



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Respuestas osmoadaptativas del halófilo *Aspergillus sydowii* en  
condición saturada de NaCl

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MsC. Irina Jiménez Gómez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ramón Alberto Batista García

## Agradecimientos

Gracias México!!! Gracias por darle a esta cubana la oportunidad de formarse como Doctora en Ciencias en tus universidades, con tus profesores y con tus recursos. Gracias por la cultura, por la comida, por los paisajes y lugares increíbles, y gracias por la gente linda que conocí durante el proceso.

Gracias Dr. Ramón Batista por aceptarme como su alumna, por la confianza, por su guía y apoyo, por las palabras acertadas en momentos difíciles y principalmente por su empuje y su determinación para soñar y lograr cosas increíbles.

Gracias a mi comité tutorial y jurado de tesis por su ayuda para mejorar el documento, en especial a las Dras. María del Rayo y Lucía Pérezgasga que me han acompañado muy de cerca en cada tutorial y que siempre tuvieron las puertas de sus laboratorios abiertas para ayudar con mi proyecto.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio CEIB-CIDC, a las chicas *Aspergillus*, especialmente a Heidi y Debora (las fundadoras) por todo el trabajo juntas y los consejos. A Adriana por recibirme en México sin conocerme, por el cariño y por todo lo que vino después. A Tonaniuh porque llegó a nuestras vidas para iluminarnos con sus gráficos hermosos que tanto han contribuido en todos nuestros trabajos.

Gracias a la Dr. Rosa Mouriño y a su equipo por recibirme en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del CICESE, aprendí muchísimo con ustedes. Saqué fotos hermosas que han rendido para congresos, artículos, posters, etc. Fue una estancia super productiva!

Gracias a la Lic. Cristina, a la secretaria del posgrado Verónica, a la Mtra Esmeralda y a la Dra. Lina por las toneladas de papeles, firmas y cuños procesados en tiempo cada semestre y por su insistencia para que nada se olvide.

Gracias a mi familia que desde la distancia siempre me apoya, mi tía Tata, mi hermana, mi papá, mi suegra, mi sobrino Sergio, mis Viejas Locas y en especial a mi mamá por su apoyo incondicional siempre!!

Gracias Gisell por ser la mejor compañía durante interminables horas de estudio y trabajo, gracias por hacer también tuyo este proyecto, sin ti hubiera sido imposible realizar todos los experimentos y procesar la montaña de datos en tan poco tiempo. Gracias por escuchar y repasar una y otra vez conmigo todas las presentaciones y proyectos que surgieron, y gracias por todo lo demás.

Gracias infinitas a mi compañero de vida Alfredo por ser incondicional en todo momento, llegamos hasta aquí juntos. Gracias por esta aventura de 16 años!

## Publicaciones

1. **Jiménez-Gómez**, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Ulloa, A., Pérez-Llano, Y., Moreno-Perlin, T., Silva-Jiménez, H., Barreto-Curiel, F., Sánchez- Carbente, M. D. R., Folch-Malloi, J. L., Gunde-Cimerman, N., Lago-Lestón, A & Batista-García, R. A. (2022). Surviving in the Brine: A Multi-Omics Approach for Understanding the Physiology of the Halophile Fungus *Aspergillus sydowii* at Saturated NaCl Concentration. *Frontiers in microbiology*, 13.
2. **Jiménez-Gómez**, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Ulloa, A., Pérez-Llano, Y., Moreno-Perlin, T., Silva-Jiménez, H., Barreto-Curiel, F., Sánchez- Carbente, M. D. R., Folch-Malloi, J. L., Gunde-Cimerman, N., Lago-Lestón, A & Batista-García, R. A. (2020). Surviving in the Brine: A Multi-Omics Approach for Understanding the Physiology of the Halophile Fungus *Aspergillus sydowii* at Saturated NaCl Concentration. *Frontiers in microbiology*, 13.
3. Peidro-Guzmán, H., Pérez-Llano, Y., González-Abradelo, D., Fernández-López, M.G., Dávila-Ramos, S., Aranda, E., Hernández, D.R.O., García, A.O., Lira-Ruan, V., Pliego, O.R., Santana, M.A., Schnabel, D., **Jiménez-Gómez**, I., Mouriño-Pérez, R.R., Aréchiga-Carvajal, E.T., del Rayo Sánchez-Carbente, M., Folch-Malloi, J.L., Sánchez-Reyes, A., Vaidyanathan, V.K., Cabana, H., Gunde-Cimerman, N. and Batista-García, R.A. (2021), Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions. *Environ Microbiol*.

# Índice

Resumen.....	6
Abstract .....	7
1. Introducción.....	8
2. Antecedentes .....	10
2.1 Microorganismos halófilos .....	10
2.2 Mecanismos de halofilia .....	11
2.3 Vía de HOG .....	14
2.4. Toxicidad del NaCl, vida en ambientes cosmotrópicos y caotrópicos .....	15
2.5. Transcriptómica .....	18
2.6 Análisis transcriptómicos en hongos .....	23
2.7. Metabólica .....	26
2.7.1 Amino ácidos .....	29
2.7.2 Ácidos grasos.....	32
2.8 <i>Aspergillus sydowii</i> .....	35
3. Hipótesis .....	37
4. Objetivos específicos .....	37
5. Materiales y métodos.....	39
5.1. Cepa, conservación y condiciones de cultivo .....	39
5.2. Análisis morfológico de <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 en solución saturada de NaCl	39
5.3. Determinación de osmolitos en <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 expuesto a una concentración saturada de NaCl .....	40
5.4. Biomarcadores de estrés oxidativo en <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 en condiciones hipersalinas .....	41
5.5. Cálculos estadísticos.....	42
5.6. Extracción de RNA total, construcción de librerías, secuenciación y análisis del transcriptoma de <i>A. sydowii</i> en la condición óptima (CO) y la condición de estrés (CE).....	43
5.7. Expresión transcriptómica de los genes implicados en las defensas contra el estrés oxidativo celular .....	46
5.8. Perfiles metabólicos de <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 cultivado en solución saturada de NaCl .....	47
5.8.1 Determinaciones de aminoácidos y ácidos grasos .....	49
6. Resultados y discusión .....	52
6.1. Morfología de <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 en diferentes concentraciones de NaCl	52
6.2. Síntesis de solutos compatibles por <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 expuesto a NaCl ..	56
6.3. Defensas de estrés oxidativo inducidas por NaCl en <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860.....	59

6.4. Expresión transcripcional de genes relacionados con respuestas al estrés oxidativo en <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 .....	64
6.5. Perfiles transcripcionales de mRNA y análisis de la ontología genética de <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 a una concentración saturada de NaCl .....	71
6.6. El análisis de las adaptaciones moleculares al NaCl saturado puso de manifiesto la importancia de la vía de transducción de señales del glicerol de alta osmolaridad (HOG) y de la ultraestructura y morfología de la pared celular. ....	75
6.7. Importancia de los lncRNA y de los factores transcripcionales en el transcriptoma de <i>Aspergillus sydowii</i> a una concentración saturada de NaCl .....	79
6.8. Cambios en el perfil metabolómico en solución saturada de NaCl .....	83
6.9. La reprogramación del metabolismo de los aminoácidos se produjo con una concentración saturada de NaCl.....	91
6.10 El metabolismo de los ácidos grasos a una concentración saturada de NaCl se mantuvo principalmente sin cambios. ....	97
7. Conclusiones.....	101
8. Anexos .....	103
9. Referencias .....	107

## Resumen

Aunque varios estudios han investigado las osmoadaptaciones de los hongos halófilos a las condiciones salinas, sólo unos pocos han analizado los mecanismos sistémicos que se activan en soluciones con concentraciones saturantes NaCl. El hongo halófilo *Aspergillus sydowii* es un organismo modelo para el estudio de las adaptaciones moleculares de los hongos filamentosos a la hiperosmolaridad. Este estudio es el más completo donde se caracteriza la micromorfología y la respuesta celular adaptativa de diferentes biomarcadores de estrés oxidativo no enzimáticos y enzimáticos en hongos filamentosos halófilos. Aquí estudiamos la morfología, la síntesis de osmolitos y las defensas contra el estrés oxidativo del halófilo *A. sydowii* EXF-12860 a 1.0 M y 5.13 M de NaCl.

También por primera vez se utilizó un enfoque multiómico (es decir, transcriptómica y metabolómica) para comparar la expresión y metabolismo de *A. sydowii* en una concentración saturada (5.13 M de NaCl) y en la salinidad óptima (1 M de NaCl). El análisis reveló que 1,842 genes se expresan diferencialmente, de los cuales 704 estaban sobreexpresados. Los genes sobreexpresados están implicados en las vías de transducción de señales de glicerol de alta osmolaridad, la biosíntesis de  $\beta$ -1,3-glucanos y el transporte de iones transmembrana. Los genes regulados negativamente están relacionados con la síntesis de quitina, manosa, proteínas de la pared celular, respuesta a inanición, síntesis de feromonas y regulación del ciclo celular. Del 100% de los transcritos, 20% son ARN no codificantes, y de estos un 7% se clasifican como ARNs largos no codificantes largos (lncRNA). El 42% y el 69% del total de lncRNAs y de los RNAs que codifican factores de transcripción, respectivamente, se expresaron de forma diferencial. Los análisis metabolómicos revelaron más metabolitos complejos y desconocidos en la concentración saturada de NaCl que en la salinidad óptima. En la condición de 5.13M de NaCl los aminoácidos libres disminuyeron significativamente y el metabolismo de los aminoácidos se reprogramó. El análisis del contenido y tipo de ácidos grasos de membrana muestra que no cambia en el hongo creciendo en condición óptima o en hipersalinidad. Este estudio es el primer intento de desentrañar la ecología molecular de un hongo ascomiceto en situación de privación extrema de agua por NaCl (5.13 M). Este trabajo también representa un estudio pionero en la investigación de la importancia de los lncRNAs y los factores transcripcionales en la respuesta transcriptómica al alto estrés por NaCl en hongos halófilos.

## Abstract

Although various studies have investigated osmoadaptations of halophilic fungi to saline conditions, only few analyzed the fungal mechanisms occurring at saturated NaCl concentrations. Halophilic *Aspergillus sydowii* is a model organism for the study of molecular adaptations of filamentous fungi to hyperosmolarity. This is the most comprehensive study that investigates the micromorphology and the adaptive cellular response of different non-enzymatic and enzymatic oxidative stress biomarkers in halophilic filamentous fungi. Here we studied the morphology, osmolyte synthesis, and oxidative stress defenses of the halophile *A. sydowii* EXF-12860 at 1.0 M and 5.13 M NaCl.

Also, for the first time a multiomics approach (i.e., transcriptomics and metabolomics) was used to compare *A. sydowii* at saturated concentration (5.13M NaCl) to optimal salinity (1M NaCl). Analyses revealed 1,842 genes differentially expressed, of which 704 were overexpressed. No modifications of membrane fatty acid composition occurred. Upregulated genes were involved in high-osmolarity glycerol signal transduction pathways, biosynthesis of  $\beta$ -1,3-glucans, and transmembrane ion transporters. Downregulated genes were related to the synthesis of chitin, mannose, cell wall proteins, starvation response, pheromone synthesis, and cell cycle regulation. Non-coding RNAs represented the 20% of the total transcripts with 7% classified as long non-coding RNAs (lncRNAs). The 42% and 69% of the total lncRNAs and RNAs encoding transcription factors, respectively, were differentially expressed. Metabolomic analyses revealed more complex and unknown metabolites at saturated NaCl concentration than at optimal salinity. Free amino acids significantly decreased and amino acid metabolism was reprogrammed at 5.13M NaCl. This study is the first attempt to unravel the molecular ecology of an ascomycetous fungus at extreme water deprivation by NaCl (5.13 M). This work also represents a pioneer study to investigate the importance of lncRNAs and transcriptional factors in the transcriptomic response to high NaCl stress in halophilic fungi.

## 1. Introducción

El agua es esencial para la vida, por lo que sólo puede existir vida dentro de un estrecho rango de disponibilidad de agua en condiciones ambientales concretas. Esta disponibilidad de agua en el ambiente o en una sustancia es expresada como actividad del agua ( $a_w$ ). La actividad de agua es el contenido efectivo de agua expresado como su fracción molar, por lo que el agua pura tiene  $a_w = 1$ , y todas las demás soluciones tienen  $a_w < 1$  (Zajc *et al.*, 2014a). La actividad de agua ( $a_w$ ) también es un parámetro termodinámico que mide el grado de hidratación de una mezcla. Este parámetro fue introducido por primera vez en 1953 y se definió como la disponibilidad de agua en una solución determinada (Scott, 1953). Su significado biológico es de extremo interés ya que la  $a_w$  constituye el principal factor de control del crecimiento microbiano. La disminución de la ( $a_w$ ) se convierte en un factor limitante para la vida a valores  $\leq 0.85$  (Grant *et al.*, 2004). Bajos valores de  $a_w$  son encontrados fundamentalmente en dos tipos de ambientes: alimentos deshidratados o con altas concentraciones de azúcar y ambientes hipersalinos. A pesar de los retos que impone para la vida la baja disponibilidad de agua, muchos microorganismos procariontes, levaduras y algunos hongos filamentosos son capaces de vivir en estas condiciones (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009).

Los organismos que toleran condiciones de baja  $a_w$  se denominan xerotolerantes, mientras que aquellos que requieren estrictamente condiciones de baja  $a_w$  para su crecimiento óptimo se denominan xerófilos. En particular, los microorganismos que crecen en ecosistemas hipersalinos desarrollan mecanismos de adaptación a altos niveles de iones y se denominan halófilos o halotolerantes en lugar de xerófilos/xerotolerantes (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). Los grupos microbianos xerófilos y halófilos estudiados están dominados por Archeas y Eubacterias, con muy pocos ejemplos de microorganismos eucariontes (Kushner, 1978; Grant *et al.*, 2004). Dentro de estos últimos, sobresalen los hongos como modelos para el estudio de los mecanismos de adaptación a condiciones de baja  $a_w$ . Particularmente, varias levaduras y hongos basidiomicetos han sido identificados en lagos hipersalinos y otros ecosistemas de baja  $a_w$  (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000, 2009). En condiciones de  $a_w$  inferiores a 0.90 la velocidad de crecimiento y la cantidad de masa celular disminuyen y la fase de latencia aumenta (Scott, 1957). Incluso a actividades de agua suficientemente bajas, la fase de latencia puede durar años y el crecimiento cesa completamente (Scott,



1957). Cuando la condición de baja  $a_w$  es impuesta por hipersalinidad los microorganismos se enfrentan (i) a una brusca pérdida de agua del citoplasma por desbalance osmótico, (ii) a toxicidad por acumulación de iones, (iii) a inactivación de enzimas, (iv) a alteración del metabolismo y (v) a la producción generalizada de especies reactivas de oxígeno (Hohmann *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2019).

Para contender con las consecuencias fisiológicas del estrés generado, tanto por la pérdida de agua, como por la toxicidad del NaCl, los microorganismos han desarrollado varias estrategias adaptativas. Entre las principales osmoadaptaciones se encuentran cambios morfológicos, equilibrio iónico y acumulación de solutos compatibles. El estudio de estas adaptaciones se ha enfocado principalmente en los mecanismos moleculares que explican los cambios morfológicos, en los mecanismos de homeostasis para lograr el equilibrio iónico y en la síntesis y acumulación de solutos compatibles en respuestas a condiciones de baja  $a_w$  (Zajc *et al.*, 2013).

Los hongos ascomicetos filamentosos, en particular del género *Aspergillus*, son modelos atractivos para el estudio de los mecanismos de tolerancia a baja  $a_w$  dado que son capaces de crecer en el rango de 0.75-0.80 valores que están entre los más bajos que permiten el desarrollo de la vida. Además presentan una gran diversidad metabólica que les permite crecer en diferentes sustratos (Grant *et al.*, 2004). Por ejemplo, varias especies de *Aspergillus* caracterizadas como xerófilas/halófilas son eficientes en la degradación de biomasa, la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y la producción de compuestos de valor añadido que las hacen potencialmente atractivas para la industria (González-Abradelo *et al.*, 2019; Peidro-Guzmán *et al.*, 2021). Los mecanismos moleculares que describen las adaptaciones morfológicas y la biosíntesis de solutos compatibles, así como la respuesta a la producción de especies reactivas del oxígeno generadas durante el estrés osmótico aun necesitan ser estudiadas con mayor profundidad. Tampoco existe ningún estudio transcriptómico, metabolómico y con caracterización de perfiles aminoacídicos y de ácidos grasos de un hongo halófilo en concentraciones saturantes de NaCl. Por estas razones, en este proyecto proponemos describir los mecanismos moleculares relacionados con adaptaciones fisiológicas y morfológicas que se producen en *Aspergillus sydowii* bajo estrés por NaCl en solución saturada (5.13M) a una actividad de agua de ( $\approx 0.75$ ), de las más bajas reportadas que soportan la vida.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Microorganismos halófilos

La vida existe en toda la gama de concentraciones de sal que se encuentran en los hábitats naturales: desde los entornos de agua dulce hasta los lagos hipersalinos como el Mar Muerto, los estanques de cristalización de las salinas y otros lugares saturados de cloruro de sodio (Oren, 2002). Los ambientes hipersalinos son aquellos cuyo contenido de NaCl es superior al encontrado en agua de mar ( $\approx 0.5$  M NaCl) (Ventosa, 2006). Estos ambientes al igual que todos aquellos ambientes donde se encuentra muy baja diversidad de especies y ausencia de varios grupos taxonómicos, son considerados extremos para la vida (Brock, 1979). Por tanto, todos los organismos que logran crecer y reproducirse óptimamente en estos ambientes se denominan extremófilos. Mientras que aquellos que logran sobrevivir a determinadas condiciones con ciertas limitaciones, ya sea en el crecimiento o en su reproducción se consideran extremotolerantes (Gunde-Cimerman *et al.*, 2003). Muchos de los organismos que crecen en estos ambientes son considerados poliextremófilos ya que además de soportar condiciones extremas por baja actividad de agua, deben contender con los efectos de la toxicidad por iones, altos valores de pH (alcalinos), altas temperaturas e incidencia de radiación ultravioleta (Oren, 2002). Sin embargo en estos ambientes podemos encontrar una gran diversidad microbiana, tanto a nivel filogenético (se encuentran en los tres dominios de la vida) como a nivel fisiológico (poseen la mayoría de los modos de generación de energía reportados para no-halófilos) (Oren, 2002).

Los microorganismos halófilos más estudiados son Archeas y Eubacterias (Kushner, 1978; Grant *et al.*, 2004) seguidas por levaduras y basidiomicetos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000, 2009). Sin embargo, el número de hongos filamentosos aislados de estos ambientes aun es limitado. Dentro del orden *Wallemiales* (basidiomicetos) se han caracterizado especies predominantemente xerófilas/halófilas o xerotolerantes como *Wallemia ichthyophaga*, *Wallemia muriae* y *Wallemia sebi* (Jančič *et al.*, 2016), mientras que del género *Aspergillus* (ascomicetos) han sido aisladas y clasificadas como halófilas/halotolerantes varias especies entre las que destacan *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. atacamensis*, *A. sclerotiales*, *A. salisburgensis* y *A. ruber* (Kis-Papo *et al.*, 2014; Martinelli *et al.*, 2017; Tafer *et al.*, 2019).

## 2.2. Mecanismos de halofilia

La adición de NaCl al agua provoca cambios en las características fisicoquímicas del agua como: punto de congelación, punto de ebullición y presión osmótica. Esto conlleva a una disminución del potencial químico de la misma. En un organismo no adaptado a la hipersalinidad, el agua citoplasmática tiene un potencial químico mayor que el agua del entorno. Esta diferencia en el potencial químico del agua provoca contracción (pérdida de turgencia) celular debido a la pérdida de agua libre a través de la membrana permeable (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). En consecuencia el crecimiento celular se detiene y la difusión de las proteínas y los metabolitos se reducen (Kunte *et al.*, 2002). Así mismo elevadas concentraciones iónicas extracelulares facilitan la entrada de iones a la célula con el consecuente efecto tóxico si no existen mecanismos moleculares que garanticen la homeostasis celular (Ariño *et al.*, 2010). Para sobrevivir en condiciones de hipersalinidad los microorganismos halófilos presentan dos estrategias. La primera, conocida como “salt-in” la que fue descrita por primera vez en las *Halobacterias*, consiste en la acumulación de  $K^+$  y  $Cl^-$  intracelular como mecanismo para mantener el equilibrio osmótico. Esto implica una adaptación de la química proteica a medios con una alta fuerza iónica (DasSarma and DasSarma, 2015). La segunda estrategia conocida como “salt-out” es utilizada por Eubacterias y eucariontes halófilos y consiste en la acumulación de solutos osmóticamente activos en el interior de la célula para evitar la pérdida de agua, además de la expulsión activa de cationes metálicos para evitar su toxicidad. En consecuencia el potencial químico del agua de la célula se reduce principalmente por la acumulación de solutos orgánicos no cargados y altamente solubles en agua (Kunte *et al.*, 2002).

Los hongos tienen algunas características comunes de osmotolerancia, por ejemplo, todos emplean la estrategia de los solutos compatibles. Esto consiste en equilibrar la presión osmótica del entorno, permitiendo un contrabalance electroquímico ante la alta osmolaridad extracelular, mediante la acumulación de pequeñas moléculas orgánicas (solutos compatibles), normalmente glicerol, y mantener bajas concentraciones intracelulares de sal (como los iones tóxicos  $Na^+$ ) (Gostinčar *et al.*, 2011).

La mayoría de los hongos descritos acumulan glicerol como soluto mayoritario, pero también pueden acumular otros tipos de solutos compatibles (Plemenitaš *et al.*, 2008). De acuerdo a su naturaleza, los solutos compatibles se dividen en: polialcoholes (glicerol, manitol, sorbitol,

entre otros),  $\alpha$  y  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados (betaína, ectoína, hidroxiectoína, L- $\alpha$ -glutamato,  $\beta$ -glutamina, entre otros) y, por último, azúcares y sus derivados (sacarosa, trehalosa, etc). En bacterias se ha reportado la presencia de solutos compatibles como glicina, betaína y glutamato, mientras que en hongos se ha descrito la acumulación de solutos como trehalosa, y polioles como manitol, glicerol, arabitol y sorbitol (Zajc *et al.*, 2014b).

Sin embargo, al igual que ocurre con las adaptaciones morfológicas, el estudio de los mecanismos de homeostasis relacionados con la síntesis y acumulación de solutos compatibles en los hongos ascomicetos es limitado. Algunos estudios reportan que el glicerol es el soluto compatible que se encuentra frecuentemente en distintos microorganismos. Por ejemplo, en estudios realizados en *Aspergillus niger* se observó que en micelio “joven” (48-72 horas) se acumula mayoritariamente glicerol, seguido de eritritol, mientras que en micelio “viejo” (120 horas) se encuentran preferencialmente manitol y eritritol (Sereno *et al.*, 2001; Marcolli and Peter, 2005). Algunos autores han propuesto que la acumulación de solutos compatibles es una de las adaptaciones de mayor importancia fisiológica en hongos halófilos. Se ha reportado que la levadura *Hortaea werneckii* y *Wallemia ichthyophaga*, contienen mezclas de polioles (glicerol, arabitol y manitol) (Zajc *et al.*, 2014b), mientras que en *Aspergillus niger* y *Aspergillus nidulans* se ha descrito la acumulación de trehalosa y manitol en las conidiosporas (Sereno *et al.*, 2001; Conesa *et al.*, 2016). Sin embargo, el glicerol puede relacionarse no sólo a la presión osmótica, producida por concentraciones elevadas de NaCl, sino también con concentraciones elevadas de otros solutos, entre ellos la glucosa (Kogej *et al.*, 2007a ; Sims *et al.*, 2014). A pesar de estas evidencias el conocimiento acerca de la acumulación de solutos compatibles y las estrategias de haloadaptación se encuentra limitado tanto a nivel molecular como fisiológico (Butinar *et al.*, 2011).

Además, se ha observado un aumento del transporte activo de solutos y/o iones a través de la membrana para contrarrestar el efecto nocivo que puede tener la acumulación de los mismos sobre el funcionamiento de las proteínas intracelulares (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Los transportadores de cationes alcalinos-metálicos son de gran importancia para la osmoadaptación a ambientes extremadamente salinos. De hecho, la ATPasa exportadora de Na<sup>+</sup> (EnaA) es el principal determinante de la tolerancia a la sal en las levaduras (Ariño *et al.*, 2010). Sin embargo, se necesitan más estudios para describir estos mecanismos en hongos filamentosos ascomicetos. A los anteriores, conocidos como mecanismos activos, para

contender con altas concentraciones de sales en el medio, podemos añadir mecanismos pasivos. Entre estos se encuentra la agrupación de las células en grupos celulares compactos, cubriendo a las células con una gran cantidad de polisacáridos extracelulares o aumentando el grosor (Kunčič *et al.*, 2010), y la pigmentación por melanización (Kogej *et al.*, 2006) de la pared celular. Otras adaptaciones morfológicas incluyen cambios en la composición de la pared celular, y el incremento en número y/o tamaño de las vesículas intracelulares, posiblemente asociadas a la acumulación de estos solutos (Zajc *et al.*, 2013).

De igual manera existe un conocimiento limitado sobre la respuesta de hongos filamentosos ante la alta producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la célula en un ambiente hiperosmótico. En relación al balance oxidativo, el estudio más abarcador sobre genes de respuesta al estrés oxidativo en hongos halófilos es Gostinčar y Gunde-Cimerman 2018. Los autores evaluaron la expresión de 10 genes que codifican para enzimas o metabolitos involucrados en la defensa celular contra los ROS, en *W. ichthyophaga*, *H. werneckii* y *A. pullulans* (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018). Sin embargo, no se alcanzó a medir directamente la producción de estos metabolitos.

Los hongos del género *Aspergillus* están entre los más ricos en secuencias de genomas disponibles con aproximadamente 324 ensamblajes y 98 genomas representativos, superado en ensamblajes con 1098 por la levadura modelo *Saccharomyces* que hasta el momento cuenta con apenas 19 genomas. Todos los genomas de *Aspergillus* secuenciados hasta ahora tienen ocho cromosomas, que varían en tamaño entre 28-40 Mb (Dujon, 2010). Una pregunta que ha suscitado considerable interés es por qué los genomas de especies como *A. oryzae* y *A. flavus* son ~ 20% más grandes y sustancialmente más ricos en genes que los de *A. nidulans* y *A. fumigatus*. Algunas de las posibles explicaciones para esto son: la duplicación del genoma, la duplicación segmentaria y la transferencia horizontal masiva de genes (HGT, por sus siglas en inglés). Resulta esta última la explicación la más acertada hasta ahora, ya que varios estudios han proporcionado ejemplos que muestran la presencia de HGT en el genoma de *Aspergillus*, tanto en el linaje del donante (Andersen *et al.*, 2011; Slot and Rokas, 2011) como en el linaje receptor (Khaldi and Wolfe, 2008; Mallet *et al.*, 2010; Andersen *et al.*, 2011).

En el caso de *Aspergillus* halotolerantes se han identificado *A. versicolor*, *A. destruens*, *A. atacamensis*, *A. montevidensis* y *A. sclerotialis*. Mientras que *A. baarnensis*, *A. salinarium*,

*A. ruber* y *A. salisburgensis* son hasta el momento las únicas especies dentro del género clasificadas con halófilas (Martinelli *et al.*, 2017; Tafer *et al.*, 2019). Actualmente están secuenciados los transcriptomas de *Aspergillus ruber*, *A. sydowii*, *A. montevicensis*, *A. sclerotialis* y *A. salisburgensis* (Ding *et al.*, 2019; Tafer *et al.*, 2019; Pérez-Llano *et al.*, 2020) pero en ninguno de estos casos la extracción de RNA se realizó en la condición de solución saturada por NaCl. Particularmente, los hongos de este género son de interés por su uso en la producción a gran escala de ácidos y enzimas para la industria química (González-Abradelo *et al.*, 2019). También se ha demostrado el potencial de dos miembros de este género, *Aspergillus sydowii* y *Aspergillus destruens*, en la biorremediación de aguas residuales (González-Abradelo *et al.*, 2019; Peidro-Guzmán *et al.*, 2021). Sin embargo, existen pocos estudios enfocados en la caracterización transcripcional de los mecanismos moleculares de los hongos ascomicetos filamentosos en condiciones de halofilia. Por tales motivos en este estudio nos enfocaremos en las estrategias de haloadaptación de *A. sydowii* (ascomiceto filamentoso), importante patógeno de arrecifes de coral y con reservorios potenciales en ambientes hipersalinos. Esta especie fue descrita por (Batista-García *et al.*, 2014), creciendo sobre paja de trigo y se conocen aspectos de la respuesta transcripcional de *A. sydowii* a 0.5 M y 2.0 M de NaCl (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

### 2.3. Vía de HOG

La vía de alta osmolaridad de glicerol, conocida como HOG (High Osmolarity Glycerol) es la principal vía de señalización en levaduras y hongos filamentosos responsable por las respuestas a estrés celular y estrés osmótico causado por elevada salinidad (de Nadal *et al.*, 2002; Saito and Posas, 2012; Hohmann, 2015). Esta vía consiste en una cascada de señalización de MAPKKKs que se activa mediante fosforilación a la MAPK Hog1. La vía está constituida por dos ramas funcionalmente redundantes, pero estructuralmente distintas, una que involucra a la proteína SHO1 y la otra a SLN1, y ambas convergen en la MAPK Pbs2 que finalmente activa a HOG, el cual provoca la fosforilación de factores de transcripción diana (de Nadal *et al.*, 2002; O'Rourke and Herskowitz, 2004; Saito and Posas, 2012). La activación de la vía de HOG por estrés osmótico induce la acumulación de glicerol, mediante síntesis e importación del medio extracelular, como principal soluto compatible para contender con el estrés hipersalino. En *W. ichthyophaga*, *H. werneckii* y algunas especies del

género *Aspergillus* el glicerol se reporta como el principal soluto compatible utilizado. Sin embargo, otros polioles como arabitol, eritritol y manitol, también han sido detectados en menor concentración (Gunde-Cimerman and Zalar, 2014; Plemenitaš *et al.*, 2014). La activación de la vía de HOG por estrés osmótico no solo induce la acumulación de glicerol como principal soluto compatible para contender con el estrés hipersalino, sino de otros osmolitos. Además, induce la detención del ciclo celular, la reorganización del citoesqueleto de actina, así como cambios en la dinámica de la pared celular (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

#### 2.4. Toxicidad del NaCl, vida en ambientes cosmotrópicos y caotrópicos

Las sales presentes en el medio no sólo disminuyen el agua biológicamente disponible y causan toxicidad debido a la penetración de ciertos cationes en la célula, sino que también modifican las interacciones estructurales de las macromoléculas celulares. Esto ocurre porque cuando los electrolitos se disuelven en agua, se disocian en iones hidratados. Esto implica que las moléculas de agua se reacomodan en capas de hidratación alrededor de los iones más pequeños debido al gran campo eléctrico que rodea a estos, reduciendo la cantidad de agua disponible para hidratar a las macromoléculas. Por lo tanto la adición de sales a un medio o solución afecta a la solubilidad de las proteínas y a muchas otras propiedades fisicoquímicas de una solución proteica (Marcus, 2009). Hofmeister determinó que la capacidad de diferentes sales para estabilizar o desestabilizar las proteínas en el agua depende del tipo de sal y de la concentración de la misma. La serie de iones de Hofmeister ( $K^+ > Na^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+}; SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > Cl^- > NO_3^- > Br^- > ClO_3^- > I^- > ClO_4^-$ ) describe el orden de la capacidad de los iones para *salt-out* o *salt-in* las proteínas (Hofmeister, 1888; Kunz *et al.*, 2004). La fuerza de la interacción molecular ion-agua y agua-agua es consecuencia de la densidad de carga y del enlace de hidrógeno, respectivamente. Este fenómeno se basa en las interacciones directas entre los iones y las macromoléculas y en las interacciones entre los iones y las moléculas de agua en la primera capa de hidratación de la macromolécula (Zhang and Cremer, 2006).

En la serie de Hofmeister o serie liotrópica, tanto los aniones como los cationes pueden clasificarse en cosmótrofos/lipotrofos y caótrofos/hidrotrofos, respectivamente, según sus propiedades de aumentar o debilitar la red de enlaces de hidrógeno de las moléculas de agua (Zhang and Cremer, 2006). La serie incluye dos grupos diferentes: iones fuertemente hidratados e iones débilmente hidratados. Los aniones a la izquierda del  $Cl^-$  están bien

hidratados, se clasifican como iones cosmótrópos (creadores de la estructura del agua), y tienden a estabilizar la estructura del pliegue nativo de las proteínas, lo que conduce a un comportamiento de “salting-out”. Utilizando el método de simulación dinámica molecular Kang y colaboradores sugieren que en el “salting-out” la estructura del agua que rodea a los aniones disminuye, lo que puede transformarse en la pérdida efectiva de enlaces de hidrógeno en la capa externa de solvatación alrededor de los iones ( $\Delta HB$ ) (Kang *et al.* 2020). Esto a su vez da lugar a la reorganización de las moléculas restantes en una estructura de hidratación de orden superior. De esta manera aumenta la tensión superficial por lo que es más difícil la formación de cavidades (Gallo *et al.*, 2011) y disminuye la desnaturalización de proteínas. Mientras tanto, los aniones a la derecha del Cl<sup>-</sup> esta mal hidratados, se denominan caótrópos (rompedores de la estructura del agua), y tienden a facilitar la desnaturalización y el desdoblamiento de las proteínas, debilitando las interacciones electrostáticas y desestabilizando las macromoléculas biológicas, lo que conduce a un comportamiento de “salting-in”. Estos interactúan débilmente con las moléculas de agua cercanas, disminuyen la tensión superficial facilitando la formación de cavidades (Zhang and Cremer, 2006) y hacen que el agua circundante sea desordenada (Salis and Ninham, 2014; Kang *et al.*, 2020). El Cl<sup>-</sup> es el límite entre los dos tipos de iones, que no tiene un efecto obvio en la estabilidad de las proteínas.

Desde el punto de vista termoquímico los iones se clasifican en “formadores” (salting-out) o “rompedores” (salting-in) de estructuras atendiendo a valores de entropía. Utilizando la entropía ( $\Delta S$ ) como función termoquímica de referencia y estableciendo que la entropía de la estructura del agua de la hidratación de los iones es ( $\Delta S_{\text{struc}}$ ). Cuando el valor de  $\Delta S_{\text{struc}} > 60 \text{ (J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1})$ , los anions son clasificados como caotrópicos (rompedores de estructuras), y cuando el valor de ( $\Delta S_{\text{struc}} < 60 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) los aniones son considerados cosmotrópicos (formadores de estructuras) (Marcus, 1994). En el caso del Cl como su valor esta muy proximo a 60 se definio como la frontera entre ambos grupos de aniones. Otra propiedad utilizada para clasificar la caotrópicidad de los iones es basados en la perdida efectiva de uniones de hidrogeno en la capa de solvatación alrededor de los iones ( $\Delta HB$ ). Cuando los anions presentan una  $\Delta HB$  menor que  $-1$  son caotrópicos, y cuando este valor es  $\Delta HB < -2$  los aniones son superchaotrópic (Assaf and Nau, 2018).

Las altas concentraciones de sodio generan una doble toxicidad a la celula: estrés iónico y



estrés hiperosmótico. Un factor que contribuye a la toxicidad iónica es la capacidad del sodio para desplazar al potasio o, en algunos casos, al magnesio en los sitios activos de algunas enzimas.

El potasio es un catión monovalente clave necesario para múltiples aspectos del crecimiento y la supervivencia celular, por ejemplo para la compensación de las cargas negativas de las macromoléculas para mantener la electroneutralidad, la turgencia y el volumen celular, la actividad enzimática, la síntesis de proteínas y el mantenimiento del potencial de membrana. En la mayoría de las células, el potasio se acumula contra su gradiente de concentración a cantidades relativamente altas, mientras que la acumulación de sodio se evita activamente (Yenush, 2016). Las levaduras por ejemplo evitan la toxicidad del sodio, manteniendo una alta relación  $K^+/Na^+$  en el citoplasma por mecanismos activos, ya sea por la extrusión del sodio o la limitación de su entrada, la captación eficiente y selectiva de potasio y el secuestro vacuolar del sodio. En la mayoría de estos procesos de transporte, la fuerza motriz de protones es creada por las  $H^+$ -ATPasas.

Los efectos del "Salting-in" pueden ser a veces dramáticos: por ejemplo, un aumento de 50 mM en la concentración de KCl produce un aumento de 20 veces en la solubilidad de la T7 RNA polimerasa seguido de una disminución de la solubilidad que es casi igual de abrupta (Schein, 1990; Collins, 2004). Las altas concentraciones de NaCl (>1M) inhiben la mayoría de las enzimas, debido a la perturbación del equilibrio hidrofóbico-electrostático entre las fuerzas que mantienen la estructura proteica (Wyn Jones and Gorham, 1983). Además, las funciones de membrana también se ven afectadas por altas concentraciones de sal, probablemente debido a cambios estructurales en las proteínas y lípidos. El sodio es capaz de interferir con diferentes sitios de unión a potasio en proteínas y RNA, mientras que el cloruro interfiere con los sitios aniónicos involucrados en la unión al RNA. La fosfoenolpiruvato carboxilasa, la glutatión reductasa y la ribulosa bisfosfato carboxilasa son enzimas con sustratos aniónicos especialmente sensibles a la inhibición por cloruro (0.1-0.2 M) (Serrano, 1996). La inhibición por sodio puede esperarse en el caso de enzimas activadas por potasio como la piruvato quinasa, la fosfofructoquinasa y la DPG-almidón sintetasa (Wyn Jones and Gorham, 1983), sin embargo, no hay información sobre la sensibilidad a la sal de estas enzimas.

La diferencia entre el efecto cosmotrópico del NaCl y el efecto caotrópico del  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$

está dado por la toxicidad que provocan las concentraciones altas de los iones desestabilizantes  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , incluso en la mayoría de los organismos halófilos (Ma *et al.*, 2010). Hasta cierto punto el efecto caotrópico de  $Mg^{2+}$  y del  $Ca^{2+}$  puede ser contrarrestado por la presencia de iones cosmotrópicos. Algunas Archaeas halófilas pueden crecer en altas concentraciones de  $MgCl_2$  pero solo con la compensación cosmotrópica de concentraciones significativas de NaCl (Hallsworth *et al.*, 2003). La mayor concentración de  $MgCl_2$  soportada por un hongo en ausencia de iones cosmotrópicos es 2.1 M, la cual es mucho mayor que la que había sido previamente determinada como limitante del crecimiento en bacterias de la familia *Desulfohalobiaceae*, sin adición de NaCl (1.26 M) (Hallsworth *et al.*, 2007)(Zajc *et al.*, 2014a).

Conocer el conjunto de genes que se expresan o transcriben a partir del DNA genómico, es determinante para entender las adaptaciones de un organismo a nivel molecular. La transcripción del DNA genómico para producir ARNm es el primer paso en el proceso de síntesis de proteínas, y las diferencias en la expresión de los genes son responsables de las diferencias morfológicas y fenotípicas, así como indicativas de las respuestas celulares a los estímulos y perturbaciones ambientales (Lockhart and Winzeler, 2000). A diferencia del genoma, el transcriptoma es altamente dinámico y cambia rápida y dramáticamente en respuesta a perturbaciones o incluso durante eventos celulares normales como la replicación del DNA y la división celular (Cho *et al.*, 1998). Comprender los cambios en los patrones de expresión de varios genes frente a diferentes condiciones nos proporciona información valiosa para describir y entender mecanismos de regulación, las funciones celulares y vías bioquímicas como posibles adaptaciones a la hipersalinidad.

## 2.5. Transcriptómica

La transcripción es el paso clave en la regulación de la expresión génica y es un proceso intrínsecamente dinámico (Hager *et al.*, 2009) que tiene lugar en el núcleo. Este proceso consiste en la síntesis de una cadena de ARN complementaria y antiparalela a la secuencia de nucleótidos de una de las cadenas de DNA denominada cadena molde. Por tanto la cadena de ARN tendrá la secuencia de nucleótidos idéntica a la cadena codificadora del DNA, con la premisa de que la timina se sustituye por uracilo en el ARN.

Las células eucariotas contienen tres polimerasas nucleares distintas que transcriben

diferentes clases de genes. Los genes que codifican proteínas son transcritos por la ARN polimerasa II la cual sintetiza las moléculas de ARNhn, el precursor del ARNm y algunos ARNsn; los ARN ribosómicos (ARNr) y los ARN de transferencia (ARNt) son transcritos por las ARN polimerasas I y III. La ARN polimerasa I sintetiza un único transcrito, el ARNr 45S, precursor de los ARNr 28S, 18S y 5.8S. Mientras que la ARN pol III es la encargada de la síntesis de los ARNt, el ARNr 5S y otros pequeños ARN (small nuclear, ARNsn). Cada una reconoce promotores y factores de transcripción con características específicas.

La reacción de transcripción se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación.

La ARN polimerasa sintetiza una cadena de ARN en dirección 5' → 3' y actúa de manera continua durante toda la unidad de transcripción: primero sobre el sitio de inicio indicado en el promotor basal, continúa en la secuencia codificadora y finaliza en una secuencia de terminación. En el sitio de inicio de la transcripción, la molécula de DNA se separa de forma transitoria en dos cadenas sencillas y una se utiliza como molde para la síntesis de ARN, formando una burbuja (burbuja de transcripción). Conforme la ARN polimerasa avanza y copia el DNA, el DNA ya copiado se vuelve a unir a su cadena complementaria y forma nuevamente la doble hélice, liberando el ARN como una cadena sencilla de nucleótidos. La transcripción suele iniciarse en una posición definida, el sitio de inicio de la transcripción (TSS), en el extremo 5' de un gen, referido como el inicio del gen (Haberle and Stark, 2018). El TSS se encuentra dentro de un promotor central, que es una secuencia corta que abarca ~50 pb río arriba y ~50 pb río abajo del TSS. El promotor central sirve como plataforma de unión para la maquinaria de transcripción, que comprende a la Pol II y a los factores de transcripción generales asociados (GTFs) (Hampsey, 1998). Los promotores centrales son suficientes para dirigir la iniciación de la transcripción pero generalmente la transcripción suele ser débil en ausencia de regiones de DNA reguladoras más alejadas del TSS; estas regiones se denominan potenciadores o módulos cis-reguladores (CRM).

El inicio de la transcripción puede ser suprimida por la cromatina o activada por otros elementos reguladores (Spitz and Furlong, 2012).

Por tanto la expresión génica se regula mediante la acción integrada de muchos elementos cis-reguladores, incluidos los promotores centrales y elementos proximales del promotor (recientemente revisado en REF. 3), así como varios módulos cis-reguladores que se localizan a mayor distancia de los sitios de inicio de la transcripción (TSS), como los

potenciadores<sup>4,5</sup> silenciadores<sup>6-8</sup>, aislantes<sup>9</sup> y elementos de sujeción<sup>10,11</sup>. Por ejemplo, los potenciadores se unen a las proteínas reguladoras conocidas como factores de transcripción y reclutan cofactores transcripcionales que pueden aumentar la transcripción de un promotor central independientemente de su distancia relativa y la orientación (Spitz and Furlong, 2012).

Otro elemento regulador de la transcripción es la cromatina, la cual puede suprimir la transcripción. Esta se muestra como un "guardián" de la unión del factor de transcripción (TF) y de la actividad potenciadora. Los nucleosomas densamente posicionados pueden restringir el acceso de los factores de transcripción, tanto activadores como represores, el factor de unión al CCCTC (CTCF), la ARN polimerasa II (Pol II) y otras proteínas.

La regulación de la transcripción es fundamental tanto para la expresión de genes específicos de un tejido como para los genes de respuesta a estímulos específicos (Latchman and Higgins, 1995). Si bien la expresión genética puede regularse también después de la transcripción, en la mayor parte de los casos los genes se regulan a este nivel.

La elongación productiva (Kwak and Lis, 2013) de la transcripción se caracteriza por periodos de movimiento unidireccional de la RNAPII a lo largo de la cadena molde de DNA, añadiendo un nucleótido cada vez a la transcripción de ARN en crecimiento. El complejo de elongación de la polimerasa puede retrasarse transitoriamente, dando lugar a un complejo "en pausa". Estas pausas durante la elongación se asocian mayormente con el retroceso de la enzima, un proceso por el que la RNAPII invierte su dirección normal de movimiento y se desplaza hacia arriba en el molde (Galburt *et al.*, 2007). La entrada en estados de retroceso parece conferir un alto grado de sensibilidad a las moléculas de RNAPII en elongación que probablemente gobierna su respuesta a los obstáculos físicos encontrados *in vivo*, incluyendo nucleosomas y otras proteínas de unión al DNA (Kireeva *et al.*, 2005; Galburt *et al.*, 2007), señales en la secuencia del molde subyacente y múltiples moléculas de RNAPII que transcriben el mismo gen simultáneamente. Durante la elongación del transcrito también hay regulación de su velocidad a través de modificaciones de las histonas (Guenther *et al.*, 2007), las cuales parecen interactuar con la polimerasa.

