

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



BUSQUEDA DE GENESQUE LE CONFIEREN HALOTOLERANCIA
A *Aspergillus* sp. CON POTENCIAL USO EN BIOTECNOLOGÍA

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

SOPHIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. DICIEMBRE 2019

RESUMEN

Existen pocos reportes de hongos halófilos obligados, la mayoría de ellos aislados de ambientes hipersalinos. Las estrategias adaptativas de estos hongos no han sido bien estudiadas. En este estudio se identificó un hongo aislando de sedimentos marinos (275 m de profundidad) el cual fué identificado como una nueva especie con base en sus características morfológicas y moleculares (marcadores utilizados: TS 1-2; RPB1; RPB2; Cct8; TSR1; CaM; BenA). Por otro lado, se analizó el transcriptoma *A. loretoensis* bajo dos condiciones de salinidad (4% y 15% de NaCl) utilizando el sistema de Illumina MiSeq. Basados en sus características morfológicas como la producción de conidios en cadenas simples, el hongo fue relacionado al género *Aspergillus* subgénero *Polypaecilum*. El análisis filogenético molecular colocó al aislado fungal cerca de *A. salinarus* y *A. baarnensis*. No obstante, lo anterior las diferencias morfológicas y moleculares establecieron a este hongo como una nueva especie *Aspergillus loretoensis* sp. nov. El ensamble del transcriptoma generó 15,132 transcritos con 10,507 genes putativos (644 sobre expresados, de los cuales, 476 contaron con anotación). Algunos de los genes sobre expresados al 15% NaCl estuvieron relacionados al transporte de osmolitos, transporte aniónico y transporte de membrana. Por otro lado, al 4% NaCl algunos genes sobre expresados están relacionados al estrés. Fue posible la identificación de algunas enzimas relacionadas a procesos metabólicos con interés biotecnológico. Se requieren más estudios de este tipo de organismos dada su posible utilización en la biotecnología.

ABSTRACT

To date, there are few reports of obligate halophilic fungi, most of them isolated from hypersaline environments. The adaptive strategies of these fungi are not well known. In this study, a fungal isolate was identified from marine sediments (275 m deep) as a new species based on its morphological and molecular markers (ITS 1-2; RPB1; RPB2; Cct8; TSR1; CaM; BenA). On the other hand, *A. loretoensis* was subjected under two salinity conditions (4% and 15% NaCl) to obtain the transcriptome using the Illumina MiSeq System. Based on its morphological characteristics as conidia chain production in a single phialide, the fungal isolate was related to the genus *Aspergillus*, subgenus *Polypaecilum*. The phylogenetic molecular analysis placed the fungal isolate closer to *Aspergillus salinarus* and *A. baarnensis*. However, its morphological and molecular differences establish it as a new species, *Aspergillus loretoensis* sp. nov. The transcriptome assembly generates 15,132 transcripts with 10,507 putative genes (644 up-regulated, of those 476 with annotation). Some of the upregulated genes at 15% NaCl were related to osmolytes transport, anionic exchange, and membrane transport. In the other hand at 4%, some upregulated genes are related to stress. There was possible to identify some enzymes related to metabolic process with biotechnological interest. Further research into these understudied organisms is required since their possible biotechnological applications

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

BUSQUEDA DE GENES QUE LE CONFIEREN HALOTOLERANCIA A
Aspergillus sp CON POTENCIAL USO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

SOPHIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

APROBADA POR:



Dra. Amelia Portillo López
Directora de tesis



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Sinodal



Dr. Edgar Alfonso López Landavery
Sinodal



Dra. Nahara Ernestina Ayala Sánchez
Sinodal



Dra. Sandra Tapia Morales
Sinodal

DEDICATORIA

*En memoria de mi padre Ing. Jorge Manuel González Vicente,
quien me vio comenzar este reto y gracias a sus enseñanzas y a su
apoyo hoy logro conquistarlo.*

*A mi hija Michelle Terrazas González y a mi esposo Eduardo
Terrazas Lugo, por estar ahí siempre en las buenas y en las no tan
buenas, son mi pilar y gracias a ustedes hoy puedo conquistar un
logro más, los amo.*

Agradecimientos

A mi directora de tesis la Dra. Amelia Portillo López, por siempre brindarme su apoyo y soporte, por todas las enseñanzas recibidas, tiempo y paciencia para la realización de este trabajo.

A la Dra. Clarisa E. Galindo Sánchez, por brindarme su tiempo, su apoyo y permitir que parte de este trabajo fuera llevado a cabo en su laboratorio.

Al Dr. Edgar A. López Landavery, por todo el tiempo, paciencia, enseñanzas y guía para la realización de este trabajo.

A la Dra. Nahara Ayala Sánchez, por brindarme su tiempo, conocimientos y ánimos para que este trabajo fuera exitoso.

A la Dra. Sandra Tapia Morales, por aceptar ser parte de mi comité y brindarme su tiempo y consejos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca recibida para cursar este programa de posgrado.

A mi madre Amalia Martínez Aguilar, que siempre me ha brindado sus sabios consejos y me ha impulsado a seguir adelante para lograr mis metas.

A mi hermana que siempre está ahí para escucharme y me anima a no rendirme.

A mis tíos Rafael González Vicente y Gabriela Delgado por brindarme su mano en los momentos difíciles de este proceso.

Contenido

I.	Introducción	1
I.I.	<i>Aspergillus</i>	1
I.II.	<i>Halotolerancia</i>	2
I.III.	<i>Halotolerancia en la biotecnología</i>	3
I.IV.	<i>Hongos halófilos y la disponibilidad de agua.</i>	5
II.	Hipótesis	10
III.	Objetivo	10
III.I.	<i>Objetivos particulares</i>	10
IV.	Materiales y Métodos	12
IV.I.	<i>Aislamiento</i>	12
IV.II.	<i>Identificación</i>	13
IV.II.I.	<i>Halotolerancia y curva de crecimiento</i>	13
IV.II.II.	<i>Identificación morfológica</i>	13
IV.II.III.	<i>Degradación de sustratos</i>	14
IV.II.IV.	<i>Identificación molecular</i>	16
IV.III.	<i>Transcriptoma</i>	17
IV.III.I.	<i>Extracción de RNA y secuenciación</i>	17
IV.III.II.	<i>Limpieza de secuencias y ensamblaje</i>	18

V.	Resultados.....	20
	<i>V.I. Resultados de la identificación.....</i>	<i>20</i>
	<i>V.I.I. Halotolerancia y curva de crecimiento.</i>	<i>20</i>
	<i>V.I.II. Identificación morfológica.....</i>	<i>21</i>
	<i>V.I.III. degradación de sustratos.....</i>	<i>24</i>
	<i>V.I.IV. identificación molecular</i>	<i>24</i>
	<i>V.I.V. Taxonomía</i>	<i>31</i>
	<i>V.II. Transcriptoma</i>	<i>33</i>
	<i>V.II.I. Análisis del transcriptoma</i>	<i>33</i>
	<i>V.II.II. Análisis de expresión diferencial.....</i>	<i>33</i>
	<i>V.II.III. Ontología de genes y anotación</i>	<i>38</i>
	<i>V.II. IV. Rutas metabólicas</i>	<i>51</i>
VI.	Discusión	56
	<i>VI.I. identificación.....</i>	<i>56</i>
	<i>VI.II. Transcriptoma</i>	<i>59</i>
VII.	Conclusiones	64
VIII.	Referencias.....	65

Lista de Tablas

Número		Página
1	Medios para la degradación de sustratos	15
2	Morfología de <i>Aspergillus</i> spp., subgénero <i>Polipaecilum</i> , relacionados a <i>Aspergillus loretoensis</i>	22
3	Comparación de las actividades enzimáticas de <i>A. loretoensis</i> con micromicetos relacionados.	24
4	Información del análisis de Blast.	28
5	Mediciones de la morfología microscópica al 4, 15 y 25% de NaCl.	33
6	Genes sobre expresados al 4% NaCl por cada Ontología de Genes nivel 2.	42
7	Genes sobre expresados al 15%NaCl por cada Ontología de Genes nivel 2.	45
8	Anotación de los genes sobre expresados al 4% NaCl	47
9	Anotación de los genes sobre expresados al 15% NaCl	50
10	Enzimas del transcriptoma de <i>A. loretoensis</i> involucradas en el metabolismo de gliceroslípidos y en el de alimidón y sacarosa	54
11	Procesos metabólicos de interés biotecnológico encontrados en el transcriptoma de <i>A. loretoensis</i>	55

Lista de figuras

Número		Página
1	Curva de crecimiento de la cepa CM-CNRG 624 en YPD con 0%, 4%, 15% y 25% de NaCl	20
2	<i>Aspergillus loretoensis</i> (CM-CNRG 624) en YPD agar. Colonia creciendo en diferentes concentraciones de NaCl: a) 4%, b) 15%, c) 25%. d) fálides produciendo cadenas de conidios al 4%; e) fiálides produciendo conidios en racimos al 4%; f) y g) fiálides con conidios en cadenas al 15%; h) hifas creciendo en espirales al 25%; i) fiálides produciendo cadenas de conidios al 25%. Barras = 10 μ m	23
3	Árbol filogenético de la región ITS 1-2 basado en el método de máxima similitud, con valores de bootstrap expresados en porcentaje. Los nombres de los taxones se encuentran precedidos por el NAGB. <i>Aspergillus wentii</i> fue utilizado como grupo externo	
4	Árboles filogenéticos basados en el método de máxima similitud, con valores de bootstrap expresados en porcentaje provenientes de diferentes secuencias: a) RPB1; b) TSR1; c) RPB2; d) Cct8; e) BenA; f) CaM. Los nombres de los taxones se encuentran precedidos por el	30

	NAGB. <i>Aspergillus wentii</i> fue utilizado como grupo externo	
5	Número de genes sobre-expresados: a) 4% y 15% de NaCl; b) anotados y no anotados 4% NaCl; c) anotados y no anotados 15% NaCl	35
6	Representación gráfica de la expresión diferencial de genes bajo las condiciones de 4% vs 15% NaCl. En la gráfica superior: tasa de expresión diferencial log2 contra la media. En la gráfica inferior: volcán representando en rojo los genes expresados significativamente de forma diferencial ($p=0.05$)	36
7	Mapa de calor. Del lado izquierdo bajo la barra roja se encuentran las 3 repeticiones de la prueba al 4% NaCl. Del lado derecho bajo la barra verde azul se encuentran las 3 repeticiones de la prueba a 15% NaCl. En morado se encuentran los genes sub expresados y en amarillo se encuentran los genes sobre expresados	37
8	Ontología de genes en nivel 2. a) procesos biológicos; b) componentes celulares	40
9	Ontología de genes nivel 2 de las funciones moleculares	41
10	Interacciones de los genes sobre expresados al 4% NaCl	46

11	Interacciones de los genes sobre expresados al 15% NaCl	49
12	Metabolismo de glicerolípidos. En color las enzimas presentes en el transcriptoma de <i>A. loretoensis</i>	52
13	Metabolismo de almidón y sacarosa. En color las enzimas presentes en el transcriptoma de <i>A. loretoensis</i>	53

I. Introducción

I.I. *Aspergillus*

El género *Aspergillus* es un grupo muy grande y diverso de micromiceto distribuido en diferentes hábitats de todo el mundo. En este género se pueden encontrar patógenos, contaminantes de alimentos hasta especies de utilidad en la industria. Debido a su abundancia y diversidad, la clasificación de las especies de este género ha sido complicada. Anteriormente su clasificación se basaba en sus características morfológicas, principalmente en la forma de los conidióforos, sin embargo, recientemente la identificación se ha realizado con técnicas moleculares (Samson *et al.*, 2014). Actualmente el marcador molecular utilizado para la identificación de hongos es el ITS (Internal transcribed spacer por sus siglas en inglés) (Schoch *et al.*, 2014). Sin embargo, en el 2014 Samson *et al.*, refieren la necesidad de la utilización de otros marcadores para poder identificar a las especies de este género como son: RPB1 (subunidad II de la RNA polimerasa dirigida por DNA), RPB2 (RNA beta polimerasa), TSR1 (Factor de maduración ribosomal) y Cct8 (chaperonina que contiene la subunidad 8 de TPC1), CaM (calmodulina) y Ben A (beta tubulina). Con la utilización de estos marcadores se ha logrado dividir el género en 6 subgéneros: *Circumdati*, *Nidulantes*, *Aspergillus*, *Fumigati*, *Polipaecilum* y *Cremeri* (Samson *et al.*, 2014; Houbraken *et al.*, 2014). Algunas especies de *Aspergillus* habían sido clasificadas en otros géneros ya que no presentaban las características morfológicas características, tal es el caso de *Phialosimplex* spp. o de *Basipetospora halophila*

(*A. baarnensis*), pero gracias a la identificación molecular se ha logrado incorporar a estas especies al género *Aspergillus*, subgénero *Polipaecilum* no obstante, que presentan el conidio en una fiálide simple. (Houbraken y Samson, 2011). Algunas especies del subgénero *Polipaecilum* han resultado ser halófilas o halotolerantes (Samson et al., 2014).

I.II. Halotolerancia

Los organismos halotolerantes presentan una amplia gama de adaptaciones que les permiten soportar la salinidad, estas pueden ser tanto morfológicas como bioquímicas (Tester y Davenport, 2003). Algunos ejemplos de estas adaptaciones son la presencia de glándulas secretoras de sal las cuales remueven el exceso de iones de la planta (Thomson *et al.*, 1992), la compartimentalización de iones en donde se mantiene la homeostasis transportando el exceso de sal a vacuolas y tejidos en desuso (Gupta y Huang, 2014), la producción de osmolitos los cuales son compuestos orgánicos (prolina, glicina, betaína, azúcares y polioles), cuya concentración aumenta en el interior celular para hacer un balance osmótico en condiciones de alta salinidad. Aumento en la actividad de enzimas oxidantes capaces de desintoxicar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gupta *et al.*, 2005) y regulación hormonal.

