10 mL de medio LB (bactotripton 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0.5%, suplementado con el antibiótico de selección adecuado, se incuba a 37 °C a 200 rpm durante 15-18 horas. Se transfiere el medio a un tubo de 15 mL y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos. Se decanta el medio y se resuspende el pellet celular con 200 µl de la solución de lisis 1 (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0), se agita en vortex y se transfiere la suspensión a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se adicionan 400 µl de solución de lisis 2 (0.2 N NaOH, 1% SDS) preparada al momento y se agita por inversión, se incuba durante 2 minutos en hielo. Se agregan 400 µl de solución de lisis 3 (acetato de potasio 3 M, 11.5 mL ácido acético) y se mezcla por inversión, se incuba en hielo durante 3-5 minutos. Se centrifuga el lisado bacteriano a máxima velocidad (13300 rpm) durante 5 minutos. Se transfieren 600 µl de sobrenadante a un tubo nuevo y se adiciona un volumen de fenol:cloroformo, se agita con vortex durante 1 minuto y se centrifuga a max. velocidad durante 2 minutos. Se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio y se adiciona un volumen de isopropanol frío y una décima parte del volumen de acetato de sodio 3 M. Se homogeniza en vortex durante 30 segundos y se centrifuga a max. velocidad durante 5 minutos. Se resuspende el pellet de ácidos nucleicos en 100 µl de H₂O MiliQ y se agrega 1 µl de RNase (100 µl/mL) e se incuba durante 1 hora a 37 °C. Se afora a 200 µl con H₂O MiliQ y se adiciona

un volumen de fenol:cloroformo, se agita por vortex y se centrifuga a max. velocidad durante 2 minutos. Se recupera la fase acuosa y se adiciona un volumen de isopropanol y un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, se centrifuga a max. velocidad durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se adicionan 200 µl de etanol al 70%, se centrifuga durante 2 minutos a max. velocidad. Se retira el sobrenadante y se resuspende en 50 µl de H₂O MiliQ.

4. Condiciones de amplificación, digestiones enzimáticas y ligación.

1.1. Amplificación de TtTmk3 a partir de cDNA

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	30
Alineamiento	61.7	40 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	1 min	1

1.2. Amplificación de Schog1 a partir de DNA genómico

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	30
Alineamiento	58	40 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	1 min	1

1.3. Amplificación de TaTmk3 a partir de cDNA

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	30
Alineamiento	58	40 seg	
Extensión	72	35 seg	
Extensión final	72	1 min	1

1.4. Amplificación de un fragmento del biosensor SED1 dentro del plásmido pUE10:SED1

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	30
Alineamiento	61	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	5 min	1

1.5. Digestión de plásmido pYES2 y amplicón TtTmk3

	pYES2	TtTmk3
Reactivos	Cantidad	
DNA objetivo	5 µg	1.5-2 µg
Buffer Tango (10X)	10 µl (2X)	10 µl (2X)
<i>EcoRI</i> (10 U/µl)	1 µl	0.5 µl
<i>XbaI</i> (10 U/µl)	1 µl	0.5 µl
H ₂ O MiliQ	to 50 µl	to 50 µl

1.6. Digestión de plásmido pYES2 y amplicón SchHog1

	pYES2	SchHog1
Reactivos	Cantidad	
DNA objetivo	5 µg	1.5-2 µg
Buffer Tango (10X)	10 µl (2X)	10 µl (2X)
<i>BamHI</i> (10 U/µl)	1 µl	0.5 µl
<i>XbaI</i> (10 U/µl)	1 µl	0.5 µl
H ₂ O MiliQ	to 50 µl	to 50 µl

1.7. Digestión del plásmido pYES2 y amplicón TaTmk3

	pYES2	TaTmk3
Reactivos	Cantidad	
DNA objetivo	5 µg	1.5-2 µg
Buffer Tango (10X)	10 µl (2X)	10 µl (2X)
<i>Bam</i> HI (10 U/µl)	1 µl	0.5 µl
<i>Xba</i> I (10 U/µl)	1 µl	0.5 µl
H2O MiliQ	to 50 µl	to 50 µl

1.8. Digestión de plásmido pUE10:SED1

Reactivos	Cantidad
DNA objetivo	5 µg
Buffer O (10X)	5 µl (1X)
<i>Bgl</i> I (10 U/µl)	1 µl
H2O MiliQ	to 50 µl

1.9. Ligación pYES2:TtTmk3

Reactivos	Cantidad
DNA del vector	8 µl (109 ng)
DNA inserto	1.2 µl (60.8 ng)
10X T4 DNA Ligasa	2 µl (1X)
T4 DNA Ligasa	1 µl
H2O MiliQ	7.2 µl