Cuando se añade el último nucleótido a la burbuja de transcripción esta se colapsa al desaparecer el híbrido DNA-ARN, y se libera la ARN pol II. Es importante mencionar que existe una superposición de eventos, de tal manera que los procesos de elongación,

terminación y maduración del ARNm son simultáneos, por lo que cuando termina la transcripción ya existe un ARNm maduro y listo para transportarse al citoplasma. El transcrito primario, o ARNhn, tiene que procesarse de diversas formas para su maduración antes de exportarse del núcleo y participar en el proceso de traducción. El proceso de maduración incluye la adición de un capuchón de guanina modificada en el extremo 5', la poliadenilación del extremo 3', el corte y empalme, además del proceso de edición que sucede sólo en algunos genes. El proceso de corte y empalme (splicing) consiste en la remoción de los intrones (las secuencias intragénicas no codificadoras de la región codificadora) y el empalme de los exones (bloques de secuencias codificadoras para formar el ARNm maduro). Los exones y los intrones pueden empalmarse en más de una forma y generar diversidad en los transcritos del ARNm por corte y empalme alternativo.

Eventos celulares tales como la replicación, la diferenciación, la división celular así como caracteres morfológicos, funcionales y de respuesta ante estímulos de los organismos son producto de la expresión diferencial de genes. Los activadores o represores dictaminan la tasa de síntesis de mRNA que debe producir la maquinaria basal de transcripción ante cada estímulo. Así, cuando se requiera dar respuesta a una condición determinada en la cual un gen tiene una participación importante, se producirán más moléculas de este transcrito (Latchman and Higgins, 1995). Siempre salvando que no existe correlación directa entre número de transcritos y proteína efectiva debido a que pueden ocurrir diversos procesos de edición postranscripcional del ARNm. En algunos de estos casos se genera el cambio de un aminoácido importante por otro o codones de paro de la traducción y la generación de una proteína truncada.

La determinación de dónde, cuándo y bajo qué condición es generado un transcrito es fundamental para el entendimiento de la función biológica de un gen. En contraste con el genoma estático, el transcriptoma refleja la expresión diferencial de los genes en respuesta a las condiciones de desarrollo o ambientales, estableciendo un vínculo dinámico entre el genoma de un organismo y sus características físicas (Hager *et al.*, 2009).

Los transcriptomas son el conjunto completo de secuencias genómicas transcritas en un momento dado por un organismo, órgano, tejido o célula (Nagalakshmi *et al.*, 2010; Meijueiro *et al.*, 2014). En células de mamíferos sólo una pequeña fracción (2-7%) del RNA celular se corresponde con RNA mensajero o mRNA, mientras que más del 95% de los RNA

totales transcritos en una célula corresponden a los RNA ribosómicos (rRNA 28S, 18S, 5.8S y 5S) y RNA de transferencia (Carter *et al.*, 2005; Rio *et al.*, 2010; Palazzo and Lee, 2015). Los RNAs se pueden dividir en dos grupos, RNAs codificantes donde se encuentra el mRNA, y RNAs no codificantes o ncRNA que cuentan con una amplia variedad de funciones en la célula (Palazzo and Lee, 2015). La longitud de los ncRNA puede variar de 21 a varios miles de nucleótidos (nt) y estas moléculas se dividen en i) RNA largos o grandes, como el RNA de transferencia, el RNA ribosómico y el RNA de transcripción específica del X (RNA XIST), y ii) ncRNA pequeños, como los RNAs pequeños nucleares (snRNAs), los RNAs nucleolares pequeños (snoRNA) que guían la modificación del rRNA en un sitio específico (Dieci *et al.*, 2009), los micro RNA (microRNA) que regulan negativamente la expresión de los genes mediante la represión de la traducción o la degradación del mRNA blanco, los RNA de interferencia pequeño (siRNA) que participan en el proceso biológico de interferencia del RNA y otros que forman parte de diferentes ribonucleoproteínas implicadas en funciones celulares esenciales (Cheng *et al.*, 2005; Mendes Soares and Valcárcel, 2006; Gavazzo *et al.*, 2013; Dogini *et al.*, 2014).

Las tecnologías de análisis del transcriptoma han evolucionado desde la secuenciación masiva paralela de firmas MPSS (Brenner *et al.*, 2000) y el análisis en serie de la expresión génica SAGE, hasta diferentes tipos de microarreglos y la aplicación generalizada de plataformas de secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq). Esto ha permitido un uso más generalizado de estas técnicas no solo para el estudio de los mRNA sino para explorar el contenido de diferentes especies de ncRNA (Meijueiro *et al.*, 2014).

La secuenciación de RNA (RNA-Seq) consiste en la secuenciación directa de DNA complementario (cDNA) mediante tecnologías de secuenciación de DNA de alto rendimiento, seguida de la asignación de las lecturas de secuenciación al genoma. Proporciona una mejor comprensión de la complejidad de los transcriptomas eucariontes, ya que permite la identificación de los sitios de inicio de la transcripción, la identificación de exones e intrones, la delimitación de sus fronteras y la identificación de los extremos 5' y 3' de los genes, revelando así la ocurrencia y frecuencia de procesos de splicing alternativo y sus variantes (Tsuchihara *et al.*, 2009), la cuantificación precisa de la expresión de exones, así como la ocurrencia y frecuencia de los procesos de empalme alternativo (Wang *et al.*, 2009)(Tsuchihara *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Además, la identificación de

polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en las lecturas ayuda a distinguir los alelos y a determinar sus niveles relativos de expresión. Por último, se han desarrollado algoritmos bioinformáticos para buscar ncRNAs en los transcriptomas de especies poco caracterizadas (Morozova *et al.*, 2009).

Para el aislamiento del RNA eucarionte con frecuencia se emplean kits de extracción de mRNA, en los que se utiliza un oligo dT para capturar los mRNA que tienen colas polyA (Ward *et al.*, 2012). Luego se realiza la fragmentación del RNA o del DNAc ya sea por nebulización o por digestión con enzimas de restricción o a través del uso de cationes divalentes bajo condiciones de presiones elevadas (Wang *et al.*, 2009). Generalmente el fraccionamiento se realiza posteriormente a la síntesis de DNAc. Esta síntesis se realiza con procedimientos estándares bien establecidos para la mayoría de los organismos que hacen uso de la enzima transcriptasa reversa. Una vez obtenido el DNAc se ligan adaptadores de tal forma que cada fragmento generado contendrá un adaptador ligado en sus extremos 3' y 5'. Alternativamente los adaptadores se pueden ligar directamente a la muestra de RNA, previa síntesis de DNAc (Marguerat and Bähler, 2010). Las secuencias de estos adaptadores se conocen y serán necesarias para que cada fragmento pueda ser secuenciado, y en algunos casos pueden emplearse para diferenciar otros grupos de fragmentos obtenidos a partir de muestras de DNAc diferentes; sin embargo, no en todos los casos se requiere la ligación de adaptadores, lo cual dependerá de la plataforma de secuenciación a emplear.

## 2.6 Análisis transcriptómicos en hongos

Generalmente el análisis de los transcriptomas permite visualizar que la mayor parte del genoma de un organismo se transcribe activamente. Además, una ventaja del uso de RNA-Seq es la identificación de regiones genómicas transcritas no anotadas previamente. Bruno y colaboradores (Bruno *et al.*, 2010) utilizaron la secuenciación de Illumina para estudiar el transcriptoma del patógeno humano *Candida albicans* bajo diferentes e identificaron 602 nuevas regiones activamente transcritas (aumentando la anotación anterior en un 10%). Utilizando matrices de RNA-Seq, se ha demostrado que hasta el 85% del genoma de *S. cerevisiae* está transcrito (Wu *et al.*, 2012). Otros reportes han mostrado la transcripción activa del 70% del genoma de *A. fumigatus* (Müller *et al.*, 2012), el 95% de los 12 827 genes de *Magnaporthe oryzae* (Mathioni *et al.*, 2013), el 80-95% de los 11 800 genes anotados en

*A. nidulans* (Sibthorp *et al.*, 2013), el 80-86% de los genes de dos cepas del patógeno vegetal *Fusarium oxysporum* (Guo *et al.*, 2014), el 74% de los 13937 genes del basidiomiceto de la podredumbre blanca *Phanerochaete carnosae* (MacDonald *et al.*, 2011) y el 97% de los 6197 genes anotados en el patógeno humano *Candida albicans* (Bruno *et al.*, 2010). Por último, tras un amplio estudio del transcriptoma en 70 aislados de *N. crassa* silvestre, (Ellison *et al.*, 2014) se determinó que el 91% de los 9733 genes predichos en este hongo tenían lecturas mapeadas en al menos 24 de los aislados.

El análisis transcriptómico del halófilo *Aspergillus montevicensis* fue realizado en medio sintético con 3M de NaCl y sin estrés por alta salinidad (0M NaCl). Este medio estaba compuesto por glucosa y KNO<sub>3</sub> como principales fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. En estas condiciones *A. montevicensis* mostró expresión diferencial de genes que controlaban el transporte de iones, el transporte de aminoácidos, la acumulación de azúcares solubles, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, la síntesis de ácidos grasos saturados, la transferencia de electrones y la tolerancia al estrés oxidativo. La significación de las diferencias de expresión génica se evaluó mediante los criterios de umbral FDR (False Discovery Rate) < 0,05 y  $\log(\text{fold change}) \geq 1$ . Según estos criterios, 380 y 508 genes fueron significativamente regulados positivamente y negativamente, respectivamente (Ding *et al.*, 2019). Sin embargo, en un análisis transcriptómico del mismo hongo cultivado en medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) con 3M de NaCl y en ausencia de sal (0M NaCl) se reportaron 2352 genes expresados diferencialmente (DEGs). Entre ellos 733 fueron regulados positivamente mientras que 1,619 fueron regulados negativamente. La acumulación de glicerol, el almacenamiento de azúcares compatibles, los ácidos orgánicos, la producción de pigmentos y la esporulación asexual se encontraron regulados positivamente bajo estrés salino (Liu *et al.*, 2017).

El hongo halófilo *Aspergillus oryzae* es ampliamente utilizado para la producción industrial de salsa de soya, por lo que se encuentra expuesto a un entorno donde puede desarrollar estrés por salinidad. Para comprender el efecto del estrés por salinidad sobre *A. oryzae*, se emplea RNA-seq para analizar los cambios de la expresión génica bajo diferentes concentraciones de sal (0%, 0.5% (0.86M), 1% (0.17M) y 1.5% (0.25M) de NaCl) a nivel de todo el genoma. Los resultados transcriptómicos mostraron la expresión de genes regulados positivamente, relacionados con la acumulación de arginina y la síntesis de ácido oleico (He *et al.*, 2018).



En *Aspergillus sydowii*, una especie halófila, los cambios transcriptómicos fueron estudiados en tres condiciones de salinidad (sin NaCl, 0.5 M y 2.0 M de NaCl). Las principales modificaciones fisiológicas fueron reportadas en condiciones de alta salinidad (2.0 M de NaCl) lo que sugiere que la mayoría de los mecanismos descritos para el crecimiento halófilo son una consecuencia de la respuesta molecular al estrés salino. En este trabajo se reportaron modificaciones de la pared celular en condiciones de salinidad extrema, con un aumento del grosor de la pared celular y de la estructura laminar. Además, tres genes de hidrofobina se expresaron de forma diferencial bajo estrés hipo o hiperosmótico. El glicerol fue el principal soluto compatible acumulado en condiciones de estrés salino, mientras que la trehalosa se encontró en ausencia de sal (Pérez-Llano *et al.*, 2020).

De manera general la técnica de secuenciación del RNA (Illumina RNA-seq) ha sido aplicada ampliamente en especies modelo y no modelo de hongos filamentosos y levaduras, como *Aspergillus nidulans*, *A. salisburgensis*, *A. sclerotiales*, *Hortaea werneckii* y *Wallemia ichthyophaga*, examinando cientos de genes de tolerancia al estrés (Redkar *et al.*, 1996; Petrovič *et al.*, 2002; Zajc *et al.*, 2013; Tafer *et al.*, 2019). Aunque se realizan estudios para comprender los genes de tolerancia al estrés salino en los hongos, no hay informes sobre la respuesta de estos hongos a concentraciones saturantes de NaCl.

Si bien el transcriptoma es una herramienta muy útil para predecir e interpretar adaptaciones a nivel molecular, el hecho de encontrar determinado transcrito no garantiza que este posteriormente será traducido en una proteína. Sin embargo los metabolitos son los productos finales de los procesos reguladores celulares y sus niveles pueden considerarse como la respuesta final de los sistemas biológicos a los cambios genéticos o ambientales (Fiehn, 2002). Las alteraciones metabolómicas se ven reflejadas directamente como cambios en el fenotipo y la fisiología molecular (Johnson *et al.*, 2016). La metabolómica, al igual que las demás tecnologías ómicas, se utiliza actualmente para la identificación de biomarcadores y vías metabólicas alteradas (Fan *et al.*, 2004). Un experimento de metabolómica refleja directamente la actividad de la red metabólica que conduce a la producción de estos metabolitos y arroja información esencial sobre el estado biológico de un organismo en una condición determinada.

## 2.7. Metabolómica

La metabolómica es el campo científico, que se ocupa del estudio de los metabolitos orgánicos de bajo peso molecular (<1500 Da) que se producen de forma natural en una célula, tejido o biofluido (Griffiths, 2007; Nicholson and Lindon, 2008). Esto incluye moléculas endógenas y exógenas, que son los productos y sustratos de las reacciones químicas dentro de los sistemas biológicos. Esta técnica trata de identificar y cuantificar sistemáticamente los metabolitos de una muestra biológica. Los metabolitos representan un grupo diverso de estructuras de bajo peso molecular que incluyen lípidos, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, vitaminas, tioles y carbohidratos, lo que hace que el análisis global sea un reto. Estas pequeñas moléculas actúan como biomarcadores que representan el fenotipo en una célula, tejido u organismo (Arakaki *et al.*, 2008). Por estos motivos la metabolómica se ha utilizado en la evaluación de las respuestas al estrés ambiental, la comparación de mutantes, el descubrimiento de fármacos, la toxicología, la nutrición, el estudio de los efectos globales de la manipulación genética, el cáncer, la comparación de diferentes etapas de crecimiento, la diabetes y el descubrimiento de productos naturales (Wang *et al.*, 2011a).

Los metabolitos son los sustratos y productos del metabolismo que impulsan funciones celulares esenciales, como la producción y el almacenamiento de energía, la transducción de señales y la apoptosis. Las acciones bioquímicas de los metabolitos son de gran alcance, por ejemplo: metabolitos como el ATP, el acetil-CoA, el NAD<sup>+</sup> y la S-adenosilmetionina (SAM) pueden funcionar como co-sustratos, regulando las modificaciones postraduccionales que afectan a la actividad de las proteínas (Nakahata *et al.*, 2008; Wellen *et al.*, 2009). Además, las interacciones metabolito-proteína pueden contribuir a facilitar las respuestas celulares iniciando cascadas de señalización, lo que pone de manifiesto el papel de los metabolitos en la transducción de señales (Hubbard *et al.*, 2015). Indirectamente, los metabolitos afectan al entorno en el que se producen. En condiciones normales, existen controles homeostáticos para contrarrestar cualquier consecuencia biológica adversa de tales efectos. Por ejemplo, en el colon se encuentran altas concentraciones de metabolitos ácidos que disminuyen el pH del microambiente (Sharma *et al.*, 2015). Sin embargo, son neutralizados eficazmente por la producción de bicarbonato de la mucosa.

Para los estudios metabolómicos se pueden aplicar varios enfoques para identificar los

metabolitos y las vías metabólicas que se asocian con fenotipos particulares, y luego se puede integrar este conocimiento con estudios biológicos funcionales y mecanísticos. La metabolómica es un marco global de perfiles metabólicos que utiliza análisis de alta resolución (normalmente RMN y MS) junto con herramientas estadísticas quimiométricas como el análisis de componentes principales (PCA) y los mínimos cuadrados parciales (PLS). El reciente y rápido desarrollo de una serie de plataformas analíticas, como la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) y la electroforesis capilar (CE) acoplada a la espectroscopía de masas (MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), facilitan la separación, detección, caracterización y cuantificación de metabolitos y de las vías metabólicas relacionadas (Zhang *et al.*, 2012).

Un gran número de trabajos han estudiado las respuestas metabólicas a diferentes tipos de estrés, en particular para el estrés térmico y el estrés por desecación en plantas. Un punto importante aquí es que muchos cambios metabólicos a las perturbaciones biológicas pueden ser efectos indirectos de la reorganización de una red metabólica, y los cambios metabólicos observados no tienen por qué estar vinculados de manera obvia a la perturbación original. Por el contrario, en el caso del estrés fisiológico, los cambios en los metabolitos se pueden asociar directamente a un estímulo particular, un ejemplo clásico es la acumulación de trehalosa en invertebrados en estado latente (Clegg, 2001).

Los halófilos sobreviven a altas concentraciones de sal aumentando la osmolaridad interna de su citoplasma mediante la síntesis y/o acumulación de solutos compatibles o por internalización de iones. Sin embargo la diversidad de mecanismos bioquímicos para sobrevivir en entornos salinos necesita ser mejor caracterizada.

El descubrimiento de nuevos productos naturales procedentes de hongos aislados del medio marino ha aumentado drásticamente en las últimas décadas (Bugni and Ireland, 2004; Sulkowska-Ziaja *et al.*, 2005; Saleem *et al.*, 2007), lo que ha llevado a la identificación de más de 1000 nuevos metabolitos. Sin embargo, la mayoría de las especies de origen marino de las que se ha informado parecen ser de origen terrestre y, al mismo tiempo, facultativamente halo u osmotolerantes. La secuenciación del genoma confirma que los hongos poseen muchos más grupos de genes que codifican para metabolitos secundarios de los que se expresan en las fermentaciones que emplean métodos y materias primas

convencionales (Bennett and Ciegler, 1983).

Los estudios sobre la regulación génica de los hongos halófilos indican que, aunque los hongos individuales muestran diferentes estrategias de osmorregulación (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018), se ha encontrado que los genes expresados diferencialmente que codifican los transportadores de iones y metabolitos están regulados positivamente como una respuesta compartida al estrés salino (halotolerancia) (Zajc *et al.*, 2013). La relación entre la producción de metabolitos secundarios como respuesta al estrés salino es evidente a partir de estudios comparativos en los que se observó una expresión diferencial en la producción de metabolitos secundarios de una cepa de *Aspergillus terreus* aislada de una salina (Wang *et al.*, 2011c). También se observó que en el hongo *Spicaria elegans*, aislado de sedimentos marinos, la producción de diferentes metabolitos secundarios aumenta cuando se cultiva en condiciones salinas al 3% y al 10%. Destacándose la producción de cuatro metabolitos exclusivos del cultivo al 10% de salinidad (Wang *et al.*, 2011b).

Overy y colaboradores encontraron que la regulación de los metabolitos secundarios difiere entre el estrés osmótico (inducido por el glicerol) y el estrés salino (inducido por las sales marinas). En concreto, la producción de los metabolitos (CJ-15,183 un derivado dihidro-CJ-15,183 y de los aculenos A y B) aumentó en respuesta a una mayor concentración de glicerol, mientras que la producción en condiciones de estrés salino fue consistente con la condiciones de no estrés (control 0% de agua de mar/0% de glicerol). Metabolitos secundarios como aspergillusol, el ácido secalónico D, el aculeno C y otro análogo del aculeno, aumentan en condiciones salinas (Overy *et al.*, 2017). Curiosamente, el aspergillusol se describió por primera vez en una cepa de origen marino (CRI323-04) de *A. aculeatus* cultivada en caldo de dextrosa de patata utilizando agua de mar (Ingavat *et al.*, 2009).

El análisis metabolómico nos ofrece información valiosa sobre la presencia de metabolitos no identificados, comunes y/o específicos para cada condición, incluyendo lípidos y aminoácidos. Sin embargo debido a la importancia de estas biomoléculas en la fisiología y metabolismo celular, en nuestro trabajo realizamos análisis adicionales para determinar identificar y cuantificar estas moléculas tanto en micelio como en el medio extracelular.

### 2.7.1 Amino ácidos

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes y son mucho más diversas en estructura y función que otras clases de macromoléculas. Estas median prácticamente en todos los procesos que tienen lugar en una célula y son los instrumentos moleculares a través de los cuales se expresa la información genética. Son factores dominantes en la célula, tanto en términos de funcionalidad como de biomasa, tanto que representan aproximadamente la mitad de la masa seca total. Una sola célula puede contener miles de proteínas, cada una con una función única, y número de copias por célula de cada proteína muy variable. Las proteínas son polímeros de aminoácidos, con cada residuo de aminoácido unido a su vecino mediante un tipo específico de enlace covalente. Los 20 aminoácidos comunes son  $\alpha$ -aminoácidos. Tienen un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono (el carbono  $\alpha$ ). Se diferencian entre sí por sus cadenas laterales, o grupos R, que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica, y que influyen en la solubilidad de los aminoácidos en el agua. Comúnmente se usa el término aminoácido para referirse a los 20 aminoácidos proteínogénicos (formadores de proteínas) estándar. En realidad, un aminoácido es cualquier compuesto orgánico que contenga amina ( $-\text{NH}_2$ ) y carboxilo ( $-\text{COOH}$ ). Se han identificado más de 500 aminoácidos naturales se han identificado (Wagner and Musso, 1983). Algunos son residuos modificados después de sintetizar una proteína; otros son aminoácidos presentes en los organismos vivos pero que no forman parte de las proteínas. Los aminoácidos no sólo actúan como bloques de construcción de las proteínas, sino que *S. cerevisiae* puede también utilizar la mayoría de los aminoácidos proteínogénicos, así como la citrulina, la ornitina y el GABA, como única fuente de nitrógeno (Godard *et al.*, 2007). El catabolismo de la mayoría de los aminoácidos también proporciona una fuente de carbono, excepto los que se alimentan de la vía de Ehrlich (Hazelwood *et al.*, 2008). Los aminoácidos también participan en numerosas vías metabólicas, incluyendo la síntesis de NAD, folato, glutatión, nucleótidos, poliaminas y fosfolípidos (Bianchi *et al.*, 2019). En este sentido determinar la concentración de proteínas en las células, composición de aminoácidos de las proteínas y/o el número de copias de proteína en una célula es importante para conocer la diversidad de mecanismos fisiológicos empleados por la célula ante diferentes condiciones ambientales.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas y aminoácidos. Muchos de estos métodos se basan en: la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el espectro de luz ultravioleta (UV), la formación de derivados químicos, o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes. La absorbancia de luz UV a 280nm es un método que se basa en las propiedades de los aminoácidos aromáticos tirosina, triptófano, fenilalanina y los puentes disulfuro. Entre los métodos basados en la formación de derivados químicos/colorimétricos se encuentran ácido bicinonínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985), Biuret y Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Otros métodos utilizados son los de turbidimetría, entre los que se encuentran el de Nefelometría, Kjeldahl y el bien conocido método de Bradford (Bradford, 1976), así como la adhesión al colorante aniónico (AOAC, 1995). Los métodos más utilizados para la medición de proteínas son; los métodos de Lowry, Bradford y el BCA. Para la selección del método a utilizar lo más importante es conocer las características de la muestra, pues cada método tiene sus ventajas y desventajas (Shen *et al.*, 2013).

El método de Lowry se basa en dos reacciones colorimétricas diferentes. La primera es la formación de un complejo de iones de cobre con enlaces amida; formando cobre reducido que en soluciones alcalinas se observa un color morado de poca intensidad. Este cromóforo de Biuret suele estabilizarse mediante la adición de tartrato (Gornall *et al.*, 1949). La segunda reacción se observa de color azul-verde y consiste en la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungstato), en presencia de ácido fosfórico y clorhídrico, principalmente por el complejo de enlace cobre-amida reducido así como por los residuos de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y triptófano. Este método permite determinar la concentración de proteína en rangos de 0.01-1 mg/mL (Waterborg and Matthews, 1994). Dado que el reactivo Folin-Ciocalteu reducido es azul, es detectable con un espectrofotómetro en el rango de 500 a 750 nm.

La reacción de Biuret en sí misma no es muy sensible. El uso del reactivo Folin-Ciocalteu para detectar el cobre reducido hace que el ensayo de Lowry sea casi 100 veces más sensible que la reacción de Biuret por sí sola (Olson, 2016). Se han desarrollado varias modificaciones útiles del ensayo original de Lowry para aumentar la sensibilidad y detectar menores concentraciones de proteínas (Hartree, 1972), y al mismo tiempo haciéndolo menos sensible a la interferencia de los detergentes (Dulley and Grieve, 1975), (Bensadoun and Weinstein, 1976).

La mayoría de los métodos son sensibles a la composición de aminoácidos de la proteína y no se pueden obtener concentraciones absolutas. El procedimiento de Lowry no es una excepción, pero su sensibilidad es moderadamente constante de proteína a proteína, y ha sido tan ampliamente utilizado que las estimaciones de proteínas de Lowry son una alternativa completamente aceptable para una determinación absoluta rigurosa en casi todas las circunstancias en las mezclas de proteínas o extractos crudos (Redmile-Gordon *et al.*, 2013). El método más preciso para determinar la concentración de aminoácidos de una proteína es probablemente la hidrólisis ácida seguida del análisis de aminoácidos. Este método se basa en el análisis de aminoácidos mediante la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, o High Performance Liquid Chromatography, (HPLC). Consiste en la elución diferencial de una mezcla de compuestos a través de una columna cromatográfica. La detección de aminoácidos generalmente es a través de su absorbancia o fluorescencia ante una determinada longitud de onda, y su presencia es registrada en una forma gráfica denominada cromatograma. Se puede así evaluar cualitativa y cuantitativamente los componentes de una mezcla, comparándolos con estándares de concentración conocida. El análisis de aminoácidos proteicos involucra una metodología compleja compuesta por los siguientes pasos: hidrólisis de la proteína, derivatización de aminoácidos, separación cromatográfica, y su cuantificación requiriendo el uso de una mezcla de estándares de referencia.

En nuestro trabajo por la naturaleza de las muestras y disminuyendo al máximo las posibles interferencias que pudieran ser ocasionadas por los buffers, utilizamos el método de Lowry para la cuantificación total de proteínas y también el análisis de aminoácidos por HPLC. Así expresamos los resultados en porcentajes para cada aminoácido sobre proteínas totales.

Una respuesta común al estrés salino en los hongos es la acumulación de derivados de aminoácidos (péptidos y aminoácidos N-acetilados) y algunos ácidos orgánicos (Jennings, 1984; Casonka, 1989; Casonka & Hanson, 1991; Fougere & Streeter, 1991; Luxo *et al.*, 1993). Los aminoácidos, diaminoácidos y carboxamidas N-derivadas de la glutamina pueden funcionar como solutos compatibles en diferentes grupos de microorganismos (Roberts, 2005). Dentro del género *Aspergillus* existen evidencias de cambios en el contenido de aminoácidos libres como respuesta al estrés osmótico provocado por altas concentraciones de NaCl en el medio. Algunos autores reportan afectaciones tanto en la composición como los porcentajes de aminoácidos de *A. flavus* y *P. roquefortii* por la presencia de NaCl en el

medio (Abu-Seidah, 2007). En el caso de *A. flavus*, algunos aminoácidos inusuales no fueron detectados en presencia de una alta concentración de NaCl, como el ácido  $\alpha$ -amino-adípico y el ácido  $\alpha$ -aminobutírico. Además, la glicina, que puede actuar como aminoácido osmolítico, y el ácido  $\gamma$ -amino-n-bútrico, aumentaron. Se detectaron algunos aminoácidos en presencia de NaCl en el medio de crecimiento, como la taurina y la 3-metil histidina, además a la alanina como soluto compatible. En *A. flavus*, el ácido glutámico aumentó aproximadamente un 6% y un 18% en presencia de 4% y 8 % de NaCl respectivamente. La concentración de prolina aumentó ligeramente, mientras que la hidroxiprolina no fue detectada en presencia de NaCl (Abu-Seidah, 2007).

En cuanto al cambio en la proporción de amino ácidos, las hidrofobinas de *W. ichthyophaga* contienen una mayor proporción de aminoácidos ácidos en la superficie de la proteína respecto a sus homólogos en hongos no halófilos, lo que indica una adaptación a la exposición a la sal (Zajc *et al.* 2013). Basado en análisis genómicos ha sido reportado que la mayoría de las proteínas de *E. rubrum* pertenecen a familias de genes compartidas con otras nueve especies de *Trichocomaceae*. Entre las 10 cepas, el contenido más alto de proteínas con residuos de de ácido aspártico y glutámico fue encontrado en *E. rubrum*, seguido por el halotolerante *Penicillium chrysogenum* (*Eurotiomycetes*). El análisis de dos especies halófilas adicionales, *Wallemia ichthyophaga* (*Basidiomycota*) y *Hortaea werneckii* (*Dothideomycetes*), confirmó que las familias de genes con alto contenido de residuos ácidos son particularmente frecuentes en estos tres taxones halófilos.

El análisis comparativo del transcriptoma en *Hyphopichia* revela la inducción específica provocada por NaCl de los genes implicados en la biosíntesis y el metabolismo de los aminoácidos, en particular el *BAT2*. Esto sugiere la posible asociación entre la reacción de oxoácidos que implica a los aminoácidos de cadena ramificada y la osmotolerancia (Lee *et al.*, 2021).

### 2.7.2 Ácidos grasos

Los lípidos son un grupo heterogéneo de moléculas hidrofóbicas. Los lípidos son un componente esencial de la membrana celular, su estructura varía desde simples cadenas cortas de hidrocarburos hasta moléculas más complejas, como los triacilgliceroles, fosfolípidos y esteroides y sus ésteres.



Los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburos de diferente longitud y grado de insaturación (presencia de dobles enlaces), con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro. Los carbonos suelen estar numerados desde el grupo carboxilo hasta el grupo metilo ( $\omega$  o n). Los ácidos grasos más abundantes tienen un número par de carbonos, con una cadena recta, con excepciones, como un número impar (por ejemplo, en los tejidos de los rumiantes), con cadena ramificada (por ejemplo, en las bacterias) o con sustituciones (Gurr *et al.*, 2002). El grado de insaturación puede variar desde un doble enlace (ácidos grasos monoinsaturados, o MUFAs) a dos o más (ácidos grasos poliinsaturados, o PUFAs).

La técnica de la cromatografía de gases (GC) revolucionó el estudio de los lípidos al hacer posible determinar la composición completa de ácidos grasos de un lípido en muy poco tiempo (Christie, 1989). Para ello, los componentes de los ácidos grasos de los lípidos se convierten en los derivados volátiles más sencillos, normalmente ésteres metílicos, aunque se pueden preferir otros ésteres para fines específicos (Christie, 1993).

La variación estructural entre los lípidos complejos y entre los ácidos grasos da lugar a diferencias funcionales que se traducen en distintos efectos sobre el metabolismo y sobre las respuestas de las células y los tejidos (Burdge and Calder, 2015). Los ácidos grasos son omnipresentes en la naturaleza y, como tales, pertenecen a una clase fisiológicamente importante de moléculas que intervienen en el almacenamiento de energía de las células (por ejemplo, en los tejidos adiposos), en la estructura de las membranas (bicapa de fosfolípidos) y en varias vías de señalización (Liu *et al.*, 2008).

Los ácidos grasos en forma de fosfolípidos son componentes importantes de la bicapa lipídica de la membrana celular de todas las células. La membrana fúngica tiene el papel fundamental de mantener el orden y la integridad de la célula, por lo que muchos tratamientos antifúngicos se dirigen principalmente a la membrana fúngica (Avis, 2007). Los esteroides, especialmente el ergosterol, facilitan el aumento de la fluidez de la membrana, por lo que las membranas fúngicas con bajo contenido en esteroides son sensibles a cambios en la salinidad e incapaces de hacer frente a elevaciones excesivas de la fluidez de la membrana (McDonough *et al.*, 2002).

En bacterias halófilas como *Halomonas halmophila*, *H. halophila* y *H. campisalis*, han sido reportados cambios en la membrana plasmática inducidos por la salinidad (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Entre estos cambios se encuentran la disminución de los ácidos grasos trans,

aumento de los ácidos grasos ciclopropánicos y ácidos grasos monoenoicos, mayor grado de saturación de ácidos grasos, disminución de los ácidos grasos de cadena ramificada y aumento de ácidos grasos insaturados y glicolípidos (Oren, 2002).

En levaduras como *Z. rouxii* cultivada en 15% de NaCl se encontraron mayores cantidades de ergosterol libre (no esterificado), disminución de la insaturación de ácidos grasos y disminución de la fluidez de la membrana que cuando se cultivó sin NaCl (Hosono, 1992).

En *Y. lipolitica* la alta salinidad no indujo cambios significativos en la insaturación de los ácidos grasos, sin embargo causó una disminución del contenido de fosfolípidos y esteroides (Andreishcheva *et al.*, 1999). Por el contrario, *C. membranefaciens* cultivada a altas concentraciones de NaCl mostró aumentos en la insaturación de los ácidos grasos y en los contenidos de fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE), lo que resultó en mayor fluidez de la membrana (Khaware *et al.*, 1995). En *D. hansenii*, el estrés salino provocó una disminución del contenido de esteroides, fosfatidilglicerol (PG), PI y PE; mientras que el contenido relativo de fosfatidilserina (PS) aumentó (Tunblad-Johansson *et al.*, 1987; Turk *et al.*, 2004).

En los hongos *Aureobasidium pullulans* y *Hortaea werneckii* en diferentes condiciones de salinidad, ha sido reportado un aumento de los ácidos grasos insaturados mientras que en *Debaryomyces hansenii* y *Phaeothea triangularis* se encontró una ligera disminución de los mismos. En este último también se reporta aumento sustancial de fosfatidilglicerol y una disminución de fosfatidilinositol y fosfatidilserina.

En cuanto a la fluidez de la membrana que está directamente relacionada con la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados, en *H. werneckii* la disminución de la fluidez ocurre con concentraciones de NaCl subóptimas (<5%) y superiores a las óptimas (>15%) mientras que en condiciones óptimas de salinidad la fluidez aumenta. De igual manera para *Wallemia ichthyophaga* disminuye la fluidez en condiciones subóptimas y aumenta en concentraciones óptimas de NaCl. En *Aureobasidium pullulans* se observa menor fluidez que en hongos halófilos y aumento de la fluidez de la membrana a salinidades superiores al rango óptimo al igual que en *Rhodotorula mucilaginosa* y *Saccharomyces cerevisiae* (Gostinčar *et al.*, 2009). Por otra parte *Debaryomyces hansenii* no mostró cambios significativos de fluidez en su membrana como respuesta a la presencia de NaCl. De manera general como respuesta a la salinidad, podemos observar baja relación sterol/fosfolípidos y aumento en la desaturación

de ácidos grasos aumentando así la fluidez de la membrana. En los halófilos *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis* y el halotolerante *Aureobasidium pullulans* las principales clases de fosfolípidos reportados en membrana son la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, seguidas de los fosfolípidos aniónicos. Los ácidos grasos más abundantes en los fosfolípidos generalmente contienen longitudes de cadena C16 y C18 (Turk *et al.*, 2004).

Como habíamos visto anteriormente los hongos del género *Aspergillus*, tienen una gran diversidad metabólica que les permite crecer en diferentes sustratos (Grant *et al.*, 2004) incluyendo en el rango de los menores valores de  $a_w$  que sustentan la vida (0.75-0.80) por lo que son modelos atractivos para el estudio de los mecanismos de xerofilia. Particularmente *Aspergillus sydowii* resulta de gran interés para nuestro grupo pues representa un modelo para el estudio de los mecanismos de adaptación a la halofilia.

### 2.8 *Aspergillus sydowii*

*Aspergillus sydowii* es un hongo ubicuo, halófilo y saprótrofo que se encuentra tanto en entornos terrestres, como marinos (Geiser *et al.*, 1998). Se ha descrito como un patógeno oportunista humano (de Hoog *et al.*, 2000) y un importante patógeno de los arrecifes de coral (*Gorgonia ventalina* (Geiser *et al.*, 1998; Ein-Gil *et al.*, 2009), pero solamente los aislados marinos causan la enfermedad ) (Geiser *et al.*, 1998), demostrando la importancia de la naturaleza halófila de *A. sydowii* y el potencial de los ambientes marinos hipersalinos (por ejemplo, las salinas) para servir como reservorios naturales para la propagación del hongo (Chung *et al.*, 2019). Aunque *A. sydowii* no tiene un requisito obligatorio de NaCl, su crecimiento óptimo ocurre en 1 M de NaCl y puede llegar a crecer aunque débil y escasamente a 5.13M NaCl (concentración de saturación) (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020). Debido a su amplia tolerancia al rango de salinidad, desde la ausencia de NaCl hasta 5.13 M de NaCl, *A. sydowii* puede ser considerado como un halófilo extremo y un modelo para estudiar en hongos filamentosos las adaptaciones a condiciones extremadamente salinas (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020; Pérez-Llano *et al.*, 2020; Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021). Este hongo crece principalmente en forma hifal a diferencia de otros halófilos extremos que crecen meristemáticamente como la levadura negra basidiomiceto *Hortaea werneckii* (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000), la levadura negra ascomiceto *Aureobasidium pullulans* (Zalar *et al.*,

2008) o el hongo filamentoso basidiomiceto *Wallemia ichthyophaga* (Zajc *et al.*, 2013). El primero de los trabajos de nuestro grupo sobre *A. sydowii* fue publicado por Batista-García *et al.* 2014 y estuvo enfocado en la descripción de *A. sydowii* y la caracterización de la actividad lignocelulolítica del mismo, crecido a partir de una fermentación de un lote de bagazo de caña de azúcar, con medio mineral suplementado con 2.0 M de NaCl. Aquí los autores hacen referencia a los posibles usos de este hongo con aplicaciones biotecnológicas. Siguiendo esta guía, González-Abradeo *et al.* 2019 reportan la capacidad de *A. sydowii* para la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) (benzo- $\alpha$ -pireno y fenantreno) en condiciones de alta salinidad. Este trabajo muestra por primera vez el potencial de *A. sydowii* (ascomiceto halófilo) para la biorremediación de xenobióticos. Peidro-Guzmán *et al.* 2020, profundizaron en este tema mediante la realización de un análisis transcriptómico de *A. sydowii* creciendo en presencia de PAHs y en condiciones de alta salinidad. La expresión transcripcional de *A. sydowii* mostró la presencia de genes regulados positivamente relacionados con escasez de nutrientes, remodelación de la pared celular, degradación y metabolismo de xenobióticos, metabolismo del *DNA* y el *RNA*, generación de energía, señalización y respuesta general al estrés, siendo este uno de los estudios transcriptómicos más profundos sobre la degradación de PAHs en hongos. Por su parte Pérez-Llano *et al.* 2020 realizaron un estudio transcriptómico de *A. sydowii* en condiciones de hipo e hiper-osmolaridad. Se encontraron transcritos diferencialmente expresados (DE) en ambas condiciones de estrés, como por ejemplo, tres genes de hidrofobina se expresaron diferencialmente bajo estrés hipo o hiperosmótico pero no cuando el hongo crece óptimo. En cuanto a los solutos compatibles, el glicerol es el principal compuesto acumulado en condiciones de estrés salino, mientras que la trehalosa se acumula en ausencia de sal. Sin embargo, solo fueron encontrados transcritos DE para la modificación de pared celular y el transporte de cationes metálicos en condiciones de alta salinidad. En este trabajo los autores reportaron modificaciones transcripcionales principalmente en condiciones de hiperosmolaridad y no en condición óptima (CO) de salinidad, sugiriendo que la mayoría de los mecanismos descritos para el crecimiento en condiciones de halofilia son una respuesta provocada ante estrés salino y no una adaptación a condiciones hiperosmóticas. Recientemente Rodríguez-Pupo *et al.* 2021 publicaron un extenso trabajo donde profundizan en el estudio de la vía de HOG y la estrategia de acumulación de solutos compatibles en *A.*

*sydowii* corroborando la presencia de estos solutos. La vía de HOG como tratamos anteriormente consiste en una cascada de transducción de señales de MAPK que provoca la expresión diferencial de genes mediante la fosforilación de determinados factores de transcripción. Los autores refieren que *A. sydowii* contiene tres homólogos de Hog1 MAPK (Hog1, Hog2 y MpkC) y encontraron una regulación diferencial de estas MAPKs, las cuales se activaron en condiciones de hipo e hiper osmolaridad. Estos resultados sugieren que hongos halófilos/halotolerantes como *A. sydowii* utilizan diferentes mecanismos de osmoadaptación para contender con altos niveles de salinidad. Hasta aquí se evidencia que *A. sydowii* es un hongo ampliamente estudiado por su potencial biotecnológico y como un modelo para el estudio de adaptaciones y mecanismos de respuesta a estrés osmótico por hipo e hiper osmolaridad. Sin embargo, no hay ningún estudio que aborde la expresión transcripcional de *A. sydowii* en condiciones de saturación de NaCl. Además, los estudios sobre perfil metabolómico, presencia de ácidos grasos y aminoácidos son escasos en hongos en condiciones de hipersalinidad. Por tales motivos nos proponemos continuar explorando las osmoadaptaciones morfológicas, fisiológicas y moleculares de *A. sydowii* en la concentración saturada de NaCl mediante la siguiente hipótesis y objetivos.

### **3. Hipótesis**

Para contender con condiciones de baja  $a_w$  impuesta por NaCl, *Aspergillus sydowii* sufre una reprogramación transcripcional que se refleja en adaptaciones a nivel molecular, fisiológico y morfológico.

#### **4. Objetivo general**

Analizar las estrategias de adaptación de *Aspergillus sydowii* ante condiciones de baja  $a_w$  impuesta por NaCl.

##### **4.1 Objetivos específicos**

1. Establecer las condiciones de crecimiento óptimo de *A. sydowii* y determinar el día de crecimiento exponencial en condiciones de  $a_w$  óptima.
2. Caracterizar comparativamente los cambios morfológicos de *A. sydowii* en condiciones de estrés por hiper e hipo osmolaridad y en condición óptima.

3. Determinar la composición de solutos osmóticamente activos en *A. sydowii* durante su crecimiento en condiciones óptima y de hiperosmolaridad.
4. Evaluar biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos indicadores de respuesta al alto estrés oxidativo en condiciones óptima y de hiperosmolaridad.
5. Analizar la expresión transcripcional de genes relacionados con el estrés oxidativo de *A. sydowii* crecido en condiciones de hiperosmolaridad y en condición óptima.
6. Analizar el perfil transcripcional de mRNA y la ontología genética de *A. sydowii* crecido en condiciones de hiperosmolaridad y en condición óptima.
7. Estudiar y clasificar lncRNAs y factores transcripcionales presentes en el perfil transcripcional de *A. sydowii* crecido en condiciones de hiperosmolaridad y en condición óptima.
8. Analizar el perfil metabolómico de *A. sydowii* en condiciones de hiperosmolaridad (saturación por NaCl) y en condición óptima.
9. Analizar el perfil aminoacídico de *A. sydowii* en condiciones de hiperosmolaridad (saturación por NaCl) y en condición óptima.
10. Analizar el perfil de ácidos grasos de *A. sydowii* en condiciones de hiperosmolaridad (saturación por NaCl) y en condición óptima.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Cepa, conservación y condiciones de cultivo

*Aspergillus sydowii* EXF-12860 utilizado en este estudio es un hongo halófilo aislado de la fermentación sólida del bagazo de la caña de azúcar en presencia de 2.0 M de NaCl. Esta cepa mostró un crecimiento óptimo en medios de cultivo suplementados con 0.5-1.0 M de NaCl [15]. El hongo fue cultivado y mantenido en Agar Malta Levadura (YMA): extracto de malta 10 g/L, extracto de levadura 4 g/L, dextrosa 4 g/L, peptona micológica 5 g/L, agar 15 g/L. Las esporas y el micelio se conservaron en glicerol al 20% a -80 °C y se depositaron en la Colección de Cultivos Microbianos del Centro de Infraestructura Mycosmo, Departamento de Biología, Facultad de Biotecnología, Universidad de Ljubljana (Eslovenia). En este estudio se utilizaron cultivos suplementados con dos concentraciones de NaCl 1.0 M (crecimiento óptimo,  $a_w = 0.98$ ) y 5.13 M de NaCl (solución saturada de NaCl,  $a_w = 0.75$ ). En todos los experimentos se utilizó como preinóculo el micelio obtenido de cultivos frescos de EXF-12860 suplementados con 1.0 M de NaCl.