En relación a los hongos halotolerantes y halófilos se han observado ciertas adaptaciones específicas cuando se encuentran en altas salinidades como es el presentar compartimentos hifales gruesos y cortos y gránulos miceliares largos que ayudan a minimizar el contacto con la sal. Por otro lado, *Wallemia spp* y

Trimmatostroma salinum producen polisacáridos extracelulares muy pronunciados. También se ha observado un incremento en el grosor de la pared celular en *W. ichthyophaga*. Así como en las plantas, algunos micromicetos halotolerantes presentan la acumulación citoplasmática de osmolitos. En los casos de *Hortae werneckii* y en *Aureobasidium pullulans* la fluidez de la membrana está regulada por el cambio en la expresión de enzimas modificadoras de ácidos grasos como la desaturasa y la elongasa. Asimismo, algunos hongos halotolerantes presentan una melanización de su pared celular, tal es el caso de *H. werneckii*, es posible que esta característica le permite reducir la fuga de glicerol en ciertas concentraciones de sal (Zajc *et al.*, 2012).

I.III. Halotolerancia en la biotecnología

Se sabe que la tolerancia a las sales se puede encontrar en los diferentes reinos de la naturaleza. Dada la similitud de la respuesta celular al estrés en procariontes, eucariontes inferiores, así como en plantas, es posible estudiar la sobre expresión de estos genes en otros organismos como en levaduras o bacterias. Por lo anterior, es posible aislar e identificar genes que se encuentren relacionados al estrés salino en hongos marinos (Joshi *et al.*, 2009). Los microorganismos tolerantes a la sal se clasifican en halófilos y halotolerantes (Margesin y Schinner, 2001). Estos microorganismos, pueden ofrecer un gran potencial de aplicaciones biotecnológicas. El aislamiento e identificación de los genes relacionados a la supervivencia en ambientes salinos es imperante para poder elucidar los mecanismos que les confieren halotolerancia y poder así

ayudar a la agricultura creando variedades resistencia a ambientes salinos, técnicas establecidas en la biotecnológicas (Fang *et al.*, 2014). Existe evidencia de que la tolerancia a la salinidad se encuentra regulada por un loci de genes múltiples, algunos de estos genes se presentan solo en condiciones salinas (Flowers, 2004). Como ejemplo de la utilización de estos genes para conferir halotolerancia a organismos no halotolerantes se encuentra la sobre-expresión de Alfin1 en alfalfa, promoviendo el crecimiento tanto de la raíz como de los brotes (Wincove, 2000). Otro ejemplo de ello fue el de Gisbert *et al.*, (2000), quienes introdujeron el gen HAL1 proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* en plantas de tomate. Huang *et al.*, (2000) transformaron plantas de tabaco con manitol-1-fosfatodeshidrogenasa. Shen *et al.*, (2003) lo hicieron en plantas de tabaco con el gen AtDREB2A proveniente de *Atriplex hortensis*. Laurie *et al.*, (2002) observaron que la represión de la regulación del gen HKT1 en el trigo incrementó la halotolerancia. Fang *et al.*, (2014) identificaron y clonaron en *Escherichia coli* varios genes de *Aspergillus glaucus* (proveniente de minas de sal) confiriendo a la bacteria la capacidad de ser halotolerante. En cuanto a hongos marinos, Aggarwal *et al.*, (2005) compararon el gen homólogo HAL2 en la levadura *Debryiomyces hansenii* (origen marino) y *S. cerevisiae* (terrestre). Este gen le confiere sensibilidad a la salinidad a la especie terrestre, sin embargo, al ser transformado con el gen de *D. hansenii*, la especie terrestre adquirió tolerancia al medio salino.

Los organismos halófilos y halotolerantes han tenido un papel importante en la biotecnología en la producción de enzimas, metabolitos secundarios entre otras aplicaciones. Margesen y Schinner (2001) realizaron una revisión de todos los procesos en los cuales estos organismos han sido utilizados, sin embargo, estos procesos han sido estudiados principalmente en procariontes. Existen estudios en los que se ha demostrado que los hongos halófilos tienen también un potencial en la industria como productores de antibióticos y antioxidantes (Ali *et al.*, 2014), en la fermentación de productos con un alto contenido de sales, biosurfactantes y colorantes. Del mismo modo, estos hongos también pueden ser un recurso genético importante ya que sus genes le podrían proporcionar halotolerancia a especies no halotolerantes involucradas en procesos de fermentación o incluso en la agronomía (Gostincăr *et al.*, 2011).

I.IV. Hongos halófilos y la disponibilidad de agua.

La deshidratación con solutos como sal o azúcar produce una disminución de la actividad del agua (a_w). Estos solutos presentan diferentes propiedades las cuales les permiten unirse a las moléculas de agua limitando su disponibilidad para los procesos celulares de los microorganismos (Staford *et al.*, 2019).

Todos los microorganismos tienen ciertos requerimientos fisicoquímicos en donde la osmolaridad y a_w tienen un papel fundamental. El agua de mar contiene aproximadamente 3% de cloruro de sodio (NaCl), así como otros minerales teniendo una a_w de 0.98. Aquellos organismos que requieren NaCl y que pueden crecer óptimamente en la a_w del agua de mar son conocidos como halófilos

(Madigan *et al.*, 2015). En 1975, Pitt estableció que los hongos que eran capaces de crecer en sustratos con un a_w menor o igual a 0.85 (17% NaCl) podían ser clasificados como xerófilos o xerotolerantes, del mismo modo estableció que los hongos que presentaban un crecimiento superior en medios con NaCl como soluto de control debían ser denominados halófilos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000)

Antes de 1998 solo se conocían hongos tolerantes a la sal como contaminantes de comida, principalmente de pescados salados (Wheeler *et al.*, 1986 and 1988; Pitt *et al.*, 2009). En 1998, Buchalo y colaboradores aislaron hongos del Mar Muerto y algunos años después, Gunde-Cimerman y colaboradores (2000) describieron la diversidad fungal de aguas provenientes de las salinas de Sečovlje en Eslovenia. En el año 2014, Grainer y colaboradores describieron una nueva especie aislada de un hábitat hipersalino (minas de sal) relacionada al género *Phialosimplex*. el mismo año Samson y colaboradores (2014) reclasificaron el género de *Phialosimplex* a *Aspergillus*. Posteriormente, Kocsubé *et al.*, (2016) colocó a los hongos halófilos u osmofílicos del género *Aspergillus* sp (con células conidiógenas en fiálides simples) dentro del subgénero *Polipaecilum*. Recientemente Sklenar *et al.*, (2017) describieron algunos hongos halotolerantes como miembros del género *Aspergillus* sección Restricti.

A la fecha se conocen pocos hongos halófilos obligados: *Aspergillus baarnensis* (Pitt y Hocking 1985), *Gymnascella marismortui* (Buchalo *et al.*, 1998), *Wallemia ichthyophaga* (Zalar *et al.*, 2005), *A. penicillioides*, *A. unguis* (Nazareth *et al.*,

2012), *A. salinarum* (Grainer *et al.*, 2014), *A. ruber* (Kis-Papo *et al.*, 2014), *W. muriae* (Zalar *et al.*, 2005), *Gymnoascus halophilus* (Zhou *et al.*, 2016), *A. salisburgensis* y *A. atacamensis* (Martinelli *et al.*, 2017). A pesar del descubrimiento de estas especies halófilas obligadas, existen pocos estudios de sus mecanismos de adaptación a la tolerancia a la salinidad. El hongo más halófilo descrito hasta el momento es *Wallemia ichthyophaga* (Zalar *et al.*, 2005), una levadura perteneciente a la división Basidiomycota, de la cual se han realizado estudios de sus estrategias adaptativas a las altas concentraciones de NaCl (Zajc *et al.*, 2013 y 2014). Algunos otros estudios de halotolerancia y osmotolerancia se han realizado en algunas levaduras de las divisiones Ascomycota y Basidiomycota (Stratford *et al.*, 2019), siendo el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* la especie más estudiada (Silva-Graça *et al.*, 2003; Konte *et al.*, 2016; Strucko *et al.*, 2018).

I.V. Mecanismos de regulación de sal en microorganismos

Se conocen dos estrategias por las cuales los microorganismos mantienen la presión osmótica en el interior celular. La estrategia de la “sal in”, en donde las altas concentraciones de sales orgánicas en el medio se utilizan para mantener la osmolaridad y el turgor celular, esta utiliza preferentemente cloruro de potasio (KCl) y no NaCl (revisado por Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). La otra estrategia es la de “soluto compatible con baja concentración de sal”, donde una concentración alta de un soluto que no interfiere con las funciones celulares vitales, se utiliza para mantener las concentraciones de sodio intracelular por

debajo de niveles tóxicos. Esta última estrategia ha sido la más observada en el reino Fungi (revisado por Plemenitaš *et al.*, 2014). Los solutos que utilizan los hongos para este propósito son polioles, de los cuales el glicerol es el más común, pero el arabitol y manitol también han sido observados (Zajc *et al.*, 2014). Hasta el 2013, Zajc *et al.* comenzó a estudiar la respuesta de adaptación de una levadura halófila (*W. ichthyophaga*) la cual crecía a dos diferentes concentraciones de sal. Antes del 2013, lo que se había estudiado era la respuesta celular a un shock salino (Zajc *et al.*, 2013). Gracias a los estudios realizados se ha hecho una relación con la alta salinidad y la activación del estrés oxidativo el cual activa señales para la ruta metabólica de producción de glicerol (Gostincar y Gunde-Cimerman, 2018)

A nivel molecular se ha visto que la síntesis de glicerol se encuentra fuertemente regulada por la actividad de la enzima 3 fosfato dehidrogenasa dependiente de glicerol (Gpdp). La actividad de Gpdp está condicionada al decremento de a_w . Se ha observado que la producción de glicerol ocurre naturalmente en *S. cerevisiae* cuando ésta es expuesta a condiciones de hiperosmolaridad (Cronwright *et al.*, 2002). En el hongo halófilo *W. ichthyophaga*, se ha identificado que el mecanismo de producción del glicerol donde participa la Gpd1 en la vía HOG que es activada por MAP kinasas, es parte importante de la respuesta de la levadura para el control osmótico (Rodríguez-Peña 2010; Zajc *et al.*, 2014). En mayo de 2019, se publicó el primer estudio del genoma y transcriptoma de dos especies de hongos filamentosos pertenecientes al subgénero *Polypaecilum*; *A. salisburgensis* y *A.*

atacamensis, donde se analiza la expresión diferencial bajo dos condiciones de salinidad (5 y 20 % NaCl), encontrándose que el primero regula tres veces menos genes que el segundo para poderse adaptar a altas concentraciones de sal, además señalan que *A. salisburgensis* tiene un tamaño de genoma reducido con respecto a *A. atacamensis* (Tafer *et al.*, 2019).

En este estudio se presenta la identificación de un nuevo micromiceto halófilo obligado aislado anteriormente de la Bahía de Loreto Baja California Sur y se analiza su transcriptoma bajo dos concentraciones de salinidad con el fin de identificar los genes que le confieren sus adaptaciones a la alta salinidad.

II. Hipótesis

Aspergillus sp. tiene genes que le confieren la halotolerancia y algunos de ellos no descritos anteriormente

III. Objetivo

Identificar la especie halófila *Aspergillus* sp. así como los genes que le confieren halotolerancia como candidatos potenciales para ser utilizados en biotecnología.

III.I. Objetivos particulares

1. Identificar la especie halófila *Aspergillus* sp. mediante sus características morfológicas
2. Identificar *Aspergillus* sp. mediante marcadores moleculares (genes Rpb1 (Subunidad II de la RNA polimerasa dirigida por DNA), Rpb2 (RNA beta polimerasa), Cct8 (Chaperonina que contiene la subunidad 8 de TCP1), TSR1 (factor de maduración ribosomal), CaM (calmodulina), BenA (cadena beta de la tubulina), actina, Top1 (topoisomerasa 1), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), gamma actina y EF1a (factor de elongación 1 α)).
3. Identificación por pruebas bioquímicas
4. Registrar la nueva especie en la colección de microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP (Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) y en la base de datos de hongos MycoBank (<http://www.mycobank.org/>)

5. Obtener el transcriptoma de *Aspergillus* sp, bajo dos condiciones de cultivo (4% y 15% NaCl).
6. Determinar los genes diferenciales bajo las dos condiciones de cultivo.
7. Analizar cuales genes son homólogos en otras especies halotolerantes y cuales son nuevos.

IV. Materiales y Métodos

IV.I. Aislamiento

La cepa de estudio (CM-CNRG 624) fue aislada de sedimentos marinos de la Bahía de Loreto en las coordenadas: 25°89'14" N 111°25'09"W a 275m de profundidad. Los sedimentos fueron obtenidos con una draga de acero inoxidable de 12 cm de longitud (Khalsico) con adaptaciones hechas por técnicos del Instituto Oceanográfico Scripps, Universidad de California, San Diego. El material utilizado para tomar las muestras fue desinfectado con etanol al 100%. Después de sacar la draga, la muestra se tomó utilizando una espátula de metal estéril procurando tomar el sedimento de la capa más cercana a la superficie (en los primeros 2 centímetros). La muestra fue transferida y etiquetada en una bolsa estéril, posteriormente fue colocada en una hielera para su transporte al laboratorio en donde se almaceno a -4 °C hasta su procesamiento.

Los sedimentos fueron descongelados y se tomaron 5 g los cuales se colocaron en cajas de Petri estériles. La muestra se dejó secar bajo una campana de flujo laminar por 24 horas.

Se realizó una dilución de los sedimentos 1:10 en solución salina al 2% con 0.5% de glucosa. Después la dilución fue incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se homogenizó la dilución y se inocularon 100 µl (por duplicado) en cajas de Petri con medio YPD agar (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa y 2% agar) con 1 µg/ml de ampicilina. El medio se preparó con el 100% de agua de mar y sin agua de mar.

Como control se destaparon dos cajas de cada medio al ambiente por 10 minutos, unas se expusieron en la campana de flujo laminar y otras en la mesa del laboratorio, con el fin de observar a los micromicetos ambientales y descartarlos como contaminantes. De las cepas aisladas se escogió la más halotolerante y halófila, cepa denominada: CM-CNRG 624.

IV.II. Identificación

IV.II.I. Halotolerancia y curva de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento de la cepa CM-CNRG 624 a concentraciones del 0, 4, 15 y 25% de NaCl (peso/volumen) en YPD agar. Los cultivos fueron incubados por triplicado, en la oscuridad a 28°C por seis semanas. El diámetro del micelio fue medido cada tercer día. Se realizó la curva de crecimiento con las observaciones obtenidas.