1.10. Ligación pYES2:ScHog1.

Reactivos	Cantidad
DNA del vector	10 µl (66.3 ng)
DNA inserto	4 µl (36.8 ng)
10X T4 DNA Ligasa	4 µl (1X)
T4 DNA Ligasa	1 µl
H2O MiliQ	1 µl

1.11. Ligación pYES2:TaTmk3

Reactivos	Cantidad
DNA del vector	2 µl (50 ng)
DNA inserto	8 µl (47.5 ng)
10X T4 DNA Ligasa	4 µl (1X)
T4 DNA Ligasa	1 µl
H2O MiliQ	5 µl

1.12. Ligación de pJET1.2/blunt con TaTmk3

Reactivos	Cantidad
DNA del vector	1 µl (0.05 pmol ends)
DNA inserto	8 µl (49.6 ng)
2X Buffer de reacción	10 µl
T4 DNA Ligasa	1 µl
H2O MiliQ	Up to 20 µl

5. Transformación por electroporación de conidias. (Sánchez & Aguirre, 1996)

Se inoculan 200 mL de medio PDB (potato dextrose broth) con conidias a una densidad de 1×10^7 conidios/mL, y se incuban a 28 °C en un agitador rotatorio (180 rpm) durante 10 hrs. Los conidios se recuperan por centrifugación y se resuspenden en 400 mL de agua estéril fría, se centrifugan nuevamente, y se mezclan en 25 mL de tampón de pretratamiento frío YED (1% extracto de levadura, 1% glucosa) y 20 mM de HEPES (ajustado a pH 8.0 con 100 mM de Tris) y se incuban durante 1 h a 30 °C en un agitador rotatorio a 100 rpm. Después de esta incubación de 60 min, los conidios se centrifugan

y se resuspenden en 2.5 mL (aproximadamente 1.6×10^9 conidios/mL final) de tampón de electroporación frío (10 mM de Tris-HCl [pH 7.5], 270 mM de sacarosa, 1 mM de acetato de litio) y se mantienen sobre hielo. Para la electroporación, se agregan 1 µg de ADN linealizado a 50 µL de la suspensión de conidios fríos. El volumen final se ajusta a 60 µL con agua destilada, la mezcla se incuba sobre hielo durante 15 min y luego se transfiere a una cubeta de 0.2 cm. La electroporación se ajusta a un voltaje de 1,000 V, la capacitancia a 25 µF y la resistencia a 400 ohmios (la longitud del pulso entre 5.1 y 5.8 ms). Después de la electroporación, se agrega 1 mL de YED frío a la cubeta y se transfiere la suspensión celular a un tubo estéril de 10 mL, se mantiene sobre hielo durante 15 min y se incuba a 30 °C durante 90 min en un agitador rotatorio a 100 rpm. Los conidios sometidos a electroporación se siembran en placas de PDA suplementadas con higromicina (50 o 150 µg/mL, según sea el caso) y se incuban a 28 °C.

6. Transformación de *Trichoderma* por el método de protoplastos. Balcázar-López, 2014

Para la obtención de protoplastos, se inoculan 1×10^6 esporas/mL en 100 mL de medio GYEC (1.5 g de glucosa, 0.3 g de extracto de levadura y 0.5 g de peptona de caseína), con una suspensión de 1×10^8 conidios/mL. El cultivo se incubó a 28 °C durante 16 horas con agitación constante a 180 rpm. Posteriormente, se recolectan las germinulas por filtración a través de tela Magitel estéril y se pesan 0.2 g de micelio fresco. En un tubo Falcon de 50 mL estéril se colocan 0.08 g de Lysing enzymes from *T. harzianum* (Sigma, Cat. L-1412) y 6 mL de solución osmótica estéril (1.2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM CaCl_2 ; ajustada a pH 5.5 con KOH), posteriormente se añaden las germinulas y se homogenizan por inversión. La mezcla se incuba horizontalmente a 28 °C (o a temperatura ambiente) durante 2 h con agitación orbital de 60 rpm. La liberación de protoplastos se verifica al microscopio, observando estructuras circulares más pequeñas que las esporas.

La suspensión de protoplastos se filtra con mallas de 100 y 50 µm, y con canastas Cell Strainer de 40 µm, y se lava con 2 mL de solución osmótica. Posteriormente, se centrifuga a 8000 rpm durante 10 min, se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende suavemente en 200 µL de solución osmótica. La concentración se determina en cámara de Neubauer, ajustándola entre 1×10^7 y 1×10^8 protoplastos/mL.

Para la transformación, se mezclan 240 µL de protoplastos con 20 µL de plásmido (10–20 µg de DNA en solución osmótica) y se incuban en hielo durante 20 min. Se añaden 260 µL de PEG al 40 % precalentado a 42 °C, se mezcla suavemente y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, las mezclas de transformación se siembran en medio PDA selectivo con higromicina a una concentración final de 100

µg/mL, se mezcla cada reacción con PDA suave para asegurar la correcta distribución del antibiótico y de los protoplastos. Los controles incluyen protoplastos sin DNA sembrados en PDA con y sin higromicina.