### 5.2. Análisis morfológico de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en solución saturada de NaCl

Las características morfológicas de la colonia fúngica se examinaron inoculando 0.1 g de micelio fresco en placas de medio YMA con adición de NaCl a 0, 1.0 o 5.13 M como concentración final. Para describir el aspecto macromorfológico de las colonias, se utilizaron cultivos de diez días de *A. sydowii* EXF-12860 incubados a 28 °C en la oscuridad. Para las observaciones micromorfológicas de EXF-12860 se utilizó el método del "bloque de agar invertido" (Hickey *et al.*, 2002), empleando un sistema de obtención de imágenes de células vivas equipado con un microscopio de barrido láser invertido (NiKon Eclipse Ti-U, Tokio, Japón) con un objetivo Apo 60x/1.49 A.N. Se utilizó una cámara Hamamatsu Orca Flash 4.0 para la adquisición de datos. Las imágenes confocales se analizaron cuantitativamente utilizando el software ImageJ (Rueden *et al.*, 2017). Para el examen micromorfológico, se fijaron las hifas vegetativas y se tiñeron con blanco de calcoflúor y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Las muestras se excitaron con una lámpara de mercurio equipada con filtros ET-DAPI. Se determinó la longitud del

compartimento hifal apical, la frecuencia de septación, los índices de ramificación y de núcleo, y los diámetros de las hifas analizando 30 hifas independientes. Las imágenes se procesaron y produjeron con Adobe Photoshop CS6 Extended (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Se muestran campos microscópicos representativos como imágenes finales.

### 5.3. Determinación de osmolitos en *Aspergillus sydowii* EXF-12860 expuesto a una concentración saturada de NaCl

Las concentraciones de arabitol, eritritol, galactitol, glicerol, maltitol, manitol, ribitol, sorbitol, trehalosa y xilitol se determinaron usando 100 mg de micelio obtenidos por centrifugación después de 0, 18, 96 y 168 h de crecimiento fúngico en caldo de malta de levadura (YMB). También se determinó la concentración de osmolitos después de choques hipoosmóticos utilizando 200 mg de micelio: (i) de 1.0 M a 0 M de NaCl y (ii) de 5.13 M a 1.0 M de NaCl (ver Figura 3D). Los cultivos fúngicos de siete días se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de YMB con 1.0 M o 5.13 M de NaCl. Después de exponer el micelio a choques hipoosmóticos, se incubó a 28 °C durante 30 minutos y se recogió entonces por centrifugación.

La extracción de los solutos compatibles se realizó según lo descrito anteriormente por (Kogej *et al.*, 2007a). El micelio se secó a 60 °C y se mezcló con 1,5 mL de solución de Bligh y Dyer (metanol: cloroformo: agua, 10:5:4) durante 30 min. Posteriormente, se añadió cloroformo (450 µL) y agua desmineralizada (450 µL). La solución resultante se agitó enérgicamente durante 30 min y, finalmente, se centrifugó a 6000×g durante 10 min para la separación de fases. Se recogieron 100 µL de la fase superior (metanol:agua) y se inyectaron 50 µl en un cromatógrafo líquido de alto rendimiento (HPLC) (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE.UU.). El análisis cromatográfico se realizó en un sistema isocrático equipado con una columna AMINEX-HPX87H -de 300 mm × 7.8 mm- (Bio-Rad, Munich, Alemania). Se utilizó ácido sulfúrico (5 mM) como fase móvil a un flujo de 1 mL/min. Las curvas de calibración se obtuvieron utilizando estándares analíticos de 5 mg/mL y 10 mg/mL de cada uno de los osmolitos probados (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Los cromatogramas se procesaron con el software ChromQuest versión 2.51



(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El análisis cromatográfico ( $n = 3$ ) se realizó en el Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelos (México).

#### 5.4. Biomarcadores de estrés oxidativo en *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en condiciones hipersalinas

A partir de cultivos de *A. sydowii* crecido en medio YMB suplementado con 1.0M y 5.13M de NaCl por 96H con, se colectaron los sobrenadantes y las fracciones celulares se obtuvieron por centrifugación a  $6000\times g$ . Las células se trituraron en nitrógeno líquido y se añadió 1 mL de H<sub>2</sub>O milliQ por muestra. Se realizaron determinaciones tanto de los sobrenadantes como de las fracciones celulares ( $n=3$ ).

Se determinaron tres biomarcadores antioxidantes: 1. La actividad de la superóxido dismutasa se evaluó midiendo la inhibición de la autooxidación del pirogalol (Marklund and Marklund, 1974). Brevemente, se mezclaron 32  $\mu$ L de una solución de pirogalol 7.37 mM en agua destilada con tampón Tris-HCl (50 mM, pH 8.2) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,6 mM. Después de añadir 10  $\mu$ L de muestra, la tasa de formación de pirogalol oxidado (purpurogalina-quinona) se midió espectrofotométricamente a 405 nm durante 1 minuto (Ramasarma *et al.*, 2015). 2. Se determinó también la actividad de la catalasa utilizando el kit EnzyChrom™ Catalase Assay (BioAssay System, Hayward, CA, USA) y 3. se monitorizó la glutatión peroxidasa utilizando el kit Glutathione Peroxidase Assay (Abcam, Boston, MA, USA).

Además de estos tres biomarcadores enzimáticos se cuantificó la concentración de glutatión reducido como se describió previamente por (Ecobichon, 1984) con pequeñas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 5  $\mu$ L de la muestra con tampón fosfato 0.1 M de pH 8 y 50 mL de  $10^{-2}$  M 5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB). La producción de color debida a la oxidación del DTNB se midió espectrofotométricamente a 412 nm. La concentración de glutatión reducido se determinó utilizando una curva estándar de glutatión reducido preparada en tampón fosfato 0,1 M de pH 8.

Adicionalmente, se analizaron otros cinco biomarcadores de oxidación. La concentración de peróxido de hidrógeno se midió utilizando el kit BIOXYTECH® H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-560 Assay

(Bioxytech, Portland, OR, USA). Los productos protéicos de oxidación avanzada se cuantificaron como se ha descrito previamente (Witko *et al.*, 1992). Otro indicador de oxidación, se realizó un ensayo colorimétrico para los marcadores de peroxidación lipídica. Los niveles de malondialdehído y de 4-hidroxi-alquenos se determinaron a 586 nm según (Erdelmeier *et al.*, 1998). Finalmente, se determinó la susceptibilidad a la peroxidación lipídica según (Ozdemirler *et al.*, 1995). Las muestras se incubaron con sulfato de cobre 2 mM a 37 °C durante 24 h. Los niveles de malondialdehído se midieron a 586 nm.

### 5.5. Cálculos estadísticos

Todas las determinaciones experimentales se realizaron por triplicado con tres réplicas técnicas. Las diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre las medias de las determinaciones morfológicas o las cantidades de los marcadores de estrés oxidativo se determinaron mediante ANOVA de una vía y la prueba HSD de Tukey como análisis post hoc. Las diferencias ( $p < 0,05$ ) entre las cantidades medias de osmolitos se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y la prueba de Dunn como análisis post hoc. Los cálculos estadísticos se realizaron con GraphPad versión Prism8 (<https://www.graphpad.com>). El análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) para visualizar las ordenaciones estadísticas de los datos de las determinaciones de osmolitos, se realizó en R utilizando el paquete vegan (R Development Core Team).

Para analizar la agrupación de las muestras según los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando la función PCA del paquete FactoMineR para R (R Development Core Team). Los valores perdidos se imputaron previamente utilizando el algoritmo PCA iterativo regularizado del paquete missMDA para R (R Development Core Team). En ambos análisis, las variables se escalaron a la varianza unitaria. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para cada par de indicadores con el fin de analizar la correlación entre los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo.

5.6. Extracción de RNA total, construcción de librerías, secuenciación y análisis del transcriptoma de *A. sydowii* en la condición óptima (CO) y la condición de estrés (CE).

La extracción del RNA de *A. sydowii* en la CO se realizó mediante el kit Zymo Spin y para el caso de la CE se empleó el método tradicional con fenol ácido, pues con el kit no se logró obtener el RNA. Este segundo método se diferencia del kit pues incorpora dos rondas de precipitación de la molécula de interés, en las cuales se trata con la solución desnaturizante y con el fenol ácido, el cual garantiza que el RNA este en la fase acuosa y el *DNA* en la interfase (Chomczynski and Sacchi, 2006). Fue efectivo utilizar este método para obtener el RNA de *A. sydowii* crecido en medio YMB con 5.13 M de NaCl considerando que uno de los cambios morfológicos de este hongo filamentoso puede ser el engrosamiento de la pared celular, lo que pudiera tener una influencia negativa en la lisis celular química. Además este método incluye dos precipitaciones de RNA y propicia un medio más ácido para garantizar la extracción de la molécula de RNA totalmente independiente del *DNA*.

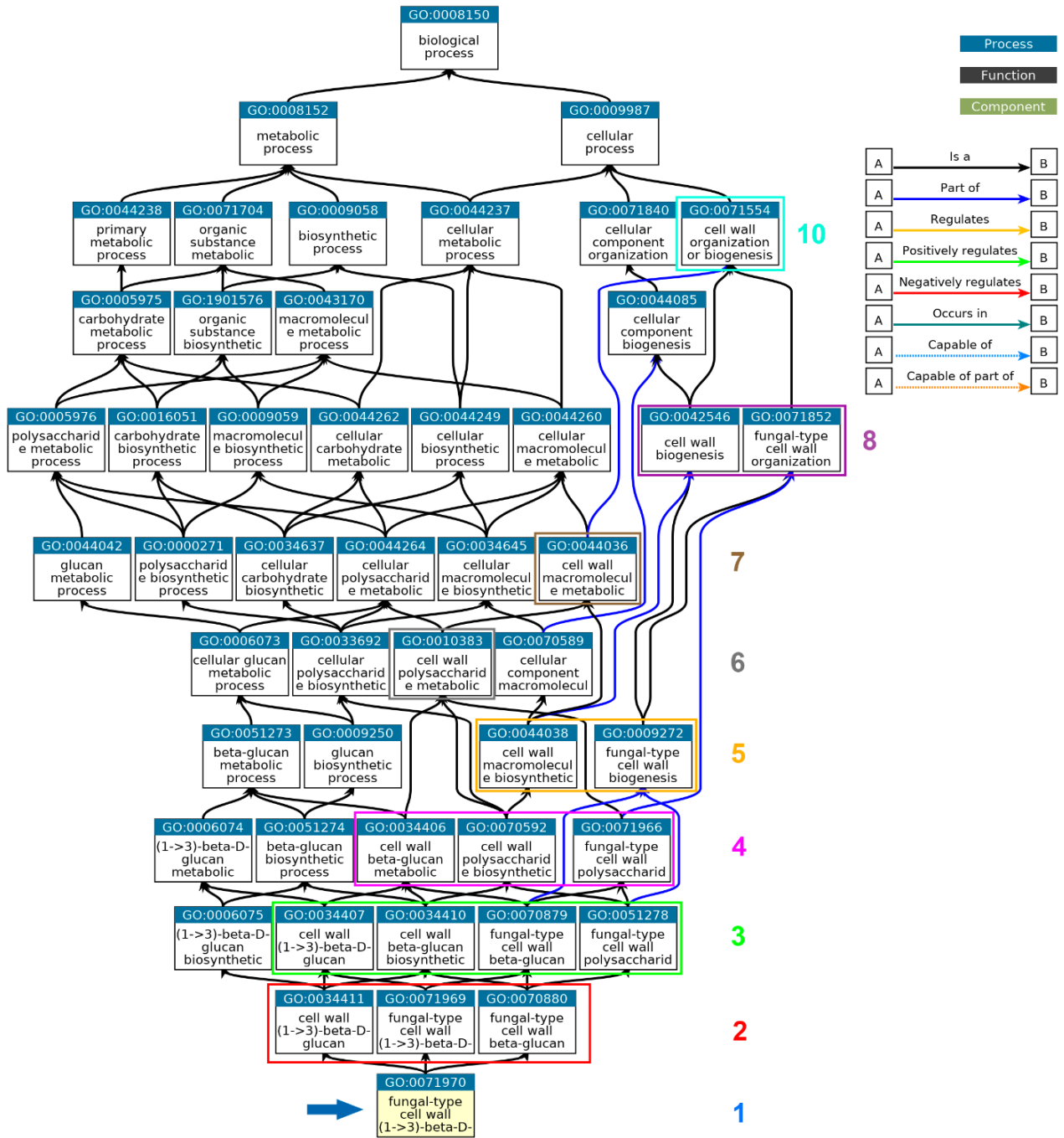
Mediante electroforesis capilar se obtuvieron los RIN (RNA Integrity Number) para todas las réplicas los cuales cumplen con el requerimiento de ser mayores que 6 y lo más cercano a 10 posible. La figura 3 muestra los electroferogramas correspondientes a todas las muestras donde se presentan señales intensas y estrechas de los fragmentos 28S y 18S. Las réplicas de la CE presentan el pico correspondiente al fragmento 28S más grande con respecto al 18S, sin embargo este aspecto no es homogéneo para el caso de la réplicas de CO. Esta diferencia se puede deber a que las extracciones del RNA de la CE y la CO se realizaron con dos métodos diferentes.

El análisis de la calidad de las secuencias se realizó mediante el software FastQC. Dados los parámetros de calidad obtenidos, fue necesario realizar un preprocesamiento de las lecturas para potenciar su calidad. Para ello se utilizaron varias herramientas bioinformáticas como `RemoveFastqcOverrepSequenceReads.py` (Freedman and Weeks, 2016) para la eliminación de las secuencias sobrerrepresentadas; `Trimmomatic 0.39` para remover los adaptadores (longitud mínima de contig de 124 bp, tamaño k-mer de 23) resultado del proceso de secuenciación (Bolger *et al.*, 2014). Seguidamente las secuencias fueron procesadas con `Rcorrector` (Song and Florea, 2015) y `BBnorm` para corregir errores y normalizar la cobertura de lectura. El ensamblaje de novo de las secuencias se realizó utilizando el software `Trinity 2.10.0` (Grabherr *et al.*, 2011a; Haas *et al.*, 2013). La metodología BUSCO (versión 4.0.5) se

empleó para evaluar la integridad del transcriptoma completo (Seppey *et al.*, 2019). Se utilizó Blast2GO para generar anotaciones funcionales de alta calidad y el análisis de los datos transcriptómicos (Bioinformatics, 2019). Brevemente, un flujo de trabajo basado en blast utilizando la sección Fungi en la base de datos nr se abordó. Las anotaciones de la ontología de genes (GO) y de InterPro se obtuvieron de esta estación de trabajo de alto rendimiento. Kallisto versión 0.46.1 se utilizó para cuantificar las abundancias de los transcritos (Bray *et al.*, 2016). Las variaciones no deseadas en la secuenciación de RNA se eliminaron de los recuentos no normalizados utilizando RUVseq (Risso *et al.*, 2014). El procesamiento de los datos de expresión de genes se realizó utilizando diferentes paquetes implementados en Bioconductor, un proyecto de código abierto para el análisis de datos genómicos en R (Gentleman *et al.*, 2004). Para realizar el análisis de expresión diferencial se eliminaron los transcritos con bajos niveles de expresión en todas las condiciones, es decir, aquellos que tenían menos de 1,5 conteos por millón de lecturas ( $\text{cpm} < 1,5$ ). Los datos de expresión fueron normalizados mediante el algoritmo TMM para eliminar la variación experimental en las muestras y ponderar la variación (Robinson and Oshlack, 2010). El análisis de la expresión diferencial de genes se realizó utilizando la herramienta EdgeR (Robinson *et al.*, 2010). Se consideraron como diferencialmente expresados (DE), aquellos transcritos con  $\log_{2}\text{FC}$  (Fold Change)  $> 1,5$  y FDR (False Discovery Rate)  $< 0.01$ .

La anotación funcional y el enriquecimiento de términos de GO se realizó utilizando Blast2GO en OmicsBox (Bioinformatics, 2019), que emplea una prueba exacta de Fisher para determinar la tasa de falsos descubrimientos (FDR) del enriquecimiento GO (Al-Shahrour *et al.* 2004). Por último, el análisis de enriquecimiento de vías se realizó en el mapeador KEGG (Kyoto de Genes y Genomas) utilizando las anotaciones KEGG recuperadas de GhostKOALA (Kanehisa *et al.*, 2021). Este método permitió obtener gráficos asociados a vías metabólicas teniendo en cuenta los términos asociados a las ontologías: Proceso Biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC) (Haas *et al.*, 2013). En cada caso se analizaron y representaron gráficamente los términos más significativos para este estudio. Una vez obtenidos los GOs enriquecidos mediante el Blast2GO fueron seleccionados los que representaban procesos más específicos utilizando la base de datos QuickGo. Esta base de datos permite mediante conexiones de ancestros establecer la relación entre GOs permitiendo establecer cuáles son más específicos evitando

análisis redundantes de la información (Figura 1).



QuickGO - <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

**Figura 1.** Gráfico de antepasados generado por QuickGo, mostrando los pasos seguidos para la elección del ancestro más específico. Este esquema muestra el ejemplo del GO: 0071970 (fungal-type cellwall (1>3)-beta-D-glucan) que sería el GO más específico relacionado con pared celular dentro de los procesos biológicos anotados, y por tanto fue el seleccionado para la representación gráfica.

Los RNA largos no codificantes (lncRNA) también se identificaron a través de un flujo de trabajo específico para identificar a los posibles lncRNA. En primer lugar, evaluamos el potencial de codificación de todos los transcritos expresados diferencialmente ( $\log_{2}FC > 1,5$ , valor de  $p < 0,05$ , FDR  $< 0,05$  y CPM  $< 0,05$ ) utilizando RNAsamba (Camargo *et al.*, 2020) y CPC2 (Kang *et al.*, 2017). Los transcritos clasificados como no codificantes utilizando ambas herramientas se identificaron como lncRNA expresados diferencialmente. Los transcritos clasificados como codificación utilizando ambas herramientas se identificaron como mRNA expresados diferencialmente. Finalmente, utilizamos los parámetros de expresión mencionados anteriormente con transcritos anotados como factores de transcripción (TF) para identificar factores de transcripción expresados diferencialmente.

Para analizar la posible función reguladora de los lncRNA y TF identificados expresados diferencialmente, preparamos un análisis de coexpresión de los lncRNA, TF y mRNA expresados diferencialmente (Zhan *et al.*, 2016) sobre la base del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) utilizando el paquete R Hmisc (Pasek J, 2020). Seleccionamos pares de mRNA / lncRNA o mRNA / TF con  $|r| > 0,9$  y un valor de  $p < 0,05$ . Se aplicó un procedimiento similar para obtener la red de coexpresión para correlacionar los GO identificados como enriquecidos.

El conjunto de datos transcriptómicos se depositó para su disponibilidad pública en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI): ID de envío: SUB8102769, Bioproyecto PRJNA662826, Acceso a BioSample: SAMN16095160.

### 5.7. Expresión transcriptómica de los genes implicados en las defensas contra el estrés oxidativo celular

Se analizó un conjunto de datos transcriptómicos de *A. sydowii* EXF-12860 creciendo a 1.0 M y 5.13 M de NaCl para identificar los genes expresados diferencialmente relacionados con el equilibrio redox celular y las respuestas al estrés oxidativo en condiciones hipersalinas. Este conjunto de datos está disponible públicamente en el National Centre for Biotechnology Information (NCBI): Submission ID: SUB8102769, BioProject PRJNA662826, BioSample accession: SAMN16095160. Para este experimento, se aisló el RNA total de muestras de micelio tras 96 h de crecimiento fúngico en medios con 1.0 M y 5.13 M de NaCl. Los transcriptomas ( $n = 3$ ) fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Seúl, Corea) y

analizados según lo descrito previamente por (Pérez-Llano *et al.*, 2020). El control de calidad de la secuenciación se realizó utilizando Trimmomatic versión 0.39 (Bolger *et al.*, 2014) y Rcorrector se llevó a cabo para corregir los errores de secuenciación de Illumina (Song and Florea, 2015). Se utilizó la versión 2.10.0 de Trinity como algoritmo de ensamblaje de novo (Grabherr *et al.*, 2011b). Las anotaciones funcionales y el análisis de los niveles transcripcionales de los genes relacionados con el equilibrio redox y las respuestas al estrés oxidativo se realizaron mediante Blast2GO (Biobam Bioinformatic, 2019).

#### 5.8. Perfiles metabolómicos de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 cultivado en solución saturada de NaCl

Se liofilizó un mililitro de extractos libres de células o de medios de control. A continuación, se añadieron 500 µl de acetona fría a las muestras secas, se agitó en vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Estos pasos se repitieron dos veces y se recogió el 90% del volumen de disolvente en cada paso y se combinó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. El disolvente se evaporó con un sistema SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a temperatura ambiente. Los metabolitos se resuspendieron en 50 µl de una solución de agua:acetonitrilo en una proporción de 95:5. Las muestras de control de calidad se prepararon mezclando volúmenes iguales de todas las muestras.

Se siguió la metodología de HPLC-Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS2) reportada previamente con modificaciones menores (Moreno-Ulloa *et al.*, 2020). En resumen, se cargaron aleatoriamente 10 µl de muestras en el sistema Eksigent nanoLC400 (Eksigent AB Sciex, CA, USA) con una columna HALO Phenyl-Hexyl (0,5 × 50 mm, 2,7 mm, tamaño de poro de 90 Å). Los metabolitos se separaron utilizando una elución en gradiente con ácido fórmico al 0,1% en agua (A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (B) como fases móviles a un flujo constante de 5 mL/min. El gradiente se inició al 5% de B durante 1 minuto, seguido de un aumento escalonado hasta el 100% de B durante 26 minutos y se mantuvo constante durante 4 minutos. La composición del disolvente se devolvió al 5% de B durante 0,1 min. Para asegurar el reequilibrio de la columna, se aplicó un precalentamiento de cuatro minutos con 5% de B entre las muestras. Se ejecutó una muestra en blanco (10 µL de tampones A:B en una proporción de 95:5) entre las inyecciones de muestras experimentales para minimizar el posible arrastre. El eluido de la cromatografía líquida (LC) se envió directamente a la

fuelle TurboV de un espectrómetro de masas TripleTOF (tiempo de vuelo) 5600+ (SCIEX, CA, EE.UU.) utilizando la ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. Las condiciones de la fuente ESI se establecieron como sigue: Voltaje de IonSpray flotante, 5.500 V; temperatura de la fuente, 350 °C; gas de cortina, 20 psi; los gases de la fuente de iones 1 y 2 se ajustaron a 40 y 45 psi; potencial de desclasificación, 100 V. Los datos se adquirieron utilizando la adquisición dependiente de datos (DDA) con el modo de alta sensibilidad seleccionado, cambiando automáticamente entre espectrometría de masas (MS) de barrido completo y MS2. El tiempo de acumulación para la MS TOF fue de 0,25 s/espectro en el rango m/z 100-1500 Da y para el barrido MS2 fue de 0,05 s/espectro en el rango m/z 50-1500 Da. Los ajustes DDA fueron los siguientes: estado de carga +1 a +2, intensidad 125 cps, excluir isótopos dentro de 6 Da, tolerancia de masa 50 mDa, y un número máximo de iones candidatos 20. En los ajustes IDA, la "exclusión de iones objetivo anteriores" se estableció como 15 s después de dos ocurrencias y se seleccionó la "sustracción dinámica de fondo". Se utilizó la opción de energía de colisión rodante (CE) del fabricante basada en el tamaño y la carga del ion precursor utilizando la fórmula  $CE = m/z \times 0,0575 + 9$ . El instrumento se calibró automáticamente por el modo de lote utilizando las soluciones de calibración positivas apropiadas de TOF MS y MS2 antes de la carga de la muestra y después de la inyección de seis muestras (< 3,5 horas de trabajo) para garantizar una precisión de masa de < 5 ppm tanto para los datos de MS como de MS/MS. El rendimiento del instrumento se supervisó durante la adquisición de datos incluyendo una muestra de control de calidad (n = 4) cada cuatro muestras experimentales.

Se utilizaron dos enfoques informáticos complementarios para analizar los conjuntos de datos de LC-MS2: i) la extracción de características, la normalización y el análisis estadístico se realizaron con el software MarkerView TM versión 1.3 (AB Sciex, CA, EE.UU.) y ii) la extracción de datos espectrales de MS2 para la identificación o anotación de metabolitos (nivel 2 de acuerdo con la clasificación de la Iniciativa de Estándares Metabólicos [MSI] (Aron *et al.*, 2020) se realizó utilizando el software MZmine versión 2.53 y la plataforma web Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS, <https://www.gnps.ucsd.edu>) (Aron *et al.*, 2020). Además, para superar la limitada identificación o anotación de metabolitos mediante la comparación espectral con las bibliotecas espectrales de GNPS, utilizamos la herramienta de anotación avanzada de



SIRIUS 4 y CSI:Finger ID (nivel 3 de acuerdo con la clasificación MSI) (Dührkop *et al.*, 2015).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para los datos de metabolómica, teniendo en cuenta el fenómeno de compresión del cambio de pliegues (Yu *et al.*, 2020), las características con un cambio de pliegues  $\geq 1,5$  o  $\leq -1,5$  y un valor  $p < 0,05$  (prueba t) se consideraron como diferencialmente abundantes. Para el análisis estadístico multivariado y para evaluar el comportamiento de la agrupación de las muestras y la variación entre grupos, utilizamos el análisis de componentes principales (PCA) y la agrupación de variables de componentes principales (PCVG) (Ivosev *et al.*, 2008). Para el análisis PCA y PCVG se utilizaron datos transformados en Log2. Se utilizó el software PRISM 6.0 (GraphPad Software, CA, EE.UU.) para la creación de gráficos de volcán.

Los conjuntos de datos en bruto se han depositado en el repositorio público GNPS/MassIVE (Wang *et al.*, 2016) con el número de acceso MSV000088136. Los parámetros para la creación de redes moleculares clásicas utilizando todos los conjuntos de datos están disponibles en el siguiente enlace: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a3e71334eb534f89b24b09f31c9bca5d>.

El trabajo NAP está aquí: <https://proteomics2.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a27935fe261946169af78d93d8d6e312>.

El trabajo MolNetEnhancer está aquí: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=d974315d59b649be96e6bf583505f2aa>.

Los parámetros para FBMN (A. sydowii 1 M vs 5.13 M NaCl) están disponibles en el siguiente enlace:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=5f212d5ccb1a46de86fe6ba4fb402952>. El

trabajo Qemistree está disponible en el siguiente enlace: <https://proteomics2.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=80ba69060ca54408b52ebf726b91359c>

### 5.8.1 Determinaciones de aminoácidos y ácidos grasos

El contenido de proteína bruta del micelio y el medio de cultivo libre de células de cada condición de crecimiento hipersalino se realizó de acuerdo con el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). El contenido de aminoácidos se determinó a partir de muestras trituradas (para

el micelio) y homogeneizadas que se habían desgrasado previamente mediante extracción Soxhlet de acuerdo con (AOAC, 1995). A 10 mg de muestra se le añadieron 5 ml de HCl 6 N que contenía fenol al 0,06%. Para producir aminoácidos libres, las mezclas se hidrolizaron durante 24 h a 110 ° C bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación. Las muestras hidrolizadas se diluyeron en 25 ml de agua desionizada y se añadió 1 ml de ácido  $\alpha$ -aminobutírico (AABA) 2,5 mM como patrón interno. A continuación, las muestras se filtraron a través de un filtro de teflón de 0,45  $\mu$ m y se almacenaron en una atmósfera de nitrógeno a -30 ° C. Se derivatizaron muestras que contenían los aminoácidos libres (Bidlingmeyer, 1984), se inyectaron en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, CA, EE. UU.) equipado con una columna Zorbax Eclipse AAA de fase inversa Agilent C-18 (partícula de 3,5  $\mu$ m de diámetro interno, 4,6  $\times$  150 mm), y eluyeron usando un gradiente de acetonitrilo-metanol-agua (45:45:10, v/v). La temperatura de la columna se mantuvo a 40 ° C y se utilizó un flujo de 1 mL / min. El volumen de inyección fue de 5  $\mu$ l. Las muestras se controlaron utilizando un detector de fluorescencia 1260 (FLD, Agilent Technologies, CA, EE. UU.) en serie. Se obtuvieron cromatogramas de fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 340 nm y señales de emisión controladas a 450 nm. Se obtuvieron curvas estándar para la determinación de aminoácidos usando soluciones estándar de aminoácidos en el rango de 25 a 350 pmol (PN 061-3330, Agilent Technologies, CA, EE. UU.) Agilent OpenLAB ChemStation versión C.

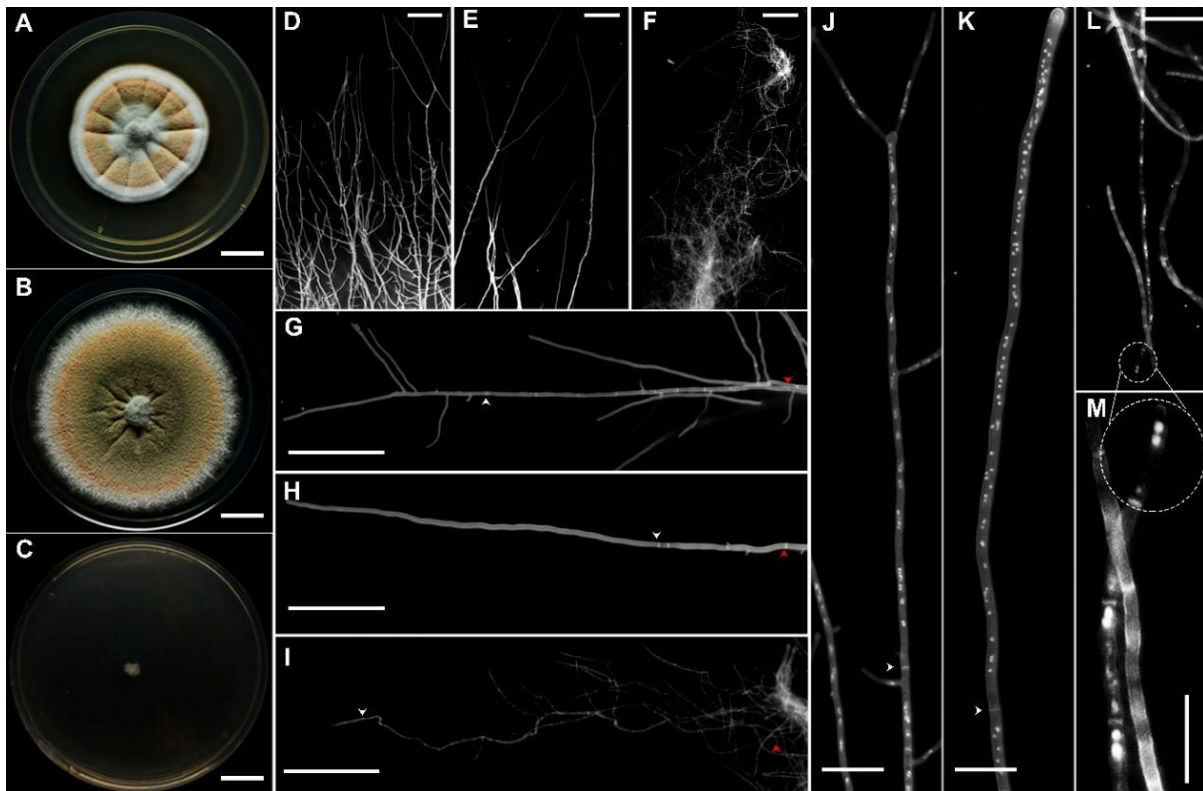
Se obtuvieron extractos de éster metílico de ácidos grasos a partir de muestras de micelio y medio de cultivo libre de células de cada condición hipersalina de crecimiento (Folch *et al.*, 1957; Christie, 1993). Los ésteres metílicos de ácidos grasos se separaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A (Agilent Technologies, CA, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama (FID) (260 ° C) y una columna capilar (DB-23 Agilent; 60 m  $\times$  0,25 mm, espesor de película 0,15  $\mu$ m) usando nitrógeno como gas portador. La temperatura inicial del horno fue de 120 ° C. Se inyectó un microlitro de la solución que contenía los ésteres metílicos de ácidos grasos dividido 10: 1. Después de 1 minuto, la temperatura se aumentó a una velocidad de 6,5 ° C / min a 170 ° C, inmediatamente después, se incrementó a una velocidad de 6 ° C / min a 198 ° C se mantuvo durante 7 minutos, y finalmente se incrementó a una velocidad de 15 ° C / min a 230 ° C se mantuvo durante 5

minutos y luego se mantuvo a esa temperatura durante 10 minutos más. Los ácidos grasos se identificaron comparando los tiempos de retención de perfiles bien caracterizados de estándares de éster metílico de ácido graso (mezcla de éster metílico de ácido graso de 37 componentes, Supelco /Sigma-Aldrich, CA, EE. UU.). La concentración de cada ácido graso se determinó a partir del área bajo la curva correspondiente dentro del cromatograma utilizando un ácido graso C19 como estándar interno y el paquete de software Agilent OpenLAB ChemStation versión C.01.07.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Morfología de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en diferentes concentraciones de NaCl

Los caracteres micro y macromorfológicos de *A. sydowii* a 0, 1.0 y 5.13 M NaCl se examinaron utilizando cultivos de 10 días incubados en la oscuridad (Figura 2). En ausencia de NaCl, las colonias umbonadas alcanzaron 32-35 mm de diámetro, tenían contornos delicadamente filiformes y produjeron abundantes conidios de color blanco anaranjado a naranja claro (Figura 2 A). La apariencia superficial era flocosa en el centro y aterciopelada en los márgenes, con micelio hialino a blanco y radialmente arrugado. El reverso de la colonia era de color amarillento a parduzco. Los exudados superficiales eran de color marrón rojizo a marrón oscuro. En el medio YMA suplementado con NaCl 1.0 M (Figura 2B), las colonias eran más grandes, se extendían ampliamente y alcanzaban un diámetro de 42 a 45 mm, menos umbonadas, con abundantes conidios de color verde mate a naranja claro, la superficie de la colonia era de pulvurulenta a flocosa, márgenes enteros a delicadamente filiformes, micelio hialino a blanco, el reverso se observó ligeramente amarillo, no se observaron exudados (Figura 2 B).



**Figura 2.** Caracterización morfológica de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 cultivado en YMA a diferentes concentraciones de NaCl tras 10 días de cultivo a 28 °C. (A-C) Aspecto de la colonia a 0, 1.0 M y 5.13 M de NaCl, respectivamente. Barras: 1 cm. (D-F). Examen estereoscópico del contorno de las colonias tras el crecimiento del hongo a 0, 1.0 M y 5.13 M de NaCl, respectivamente. Barras: 100 µm. (G-I). Hifas cultivadas en presencia de 0, 1.0 M y 5.13 M de NaCl, respectivamente. Barras: 100 µm. Las flechas blancas indican el primer septo, mientras que las rojas muestran 500 µm de longitud. En (D-I) se aplicó la tinción con blanco de calcoflúor. (J-L). Multinucleación a 0, 1.0 M y 5.13 M de NaCl, respectivamente. Barras: 25 µm. (L-M). Los círculos pequeños y grandes enmarcan el último compartimento de la hifa cultivada en 5.13 M de NaCl, (M) representan un acercamiento a lo observado en L. Barras: 25 µm. En (J-M) se aplicó la tinción con blanco de calcoflúor y DAPI.

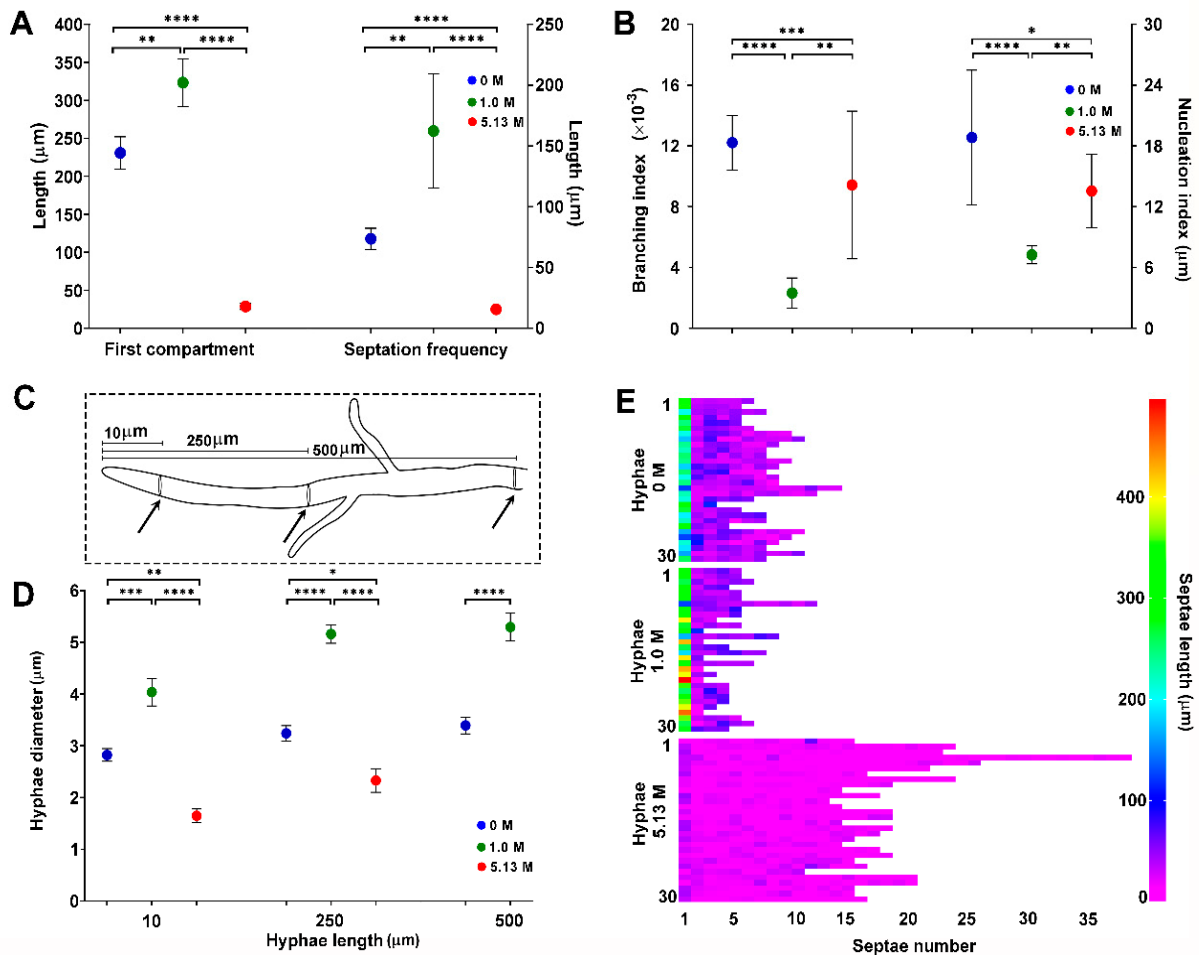
A una concentración saturada de NaCl (5.13 M), las colonias eran claramente más pequeñas (5 a 6 mm), planas, con micelio hialino, reversa no pigmentada y márgenes filiformes (Figura 2 C). No se observaron conidios ni exudados. Con base en estas observaciones se concluyó que 1.0 M NaCl es la salinidad óptima para *A. sydowii* EXF-12860, como lo muestra un diámetro de colonia mayor (HSD de Tukey,  $p \leq 0,05$ ) en comparación con el crecimiento a 0 M y NaCl 5.13 M.

El examen micro-morfológico reveló una influencia drástica del NaCl en la morfología de los bordes de las colonias (Figura 2 D – F). Las hifas vegetativas tanto a 0 M como a 1.0 M de NaCl mostraron un crecimiento polarizado (Figura 2 D, E), mientras que en 5.13 M de NaCl las hifas eran aberrantes, rizadas y enredadas (Figura 2 F). Se observó un aumento de la ramificación de las hifas en ausencia de sal y algunas regiones alcanzaron un crecimiento isométrico (Figura 2 D). La concentración saturante de NaCl también afectó la longitud del compartimento hifal apical, la frecuencia de septación, los índices de ramificación y nucleación (Figura 2 G – M).

El análisis estadístico (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ ) de estos caracteres morfológicos mostraron diferencias significativas cuando *A. sydowii* EXF-12860 creció en YMA con 1.0 M y 5.13 M NaCl, o en ausencia de sal (Figura 3 A, B). Mientras que la longitud promedio del compartimento hifal apical fue 323 µm y 231 µm en 1.0 M y 0 M NaCl, respectivamente, se observaron compartimentos apicales mucho más pequeños (29 µm en promedio) en 5.13 M de NaCl (Figura 3 A). La septación aumentó significativamente en 5.13 M, con un tabique cada 15,5µm versus un tabique cada 162 µm en condiciones óptimas de NaCl 1.0 M (Figura 3 A). En condiciones de estrés (0 M y 5.13 M NaCl), también los índices de ramificación y núcleo fueron marcadamente más altos en comparación con el crecimiento en condiciones óptimas de sal (Figura 3 B). Los diámetros de las hifas cultivadas a

diferentes concentraciones de NaCl se midieron a 10, 250 y 500  $\mu\text{m}$  del ápice de la hifa (Figura 3 C). Las hifas en 1.0 M NaCl presentaron los diámetros más grandes (Figura 3 D), mientras que la distancia entre dos septos fue más pequeña a 5.13 M NaCl (Figura 3 E).

En resumen, la micro-caracterización de *A. sydowii* EXF-12860 mostró cambios drásticos en concentraciones saturadas de NaCl, lo que indica un fuerte estrés osmótico. En general, EXF-12860 reveló una micromorfología similar en YMA saturado con NaCl y en ausencia de sal.



**Figura 3.** Cuantificación de los descriptores morfológicos de los cultivos de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 realizados en medio de YMA a concentraciones de 0, 1.0 M y 5.13 M de NaCl tras 10 días de cultivo a 28 C. (A) Longitud del primer compartimento hifal y frecuencia de septación. (B) Índices de ramificación y nucleación. (C) Representación metodológica de las mediciones del diámetro de las hifas. Las flechas negras indican las distancias desde el ápice de la hifa donde se midieron los diámetros. (D) Diámetro de las hifas a las longitudes de 10  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ . (E) Número de septos y longitud de estos para 30 hifas diferentes. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas determinadas por el ANOVA de una vía y la prueba HSD de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).

Además de la morfología y la pigmentación de las colonias, el estrés salino altera drásticamente la estructura de la pared celular de los hongos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Si bien algunos estudios se centraron en la microestructura de la pared celular de los hongos halófilos / xerófilos (Kogej *et al.*, 2007a ; Kunčič *et al.*, 2010; Pérez-Llano *et al.*, 2020), la micromorfología colonial rara vez se ha investigado (Marjetka *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2019). Estudios previos mostraron cambios de tamaño y apariencia en las colonias de la levadura negra extremadamente halotolerante *H. werneckii* y diferentes especies del género basidiomiceto halófilo / xerófilo *Wallemia* (Kunčič *et al.*, 2010). Dentro del género *Aspergillus*, solamente *A. montevicensis* fue analizado a 3,0 M de NaCl mostrando respuestas morfológicas únicas en el nivel de producción de pigmento y desarrollo de cleistotecio (Liu *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2019). Las observaciones con respecto a la reducción del ancho de las hifas en estrés salino coinciden con lo reportado para *A. montevicensis* (Matsuda *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2017). Se observaron compartimentos hifas más delgados y cortos en condiciones saturadas de NaCl en halófilos *A. sydowii* EXF-12860 así como en halófilas *W. muriae* y *W. sebi* (Kunčič *et al.*, 2010). En el levemente tolerante a halógenos *Aspergillus repens*, se observó acortamiento y engrosamiento de los compartimentos hifales bajo estrés de NaCl en comparación con la condición no estresada (Kelavkar *et al.*, 1993). En *Exophiala sp.*, un informe reciente mostró que el cambio dimórfico fue provocado por el NaCl (de fenotipos filamentosos a tipo de levadura) (Ide-Pérez *et al.*, 2020).