IV.II.II. Identificación morfológica

Se realizaron cultivos en microplaca (Koneman, 1988) utilizando YPD agar con una concentración del 4, 15 y 25% NaCl (peso/volumen) los cuales fueron incubados en la obscuridad por 15 días. Trascurrido el tiempo de incubación se observaron y fotografiaron las placas con un microscopio óptico marca Motic® modelo B1 Advance a un aumento de 1000X. Del registro fotográfico se realizaron mediciones de cada estructura.

Se tomaron en cuenta diferentes características para la identificación morfológica, específicamente: color de la colonia, textura, color del micelio, ancho

y largo de hifas, características del conidio, así como la morfología de las fiálides (Samson *et al.* 2014).

IV.II.III. Degradación de sustratos

Se probó la capacidad de la cepa CM-CNRG 624 para degradar quitina, almidón, celulosa, proteína y lignina utilizando diferentes medios de cultivo como se muestra en la tabla 1. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado en condiciones de obscuridad a 28°C hasta por 8 días.

Tabla 1. Medios para la degradación de sustratos

Sustrato	Medio	Detección
Almidón	0.8% peptona; 15% NaCl; 1% almidón, agua destilada (técnica modificada de Greiner <i>et al.</i> , 2014)	Prueba de Benedict para la reducción de azúcares. Positivo: cambio de color de azul a naranja o rojo ladrillo.
Quitina	0.45% quitina coloidal; 0.2% NaH ₂ PO ₄ ; 0.3% (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0.3% MgSO ₄ ; 0.1% ácido cítrico; 0.01% rojo de fenol; 15% NaCl; 1.5% agar; 0.02% tween 80, agua destilada, pH 4.7. (Agrawal y Kotasthane, 2012).	Cambio de color de agar (amarillo a rojo)
Celulosa	0.2% KH ₂ PO ₄ ; (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0.03% urea; 0.03% MgSO ₄ ; CaCl ₂ ; 0.1% peptona; 1% carboxyl methyl celulosa; 15% NaCl; agua destilada; pH 5.5. (Trigiano y Ament, 2004)	Prueba de Benedict Positivo: cambio de color de azul a naranja o rojo ladrillo
Proteínas	10% leche descremada; 2% peptona; 15% NaCl; 1.5% agar; agua destilada (Claus, 1989)	Áreas hialinas indican actividad proteolítica
Lípidos	Agar spirit blue; 15% NaCl, agua destilada (Claus, 1989)	Color azul intenso alrededor de la colonia indica actividad lipolítica
Lignina	0.4% lignina; 1% extracto de malta; 0.4% extracto de levadura; 0.4% dextrosa; 15% NaCl; 1.5% agar; agua destilada (modificado de Greiner <i>et al.</i> , 2014).	Áreas hialinas, revelado con: 1% w/v solución acuosa de K ₃ Fe (CN) ₆ y FeCl ₃

IV.II.IV. Identificación molecular

Obtención de la región ITS 1-2

Para la extracción de DNA se cultivó la cepa CM-CNRG 624 en YPD caldo, con 15% NaCl durante 15 días a 28°C en oscuridad. El micelio se colocó en un portaobjetos estéril sobre hielo y se trituró con una navaja estéril. Se colocaron aproximadamente 30 mg del micelio en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml estériles. Se liofilizó la muestra y se extrajo el DNA siguiendo la técnica de Michiels *et al.*, 2003.

Para la amplificación de la región ITS 1-2 (por sus siglas en inglés: internal transcribe spacer) se utilizaron de 10 a 50 ng de DNA genómico por reacción de PCR utilizando los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Schoch *et al.*, 2012). bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, posteriormente 30 ciclos de 95 °C por un minuto, 59 °C por un minuto y 72 °C por un minuto, seguido por 10 min de extensión a 72 °C Y 10 minutos de enfriamiento a 20 °C. Las secuenciaciones y los cebadores se sintetizaron en la compañía Allele Biotech en San Diego CA, EUA.

Obtención de las secuencias Rpb1, Rpb2, Cct8, Tsr1, CaM, BenA, Top1, GAPDH, Gamma actina, EF1a

Se utilizaron los resultados del ensamble del transcriptoma y de la anotación realizada con uniprot-reviewed-annotations_041017 (<https://rest.sqlshare.uw.edu>; Washington University, 2018). Para identificar las secuencias de los genes Rpb1 (Subunidad II de la RNA polimerasa dirigida por DNA), Rpb2 (RNA beta polimerasa), Cct8 (Chaperonina que contiene la subunidad 8 de TCP1), TSR1 (factor de maduración ribosomal), CaM (calmodulina), BenA (cadena beta de la tubulina), actina, Top1 (topoisomerasa 1), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), gamma actina y EF1a (factor de elongación 1 α).

Análisis de las secuencias

Los resultados obtenidos se compararon con las secuencias disponibles en el banco de genes del Gen Bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por medio de la aplicación Blast. Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa Clustal W (Larking *et al.*, 2007) en Mega X (Kumar *et al.*, 2018), el cual también fue utilizado para realizar el análisis filogenético. Los árboles filogenéticos se realizaron utilizando el modelo de máxima similitud basado en 1000 repeticiones de bootstrap, utilizando el mejor modelo para cada set de datos para la estimación de la tasa evolutiva y la diferencia entre sitios. Todas las secuencias fueron depositadas en el banco de genes del NCBI.

IV.III. Transcriptoma

IV.III.I. Extracción de RNA y secuenciación

La cepa de estudio (CM-CNRG 624) fue cultivada por triplicado en el medio YPD caldo a 4% y 15%NaCl (28°C en oscuridad). Se cosecho el micelio después de 10 días, que fue el tiempo en el cual el micromiceto presentó crecimiento exponencial. Una vez cosechado, el micelio fue congelado de inmediato utilizando nitrógeno líquido, se liofilizó y se almacenó a -80°C hasta su utilización. El RNA total fue extraído y purificado utilizando el kit E. Z. N. A. Fungal RNA mini kit (OMEGA®). La pureza y cantidad de RNA fue determinada por medio de absorbancia por espectrofotometría utilizando un UV/vs nanodrop 2000 (ThermoScientific) por medio de la relación de la absorbancia en longitudes de onda de 260/280 nm y 260/230 considerando como aceptables valores mayores a 1.8. La integridad del RNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución amortiguadora y su observación en un transiluminador de UV marca First Light®.

Las librerías de cDNA fueron sintetizadas utilizando el kit TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina®). Las librerías de cDNA obtenidas fueron secuenciadas utilizando el secuenciador MiSeq system (Illumina®).

IV.III.II. Limpieza de secuencias y ensamblaje

El control de calidad de las secuencias obtenidas se verificó con el programa FastQC V0.11.7 (PHRED calidad mayor a Q30 con una longitud mayor a 36 pb, Andrews, 2010; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), posteriormente se removieron adaptadores y homopolímeros por medio del programa Trimmomatic 0.36 (Bolger *et al.*, 2014). Las secuencias filtradas fueron

utilizadas para realizar un ensamble *de-novo* utilizando Trinity (trinityrnaseq-Trinity-v2.6.6; Grabherr *et al.*, 2013). El control de calidad del ensamble se llevó a cabo por medio de Transrate v 1.0.3 (Smith-Unna *et al.*, 2016). Con los datos del transcriptoma se realizó un análisis de expresión diferencial por medio de DESq2 en Trinity con un valor estadístico de P de 0.01. Los archivos resultantes fueron comparados con las bases de datos de Uniport en NCBI (National Center of Biotechnology) por medio de la aplicación BlastX (versión 2.4.0+; Altschul *et al.*, 1990) tomando en cuenta un valor de E de 0.05. Los archivos resultantes se utilizaron para realizar una anotación funcional en SQLshare utilizando uniport-reviewed annotations_041017 (<https://rest.sqlshare.uw.edu>; Washington University, 2018) y en Blast2Go (Götz *et al.*, 2008). El enriquecimiento de la ontología de genes (OG) fue llevado a cabo por medio de David (Huang *et al.*, 2009). Los archivos obtenidos del enriquecimiento fueron utilizados para identificar las interacciones de las proteínas por medio de la aplicación String (Szklarczyk *et al.*, 2015).

V. Resultados

V.I. Resultados de la identificación

V.I.I. Halotolerancia y curva de crecimiento.

La cepa CM-CNRG 624 no presentó crecimiento en medio sin NaCl. La colonia presentó un crecimiento óptimo con 15% NaCl con un diámetro de 3.7 cm a los 26 días. Al 4% NaCl la colonia presentó un menor crecimiento con un diámetro de 1.8 cm después de 42 días. Al 25% NaCl la colonia presentó un crecimiento lento con un diámetro de 3.6 cm después de 42 días (Figura 1).

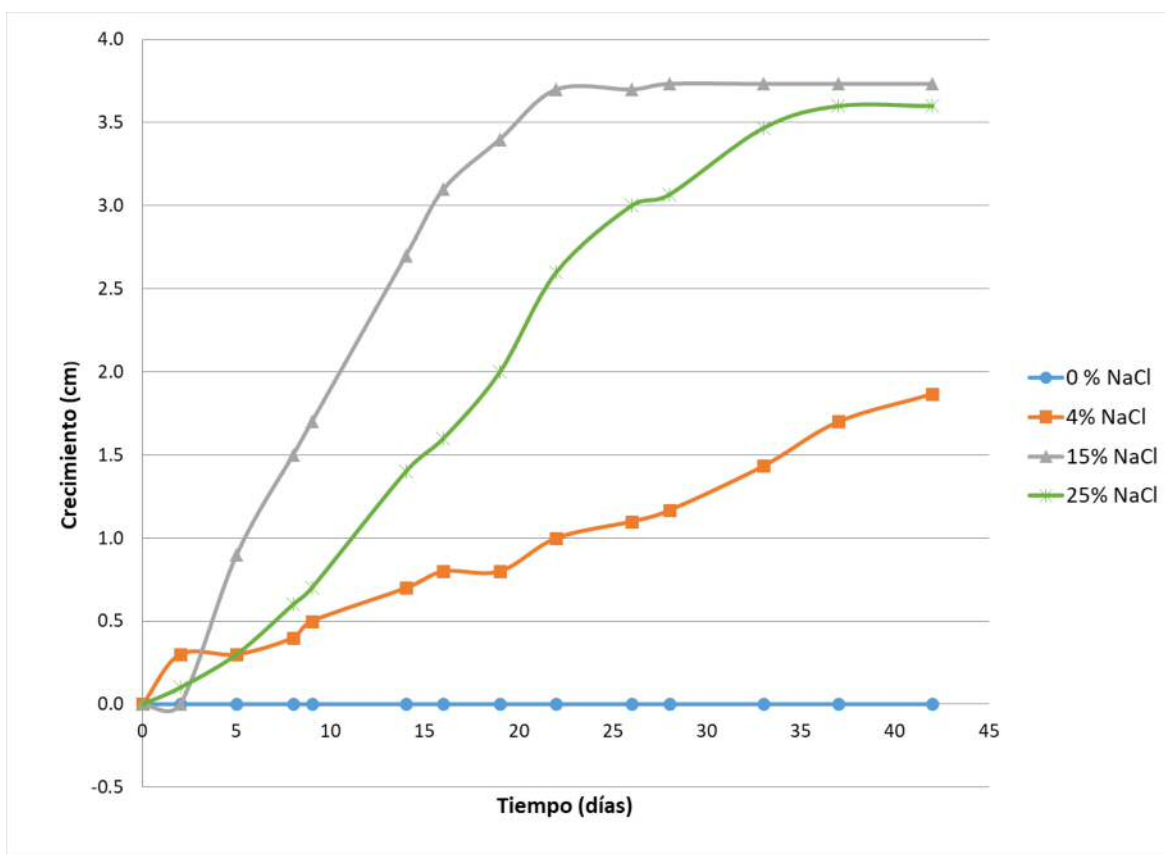


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa CM-CNRG 624 en YPD con 0%,4%, 15% y 25% de NaCl.

V.I.II. Identificación morfológica

En YPD 4% NaCl la colonia presentó un aspecto granular con una coloración marfil, en algunas ocasiones las colonias tenían aspecto de colonias de levaduras. En YPD 15% NaCl la colonia se observó con un aspecto polvoso aterciopelado de color blanco. En YPD 25% NaCl las colonias tenían las mismas características que al 15% NaCl (Figura 2, b y c).