7. Microcultivos. Anajared-Castrejon, 2023.

Dentro de una caja Petri de vidrio se genera una cámara húmeda con un papel filtro en el fondo adicionando 2 mL de agua destilada estéril, posteriormente, se realiza el montaje de un portaobjeto sobre una base de soporte y sobre este se coloca un disco de medio PDA (suplementado con higromicina, según sea el caso) y dentro de este se coloca una cantidad de esporas/mL o un pequeño pedazo de micelio del hongo de interés. Finalmente, se coloca un cubreobjeto sobre el disco de medio y se incuba a 28 °C durante el tiempo requerido por el hongo para crecer sobre el cubreobjeto.

Genomic tracks for MK3_Seg1 and TITMK31 across the MK3 gene region. The tracks show sequence alignment, consensus, and occupancy for various segments. The x-axis represents genomic coordinates from 1 to 147. The y-axis lists the tracks: MK3_Seg1, TITMK31, Consensus, and Occupancy. The tracks are color-coded: green for high occupancy, yellow for medium, and red for low. The occupancy track shows a series of bars representing the relative frequency of each segment. The consensus track shows the most common sequence for each segment. The sequence alignment tracks show the specific nucleotide sequences for each segment.

1 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 420 440 460 480 500 520 540 560 580 600 620 640 660 680 700 720 740 760 780 800 820 840 860 880 900 920 940 960 980 1000 1020 1040 1060 1080 1100 1120 1140 1160 1180 1200 1220 1240 1260 1280 1300 1320 1340 1360 1380 1400 1420 1440 1460 1480 1500 1520 1540 1560 1580 1600 1620 1640 1660 1680 1700 1720 1740 1760 1780 1800 1820 1840 1860 1880 1900 1920 1940 1960 1980 2000 2020 2040 2060 2080 2100 2120 2140 2160 2180 2200 2220 2240 2260 2280 2300 2320 2340 2360 2380 2400 2420 2440 2460 2480 2500 2520 2540 2560 2580 2600 2620 2640 2660 2680 2700 2720 2740 2760 2780 2800 2820 2840 2860 2880 2900 2920 2940 2960 2980 3000 3020 3040 3060 3080 3100 3120 3140 3160 3180 3200 3220 3240 3260 3280 3300 3320 3340 3360 3380 3400 3420 3440 3460 3480 3500 3520 3540 3560 3580 3600 3620 3640 3660 3680 3700 3720 3740 3760 3780 3800 3820 3840 3860 3880 3900 3920 3940 3960 3980 4000 4020 4040 4060 4080 4100 4120 4140 4160 4180 4200 4220 4240 4260 4280 4300 4320 4340 4360 4380 4400 4420 4440 4460 4480 4500 4520 4540 4560 4580 4600 4620 4640 4660 4680 4700 4720 4740 4760 4780 4800 4820 4840 4860 4880 4900 4920 4940 4960 4980 5000 5020 5040 5060 5080 5100 5120 5140 5160 5180 5200 5220 5240 5260 5280 5300 5320 5340 5360 5380 5400 5420 5440 5460 5480 5500 5520 5540 5560 5580 5600 5620 5640 5660 5680 5700 5720 5740 5760 5780 5800 5820 5840 5860 5880 5900 5920 5940 5960 5980 6000 6020 6040 6060 6080 6100 6120 6140 6160 6180 6200 6220 6240 6260 6280 6300 6320 6340 6360 6380 6400 6420 6440 6460 6480 6500 6520 6540 6560 6580 6600 6620 6640 6660 6680 6700 6720 6740 6760 6780 6800 6820 6840 6860 6880 6900 6920 6940 6960 6980 7000 7020 7040 7060 7080 7100 7120 7140 7160 7180 7200 7220 7240 7260 7280 7300 7320 7340 7360 7380 7400 7420 7440 7460 7480 7500 7520 7540 7560 7580 7600 7620 7640 7660 7680 7700 7720 7740 7760 7780 7800 7820 7840 7860 7880 7900 7920 7940 7960 7980 8000 8020 8040 8060 8080 8100 8120 8140 8160 8180 8200 8220 8240 8260 8280 8300 8320 8340 8360 8380 8400 8420 8440 8460 8480 8500 8520 8540 8560 8580 8600 8620 8640 8660 8680 8700 8720 8740 8760 8780 8800 8820 8840 8860 8880 8900 8920 8940 8960 8980 9000 9020 9040 9060 9080 9100 9120 9140 9160 9180 9200 9220 9240 9260 9280 9300 9320 9340 9360 9380 9400 9420 9440 9460 9480 9500 9520 9540 9560 9580 9600 9620 9640 9660 9680 9700 9720 9740 9760 9780 9800 9820 9840 9860 9880 9900 9920 9940 9960 9980 10000 10020 10040 10060 10080 10100 10120 10140 10160 10180 10200 10220 10240 10260 10280 10300 10320 10340 10360 10380 10400 10420 10440 10460 10480 10500 10520 10540 10560 10580 10600 10620 10640 10660 10680 10700 10720 10740 10760 10780 10800 10820 10840 10860 10880 10900 10920 10940 10960 10980 11000 11020 11040 11060 11080 11100 11120 11140 11160 11180 11200 11220 11240 11260 11280 11300 11320 11340 11360 11380 11400 11420 11440 11460 11480 11500 11520 11540 11560 11580 11600 11620 11640 11660 11680 11700 11720 11740 11760 11780 11800 11820 11840 11860 11880 11900 11920 11940 11960 11980 12000 12020 12040 12060 12080 12100 12120 12140 12160 12180 12200 12220 12240 12260 12280 12300 12320 12340 12360 12380 12400 12420 12440 12460 12480 12500 12520 12540 12560 12580 12600 12620 12640 12660 12680 12700 12720 12740 12760 12780 12800 12820 12840 12860 12880 12900 12920 12940 12960 12980 13000 13020 13040 13060 13080 13100 13120 13140 13160 13180 13200 13220 13240 13260 13280 13300 13320 13340 13360 13380 13400 13420 13440 13460 13480 13500 13520 13540 13560 13580 13600 13620 13640 13660 13680 13700 13720 13740 13760 13780 13800 13820 13840 13860 13880 13900 13920 13940 13960 13980 14000 14020 14040 14060 14080 14100 14120 14140 14160 14180 14200 14220 14240 14260 14280 14300 14320 14340 14360 14380 14400 14420 144