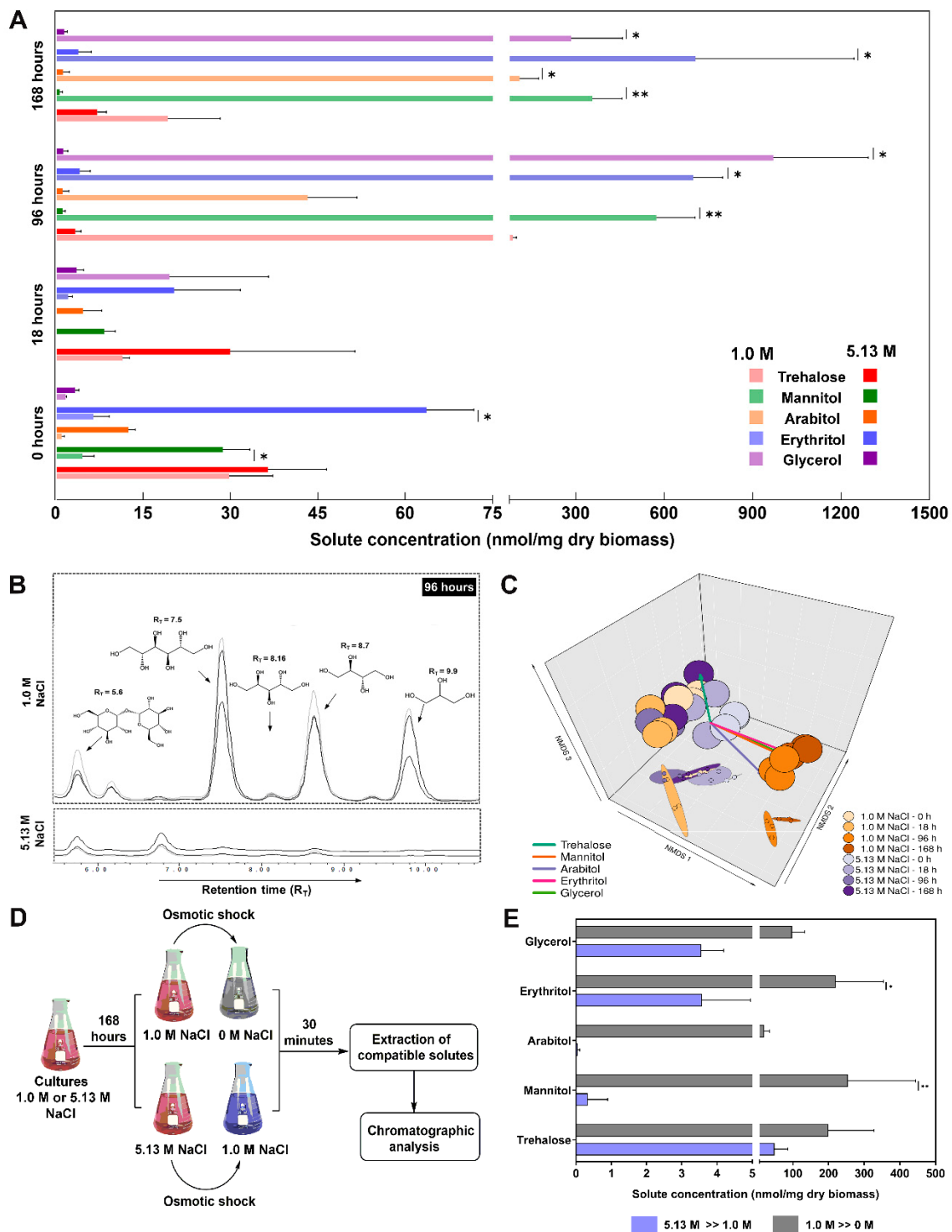
Los cambios observados en la geometría de las hifas debido a concentraciones de NaCl no óptimas indican una reordenación dinámica del citoesqueleto, en particular a 5.13 M de NaCl. Las septinas y las forminas, las principales proteínas implicadas en la morfogénesis de las hifas, están implicadas en la escultura de las células fúngicas filamentosas (Gladfelter, 2006, 2010), y en dinámica nuclear hifal (Kozubowski and Heitman, 2010). Nuestros resultados sugieren que el NaCl podría influir en la expresión de estas proteínas, pues la septación, la polaridad de las hifas, el diámetro y la morfología se modificaron en condiciones hipersalinas. Estas proteínas han sido reconocidas previamente como componentes clave de la morfogénesis hifal en el género *Aspergillus* (Lindsey *et al.*, 2010a, 2010b). Por ejemplo, los genes que codifican septinas en *A. nidulans* (*aspA-E*) se han relacionado con el patrón de ramificación de hifas y el desarrollo de conidióforos

(Gladfelter, 2006), mientras que los genes ortólogos de septina en *A. fumigatus*, aspA, aspB, aspC, y aspE, coordinan distancias interseptales en los compartimentos hifales apical y subapical (Vargas-Muñiz *et al.*, 2015). sepA, una forma homóloga de *A. nidulans*, se relacionó con la septación y el diámetro de las hifas (Gladfelter, 2006). Hasta nuestro conocimiento, no existen reportes con respecto al papel de la septina y la formina en los hongos halófilos; este estudio proporciona información inicial interesante sobre la influencia potencialmente decisiva del NaCl en su expresión.

## 6.2. Síntesis de solutos compatibles por *Aspergillus sydowii* EXF-12860 expuesto a NaCl

*A. sydowii* EXF-12860 produjo trehalosa, manitol, arabitol, eritritol y glicerol como solutos compatibles en ambas salinidades probadas (Figura 4 A, B). Inicialmente (después de 18 h), los cultivos que crecían en medio de NaCl 5.13 M producían mayores cantidades de trehalosa, manitol, arabitol y eritritol en comparación con los cultivos más antiguos (96 h y 168 h) (Figura 4 A). El manitol y el arabitol se sintetizaron solo en el medio saturado de NaCl, pero disminuyeron con el tiempo, mientras que la concentración de glicerol no cambió durante el período de medición (Figura 4 A). En condiciones óptimas (NaCl 1.0 M), la producción de solutos compatibles alcanzó su punto máximo a las 96 h (Figura 4 A), correspondiente al punto medio de la fase de crecimiento exponencial de *A. sydowii* EXF-12860. El arabitol alcanzó su punto máximo a las 168 h (fase de crecimiento estacionario) (Figura 4 A). El escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) tridimensional mostró dos ordenaciones estadísticas basadas en las respuestas de *A. sydowii* EXF-12860 sobre el nivel de síntesis de osmolitos en diferentes momentos a 1.0 M y 5.13 M NaCl (Figura 4 C). La síntesis de solutos compatibles a 1.0 M después de 96 h y 168 h exhibió una fuerte ordenación, reflejando estas condiciones como condiciones fisiológicas óptimas, diferenciándose mucho de otras condiciones experimentales probadas (Figura 4 C). También se determinó el perfil de soluto compatible después de 30 minutos de diferentes choques hipoosmóticos (Figura 4 D). Cuando se transfirió EXF-12860 de 5.13 M a 1.0 M de NaCl, se sintetizó trehalosa en abundancia, se produjeron eritritol y glicerol en cantidades menores, mientras que no se detectó arabitol en absoluto (Figura 4 D). Curiosamente, la transferencia de NaCl 1.0 M a 0 M resultó en cambios más drásticos, en





**Figura 4.** Producción de osmolitos por *Aspergillus sydowii* EXF-12860 cultivado a 1.0 M y 5.13 M de NaCl (solución saturada de NaCl) en caldo de malta de levadura a 28 °C. (A) Síntesis de solutos compatibles a las 0 h, 18 h, 96 h y 168 h. (B) Cromatogramas representativos obtenidos tras 96 h de cultivo del hongo a 1.0 M y 5.13 M de NaCl. (C) Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de la producción de

solutos compatibles. (D) Diseño experimental para estudiar la producción de solutos compatibles debido a choques hipoosmóticos. (E) Las barras azules representan la producción de solutos compatibles tras el choque hipoosmótico de 5.13 M a 1.0 M de NaCl. Las barras grises representan la producción de solutos compatibles tras el choque hipoosmótico de 1.0 M a 0 M de NaCl. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn ( $p < 0,05$ ),  $*(p \leq 0,05)$  y  $** (p \leq 0,01)$ .

particular el manitol aumentó considerablemente (Figura 4 D). Por el contrario, su concentración no cambió notablemente cuando *A. sydowii* se transfirió de NaCl 5.13 M a 1.0 M. El arabitol mostró un perfil de concentración similar al manitol. No se detectaron galactitol, maltitol, ribitol, sorbitol y xilitol. La figura 4 B muestra una señal cromatográfica correctamente resuelta que corresponde a un compuesto desconocido eluido a los 6.2 min (a 1.0 M NaCl) y otro a los 6.8 min (a 5.13 M NaCl) (Figura 3B). Curiosamente, la concentración de este último compuesto no identificado aumentó con la salinidad. Dado que estos picos no corresponden a ningún estándar analítico, probablemente representan nuevos osmolitos sintetizados por *A. sydowii*.

La producción de solutos compatibles ha sido reconocida como una de las principales respuestas empleadas por hongos extremófilos / extremotolerantes que crecen a baja  $a_w$  (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Las condiciones extremadamente salinas inducen la síntesis de polioles y azúcares (p. ej., glicerol, eritritol, arabitol, manitol) en hongos halófilos y halotolerantes como *H. werneckii*, *W. ichthyophaga*, y *Aureobasidium pullulans* y *Aureobasidium subglaciale*, con glicerol como principal osmolito compatible (Kogej *et al.*, 2007b; Zajc *et al.*, 2014b; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Turk and Gostinčar, 2018). Opuesto a lo esperado, en *A. sydowii* EXF-12860 el glicerol o cualquier otra concentración de polirol no se correlacionó positivamente con el aumento de salinidad (Figura 4 A) y no contrarrestó los desequilibrios osmóticos. Sin embargo, la síntesis de otros solutos compatibles aumentó a una concentración óptima de NaCl 1.0 M (Figura 4 A), lo que refleja las adaptaciones fisiológicas transmitidas por estas pequeñas moléculas.

Nuestros resultados mostraron una dependencia de la fase de crecimiento de la producción de osmolitos, como se informó anteriormente para *H. werneckii*, donde el glicerol se acumuló predominantemente durante la fase exponencial y el eritritol durante la fase estacionaria (Plemenitaš *et al.*, 2008). Se encontraron resultados similares para *Aspergillus*

*niger* cuando se determinó que el glicerol y el eritritol eran osmolitos primarios en el micelio joven, y el manitol y el eritritol eran predominantes en el micelio más viejo (Witteveen and Visser, 1995). Curiosamente *A. sydowii* EXF-12860 acumuló de manera constante manitol, eritritol y glicerol durante la fase de crecimiento exponencial y estacionario a 1.0 M de NaCl (Figura 4 A), mientras que el arabitol también aumentó gradualmente durante la fase exponencial, pero alcanzó su punto máximo en la fase estacionaria. Las cantidades de osmolitos permanecieron sorprendentemente bajas en NaCl 5.13 M, sin dependencia de la fase de crecimiento (Figura 4 A).

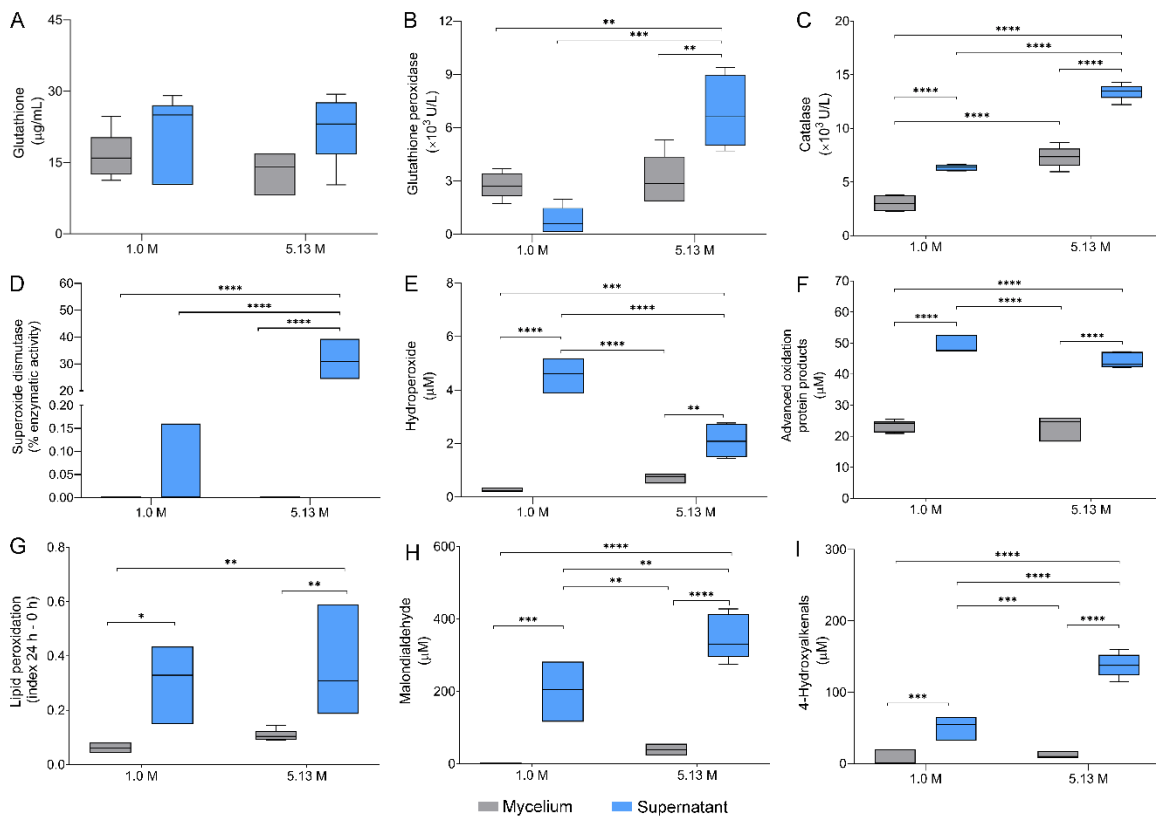
Como se observa para *W. ichthyophaga* (Kogej *et al.*, 2007b) (Zajc *et al.*, 2014b), los choques hiposmóticos afectaron el perfil de solutos compatibles en *A. sydowii* EXF-12860. El perfil de osmolitos fue más diferente cuando *A. sydowii* EXF-12860 se transfirió al medio sin NaCl agregado, lo que sugiere una reprogramación rápida durante los choques hiposmóticos y el crecimiento en un medio de cultivo sin NaCl (Figura 4).

### 6.3. Defensas de estrés oxidativo inducidas por NaCl en *Aspergillus sydowii* EXF-12860

Diferentes condiciones de estrés, incluida la privación de agua debido a las altas concentraciones de NaCl, causan daño oxidativo a las células (Sreenivasulu *et al.*, 2004; Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018; Hassan *et al.*, 2020). El vínculo entre la capacidad antioxidante de los hongos y la halotolerancia en el nivel genómico se ha investigado sólo recientemente en el halófilo *W. ichthyophaga* y levaduras negras halotolerantes *H. werneckii* y *A. pullulans* (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018), con un solo estudio sobre este tema realizado previamente (Petrovič, 2006). En este trabajo investigamos la defensa antioxidante celular de *A. sydowii* EXF-12860 expuesto a dos concentraciones de NaCl: 1.0 M y 5.13 M, basado en la respuesta de nueve biomarcadores no enzimáticos y uno enzimático (Figura 5 A-I).

Los niveles de glutatión reducido en la fracción micelial fueron similares a NaCl 1.0 M (16.40 µg / mL) y en NaCl 5.13 M (13.02 µg / mL) (Figura 5A). En ambos casos se encontró glutatión reducido en los sobrenadantes alcanzando 21,45µg / mL y 22,18 µg / mL, sin diferencias estadísticas. La glutatión peroxidasa tuvo una actividad considerablemente más alta con NaCl 5.13 M en comparación con NaCl 1.0 M tanto en las

fracciones de micelio como en el sobrenadante (Figura 5 B), en 7,7 y 1,2 veces en sobrenadantes y micelios, respectivamente. Las actividades de catalasa y superóxido dismutasa también aumentaron significativamente con NaCl 5.13 M (Figura 5 C-D).



**Figura 5.** Respuestas al estrés oxidativo en *Aspergillus sydowii* EXF-12860. Se investigaron nueve biomarcadores de estrés oxidativo en el micelio y los sobrenadantes de EXF-12860 cultivados a 1.0 M y 5.13 M de NaCl: (A) Concentración de glutatión; (B-D) Actividad enzimática de glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, respectivamente; (E-I) Determinación de hidroperóxidos, productos proteicos de oxidación avanzada, relación de peroxidación lipídica, malondialdehído y 4-hidroxiálquenos, respectivamente. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas determinadas por el ANOVA de una vía y la prueba HSD de Tukey ( $p < 0,05$ ),  $*(p \leq 0,05)$ ,  $** (p \leq 0,01)$ ,  $*** (p \leq 0,001)$  y  $**** (p \leq 0,0001)$ .

Mientras que la actividad de la catalasa aumentó dos veces tanto en el micelio como en los sobrenadantes expuestos a NaCl 5.13 M, la superóxido dismutasa aumentó significativamente, aproximadamente 197 veces en el sobrenadante a NaCl 5.13 M en contraste con la concentración óptima de NaCl 1.0 M. Curiosamente, no se detectó superóxido dismutasa en el micelio a ninguna concentración de NaCl. Además, se estudiaron cinco biomarcadores metabólicos indicativos de estrés oxidativo, debido al

anión superóxido reconocido ( $O_2^-$ ) causando daños a todos los grupos principales de biomoléculas (Warris and Ballou, 2019). Las concentraciones determinadas de hidroperóxidos se consideraron indicadores directos de la oxidación de biomoléculas. Los hidroperóxidos y productos de proteína de oxidación avanzada reportados en el micelio de *A. sydowii* EXF-12860 se encontraron a los mismos niveles en ambas concentraciones de NaCl (Figura 5 E-F), así como el índice de peroxidación lipídica del micelio (Figura 5 G). Curiosamente, la peroxidación de lípidos se detectó en una proporción alta en el medio extracelular en ambas condiciones de NaCl. Malondialdehído, un producto natural de la peroxidación de lípidos (Erdelmeier *et al.*, 1998), se detectó en concentraciones más altas en los sobrenadantes (Figura 5 H), y solo a 5.13 M de NaCl también en el micelio. Por último, los 4-hidroxiálquenos, también subproductos de la peroxidación lipídica, alcanzaron los valores más altos en los sobrenadantes a 5.13 M NaCl (Figura 4I), pero también estaban presentes en el micelio en ambas concentraciones de sal.

Los biomarcadores investigados indican un alto estrés oxidativo causado por medios saturados de NaCl (NaCl 5.13 M) en *A. sydowii* EXF-12860, que da como resultado una sólida respuesta celular no enzimática y enzimática para superar el daño celular (Figura 4 A). La privación de agua por NaCl constituye un factor de estrés ambiental para los eucariontes (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Osman *et al.*, 2021). Los hongos responden al estrés osmótico induciendo metabolitos antioxidantes como glutatión (respuesta antioxidante no enzimática) y enzimas (respuesta antioxidante enzimática) como catalasas, superóxido dismutasas y glutatión peroxidasas, entre otras (Vaupotic *et al.*, 2008; Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018; Warris and Ballou, 2019).

*A. sydowii* EXF-12860 mostró un equilibrio de glutatión finamente regulado en ambas concentraciones de NaCl (Figura 5 A), sin grandes diferencias entre micelios y sobrenadantes. El glutatión es generalmente reconocido como el antioxidante más abundante en la célula, con niveles intracelulares decrecientes cuando se expone al estrés oxidativo (Morgan *et al.*, 2013). También se encontró un aumento de los niveles de glutatión intracelular en bacterias halotolerantes cultivadas a altas concentraciones de NaCl (Hassan *et al.*, 2020).

Las actividades enzimáticas de la glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa aumentaron en NaCl 5.13 M (Figura 5B – D), lo que indica exposición al estrés oxidativo en *A. sydowii* EXF-12860. La defensa antioxidante enzimática observada contribuyó al mantenimiento de la homeostasis celular redox, al limitar el daño celular causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Warris and Ballou, 2019). Las ROS surgen principalmente como subproductos del metabolismo aeróbico en las mitocondrias e incluyen el  $O_2^-$ , peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilos ( $OH\cdot$ ) (Schieber and Chandel, 2014).  $O_2^-$  debe convertirse inmediatamente a  $H_2O_2$  por superóxido dismutasas, seguido de la desintoxicación de  $H_2O_2$  mediada por catalasas y glutatión peroxidasas.  $H_2O_2$  también se puede reducir parcialmente a  $OH\cdot$ , con una reactividad extremadamente alta hacia diferentes objetivos biológicos (Warris and Ballou, 2019). El aumento del nivel de ROS activa las vías de señalización para mantener el estado redox celular (Warris and Ballou, 2019).

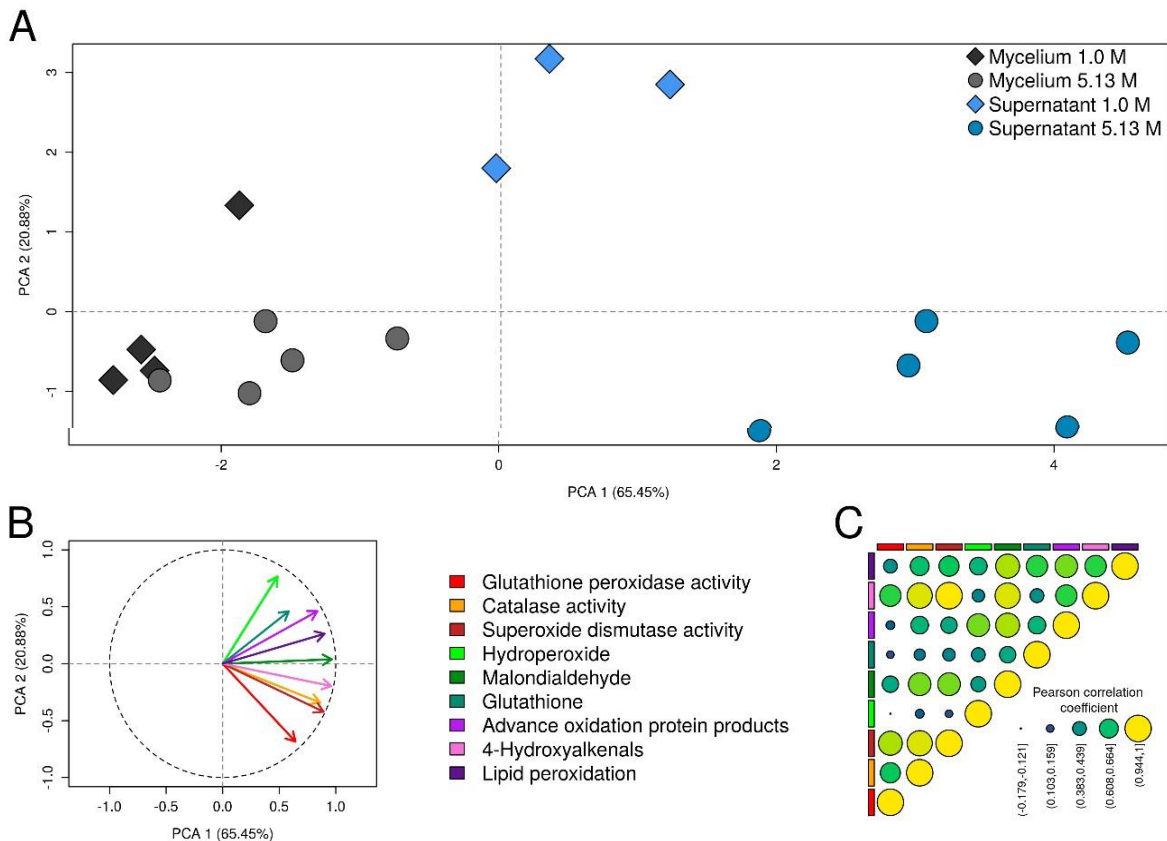
Los marcadores de daño oxidativo estudiados en *A. sydowii* EXF-12860 revelaron que la exposición a concentraciones saturantes de NaCl induce daños tanto a proteínas como a lípidos (Figura 4E – I). Particularmente, se promueve la peroxidación de lípidos, como lo demuestra la relación mejorada de peroxidación de lípidos y concentraciones más altas de hidroperóxidos, malondialdehído y 4-hidroxiálquenos (Figura 5 E, H, I), como se ha documentado previamente (Busch and Binder, 2017). La oxidación de lípidos implica la formación continua de hidroperóxidos como productos de oxidación primaria que a su vez son reducidos por glutatión peroxidasas con glutatión como reductor (Dobarganes and Velasco, 2002). Uno de los productos finales de la peroxidación lipídica es la generación de malondialdehído (Busch and Binder, 2017), así como los 4- hidroxiálquenos, considerados productos de peroxidación no enzimática de ácidos grasos poliinsaturados (Sasson, 2017). Se encontraron niveles elevados de malondialdehído a alta salinidad en las bacterias halotolerantes *Planococcus spp.*, *Bacillus haikouensis*, y *Microcystis aeruginosa* (Sreenivasulu *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2020).

Las proteínas, en particular las que tienen grupos de Fe-S protésicos, también se ven afectadas por ROS (Schieber and Chandel, 2014). La cisteína es especialmente susceptible, en particular los aniones tiolato (Cys-S<sup>-</sup>) encontrados a pH fisiológico (Finkel, 2012). Por ejemplo,  $H_2O_2$  media la oxidación reversible Cys-S a forma sulfénica (Cys-SOH) que

desencadena la vía de señalización del estrés oxidativo. Sin embargo, los niveles dañinos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causan la oxidación irreversible Cys-S a sulfínico (SO<sub>2</sub>H) o sulfónico (SO<sub>3</sub>H) (Winterbourn and Hampton, 2008), causando daño permanente a las proteínas oxidadas (Schieber and Chandel, 2014). Parece que la concentración saturada de Na<sup>+</sup> no causó una oxidación significativa de proteínas en *A. sydowii* EXF-12860, ya que las cantidades de productos avanzados de oxidación de proteínas fueron similares en ambas condiciones de salinidad.

El estrés oxidativo como consecuencia directa de la exposición al NaCl aún no se ha investigado a fondo en los hongos halófilos / halotolerantes (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018), como lo demuestra la falta de informes. Se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por la salinidad limita el crecimiento de la levadura negra halotolerante extrema *H. werneckii* (Petrovič, 2006). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que investiga las respuestas celulares adaptativas de diferentes biomarcadores de estrés oxidativo no enzimáticos y enzimáticos en hongos filamentosos halófilos.

La correlación entre biomarcadores de estrés oxidativo determinada por análisis de PCA (Figura 6 A, B) mostró una variación similar entre los biomarcadores de estrés oxidativo estudiados. PC1 y PC2 explicaron la mayor parte de la varianza, ya que el PC1 esperado tuvo la mayor varianza (65,45%). Se identificaron dos grupos potenciales correspondientes a micelios y sobrenadantes (Figura 6 A), lo que indica una respuesta similar tanto del micelio como del sobrenadante. Los biomarcadores 4- hidroxialquenos, malondialdehído y la relación de peroxidación lipídica contribuyeron notablemente a la PC1, mientras que el hidroperóxido y la glutatión peroxidasa contribuyeron notablemente a la PC2 (Figura 6 B). El análisis de correlación de Pearson mostró una fuerte correlación entre 4- hidroxialquenos, malondialdehído y relación de peroxidación lipídica, así como con las tres enzimas antioxidantes medidas (Figura 6 C). En resumen, *A. sydowii* EXF-12860 respondió a altas concentraciones de NaCl con estrés oxidativo, mostrado en particular por mayores niveles de enzimas antioxidantes y biomarcadores de peroxidación de lípidos.



**Figura 6.** Condiciones hipersalinas inducen estrés oxidativo en *Aspergillus sydowii* EXF-12860. Análisis estadístico multivariado de las respuestas al estrés oxidativo (A) Gráfico de análisis de componentes principales (PCA) que muestra la agrupación de muestras de micelio y sobrenadante en condiciones de NaCl 1.0 M y 5.13 M según sus valores de indicadores de estrés oxidativo. (B) La correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo y los ejes del gráfico PCA. (C) Coeficiente de correlación de Pearson de los biomarcadores de estrés oxidativo en muestras de micelio y sobrenadante en condiciones de NaCl 1,0 M y 5.13 M.

#### 6.4. Expresión transcripcional de genes relacionados con respuestas al estrés oxidativo en *Aspergillus sydowii* EXF-12860

El transcriptoma comparativo (5.13M vs 1.0 M) de *A. sydowii* EXF12-860 mostró 44 transcritos DE involucrados en las respuestas antioxidantes (Tabla 1). Mientras que siete transcritos de catalasa (*cat*) se expresaron diferencialmente, solo dos de ellos estaban fuertemente regulados positivamente ( $\log_{2}FC = 11.27$  y  $\log_{2}FC = 10.73$ ). Todos los transcritos de catalasa correspondían al mismo gen, lo que indica que el uso diferencial de la transcripción se produjo en la reprogramación transcripcional de *A. sydowii* EXF-12860 a alta salinidad. Además, diferentes isoformas de genes que codifican para superóxido dismutasas citoplasmáticas (*sod1*) y mitocondriales (*sod2*) y cistationina gamma-liasa (*cse*)



fueron regulados positivamente. Estos resultados confirmaron que el uso diferencial de mRNA empalmados alternativamente tuvo lugar en *A. sydowii* EXF-12860 en 5.13 M. Genes que codifican para la glutatión-S-transferasa (*gst*), tiorredoxina (*trx*), glioxalasa (*gly*), aconitasa (*aco*), citocromo P450 (*cyp450*) y succinil-CoA-3-cetoácido-coenzima A transferasa (*scot*) también se sobre expresaron. Curiosamente *oax* (logFC = 5.24) y *ish1* (logFC = 4.84) genes que codifican para la enzima antioxidante auxiliar y el sensor de respuesta al estrés respectivamente, fueron regulados positivamente.

Estos resultados confirman que el estrés por salinidad en 5.13 M NaCl resultó en estrés oxidativo en *A. sydowii* EXF-12860. Por tanto, este hongo halófilo regula positivamente la expresión transcripcional de diferentes genes implicados en la defensa en condiciones de estrés oxidativo. Nuestros resultados sugieren que la reprogramación transcripcional que ocurrió en EXF-12860 expuesto a NaCl 5.13 M podría haber ayudado a superar el desequilibrio entre los niveles celulares de oxidantes (ROS) y antioxidantes. En este contexto, las catalasas, superóxido dismutasas y glutatión reductasas son enzimas con efectos antioxidantes que limitan el daño de las ROS (Sarkaya, 2020). Las glutatión reductasas y las glutatión-S-transferasas desempeñan un papel clave en el ciclo redox del glutatión, manteniendo niveles adecuados de glutatión reducido para conectarse con diferentes vías metabólicas de desintoxicación de ROS (Aktaş *et al.*, 2005; Calabrese *et al.*, 2017). El glutatión reducido también sirve como puente con otros metabolismos de desintoxicación que reaccionan con hidroperóxidos o peróxidos de lípidos a través de la glutatión peroxidasa (Couto *et al.*, 2016).

Aunque los niveles de glutatión no se modificaron en gran medida con NaCl 5.13 M, la sobreexpresión del gen de la glutatión reductasa sugiere que *A. sydowii* EXF-12860 presentó una respuesta transcriptómica para mantener niveles reducidos de glutatión en la célula fúngica. La glutatión peroxidasa no se expresó diferencialmente, probablemente porque los niveles de hidroperóxido eran menores en ambas concentraciones de NaCl (Figura 5 B). Esta peroxidasa citosólica dependiente de glutatión reducido media la reducción de hidroperóxidos formados en las células. Nuestros resultados bioquímicos y transcriptómicos señalan que la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa actuaron juntas como un sistema de defensa antioxidante primario para proteger a *A. sydowii* EXF-12860 contra moléculas peroxidantes en condiciones extremas de salinidad.

**Tabla 1.** Expresión transcriptómica de genes de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 relacionados con las respuestas al estrés oxidativo inducidas por la condición hipersalina.

Transcrito ID	Anotación	Genes ID	LogFC	FDR
TRINITY_DN892_c0_g1_i12			11.27	4.46E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i4			10.73	6.37E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i3			-4.12	2.57E-03
TRINITY_DN892_c0_g1_i6	Catalase A	<i>catA</i>	-5.08	2.69E-04
TRINITY_DN892_c0_g1_i11			-11.27	2.46E-08
TRINITY_DN892_c0_g1_i9			-11.94	2.53E-09
TRINITY_DN892_c0_g1_i10			-14.33	1.37E-11
TRINITY_DN1037_c0_g1_i5	Glyoxalase I		11.15	4.82E-04
TRINITY_DN1037_c0_g1_i4		<i>gly1</i>	10.40	9.77E-04
TRINITY_DN2716_c0_g2_i1			3.85	5.32E-02
TRINITY_DN1197_c0_g1_i1			10.51	8.67E-04
TRINITY_DN1197_c0_g1_i7	Cystathionine gamma-lyase	<i>cth</i>	7.20	3.63E-06
TRINITY_DN1197_c0_g1_i6			3.66	8.26E-03
TRINITY_DN2112_c0_g1_i19	Cytochrome P450 alkane hydroxylase	<i>cyp</i>	9.84	9.10E-07
TRINITY_DN3588_c0_g1_i1			6.65	4.76E-06
TRINITY_DN2010_c0_g1_i16			4.89	3.88E-04
TRINITY_DN2010_c0_g1_i10	Cytochrome P450	<i>cyp</i>	4.65	7.22E-04
TRINITY_DN312_c0_g1_i9			-4.57	1.59E-03
TRINITY_DN312_c0_g1_i2			-3.67	8.32E-03
TRINITY_DN4029_c0_g1_i2	Aconitate hydratase	<i>aco1</i>	8.88	7.12E-06
TRINITY_DN1574_c0_g1_i2	Alternative oxidase-domain-containing protein	<i>aox</i>	5.25	1.47E-04
TRINITY_DN1793_c0_g1_i1	Fe-S cluster assembly protein dre2	<i>dre2</i>	5.24	1.51E-04
TRINITY_DN10053_c1_g1_i1	Peroxirredoxin 6	<i>prdx6</i>	5.20	1.89E-04
TRINITY_DN2598_c0_g1_i4	Cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase	<i>sod1</i>	5.01	2.74E-04
TRINITY_DN2598_c0_g1_i3			4.38	1.66E-03
TRINITY_DN1168_c0_g2_i5	Stress response protein putative	<i>ish1</i>	4.84	8.67E-04
TRINITY_DN681_c0_g1_i14	Glutaredoxin/glutathione-dependent peroxidase	<i>prx1</i>	4.73	7.03E-04
TRINITY_DN1443_c0_g1_i3			4.39	1.36E-03
TRINITY_DN1443_c0_g1_i3	Tiorredoxin-like protein	<i>trx</i>	-	2.93E-04
			5.45	
TRINITY_DN2569_c2_g2_i1			4.19	2.90E-03
TRINITY_DN9329_c0_g1_i1	Glutathione S-transferase	<i>gst</i>	-4.15	5.47E-03
TRINITY_DN473_c0_g1_i3			-	1.67E-07
			10.53	
TRINITY_DN902_c0_g1_i5	Superoxide dismutase [Mn] mitochondrial	<i>sod2</i>	4.21	3.20E-03
TRINITY_DN902_c0_g1_i4	Superoxide dismutase Fe-Mn family	<i>sod2</i>	3.65	7.90E-03
TRINITY_DN2375_c0_g1_i2	MAP kinase kinase kinase	<i>ask1</i>	-3.80	5.87E-03
TRINITY_DN38_c0_g1_i5			-3.84	7.67E-03
TRINITY_DN50_c0_g1_i16	Homocysteine synthase	<i>cysD</i>	-6.25	8.00E-05
TRINITY_DN1899_c0_g1_i4			-4.23	2.02E-03
TRINITY_DN1899_c0_g1_i2	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	<i>scot</i>	-5.14	2.47E-04
TRINITY_DN1899_c0_g1_i5			-9.54	1.81E-06
TRINITY_DN1899_c0_g1_i6			-9.57	1.71E-06
TRINITY_DN298_c0_g1_i11	Glyoxalase II (Hydroxyacylglutathione hydrolase)	<i>gly2</i>	-4.45	1.78E-03
TRINITY_DN1341_c0_g1_i2	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	<i>ipda</i>	-8.91	9.70E-06

Otra defensa antioxidante que mostró genes regulados positivamente en *A. sydowii* EXF-12860 fue el sistema de tiorredoxina, que participa en la eliminación de ROS, particularmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las tiorredoxinas detectan el estrés oxidativo, mantienen el estado redox relacionado con el tiol y activan proteínas de señalización como peroxirredoxinas y quinasas (Fujino *et al.*, 2006). Posteriormente, las peroxirredoxinas también juegan un papel importante en la estabilización del equilibrio redox de tiorredoxina (Matsuzawa, 2017). Además, las peroxirredoxinas participan en la señalización de la información redox y en el control del metabolismo celular (Liebthal *et al.*, 2018). Los genes que codifican peroxirredoxina, tiorredoxina reductasa y proteínas de la familia de tiorredoxina, todos involucrados en el sistema de tiorredoxina, se regularon positivamente en *A. sydowii* EXF-12860 crecido a 5.13 M de NaCl.

La cisteína es un aminoácido crucial para la respuesta celular antioxidante (Matsuzawa, 2017). Por el contrario, la homocisteína, un derivado de la metionina, perturba la síntesis de proteínas, contribuye a la formación de ROS y promueve reacciones de hipermetilación en la célula, lo que podría alterar la expresión y regulación génica (Richard *et al.*, 2018; Esse *et al.*, 2019). Por tanto, durante el estrés oxidativo es crucial reducir eficazmente los niveles de homocisteína intracelular que pueden condensarse con serina para formar cistationina mediante la cistationina β-sintasa (CBS). La cistationina finalmente se convierte en cisteína a través de la cistationina gamma-liasa (CSE) (Taysi *et al.*, 2015; Esse *et al.*, 2019). Encontramos que los genes *cbs* y *cse* fueron regulados positivamente durante el crecimiento en condiciones de estrés por salinidad. Como era de esperar, los genes de la homocisteína sintasa (*cys*) fueron regulados negativamente. Estos genes codifican enzimas que catalizan la conversión de O-acetil-L-homoserina en homocisteína en la vía de biosíntesis de metionina (Esse *et al.*, 2019). Nuestros resultados sugieren que la síntesis de homocisteína está apagada, mientras que la conversión de homocisteína en cisteína se activa transcripcionalmente. Esta estrategia también evidencia la defensa antioxidante de este hongo en condiciones hipersalinas.

Finalmente, también se analizó el sistema glioxalasa. El papel de las glioxalosas se ha relacionado con la respuesta al estrés en eucariontes, lo que contribuye a conferir tolerancia a los factores ambientales estresantes (Sankaranarayanan *et al.*, 2017). Por ejemplo, se han propuesto como biomarcadores para la tolerancia al estrés abiótico en plantas (Kaur *et al.*,

2014). Sin embargo, las glioxalasa s fueron principalmente relacionadas con la vía de desintoxicación del metilglioxal, un producto citotóxico de la glucólisis. Las glioxalasa s catalizan la conversión de metilglioxal en D-lactato utilizando glutatión reducido como cofactor (Thornalley, 1990). Se ha informado que varios estreses abióticos, incluida la salinidad y la privación de agua, aumentan las concentraciones intracelulares de metilglioxal, que es eliminado por glioxalasa s codificadas por los genes *glyI* y *glyII* (Sankaranarayanan *et al.*, 2017). La glioxalasa I media la combinación de metilglioxal con glutatión reducido para formar S-lactoilglutatión, que luego se convierte en D-lactato a través de las glioxalasa s II que también regeneran el glutatión reducido (Crook and Law, 1952). También encontramos regulados positivamente transcritos para el gen *glyI* que codifica S-D-lactoilglutatión liasa.

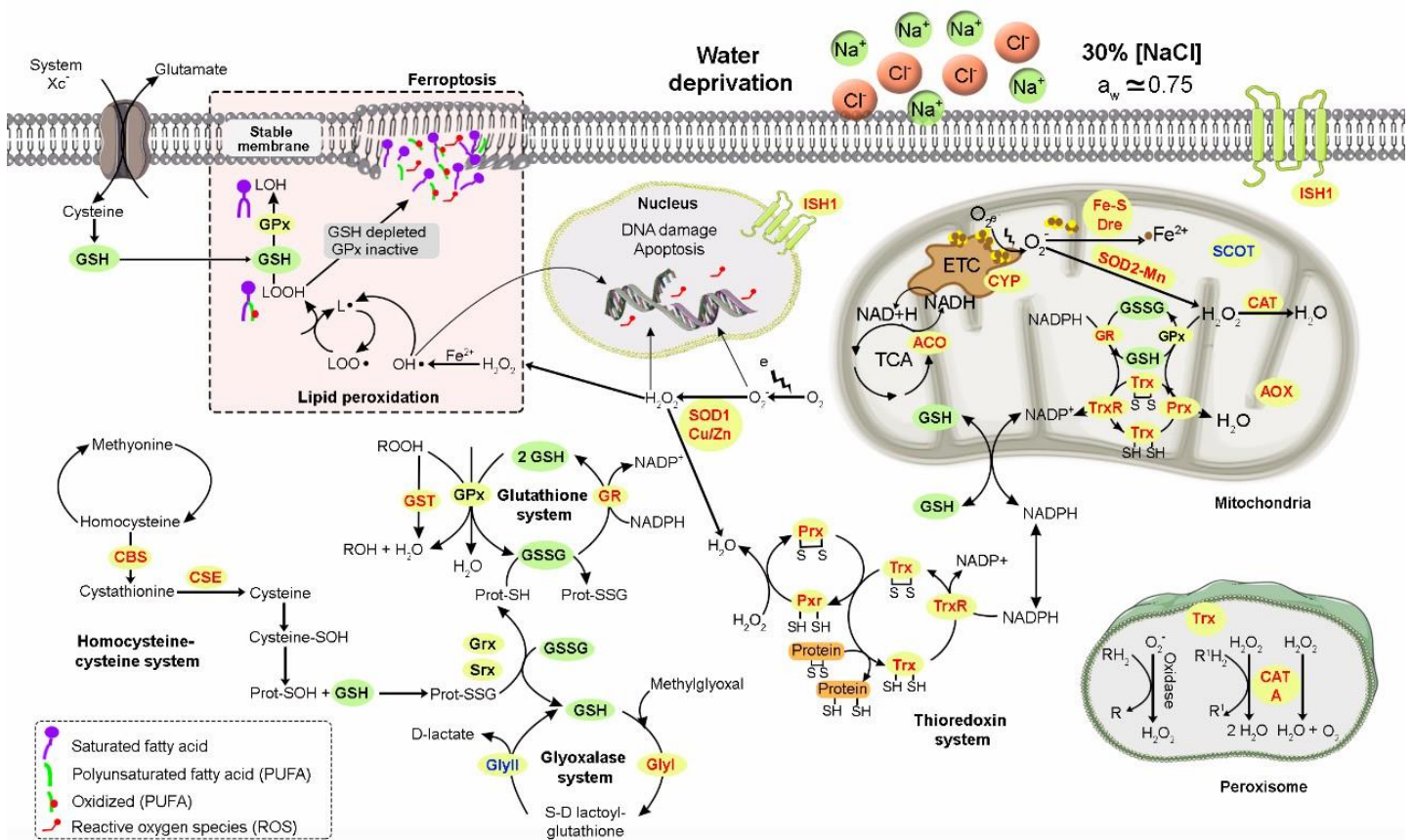
Además, analizamos la transcripción de genes relacionados con la oxidación de lípidos por tratarse de un proceso fuertemente inducido por el estrés oxidativo (Busch and Binder, 2017). Cinco transcritos que correspondían a dos diferentes *scot*, gene que codifica para succinil-CoA-3-cetoácido-coenzima A transferasa, se expresaron diferencialmente (Tabla 1). Si bien solo un gen (id de transcripción: DN1270) se regulaba positivamente bajo estrés por salinidad (logFC= 5,04), cuatro isoformas del otro gen (id de transcripción: DN1899) estaban reguladas negativamente. Este gen también mostró un uso diferencial de la transcripción. Las transferasa s succinil-CoA-3-cetoácido-coenzima A son enzimas de la matriz mitocondrial con una función central en el catabolismo de cuerpos cetónicos. El vínculo entre los genes *scot* y el estrés oxidativo no se ha estudiado de forma exhaustiva. En la bacteria *Burkholderia pseudomallei*, se ha sugerido que *scot* responde a ROS externos (Chutoam *et al.*, 2013). Aunque se planteó la hipótesis de que las transferasa s de succinil-CoA-3-cetoácido-coenzimaA son necesarias para transferir CoA de succinil-CoA a lípidos oxidados durante el estrés oxidativo, los niveles de mRNA de los genes *scot* fueron regulados negativamente en *B. pseudomallei*. La regulación transcripcional negativa de los genes *scot* puede reducir los niveles intracelulares de acetoacetyl-CoA y la reducción de NADH y FADH<sub>2</sub>, que resulta en una menor cantidad de ROS intracelulares (Folgueira *et al.*, 2020). Entonces, no es sorprendente que *A. sydowii* EXF-12860 redujo la transcripción de cuatro transcritos diferentes que codifican para transferasa s de succinil-CoA-3-cetoácido-coenzimaA en condiciones hipersalinas.