Las hifas presentaron septos y crecieron rectas con ramificaciones. Las células conidiógenas se presentaron en fiálides simples que crecían de forma lateral o apical en un conidióforo corto y sin ramificaciones. La fiálides (monofialídicas) crecieron cilíndricas y rectas, en ocasiones se observaron con una base estrecha. Los conidios se presentaron en cadenas largas, con una textura ligeramente rugosa, forma globosa o subglobosa, ocasionalmente formaban cabezas en forma de racimo de uva. No se observaron esclerocios ni clamidosporas. (Tabla 2, figura 2, d-i)

Tabla 2. Morfología de *Aspergillus* spp., subgénero *Polipaecilum*, relacionados a *Aspergillus loretoensis*

Especies	Hifa		Fialides		Conidios				Clamidosporas	Esclerocios
	Ancho (μm)	Distancia entre septos (μm)	Largo (μm)	Ancho (μm)	Cabezas largo (μm)	Cabezas ancho (μm)	Diámetro (μm)	Forma	Presencia	Presencia
<i>A. loretoensis</i> 15% NaCl (CM-CNRG 624)	1.6-3.5 $\bar{X}$ =2.39	4.9-28.8 $\bar{X}$ =12.03	3.4-6.7 $\bar{X}$ =4.75	1.1-2.5 $\bar{X}$ =1.8	Ocasionalmente en forma de racimos		2.5-3.9 $\bar{X}$ =3.28	globosa, subglobosa	No	No
<i>A. salinarus</i> 15-25% NaCl (Grainer, <i>et al.</i> 2014 ^{*1} ; Martinelli <i>et al.</i> 2017 ^{*2})	1.5-2.5 ^{*1} 2.5-4 $\bar{X}$ =3 ^{*2}	9.5-16.0 ^{*1} 3.0-32.0 $\bar{X}$ =10.0 ^{*2}	1.5-8.5 ^{*1} 2.0-18.0 $\bar{X}$ =18.0 ^{*2}	1-1.5 ^{*1} 2-3.3 $\bar{X}$ =2.6 ^{*2}	Ocasionalmente en forma de racimos	-	3.0-4.0 ^{*1} 2.4-3 $\bar{X}$ =3.5 ^{*2}	globosa a subglobosa	3.0-4.0 X 3.0-4.0 ^{*2}	No
<i>A. baarnensis</i> (Pitt & Hocking, 1985)	-	-	3.0-20.0	2.0-3.0	No presenta	No presenta	3.5-6.0	Esférica, ligeramente elipsoidal, piriforme	No	No
<i>A. caninus</i> 5%NaCl (Martinelli <i>et al.</i> 2017 ^{*2} ; Sigler <i>et al.</i> 2010 ^{*3})	1.5-2.8 $\bar{X}$ =1.9 ^{*2}	5.3-17.1 $\bar{X}$ =10.6 ^{*2}	base 4.5-16 $\bar{X}$ =11.9 punta 0.7-1.5 $\bar{X}$ =1.1 ^{*3} 1.5-2.2 $\bar{X}$ =1.9 ^{*2} 7.2-20.7 $\bar{X}$ =12.0 ^{*2}	2.0-4.0 $\bar{X}$ =2.1 ^{*3} 1.5-2.2 $\bar{X}$ =1.9 ^{*2}	2.0-4.5 ^{*3} 2.5-4.1 $\bar{X}$ =3.3 ^{*2}	1.5-3.2 ^{*3} 1.9-2.7 $\bar{X}$ =2.3 ^{*2}	2.2-4.0 X 1.8-3.7 ^{*3} 2.4-3.1 $\bar{X}$ =2.9 ^{*2}	Subglobosa ^{*3}	No	No
<i>A. atacamensis</i> 10%NaCl (Martinelli <i>et al.</i> 2017)	1.5-3.0 $\bar{X}$ =2.0	2.0-33.0 $\bar{X}$ =12.5	3.0-23.5 $\bar{X}$ =10.5	base 2.0-3.0 punta 1.5	No presenta	No presenta	largo 3.5-4.5 $\bar{X}$ =4.0 ancho 3.5-4.5 $\bar{X}$ =3.7	globosa	3.5 X 3.5	No
<i>A. salisburgensis</i> (Martinelli <i>et al.</i> 2017)	1.5-5.5 $\bar{X}$ =3.0	1.5-21.0 $\bar{X}$ =8	3-23.5 $\bar{X}$ =8.5	base 2-3 punta 1.5	No presenta	No presenta	largo 2.5-4.5 $\bar{X}$ =3.5 ancho 2.0-4.0 $\bar{X}$ =3.0	Subglobosa	3.0 X 3.5	No
<i>A. chlamydisporus</i> 5-15%NaCl (Martinelli <i>et al.</i> 2017 ^{*2} ; Sigler <i>et al.</i> 2010 ^{*3})	1.5-2.7 $\bar{X}$ =2.0 ^{*2}	7.5-44.7 $\bar{X}$ =22 ^{*2}	3.0-14.0 ^{*3}	base 1.5-2.3 punta 1-1.5 ^{*3}	1.8-3.5 ^{*3}	1.3-2.0 ^{*3}	2.3-5.8 x 1.7-3 ^{*3} 3.0-4.5 x 2.0-3.0 $\bar{X}$ =4.0 x 2.5 ^{*2}	ovoide, piriforme ^{*3}	2.8-5.5 x 2.5-4.8 ^{*3} 4.0-6.7 x 3.5-5.0 $\bar{X}$ =5.0 x 4.0 ^{*2}	No
<i>A. sclerotialis</i> (Sigler <i>et al.</i> 2010)	-	-	5.0-15.0	base 1.2-1.8 punta 1.0	No presenta	No presenta	3.0-4.5 $\bar{X}$ 1.5-2.0	ovoide, base truncada	No	Si
<i>A. keratitis</i> (Hsieh <i>et al.</i> 2009)	-	-	14.0-30.0	2.0-2.5	No presenta	No presenta	2.5-3.5	globosa to subglobosa	No	No

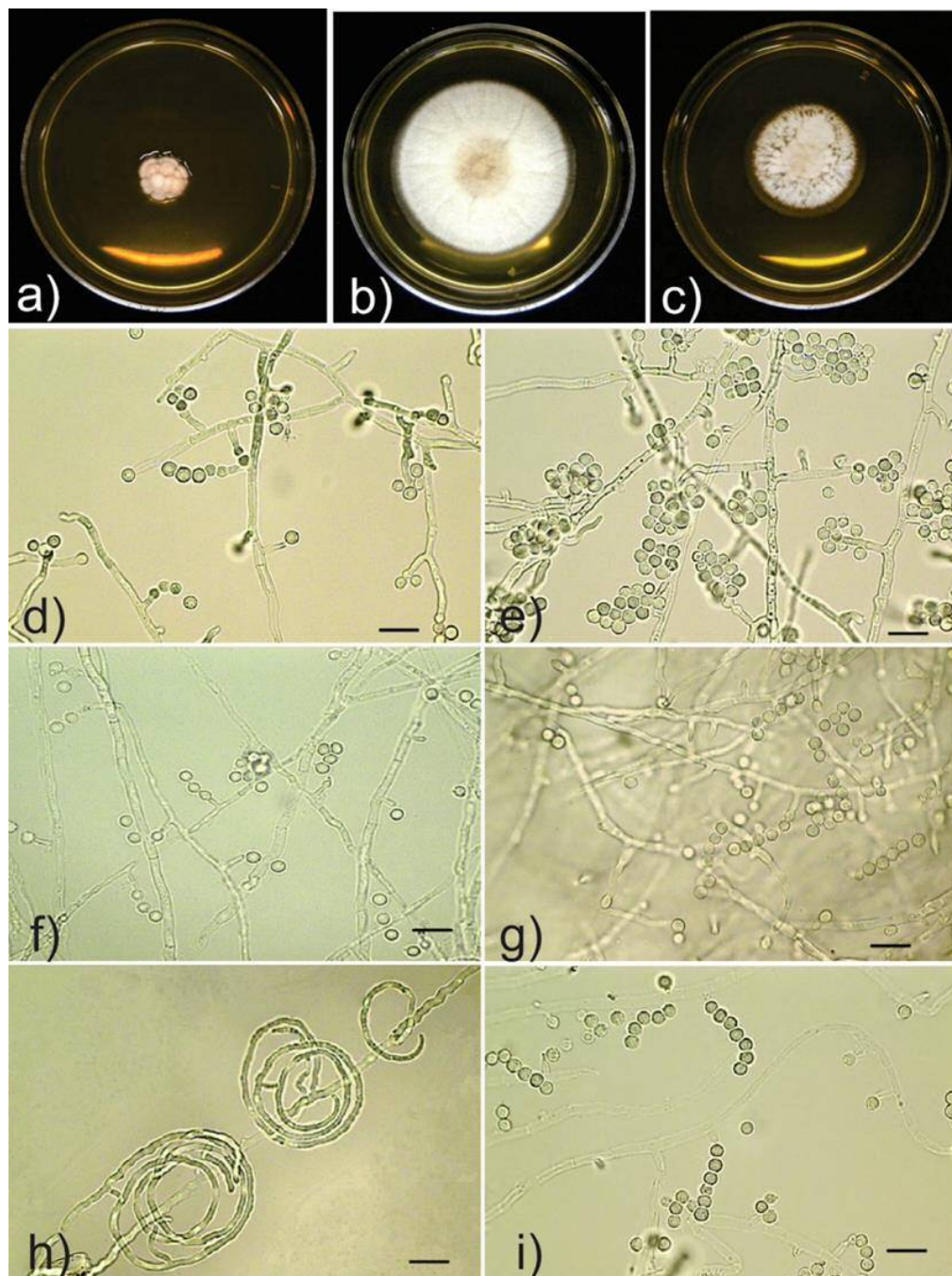


Figura 2. *Aspergillus loretoensis* (CM-CNRG 624) en YPD agar. Colonia creciendo en diferentes concentraciones de NaCl: **a)** 4%, **b)** 15%, **c)** 25%. **d)** fálides produciendo cadenas de conidios al 4%; **e)** fiálides produciendo conidios en racimos al 4%; **f)** y **g)** fiálides con conidios en cadenas al 15%; **h)** hifas creciendo en espirales al 25%; **i)** fiálides produciendo cadenas de conidios al 25%. Barras = 10 μm.

V.I.III. degradación de sustratos

El análisis bioquímico demostró que la cepa CM-CNRG 624 fue capaz de degradar lignina, almidón y ligeramente quitina. No se encontró degradación de lípidos celulosa y proteínas (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las actividades enzimáticas de *A. loretoensis* con micromicetos relacionados.

	<i>A. loretoensis</i> CM-CNRG 624	<i>A. salinarus</i> Greiner et al. 2014	<i>A. salinarus</i> Martinelli et al. 2017	<i>A. atacamensis</i> Martinelli et al. 2017	<i>A. salisburgensis</i> Martinelli et al. 2017
Lípidos	-	-	+/-	+	+
Lignina	+	-	NA	NA	NA
Quitina	+/-	-	NA	NA	NA
Celulosa	-	+	+	-	+
Proteína	-	+	-	-	+/-
Almidón	+/-	+	-	+	+/-

V.I.IV. identificación molecular

El análisis de Blast de la región ITS 1-2 de la cepa CM-CNRG 624 (Número de acceso del Genbank (NAGB): K236325.1) muestra una similitud entre *Aspergillus baarnensis* (NAGB: KY980621.1; valor de E 5e-94, 97% de identidad y 80% de cobertura) y con *A.*

salinarus (NAGB: NR_157473.1; valor de E 3e-91, 96% de identidad y 80% de cobertura). En relación a los datos de bootstrap, CM-CNRG 624 fue similar a *A. baarnensis* con un soporte del 50% (Figura 3).

El gen RPB1 de la cepa (NAGB: MK312161) fue similar a *A. vadensis* (NAGB: XM_025705365.1; valor de E 0.0, 81% de identidad y 90% de cobertura), *A. salinarus* (NAGB: KY704175.1; valor de E 0.0, 96% de identidad y 24% de cobertura) y con *A. baarnensis* (NAGB: JN121666.1; valor de E 0.0, 97% de identidad y 16% de cobertura). El análisis de bootstrap colocó a CM-CNRG 624 cercana *A. salinarus* con soporte del 65% (Figura 4-a).

El gen TSR1 de la cepa CM-CNRG 624 (NAGB: MK312164) mostró una similitud con *A. salinarus* (NAGB: KJ855528.1; con un valor de E 0.0, 95% de identidad y 87% de cobertura) y con *A. baarnensis* (NAGB KY980518.1; valor de E-value 0.0, 95% de identidad y and 78% de cobertura). El análisis de bootstrap ubicó a la cepa CM-CNRG 624 cerca de *A. salinarus* con un soporte del 33% (Figura 4-b).

El gen RPB de la cepa CM-CNRG 624 RPB2 (NAGB: MK312162) demostró una similitud con to *A. salinarus* (NAGB: KY704176.1; valor de E 0.0, 97% de identidad) y con *A. baarnensis* (NAGB: KY980450.1; valor de E-value 0.0, 97% de identidad), sin embargo, la cobertura se ubicó en 26% y 22%, respectivamente. El análisis de bootstrap agrupó a la cepa CM-CNRG 624 en el mismo clado que *A. baarnensis* con un soporte del 36% (Figure 4-c).

El gen Cct8 de la cepa CM-CNRG 624 (NAGB: MK309401) fue similar que *A. salinarus* (NAGB: KY704179.1; con un valor de E 0.0, 97% de identidad y 69% de cobertura) y con *A. baarnensis* (NAGB: JN121910.1; con un valor de E de 0.0, 97% de identidad y 37% de cobertura). El análisis de bootstrap colocó a la cepa CM-CNRG 624 cerca de *A. baarnensis* con un soporte del 52% (Figura 4-d).

El gen BenA de la cepa CM-CNRG 624 (NAGB: MK309399) mostró más similitud con *A. mundensis* (NAGB: XM_026764535.1; con un valor de E 0.0, 89% de identidad y 100% de cobertura) que con *A. baarnensis* (NAGB: KY980553.1; valor de E 4e-75, 99% de identidad y

19% de cobertura) y con *A. salinarus* (NAGB: KY704177.1; valor de E 4e-80, 98% de identidad y 22% de cobertura). El análisis de bootstrap demostró que CM-CNRG 624 se encuentra cerca de *A. baarnensis* con un soporte del 75% (Figura 4-e).

Del mismo modo la especie que resultó con una mayor similitud con la cepa CM-CNRG 624 en el análisis de Blast del gen CaM (NAGB: MK309400) fue *A. candidus* (NAGB: LT626978.1; valor de E 7e-118, 88% de identidad y 81% de cobertura). Se comparó una secuencia de DNA de 339 pb de la cepa CM-CNRG 624 con *A. baarnensis* (NAGB: KY980585.1) obteniendo un valor de E-value 2e-105, 99% de identidad y un 83% de cobertura. Así mismo se comparó una secuencia de DNA de 124 pb de CM-CNRG 624 con *A. salinarus* (NAGB: KY980583.1) obteniendo un valor de E 2E-105, 99% de identidad y 83% de cobertura. El análisis de bootstrap colocó en el mismo clado a *A. salinarus*, *A. baarnensis* y a CM-CNRG 624 con un soporte del 95% bootstrap (Figura 4-f).

El análisis del gen Top1 muestra que la cepa CM-CNRG 624 (NAGB: MK312163) se encuentra cerca de *A. baarnensis* (NAGB: KY980486.1; valor de E 0.0, 84% de identidad y 92% cobertura) y con *A. salinarus* (NAGB: KY980479.1; valor de E 0.0, 83% de identidad y 81% de cobertura). El análisis de bootstrap ubica a

CM-CNRG 624 con *A. baarnensis* y con *A. salinarus* con un soporte del 87%, sin embargo, el clado no se encuentra bien consolidado (Figure 4-h).