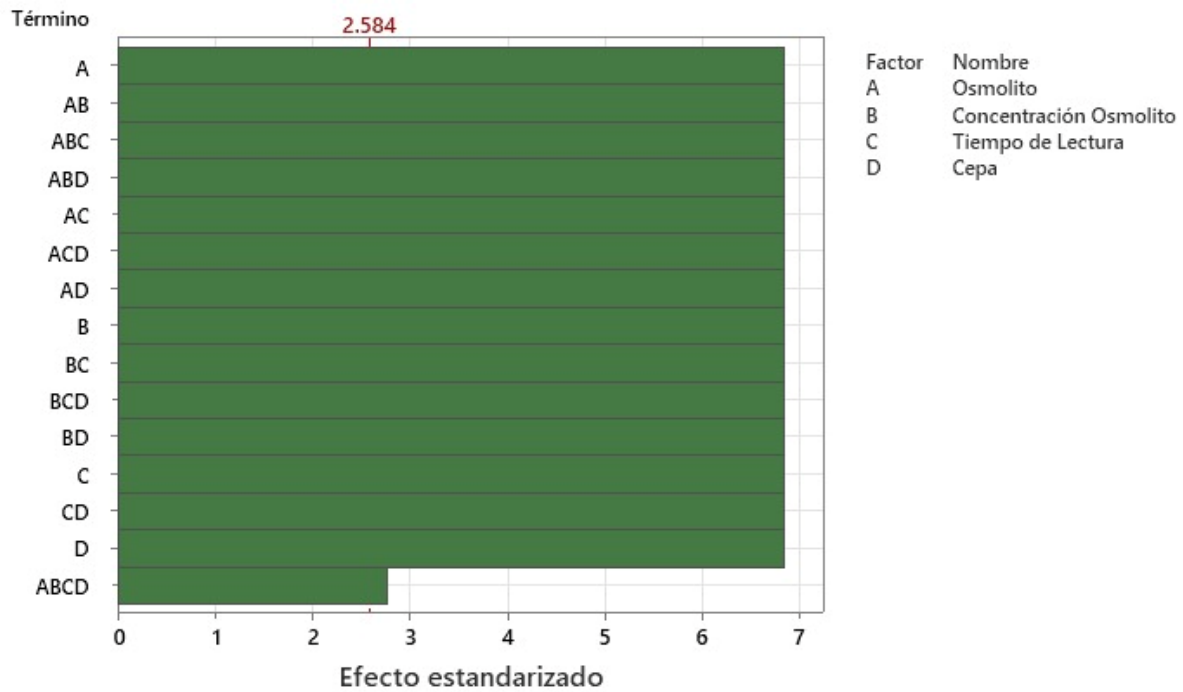
9. Análisis de varianza multifactorial para datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento en medio líquido