Finalmente, *aox* el gen que codifica para una oxidasa alternativa se incrementó en condición hipersalina ( $\log_{2}FC = 5,25$ ). Las oxidasas alternativas, que son sintetizadas por una gran variedad de plantas, hongos y algunos protistas, constituyen una cadena respiratoria alternativa que confiere resistencia a diferentes estresores ambientales (Folgueira *et al.*, 2020) (McDonald, 2008). Estas enzimas permiten el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria de fosforilación oxidativa incluso en presencia de niveles tóxicos de ROS que inhiben los complejos III y IV. La actividad de las oxidasas alternativas es crucial cuando se produce una acumulación de  $O_2^-$  derivados del complejo III como consecuencia del estrés oxidativo (Warris and Ballou, 2019).

Los genes *aox* están vinculados al desarrollo de los hongos en condiciones de estrés (Lin *et al.*, 2019; Barsottini *et al.*, 2020). En *Candida albicans*, las oxidasas alternativas están íntimamente involucradas en el crecimiento de la levadura durante la exposición al fluconazol (Yan *et al.*, 2009), mientras que estas enzimas son relevantes durante el crecimiento de *A. fumigatus* (Grahl *et al.*, 2012; Kowalski *et al.*, 2016) y *Botrytis cinerea* (Lin *et al.*, 2019) en condiciones hipóxicas. Adicionalmente, los genes *aox* se han regulado positivamente en varios hongos como *A. niger*, *Yarrowia lipolytica* (Honda *et al.*, 2012), *A. fumigatus* (Yukioka *et al.*, 1998), *Hansenula anomala* (Minagawa *et al.*, 1992), y *Paracoccidioides brasiliensis* (Martins *et al.*, 2011) en respuesta al estrés oxidativo o la privación de agua.

Nuestros resultados concuerdan con los informados por (Petrovič, 2006) que estudiaron la respuesta transcripcional en la levadura halotolerante *H. werneckii* durante su crecimiento en condiciones hipersalinas. En *H. werneckii*, la expresión de genes que codifican para aconitasa y la proteína de agrupación Fe-S (nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) deshidrogenasa) se incrementó con 17% (2.9M) de NaCl. Además, estos genes fueron regulados positivamente en *A. sydowii* EXF-1286 en NaCl 5.13 M. La aconitasa y la NADH deshidrogenasa funcionan como sensores de equilibrio redox mitocondrial y son uno de los principales objetivos moleculares de ROS (Bulteau *et al.*, 2003). Al mismo tiempo, la aconitasa, por ejemplo, es una enzima clave en el ciclo de Krebs, mientras que la NADH deshidrogenasa es un componente importante del complejo I para el flujo de electrones durante la respiración mitocondrial. Por lo tanto, pueden sobreexpresarse en condiciones de alta salinidad para mantener niveles fisiológicos suficientes de enzimas que mantienen

encendidos el ciclo de Krebs y preservan la función de señalización como sensor de estado redox, o para apoyar la producción de ATP, respectivamente (Petrovič, 2006). También se encontraron resultados similares en el proteoma de *H. werneckii* expuestos a NaCl 3,0 M y 4,5 M (Vaupotic *et al.*, 2008). Nuestros resultados bioquímicos y transcriptómicos señalan que la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa actuaron juntas como un sistema de defensa antioxidante primario para proteger *A. sydowii* EXF-12860 contra moléculas peroxidantes en condiciones extremas de salinidad. Este ascomiceto halófilo regulado positivamente bajo Na<sup>+</sup> enfatiza un conjunto de genes que evidencia la explotación de una extensa respuesta antioxidante que también incluye los sistemas de glutatión, tiorredoxina y glioxalasa. La figura 7 representa un modelo celular con la defensa antioxidante de *A. sydowii* EXF-12860 a concentración saturada de NaCl.



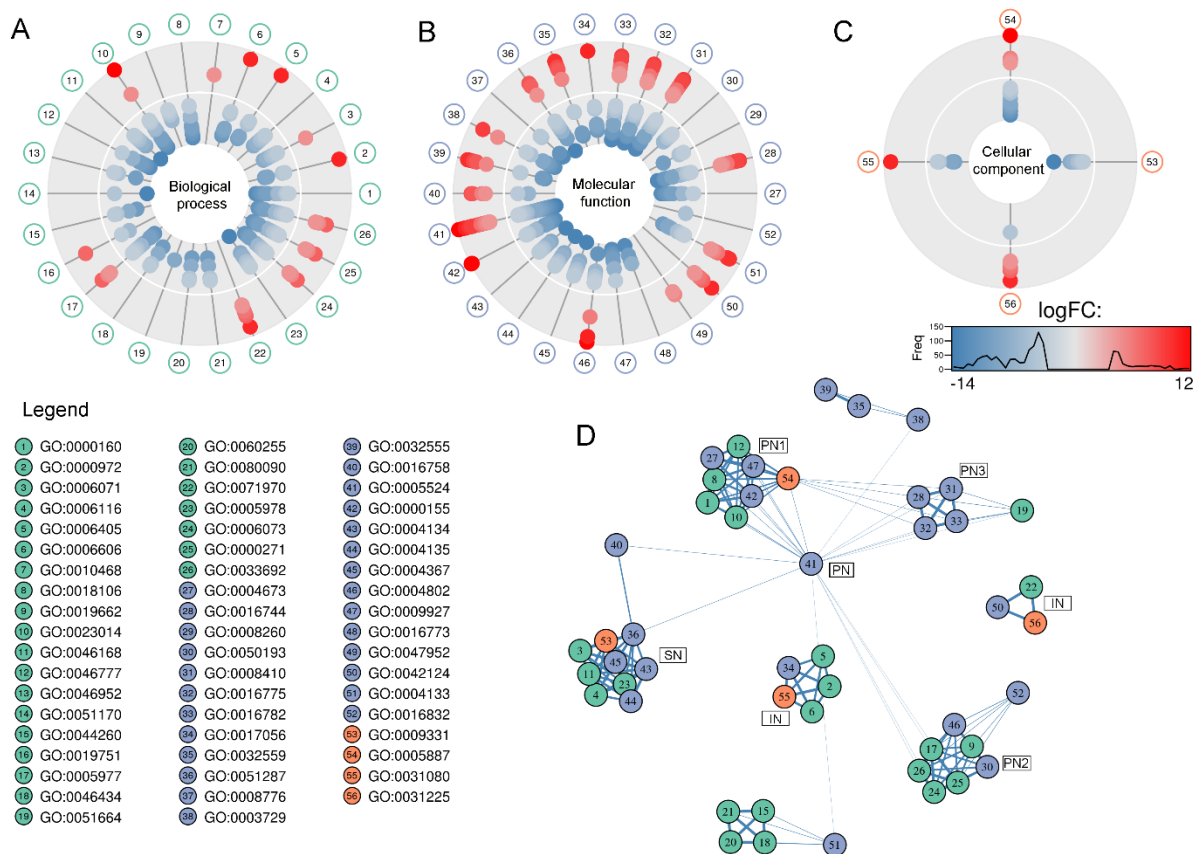
**Figura 7.** El modelo de defensa antioxidante celular de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en concentración saturada de NaCl. En los círculos verdes (no enzimáticos) y amarillos (enzimáticos) se señalan los componentes de las vías implicadas en las respuestas al estrés oxidativo. En negrita las moléculas que no se encontraron en el análisis transcriptómico, en rojo y resaltado las proteínas cuyos transcritos están regulados positivamente y en azul y resaltado las proteínas cuyos transcritos están regulados negativamente.

## 6.5. Perfiles transcripcionales de mRNA y análisis de la ontología genética de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 a una concentración saturada de NaCl

Varios estudios abordan las adaptaciones de los hongos halotolerantes y halófilos a condiciones salinas e hipersalinas (Zajc *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Turk and Gostinčar, 2018; Ding *et al.*, 2019; Tafer *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2021). Sin embargo, sólo unos pocos investigaron los mecanismos fúngicos que ocurren a concentraciones saturadas de NaCl ( $\geq 5$  M de NaCl) (Kogej *et al.*, 2007b; Kunčič *et al.*, 2010; Zajc *et al.*, 2013). Este es el primer estudio dirigido a analizar el perfil de mRNA de un hongo filamentoso ascomiceto halófilo expuesto a una concentración saturada de NaCl (5.13 M).

Para profundizar en los mecanismos moleculares de adaptación del hongo halófilo *A. sydowii* EXF-12860 a una actividad hídrica extremadamente baja debida a una elevada concentración de NaCl, analizamos los perfiles de mRNA obtenidos a partir de tres cultivos líquidos YMA independientes de *A. sydowii* en fase exponencial, cultivados a una concentración óptima y saturada de NaCl. El análisis reveló 41,309 secuencias transcritas y 1,842 genes expresados diferencialmente ( $\log_{2}FC > 1,5$ , valor  $p < 0,05$ ) en saturación de NaCl en comparación con la concentración óptima de NaCl. En el perfil transcripcional se encontraron 704 genes regulados positivamente y 1,138 regulados negativamente. El 89% de los genes expresados diferencialmente pudieron ser anotados con KEGG, mientras que 193 (1,25%) genes codifican para proteínas con funciones desconocidas.

El análisis GO mostró 26 procesos biológicos, 26 funciones moleculares y cuatro términos GO de componentes celulares significativamente enriquecidos (valor  $p < 0,05$ , prueba de Fisher) (Fig. 8A-C). Los procesos biológicos enriquecidos, sobrerrepresentados según los perfiles de mRNA, fueron el sistema de transducción de señales de fósforo, el tráfico de RNA y proteínas a través del núcleo, la regulación de la expresión génica, la regulación de las macromoléculas y el metabolismo primario, la fermentación no glicolítica, la biosíntesis de polisacáridos, la biosíntesis de  $\beta$ -glucanos de la pared celular, el metabolismo de los polioles (es decir, el metabolismo del glicerol), el catabolismo de los cuerpos cetónicos y la oxidación del NADH (Fig. 8A).



**Figura 8.** Gráfico de tarta (A-C) que muestra el enriquecimiento de términos de la ontología génica (GO) a partir de las anotaciones funcionales sobrerrepresentadas en el conjunto de transcritos expresados diferencialmente de *Aspergillus sydowii* expuesto a la privación extrema de agua por la sal (5.13 M de NaCl) en comparación con la concentración óptima de sal para el crecimiento (1 M de NaCl). Los GOs se nombran con números del 1 al 56. (A) Proceso biológico (círculos verdes, 1-26). (B) Función molecular (círculos azules, 27-52). (C) Componente celular (círculos rojos, 53-56). El círculo blanco dentro de los donuts representa  $\logFC = 0$ . Los transcritos asociados a cada GO se representan en base a su valor  $\logFC$  como: ● transcripciones reguladas positivamente ( $\logFC > 2$ ); ● transcripciones reguladas negativamente ( $\logFC < -2$ ). (D) Red multiescala obtenida a partir de los datos de enriquecimiento de GO. Se observan tres nodos principales (PN1, PN2, PN3), un nodo secundario (SN) y dos nodos aislados (IN). Sólo los GO que comparten más de tres transcritos entre sí están representados en la red basada en términos GO.

Legenda GO. Proceso biológico: 1-GO:0000160 sistema de transducción de señales por fosforilación; 2-GO:0000972 fijación dependiente de la transcripción del *DNA* del gen de la RNA polimerasa II en la periferia nuclear; 3-GO:0006071 proceso metabólico del glicerol; 4-GO:0006116 oxidación del NADH; 5-GO:0006405 exportación de RNA del núcleo; 6-GO:0006606 importación de proteínas al núcleo; 7-GO: 0010468 regulación de la expresión génica; 8-GO:0018106 fosforilación de peptidil-histidina; 9-GO:0019662 fermentación no glicolítica; 10-GO:0023014 transducción de señales por fosforilación de proteínas; 11-GO:0046168 proceso catabólico de glicerol-3-fosfato; 12-GO:0046777 autofosforilación de proteínas; 13-GO:0046952 proceso catabólico de cuerpos cetónicos; 14-GO: 0051170 importación al núcleo; 15-GO:0044260 proceso metabólico de las macromoléculas celulares; 16-GO:0019751 proceso metabólico de los polioles; 17-GO:0005977 proceso metabólico del glucógeno; 18-GO:0046434 proceso catabólico de los organofosforados; 19-GO:0051664 localización del poro nuclear; 20-GO:0060255 regulación del proceso metabólico de las macromoléculas; 21-GO: 0080090 regulación del proceso metabólico primario; 22-GO:0071970 proceso biosintético de la pared celular de tipo fúngico (1->3)- $\beta$ -D-glucano; 23-GO:0005978 proceso biosintético del glucógeno; 24-



GO:0006073 proceso metabólico del glucano celular; 25-GO:0000271 proceso biosintético del polisacárido; 26-GO:0033692 proceso biosintético del polisacárido celular. Función molecular: 27-GO:0004673 actividad histidina quinasa proteica; 28-GO:0016744 actividad transferasa, transferencia de grupos aldehído o cetónicos; 29-GO:0008260 actividad CoA-transferasa de 3-oxoácidos; 30-GO:0050193 actividad fosfocetolasa; 31-GO:0008410 actividad CoA-transferasa; 32-GO:0016775 actividad fosfotransferasa, grupo nitrogenado como aceptor; 33-GO: 0016782 actividad transferasa, transferencia de grupos que contienen azufre; 34-GO:0017056 constituyente estructural del poro nuclear; 35-GO:0032559 unión de adenil ribonucleótidos; 36-GO:0051287 unión de NAD; 37- GO:0008776 actividad acetato quinasa; 38-GO:0003729 unión de mRNA; 39-GO:0032555 unión de purina ribonucleótidos; 40-GO: 0016758 actividad hexosiltransferasa; 41-GO:0005524 unión de ATP; 42-GO:0000155 actividad fosforelase sensorial; 43-GO:0004134 actividad 4- $\alpha$ -glucanotransferasa; 44-GO:0004135 actividad amilo- $\alpha$ -1,6-glucosidasa; 45-GO:0004367 actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD+]; 46-GO:0004802 actividad transketolasa; 47-GO: 0009927 actividad histidina fosfotransferasa; 48-GO:0016773 actividad fosfotransferasa, grupo alcohol como aceptor; 49-GO:0047952 actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)+]; 50-GO:0042124 actividad 1,3- $\beta$ -glucanosiltransferasa; 51-GO:0004133 actividad enzima de desramificación del glucógeno; 52-GO:0016832 actividad aldehído-liasa. Componente celular: 53-GO:0009331 complejo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 54-GO:0005887 componente integral de la membrana plasmática; 55-GO:0031080 anillo exterior del poro nuclear; 56-GO:0031225 componente anclado de la membrana.

Los procesos biológicos enumerados anteriormente de EXF-12860 reflejan la amplia reprogramación fisiológica necesaria de la célula fúngica a concentraciones saturadas de NaCl. Algunos de estos procesos metabólicos, incluyendo la biosíntesis de glicanos y polisacáridos de la pared celular, el sistema de transducción de señales de fosforilación y el metabolismo de los polioles, fueron identificados como cruciales en los dos hongos modelo más investigados para adaptarse a condiciones hipersalinas, el basidiomiceto obligatoriamente halófilo *Wallemia ichthyophaga* y la levadura negra extremadamente halotolerante *Hortaea werneckii* (Kogej *et al.*, 2007b; Zajc *et al.*, 2013; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). El metabolismo del glicerol y la regulación del metabolismo primario también se enriquecieron en las levaduras no convencionales halotolerantes *Hyphopichia burtonii* e *Hyphopichia pseudoburtonii* cuando se expusieron al estrés salino (Lee *et al.*, 2021). Las funciones biológicas sobrerrepresentadas de EXF-12860 a concentraciones saturadas de NaCl también están relacionadas con las adaptaciones necesarias para el crecimiento a bajas temperaturas, ya que ambas condiciones inducen una baja actividad del agua. La levadura psicrófila *Rhodotorula frigidialcoholis*, recientemente descrita, cuando se cultiva a 0 °C y 23 °C, tiene a 0 °C transcritos más abundantes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, el metabolismo primario, la transducción de señales y la biosíntesis de glicanos (Touchette *et al.*, 2021).

En correlación con los procesos biológicos enriquecidos, nuestros datos del transcriptoma

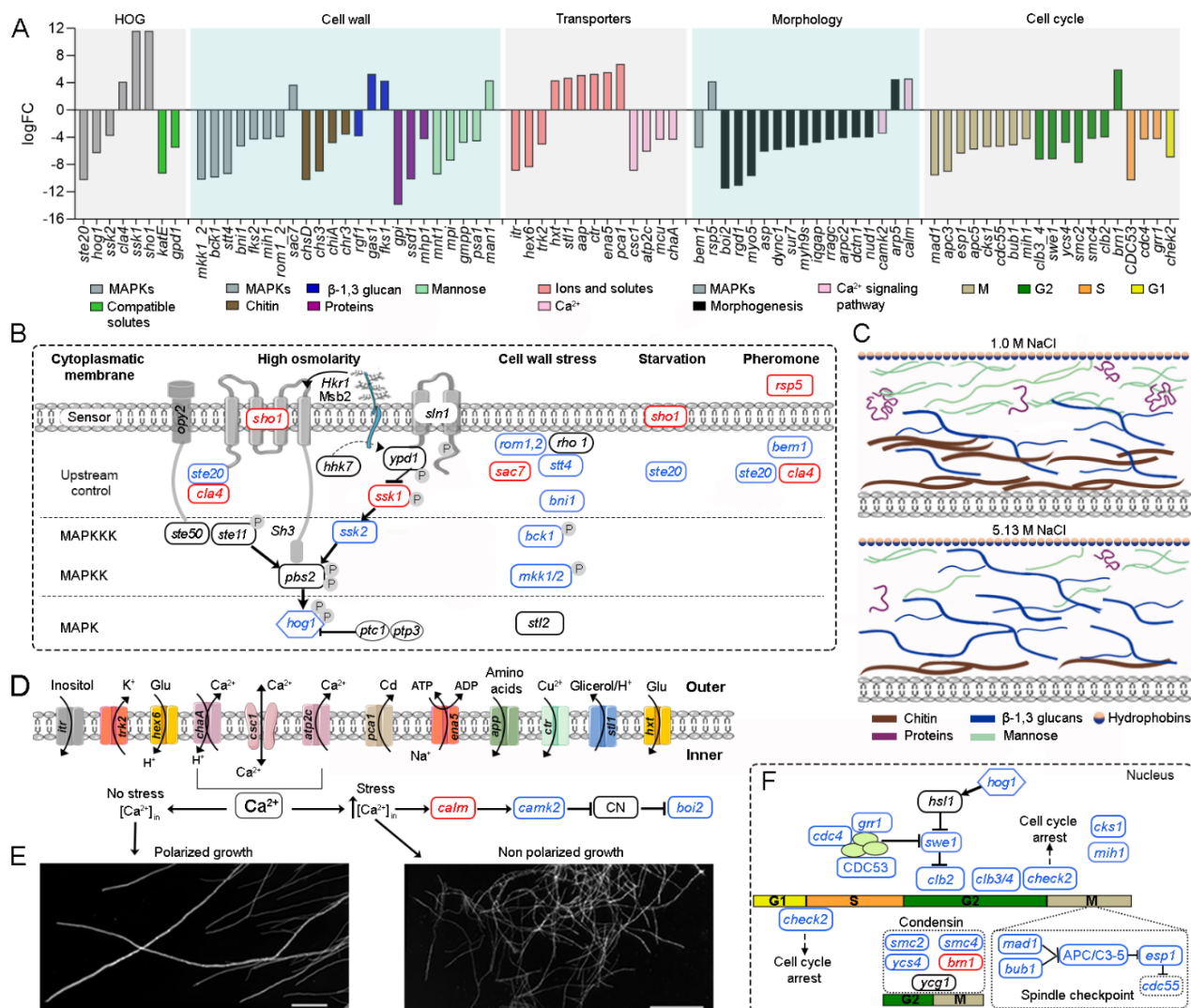
revelaron que la actividad de transferasa de CoA, glicanos, grupos cetónicos, aldehídos, fosfatos y grupos que contienen azufre, junto con los procesos de NAD, de unión de mRNA y ATP, y de cinasa de sensores de fosforilación fueron las categorías GO de función molecular con el mayor número de genes expresados de forma diferencial (Fig. 8B). La actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mostró sólo genes regulados negativamente (Fig. 8B), lo que es consistente con las bajas concentraciones de glicerol reportadas en estudios previos de nuestro grupo. Este resultado es muy interesante ya que es completamente opuesto a la respuesta al estrés salino en otros hongos (Zajc *et al.*, 2014b; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Turk and Gostinčar, 2018; Lee *et al.*, 2021). Por último, las categorías de componentes celulares sobrerrepresentadas estaban relacionadas con los componentes estructurales de la membrana, el anillo exterior del poro nuclear y el complejo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Fig. 8C). En conclusión, el análisis de categorías GO expuso que la mayoría de los genes expresados diferencialmente estaban involucrados en el metabolismo primario y la transducción de señales.

Se obtuvo una red multiescala GO a partir de los datos de enriquecimiento GO (Fig. 8D). La ilustración de la red derivada de GO mostró que el término GO ATP binding constituye el nodo principal de la red y muestra interacciones directas entre el nodo central (CN) y otros tres nodos principales (PN). El primer nodo (PN1) alberga GO relacionados con el sistema de transducción de señales por fosforilación, la autofosforilación de proteínas, la transducción de señales por fosforilación de proteínas, la actividad quinasa del sensor de fosforilación y la actividad quinasa de la fosfotransferasa. El PN2 alberga procesos de metabolismo de polisacáridos celulares y fermentación no glicolítica y el PN3 actividad transferasa de CoA y grupos que contienen azufre, nitrógeno y fósforo (Fig. 8D). También se observó un nodo secundario (SN) relacionado con el metabolismo del glicerol, el NAD y los carbohidratos. Además, se identificaron dos nodos aislados (IN), relacionados principalmente con: IN-1) el metabolismo de los componentes de la pared celular y el componente anclado de la membrana, e IN-2) los procesos relacionados con la exportación de RNA desde el núcleo, la exportación de proteínas al núcleo y los componentes estructurales del poro nuclear. Este análisis revela una imagen completa que muestra grupos de firmas GO informativas, indicando procesos biológicos relevantes y funciones moleculares relacionadas con la tolerancia hipersalina en *A. sydowii* EXF-12860:

transducción de señales de fosforilación, metabolismo de polisacáridos y actividad transferasa.

6.6. El análisis de las adaptaciones moleculares al NaCl saturado puso de manifiesto la importancia de la vía de transducción de señales del glicerol de alta osmolaridad (HOG) y de la ultraestructura y morfología de la pared celular.

En la Figura 9 y en el Anexo 3 se presenta un resumen de los genes expresados diferencialmente en la concentración de NaCl saturado. La vía de transducción de señales del glicerol de alta osmolaridad (HOG) media en la detección y respuesta al estrés osmótico en microorganismos halófilos y halotolerantes, incluidos los hongos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). En *A. sydowii* *sho1* (logFC = 11,65), *cla4* (logFC = 4,15), y *ssk1* (logFC = 11,65) fueron regulados positivamente en la concentración saturada de NaCl, mientras que otros genes relacionados con HOG como *hog1* (logFC = -6,31), *ste20* (logFC = -10,28), y *ssk2* (logFC = -3,81) fueron regulados negativamente (Fig. 9A, B). El gen osmosensor transmembranal *sho1*, que desempeña un papel crítico en la detección de la falta de agua, se sobreexpresó transcripcionalmente. Curiosamente, el gen híbrido de la histidina quinasa *shn1*, con un papel putativo en la detección de osmosis, mantuvo sus niveles de transcripción tanto en concentraciones óptimas como saturadas de NaCl. Aunque el gen *ssk1*, que codifica un regulador de la respuesta a la fosforilación, reconocido como un activador de la MAPK Hog1, fue regulado positivamente en la concentración saturada de NaCl, el gen de la MAPKK *ssk2* fue desactivado dando lugar a una regulación negativa del gen *hog1*. Estos resultados sugieren que los genes osmoresponsables podrían ser activados temporalmente en la transcripción y que otros factores también podrían jugar un papel clave en su regulación transcripcional (Kejžar *et al.*, 2015). La concentración saturada de NaCl también induce cambios importantes en los niveles transcripcionales de los genes relacionados con la ultraestructura y la morfología de la pared celular (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).



**Figura 9.** Resumen de los principales mecanismos de tolerancia de *Aspergillus sydowii* cultivado a una concentración saturada de NaCl (5.13 M NaCl) en comparación con la concentración óptima de sal para el crecimiento (1 M NaCl). (A) Gráfico de barras que muestra los valores logFC de todos los genes expresados diferencialmente que participan en la vía del glicerol de alta osmolaridad (HOG), la biosíntesis de la pared celular, los transportadores de la membrana celular, la morfología del micelio y el ciclo celular. (B) Genes relacionados con las vías de señalización MAPK que responden a una condición de hiperosmolaridad. Los recuadros/letras rojas, azules y negras indican los genes regulados al alza, los regulados negativamente y los expresados de forma no diferencial, respectivamente. (C) Composición de la pared celular inferida a partir de la expresión de los genes implicados en la síntesis de los componentes de la pared celular (quitina, proteínas - se muestran especialmente las hidrofobinas-, glucanos, manosa). Se representan modelos de pared celular pertenecientes a 1 M de NaCl (arriba) y 5.13 M de NaCl (abajo). (D) Transportadores de membrana citoplasmática expresados diferencialmente a una concentración saturada de NaCl. *chaA*, *csc1* y *atp2c* son componentes de la vía de señalización del  $Ca^{2+}$ . La concentración de  $Ca^{2+}$  dentro de la célula controla el crecimiento polarizado de la hifa. (E) Microscopía electrónica de *A. sydowii* cultivado a 1 M de NaCl (crecimiento polarizado) y 5.13 M de NaCl (crecimiento no polarizado). Barras de escala = 100  $\mu$ m. (F) Genes expresados diferencialmente relacionados con el ciclo celular.

En *A. sydowii* EXF-12860 cultivada a una concentración saturada de NaCl los genes relacionados con la síntesis de quitina, manosa y proteínas de la pared celular fueron regulados negativamente, mientras que el *gas1* que codifica la proteína que contiene el dominio de la glucanosiltransferasa y el gen *fks1* que codifica la  $\beta$ -1,3 glucano sintasa, implicado en la biosíntesis de  $\beta$ -1,3 glucanos, fueron regulados positivamente (Fig. 9A). Un conjunto de MAPKs (es decir, *Sac7*, *Rho1*, *Stt4*, *Bck1*, *Mkk1/2*, *Bni1*, *Rom1/2*, etc.) median la capacidad del hongo para cambiar entre diferentes estructuras de la pared celular en respuesta al estrés salino (Levin, 2005), crucial para recuperar la rigidez de la pared celular, la porosidad y la permeabilidad en los hongos halófilos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Las MAPKs relacionadas con la vía de respuesta al daño de la pared celular, excepto el gen *sac7* que codifica una proteína activadora de GTPasas de Rho1 (Cid *et al.*, 1998), fueron reguladas negativamente en *A. sydowii* EXF-12860 a la concentración saturada de NaCl (Fig. 9A, B). Curiosamente, los genes que codifican las hidrofobinas no se expresaron de forma diferencial en *A. sydowii* expuesta a la concentración saturada de NaCl, como se observó a 0,5 M y 2 M de NaCl (Pérez-Llano *et al.*, 2020). Las hidrofobinas son proteínas anfipáticas asociadas a la pared celular, que fueron transcripcionalmente reguladas positivamente en el hongo halófilo obligado *W. ichthyophaga*, indicando su importante papel en la adaptación de la pared celular a la salinidad (Turk and Gostinčar, 2018). Según el perfil transcripcional observado en *A. sydowii* EXF-12860, proponemos dos tipos de adaptaciones de la pared celular, una relacionada con concentraciones de 1 M y otra con concentraciones saturadas de NaCl (Fig. 9C). Nuestra hipótesis es que la pared celular a la concentración saturada de NaCl contiene una mayor cantidad de  $\beta$ -1, 3 glucanos con mayor porosidad y menor rigidez debido a la biosíntesis reprimida de quitina. Esta hipótesis debe ser evaluada más a fondo mediante resonancia magnética nuclear de alta resolución.

Otros genes expresados diferencialmente en la concentración saturada de NaCl estaban relacionados con la inanición y la síntesis de feromonas (Fig. 9B), como el gen *rsp5*, que codifica la ubiquitina-proteína ligasa E3 necesaria para el apareamiento desencadenado por las feromonas (Wang *et al.*, 1999). Normalmente, esta señal de apareamiento se une a un receptor de la superficie celular Ste (es decir, Ste2/Ste3), que a su vez activa una cascada de MAP quinasas que da lugar a la expresión de genes promotores del apareamiento (Zhu *et al.*, 2011). Los genes *cla4* y *ste20* que codifican quinasas implicadas en la respuesta a la

feromona (Melanie *et al.*, 2007) se expresaron de forma diferencial en *A. sydowii* expuesta a una concentración saturada de NaCl (logFC = 4,15 y logFC = -10,28, respectivamente). En la respuesta a la feromona, el producto del gen *bem1*, que fue regulado negativamente (logFC = -5,53), es necesario para la activación de Cdc42 en yuxtaposición con Ste20. Dado que este paso es crítico para desencadenar la respuesta fúngica a la feromona (Alvaro and Thorner, 2016), parece que las condiciones extremas de NaCl disminuyen el apareamiento en *A. sydowii*. Hay que añadir que la interrelación entre la señalización fúngica de la feromona y las altas concentraciones de NaCl es todavía poco conocida.

A altas concentraciones de NaCl las células fúngicas están expuestas a niveles tóxicos de iones de sodio (Na<sup>+</sup>). Para mantener la homeostasis iónica transmembranal, el potencial de membrana, el pH intracelular y otros procesos fisiológicos relacionados, deben variar los transportadores iónicos transmembranales (Ariño *et al.*, 2010). En *A. sydowii* EXF-12860, la transcripción de los genes que codifican los transportadores que facilitan la afluencia de glucosa, aminoácidos y Na<sup>+</sup> fueron regulados positivamente (Fig. 9A, D), de forma similar a lo observado en el halófilo obligado *W. ichthyophaga*, que aumentó la tasa de transcripción de varios ATPs y exportadores de Na<sup>+</sup> para preservar la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> intracelular y aumentó la captación de glucosa para mantener los flujos metabólicos en concentraciones limitantes de NaCl (Zajc *et al.*, 2013). En *A. sydowii*, a una concentración saturada de NaCl, la transcripción del simportador de glicerol/H<sup>+</sup> STL1, que regula los niveles de glicerol intracelular, fue regulada positivamente (logFC = 4,76), como se observó en *Saccharomyces cerevisiae* expuesto a un choque hiperosmótico y en otros hongos cultivados en condiciones hipersalinas (Kogej *et al.*, 2007a; Zajc *et al.*, 2013).

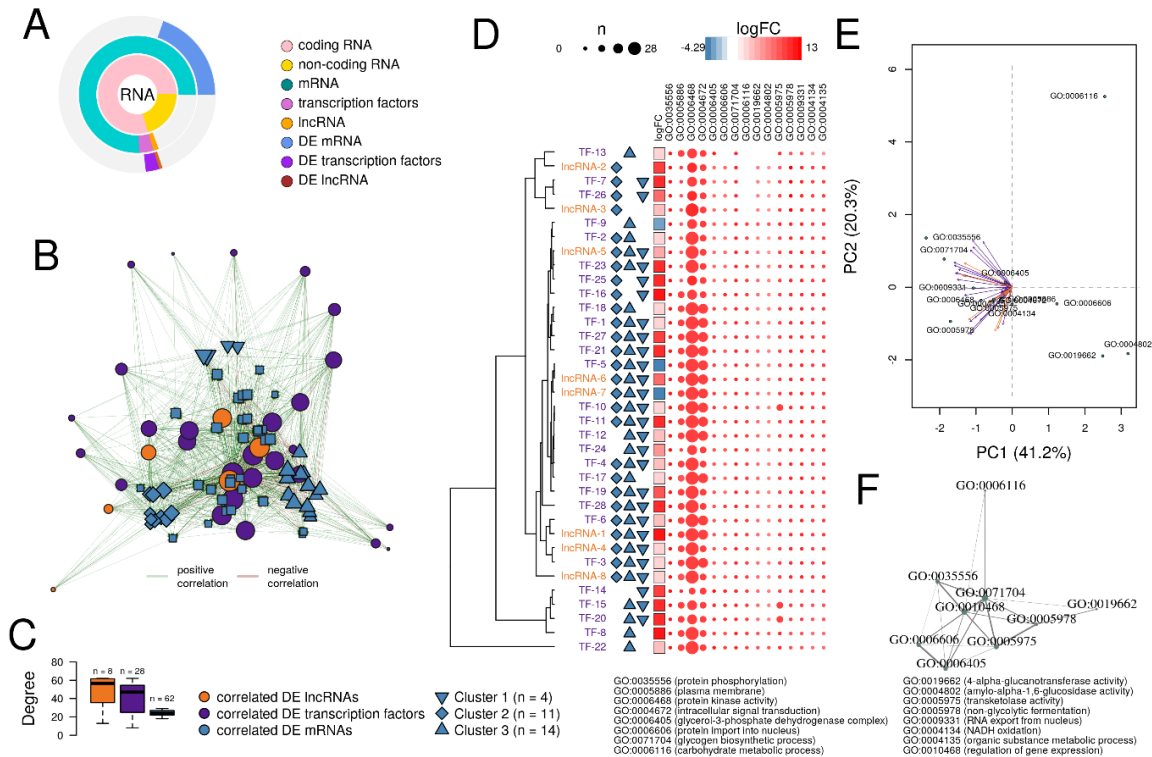
En *A. sydowii*, en condiciones de saturación de NaCl, varios transportadores de Ca<sup>2+</sup> fueron regulados negativamente (Fig. 9A) y, en consecuencia, el crecimiento polarizado se vio drásticamente afectado (Fig. 4E). Esto fue apoyado por la represión transcripcional del gen *bem1* (logFC = -5,53), requerido para la polaridad celular del hongo (Leberer *et al.*, 1996). Otros genes relacionados con la morfogénesis, la citocinesis, el crecimiento polarizado y la formación de tubos germinales, como *boi2* (logFC = -11,57), *rgd1* (logFC = -11,13), *myo5* (logFC = -9,71) y *dync1* (logFC = -6,0), también fueron regulados negativamente (Fig. 4A). En la concentración saturada de NaCl, los genes implicados en el ciclo celular también fueron regulados negativamente (Fig. 9A, F) proporcionando una fuerte evidencia de la

influencia de las concentraciones extremadamente altas de NaCl en el crecimiento celular y el aumento de las necesidades de energía para mantener los flujos metabólicos y los procesos fisiológicos en *A. sydowii* en esta condición extrema. La detención del ciclo celular es una estrategia bien documentada en levaduras y hongos filamentosos para hacer frente a la hiperosmolaridad (Solé *et al.*, 2015). En presencia de diferentes estímulos (es decir, osmostress), las células deben retrasar la progresión del ciclo celular para permitir las respuestas adaptativas a las nuevas condiciones ambientales antes de que las células desencadenen períodos de transición del ciclo celular vulnerables. En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, la privación de agua induce la fosforilación de la quinasa Hog1, que participa en la regulación de todas las fases del ciclo celular y se observa una rápida detención del ciclo celular (Saito and Posas, 2012). En *A. sydowii* expuesto a la hiperosmolaridad (5.13 M de NaCl) la progresión del ciclo celular se detiene en la fase S, pero principalmente en la fase G2 y en la transición G2/M (Fig. 9A y F). Se ha sugerido que el retraso en la fase S durante la privación extrema de agua impide la replicación del *DNA* para evitar interferencias con la transcripción de los genes implicados en las respuestas osmoadaptativas. La transición de la fase S a la fase G2 está gobernada principalmente por ciclinas mitóticas como Clb1 y Clb2. Posteriormente, la transición del ciclo celular de la fase G2 a la M está controlada por el punto de control morfogénico (Saito and Posas, 2012). En *A. sydowii* expuesta a 5.13 M de NaCl encontramos que *clb2* y diferentes genes implicados en el punto de control morfogénico fueron regulados negativamente (Fig. 9A y F). Nuestros resultados también sugieren que el punto de control mitogénico es sensible a concentraciones saturadas de NaCl (Saito and Posas, 2012).

#### 6.7. Importancia de los lncRNA y de los factores transcripcionales en el transcriptoma de *Aspergillus sydowii* a una concentración saturada de NaCl

Encontramos que ~ 80% y ~ 20% de los transcritos fueron clasificados como RNA codificante y no codificante, respectivamente (Fig. 10A). Además, los RNA que codifican factores de transcripción (TFs) representaron el 4% del RNA codificante y el 7,3% del RNA no codificante se clasificó como lncRNAs. Los restantes transcritos no codificantes se clasificaron como tRNAs, snRNAs y sRNAs, entre otros (Fig. 10A). A pesar de su relativamente baja abundancia, una gran proporción de lncRNAs y RNAs que codifican TFs

se expresaron diferencialmente: 42,4% y 69,8% del total de lncRNAs y RNAs que codifican TFs, respectivamente. En comparación, sólo el 27,4% de los mRNAs se expresaron de forma diferencial, lo que refleja el papel clave que los lncRNAs podrían desempeñar en la respuesta transcripcional de *A. sydowii* expuesta a condiciones extremadamente salinas.



**Figure 10.** Análisis de la función putativa de los lncRNAs y factores de transcripción encontrados en el transcriptoma de *A. sydowii* (condición de 5.13 M de NaCl comparada con 1 M de NaCl). (A) Cantidades relativas de mRNAs diferencialmente expresados (DE), lncRNAs y RNAs que codifican factores de transcripción encontrados en el transcriptoma de *A. sydowii*. (B) Topología de la red dirigida construida con los lncRNAs y RNAs más relevantes que codifican factores de transcripción y sus mRNAs DE co-expresados. (C) Grado de distribución de los lncRNAs y RNAs que codifican factores de transcripción y sus mRNAs DE co-expresados observados en la red dirigida. (D) LogFC de los lncRNAs y RNAs que codifican factores de transcripción seleccionados, su asociación a los clusters identificados de DE mRNAs, y un mapa de calor de los recuentos de DE mRNAs que cada molécula reguladora fue correlacionada por término GO de interés. (E) Análisis de correspondencia canónica de los lncRNAs y RNAs seleccionados que codifican factores de transcripción y los términos GO relacionados con funciones biológicas relevantes para superar el estrés osmótico extremo. (F) Análisis de similitud semántica de los términos GO anotados al mRNA de DE co-expresado con los lncRNAs de DE y los RNAs que codifican factores de transcripción.

Anteriormente se ha informado que el papel transcripcional de los lncRNAs está relacionado con sus genes co-expresados (Zhan *et al.*, 2016). La expresión génica está regulada tanto



por TFs como por ncRNAs. Para identificar posibles módulos reguladores de genes que juegan un papel en la respuesta a la salinidad, derivamos una red mRNA-TF-lncRNA a partir de la matriz del coeficiente de correlación de Pearson de los transcritos expresados diferencialmente ( $r > 0,95$ , valor  $p < 0,05$ ) (Jiang *et al.*, 2016). Los mRNA diferencialmente expresados evaluados están asociados a términos GO con funciones clave en la tolerancia osmótica (es decir, fosforilación de proteínas, actividad de proteínas quinasa, transducción de señales intracelulares, complejo de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y composición de la membrana plasmática, entre otros). Quince (93,8%) de los lncRNAs diferencialmente expresados y 62 (77,5%) de los RNAs diferencialmente expresados que codifican TFs estaban fuertemente correlacionados ( $r > 0,9$ , valor  $p < 0,05$ ) con el 54,4% de los mRNAs diferencialmente expresados ( $n = 309$ ).

Para analizar la correlación de los niveles de coexpresión entre los reguladores transcripcionales (lncRNAs y TFs) y sus supuestas dianas (elementos regulados), construimos una red de interacción dirigida que incluía los lncRNAs y RNAs que codifican TFs diferencialmente expresados que mostraban los mayores niveles de coexpresión ( $r > 0,95$ , valor  $p < 0,05$ ) con los mRNAs asociados a términos GO relevantes para el estrés osmótico (Fig. 10B). El grado de distribución (número de aristas -conexiones- por vértices), mostrado en la Fig. 5C, indica que los lncRNAs y los TFs mostraron un mayor número de conexiones que los mRNAs. La red refleja un interactoma jerárquico en el que un elemento regulador (es decir, lncRNAs [ $n = 8$ ] o TFs [ $n = 28$ ]) actúa sobre varios objetivos (mRNA [ $n = 62$ ]). Cada lncRNA diferencialmente expresado estaba relacionado en promedio con ~ 48 mRNAs diferencialmente expresados, mientras que cada RNA que codifica un TF estaba relacionado en promedio con ~ 41 mRNAs diferencialmente expresados.

Curiosamente, los mRNA expresados diferencialmente estaban relacionados en promedio con sólo ~ 24 reguladores transcripcionales (es decir, lncRNAs y TFs) lo que sugiere que la expresión de cada gen podría estar bajo la influencia tanto de lncRNAs como de TFs.

La topología de la red (Fig. 10B) muestra diferentes clusters formados por mRNAs diferencialmente expresados con un perfil de conexión similar (bordes) con lncRNAs diferencialmente expresados y RNAs que codifican TFs. Se identificaron tres clusters específicos y claramente separados de mRNA diferencialmente expresados (Fig. 10C). Su análisis más profundo indicó que los mRNA agrupados en el cluster 1 ( $n = 4$ ) estaban

asociados a términos GO relacionados con procesos metabólicos (GO:0071704). En el clúster 2 (n = 11) y en el clúster 3 (n = 14) se encontraban mRNA asociados a términos GO relacionados con procesos de fosforilación de proteínas (GO:0006468) y con la actividad de las proteínas quinasas (GO:0004672), y con la composición de la membrana plasmática (GO:0005886), respectivamente. En este análisis, "n" se refiere al número de mRNA en cada cluster.