Finalmente, las secuencias de los genes: TOP1 (NAGB: MK312163), GAPDH (NAGB: MK312160), Gamma actina (NAGB: MK309403), y Ef1a (GBAN: MK309402) fueron sometidos a análisis de Blast, sin embargo, en el caso de TOP1, las secuencias encontradas del subgénero *Polypaecilum* eran escasas y en relación a los demás genes no se encontraron secuencias para realizar el análisis filogenético. Las secuencias de todos los genes analizados de la cepa CM-CNRG 624 fueron depositados en el Genbank. Los resultados de los análisis se encuentran resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Información del análisis de Blast.

Locus	Especies	No. de Genbank	Valor de E	Identidad	Cobertura	Especie más relacionada	Bootstrap (Porcentaje)
ITS1-2	<i>A. baarnensis</i>	KY980621.1	5.00E-94	97	80	<i>A. baarnensis</i>	50
	<i>A. salinarus</i>	NR_157473.1	3.00E-91	96	80		
RPB1	<i>A. vadensis</i>	XM_025705365.1	0.00	81	90	<i>A. salinarus</i>	65
	<i>A. salinarus</i>	KY704175.1	0.00	96	24		
	<i>A. baarnensis</i>	JN121666.1	0.00	97	16		
RPB2	<i>A. fumigatus</i>	AY485610.1	0.00	63	81	<i>A. baarnensis</i>	36
	<i>A. salinarus</i>	KY704176.1	0.00	97	26		
	<i>A. baarnensis</i>	KY980450.1	0.00	97	22		
Cct8	<i>A. salinarus</i>	KY704179.1	0.00	97	69	<i>A. baarnensis</i>	52
	<i>A. baarnensis</i>	JN121910.1	0.00	97	37		
TSR1	<i>A. salinarus</i>	KJ855528.1	0.00	95	87	<i>A. salinarus</i>	33
	<i>A. baarnensis</i>	KY980518.1	0.00	95	78		
CaM	<i>A. candidus</i>	LT626978.1	7.00E-118	88	81	<i>A. salinarus</i>	95
	<i>A. baarnensis</i>	KY980585.1	2.00E-105	99	83	<i>A. baarnensis</i>	95
	<i>A. salinarus</i>	KY980583.1	2.00E-105	99	83		
BenA	<i>A. mundensis</i>	XM_026764535.1	0.00E+00	89	100	<i>A. baarnensis</i>	75
	<i>A. baarnensis</i>	KY980553.1	4.00E-75	99	19		
	<i>A. salinarus</i>	KY704177.1	4.00E-80	98	22		

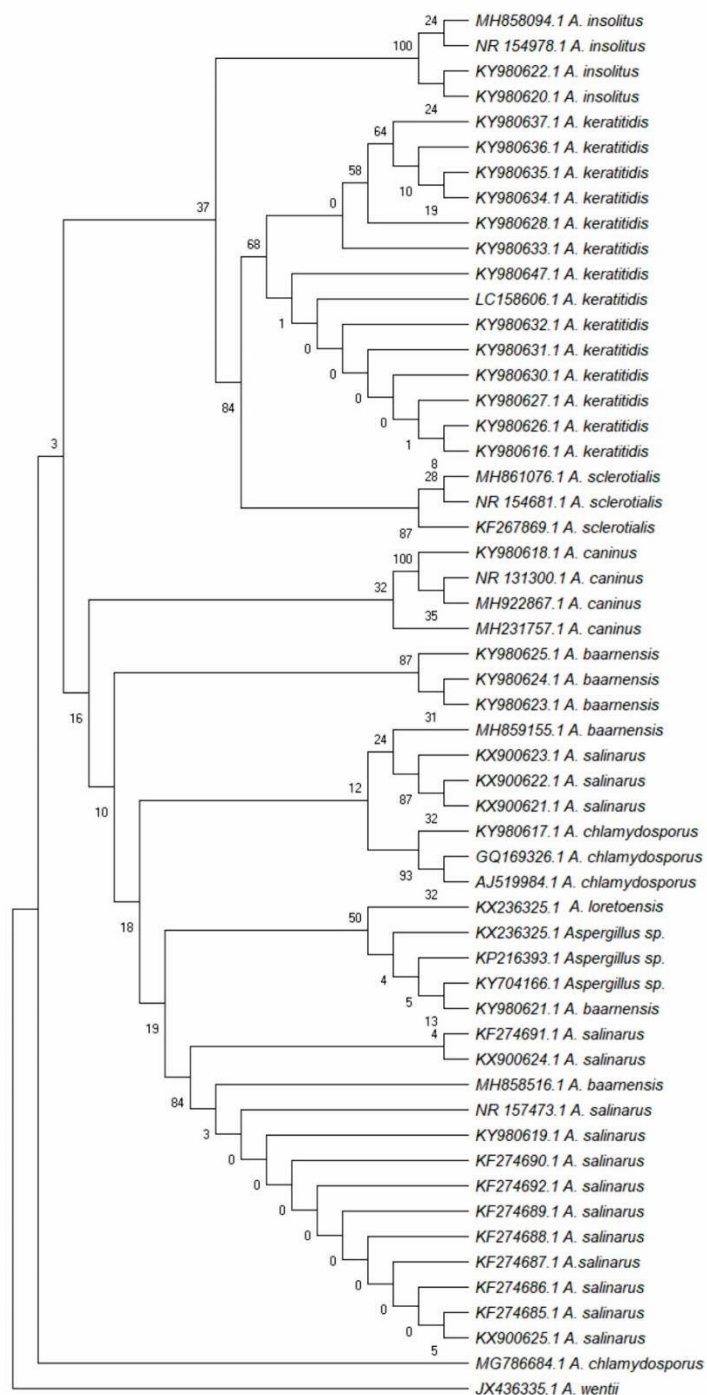


Figura 3. Árbol filogenético de la región ITS 1-2 basado en el método de máxima similitud, con valores de bootstrap expresados en porcentaje. Los nombres de los taxones se encuentran precedidos por el NAGB. *Aspergillus wentii* fue utilizado como grupo externo.

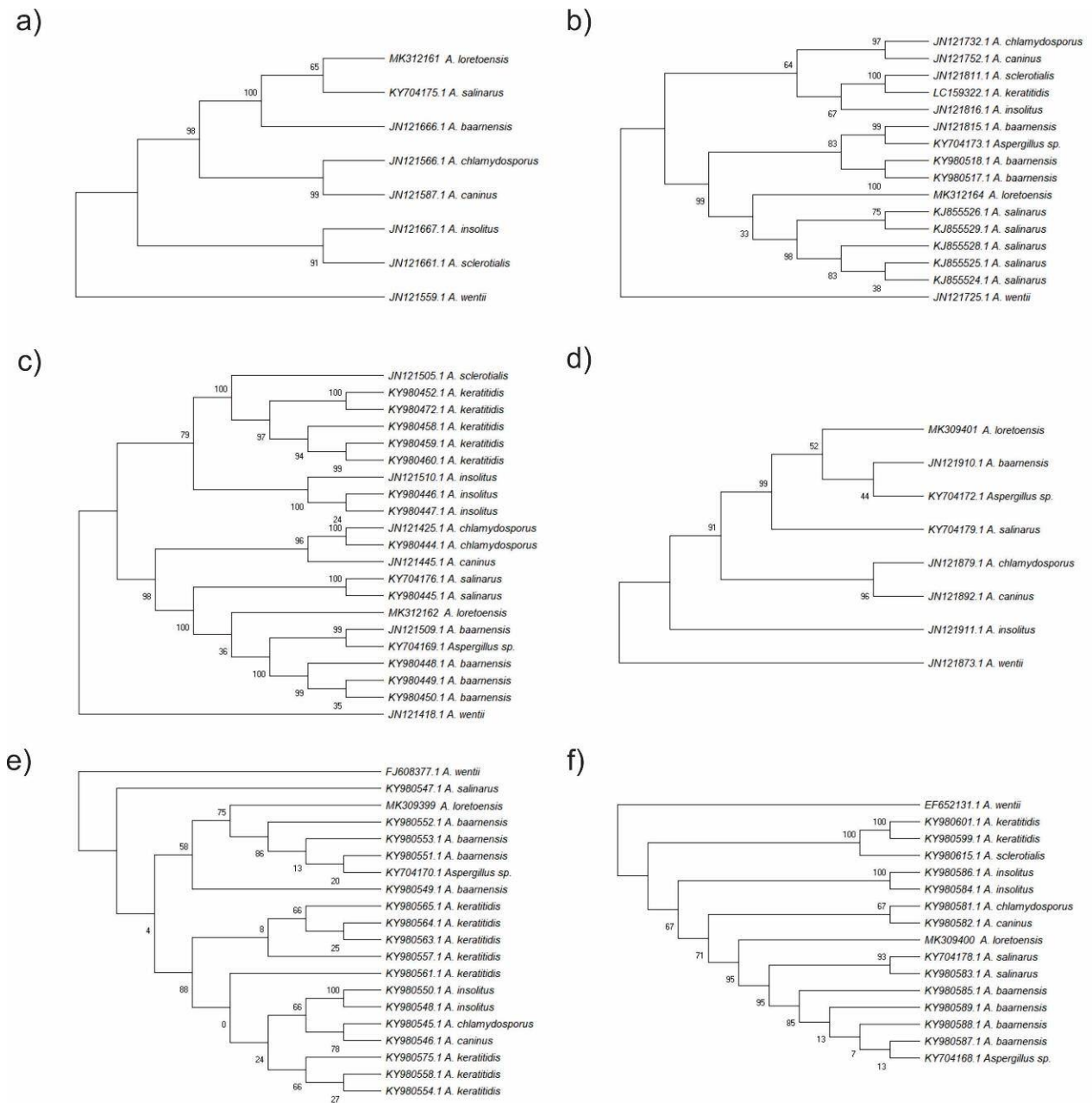


Figura 4. Árboles filogenéticos basados en el método de máxima similitud, con valores de bootstrap expresados en porcentaje provenientes de diferentes secuencias: **a)** RPB1; **b)** TSR1; **c)** RPB2; **d)** Cct8; **e)** BenA; **f)** CaM. Los nombres de los taxones se encuentran precedidos por el NAGB. *Aspergillus wentii* fue utilizado como grupo externo.

V.I.V. Taxonomía

Aspergillus loretoensis, González-Martínez and Portillo-López, sp. nov.

MycoBank MB830181

(Figura 2)

Etimología: Del latín *loretoensis* perteneciente a la Bahía de Loreto (Baja California Sur, México) en donde esta especie fue aislada y descubierta.

Descripción: Las colonias crecen más rápido en el medio YPD con 15% NaCl, presentan una textura aterciopelada polvosa de color blanco al 15% y 25% NaCl. Las colonias al 4% tienen un aspecto granular de color marfil. No se observó crecimiento en medio sin NaCl. Con 15% NaCl las hifas se observaron septadas con crecimiento recto y ramificaciones con medidas de 4.9 - 25.8 μm entre septos ($\bar{x}$ 11.44) y 1.4 - 2.8 μm de ancho ($\bar{x}$ 2.26). Las células conidiógenas se presentaron en fiálides simples con crecimiento lateral en un conidióforo corto y sin ramificaciones. Las fiálides eran hialinas, cilíndricas y rectas midiendo de 3.4 - 6.7 μm de largo ($\bar{x}$ 4.75) y 1.1 - 2.5 μm de ancho ($\bar{x}$ 1.88). Los conidios se presentaron en cadenas largas, ocasionalmente en cabezas en forma de racimo, con una forma globosa y subglobosa. El diámetro de cada conidio fue de 2.5 - 3.9 μm ($\bar{x}$ 3.28) y el largo de la cadena fue de 13.1 - 26.8 μm de largo ($\bar{x}$ 18.95). No se observaron ascocarpos, esclerocios ni clamidosporas. Al 4% y 25% NaCl las estructuras tuvieron medidas similares (tabla 2), se presentaron algunas diferencias en cuanto a las formas. Al 25% NaCl algunas hifas crecieron de una

forma curvada a espiral (Figura 2-h, 2-i) y al 4% NaCl los conidios crecieron principalmente en forma de racimos (figura 2-c). Las medidas de todas las condiciones se presentan en la tabla 5.

Ecología: *A. loretoensis* fue aislada de sedimentos marinos procedentes de la Bahía de Loreto, Baja California Sur, México, a 275 m de profundidad (coordenadas 25° 89' 14" N 111° 25' 09" W). Se encontró junto con *Cladosporium* sp. In vitro los cultivos exhibieron crecimiento en medio con YPD a 28°C con una concentración de sal de entre 4-25%. Bajo las mismas condiciones *A. loretoensis* presentó un crecimiento más lento en medio MEA.

A. loretoensis presentó fiálides más cortas en comparación con las especies que resultaron más cercanas, *A. baarnensis* y *A. salinarus*. Por otro lado, no se observó la presencia de clamidosporas, las cuales se han observado en *A. salinarus*, *A. atacamensis*, *A. salisburgensis* y *A. chlamydosporus*. La forma de los conidios (globosa y subglobosa) así como la presencia de conidios en racimos de uvas no se ha observado en *A. baarnensis*. A diferencia de *A. sclerotialis* no se presentaron esclerocios. En comparación con *A. keratitidis* las fiálides fueron más cortas y a diferencia de *A. caninus* no fue capaz de crecer sin NaCl en el medio. Las características comunes que comparte con todos los miembros del subgénero *Polypaecilum* es que los conidios son producidos en fiálides simples en cadenas largas y en el ancho de las hifas.

Tabla 5. Mediciones de la morfología microscópica al 4, 15 y 25% de NaCl.

Concentración NaCl (porcentaje)		Hifa		Fiálides		Conidios	
		Largo entre septos (μ m)	Ancho (μ m)	Largo (μ m)	Ancho (μ m)	Diámetro (μ m)	Largo de cadena (μ m)
4	min-max	4.7-29.7	1.6-3.5	2.2-11.6	1.2-2.9	2.5-4.3	11.5-27.2
	$\bar{X}$	11.44	2.39	5.95	1.93	3.49	18.43
15	min-max	4.9-25.8	1.4-2.8	3.4-6.7	1.1-2.5	2.5-3.9	13.1-26.8
	$\bar{X}$	12.03	2.26	4.75	1.88	3.28	18.95
25	min-max	6.5-31	1.6-3.6	1.6-7.7	1.2-2.4	2.3-4.1	20.7-30
	$\bar{X}$	12.18	2.47	4.51	1.76	3.24	23.51

V.II. Transcriptoma

V.II.I. Análisis del transcriptoma

Del transcriptoma de *A. loretoensis* al 4% NaCl se generaron 12,832,262 lecturas de extremos pareados y del 15% NaCl 10,986,333. En ambos tratamientos el largo de las lecturas estuvo entre 35-76 pb con un contenido de GC del 60%.