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.
Modelo	287	18.1971	0.06340
Lineal	13	10.7453	0.82656
Osmolito	3	2.6183	0.87277
Concentración Osmolito	2	0.3990	0.19950
Tiempo de Lectura	5	6.0756	1.21513
Cepa	3	1.6523	0.55078
Interacciones de 2 términos	61	5.9447	0.09745
Osmolito*Concentración Osmolito	6	0.2686	0.04477
Osmolito*Tiempo de Lectura	15	2.1866	0.14577
Osmolito*Cepa	9	1.1060	0.12289
Concentración Osmolito*Tiempo de Lectura	10	0.2907	0.02907
Concentración Osmolito*Cepa	6	0.1116	0.01860
Tiempo de Lectura*Cepa	15	1.9811	0.13208
Interacciones de 3 términos	123	1.4247	0.01158
Osmolito*Concentración Osmolito*Tiempo de Lectura	30	0.1654	0.00551
Osmolito*Concentración Osmolito*Cepa	18	0.0951	0.00528
Osmolito*Tiempo de Lectura*Cepa	45	1.0476	0.02328
Concentración Osmolito*Tiempo de Lectura*Cepa	30	0.1165	0.00388
Interacciones de 4 términos	90	0.0825	0.00092
Osmolito*Concentración Osmolito*Tiempo de Lectura*Cepa	90	0.0825	0.00092
Error	576	0.3614	0.00063
Total	863	18.5585	

Fuente	Valor F	Valor p
Modelo	101.06	0.000
Lineal	1317.42	0.000
Osmolito	1391.07	0.000
Concentración Osmolito	317.98	0.000
Tiempo de Lectura	1936.74	0.000
Cepa	877.86	0.000
Interacciones de 2 términos	155.33	0.000
Osmolito*Concentración Osmolito	71.36	0.000
Osmolito*Tiempo de Lectura	232.34	0.000
Osmolito*Cepa	195.87	0.000
Concentración Osmolito*Tiempo de Lectura	46.34	0.000
Concentración Osmolito*Cepa	29.65	0.000
Tiempo de Lectura*Cepa	210.51	0.000
Interacciones de 3 términos	18.46	0.000
Osmolito*Concentración Osmolito*Tiempo de Lectura	8.79	0.000
Osmolito*Concentración Osmolito*Cepa	8.42	0.000
Osmolito*Tiempo de Lectura*Cepa	37.11	0.000
Concentración Osmolito*Tiempo de Lectura*Cepa	6.19	0.000
Interacciones de 4 términos	1.46	0.006
Osmolito*Concentración Osmolito*Tiempo de Lectura*Cepa	1.46	0.006
Error		
Total		

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados (la respuesta es Absorbancia, $\alpha = 0.01$)



Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Osmolito	N	Media Agrupación
Sin Osmolito	216	0.201764 A
Sorbitol	216	0.083435 B
KCl	216	0.079944 B
NaCl	216	0.063935 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Concentración Osmolito

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Concentración Osmolito	N	Media	Agrupación
1	288	0.135962	A
2	288	0.101601	B
3	288	0.084247	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo de Lectura

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo de Lectura	N	Media	Agrupación
24h	144	0.251340	A
20h	144	0.178278	B
16h	144	0.107882	C
12h	144	0.059417	D
8h	144	0.026382	E
4h	144	0.020319	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Cepa

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Cepa	N	Media	Agrupación
TMK3	216	0.147389	A
HOG1	216	0.141509	A
Pyes2	216	0.102519	B
WT	216	0.037662	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

13. Referencias

- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 74(1), 95–120. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-09>
- Bahn, Y.-S., Kojima, K., Cox, G. M., & Heitman, J. (2005). Specialization of the HOG Pathway and Its Impact on Differentiation and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(5), 2285–2300. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-0987>
- Balcázar-López, E., Méndez-Lorenzo, L. H., Batista-García, R. A., Esquivel-Naranjo, U., Ayala, M., Kumar, V. V., Savary, O., Cabana, H., Herrera-Estrella, A., & Folch-Mallol, J. L. (2016). Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. *PloS one*, 11(2), e0147997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147997>
- Bai, C., Tesker, M., & Engelberg, D. (2015). The yeast Hot1 transcription factor is critical for activating a single target gene, STL1. *Molecular biology of the cell*, 26(12), 2357–2374. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-12-1626>
- Bajar, B. T., Wang, E. S., Zhang, S., Lin, M. Z., & Chu, J. (2016). A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors* (Basel, Switzerland), 16(9), 1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>
- Becker, E. A., Seitzer, P. M., Tritt, A., Larsen, D., Krusor, M., Yao, A. I., Wu, D., Madern, D., Eisen, J. A., Darling, A. E., & Facciotti, M. T. (2014). Phylogenetically driven sequencing of extremely halophilic archaea reveals strategies for static and dynamic osmo-response. *PLoS genetics*, 10(11), e1004784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004784>
- Bonnaud, E., Oger, P. M., Ohayon, A., & Louis, Y. (2024). Haloarchaea as Promising Chassis to Green Chemistry. *Microorganisms*, 12(8), 1738. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081738>
- Bremer, E., & Krämer, R. (2019). Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annual review of microbiology*, 73, 313–334. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115504>
- Brewster, J. L., & Gustin, M. C. (2014). Hog1: 20 years of discovery and impact. *Science signaling*, 7(343), re7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005458>
- Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., & Gustin, M. C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* (New York, N.Y.), 259(5102), 1760–1763. <https://doi.org/10.1126/science.7681220>