Utilizamos los descriptores de correlación de la red de co-expresión (Fig. 10B) para seleccionar los lncRNAs y los RNAs que codifican TFs que mostraron las correlaciones de Pearson más altas y el mayor número de conexiones con mRNAs expresados diferencialmente relacionados con GOs relevantes para el estrés hipersalino. La Fig. 10D muestra el logFC de lncRNAs y RNAs que codifican TFs correlacionados con el nivel transcripcional de los mRNAs diferencialmente expresados agrupados en los tres clusters de mRNA identificados, pero también el número de mRNAs diferencialmente expresados que cada molécula reguladora estaba correlacionada por término GO. Parece que casi todos los RNAs que codifican TFs y lncRNAs estaban correlacionados con al menos un mRNA anotado en cada término GO analizado. Además, muchos de los RNAs que codifican TFs y lncRNAs estaban correlacionados con al menos dos de los grupos de genes identificados en la Fig. 10B. En general, los lncRNAs y TFs identificados podrían regular la expresión de mRNA asociados a procesos de fosforilación (GO:0006468), actividad de proteína quinasa (GO:0004672), transducción de señales intracelulares (GO:0006468), el complejo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GO:0006405) y la composición de la membrana plasmática (GO:0005886), que son funciones biológicas fundamentales necesarias para superar el estrés hipersalino y que fueron reconocidas como tales en los basidiomicetos halófilos *W. ichthyophaga* y en la levadura negra extremadamente tolerante *H. werneckii* (Zajc *et al.*, 2013; Plemenitaš *et al.*, 2014; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Algunos lncRNAs (es decir, lncRNA-2 y lncRNA-3) parecen tener un papel regulador sobre los mRNAs agrupados solo en el clúster 2 (Fig. 10D), que codifican proteínas implicadas en procesos de fosforilación y en la actividad de las proteínas quinasas. Otros lncRNAs (i.e. lncRNA-6 y lncRNA-7) parecen tener un papel antagonista durante la transcripción de los mismos grupos de mRNAs. Esta observación fue confirmada por un análisis de correspondencia canónica (Fig. 10E) que mostró que GO:0006116 (proceso metabólico de los carbohidratos), GO:0006606

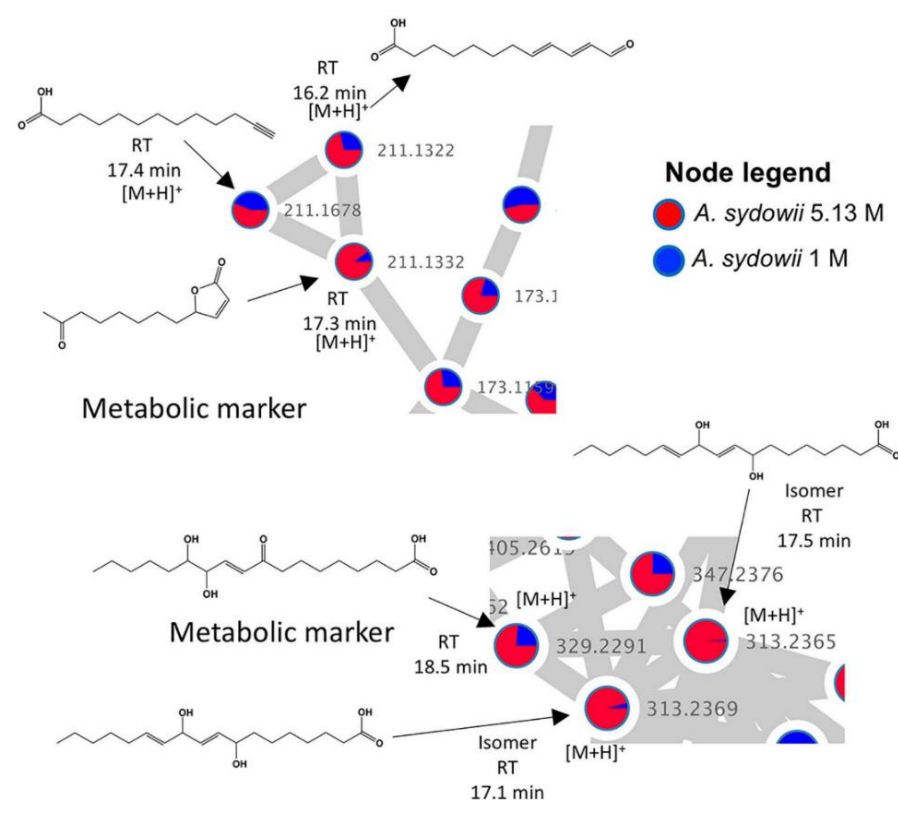
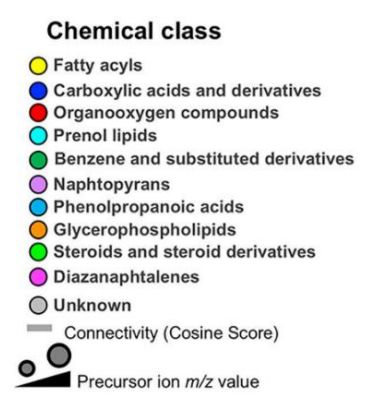
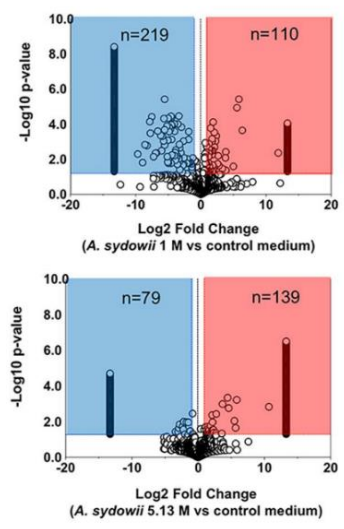
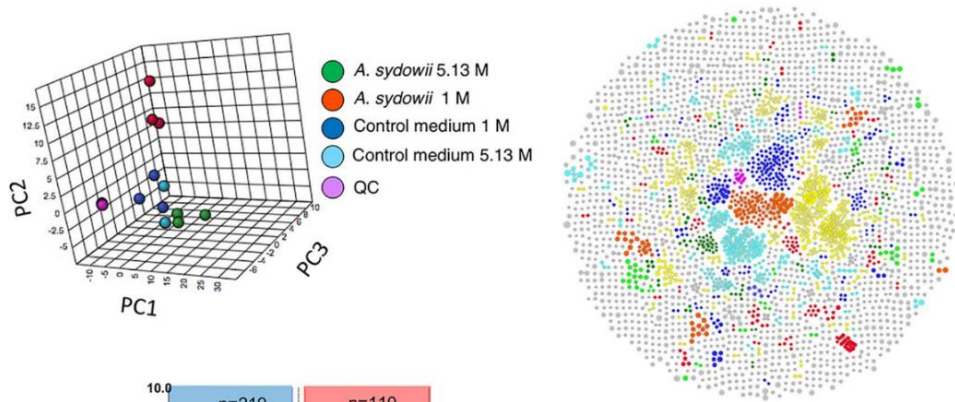
(importación de proteínas al núcleo), GO:0004802 (actividad amilo- $\alpha$ -1,6-glucosidasa), y GO:0019662 (actividad 4- $\alpha$ -glucanotransferasa) tienen una asociación inversa a la expresión de algunos de los lncRNAs y RNAs que codifican TFs encontrados en este análisis.

Finalmente, realizamos un análisis de similitud semántica (Yu *et al.*, 2010) para producir una red basada en términos GO para visualizar el perfil de correlación entre los términos GO asociados a los mRNAs correlacionados con los lncRNAs y los TFs (Fig. 10F). La red destaca el papel de ambos elementos reguladores en los perfiles transcripcionales de los genes implicados en respuestas biológicas relevantes relacionadas con el estrés osmótico, como el metabolismo de los carbohidratos, en particular la biosíntesis del glucógeno y la actividad de la transketolasa, la fosforilación de proteínas, el complejo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la actividad de las proteínas quinasas.

Este estudio, que representa el primer intento de aclarar el papel de los lncRNAs en respuesta al estrés por NaCl en hongos halófilos, abrió una nueva perspectiva para dilucidar las funciones biológicas de los lncRNAs en la regulación de la expresión génica, como lo ejemplifica un gran número de lncRNAs que fueron regulados positivamente en la concentración saturada de NaCl.

#### 6.8. Cambios en el perfil metabolómico en solución saturada de NaCl

Aunque se han estudiado las adaptaciones moleculares en algunos hongos halófilos y halotolerantes, hasta ahora no se habían realizado estudios metabolómicos de alto rendimiento para mostrar la posible reprogramación metabólica a altas concentraciones de NaCl. Este estudio es el primer intento de obtener una imagen metabolómica completa en un hongo halófilo. Los efectos de la salinidad en el crecimiento de *A. sydowii* a nivel del metaboloma se evaluaron mediante análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 11A). *A. sydowii* crecido a una concentración óptima y saturada de NaCl se agruparon por separado, indicando potencialmente diferencias en el consumo de nutrientes del medio y la producción de metabolitos secundarios. La estrecha agrupación de las muestras de control de calidad en el gráfico 3D (Fig. 11A) aseguró la fiabilidad y estabilidad del método,



**Figure 11.** Análisis metabolómico y quimiinformáticos no dirigidos de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 cultivado en condiciones optimas (1M) y estresantes de NaCl(5.13M). A) Análisis de componentes principales (PCA) en 3D mostrando los componentes 1 y 2 de las características (normalizadas en abundancia) detectadas en concentraciones de 1 M y 5.13 M de NaCl, incluyendo los controles de medios apropiados. Se realizaron muestras de control de calidad (QC) para asegurar la fiabilidad y estabilidad del método. B) Clases moleculares (recuperadas por Classyfire) del metaboloma identificadas por el flujo de trabajo MolNetEnhancer. Cada nodo representa una característica única, y el color del nodo denota la clase química asociada. El grosor del borde (conectividad) indica la similitud MS2 (puntuación de coseno) entre las características. El valor m/z de la característica se muestra dentro del nodo y es proporcional al tamaño del nodo. C) Diagrama de volcán que muestra los rasgos cuantificados entre el sobrenadante del medio NaCl 1M con y sin *A. sydowii*. D) Diagrama de volcán que muestra los rasgos cuantificados entre el sobrenadante de medio NaCl 5.13 M con y sin *A. sydowii*. Cada punto representa un rasgo con carga y grupo isotópico asignados, de lo contrario se excluyó del análisis. Subredes moleculares 1 (E) y 2 (F) de los metabolitos que contribuyen a la separación entre muestras impulsada por el análisis de los gráficos de carga del PCVG. Cada nodo representa un ion precursor (MS1), y el borde entre los nodos indica la similitud en los patrones de fragmentación MS2 utilizando una puntuación coseno de al menos 0,6. La abundancia de los metabolitos se denota por el área coloreada del nodo y la masa del ion precursor se muestra junto al nodo.

sugiriendo a su vez que las diferencias en el perfil metabólico indicadas por el PCA son de origen biológico y no se deben a la variabilidad técnica. Nuestra línea metodológica nos permitió detectar e identificar varias clases químicas de metabolitos en los sobrenadantes de *A. sydowii* cultivados en ambas condiciones salinas, que van desde los acilos grasos hasta los diazanaftalenos en el top ten (Fig. 11B). Para profundizar en los complejos datos e identificar las diferencias entre el metaboloma de *A. sydowii* cultivado en concentraciones óptimas y saturadas de NaCl, comparamos la abundancia de las características en ambas condiciones salinas utilizando sus respectivos medios de control (medios en blanco con 1 M o 5.13 M de NaCl y nutrientes) (Fig. 11C, D). Esto permitió la detección de cambios en el metabolismo (regulado positiva o negativamente) de los componentes del medio o de los nutrientes y la identificación de metabolitos secundarios vinculados específicamente al medio hipersalino. Se cuantificaron 1.137 y 1.090 características a 1 M y 5.13 M de NaCl, respectivamente.

Hubo más rasgos regulados negativamente en el sobrenadante de 1 M frente al de 5.13 M de NaCl, probablemente relacionado con la prosperidad de *A. sydowii* y la mejor metabolización de los nutrientes en el medio a la concentración óptima (1M) de NaCl (Fig.

11C, D). Para identificar o anotar los posibles metabolitos utilizados por el hongo como fuente de energía, utilizamos la plataforma GNPS y SIRIUS/CSI:FingerID (Dührkop *et al.*, 2015).

Observamos una disminución de varios ácidos grasos insaturados C18 sólo en los sobrenadantes obtenidos a 1 M de NaCl, pero no a la concentración saturada de NaCl (Tabla 2). Asimismo, la mayor abundancia de ácidos grasos insaturados C18 que se observó en *A. pullulans*, *D. salina*, *H. werneckii* y *P. triangularis*, cuando crecieron en condiciones hipersalinas (Turk *et al.*, 2004; Katz *et al.*, 2007), puede atribuirse a una menor degradación de dichos compuestos. Por el contrario, dos metabolitos aromáticos (es decir, el éster del ácido benzoico y el derivado de la alanina que contiene fenilo) desaparecieron por completo de los medios con una concentración saturada de NaCl tras ser expuestos a *A. sydowii* (Tabla 2). Esto refleja un cambio metabólico del hongo hacia fuentes no lipídicas en condiciones de actividad hídrica extremadamente baja inducida por el NaCl. Un aumento en la producción de energía es una de las adaptaciones fundamentales que mantienen la homeostasis iónica y el equilibrio osmótico en un entorno hiperosmótico (Gostinčar *et al.*, 2011). Se da prioridad a los procesos que son esenciales para la supervivencia celular. Este cambio metabólico que mencionamos parece permitir al hongo asignar principalmente su energía metabólica para asegurar procesos con alta demanda de carbohidratos como la biosíntesis de la pared celular y los solutos compatibles (glicerol, manitol, arabitol, eritritol y trehalosa). En ambos casos, la glucosa es el compuesto de partida para estos procesos de síntesis. El engrosamiento de la pared celular por aumento del  $\beta$ -1,3-glucano y la síntesis de solutos compatibles son dos de las principales adaptaciones a la halofilia reportadas para los hongos, específicamente en el género *Aspergillus*: *A. niger* (Diano *et al.*, 2006), *A. nidulans* (Mansour, 2017), *A. oryzae* (Ruijter *et al.*, 2004), *A. sydowii* (Pérez-Llano *et al.*, 2020; Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021) y también reportadas en este trabajo. Este cambio a fuentes no lipídicas también puede estar relacionado con el mantenimiento de una adecuada fluidez de la membrana citoplasmática, un factor importante para el funcionamiento indispensable de las familias de transportadores que se activan en respuesta a los cambios osmóticos en los hongos halófilos y halotolerantes (Turk *et al.*, 2004). Para reducir aún más la complejidad del análisis metabólico y centrarnos en los metabolitos específicos relacionados con el

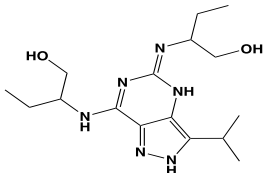
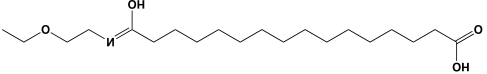
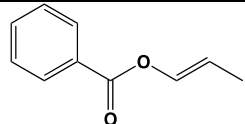
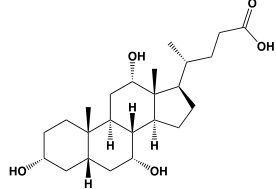
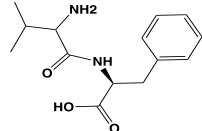
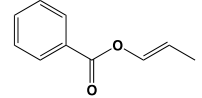
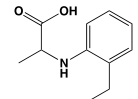
NaCl, extrajimos los datos utilizando los análisis PCA y agrupación de variables de componentes principales (PCVG) (Anexo 4) (Ivosev *et al.*, 2008). Una inspección cuidadosa de los patrones de agrupación reveló que los componentes 1 y 2 eran relevantes para la identificación de características reguladas negativamente en la concentración óptima y saturada de NaCl. Por el contrario, los componentes 3 y 4 permitieron la detección de rasgos que dominaban en *A. sydowii* cultivada en concentraciones óptimas o saturadas de NaCl (denominados en adelante como "marcadores metabólicos") (Fig. 11E, D y Tabla 3). Cabe destacar que se detectaron más metabolitos a la concentración saturada de NaCl, y tres de ellos fueron indicados como marcadores metabólicos para esta concentración de sal. Su presencia fue confirmada por los cromatogramas de iones extraídos y los gráficos de perfil (intensidad del pico a través de réplicas biológicas).

Utilizando las redes moleculares (similitud MS2 entre todos los metabolitos detectados) recuperadas por GNPS, pudimos propagar el reconocimiento de los marcadores metabólicos señalados. Sus estructuras químicas putativas, recuperadas por CSI: Finger ID, se muestran en la Tabla 3. Pudimos anotar sólo una pequeña fracción de las características que aparecieron a la concentración saturada de NaCl incluso con CSI: Finger ID, probablemente debido a las complejas y desconocidas estructuras de los metabolitos que aún no figuran en las bibliotecas o bases de datos. En la Fig. 11E observamos un grupo (subred 1) de metabolitos, estructuralmente relacionados con el marcador metabólico derivado del PCVG  $[M+H]^+$  211,1332 m/z. Las estructuras químicas predichas de estos grupos de metabolitos estaban relacionadas con un derivado de butenolida y dos ácidos grasos (Fig. 11E). Asimismo, observamos un grupo (subred 2) que contenía el marcador metabólico 329.2291  $[M+H]^+$  y dos ácidos grasos poliinsaturados hidroxilados C18 (isómeros) estructuralmente relacionados, según las predicciones de SIRIUS y CSI: FingerID (Fig. 11F). Los marcadores metabólicos encontrados en la concentración óptima de NaCl eran estructuralmente más diversos, por lo que no pudimos identificar subredes de metabolitos estructuralmente relacionados. Sin embargo, se observaron dos derivados de aminoácidos (N-acetil tiramina y dipéptido que contiene leucina) en este grupo (Tabla 3).

Tabla 2. Lista de metabolitos putativamente anotados con abundancia aumentada y reducida a 1 M y 5.13 M de NaCl.

Condicion (NaCl)	Clase química <sup>a</sup>	Nombre del compuesto	Tiempo de retención (s)	Masa experimental [adduct]	Masa exacta	Masa del error (ppm)	Fold change (5.13 M vs. 1.0 M) <sup>b</sup>	Estructura putativa <sup>c</sup>
	Acilos grasos	9-Oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid	20.3	295.2262 [M+H] <sup>+</sup>	295.2266	-1.3	0.02	
			18.5	295.2253 [M+H] <sup>+</sup>	295.2266	-4.4	0.03	
			16.4	295.2268 [M+H] <sup>+</sup>	295.2266	0.6	0.06	
		12(13)-Epoxy-9Z-octadecenoic acid	19.09	297.2423 [M+H] <sup>+</sup>	297.2423	0	0.03	
		12,13-Dihydroxy-9Z-octadecenoic acid	19.09	315.2531 [M+H] <sup>+</sup>	315.2529	0.6	0.03	
		13S-Hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid	16.4	277.216 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	277.2161	-0.3	0.09	
1.0 M	No clasificada	(Z)-N-(2-([1,1'-biphenyl]-2-yloxy)ethyl)-4-phenyltetrahydro-2H-pyran-4-carbimidic acid	22.01	402.2013 [M+H] <sup>+</sup>	402.2062	-12.1	0.2	
	Eteroides y derivados de esteroides	5-alpha-androsterone	16.6	273.2207 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	273.2219	4.3	1.7	
		17-hydroxy-10,13-dimethyl-2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-1-one	17.1	289.2153 [M+H] <sup>+</sup>	289.2168	-5.1	2.2	
	Lípidos prenoles	1-Phenanthrenecarboxylic acid, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-9-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, (1S,9R)-	19.8	299.2005 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	299.2004	-2.3	4.8	
	Fenoles	N-Acetyl Tyramine	10.8	180.1012 [M+H] <sup>+</sup>	180.1018	-3.3	5.1	
	Glicerolipidos	Monolaurin	20.5	257.2082 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	257.2118	-13.9	5.9	



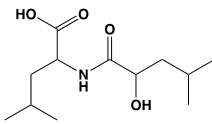
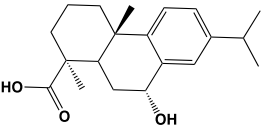
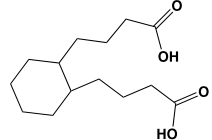
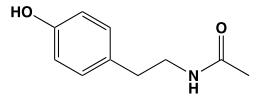
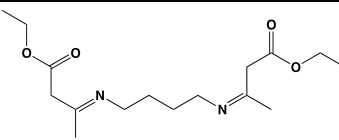
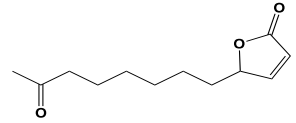
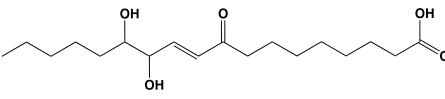
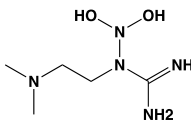
Condición (NaCl)	Clase química <sup>a</sup>	Nombre del compuesto	Tiempo de retención (s)	Masa experimental [adduct]	Masa exacta	Masa del error (ppm)	Fold change (5.13 M vs. 1.0 M) <sup>b</sup>	Estructura putativa <sup>c</sup>
	No clasificada	( <i>E</i> )-2-((7-((1-hydroxybutan-2-yl)amino)-3-isopropyl-2,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyrazolo[4,3- <i>d</i> ]pyrimidin-5-ylidene)amino)butan-1-ol	19.1	337.2348 [M+H] <sup>+</sup>	337.2345	0.8	<1000	
1.0 M	No clasificada	( <i>Z</i> )-16-((2-ethoxyethyl)imino)-16-hydroxyhexadecanoic acid	20.3	358.2944 [M+H] <sup>+</sup>	358.2951	-1.9	<1000	
	Benceno y derivados sustituidos	( <i>E</i> )-prop-1-en-1-yl benzoate	21.9	163.0745 [M+H] <sup>+</sup>	163.0752	-4.2	<1000	
	Esteroides y derivados sustituidos	Cholic acid	16.1	391.2816 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	391.2849	-8.4	2.8	
5.13 M	Ácidos carboxílicos y derivados	Val-Phe	10.8	265.1524 [M+H] <sup>+</sup>	265.1552	-10.5	3.1	
	Benceno y derivados sustituidos	( <i>E</i> )-prop-1-en-1-yl benzoate	22.03	163.0746 [M+H] <sup>+</sup>	163.0752	-3.6	<1000	
	No clasificado	(2-ethylphenyl)alanine	19.1	194.1161 [M+H] <sup>+</sup>	194.1174	-6.6	<1000	

<sup>a</sup> Clasificación por Classyfire según la estructura predicha por SIRIUS4.4 (cuando está disponible) o coincidencia espectral con las bibliotecas GNPS

<sup>b</sup> Fold change con respecto a su respectivo medio de control; 1M/control o 5.13M/control

<sup>c</sup> Estructura predicha por SIRIUS4.4 (cuando está disponible) o coincidencia espectral con las bibliotecas espectrales públicas de GNPS

Tabla 3. Lista de metabolitos anotados por la agrupación de variables de componentes principales (PCVG) como marcadores metabólicos a 1 M y 5.13 M de NaCl.

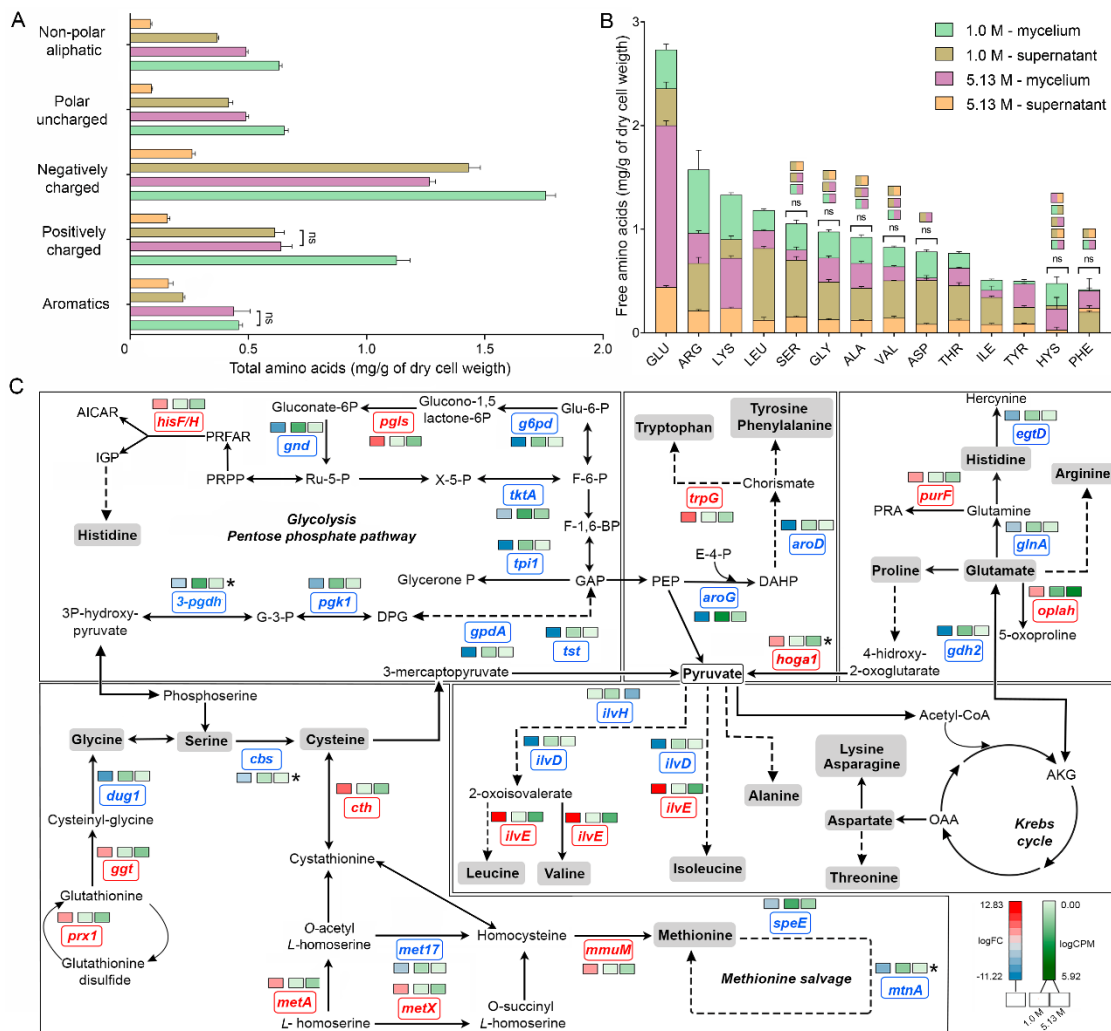
Condición (NaCl)	Clase química <sup>a</sup>	Nombre del compuesto	Tiempo de retención (s)	Masa experimental [adduct]	Masa exacta	Masa del error (ppm)	Fold change (5.13 M vs. 1.0 M) <sup>b</sup>	Estructura putativa <sup>c</sup>
1.0 M	No clasificados	(2-hydroxy-4-methylpentanoyl)leucine	15.7	246.1692 [M+H] <sup>+</sup>	246.1699	-2.8	1.6	
	Lípidos prenoles	17-hydroxy-10,13-dimethyl-1-Phenanthrenecarboxylic acid, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-9-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, (1S,9R)-	19.8	299.2005 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	299.2004	0.3	3.4	
	Ácidos carboxílicos y derivados	4,4'-(cyclohexane-1,2-diyl)dibutyric acid	15.1	257.1740 [M+H] <sup>+</sup>	257.1746	-2.3	3.6	
	Fenoles	N-Acetyl Tyramine	10.8	180.1012 [M+H] <sup>+</sup>	180.1018	-3.3	4.9	
	No clasificados	diethyl 3,3'-(butane-1,4-diylbis(azanelylidene))(3Z,3'E)-dibutyrate	19.2	313.2175 [M+H] <sup>+</sup>	313.2121	17.2	>1000	
5.13 M	Dihydrofurans	2-(4-oxo-5-pentylcyclopent-2-en-1-yl) acetic acid	17.3	211.1332 [M+H] <sup>+</sup>	211.1327	2.3	13.4	
	Acilos grasos	(E)-12,13-dihydroxy-9-oxooctadec-10-enoic acid <sup>b</sup>	18.5	329.2291 [M+H] <sup>+</sup>	329.2321	-9.1	14.3	
	No clasificados	1-(2-(dimethylamino)ethyl)-2,2-dihydroxyhydrazine-1-carboximidamide	9.6	178.1316 [M+H] <sup>+</sup>	178.1297	10.6	>1000	

6.9. La reprogramación del metabolismo de los aminoácidos se produjo con una concentración saturada de NaCl.

En general, los perfiles de aminoácidos difieren significativamente (Kruskal-Wallis, valor  $p < 0,05$ ) en condiciones óptimas e hipersalinas. En la concentración óptima de NaCl el sobrenadante mostró mayores cantidades de aminoácidos libres (Fig. 12A, B) en comparación con las cantidades en saturación de NaCl, lo que indica una menor síntesis y secreción de proteínas extracelulares. Mientras que el nivel global de aminoácidos aromáticos fue similar en los micelios cultivados tanto en la salinidad óptima como en la saturada, las cantidades de aminoácidos cargados y no cargados y de aminoácidos alifáticos no polares disminuyeron significativamente (Kruskal-Wallis, valor  $p < 0,05$ ) en los micelios expuestos a la concentración saturada de NaCl (Fig. 12A).

Los análisis de la composición de aminoácidos libres individuales en las células de *A. sydowii* revelaron mayores cantidades de glutamato tanto en condiciones óptimas como saturadas de NaCl, tanto en el micelio como en el sobrenadante (Fig. 12B). El aumento de los niveles de aminoácidos con carga negativa (es decir, ácido glutámico y ácido aspártico) ha sido reconocido como una adaptación importante de las proteínas sintetizadas por los microorganismos halófilos, incluyendo (Abu-Seidah, 2007) (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018)(Tafer *et al.*, 2019)(Lee *et al.*, 2021). El glutamato, la arginina y la lisina fueron los más abundantes, de forma similar a como ocurre en la levadura halotolerante *H. burtonii* expuesta a 1 M de NaCl (Lee *et al.*, 2021). Los niveles de serina, glicina, alanina, valina, histidina y fenilalanina no cambiaron en los micelios cultivados tanto en condiciones de salinidad óptima como de NaCl saturado (Fig 9B), así como en los respectivos sobrenadantes. No se detectaron los aminoácidos cisteína, metionina y prolina. Globalmente, los aminoácidos libres se enriquecieron 3,5 veces en los sobrenadantes obtenidos de los cultivos en salinidad óptima en comparación con los sobrenadantes de los cultivos en concentración saturada de NaCl (Fig. 12B).

El análisis transcripcional del mRNA del metabolismo de los aminoácidos reveló 33 genes expresados diferencialmente, incluyendo 20 genes regulados negativamente y 13 genes sobreexpresados en condiciones de NaCl saturado en comparación con la concentración óptima de 1 M de NaCl (Fig. 12C y Anexo 1). Aunque los genes relacionados con la síntesis de histidina (*hisF/H*, logFC = 3,98), triptófano (*trpG*, logFC = 5,63), glicina (*prx1*, logFC = 4,73; *ggt*, logFC = 4,27), cisteína (*cth*, logFC = 7,20; *metA*, logFC = 3,69), metionina (*metX*,



**Figura 12.** Perfil cuantitativo de aminoácidos y expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos en *Aspergillus sydowii* expuesto a 5.13 M de NaCl en comparación con 1 M de NaCl. (A) Gráfico de barras que muestra los aminoácidos totales (mg/g de peso celular seco) tanto en los micelios como en los sobrenadantes obtenidos de *A. sydowii* cultivados a 1 M y 5.13 M de NaCl. Los aminoácidos están agrupados por sus características de cadena lateral. (B) Gráfico de barras que muestra los aminoácidos libres (mg/g de peso celular seco) en ambos micelios y sobrenadantes obtenidos a ambas concentraciones de NaCl: 1 M y 5.13 M de NaCl. Las diferencias estadísticas no significativas (ns) sólo se muestran en (A) y (B). El resto de las comparaciones mostraron diferencias estadísticas. (C) Mapa metabólico que muestra los genes expresados diferencialmente (condición de 5.13 M de NaCl en comparación con 1 M de NaCl) implicados en las vías de biosíntesis de aminoácidos. Las cajas/letras rojas y azules indican los genes regulados positivamente ( $\log_{2}FC > 2$ ) y negativamente ( $\log_{2}FC < -2$ ), respectivamente. Los asteriscos indican que se identificaron dos o más isoformas de transcripción para ese gen. Los tres cuadrados sobre cada caja de genes ilustran los valores de  $\log_{2}FC$  y los recuentos por millón (CPM) de los transcritos en cada concentración de sal. Las líneas discontinuas y continuas se refieren a las reacciones intermedias y directas, respectivamente. Abreviaturas: AICAR: 5'-Fosfo-ribosil-5-amino-4-imidazol carboxamida; IGP: Imidazol glicerol-3P; PRFAR: Fosforibulosil-formiminio-AICAR-P; PRPP: 5-fosforibosil difosfato; Ru-5-P: Ribosa-5-fosfato, X-5-P: Xilulosa-5-fosfato, Glu-6-P: Glucosa-6-fosfato; F-6-P: Fructosa-6-fosfato; F-1,6-BP: Fructosa-1,6-bifosfato; GAP: Gliceraldehído-3-fosfato; PEP: Fosfoenolpiruvato; E-4-P: Eritrosa-4-fosfato; DAHP: 2-dehidro-3-deoxi-arabino-heptonato-7-fosfato; PRA: 5-fosforibosilamina; OAA: oxaloacetato; AKG:  $\alpha$ -cetoglutarato.

logFC = 3,69; *mmuM*, logFC = 4. 75), y leucina, valina e isoleucina (*ilvE*, logFC = 12,83) fueron regulados positivamente en la concentración saturada de NaCl (Fig. 12C), la cantidad de aminoácidos libres no aumentó, indicando que los niveles de transcripción no siempre se correlacionan con los mismos niveles de aminoácidos. Esto también se demostró en la levadura halotolerante *H. burtonii*, que sobreexpresó genes involucrados en el anabolismo de aminoácidos sin una correlación positiva con los niveles de aminoácidos libres (Lee *et al.*, 2021).

El gen *hogal* que codifica la enzima 4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa se sobreexpresó (logFC = 7,53) en condiciones de saturación de NaCl (Fig. 12C). Esta aldolasa cataliza la conversión de 4-hidroxi-2-oxoglutarato en piruvato aumentando la disponibilidad de piruvato e impulsando el flujo metabólico a través del ciclo de Krebs y probablemente a la biosíntesis de aminoácidos (Huang *et al.*, 2019). El piruvato, un metabolito clave del metabolismo del carbono intermedio, es un punto de ramificación metabólica crucial para la biosíntesis de leucina, valina, isoleucina y alanina (Fig. 12C). Los niveles de piruvato también regulan el flujo del ciclo de Krebs, en particular la síntesis de  $\alpha$ -cetoglutarato y ácido oxalacético, intermediarios clave implicados en la formación de glutamato y aspartato, respectivamente (Huang *et al.*, 2019). Al mismo tiempo, el aspartato es un nodo de ramificación para la biosíntesis de lisina, asparagina y treonina (Lunt *et al.*, 2015; Walvekar and Laxman, 2019) (Fig. 12C). Así, el contenido de piruvato no sólo tiene importantes implicaciones en el balance energético celular, sino que pequeñas limitaciones en la disponibilidad de piruvato también podrían alterar la biosíntesis de aminoácidos (Lunt *et al.*, 2015). El aumento observado en el nivel de transcritos de *hogal* sugiere que el piruvato en *A. sydowii* cultivado a concentraciones saturadas de NaCl podría representar un nodo de redirección anabólica hacia el metabolismo energético primario (biosíntesis de ATP) y la biosíntesis de aminoácidos. El análisis transcriptómico reveló un conjunto de genes regulados positivamente implicados en las vías de biosíntesis de metionina y cisteína (Fig. 12C). El gen *mmuM* que codifica la homocisteína S-metiltransferasa implicada en la formación de metionina se activó transcripcionalmente (logFC = 4,75) a la concentración saturada de NaCl (Fig. 12C). La metionina es un aminoácido que contiene azufre y que regula la iniciación de la traducción, activa las vías anabólicas en los hongos y media en varias reacciones metiltransferenciales (Walvekar and Laxman, 2019). El gen *cth* que codifica la cistationina  $\gamma$ -liasa, la enzima que cataliza el último paso en la vía de trans sulfuración de la cistationina a la cisteína, también fue regulado positivamente (logFC = 7,20) (Fig. 12C).

Las enzimas CTH tienen una amplia especificidad de sustrato y transforman los derivados de la cistationina en cisteína (Jurkowska *et al.*, 2014a). Los residuos de cisteína desempeñan un papel crucial en la estabilización de la estructura tridimensional de las proteínas mediante puentes disulfuro, lo que es importante para preservar las funciones de las proteínas en condiciones de desnaturalización impuestas por altas concentraciones de NaCl. Además, la cisteína tiene papeles clave en la homeostasis del equilibrio redox, la biosíntesis de la coenzima A, la biogénesis del clúster de hierro y azufre (Fe-S), los procesos de desintoxicación y el tráfico de proteínas (Fani *et al.*, 2007; Jurkowska *et al.*, 2014). Otros genes como *metX* y *metA*, que codifican la homoserina acetiltransferasa (MetX) y la homoserina succiniltransferasa (MetA), respectivamente, también se sobreexpresaron en condiciones de NaCl saturado ( $\log_{2}FC = 3,69$  y  $\log_{2}FC = 3,67$ , respectivamente) (Fig. 12C). Estas homoserina transferasas producen O-acetil-L-homoserina y O-succinil-L-homoserina respectivamente, dos intermediarios anabólicos que mantienen el flujo metabólico para sintetizar cisteína y metionina, respectivamente (Shrivastava *et al.*, 2021). En *A. sydowii* la L-homoserina parece ser un sustrato metabólico crítico, conectado a las vías de biosíntesis de cisteína y metionina. Como el gen *met17* que codifica la O-acetilhomoserina sulfhidrila fue regulado negativamente ( $\log_{2}FC = -3.84$ ) (Fig. 12C), la síntesis de metionina podría ocurrir probablemente vía O-succinil-L-homoserina. En resumen, los datos transcriptómicos sugieren que la reacción de sulfhidrilación directa no es la vía principal para producir homocisteína, un precursor directo de la biosíntesis de metionina.

El gen *hisF/H*, implicado en la vía de biosíntesis de la histidina, también fue regulado positivamente ( $\log_{2}FC = 3,98$ ) (Fig. 12C). La imidazol glicerol fosfato (IGP) sintasa, producto del *hisF/H*, cataliza la conversión de N'-(5'-fosforibosil)-formimino-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (PRFAR) en IGP y 5'-(5-aminoimidazol-4-carboxamida) ribonucleótido (AICAR), conectado tanto a la síntesis de histidina como al metabolismo del nitrógeno y a la vía de biosíntesis *de novo* de las purinas. El gen *hisF/H* media la reacción metabólica central de la vía de biosíntesis de la histidina debido a la síntesis del anillo de imidazol del precursor de la histidina (IGP) (Fani *et al.*, 2007). En este contexto, el gen *egtD* fue regulado negativamente ( $\log_{2}FC = -4,72$ ), ya que su producto, la L-histidina tri-metiltransferasa, cataliza el consumo de histidina para formar hercinina, lo que probablemente resulte en una disminución de los niveles de histidina disponibles. La activación transcripcional del metabolismo biosintético de la histidina a una actividad hídrica extremadamente baja debido a concentraciones saturadas de NaCl podría estar

relacionada con el papel de la histidina en los sensores de estrés de membrana histidina quinasa (Marin *et al.*, 2003), uno de los términos GO de función molecular enriquecidos a una concentración saturada de NaCl. Dado que varias histidina quinasa responden tanto al estrés osmótico como al estrés por frío (Mikami *et al.*, 2002), también se ha observado la regulación positiva de la vía de biosíntesis de la histidina en *R. frigidialcoholis* y *Mrakia blollopsis* durante el crecimiento a temperaturas cero y subcero, respectivamente (Tsuji, 2016; Touchette *et al.*, 2021). Los niveles de histidina también aumentaron en la levadura halotolerante *H. burtonii* en condiciones de estrés osmótico, aunque no se observó una respuesta transcriptómica diferencial (Lee *et al.*, 2021). Además, mostró un perfil transcriptómico sobreexpresado relacionado con la síntesis de leucina y metionina (Lee *et al.*, 2021), como se muestra en *A. sydowii* expuesta a concentraciones saturadas de NaCl (Fig. 12C). Este estudio demuestra que la privación extrema de agua por concentraciones saturadas de NaCl impone una reprogramación transcripcional considerable, lo que resulta en vías de biosíntesis de aminoácidos alteradas.

**Tabla 4.** Expresión transcriptómica de genes relacionados con el metabolismo de los aminoácidos en *A. sydowii* en condiciones de saturación por NaCl.

AA ID	Transcrito ID	Anotación	Genes ID	LogFC	p-value	FDR
GLU	TRINITY_DN713_c0_g1_i4	NAD-specific glutamate dehydrogenase	<i>gdh</i>	-7.42	1.88E-08	1,21E-06
GLU	TRINITY_DN3378_c0_g1_i4	Glutamate 5-kinase	<i>brsk2</i>	-8.44	1.11E-06	3,48E-05
GLU	TRINITY_DN745_c2_g1_i33	Imidazole glycerol phosphate synthase	<i>hisF7</i>	3.98	3.72E-04	5,23E-03
LYS	TRINITY_DN725_c4_g1_i2	Histone-lysine N-methyltransferase	<i>ehmt2</i>	-9.76	1.65E-08	1,11E-06
LEU	TRINITY_DN662_c0_g1_i3	leucine aminopeptidase 1	<i>lap1</i>	-4.40	7.14E-05	1,35E-03
LEU	TRINITY_DN754_c1_g2_i11			-3.89	3.84E-04	5,37E-03
LEU	TRINITY_DN754_c1_g2_i4			-6.34	1.53E-06	4,61E-05
LEU	TRINITY_DN754_c1_g1_i2	leucine rich repeat protein	<i>oda7</i>	-4.31	9.16E-05	1,64E-03
LEU	TRINITY_DN5196_c0_g1_i1			-4.05	2.07E-04	3,25E-03
SER	TRINITY_DN1440_c0_g1_i5	serine/threonine-protein kinase	<i>chk2</i>	-3.71	7.34E-04	8,97E-03
SER	TRINITY_DN560_c0_g1_i5			-5.70	2.01E-06	5,87E-05
SER	TRINITY_DN560_c0_g1_i1	phosphatidylserine decarboxylase	<i>psd</i>	-4.58	1.89E-04	3,01E-03
SER	TRINITY_DN560_c0_g1_i2			-4.74	2.38E-05	5,37E-04
SER	TRINITY_DN560_c0_g1_i3			-4.39	7.64E-05	1,42E-03
SER	TRINITY_DN2996_c0_g1_i1	homoserine acetyltransferase family protein	<i>metxa</i>	3.69	7.27E-04	8,91E-03
SER	TRINITY_DN1579_c0_g1_i5			-8.96	2.17E-07	8,52E-06
SER	TRINITY_DN2907_c0_g1_i1	Phosphatidylserine decarboxylase-domain-containing protein	<i>bdq12draft_722422</i>	-4.70	2.90E-05	6,35E-04
SER	TRINITY_DN774_c0_g1_i6	CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase	<i>pps</i>	-4.11	3.62E-04	5,12E-03
SER	TRINITY_DN3142_c0_g1_i1	serine/threonine-protein kinase KIN4	<i>kin4</i>	-5.31	4.64E-06	1,25E-04
SER	TRINITY_DN1195_c1_g1_i2	serine/threonine protein kinase	<i>brsk2</i>	-9.68	2.14E-08	1,30E-06
SER	TRINITY_DN5066_c0_g1_i1	serine/threonine-protein kinase tell	<i>tell</i>	-3.74	5.70E-04	7,39E-03
SER	TRINITY_DN2194_c0_g1_i1	mitochondrial serine protease	<i>pim1</i>	-3.61	7.87E-04	9,47E-03
SER	TRINITY_DN2173_c2_g1_i2	PITSLRE serine/threonine-protein kinase CDC2L1, putative	<i>afla_069750</i>	-3.77	6.06E-04	7,74E-03
ASP	TRINITY_DN1367_c1_g1_i7	asparaginase II	<i>asp 3-1</i>	4.13	1.61E-04	2,65E-03
ASP	TRINITY_DN5437_c0_g1_i1	aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	<i>dps1</i>	-5.97	5.01E-07	1,76E-05
ASP	TRINITY_DN1780_c0_g1_i6	aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	<i>tyrb_2</i>	4.95	1.82E-05	4,24E-04



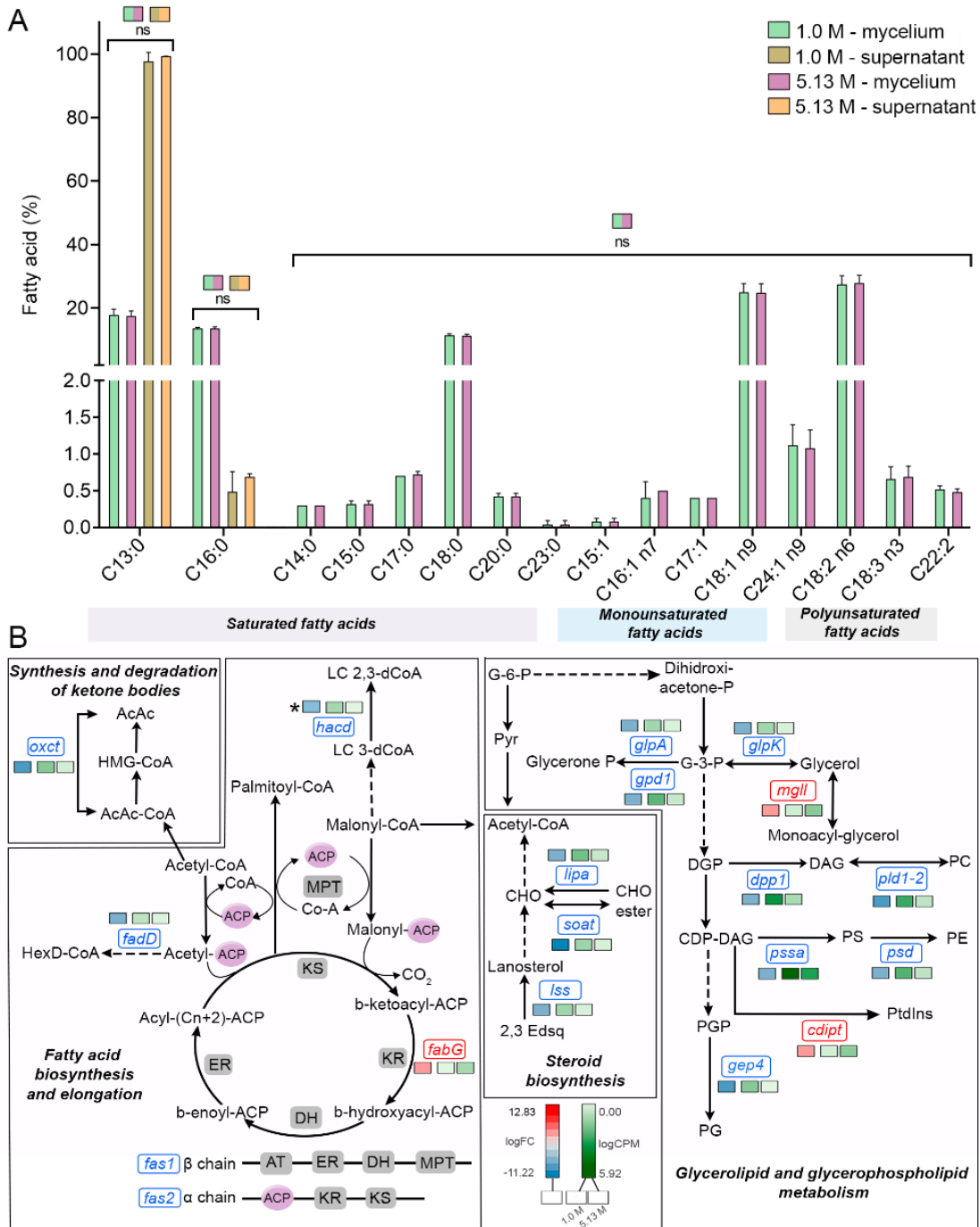
6.10 El metabolismo de los ácidos grasos a una concentración saturada de NaCl se mantuvo principalmente sin cambios.