El ensamble del transcriptoma generó 15,132 transcritos con 10,507 genes putativos. La mediana del largo de los contigs fue de 1,525 pb de un total de 28,887,258 de bases ensambladas. La mediana del isoforma más larga por gen putativo fue de 1,175 pb.

V.II.II. Análisis de expresión diferencial

Un total de 664 genes fueron sobre expresados (344 al 4% NaCl y 320 al 15% NaCl), de estos 476 con anotaciones (278 para el 4% NaCl y 198 para 15% NaCl) y 188 no tuvieron anotación (figura 5 b y c). Ninguno de los genes se encontró

sobre expresado bajo la misma condición (figura 5 a). En la figura 6 se pueden apreciar en rojo los genes que se están expresando diferencialmente de manera significativa. Lo anterior se complementa en la figura 7 en la cual se observa un mapa de calor con los genes sobre o sub expresados en forma de $\log_2$ recuentos de lectura de genes normalizados. Las tres réplicas de cada condición muestran la misma expresión de genes. Mientras que un grupo de genes fue sobre expresado en una condición (en amarillo) y que fue sub expresado en la otra (morado).

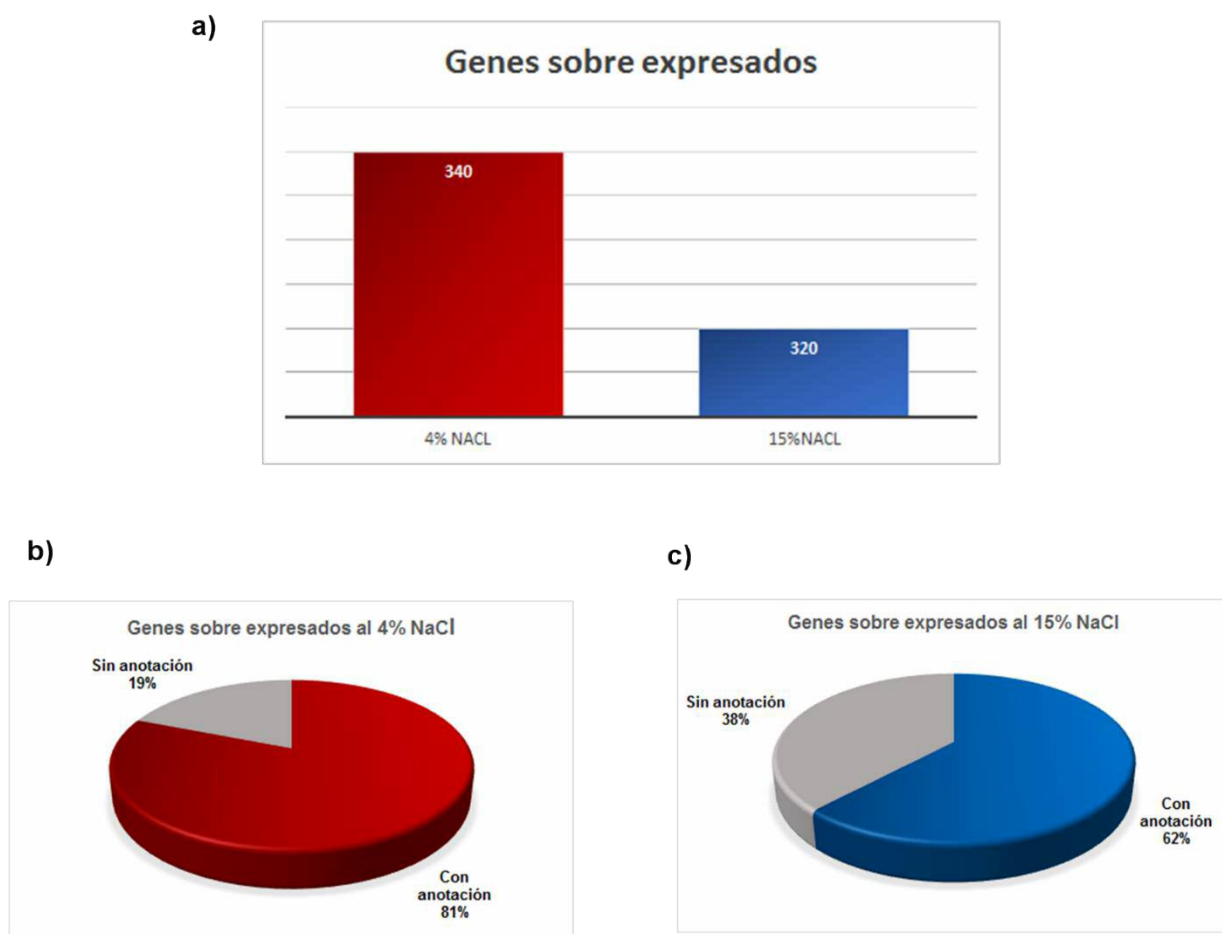


Figura 5. Número de genes sobre-expresados: a) 4% y 15% de NaCl; b) anotados y no anotados 4% NaCl; c) anotados y no anotados 15% NaCl.

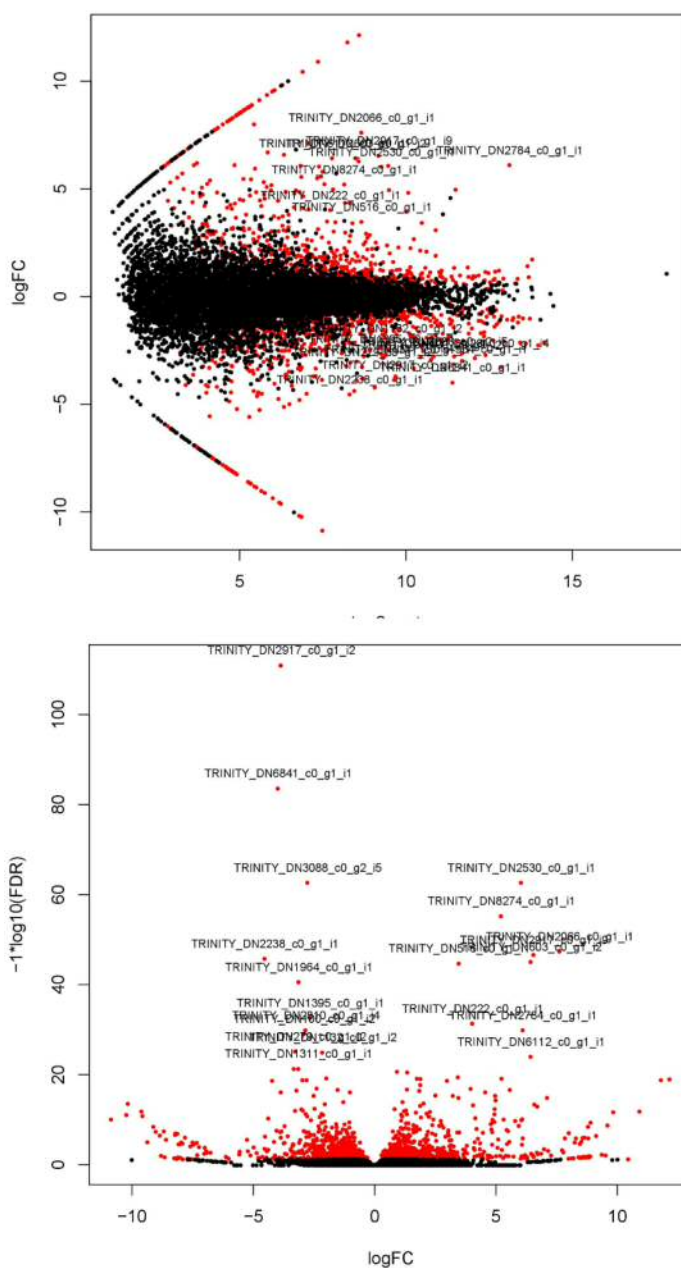


Figura 6. Representación gráfica de la expresión diferencial de genes bajo las condiciones de 4% vs 15% NaCl. En la gráfica superior: tasa de expresión diferencial $\log_2$ contra la media. En la gráfica inferior: volcán representando en rojo los genes expresados significativamente de forma diferencial ($p=0.05$).

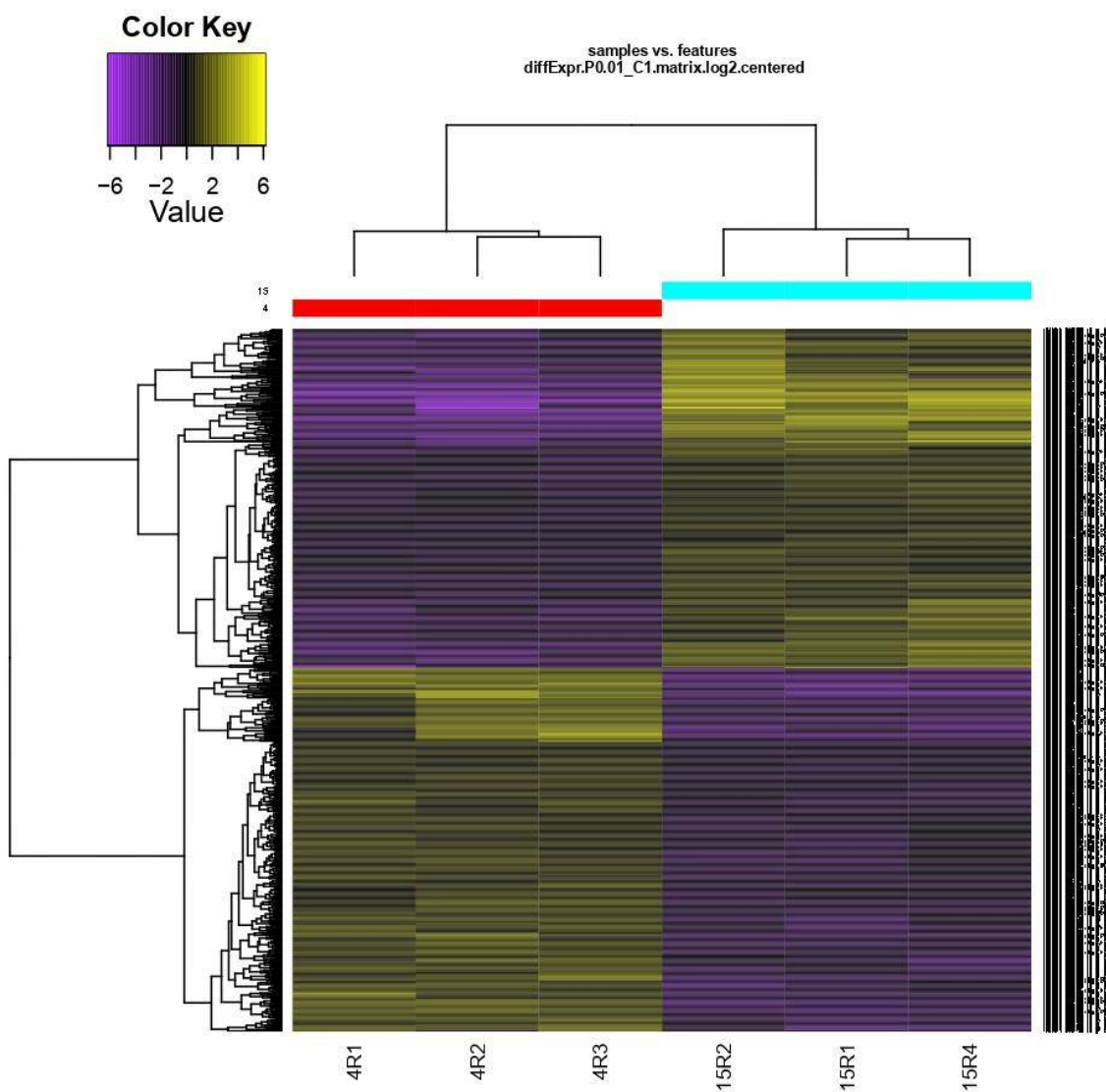


Figura 7. Mapa de calor. Del lado izquierdo bajo la barra roja se encuentran las 3 repeticiones de la prueba al 4% NaCl. Del lado derecho bajo la barra verde azul se encuentran las 3 repeticiones de la prueba a 15% NaCl. En morado se encuentran los genes sub expresados y en amarillo se encuentran los genes sobre expresados.