- Cyert, M. S., & Philpott, C. C. (2013). Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(3), 677–713. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.147207>
- Dawan, J., & Ahn, J. (2022). Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. *Microorganisms*, 10(7), 1385. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071385>
- de Nadal, E., & Posas, F. (2010). Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *The EMBO journal*, 29(1), 4–13. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.346>
- Eichler J. (2023). *Halobacterium salinarum*: Life with more than a grain of salt. *Microbiology (Reading, England)*, 169(4), 001327. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001327>
- Enriquez-Toledo, C., Ponce-Diego, C. A., & Cuevas-Velazquez, C. L. (2024). Estimation of Structural Sensitivity of Intrinsically Disordered Regions in Response to Hyperosmotic Stress in Living Cells Using FRET. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (203), 10.3791/66275. <https://doi.org/10.3791/66275>
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., & Abe, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Molecular microbiology*, 56(5), 1246–1261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04605.x>
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., & Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS microbiology reviews*, 42(3), 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
- Hernández-Oñate, M. A., Esquivel-Naranjo, E. U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., & Herrera-Estrella, A. H. (2012). An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), 14918–14923. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209396109>

- Hohmann S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 66(2), 300–372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002>
- Hohmann S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Current genetics*, 61(3), 373–382. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0>
- Hughes, K. (2013). Complementation. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., pp. 111-112). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00306-5>
- Jogawat, A., Vadassery, J., Verma, N., Sharma, R., Dua, M., Prasad, R., Varma, A., & Tuteja, N. (2016). PiHOG1, a stress regulator MAP kinase from the root endophyte fungus *Piriformospora indica*, confers salinity stress tolerance in rice plants. *Scientific Reports*, 6, 36765. <https://doi.org/10.1038/srep36765>
- Konte, T., & Plemenitas, A. (2013). The HOG signal transduction pathway in the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: identification and characterisation of MAP kinases WiHog1A and WiHog1B. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 17(4), 623–636. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0546-4>
- Konte, T., Terpitz, U., & Plemenitaš, A. (2016). Reconstruction of the High-Osmolarity Glycerol (HOG) Signaling Pathway from the Halophilic Fungus *Wallemia ichthyophaga* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00901>
- Lara-Rojas, F., Sánchez, O., Kawasaki, L., & Aguirre, J. (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Molecular microbiology*, 80(2), 436–454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07581.x>
- Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martinez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., Rollins, J. A., Wolpert, T. J., Johnson, K. B., Rodriguez, R. J., Dickman, M. B., & Ciuffetti, L. M. (2001). Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and environmental microbiology*, 67(5), 1987–1994. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.1987-1994.2001>
- Mager, W. H., & Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS yeast research*, 2(3), 251–257. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00116-2)
- Mehlmer, N., Scheikl-Pourkhalil, E., & Teige, M. (2009). Functional complementation of yeast mutants to study plant signalling pathways. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 479, 235–245. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-289-2_15

- Meyer V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi--progress, obstacles and future trends. *Biotechnology advances*, 26(2), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001>
- Miermont, A., Waharte, F., Hu, S., McClean, M. N., Bottani, S., Léon, S., & Hersen, P. (2013). Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14), 5725–5730. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215367110>
- Nevalainen, H., & Peterson, R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi are we expecting too much?. *Frontiers in microbiology*, 5, 75. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00075>
- Oren A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental microbiology*, 13(8), 1908–1923. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02365.x>
- Otlewska, A., Migliore, M., Dybka-Stępień, K., Manfredini, A., Struszczyk-Świta, K., Napoli, R., Białkowska, A., Canfora, L., & Pinzari, F. (2020). When Salt Meddles Between Plant, Soil, and Microorganisms. *Frontiers in plant science*, 11, 553087. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.553087>
- Penna, S., Negi, P., & Kumar, V. (2021). Genomics and epigenetics of plant abiotic stress. In G. Fink (Ed.), *Stress: Genetics, epigenetics and genomics* (pp. 49-56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813156-5.00005-4>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00199>
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., & Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*, 86(6), 865–875. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80162-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80162-2)
- Román, E., Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., & Pla, J. (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends in microbiology*, 15(4), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.001>
- Rzechonek, D. A., Day, A. M., Quinn, J., & Mirończuk, A. M. (2018). Influence of yIHog1 MAPK kinase on *Yarrowia lipolytica* stress response and erythritol production. *Scientific Reports*, 8, 14735. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33168-6>