Las condiciones hipersalinas provocan en los hongos halófilos el recambio de la síntesis de ácidos grasos únicos, el aumento de la concentración de ácidos grasos libres desencadena modificaciones en la elongación de la cadena de ácidos grasos y aumenta la insaturación general (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Todas estas modificaciones influyen en la composición y/o fluidez de la membrana plasmática, como se ha informado en varios microorganismos halófilos/halotolerantes, como el alga *Dunaliella salina* (Katz *et al.*, 2007), el protista *Halocafeteria seosinensis* (Harding *et al.*, 2017) y los hongos *A. pullulans*, *H. werneckii* y *W. ichthyophaga* (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

Sorprendentemente en *A. sydowii* no se produjeron modificaciones en la composición de ácidos grasos ni en concentraciones óptimas ni en concentraciones saturadas de NaCl (Fig. 13A). El ácido tridecanoico (C13:0) y el ácido palmítico (C16:0) se detectaron tanto en los sobrenadantes como en los micelios de *A. sydowii* cultivados tanto a concentraciones óptimas de NaCl como a concentraciones saturadas de NaCl, mientras que los otros ácidos grasos se encontraron solo en los micelios (Fig. 3A). El ácido oleico (C18:0) y sus derivados insaturados, el ácido *cis*-9-octadecenoico (C18:1 n9), el ácido linoleico (C18:2 n6) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n3) representaron en promedio el 65% de la composición global de ácidos grasos, lo que refleja el importante papel fisiológico del ácido oleico en el apoyo al crecimiento del hongo en condiciones hipersalinas. En general, los ácidos grasos C18 monoinsaturados y poliinsaturados representaron tanto en las concentraciones óptimas como en las saturadas de NaCl el 55% de la composición total de ácidos grasos C18, siendo el C18:1 n9 y el C18:2 n6 los más prevalentes (Fig. 13A). Estos resultados coinciden con los obtenidos para el alga *D. salina* (Katz *et al.*, 2007), los hongos negros tipo levadura *A. pullulans*, *H. werneckii* y *Phaeotheca triangularis*, con una mayor proporción de ácidos grasos C18 mayormente insaturados en condiciones hipersalinas (Turk *et al.*, 2004). Aunque las concentraciones de 10-17% de NaCl indujeron un aumento de la insaturación de los ácidos grasos en *A. pullulans* y *H. werneckii*, las concentraciones más altas (25% de NaCl) no aumentaron el nivel de insaturación en la extremadamente halotolerante *H. werneckii*, de

acuerdo con el perfil de insaturación de los ácidos grasos en *A. sydowii* en saturación de NaCl (Turk *et al.*, 2004).

Los datos transcriptómicos en *A. sydowii* cultivado a una concentración saturada de NaCl revelaron que la biosíntesis y elongación de ácidos grasos, la síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, la biosíntesis de esteroides y el metabolismo de glicerolípidos y glicerofosfolípidos se desactivaron transcripcionalmente (Fig. 13B y Anexo 2).



**Figura 13.** Perfil cuantitativo de los ácidos grasos y expresión diferencial de los genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos en *Aspergillus sydowii* expuesto a 5.13 M de NaCl en comparación con 1 M de NaCl. (A) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de ácidos grasos saturados (C13:0 - C23:0), monoinsaturados (C15:1 - C24:1 n9) y poliinsaturados (C18:2 n6 - C22:2) tanto en los micelios como en los sobrenadantes recogidos de los cultivos fúngicos a 1 M y 5.13 M de NaCl. Sólo se muestran las diferencias estadísticas no significativas (ns). El resto de las comparaciones mostraron diferencias estadísticas. (B) Mapa metabólico que muestra los genes expresados diferencialmente en las vías de biosíntesis de ácidos grasos en *A. sydowii* cultivado a 5.13 M de NaCl en comparación con 1 M de NaCl. Las cajas/letras rojas y azules indican los genes regulados positivamente ( $\log_{2}FC > 2$ ) y negativamente ( $\log_{2}FC < -2$ ), respectivamente. Los asteriscos indican que se identificaron dos o más isoformas de transcripción para ese gen. Los tres cuadrados sobre cada caja de genes ilustran los valores de  $\log_{2}FC$  y los recuentos por millón (CPM) de los transcritos en cada concentración de sal. Las líneas discontinuas y continuas se refieren a las reacciones intermedias y directas, respectivamente. Abreviaturas: AcAc: Acetoacetyl-CoA; HMG-CoA: S-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; HexD-CoA: Hexadecanoil-CoA; LC 2,3-dCoA: Trans-2,3-dehidroacil-CoA de cadena larga; LC 3-dCoA: Cadena larga-3-hidroxiacil-CoA; G-6-P: Glucosa-6-fosfato; Pyr: Piruvato; CHO: Colesterol; 2,3-Edsq: S-Cualeno; G-3-P: Glicerol-3-fosfato; DGP: 1,2-diacilglicerol-3P; DAG: 1,2-diacilglicerol; CDP-DAG: CDP-diacilglicerol; PGP: Fosfatidilglicerofosfato; PG: Fosfatidilglicerol; PC: Fosfatidilcolina; PE: Fosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PtdIns: Fosfatidil-ID-mio-inositol; ACP: proteína transportadora de acilo; ER:  $\beta$ -enoil reductasa; DH: deshidratasa; KR:  $\beta$ -cetoacil reductasa; KS:  $\beta$ -cetoacil sintasa; MPT: Malonil/palmito il transferasa.

Sólo los genes de la proteína transportadora de 3-cetoacil-acil (3-cetoacil-ACP) reductasa (*fabG*), monoacyl glycerol lipasa (*mgll*) y fosfatidilinositol sintasa (*cdipt*) fueron regulados positivamente ( $\log_{2}FC = 4,26$ ,  $\log_{2}FC = 3,88$ , y  $\log_{2}FC = 4,04$ , respectivamente) (Fig. 13B). El producto del gen *fabG* que cataliza una reducción dependiente de NADPH de 3-cetoacil-ACP a los sustratos (R)-3-hidroxiacil-CoA es esencial para la biosíntesis de ácidos grasos tipo II (Nomura *et al.*, 2020). Probablemente en *A. sydowii* expuesta a una alta concentración de NaCl la enzima FabG media la formación de sustratos (R)-3-hidroxiacil-CoA que podrían ser incorporados en el metabolismo secundario para producir polímeros relacionados con el estrés (Nomura *et al.*, 2020).

Recientemente, un aumento observado en el nivel de transcritos de *fabG* en el hongo filamentoso *Glarea lozoyensis* se ha relacionado con la síntesis de metabolitos secundarios como la neumocandina, el precursor del fármaco antifúngico caspofungina (Zhang *et al.*, 2020). El aumento de *fabG* en *A. sydowii* expuesta a una concentración saturada de NaCl podría estar relacionado con la síntesis de diferentes metabolitos secundarios o con la redirección de más acetyl-CoA a la biosíntesis de ácidos grasos, lo que resulta en la formación de lípidos, ya que el contenido de ácidos grasos libres no aumentó a una concentración saturada de NaCl.

Se encontró que el gen *mgll* estaba sobreexpresado en el transcriptoma. El producto del gen

*mgll* juega un papel clave en la conversión de monoacilglicerol en glicerol, el soluto compatible más frecuente y relevante para compensar el estrés hipersalino en los hongos halófilos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Las MGL son una clase única de lipasas con una función biológica muy bien entendida en mamíferos y bacterias (Rengachari *et al.*, 2013), pero no en hongos. Se sabe que las MGLs obtenidas de los hongos *Aspergillus oryzae*, *Candida rugosa*, *Mucor miehei*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium cyclopium*, *Stemphylium lycopersici*, y *Sordaria sp.* actúan sobre mono y diacilgliceroles, incluso sobre triacilgliceroles (Yamaguchi and Mase, 1991; Toida *et al.*, 1998; Benjamin and Pandey, 2001; Jermisuntiea *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2020). En *A. sydowii* el MGL podría estar involucrado en la conversión de un alto rango de acilgliceroles para mantener las altas cantidades intracelulares de glicerol necesarias a concentraciones saturadas de NaCl. La regulación negativamente de los genes *glpK* (logFC = -4,30) y *adh* (logFC = -3,86) podría apoyar esta noción (Fig. 3B). Finalmente, el tercer gen sobreexpresado (*cdipt*, logFC = 4,04) codifica la enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis *de novo* del fosfatidilinositol (PtdIns), implicado de forma importante en el metabolismo de los ácidos grasos, la transducción de señales intracelulares y el metabolismo energético en eucariontes (Blunson and Cockcroft, 2019), todos ellos procesos metabólicos clave en la baja actividad del agua inducida por concentraciones saturadas de NaCl.

Nuestros datos transcriptómicos son consistentes con los resultados obtenidos para el protista halófilo *H. seosinensis*, donde las cadenas de ácidos grasos más cortas aumentaron en condiciones hipersalinas (Harding *et al.*, 2017). La regulación transcripcional negativa de la elongación de ácidos grasos observada en *A. sydowii* a una concentración saturada de NaCl se observó también en la levadura negra extremadamente halotolerante *H. werneckii* y en la filamentosa *W. ichthyophaga* (Plemenitaš *et al.*, 2008 ; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). En el transcriptoma de *A. sydowii* los genes *hacd* (logFC = -5,67), *fadD* (logFC = -4,31) y *fas1/fas2* (logFC = -6,92/-4,47) que codifican la 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa, la acil-CoA sintasa asociada a la membrana interna y el complejo de ácidos grasos sintasa, respectivamente, fueron reprimidos a una concentración saturada de NaCl (Fig. 13B). Los genes *hacd* y *fadD* están involucrados en la elongación de ácidos grasos (Fujita *et al.*, 2007a, 2007b), mientras que los productos del gen *fas* catalizan toda la biosíntesis de ácidos grasos C16-C18 (Runguphan and Keasling, 2014).

## 7. Conclusiones

Basándonos en nuestros estudios previos (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020; Pérez-Llano *et al.*, 2020; Rodríguez-Pupo *et al.*, 2021), *A. sydowii* es reconocido como un organismo modelo para el estudio de las adaptaciones de los hongos filamentosos a las condiciones hipersalinas. *A. sydowii* crece de forma óptima a 1 M de NaCl y puede crecer en todo el rango que va desde cero hasta la saturación de NaCl (5.13 M). En este estudio se utilizó por primera vez un enfoque multiómico (transcriptómico y metabolómico) para estudiar las respuestas de *A. sydowii*, durante el crecimiento en condiciones extremas de saturación por NaCl (5.13 M). Además describimos y caracterizamos los cambios morfológicos, la síntesis de osmolitos, las respuestas bioquímicas y transcriptómicas desencadenadas por este hongo para superar el estrés oxidativo causado por la sal.

Nuestros resultados demostraron que la privación de agua inducida por concentraciones saturadas de NaCl tiene un importante impacto en la morfología celular de *A. sydowii* que incluyó una amplia remodelación morfológica para hacer frente al estrés salino. Esta es la descripción micromorfológica más completa realizada hasta el momento en un ascomiceto halófilo filamentoso. *A. sydowii* produjo como solutos compatibles, trehalosa, manitol, arabitol, eritritol y glicerol en presencia de concentraciones de 1.0 M y 5.13 M de NaCl. Curiosamente, los análisis de síntesis de osmolitos mostraron que el glicerol no aumentó en medios saturados de NaCl. Nuestros resultados también confirman que la producción de osmolitos depende de la fase de crecimiento. Las concentraciones saturadas de NaCl indujeron estrés oxidativo en *A. sydowii*. Nuestros datos bioquímicos mostraron que la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa actuaron juntas como un sistema de defensa antioxidante primario para proteger a *A. sydowii* contra las moléculas peroxidantes en condiciones de salinidad extrema. El glutatión reducido mostró los mismos niveles tanto en 1.0 M como en 5.13 M de NaCl, lo que indica que este hongo halófilo gestionó adecuadamente el estrés oxidativo causado por las condiciones de salinidad. Además, los datos transcriptómicos revelaron que los genes implicados en diferentes defensas antioxidantes celulares, como la homocisteína-cisteína, el glutatión, la glioxalasa y la tiorredoxina. Por lo tanto, *A. sydowii* desencadenó una amplia respuesta antioxidante para superar la toxicidad oxidativa celular.

El análisis del perfil de mRNA en condiciones de saturación de NaCl mostró 1.842 genes significativamente expresados de forma diferencial, de los cuales 704 estaban

sobreexpresados. Como reveló el análisis GO, el proceso biológico enriquecido reflejó una amplia adaptación fisiológica a las altas concentraciones de sal (5.13 M de NaCl), principalmente en el metabolismo y la transducción de señales. Los procesos identificados previamente en otros hongos halófilos como cruciales para la adaptación a condiciones hipersalinas (Plemenitaš *et al.*, 2008; Zajc *et al.*, 2013), fueron la reestructuración de la pared celular, la síntesis de solutos compatibles y la fosforilación del sistema de transducción de señales. Estas adaptaciones también son cruciales para el crecimiento de los hongos a bajas temperaturas. Los principales cambios a nivel transcripcional incluyeron la vía de transducción de señales del glicerol de alta osmolaridad (HOG), los transportadores de iones y la ultraestructura y morfología de la pared celular. Curiosamente, los genes que codifican la síntesis de quitina fueron reprimidos, exponiendo el importante papel en el crecimiento celular y el aumento de las necesidades energéticas en NaCl saturado de los  $\beta$ -1,3-glucanos, los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  y los productos génicos relacionados con el crecimiento polarizado, la morfogénesis y el ciclo celular.

Este estudio también es el primer intento de aclarar el papel de los lncRNAs en respuesta al estrés causado por altas concentraciones de NaCl. Una gran proporción de lncRNAs fueron regulados al alza, y la correlación de los niveles de co-expresión entre los reguladores transcripcionales (lncRNAs y TFs) y sus supuestas dianas asociadas a términos GO reflejaron la importancia de los procesos metabólicos, la fosforilación de proteínas, la actividad de la proteína quinasa, y la composición de la membrana plasmática para la adaptación a altas concentraciones de sal.

Los cambios a nivel de reprogramación transcripcional del metabolismo de los aminoácidos dieron lugar a vías de biosíntesis de aminoácidos alteradas, diferencias en los perfiles de aminoácidos y menores cantidades de aminoácidos libres. Las funciones esenciales de la metionina, la cisteína y la histidina quedaron especialmente expuestas. A diferencia de otros hongos halófilos (Turk *et al.*, 2004), las condiciones hipersalinas no influyeron en la composición o fluidez de la membrana plasmática. Este primer perfil metabolómico describió la adaptación de un hongo halófilo a las condiciones de NaCl saturado mediante un cambio en el consumo de nutrientes del medio, incluyendo un cambio metabólico hacia fuentes no lipídicas y diferencias en la producción de metabolitos secundarios. En resumen, este estudio señala el comienzo de una comprensión "ómica" y molecular de cómo los hongos halófilos se adaptan a las salinidades más extremas que son hostiles a la mayoría de los microorganismos eucariontes.

## 8. Anexos

**Anexo 1.** Expresión transcriptómica de los genes de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 relacionados con el metabolismo de los aminoácidos a 5.13 M de NaCl en comparación con 1.0 M de NaCl

Amino acid metabolism	Transcript ID	Description	Gene ID	LogFC	FDR
GLU	TRINITY_DN713_c0_g1_i7	glutamate dehydrogenase	<i>gdh2</i>	-11.72	6.97E-09
	TRINITY_DN713_c0_g1_i4			-7.42	1.21E-06
TYR/PHE	TRINITY_DN759_c0_g1_i6	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	<i>aroG</i>	-11.50	1.56E-08
	TRINITY_DN759_c0_g1_i15			-6.33	6.56E-06
HIS	TRINITY_DN380_c0_g1_i3	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	<i>g6pd</i>	-11.22	2.99E-08
GLY	TRINITY_DN1487_c0_g1_i12	Cys-Gly metallopeptidase	<i>dug1</i>	-9.92	7.31E-07
	TRINITY_DN1487_c0_g1_i5			-9.36	2.89E-06
	TRINITY_DN1487_c0_g1_i2			-4.86	4.85E-04
	TRINITY_DN1487_c0_g1_i1			-3.83	6.02E-03
HIS	TRINITY_DN182_c0_g1_i6	triosephosphate isomerase	<i>tpi1</i>	-9.92	2.89E-07
CYS	TRINITY_DN573_c0_g1_i9	thiosulfate/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	<i>tst</i>	-9.57	1.71E-06
MET	TRINITY_DN95_c0_g1_i26	methylthioribose-1-phosphate isomerase	<i>mtnA</i>	-9.34	3.10E-06
	TRINITY_DN95_c0_g1_i11			-8.95	8.67E-06
	TRINITY_DN95_c0_g1_i7			-8.88	1.04E-05
	TRINITY_DN95_c0_g1_i1			-8.59	2.35E-05
	TRINITY_DN95_c0_g1_i9			-4.71	6.22E-04
	TRINITY_DN95_c0_g1_i6			-4.10	3.88E-03
	TRINITY_DN95_c0_g1_i32			9.82	8.42E-07
HIS	TRINITY_DN9078_c0_g1_i1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>gpdA</i>	-9.26	3.74E-06
TYR/PHE	TRINITY_DN1765_c0_g1_i3	3-dehydroquinate dehydratase	<i>aroD</i>	-9.10	5.81E-06
VAL/LEU/ILE	TRINITY_DN5050_c0_g1_i2	dihydroxy-acid dehydratase	<i>ilvD</i>	-8.97	8.19E-06
CYS	TRINITY_DN1285_c0_g1_i27	cysteine synthase	<i>cysK</i>	-8.34	2.89E-06
	TRINITY_DN1285_c0_g1_i15			6.75	3.82E-06
	TRINITY_DN1285_c0_g1_i25	cystathionine beta-synthase	<i>cbs</i>	-7.43	4.95E-05
	TRINITY_DN1285_c0_g1_i43			4.06	4.16E-03
HIS	TRINITY_DN12621_c0_g1_i1	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>gnd</i>	-6.99	1.63E-06
SER	TRINITY_DN242_c0_g1_i39	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>3-pgdh</i>	-6.95	1.48E-06
	TRINITY_DN242_c0_g1_i28			-6.76	3.20E-06
	TRINITY_DN242_c0_g1_i48			7.49	9.10E-07
SER	TRINITY_DN28_c1_g1_i14	phosphoglycerate kinase	<i>pgk1</i>	-5.10	2.41E-04
ILE	TRINITY_DN800_c0_g1_i6	acetolactate synthase	<i>ilvH</i>	-5.05	7.27E-04
	TRINITY_DN800_c0_g1_i1			-4.13	3.87E-03
HIS	TRINITY_DN4830_c0_g2_i1	hercynylcysteine S-oxide synthase	<i>egt1</i>	-4.72	8.88E-04
PRO	TRINITY_DN217_c0_g1_i16	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	<i>hogal</i>	-4.69	6.22E-04
	TRINITY_DN217_c0_g1_i26			-4.56	1.46E-03
	TRINITY_DN217_c0_g1_i11			-3.68	7.74E-03

Anexo 2. Expresión transcriptómica de los genes de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos a 5.13 M de NaCl en comparación con 1.0 M de NaCl.

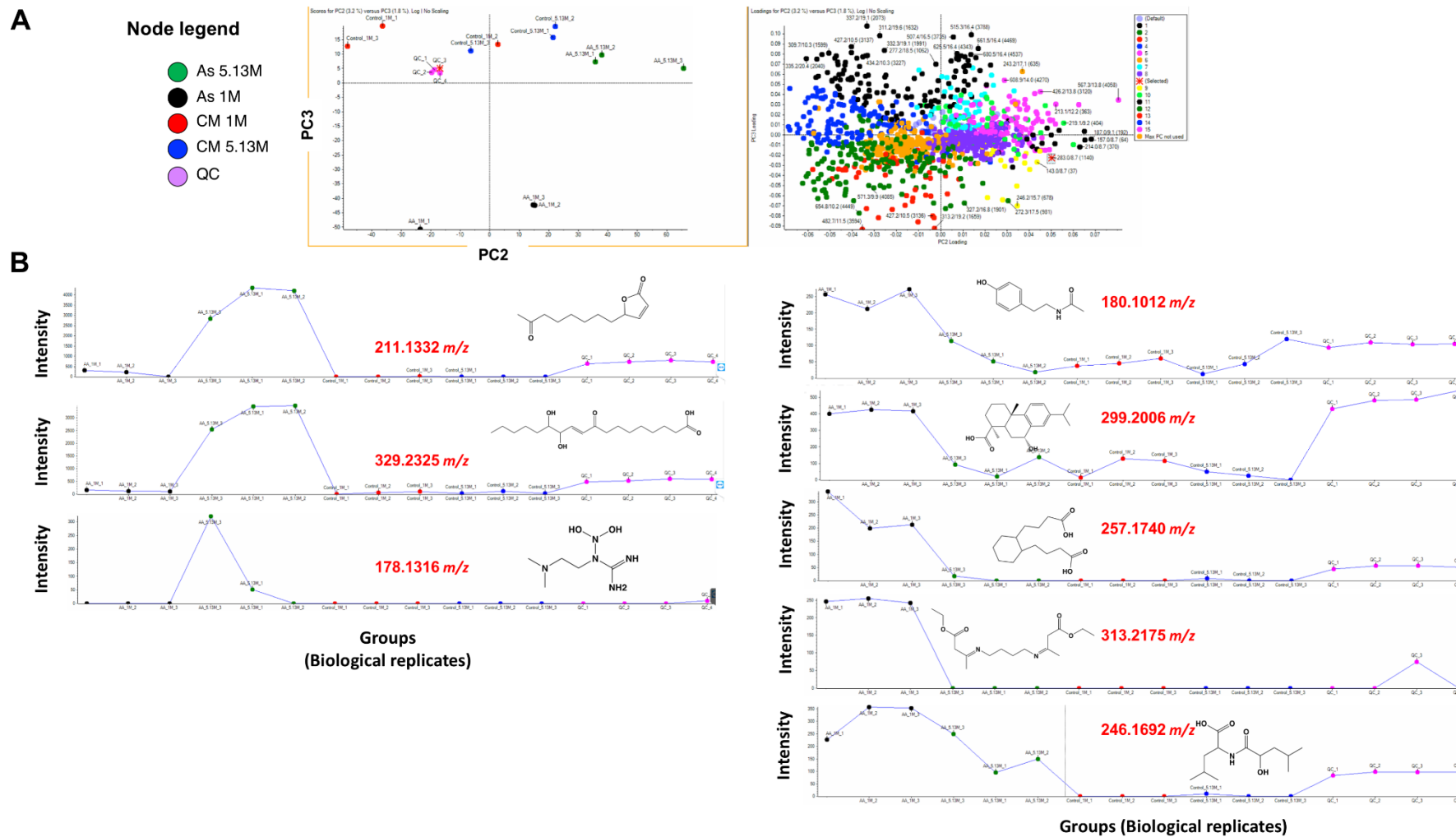
Process	Transcript ID	Description	Gene ID	LogFC	FDR	
Glycerophospholipid metabolism	TRINITY_DN560_c0_g1_i3	phosphatidylserine decarboxylase	<i>psd</i>	-11.42	1.88E-08	
	TRINITY_DN2907_c0_g1_i2			-10.11	4.43E-07	
	TRINITY_DN560_c0_g1_i5			-5.70	5.87E-05	
	TRINITY_DN560_c0_g1_i12			-4.74	5.38E-04	
	TRINITY_DN2907_c0_g1_i1			-4.70	6.35E-04	
	TRINITY_DN560_c0_g1_i1			-4.58	3.02E-03	
	TRINITY_DN560_c0_g1_i13			-4.39	1.43E-03	
	TRINITY_DN1717_c0_g1_i1	phospholipase D1/2	<i>pld1_2</i>	-11.30	2.38E-08	
	TRINITY_DN1717_c0_g1_i19			-11.19	3.24E-08	
	TRINITY_DN1717_c0_g1_i25			-10.76	4.45E-08	
	TRINITY_DN1717_c0_g1_i27			-10.16	3.93E-07	
	TRINITY_DN1717_c0_g1_i6			-7.61	2.91E-07	
	TRINITY_DN1717_c0_g1_i5			-5.71	3.63E-05	
	TRINITY_DN1717_c0_g1_i10			-5.48	7.45E-05	
	TRINITY_DN2866_c0_g1_i1	phosphatidylglycerophosphatase	<i>gep4</i>	-3.74	6.69E-03	
	TRINITY_DN2706_c0_g1_i4			-8.70	2.34E-08	
	TRINITY_DN640_c0_g1_i2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]	<i>gpd1</i>	-8.10	3.16E-06	
	TRINITY_DN640_c0_g1_i15			-7.11	1.10E-05	
	TRINITY_DN640_c0_g1_i9			-4.25	2.01E-03	
	TRINITY_DN640_c0_g1_i17			-6.61	6.15E-06	
	TRINITY_DN534_c0_g1_i20			-5.93	2.04E-05	
	TRINITY_DN534_c0_g1_i6			-5.75	3.54E-05	
	TRINITY_DN640_c0_g1_i3			-5.48	7.04E-05	
	TRINITY_DN534_c0_g1_i7			-5.19	1.71E-04	
	TRINITY_DN640_c0_g1_i1			-5.14	1.83E-04	
	TRINITY_DN640_c0_g1_i7			-4.82	9.59E-04	
	TRINITY_DN640_c0_g1_i14			-4.13	3.75E-03	
TRINITY_DN640_c0_g1_i8	-4.05			3.17E-03		
TRINITY_DN149_c0_g1_i11	glycerol-3-phosphate dehydrogenase			<i>glpA</i>	-4.64	1.09E-03
TRINITY_DN774_c0_g1_i6	CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase			<i>pssA</i>	-4.11	5.12E-03
TRINITY_DN5377_c1_g1_i3	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	<i>cdipt</i>	3.82	6.10E-03		
TRINITY_DN5377_c1_g1_i2			4.26	2.33E-03		
Glycerolipid metabolism	TRINITY_DN194_c0_g1_i1	alcohol dehydrogenase (NADP+)	<i>adh</i>	-10.24	4.89E-09	
	TRINITY_DN194_c0_g1_i2			-7.46	3.79E-07	
	TRINITY_DN4195_c0_g2_i1			6.11	4.61E-05	
	TRINITY_DN590_c0_g1_i9	diacylglycerol diphosphate phosphatase	<i>dpp1</i>	-4.68	6.37E-04	
	TRINITY_DN1861_c0_g1_i4	glycerol kinase	<i>glpK</i>	-4.30	2.41E-03	
TRINITY_DN1262_c0_g1_i5	acylglycerol lipase	<i>mgll</i>	3.88	5.40E-03		



Anexo 3. Expresión transcriptómica de los genes de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 relacionados con el ciclo celular, la vía del alto glicerol (HOG), los solutos compatibles, la pared celular, la síntesis de feromonas, los transportadores de la membrana celular, la vía del calcio y la morfología a 5.13 M de NaCl en comparación con 1.0 M de NaCl.

Process	Trinity ID	Description	Gene ID	LogFC	FDR
Cell cycle	TRINITY_DN511_c0_g1_i19			-11,31	2,38E-08
	TRINITY_DN511_c0_g1_i25	cullin 1	<i>cdc53</i>	-10,35	2,57E-07
	TRINITY_DN511_c0_g1_i34			-10,21	3,45E-07
	TRINITY_DN511_c0_g1_i27			-9,54	1,86E-06
	TRINITY_DN3603_c0_g1_i1	G2/mitotic-specific cyclin 3/4	<i>clb3_4</i>	-10,54	1,62E-07
	TRINITY_DN3603_c0_g1_i2			-3,99	3,63E-03
	TRINITY_DN1440_c0_g1_i3	serine/threonine-protein kinase	<i>chek2</i>	-10,22	3,42E-07
	TRINITY_DN1440_c0_g1_i5			-3,71	8,98E-03
	TRINITY_DN4013_c0_g1_i2	structural maintenance of chromosome 2	<i>smc2</i>	-9,77	1,09E-06
	TRINITY_DN4013_c0_g1_i3			-8,97	8,19E-06
	TRINITY_DN4013_c0_g1_i1			-4,55	8,99E-04
	TRINITY_DN1956_c0_g1_i4	mitotic spindle assembly checkpoint protein	<i>mad1</i>	-9,62	1,50E-06
	TRINITY_DN2580_c0_g1_i7	mitosis inhibitor protein kinase	<i>swe1</i>	-9,32	3,18E-06
	TRINITY_DN2580_c0_g1_i4			-5,13	2,28E-04
	TRINITY_DN4414_c0_g1_i2	anaphase-promoting complex subunit 3	<i>apc3</i>	-9,07	6,15E-06
	TRINITY_DN4637_c0_g1_i3	separase	<i>esp1</i>	-6,37	8,79E-06
	TRINITY_DN385_c0_g1_i5	anaphase-promoting complex subunit 5	<i>apc5</i>	-6,23	1,64E-05
	TRINITY_DN385_c0_g1_i8			-5,38	2,88E-04
	TRINITY_DN945_c0_g1_i11	serine/threonine-protein	<i>cdc55</i>	-5,89	1,40E-04
	TRINITY_DN945_c0_g1_i12	phosphatase		-5,59	1,56E-04
	TRINITY_DN945_c0_g1_i5	2A regulatory subunit B		-4,75	1,00E-03
	TRINITY_DN1000_c0_g1_i4	cyclin-dependent kinase regulatory subunit	<i>cks1</i>	-5,45	2,94E-04
	TRINITY_DN2023_c0_g1_i2	checkpoint serine/threonine-protein kinase	<i>bub1</i>	-5,21	2,01E-04
	TRINITY_DN240_c1_g1_i1	structural maintenance of chromosome 4	<i>smc4</i>	-4,55	9,07E-04
	TRINITY_DN240_c1_g1_i2			-3,98	3,76E-03
	TRINITY_DN986_c0_g1_i7	condensin complex subunit 1	<i>ycs4</i>	-4,81	6,17E-04
	TRINITY_DN1240_c0_g1_i1	G2/mitotic-specific cyclin 2	<i>clb2</i>	-4,43	1,45E-03
	TRINITY_DN1240_c0_g1_i2			-3,63	9,00E-03
	TRINITY_DN767_c0_g1_i6	M-phase inducer tyrosine	<i>mih1</i>	-4,36	1,45E-03
	TRINITY_DN767_c0_g1_i3	phosphatase		-4,18	2,39E-03
	TRINITY_DN2184_c0_g1_i1	F-box and WD-40 domain protein	<i>cdc4</i>	-4,32	1,78E-03
	TRINITY_DN5435_c0_g1_i1	F-box and leucine-rich repeat protein	<i>grr1</i>	-4,27	3,12E-03
	TRINITY_DN603_c0_g1_i8	condensin complex subunit 2	<i>brn1</i>	5,57	5,88E-05
	TRINITY_DN603_c0_g1_i12			6,37	2,97E-05

Anexo 4. Análisis de componentes principales (PCA) y agrupación de variables de componentes principales (PCVG) de *A. sydowii* cultivada en condiciones optimas (1M NaCl) y estresantes (5.13 NaCl). El gráfico de puntuaciones (panel superior izquierdo) se utilizó para visualizar el patrón entre las muestras. Los gráficos de carga (panel superior derecho) con PCVG se utilizaron para detectar las características que contribuyeron a la separación de las muestras. Los gráficos de perfil (paneles inferiores) se utilizaron para verificar la intensidad de los rasgos diferencialmente abundantes en *A. sydowii* cultivada en optimas (1M NaCl) y estresantes (5.13 NaCl). Las siglas representan *A. sydowii* (AS), control de medio de cultivo (CM) y muestras de control de calidad (QC). Las cifras fueron recuperadas de MarkerView Software. Las estructuras químicas fueron dibujadas con ChemDraw Professional 16.0.



## 9. Referencias

- Abu-Seidah, A. A. (2007). Effect of salt stress on amino acids, organic acids and ultra-structure of *Aspergillus flavus* and *Penicillium roquefortii*. *Int. J. Agric. Biol.*
- Aktaş, M., Değirmenci, U., Ercan, S. K., Tamer, L., Atik, U., Değirmenci, U., *et al.* (2005). The Comparison of Spectrophotometric and HPLC Methods in Reduced Glutathione Measurements. *Türk Klin. Biyokim. Derg* 3, 95–99.
- Alvaro, C. G., and Thorner, J. (2016). Heterotrimeric G protein-coupled receptor signaling in yeast mating pheromone response. *J. Biol. Chem.* 291, 7788–7795.
- Andersen, M. R., Salazar, M. P., Schaap, P. J., van de Vondervoort, P. J. I., Culley, D., Thykaer, J., *et al.* (2011). Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res.* 21, 885–897. doi:10.1101/gr.112169.110.
- Andreishcheva, E. N., Isakova, E. P., Sidorov, N. N., Abramova, N. B., Ushakova, N. A., Shaposhnikov, G. L., *et al.* (1999). Adaptation to salt stress in a salt-tolerant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem. C/C BIOKHIMIIA* 64, 1061–1067.
- AOAC (1995). *Official methods of analysis 16th Ed.* Association of official analytical chemists. Washington, DC, USA.
- Arakaki, A. K., Skolnick, J., and McDonald, J. F. (2008). Marker metabolites can be therapeutic targets as well. *Nature* 456, 443.
- Ariño, J., Ramos, J., and Sychrová, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 95–120.
- Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L.-F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., *et al.* (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nat. Protoc.* 15, 1954–1991.
- Assaf, K. I., and Nau, W. M. (2018). The chaotropic effect as an assembly motif in chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed.* 57, 13968–13981.
- Avis, T. J. (2007). Antifungal compounds that target fungal membranes: applications in plant disease control. *Can. J. Plant Pathol.* 29, 323–329.
- Barsottini, M. R. O., Copsey, A., Young, L., Baroni, R. M., Cordeiro, A. T., Pereira, G. A. G., *et al.* (2020). Biochemical characterization and inhibition of the alternative oxidase enzyme from the fungal phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Commun. Biol.* 3. doi:10.1038/s42003-020-0981-6.
- Batista-García, R. A., Balcázar-López, E., Miranda-Miranda, E., Sánchez-Reyes, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., *et al.* (2014). Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS One* 9, e105893.
- Benjamin, S., and Pandey, A. (2001). Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 44, 213–221. doi:10.1590/S1516-89132001000200016.
- Bennett, J. W., and Ciegler, A. (1983). *Secondary metabolism and differentiation in fungi.*
- Bensadoun, A., and Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70, 241–250.
- Bianchi, F., van't Klooster, J. S., Ruiz, S. J., and Poolman, B. (2019). Regulation of amino acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 83, e00024-19.

- Bidlingmeyer, B. A. (1984). Cohen SA, Tarvin TL. *Rapid Anal. Amin. acids using precolumn Deriv. J Chromatogr* 336, 93–104.
- Bioinformatics, B. (2019). OmicsBox—Bioinformatics Made Easy.
- Blunsom, N., and Cockcroft, S. (2019). Phosphatidylinositol synthesis at the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1865. doi:10.1016/j.bbaliip.2019.05.015.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bray, N., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-Seq quantification. *Nat. Biotechnol.* 34. doi:10.1038/nbt.3519.
- Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D. H., Johnson, D., *et al.* (2000). Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat. Biotechnol.* 18, 630–634.
- Brock, T. D. (1979). Ecology of saline lakes. *Strateg. Microb. life Extrem. Environ.*, 29–47.
- Bruno, V. M., Wang, Z., Marjani, S. L., Euskirchen, G. M., Martin, J., Sherlock, G., *et al.* (2010). Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. *Genome Res.* 20, 1451–1458.
- Bugni, T. S., and Ireland, C. M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 21, 143–163. doi:10.1039/b301926h.
- Bulteau, A. L., Ikeda-Saito, M., and Szveda, L. I. (2003). Redox-Dependent Modulation of Aconitase Activity in Intact Mitochondria. *Biochemistry* 42, 14846–14855. doi:10.1021/bi0353979.
- Burdge, G. C., and Calder, P. C. (2015). Introduction to fatty acids and lipids. *World Rev. Nutr. Diet.* 112, 1–16. doi:10.1159/000365423.
- Busch, C. J., and Binder, C. J. (2017). Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 398–406. doi:10.1016/j.bbaliip.2016.06.016.
- Butinar, L., Frisvad, J. C., and Gunde-Cimerman, N. (2011). Hypersaline waters—a potential source of foodborne toxigenic aspergilli and penicillia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 186–199. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01108.x.
- Calabrese, G., Morgan, B., and Riemer, J. (2017). Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. *Antioxidants Redox Signal.* 27, 1162–1177. doi:10.1089/ars.2017.7121.
- Camargo, A. P., Sourkov, V., Pereira, G., and Carazzolle, M. (2020). RNAsamba: neural network-based assessment of the protein-coding potential of RNA sequences. *NAR Genomics Bioinforma.* 2. doi:10.1093/nargab/lqz024.
- Carter, M. G., Sharov, A. A., VanBuren, V., Dudekula, D. B., Carmack, C. E., Nelson, C., *et al.* (2005). Transcript copy number estimation using a mouse whole-genome oligonucleotide microarray. *Genome Biol.* 6, 1–12.
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., *et al.* (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* (80-. ). 308, 1149–1154.
- Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., *et al.* (1998). A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell* 2,

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1, 581–585. doi:10.1038/nprot.2006.83.
- Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and lipids*. Oily.
- Christie, W. W. (1993). Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Adv. lipid Methodol.* 2, e111.
- Chung, D., Kim, H., and Choi, H. S. (2019). Fungi in salterns. *J. Microbiol.* 57, 717–724. doi:10.1007/s12275-019-9195-3.
- Chutoam, P., Charoensawan, V., Wongtrakoongate, P., Kum-arth, A., Buphamalai, P., and Tungpradabkul, S. (2013). RpoS and oxidative stress conditions regulate succinyl-CoA: 3-ketoacid-coenzyme A transferase (SCOT) expression in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol. Immunol.* 57, 605–615. doi:10.1111/1348-0421.12077.
- Cid, V. J., Cenamor, R., Sánchez, M., and Nombela, C. (1998). A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology* 144, 25–36.
- Clegg, J. S. (2001). Cryptobiosis—a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 128, 613–624.
- Collins, K. D. (2004). Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* 34, 300–311.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., *et al.* (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 17, 1–19. doi:10.1186/s13059-016-0881-8.
- Couto, N., Wood, J., and Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* 95, 27–42. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
- Crook, E. M., and Law, K. (1952). Glyoxalase; the role of the components. *Biochem. J.* 52, 492–499. doi:10.1042/bj0520492.
- DasSarma, S., and DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 120–126. doi:10.1016/j.mib.2015.05.009.
- de Hoog, G. S., Queiroz-Telles, F., Haase, G., Fernandez-Zeppenfeldt, G., Angelis, D. A., H. G. Gerrits van den Ende, A., *et al.* (2000). Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med. Mycol.* 38, 243–250. doi:10.1080/mmy.38.s1.243.250.
- de Nadal, E., Alepuz, P. M., and Posas, F. (2002). Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep.* 3, 735–740. doi:10.1093/embo-reports/kvf158.
- Diano, A., Bekker-Jensen, S., Dynesen, J., and Nielsen, J. (2006). Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 899–908.
- Dieci, G., Preti, M., and Montanini, B. (2009). Eukaryotic snoRNAs: A paradigm for gene expression flexibility. *Genomics* 94, 83–88. doi:https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.05.002.
- Ding, X., Liu, K., Lu, Y., and Gong, G. (2019). Morphological, transcriptional, and metabolic analyses of osmotic-adapted mechanisms of the halophilic *Aspergillus montevicensis* ZYD4 under hypersaline conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 3829–3846. doi:10.1007/s00253-019-09705-2.
- Dobarganes, M. C., and Velasco, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 420–428. doi:10.1002/1438-9312(200207)104:7<420::AID-

EJLT420>3.0.CO;2-N.

- Dogini, D. B., Pascoal, V. D. B., Avansini, S. H., Vieira, A. S., Pereira, T. C., and Lopes-Cendes, I. (2014). The new world of RNAs. *Genet. Mol. Biol.* 37, 285–293. doi:10.1590/s1415-47572014000200014.
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., and Böcker, S. (2015). Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 201509788. doi:10.1073/pnas.1509788112.
- Dujon, B. (2010). Yeast evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet.* 11, 512–524. doi:10.1038/nrg2811.
- Dulley, J. R., and Grieve, P. A. (1975). A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* 64, 136–141.
- Ecobichon, D. J. (1984). Glutathione depletion and resynthesis in laboratory animals. *Drug Chem. Toxicol.* 7, 345–355. doi:10.3109/01480548408998263.
- Ein-Gil, N., Ilan, M., Carmeli, S., Smith, G. W., Pawlik, J. R., and Yarden, O. (2009). Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*. *ISME J.* 3, 752–755. doi:10.1038/ismej.2009.18.
- Ellison, C. E., Kowbel, D., Glass, N. L., Taylor, J. W., and Brem, R. B. (2014). Discovering functions of unannotated genes from a transcriptome survey of wild fungal isolates. *MBio* 5, e01046-13.
- Erdelmeier, I., Gérard-Monnier, D., Yadan, J. C., and Chaudière, J. (1998). Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1184–1194. doi:10.1021/tx970180z.
- Esse, R., Barroso, M., Almeida, I. T. De, and Castro, R. (2019). The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: State-of-the-art. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–24. doi:10.3390/ijms20040867.
- Fan, T. W., Lane, A. N., and Higashi, R. M. (2004). The promise of metabolomics in cancer molecular therapeutics. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 6, 584–592.
- Fani, R., Brilli, M., Fondi, M., and Lió, P. (2007). The role of gene fusions in the evolution of metabolic pathways: The histidine biosynthesis case. *BMC Evol. Biol.* 7. doi:10.1186/1471-2148-7-S2-S4.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Funct. genomics*, 155–171.
- Finkel, T. (2012). From sulfenylation to sulphydration: What a thiolate needs to tolerate. *Sci. Signal.* 5. doi:10.1126/scisignal.2002943.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509. doi:10.1016/s0021-9258(18)64849-5.
- Folgueira, I., Lamas, J., Sueiro, R. A., and Leiro, J. M. (2020). Molecular characterization and gene expression modulation of the alternative oxidase in a scuticociliate parasite by hypoxia and mitochondrial respiration inhibitors. *Sci. Rep.* 10, 1–12. doi:10.1038/s41598-020-68791-9.
- Freedman, A., and Weeks, N. (2016). Best practices for de novo transcriptome assembly with trinity.
- Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2006). Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin. Cancer Biol.* 16, 427–435. doi:10.1016/j.semcancer.2006.09.003.