V.II.III. Ontología de genes y anotación

Con base en el enriquecimiento de la ontología de genes (OG) en las categorías nivel 2 se encontró que en los procesos biológicos (figura 8-a) el 30% de los genes se encontraban relacionados a procesos celulares, 27% a procesos metabólicos, 10% a regulación biológica, 9% en la organización de componentes celulares o a la biogénesis, 9% a la regulación de procesos biológicos, 9% a la localización y 7% a la respuesta a estímulos. En cuanto a los componentes celulares (figura 8-b) 24% de los genes estuvieron relacionados a la célula, 24% a componentes celulares, 18% a los organelos, 11% a componentes de los organelos, 8% a la membrana, 7% a complejos proteicos, 4% como componentes de membrana, 4% a lumen cubierto de membrana. Para las funciones moleculares (figura 9) 54% de los genes estuvieron relacionados a actividades catalíticas, mientras que 46% estuvieron relacionados a uniones. En la tabla 6 se encuentra la OG de genes sobre expresados al 4% NaCl nivel 2, encontrando lo siguiente: procesos biológicos: GO:0042221 respuesta a químicos, GO:1902578 localización de un solo organismo, GO:0051234 establecimiento de localización, GO:0044763 proceso celular de un solo organismo; en componentes celulares: GO:0098805 membrana completa, GO:0005886 membrana plasmática, GO:0071944 periferia celular, GO:0044425 partes de la membrana, GO:0031224 componentes intrínsecos de la membrana; En funciones moleculares: GO:0003700 actividad del factor de transcripción, unión específica de una secuencia de ADN, GO:0022857 actividad de transporte transmembranal,

GO:0043167 unión iónica. En la tabla 7 se encuentra la OG sobre expresados al 15% NaCl nivel 2, encontrando lo siguiente: procesos biológicos: GO:0051234 establecimiento de localización; componentes celulares: GO:0044459 partes de la membrana plasmática, GO:0005886 membrana plasmática; funciones celulares: GO:1901476 actividad de transporte de carbohidratos, GO:0022892 actividad específica de transporte de sustratos

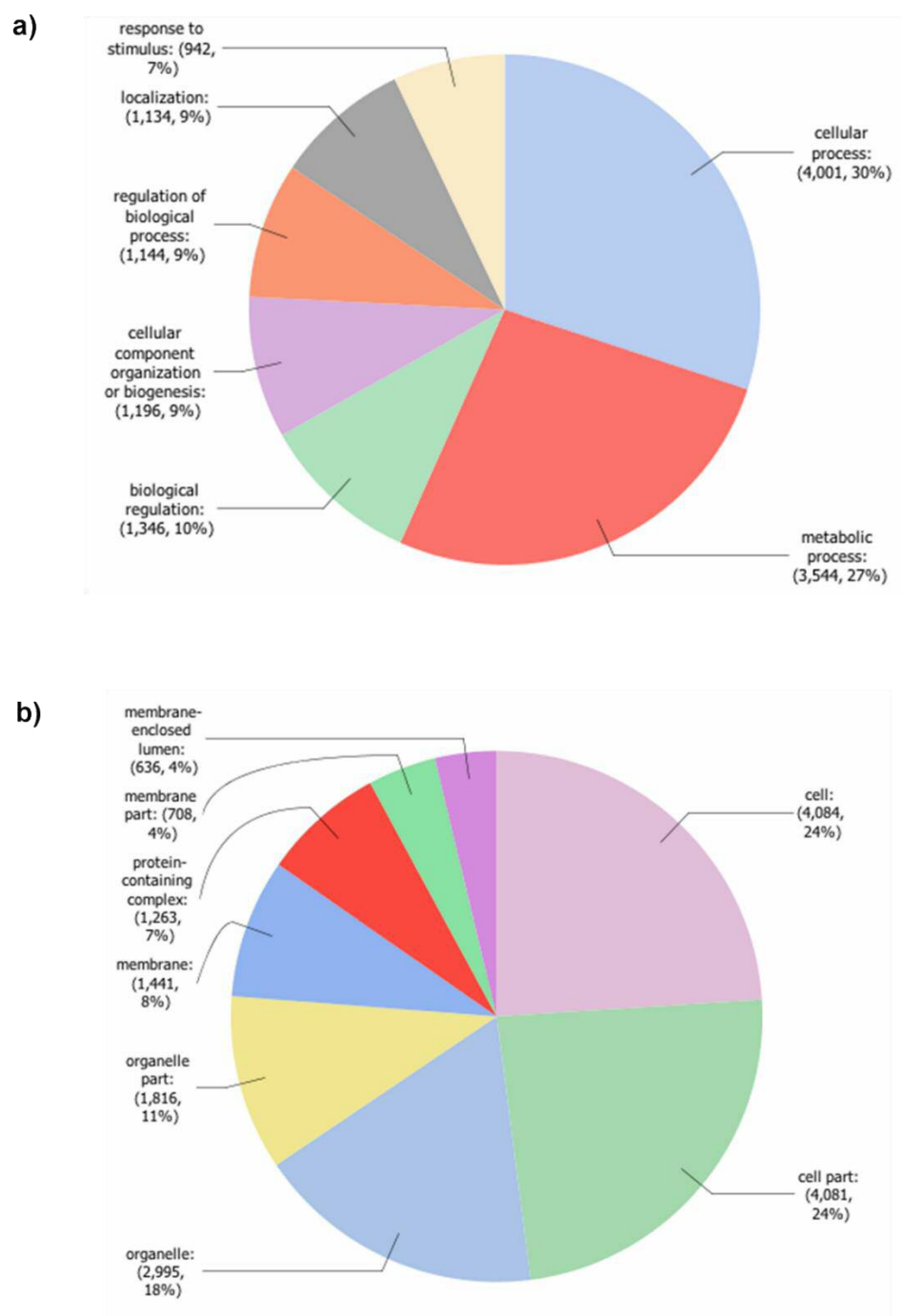


Figura 8. Ontología de genes en nivel 2. a) procesos biológicos; b) componentes celulares.

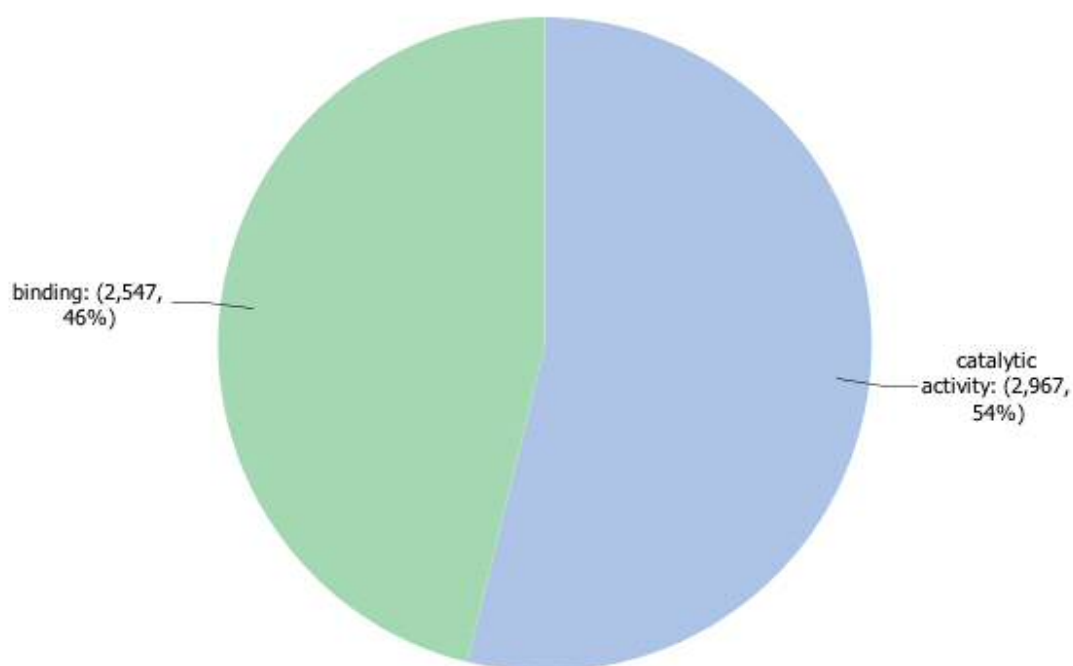


Figura 9. Ontología de genes nivel 2 de las funciones moleculares

En la tabla 6, se presentan los genes sobre expresados al 4% NaCl resultantes del enriquecimiento en David (Huang et al., 2009) en cada OG a nivel 2. Por otro lado, en la tabla 7 se encuentran los genes sobre expresados al 15% NaCl resultantes del enriquecimiento en David (Huang et al., 2009) para cada OG a nivel 2. Complementando la información anterior, se presenta la anotación de genes realizada en String (Szklarczyk *et al.*, 2015), así como la interacción de los mismos al 4% NaCl (figura 10, tabla 8) y al 15% (figura 11, tabla 9).

Tabla 6. Genes sobre expresados al 4% NaCl por cada Ontología de Genes nivel 2.

GO Category	Term	Genes	P Value	Fold Enrichment	FDR
Biological process	GO:0042221 response to chemical	SNQ2_YEAST, ASG1_YEAST, ARR2_YEAST, ZRC1_YEAST, UGA2_YEAST, GAL4_YEAST, YJU6_YEAST, SODM_YEAST, YO075_YEAST	0.0023	3.47	2.16
	GO:1902578 single organism localization	ZRT2_YEAST, OAC1_YEAST, YME1_YEAST, ZRC1_YEAST, PMA1_YEAST, MCH4_YEAST, SNQ2_YEAST, SIT1_YEAST, YO075_YEAST	0.0474	2.06	37.37
	GO:0051234 establishment of localization	ZRT2_YEAST, OAC1_YEAST, YME1_YEAST, ZRC1_YEAST, PMA1_YEAST, VPS62_YEAST, SNQ2_YEAST, MCH4_YEAST, SRC1_YEAST, TDA6_YEAST, YO075_YEAST, SIT1_YEAST	0.0447	1.75	35.62
	GO:0044763 single-organism cellular process	ZRT2_YEAST, ZRC1_YEAST, YME1_YEAST, GAL4_YEAST, PMA1_YEAST, DPP1_YEAST, RPE_YEAST, YI31B_YEAST, SNQ2_YEAST, ARO80_YEAST, UGA2_YEAST, ACE2_YEAST, YJU6_YEAST, ALAM_YEAST, SRC1_YEAST, YG31B_YEAST, BUD2_YEAST, MCH4_YEAST, ASG1_YEAST, SIT1_YEAST, OAC1_YEAST, SODM_YEAST, YO075_YEAST	0.0046	1.45	4.39

Cellular Component	GO:0098805 whole membrane	DPP1_YEAST, VPS62_YEAST, PMA1_YEAST, MCH4_YEAST, YO075_YEAST, SIT1_YEAST, ZRC1_YEAST	0.0331	2.70	24.91
	GO:0005886 plasma membrane	ZRT2_YEAST, BUD2_YEAST, DPP1_YEAST, YO075_YEAST, PMA1_YEAST, SIT1_YEAST, SNQ2_YEAST	0.0294	2.78	22.45
	GO:0071944 cell periphery	ZRT2_YEAST, YO075_YEAST, DPP1_YEAST, MCH4_YEAST, PMA1_YEAST, TDA6_YEAST, SNQ2_YEAST, SIT1_YEAST, BUD2_YEAST	0.0236	2.35	18.43
	GO:0044425 membrane part	ZRT2_YEAST, OAC1_YEAST, YME1_YEAST, ZRC1_YEAST, PMA1_YEAST, VPS62_YEAST, SNQ2_YEAST, DPP1_YEAST, BUD2_YEAST, MCH4_YEAST, SRC1_YEAST, TDA6_YEAST, YO075_YEAST, SIT1_YEAST	0.0188	1.79	14.96
	GO:0031224 intrinsic component of membrane	ZRT2_YEAST, ZRC1_YEAST, PMA1_YEAST, VPS62_YEAST, SNQ2_YEAST, DPP1_YEAST, BUD2_YEAST, MCH4_YEAST, SRC1_YEAST, TDA6_YEAST, YO075_YEAST, SIT1_YEAST, OAC1_YEAST	0.0113	2.00	9.20

Molecular Function	GO:0003700 transcription factor activity, sequence- specific DNA binding	ACE2_YEAST ASG1_YEAST ARO80_YEAST GAL4_YEAST YJU6_YEAST	0.0196	4.54	14.36
	GO:0022857 transmembrane transporter activity	ZRT2_YEAST, OAC1_YEAST, PMA1_YEAST, ZRC1_YEAST, SNQ2_YEAST, MCH4_YEAST, YO075_YEAST, SIT1_YEAST	0.0023	3.94	1.81
	GO:0043167 ion binding	YME1_YEAST, YG31B_YEAST, PMA1_YEAST, FMP41_YEAST, YI31B_YEAST, YJU6_YEAST, ACE2_YEAST, ASG1_YEAST, RPE_YEAST, GAL4_YEAST, RO80_YEAST, SODM_YEAST ALAM_YEAST	0.0009	2.63	0.74

Tabla 7. Genes sobre expresados al 15%NaCl por cada Ontología de Genes nivel 2.

GO Category	Term	Genes	P Value	Fold Enrichment	FDR
Biological Process	GO:0051234 establishment of localization	MAL11_YEAST, COG3_YEAST, GVP36_YEAST, YMB8_YEAST, PIL1_YEAST, HXT13_YEAST, ZRT1_YEAST, YCR3_YEAST, CYB2_YEAST, TPN1_YEAST, STL1_YEAST	0.023037	1.96532201	18.8828461
Cellular Component	GO:0044459 plasma membrane part	MAL11_YEAST, STL1_YEAST, ZRT1_YEAST, HXT13_YEAST	0.033001	5.35286041	24.6741104
	GO:0005886 plasma membrane	MAL11_YEAST, STL1_YEAST, PIL1_YEAST, HXT13_YEAST, ZRT1_YEAST, TPN1_YEAST	0.04825	2.79407549	34.1345742
Molecular Function	GO:1901476 carbohydrate transporter activity	MAL11_YEAST, HXT13_YEAST, STL1_YEAST	0.00895	19.6337838	6.51569633
	GO:0022892 substrate specific transporter activity	MAL11_YEAST, COG3_YEAST, ZRT1_YEAST, HXT13_YEAST, STL1_YEAST, TPN1_YEAST	0.019498	3.48417266	13.7197876