- Rzechonek, D. A., Szczepańczyk, M., & Mirończuk, A. M. (2023). Mutation in *yl-HOG1* represses the filament-to-yeast transition in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02161-8>
- Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), 289–318. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140863>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., González, J., Defosse, T., Papon, N., Peña, A., & Coria, R. (2020). Contribution of the mitogen-activated protein kinase *Hog1* to the halotolerance of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Genetics*, 66(6), 1135–1153. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01099-3>
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Afridi, M. S., Mitra, D., Valencia-Cantero, E., & Macías-Rodríguez, L. (2024). *Trichoderma* and *Bacillus* multifunctional allies for plant growth and health in saline soils: recent advances and future challenges. *Frontiers in microbiology*, 15, 1423980. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1423980>
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods*, 2(12), 905–909. <https://doi.org/10.1038/nmeth819>
- Shen, W., Gao, Z., Chen, K., Zhao, A., Ouyang, Q., & Luo, C. (2022). The regulatory mechanism of the yeast osmoresponse under different glucose concentrations. *iScience*, 26(1), 105809. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105809>
- Strange K. (2004). Cellular volume homeostasis. *Advances in physiology education*, 28(1-4), 155–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00034.2004>
- Szymanski, E. P., & Kerscher, O. (2013). Budding yeast protein extraction and purification for the study of function, interactions, and post-translational modifications. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (80), e50921. <https://doi.org/10.3791/50921>
- Thombre, R. S., Shinde, V. D., Oke, R. S., Dhar, S. K., & Shouche, Y. S. (2016). Biology and survival of extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* RR12 isolated from Mumbai salterns, India in response to salinity stress. *Scientific reports*, 6, 25642. <https://doi.org/10.1038/srep25642>
- Velázquez-Zavala, N., Rodríguez-González, M., Navarro-Olmos, R., Ongay-Larios, L., Kawasaki, L., Torres-Quiroz, F., & Coria, R. (2015). Ineffective Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinase *Hog1p* in Response to High Osmotic Stress in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic cell*, 14(9), 922–930. <https://doi.org/10.1128/EC.00048-15>

- Vikromvarasiri, N., Mitsui, R., Hirasawa, T., Kondo, A., & Shirai, T. (2025). Examination of the effect of HOG1 deletion on glucose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132788>
- Welsh D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS microbiology reviews*, 24(3), 263–290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x>
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C. P., Burkholder, A., Knoche, K., & Ota, I. (2002). Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryotic cell*, 1(2), 163–173. <https://doi.org/10.1128/EC.1.2.163-173.2002>
- Wood J. M. (2011). Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual review of microbiology*, 65, 215–238. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102815>
- Yaakoub, H., Sanchez, N. S., Ongay-Larios, L., Courdavault, V., Calenda, A., Bouchara, J. P., Coria, R., & Papon, N. (2022). The high osmolarity glycerol (HOG) pathway in fungi†. *Critical reviews in microbiology*, 48(6), 657–695. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.2011834>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02702-13>
- Zhang, Y., & Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Current opinion in chemical biology*, 10(6), 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.020>
- Zhang, C., Wang, W., Hu, Y., Peng, Z., Ren, S., Xue, M., Liu, Z., Hou, J., Xing, M., & Liu, T. (2022). A novel salt-tolerant strain *Trichoderma atroviride* HN082102.1 isolated from marine habitat alleviates salt stress and diminishes cucumber root rot caused by *Fusarium oxysporum*. *BMC microbiology*, 22(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02479-0>
- Zheng, H., Qiao, M., Lv, Y., Du, X., Zhang, K. Q., & Yu, Z. (2021). New Species of *Trichoderma* Isolated as Endophytes and Saprobies from Southwest China. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 7(6), 467. <https://doi.org/10.3390/jof7060467>
- Zhou, Xin., Mehta, Sohum. & Zhang, Jin (2020). Genetically Encodable Fluorescent and Bioluminescent Biosensors Light Up Signaling Networks. *Trends in Biochemical Sciences*, (), S0968000420301481–. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.06.001>

Zi, Z., Liebermeister, W., & Klipp, E. (2010). A quantitative study of the Hog1 MAPK response to fluctuating osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. PloS one, 5(3), e9522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009522>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, 1 de junio de 2026.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **"Complementación funcional del gen *hog1* en una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen *tmk3* del hongo halotolerante *Trichoderma tlahuicanensis*"**, que presenta el C. **Josué Rebolledo Salgado** 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. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE (directora de tesis, CEIB UAEM)

Dr. JORGE LUIS FOLCH MALLOL (CEIB-UAEM)

Dr. EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ (DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA, CENTRO UNIVERSITARIO CIENCIAS EXACTAS E INGENIERÍAS, UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA)