- Fujita, Y., Matsuoka, H., and Hirooka, K. (2007a). MicroReview Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05947.x.
- Fujita, Y., Matsuoka, H., and Hirooka, K. (2007b). Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol. Microbiol.* 66, 829–839. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05947.x.
- Galburt, E. A., Grill, S. W., Wiedmann, A., Lubkowska, L., Choy, J., Nogales, E., *et al.* (2007). Backtracking determines the force sensitivity of RNAP II in a factor-dependent manner. *Nature* 446, 820–823. doi:10.1038/nature05701.
- Gallo, P., Corradini, D., and Rovere, M. (2011). Ion hydration and structural properties of water in aqueous solutions at normal and supercooled conditions: a test of the structure making and breaking concept. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 19814–19822.
- Gavazzo, P., Vassalli, M., Costa, D., and Pagano, A. (2013). Novel ncRNAs transcribed by Pol III and elucidation of their functional relevance by biophysical approaches. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 203. doi:10.3389/fncel.2013.00203.
- Geiser, D. M., Taylor, J. W., Ritchie, K. B., and Smith, G. W. (1998). Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature* 394, 137–138. doi:10.1038/28079.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, 1–16.
- Gladfelter, A. S. (2006). Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 223–229. doi:10.1038/nrmicro1345.
- Gladfelter, A. S. (2010). Guides to the final frontier of the cytoskeleton: Septins in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 720–726. doi:10.1016/j.mib.2010.09.012.
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., *et al.* (2007). Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3065–3086.
- González-Abradelo, D., Pérez-Llano, Y., Peidro-Guzmán, H., Sánchez-Carbente, M. del R., Folch-Mallol, J. L., Aranda, E., *et al.* (2019). First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic mycoremediation under high salinity conditions. *Bioresour. Technol.* 279, 287–296. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.002.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., and David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751–766.
- Gostinčar, C., and Gunde-Cimerman, N. (2018). Overview of oxidative stress response genes in selected halophilic fungi. *Genes (Basel)*. 9. doi:10.3390/genes9030143.
- Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N., and Plemenitaš, A. (2011). Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. *Adv. Appl. Microbiol.* 77, 71–96. doi:10.1016/B978-0-12-387044-5.00003-0.
- Gostinčar, C., Turk, M., Plemenitaš, A., and Gunde-Cimerman, N. (2009). The expressions of  $\Delta 9$ -,  $\Delta 12$ -desaturases and an elongase by the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* are salt dependent. *FEMS Yeast Res.* 9, 247–256. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00481.x.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., *et al.* (2011a). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., *et al.* (2011b). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. doi:10.1038/nbt.1883.

- Grahl, N., Dinamarco, T. M., Willger, S. D., Goldman, G. H., and Cramer, R. A. (2012). *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 84, 383–399. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x.
- Grant, W. D., Danson, M. J., Scott, D. J., Halling, P. J., Engberts, J. B. F. N., Ho, M. W., *et al.* (2004). Life at low water activity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 359, 1249–1267. doi:10.1098/rstb.2004.1502.
- Griffiths, W. J. (2007). *Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling*. Royal Society of Chemistry.
- Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., and Young, R. A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77–88.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., and Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 353–375. doi:10.1093/femsre/fuy009.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., and Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol. Res.* 113, 1231–1241. doi:10.1016/j.mycres.2009.09.002.
- Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J. C., Diderichsen, B., and Plemenitaš, A. (2003). Extremophilic fungi in arctic ice: A relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Phys. Chem. Earth* 28, 1273–1278. doi:10.1016/j.pce.2003.08.056.
- Gunde-Cimerman, N., and Zalar, P. (2014). Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. *Food Technol. Biotechnol.* 52, 170–179.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., De Hoog, S., and Plemenitaš, A. (2000). Hypersaline waters in salterns - Natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 235–240. doi:10.1016/S0168-6496(00)00032-5.
- Guo, L., Han, L., Yang, L., Zeng, H., Fan, D., Zhu, Y., *et al.* (2014). Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense causing banana vascular wilt disease. *PLoS One* 9, e95543.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., and Frayn, K. N. (2002). *Lipid biochemistry*. Springer.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., *et al.* (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494–1512.
- Haberle, V., and Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* 19, 621–637.
- Hager, G. L., McNally, J. G., and Misteli, T. (2009). Transcription dynamics. *Mol. Cell* 35, 741–753.
- Hallsworth, J. E., Prior, B. A., Nomura, Y., Iwahara, M., and Timmis, K. N. (2003). Compatible solutes protect against chaotrope (ethanol)-induced, nonosmotic water stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7032–7034.
- Hallsworth, J. E., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Gillion, J. L. M., D’Auria, G., de Lima Alves, F., *et al.* (2007). Limits of life in MgCl<sub>2</sub>-containing environments: chaotropicity defines the window. *Environ. Microbiol.* 9, 801–813.
- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 465–503.
- Harding, T., Roger, A. J., and Simpson, A. G. B. (2017). Adaptations to high salt in a halophilic protist: Differential expression and gene acquisitions through duplications



- and gene transfers. *Front. Microbiol.* 8, 1–27. doi:10.3389/fmicb.2017.00944.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the Lowry method. *Anal Biochem*, 48–422.
- Hassan, A. H. A., Alkhalifah, D. H. M., Al Yousef, S. A., Beemster, G. T. S., Mousa, A. S. M., Hozzein, W. N., *et al.* (2020). Salinity Stress Enhances the Antioxidant Capacity of *Bacillus* and *Planococcus* Species Isolated From Saline Lake Environment. *Front. Microbiol.* 11, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2020.561816.
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., and Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2259–2266.
- He, B., Ma, L., Hu, Z., Li, H., Ai, M., Long, C., *et al.* (2018). Deep sequencing analysis of transcriptomes in *Aspergillus oryzae* in response to salinity stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 897–906.
- Hickey, P. C., Jacobson, D. J., Read, N. D., and Louise Glass, N. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 37, 109–119. doi:10.1016/S1087-1845(02)00035-X.
- Hofmeister, F. (1888). Zur lehre von der wirkung der salze: zweite mittheilung.
- Hohmann, S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* 61, 373–382. doi:10.1007/s00294-015-0475-0.
- Hohmann, S., Krantz, M., and Nordlander, B. (2007). Yeast Osmoregulation. *Methods Enzymol.* 428, 29–45. doi:10.1016/S0076-6879(07)28002-4.
- Honda, Y., Hattori, T., and Kirimura, K. (2012). Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (*aox1*) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 338–342. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.10.026.
- Hosono, K. (1992). Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salttolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Microbiology* 138, 91–96.
- Huang, A., Burke, J., Bunker, R. D., Mok, Y.-F., Griffin, M. D., Baker, E. N., *et al.* (2019). Regulation of human 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase by pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate: implications for primary hyperoxaluria type-3. *Biochem. J.* 476, 3369–3383. doi:10.1042/BCJ20190548.
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., *et al.* (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Sci. Rep.* 5, 1–13.
- Ide-Pérez, M. R., Fernández-López, M. G., Sánchez-Reyes, A., Leija, A., Batista-García, R. A., Folch-Mallof, J. L., *et al.* (2020). Aromatic hydrocarbon removal by novel extremotolerant *exophiala* and *rhodotorula* spp. From an oil polluted site in Mexico. *J. Fungi* 6, 1–17. doi:10.3390/jof6030135.
- Ingavat, N., Dobereiner, J., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., and Kittakoop, P. (2009). Aspergillusol A, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*. *J. Nat. Prod.* 72, 2049–2052.
- Ivosev, G., Burton, L., and Bonner, R. (2008). Dimensionality Reduction and Visualization in Principal Component Analysis. *Anal. Chem.* 80, 4933–4944. doi:10.1021/ac800110w.
- Jančič, S., Zalar, P., Kocev, D., Schroers, H.-J., Džeroski, S., and Gunde-Cimerman, N. (2016). Halophily reloaded: new insights into the extremophilic life-style of *Wallemia* with the description of *Wallemia hederiae* sp. nov. *Fungal Divers.* 76, 97–118.

- Jermuntiea, W., Aki, T., Toyoura, R., Iwashita, K., Kawamoto, S., and Ono, K. (2011). Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. *N. Biotechnol.* 28, 158–164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.09.007>.
- Jiménez-Gómez, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Perlin, T., Mouriño-Pérez, R. R., Sánchez-Carbente, M. D. R., Folch-Mallo, J. L., *et al.* (2020). Haloadaptative responses of *Aspergillus sydowii* to extreme water deprivation: Morphology, compatible solutes, and oxidative stress at nacl saturation. *J. Fungi* 6, 1–20. doi:10.3390/jof6040316.
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., and Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 451–459. doi:10.1038/nrm.2016.25.
- Jurkowska, H., Roman, H. B., Hirschberger, L. L., Sasakura, K., Nagano, T., Hanaoka, K., *et al.* (2014). Primary hepatocytes from mice lacking cysteine dioxygenase show increased cysteine concentrations and higher rates of metabolism of cysteine to hydrogen sulfide and thiosulfate. *Amino Acids* 46, 1353–1365. doi:10.1007/s00726-014-1700-8.
- Kanehisa, M., Sato, Y., and Kawashima, M. (2021). KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Sci.*, 1–7. doi:10.1002/pro.4172.
- Kang, B., Tang, H., Zhao, Z., and Song, S. (2020). Hofmeister series: Insights of ion specificity from amphiphilic assembly and interface property. *ACS omega* 5, 6229–6239.
- Kang, Y.-J., Yang, D.-C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y.-Q., Wei, L., *et al.* (2017). CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res.* 45, W12–W16.
- Katz, A., Waridel, P., Shevchenko, A., and Pick, U. (2007). Salt-induced changes in the Plasma Membrane Proteome of the Halotolerant Alga *Dunaliella salina* as revealed by blue nativ gel electrophoresis and Nano-LC-MS/MS analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1459–1472. doi:10.1074/mcp.M700002-MCP200.
- Kaur, C., Ghosh, A., Pareek, A., Sopory, S. K., and Singla-Pareek, S. L. (2014). Glyoxalases and stress tolerance in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 485–490. doi:10.1042/BST20130242.
- Kejžar, A., Cibic, M., Grötl, M., Plemenitaš, A., and Lenassi, M. (2015). The unique characteristics of HOG pathway MAPKs in the extremely halotolerant *Hortaea werneckii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–9. doi:10.1093/femsle/fnv046.
- Kelavkar, U., Rao, K. S., and Ghhatpar, H. S. (1993). Sodium chloride stress induced morphological and ultrastructural changes in *Aspergillus repens*. *Indian J. Exp. Biol.* 31, 511–515.
- Khaldi, N., and Wolfe, K. H. (2008). Elusive origins of the extra genes in *Aspergillus oryzae*. *PLoS One* 3, e3036. doi:10.1371/journal.pone.0003036.
- Khaware, R. K., Koul, A., and Prasad, R. (1995). High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranefaciens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35, 875–880.
- Kireeva, M. L., Hancock, B., Cremona, G. H., Walter, W., Studitsky, V. M., and Kashlev, M. (2005). Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol. Cell* 18, 97–108. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.027.
- Kis-Papo, T., Weig, A. R., Riley, R., Peršoh, D., Salamov, A., Sun, H., *et al.* (2014). Genomic adaptations of the halophilic Dead Sea filamentous fungus *Eurotium rubrum*. *Nat. Commun.* 5, 3745. doi:10.1038/ncomms4745.

- Kogej, T., Gostinčar, C., Volkmann, M., Gorbushina, A. A., and Gunde-Cimerman, N. (2006). Mycosporines in extremophilic fungi - Novel complementary osmolytes? *Environ. Chem.* 3, 105–110. doi:10.1071/EN06012.
- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A. A., Galinski, E. A., and Gunde-Cimerman, N. (2007a). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology* 153, 4261–4273. doi:10.1099/mic.0.2007/010751-0.
- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A. A., Galinski, E. A., and Gunde-Cimerman, N. (2007b). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of osmolytes and melanization. *Microbiology* 153, 4261–4273. doi:10.1099/mic.0.2007/010751-0.
- Kowalski, C. H., Beattie, S. R., Fuller, K. K., McGurk, E. A., Tang, Y. W., Hohl, T. M., *et al.* (2016). Heterogeneity among isolates reveals that fitness in low oxygen correlates with *Aspergillus fumigatus* virulence. *MBio* 7, 1–13. doi:10.1128/mBio.01515-16.
- Kozubowski, L., and Heitman, J. (2010). Septins enforce morphogenetic events during sexual reproduction and contribute to virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 75, 658–675. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06983.x.
- Kunčič, M. K., Kogej, T., Drobne, D., and Gunde-Cimerman, N. (2010). Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 329–337. doi:10.1128/AEM.02318-09.
- Kunte, H. J., Trüper, H. G., and Stan-Lotter, H. (2002). “Halophilic microorganisms,” in *Astrobiology* (Springer), 185–200.
- Kunz, W., Henle, J., and Ninham, B. W. (2004). ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’(about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9, 19–37.
- Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. *Microb. life Extrem. Environ.*
- Kwak, H., and Lis, J. T. (2013). Control of transcriptional elongation. *Annu. Rev. Genet.* 47, 483–508. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155440.
- Latchman, D., and Higgins, S. J. (1995). Gene regulation: a eukaryotic perspective. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 22, 397.
- Lee, D. W., Hong, C. P., Thak, E. J., Park, S. G., Lee, C. H., Lim, J. Y., *et al.* (2021). Integrated genomic and transcriptomic analysis reveals unique mechanisms for high osmotolerance and halotolerance in *Hyphopichia* yeast. *Environ. Microbiol.* 23, 3499–3522. doi:10.1111/1462-2920.15464.
- Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 262–291.
- Liebthal, M., Maynard, D., and Dietz, K. J. (2018). Proxiredoxins and Redox Signaling in Plants. *Antioxidants Redox Signal.* 28, 609–624. doi:10.1089/ars.2017.7164.
- Lin, Z., Wu, J., Jamieson, P. A., and Zhang, C. (2019). Alternative oxidase is involved in the pathogenicity, development, and oxygen stress response of botrytis cinerea. *Phytopathology* 109, 1679–1688. doi:10.1094/PHYTO-01-19-0012-R.
- Lindsey, R., Cowden, S., Hernández-Rodríguez, Y., and Momany, M. (2010a). Septins AspA and AspC are important for normal development and limit the emergence of new growth foci in the multicellular fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 9, 155–163. doi:10.1128/EC.00269-09.
- Lindsey, R., Ha, Y., and Momany, M. (2010b). A septin from the filamentous fungus *A.*

- nidulans* induces atypical pseudohyphae in the budding yeast *S. cerevisiae*. *PLoS One* 5, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0009858.
- Liu, K. H., Ding, X. W., Narsing Rao, M. P., Zhang, B., Zhang, Y. G., Liu, F. H., *et al.* (2017). Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.01789.
- Liu, S., Ruan, W., Li, J., Xu, H., Wang, J., Gao, Y., *et al.* (2008). Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia* 166, 93–102.
- Lockhart, D. J., and Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827–836.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lunt, S. Y., Muralidhar, V., Hosios, A. M., Israelsen, W. J., Gui, D. Y., Newhouse, L., *et al.* (2015). Pyruvate kinase isoform expression alters nucleotide synthesis to impact cell proliferation. *Mol. Cell* 57, 95–107. doi:10.1016/j.molcel.2014.10.027.
- Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A., and Ventosa, A. (2010). Halophiles 2010: life in saline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6971–6981.
- MacDonald, J., Doering, M., Canam, T., Gong, Y., Guttman, D. S., Campbell, M. M., *et al.* (2011). Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosae* during growth on coniferous and deciduous wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3211–3218.
- Mallet, L. V., Becq, J., and Deschavanne, P. (2010). Whole genome evaluation of horizontal transfers in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics* 11, 171. doi:10.1186/1471-2164-11-171.
- Mansour, M. M. A. (2017). Effects of the halophilic fungi *Cladosporium sphaerospermum*, *Wallemia sebi*, *Aureobasidium pullulans* and *Aspergillus nidulans* on halite formed on sandstone surface. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 117, 289–298.
- Marculli, C., and Peter, T. (2005). Water activity in polyol/water systems: New UNIFAC parameterization. *Atmos. Chem. Phys.* 5, 1545–1555. doi:10.5194/acp-5-1545-2005.
- Marcus, Y. (1994). ViscosityB-coefficients, structural entropies and heat capacities, and the effects of ions on the structure of water. *J. Solution Chem.* 23, 831–848.
- Marcus, Y. (2009). Effect of ions on the structure of water: structure making and breaking. *Chem. Rev.* 109, 1346–1370.
- Marguerat, S., and Bähler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cell. Mol. life Sci.* 67, 569–579.
- Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanasaki, Y., *et al.* (2003). Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9061–9066. doi:10.1073/pnas.1532302100.
- Marjetka, K. K., Tina, K., Damjana, D., and Nina, G.-C. (2010). Morphological Response of the Halophilic Fungal Genus *Wallemia* to High Salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 329–337. doi:10.1128/AEM.02318-09.
- Marklund, S., and Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.
- Martinelli, L., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., Azua-Bustos, A., Sterflinger, K., and Piñar, G. (2017). *Aspergillus atacamensis* and *A. salisburgensis*: two new halophilic species

- from hypersaline/arid habitats with a phialosimplex-like morphology. *Extremophiles* 21, 755–773. doi:10.1007/s00792-017-0941-3.
- Martins, V. P., Dinamarco, T. M., Soriani, F. M., Tudella, V. G., Oliveira, S. C., Goldman, G. H., *et al.* (2011). Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot. Cell* 10, 237–248. doi:10.1128/EC.00194-10.
- Mathioni, S. M., Patel, N., Riddick, B., Sweigard, J. A., Czymmek, K. J., Caplan, J. L., *et al.* (2013). Transcriptomics of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in response to the bacterial antagonist *Lysobacter enzymogenes* reveals candidate fungal defense response genes. *PLoS One* 8, e76487.
- Matsuda, Y., Sugiyama, F., Nakanishi, K., and Ito, S. I. (2006). Effects of sodium chloride on growth of ectomycorrhizal fungal isolates in culture. *Mycoscience* 47, 212–217. doi:10.1007/s10267-006-0298-4.
- Matsuzawa, A. (2017). Thioredoxin and redox signaling: Roles of the thioredoxin system in control of cell fate. *Arch. Biochem. Biophys.* 617, 101–105. doi:10.1016/j.abb.2016.09.011.
- McDonald, A. E. (2008). Alternative oxidase: An inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed “cyanide-resistant” terminal oxidase. *Funct. Plant Biol.* 35, 535–552. doi:10.1071/FP08025.
- McDonough, V., Stuke, J., and Cavanagh, T. (2002). Mutations in *erg4* affect the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to medium-chain fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids* 1581, 109–118.
- Meijueiro, M. L., Santoyo, F., Ramírez, L., and Pisabarro, A. G. (2014). Transcriptome characteristics of filamentous fungi deduced using high-throughput analytical technologies. *Brief. Funct. Genomics* 13, 440–450.
- Melanie, H., Tim, K., and Hans-Ulrich, M. (2007). Role of Cdc42-Cla4 Interaction in the Pheromone Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 6, 317–327. doi:10.1128/EC.00102-06.
- Mendes Soares, L. M., and Valcárcel, J. (2006). The expanding transcriptome: the genome as the ‘Book of Sand.’ *EMBO J.* 25, 923–931.
- Mikami, K., Kanesaki, Y., Suzuki, I., and Murata, N. (2002). The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 46, 905–915. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03202.x.
- Minagawa, N., Koga, S., Nakano, M., Sakajo, S., and Yoshimoto, A. (1992). Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.* 302, 217–219. doi:10.1016/0014-5793(92)80444-L.
- Moreno-Ulloa, A., Sicairos Diaz, V., Tejada-Mora, J. A., Macias Contreras, M. I., Castillo, F. D., Guerrero, A., *et al.* (2020). Chemical Profiling Provides Insights into the Metabolic Machinery of Hydrocarbon-Degrading Deep-Sea Microbes. *Msystems* 5, e00824-20.
- Morgan, B., Ezeriņa, D., Amoako, T. N. E., Riemer, J., Seedorf, M., and Dick, T. P. (2013). Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat. Chem. Biol.* 9, 119–125. doi:10.1038/nchembio.1142.
- Morozova, O., Hirst, M., and Marra, M. A. (2009). Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10, 135–151.
- Müller, S., Baldin, C., Groth, M., Guthke, R., Kniemeyer, O., Brakhage, A. A., *et al.* (2012).

- Comparison of transcriptome technologies in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* reveals novel insights into the genome and MpkA dependent gene expression. *BMC Genomics* 13, 1–14.
- Nagalakshmi, U., Waern, K., and Snyder, M. (2010). RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 89, 4–11.
- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., *et al.* (2008). The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134, 329–340.
- Nicholson, J. K., and Lindon, J. C. (2008). Metabonomics. *Nature* 455, 1054–1056.
- Nomura, M., Nagatomo, R., Doi, K., Shimizu, J., Baba, K., Saito, T., *et al.* (2020). Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. *JAMA Netw. open* 3, e202895. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.2895.
- O'Rourke, S. M., and Herskowitz, I. (2004). Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Mol. Biol. Cell* 15, 532–542. doi:10.1091/mbc.E03-07-0521.
- Olson, B. J. S. C. (2016). Assays for determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 73, A-3A.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56–63. doi:10.1038/sj/jim/7000176.
- Osman, M. S., Badawy, A. A., Osman, A. I., and Abdel Latef, A. A. H. (2021). Ameliorative Impact of an Extract of the Halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* on Growth and Biochemical Parameters of Soybean Under Salinity Stress. *J. Plant Growth Regul.* 40, 1245–1256. doi:10.1007/s00344-020-10185-2.
- Overy, D., Correa, H., Roullier, C., Chi, W.-C., Pang, K.-L., Rateb, M., *et al.* (2017). Does osmotic stress affect natural product expression in fungi? *Mar. Drugs* 15, 254.
- Ozdemirler, G., Mehmetcik, G., Oztecan, S., Toker, G., Sivas, A., and Uysal, M. (1995). Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. *Horm. Metab. Res.* 27, 194–196. doi:10.1055/s-2007-979938.
- Palazzo, A. F., and Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.* 6. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00002>.
- Pasek J, H. D. (2020). Package 'weights.'
- Peidro-Guzmán, H., Pérez-Llano, Y., González-Abradelo, D., Fernández-López, M. G., Dávila-Ramos, S., Aranda, E., *et al.* (2021). Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions. *Environ. Microbiol.* 23, 3435–3459. doi:10.1111/1462-2920.15166.
- Peidro-Guzmán, H., Pérez-Llano, Y., González-Abradelo, D., Fernández-López, M. G., Dávila-Ramos, S., Aranda, E., *et al.* (2021). Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions. *Environ. Microbiol.* 23, 3435–3459.
- Pérez-Llano, Y., Rodríguez-Pupo, E. C., Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Cai, F., Gunde-Cimerman, N., *et al.* (2020). Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells* 9, 1–21. doi:10.3390/cells9030525.
- Petrovic, U., Gunde-Cimerman, N., and Plemenitas, A. (2002). Cellular responses to

- environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol. Microbiol.* 45, 665–672.
- Petrovič, U. (2006). Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res.* 6, 816–822. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00063.x.
- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kežar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., *et al.* (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Front. Microbiol.* 5, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2014.00199.
- Plemenitaš, A., Vaupotič, T., Lenassi, M., Kogej, T., and Gunde-Cimerman, N. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Stud. Mycol.* 61, 67–75. doi:10.3114/sim.2008.61.06.
- Ramasarma, T., Rao, A. V. S., Devi, M. M., Omkumar, R. V., Bhagyashree, K. S., and Bhat, S. V. (2015). New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol autoxidation. *Mol. Cell. Biochem.* 400, 277–285. doi:10.1007/s11010-014-2284-z.
- Redkar, R. J., Lemke, P. A., and Singh, N. K. (1996). Altered gene expression in *Aspergillus nidulans* in response to salt stress. *Mycologia* 88, 256–263.
- Redmile-Gordon, M. A., Armenise, E., White, R. P., Hirsch, P. R., and Goulding, K. W. T. (2013). A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biol. Biochem.* 67, 166–173. doi:https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.017.
- Rengachari, S., Aschauer, P., Schittmayer, M., Mayer, N., Gruber, K., Breinbauer, R., *et al.* (2013). Conformational plasticity and ligand binding of bacterial monoacylglycerol lipase. *J. Biol. Chem.* 288, 31093–31104. doi:10.1074/jbc.M113.491415.
- Richard, E., Gallego-Villar, L., Rivera-Barahona, A., Oyarzábal, A., Pérez, B., Rodríguez-Pombo, P., *et al.* (2018). Altered redox homeostasis in branched-chain amino acid disorders, organic acidurias, and homocystinuria. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. doi:10.1155/2018/1246069.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., and Nilsen, T. W. (2010). Removal of ribosomal subunits (and rRNA) from cytoplasmic extracts before solubilization with SDS and deproteinization. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb-prot5442.
- Risso, D., Ngai, J., Speed, T. P., and Dudoit, S. (2014). Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nat. Biotechnol.* 32, 896–902.
- Roberts, M. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1, 1–30. doi:10.1186/1746-1448-1-5.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Robinson, M. D., and Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11, 1–9.
- Rocha, K. S. C., Queiroz, M. S. R., Gomes, B. S., Dallago, R., de Souza, R. O. M. A., Guimarães, D. O., *et al.* (2020). Lipases of Endophytic Fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria* sp.: Application in the synthesis of solketal derived Monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 142, 109664. doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109664.
- Rodríguez-Pupo, E. C., Pérez-Llano, Y., Tinoco-Valencia, J. R., Sánchez, N. S., Padilla-Garfias, F., Calahorra, M., *et al.* (2021). Osmolyte Signatures for the Protection of *Aspergillus sydowii* Cells under Halophilic Conditions and Osmotic Shock. *J. fungi*

- (Basel, Switzerland) 7. doi:10.3390/jof7060414.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., *et al.* (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 1–26. doi:10.1186/s12859-017-1934-z.
- Ruijter, G. J. G., Visser, J., and Rinzema, A. (2004). Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology* 150, 1095–1101. doi:10.1099/mic.0.26723-0.
- Runguphan, W., and Keasling, J. D. (2014). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Metab. Eng.* 21, 103–113. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.07.003.
- Saito, H., and Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192, 289–318. doi:10.1534/genetics.112.140863.
- Saleem, M., Ali, M. S., Hussain, S., Jabbar, A., Ashraf, M., and Lee, Y. S. (2007). Marine natural products of fungal origin. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1142–1152. doi:10.1039/b607254m.
- Salis, A., and Ninham, B. W. (2014). Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. *Chem. Soc. Rev.* 43, 7358–7377.
- Sankaranarayanan, S., Jamshed, M., Kumar, A., Skori, L., Scandola, S., Wang, T., *et al.* (2017). Glyoxalase goes green: The expanding roles of glyoxalase in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18040898.
- Sarkaya, E. (2020). “Glutathione Peroxidase in Health and Diseases,” in, ed. S. D. E.-M. D. Bagatini (Rijeka: IntechOpen), Ch. 3. doi:10.5772/intechopen.91009.
- Sasson, S. (2017). 4-Hydroxyalkenal-activated PPAR $\delta$  mediates hormetic interactions in diabetes. *Biochimie* 136, 85–89. doi:10.1016/j.biochi.2016.10.007.
- Schein, C. H. (1990). Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Bio/technology* 8, 308–317.
- Schieber, M., and Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Scott, W. J. (1953). Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 C. *Aust. J. Biol. Sci.* 6, 549–564.
- Scott, W. J. (1957). “Water Relations of Food Spoilage Microorganisms,” in, eds. E. M. Mrak and G. F. B. T.-A. in F. R. Stewart (Academic Press), 83–127. doi:https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60247-5.
- Sepey, M., Manni, M., and Zdobnov, E. (2019). “BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness,” in *Methods in Molecular Biology*, 227–245. doi:10.1007/978-1-4939-9173-0\_14.
- Sereno, A. M., Hubinger, M. D., and Comesana, J. F. (2001). ScienceDirect.com - Journal of Food Engineering - Prediction of water activity of osmotic solutions. *J. Food ...* 49. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877400002211%5Cnpapers2://publication/uuid/5A55ED06-AFC9-47D0-99B7-378FF5A7A3DC>.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165, 1–52.
- Sharma, M., Astekar, M., Soi, S., S Manjunatha, B., C Shetty, D., and Radhakrishnan, R. (2015). pH gradient reversal: an emerging hallmark of cancers. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 10, 244–258.



- Shen, Y., Xiao, K., Liang, P., Ma, Y., and Huang, X. (2013). Improvement on the modified Lowry method against interference of divalent cations in soluble protein measurement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4167–4178.
- Shrivastava, M., Feng, J., Coles, M., Clark, B., Islam, A., Dumeaux, V., *et al.* (2021). Modulation of the complex regulatory network for methionine biosynthesis in fungi. *Genetics* 217. doi:10.1093/genetics/iyaa049.
- Sibthorp, C., Wu, H., Cowley, G., Wong, P. W. H., Palaima, P., Morozov, I. Y., *et al.* (2013). Transcriptome analysis of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* directed to the global identification of promoters. *BMC Genomics* 14, 1–18.
- Sims, D., Sudbery, I., Iltott, N. E., Heger, A., and Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 15, 121–132. doi:10.1038/nrg3642.
- Slot, J. C., and Rokas, A. (2011). Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolic gene cluster between fungi. *Curr. Biol.* 21, 134–139. doi:10.1016/j.cub.2010.12.020.
- Smith, P. K. *et al.*, Krohn, R. II, Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, Md., *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Solé, C., Nadal-Ribelles, M., de Nadal, E., and Posas, F. (2015). A novel role for lncRNAs in cell cycle control during stress adaptation. *Curr. Genet.* 61, 299–308.
- Song, L., and Florea, L. (2015). Rcorrector: Efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *Gigascience* 4, 1–8. doi:10.1186/s13742-015-0089-y.
- Spitz, F., and Furlong, E. E. M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* 13, 613–626.
- Sreenivasulu, N., Miranda, M., Prakash, H. S., Wobus, U., and Weschke, W. (2004). Transcriptome changes in foxtail millet genotypes at high salinity: Identification and characterization of a PHGPX gene specifically up-regulated by NaCl in a salt-tolerant line. *J. Plant Physiol.* 161, 467–477. doi:10.1078/0176-1617-01112.
- Sułkowska-Ziaja, K., Muszyńska, B., and Końska, G. (2005). Biologically active compounds of fungal origin displaying antitumor activity. *Acta Pol. Pharm.* 62, 153–159.
- Tafer, H., Poyntner, C., Lopandic, K., Sterflinger, K., and Piñar, G. (2019). Back to the salt mines: Genome and transcriptome comparisons of the halophilic Fungus *Aspergillus salisburgensis* and its halotolerant relative *Aspergillus sclerotialis*. *Genes (Basel)*. 10. doi:10.3390/genes10050381.
- Taysi, S., Keles, M. S., Gumustekin, K., Akyuz, M., Boyuk, A., Cikman, O., *et al.* (2015). Plasma homocysteine and liver tissue S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine status in Vitamin B6-deficient rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 154–160.
- Thornalley, P. J. (1990). The glyoxalase system: New developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 269, 1–11. doi:10.1042/bj2690001.
- Toida, J., Arikawa, Y., Kondou, K., Fukuzawa, M., and Sekiguchi, J. (1998). Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 759–763. doi:10.1271/bbb.62.759.
- Touchette, D., Altshuler, I., Gostinčar, C., Zalar, P., Raymond-Bouchard, I., Zajc, J., *et al.* (2021). Novel Antarctic yeast adapts to cold by switching energy metabolism and increasing small RNA synthesis. *ISME J.*, 1–12. doi:10.1038/s41396-021-01030-9.
- Tsuchihara, K., Suzuki, Y., Wakaguri, H., Irie, T., Tanimoto, K., Hashimoto, S., *et al.* (2009).

- Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res.* 37, 2249–2263.
- Tsuji, M. (2016). Cold-stress responses in the antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. *R. Soc. Open Sci.* 3. doi:10.1098/rsos.160106.
- Tunblad-Johansson, I., Andre, L., and Adler, L. (1987). The sterol and phospholipid composition of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown at various concentrations of NaCl. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Lipids Lipid Metab.* 921, 116–123.
- Turk, M., and Gostinčar, C. (2018). Glycerol metabolism genes in *Aureobasidium pullulans* and *Aureobasidium subglaciale*. *Fungal Biol.* 122, 63–73. doi:10.1016/j.funbio.2017.10.005.
- Turk, M., Méjanelle, L., Šentjerc, M., Grimalt, J. O., Gunde-Cimerman, N., and Plemenitaš, A. (2004). Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles* 8, 53–61. doi:10.1007/s00792-003-0360-5.
- Vargas-Muñiz, J. M., Renshaw, H., Richards, A. D., Lamoth, F., Soderblom, E. J., Moseley, M. A., et al. (2015). The *Aspergillus fumigatus* septins play pleiotropic roles in septation, conidiation, and cell wall stress, but are dispensable for virulence. *Fungal Genet. Biol.* 81, 41–51. doi:10.1016/j.fgb.2015.05.014.
- Vaupotic, T., Veranic, P., Jenoe, P., and Plemenitas, A. (2008). Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 994–1007. doi:10.1016/j.fgb.2008.01.006.
- Ventosa, A. (2006). “Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments,” in *Prokaryotic diversity - Mechanisms and significance*, 223–255. doi:http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511754913.015.
- Wagner, I., and Musso, H. (1983). New naturally occurring amino acids. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 22, 816–828.
- Walvekar, A. S., and Laxman, S. (2019). Methionine at the Heart of Anabolism and Signaling: Perspectives From Budding Yeast. *Front. Microbiol.* 10, 2624. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02624>.
- Wang, G., Yang, J., and Huibregtse, J. M. (1999). Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* 19, 342–352.
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., et al. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34, 828–837.
- Wang, X., Sun, H., Zhang, A., Sun, W., Wang, P., and Wang, Z. (2011a). Potential role of metabolomics approaches in the area of traditional Chinese medicine: as pillars of the bridge between Chinese and Western medicine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 859–868.
- Wang, Y., Lu, Z., Sun, K., and Zhu, W. (2011b). Effects of High Salt Stress on Secondary Metabolite Production in the Marine-Derived Fungus *Spicaria elegans*. *Mar. Drugs* 9. doi:10.3390/md9040535.
- Wang, Y., Zheng, J., Liu, P., Wang, W., and Zhu, W. (2011c). Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium. *Mar. Drugs* 9, 1368–1378. doi:10.3390/md9081368.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63.

- Ward, J. A., Ponnala, L., and Weber, C. A. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *Am. J. Bot.* 99, 267–276.
- Warris, A., and Ballou, E. R. (2019). Oxidative responses and fungal infection biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 34–46. doi:10.1016/j.semcdb.2018.03.004.
- Waterborg, J. H., and Matthews, H. R. (1994). The Lowry method for protein quantitation. *Basic protein Pept. Protoc.*, 1–4.
- Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V, Cross, J. R., and Thompson, C. B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* (80-. ). 324, 1076–1080.
- Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 549–561. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004.
- Witko, V., Nguyen, A. T., and Descamps-Latscha, B. (1992). Microtiter plate assay for phagocyte-derived Taurine-chloramines. *J. Clin. Lab. Anal.* 6, 47–53. doi:10.1002/jcla.1860060110.
- Witteveen, C. F. B., and Visser, J. (1995). Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 57–62. doi:10.1016/0378-1097(95)00381-E.
- Wu, J., Delneri, D., and O’Keefe, R. T. (2012). Non-coding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*: what is the function? *Biochem. Soc. Trans.* 40, 907–911.
- Wyn Jones, R. G., and Gorham, J. (1983). Osmoregulation. iii: LANCE, DL.; NOBEEL, PS; OSMOND, CB; ZIEGLER, H. Encyclopedia of plant physiology: physiological plant ecology. III-Response to chemical and biological environment.
- Yamaguchi, S., and Mase, T. (1991). Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 720–725. doi:10.1007/BF00169340.
- Yan, L., Li, M., Cao, Y., Gao, P., Cao, Y., Wang, Y., *et al.* (2009). The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 764–773. doi:10.1093/jac/dkp273.
- Yenush, L. (2016). “Potassium and Sodium Transport in Yeast BT - Yeast Membrane Transport,” in, eds. J. Ramos, H. Sychrová, and M. Kschischo (Cham: Springer International Publishing), 187–228. doi:10.1007/978-3-319-25304-6\_8.
- Yu, G., Li, F., Qin, Y., Bo, X., Wu, Y., and Wang, S. (2010). GOSemSim: an R package for measuring semantic similarity among GO terms and gene products. *Bioinformatics* 26, 976–978. doi:10.1093/bioinformatics/btq064.
- Yu, H., Xing, S., Nierves, L., Lange, P. F., and Huan, T. (2020). Fold-Change Compression: An Unexplored But Correctable Quantitative Bias Caused by Nonlinear Electrospray Ionization Responses in Untargeted Metabolomics. *Anal. Chem.* 92, 7011–7019. doi:10.1021/acs.analchem.0c00246.
- Yukioka, H., Inagaki, S., Tanaka, R., Katoh, K., Miki, N., Mizutani, A., *et al.* (1998). Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1442, 161–169. doi:10.1016/S0167-4781(98)00159-6.
- Zajc, J., Džeroski, S., Kocev, D., Oren, A., Sonjak, S., Tkavc, R., *et al.* (2014a). Chaophilic or chaotolerant fungi: A new category of extremophiles? *Front. Microbiol.* 5, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2014.00708.
- Zajc, J., Kogej, T., Galinski, E. A., Ramos, J., and Gunde-Cimermana, N. (2014b). Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*,

- growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 247–256. doi:10.1128/AEM.02702-13.
- Zajc, J., Liu, Y., Dai, W., Yang, Z., Hu, J., Gostinčar, C., *et al.* (2013). Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: Haloadaptations present and absent. *BMC Genomics* 14. doi:10.1186/1471-2164-14-617.
- Zalar, P., Gostinčar, C., De Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhadham, M., and Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud. Mycol.* 61, 21–38.
- Zhan, S., Dong, Y., Zhao, W., Guo, J., Zhong, T., Wang, L., *et al.* (2016). Genome-wide identification and characterization of long non-coding RNAs in developmental skeletal muscle of fetal goat. *BMC Genomics* 17, 1–10. doi:10.1186/s12864-016-3009-3.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., and Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst* 137, 293–300.
- Zhang, K., Huang, B., Yuan, K., Ji, X., Song, P., Ding, Q., *et al.* (2020). Comparative Transcriptomics Analysis of the Responses of the Filamentous Fungus *Glarea lozoyensis* to Different Carbon Sources. *Front. Microbiol.* 11, 190. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00190>.
- Zhang, Y., and Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 658–663.
- Zhu, M., Torres, M. P., Kelley, J. B., Dohlman, H. G., and Wang, Y. (2011). Pheromone- and RSP5-dependent ubiquitination of the G protein beta subunit Ste4 in yeast. *J. Biol. Chem.* 286, 27147–27155. doi:10.1074/jbc.M111.254193.

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Respuestas osmoadaptativas del halófilo *Aspergillus sydowii* en condición saturada de NaCl**, que presenta la alumna **Irina Jiménez Gómez (10024356)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Luis Andrés Yarzabal Rodríguez Universidad Católica de Cuenca (Ecuador)	APROBADO	
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente CEIB-UAEM	APROBADO	
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC-UAEM	APROBADO	

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LUCÍA PEREZGASGA CISCOMANI** | Fecha:2022-09-24 11:15:25 | Firmante

AdtOCOEc3Xzxx+Utrbyjum4bkAD7YsMsa/qHO/Yx1CCpCQqke5Wmr7iQT3gww8WCFkaohpyyophQu6oAESW5MzwBNS7NCqyvodlJ5fGqETsZg8mb9lajBNA5z3cEXdUG3j3f28HpJotzlvchXJoBZqCnQpCpZ8HCXkeCIfaTjaJhdwMiZupsYs98NSyidzv7A8pPYcJosyjiKo9XUJD1Az8EilW4YwzPM07eS2bFJqWjn3tuFEWT2f3fZqLVIPcJ4mnWfP+AdVmYYd bhf4vM//6MTVMVIVkQP3V5LSiEx9VN0RuRc0aKW3BOrMXox8pelVd7KuhRYilc4n8r67/8g==

**CARMEN NINA PASTOR COLON** | Fecha:2022-09-25 19:42:10 | Firmante

rHmViKUIIM++4ZhfXa5QLFIIXcyHqQ7a+EK3Bhfm7r383cR/1ShxaQfI0b7oxd99+plJKSh3KIBu2YzfuBgvPRMuxQxfQLSjr7FFIoMOIXHXx9Cu6aDzsDjWGG/RsZOymn156i92fbRdPlxeSmgbo+aRimG80NxxqckpyAB+ZmZzUSZDlVN2Qv5MgCYAG8koElgleZ9Bp4hHl1eXCbkWd7ZSWGjQ0I7BNyxCbFfJdYf8j2VxcrE/ArJi+YR2hhIK0ewcWiwpoNoLaQYkvzZUyo2SQeW0w0PKZq3dbemU8W/IR3nABma4aAH5vztGpRZ6Dezu5UpiJAWDb4Ra9A==

**LUIS ANDRÉS YARZÁBAL RODRÍGUEZ** | Fecha:2022-09-26 11:57:17 | Firmante

QRoyjiqJHplcZllejZyElhsYwRQLKmnUNbKN0D/7hridRY3sjlMSe4Mwog+OXVZ1HlnAOIO+CkbCuv6u/DkOril6dKQJEjy+sqCbC4kQ/+L6J3+vPJNSC4qHtdodGUq6P0WBiiGh4wV B4mXhJDK24FgZci2hsikmwYdRuGIGJ3sqjly2Fn/3ADxJtkuNJeFICvrJuu4OdyMEXRjw9RN9q7XWxaEVPHFAXJlgDnvm0IXdTLyaTaR15J2vZVGA7meUibC34aBUInl6sJvdmyLOh hTcCJG+yfjSx435UG3ByUst7IOJw8T8gDCd9V+znZ3+GRtJLukZMcWnq1ZOIbg==

**SONIA DAVILA RAMOS** | Fecha:2022-09-29 12:00:34 | Firmante

ABv78bK3nfXojdVfnXcOJ4dN4OV/UcKVlIDhQYVxPcTbtpAk0ivt5P3p6zDT+qoRTYg3vTFfcs2b6hUmrg/4h4id7vhsma/uHbJsFVfepTfsY5pRzyW7YCGr8qFSeFWnogG9X4kXPz S3Xjgl48KWkd+9NoXn5zEzVEcCvNdvPMbOXQnat9NjAJ9aq+yEqmCTItYcnZea2ohiARKU2GsQeiba/7gG1PhFudz6Pft3LaOuhMzBGx0QV1F89zWdBQ155x8+mrZGVN2fAidMtY TQmtZ73lsWU/hOxd7GrQIEVY0QhOi2/lqbTuXYAqbtT8qUl/m5XHE3llplutVUbpw==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE** | Fecha:2022-09-29 23:36:52 | Firmante

GwbFTreKf3g6CFgd6du6SDZx/SqM+XP5jdVbM+JVrk33w9PGHcFJXxV/d2/430SF/6W2v3ua3IY6MslI3rgcSJt6E3z6DwMzbbqwa9TVMAwN+EnvFJ0sg1HhOO2Lu8ZJTm/+3QN e85rJ+doH+ju5soVqcLMAWwe6+6ekOBKX0Zp/Qlo3a6bNoFvz/1wcfq9+YSL5qAUfldQU92dci34NYwYsldnDfA221DwjOo6M9kSxPAr8RcBtKcXuSHHn/0dBAdfqQAQP63VC38yO 4vfZU20S0pviBjdgjaA/C2i785twp8bteWsgkTPlEUQpp41Wu/6vGjKb3rJAQRvDN6YoA==

**LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO** | Fecha:2022-10-03 11:29:38 | Firmante

AV3PndpGdGxJvlHDcUNcsrhZai4fZ9JrQVnuZQk6cwHawL/3A2WUHG7EgH03C5HemLgt6JpXyh1YwVjU6E+m+zytv7e0z73zJ5Gfvg7r8cAjzvYvYCeRSwLPCvW3Hay8eJpQ ckbYQl13UjifiUaL7+2vmvEopkqAmk20zXlyDsmCGiBO8104NrzFQ4cW32RHXdDvjDm1eOQB5aiw6K19MSAfenmk2od4yecVaYqpYN+WMOzD2osrkQvhNvaUnxdRMgsyCUO eUuW9ahpHnspTe76ljo2ntL840Jgod/3HoCZLk50YJ9MM+Mp5hRwblzk/17IY4LlipcmZ6J87qZw==

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA** | Fecha:2022-10-07 10:45:42 | Firmante

fKlflAEF2G9X0aNRVfYEEVb6aDinDacw/9qt4slsiWiRhs/mRqN7f5RlvCVfK9e5I+JJ6djsfvJErftqb6zA5XGCGlIvo7WUll3Oiyfpo6iUgCMkzHv5ed9CWNa5BelhvaauwMamWVMXJ Vm2+kyFeGYJ3RVXb3Kbo9H1x7TnK4WYeOPRuoXgkVXXUDkayMZdnb0l1/Q0JjBBNaX+Rp1BodqORkgq9RUFK7j0KuHcPJFysRejhhsUdc+nEz7VInEvsA+3KCGP+zxQRB5I+ 64MZE0xa425er2vmlUZVwWRhrMf6sVXfy1fUralwd8PTuhEKvEHOemDmkSpE/skexOPw==

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



ABCDcvkQb

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RAvoVICIFISudorDzrLDksc2tSGGdnMG>