Dr. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO (CEIB-UAEM)

Dr. CÉSAR LUIS CUEVAS VELAZQUEZ (CEIB-UAEM)





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

EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ | Fecha:2026-06-01 16:01:54 | FIRMANTE

GskKZZVZ0XuAzpOTY+kKxwspnfTcxuJy1N1npYECqSaylKmtaiMCzx1aJ8G0qrqvYdoA7sOxbBiJPR4qd0Wbn3Cw2472WpshT2o95NdZB2pAQQmM4WJZ1EHbdPe8EBq1x5EQ
ENqTa0+CJ460bfxB5VAqYiaYU+T2I9Af2HbyoQccLJQqnIWNxd493x4R9EpsKT61BB2DKET8x83rkcaAw2yyASbzSsJWFq9YfcmjB4q/zhNGOJOtG1G7xcXW7iGW5NmVoTGo8
fVo4zypuCUxQrFX82sLTzQU7vPMj+OMTUuHGYRZPU1Hdqn1TSXeY1Qa0cslivcLAVwSpfVQcMCZA==

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2026-06-01 17:20:30 | FIRMANTE

j1GyrJZMXg4dAmMDGabhvKPlmKuNm6qe1u++Rji77WZtWbOSozETgAC59GOF02tCLv8duRswJxWNaYQn/lwC5VceAqdRQ2IJNzRlpWYnQQFgai81lu6+pDWgetRBgRn5dVoq
NxcIWcHnuVO81PWS79dYyI5FUrJVq9Znx0upYL7A2FtmyJSqEQaAKfGjlgELJR7Y4/DIzwy6TAicH5QGsGfPisXUxpfCT98g8XzAXMSCi412kWy1YKzvcMPLpfPpSCqcXTn7LQU
35Dal3gYJ0FoOYop3eoeZQ88f0Wo+flx6U+z9BY+k8u5ZMduKD6mZ9Do8tSQc+bxIVgsPROC2Pg==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2026-06-01 19:49:32 | FIRMANTE

pxT6DTF2KhV55LAUgdzFnoop1/1TTjbXm9oJcx93bkNhWi/OKBEzkJ1K11+O519Ewss7s3TBO7i7zgj8ODwCx6Oc9T+cbYgZ5Pt0xzyQhGypJMaB7dLte+tg9o+BrxW5b73Z/wACK
4XTYZ3GzdfJkQyEoQASe8BycYQTWXB0bQGgyYIKHkt+787nK0NYnsWywoNFMJDeYgb+eDeA3Mol5/bSJUL+cCIG7y8Klqiv7R9YWnDNebiYyS9PbaPX/J+NBI Mo9bT5BiiDea
/VYjeeqsuhaBEhtjy1+1Z8Trpr5bQTdb5F5MGIT8lUx3l5v4K3RkHWMr4hARpppXTYdRJRJA==

CÉSAR LUIS CUEVAS VELAZQUEZ | Fecha:2026-06-02 09:24:57 | FIRMANTE

dbwsVZF1qQQzJOxFxWltdwlgLj7LSxbfqxJ0FIN83DgflYz5C0PpJlLa/ngcal4otLCxb7aGuV3PDtYKZ3HQX8y1Oyl9j0iawqGvEoZXC7rHQucK1GZxK1kjsHI/xWCxnT/+DM2Dr0cjJr
SDFWMjt7673H42rlZ26Oad6RVfXNsoHFcdufFmMWXR8jPH6pCxx7TYMXx18Ff/4ZgyKaAeJ9MmbF+4TXr9A9GnG+bqsdr1d8Fn7KeZ2aE5sPYWT4Fm0kHEUvJry7+Ow7bO6
DQ2Dc2Xii5V9f8XaAR1Qsg+bl7iAkcbHx2Qt9Gik6EaJhYJC+tlm5poUUzIK7Lv6kc/Mw==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2026-06-02 10:21:47 | FIRMANTE

FkVnh2/sv6BSrAyUtpYRZCxbuuZwnteHR6KPq/vYdA6crv63MBMXGjLDzze096qbx353XjFYmnlBlv1lUyAdBuK64z8QiZTKcbQwutjxWC7HwVtyfo5yGtw2qOrDzFAFms4cv7Hele
x12/Cp4jilBRuMjsEJCdAX9Ftn5qBOVCKI1SU/ASdYXklAjBhrvxybeVkvGvXxQ9hoAV0ApM1jPDglf4qRl3ONa2u4kcz0H36OFzGQl4JhQTGqHg9oMFupHEBjDZ0fTuaNqcdL
GcnhOLe5R7oyasXPTcT/09JilIzhq5LMBHVgGcdmq2uDg8htlHk7fs2r8O1RQYT9Q==

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



AhKqZCatz

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/59N5pwctVpOG8vAc1UcAVRlrbACVWCnb>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029