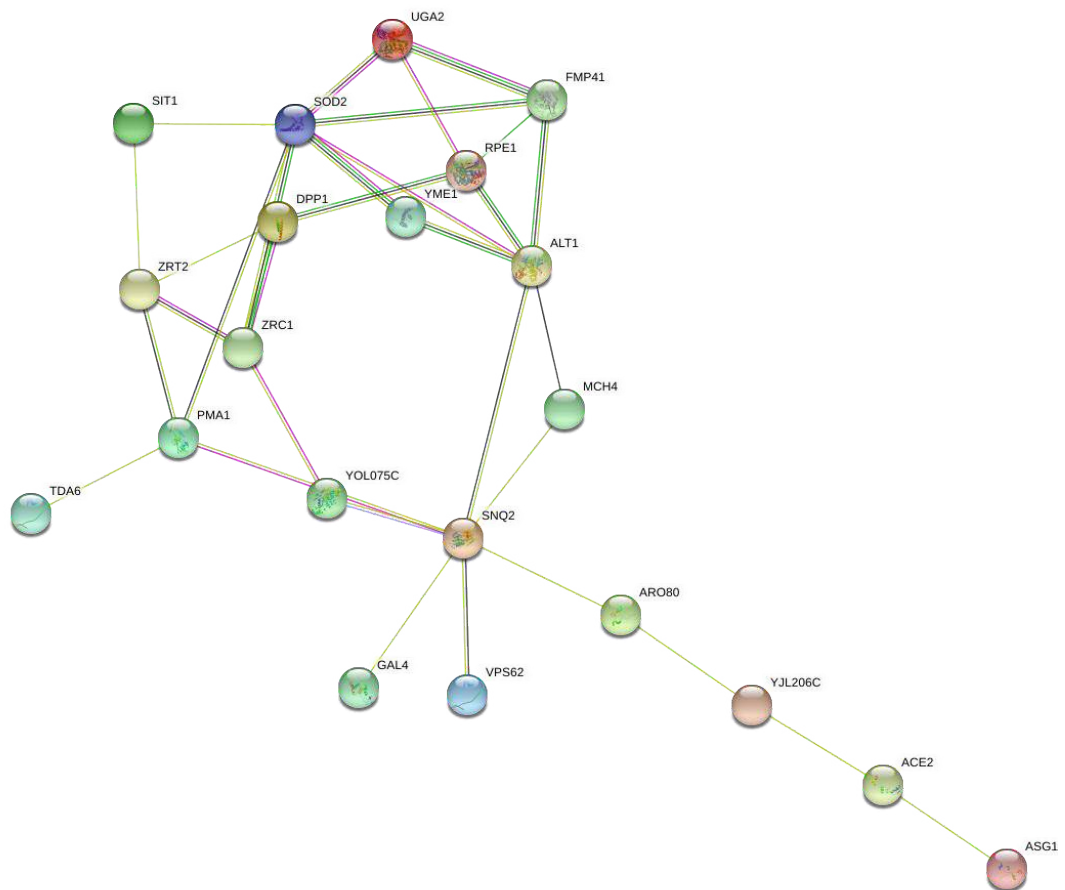


Figura 10. Interacciones de los genes sobre expresados al 4% NaCl

Tabla 8. Anotación de los genes sobre expresados al 4% NaCl

Node (gene)	Annotation
DPP1	Diacylglycerol pyrophosphate (DGPP) phosphatase; zinc-regulated vacuolar membrane-associated lipid phosphatase, dephosphorylates DGPP to phosphatidate (PA) and Pi, then PA to diacylglycerol; involved in lipid signaling and cell metabolism
ZRC1	Zinc/cadmium resistance protein; Vacuolar membrane zinc transporter; transports zinc from cytosol to vacuole for storage; also has role in resistance to zinc shock resulting from sudden influx of zinc into cytoplasm; human ortholog SLC30A10 functions as a Mn transporter and mutations in SLC30A10 cause neurotoxic accumulation of Mn in liver and brain; ZRC1 has a paralog, COT1, that arose from the whole genome duplication
RPE1	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase; catalyzes a reaction in the non-oxidative part of the pentose-phosphate pathway; mutants are sensitive to oxidative stress
YOL075C	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein/permease YOL075C; Putative ABC transporter
TDA6	Putative protein of unknown function; induced by treatment with 8-methoxypsoralen and UVA irradiation; null mutant is sensitive to expression of the top1-T722A allele; SWAT-GFP and mCherry fusion proteins localize to the cell periphery and vacuole; TDA6 has a paralog, VPS62, that arose from the whole genome duplication
SRC1	Inner nuclear membrane protein; highly enriched at telomeres and subtelomeric regions; functions in regulation of subtelomeric genes and is linked to TREX (transcription export) factors; SRC1 produces 2 splice variant proteins with different functions; alternative splicing of SRC1 pre-mRNA is promoted by Hub1p; mutant has aneuploidy tolerance; SEC1 has a paralog, HEH2, that arose from the whole genome duplication
ASG1	Activator of stress genes 1; Zinc cluster protein proposed to be a transcriptional regulator; regulator involved in the stress response; null mutants have a respiratory deficiency, calcofluor white sensitivity and slightly increased cycloheximide resistance; Belongs to the ASG1 family
ARO80	Zinc finger transcriptional activator of the Zn2Cys6 family; activates transcription of aromatic amino acid catabolic genes in the presence of aromatic amino acids
YME1	Catalytic subunit of i-AAA protease complex; complex is located in mitochondrial inner membrane; responsible for degradation of unfolded or misfolded mitochondrial gene products; serves as nonconventional translocation motor to pull PNPase into intermembrane space; also has role in intermembrane space protein folding; mutation causes elevated rate of mitochondrial turnover; human homolog YME1L1 can complement yeast null mutant; In the C-terminal section; belongs to the peptidase M41 family
PMA1	Plasma membrane P2-type H ⁺ -ATPase; pumps protons out of cell; major regulator of cytoplasmic pH and plasma membrane potential; long-lived protein asymmetrically distributed at plasma membrane between mother cells and buds; accumulates at high levels in mother cells during aging, buds emerge with very low levels of Pma1p, newborn cells have low levels of Pma1p; Hsp30p plays a role in Pma1p regulation; interactions with Std1p appear to propagate [GAR ⁺]
ACE2	Metallothionein expression activator; Transcription factor required for septum destruction after cytokinesis; phosphorylation by Cbk1p blocks nuclear exit during M/G1 transition, causing localization to daughter cell nuclei, and also increases Ace2p activity; phosphorylation by Cdc28p and Pho85p prevents nuclear import during cell cycle phases other than cytokinesis; part of RAM network that regulates cellular polarity and morphogenesis; ACE2 has a paralog, SWI5, that arose from the whole genome duplication

OAC1	Mitochondrial inner membrane transporter; transports oxaloacetate, sulfate, thiosulfate, and isopropylmalate; member of the mitochondrial carrier family
ZRT2	Zinc-regulated transporter 2; Low-affinity zinc transporter of the plasma membrane; transcription is induced under low-zinc conditions by the Zap1p transcription factor
YJL206 C	Putative protein of unknown function; similar to transcriptional regulators from the Zn[2]-Cys[6] binuclear cluster protein family; mRNA is weakly cell cycle regulated, peaking in S phase; induced rapidly upon MMS treatment; Belongs to the ASG1 family
SNQ2	Protein SNQ2; Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter; multidrug transporter involved in multidrug resistance and resistance to singlet oxygen species
VPS62	Vacuolar protein sorting (VPS) protein; required for cytoplasm to vacuole targeting of proteins; VPS62 has a paralog, TDA6, that arose from the whole genome duplication
ARR2	Arsenical-resistance protein 2; Arsenate reductase required for arsenate resistance; converts arsenate to arsenite which can then be exported from cells by Arr3p
YGR10 9W-B	Transposon Ty3-G Gag-Pol polyprotein; Retrotransposon TYA Gag and TYB Pol genes; transcribed/translated as one unit; polyprotein is processed to make a nucleocapsid-like protein (Gag), reverse transcriptase (RT), protease (PR), and integrase (IN); similar to retroviral genes
SOD2	Mitochondrial manganese superoxide dismutase; protects cells against oxygen toxicity and oxidative stress; human mitochondrial SOD2 can complement a yeast null mutant and human cytoplasmic SOD1 can also complement when targeted to the mitochondrial matrix
UGA2	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] _{cyt} ; Succinate semialdehyde dehydrogenase; involved in the utilization of gamma-aminobutyrate (GABA) as a nitrogen source; part of the 4-aminobutyrate and glutamate degradation pathways; localized to the cytoplasm
BUD2	Inhibitory regulator protein BUD2/CLA2; GTPase activating factor for Rsr1p/Bud1p; plays a role in spindle position checkpoint distinct from its role in bud site selection; required for both axial and bipolar budding patterns; mutants exhibit random budding in all cell types; contains two PH-like domains
ALT1	Probable alanine aminotransferase, mitochondrial; Alanine transaminase (glutamic pyruvic transaminase); involved in alanine biosynthesis and catabolism; TOR1-independent role in determining chronological lifespan; expression is induced in the presence of alanine; repression is mediated by Nrg1p; ALT1 has a paralog, ALT2, that arose from the whole genome duplication; Alt2p is catalytically inactive; Belongs to the class-I pyridoxal-phosphate-dependent aminotransferase family. Alanine aminotransferase subfamily
FMP41	Uncharacterized mitochondrial hydrolase FMP41; Putative protein of unknown function; GFP-fusion protein is induced in response to the DNA-damaging agent MMS; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies
GAL4	Regulatory protein GAL4; DNA-binding transcription factor required for activating GAL genes; responds to galactose; repressed by Gal80p and activated by Gal3p
MCH4	Probable transporter MCH4; Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases; monocarboxylate permeases are involved in transport of monocarboxylic acids across the plasma membrane but mutant is not deficient in monocarboxylate transport
SIT1	Siderophore iron transporter 1; Ferrioxamine B transporter; member of the ARN family of transporters that specifically recognize siderophore-iron chelates; transcription is induced during iron deprivation and diauxic shift; potentially phosphorylated by Cdc28p
YIL082 W-A	Transposon Ty3-I Gag-Pol polyprotein; Retrotransposon TYA Gag and TYB Pol genes; transcribed/translated as one unit; polyprotein is processed to make a nucleocapsid-like protein (Gag), reverse transcriptase (RT), protease (PR), and integrase (IN); similar to retroviral genes

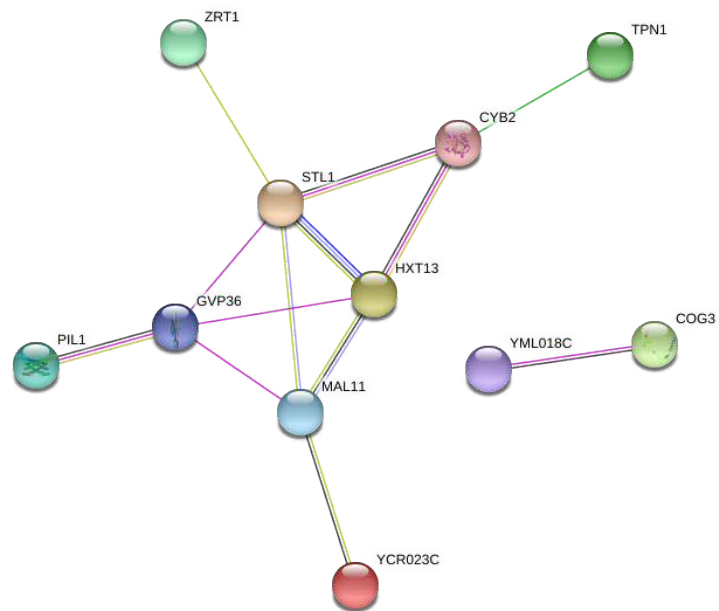


Figura 11. Interacciones de los genes sobre expresados al 15% NaCl

Tabla 9. Anotación de los genes sobre expresados al 15% NaCl

Node	Annotation
MAL11	General alpha-glucoside permease; High-affinity maltose transporter (alpha-glucoside transporter); inducible; encoded in the MAL1 complex locus; broad substrate specificity that includes maltotriose; required for isomaltose utilization
ZRT1	Zinc-regulated transporter 1; High-affinity zinc transporter of the plasma membrane; responsible for the majority of zinc uptake; transcription is induced under low-zinc conditions by the Zap1p transcription factor; Belongs to the ZIP transporter (TC 2.A.5) family
YML018C	Uncharacterized vacuolar membrane protein YML018C; Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the membrane of the vacuole; physical interaction with Atg27p suggests a possible role in autophagy; YML018C is not an essential gene; relative distribution to the vacuolar membrane decreases upon DNA replication stress; YML018C has a paralog, THI74, that arose from the whole genome duplication; Belongs to the TPT transporter family
HXT13	Hexose transporter HXT13; Putative transmembrane polyol transporter; supports growth on and uptake of mannitol and sorbitol with moderate affinity when overexpressed in a strain deleted for hexose family members; minor hexose transport activity when overexpressed in a similar strain; induced by non-fermentable carbon sources; induced in low glucose, repressed in high glucose; HXT13 has a paralog, HXT17, that arose from a segmental duplication
YCR023C	Vacuolar membrane protein of unknown function; member of the multidrug resistance family; YCR023C is not an essential gene
COG3	Essential component of the conserved oligomeric Golgi complex; a cytosolic tethering complex (Cog1p through Cog8p) that functions in protein trafficking to mediate fusion of transport vesicles to Golgi compartments
CYB2	Cytochrome b2, mitochondrial; Cytochrome b2 (L-lactate cytochrome-c oxidoreductase); component of the mitochondrial intermembrane space, required for lactate utilization; expression is repressed by glucose and anaerobic conditions
TPN1	Plasma membrane pyridoxine (vitamin B6) transporter; member of the purine-cytosine permease subfamily within the major facilitator superfamily; proton symporter with similarity to Fcy21p, Fcy2p, and Fcy22p
GVP36	BAR domain protein that localizes to early and late Golgi vesicles; required for adaptation to varying nutrient concentrations, fluid-phase endocytosis, polarization of the actin cytoskeleton, and vacuole biogenesis
STL1	Sugar transporter STL1; Glycerol proton symporter of the plasma membrane; subject to glucose-induced inactivation, strongly but transiently induced when cells are subjected to osmotic shock
PIL1	Sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1; Eisosome core component; eisosomes are large immobile cell cortex structures associated with endocytosis; detected in phosphorylated state in mitochondria; phosphorylated on Thr233 upon Pkc1p hyperactivation in a Slr2p MAPK-dependent fashion; null mutant shows activation of Pkc1p/Ypk1p stress resistance pathways; member of BAR domain family; protein increases in abundance and relocalizes from plasma membrane to cytoplasm upon DNA replication stress

V.II. IV. Rutas metabólicas

De las rutas metabólicas relevantes en este estudio se encontró el metabolismo de los glicerolípidos (Figura 12) en la cual se produce el glicerol y participan 14 enzimas encontradas en el transcriptoma (tabla 10) así como el metabolismo del almidón y sacarosa (Figura 13) con 24 enzimas encontradas (tabla 10) en el transcriptoma. Esta ruta metabólica se relaciona con la actividad enzimática encontrada en las pruebas de degradación de sustrato donde se demostró que *A. loretoensis* es capaz de degradar almidón.

Por otro lado, se encontraron procesos metabólicos de interés biotecnológico, en la tabla 11 se presentan estos procesos agrupados por su posible aplicación en la biotecnología, así como el número de genes encontrados en el transcriptoma de cada vía metabólica.

Figura 12. Metabolismo de glicerolípidos. En color las enzimas presentes en el transcriptoma de *A. loretoensis*

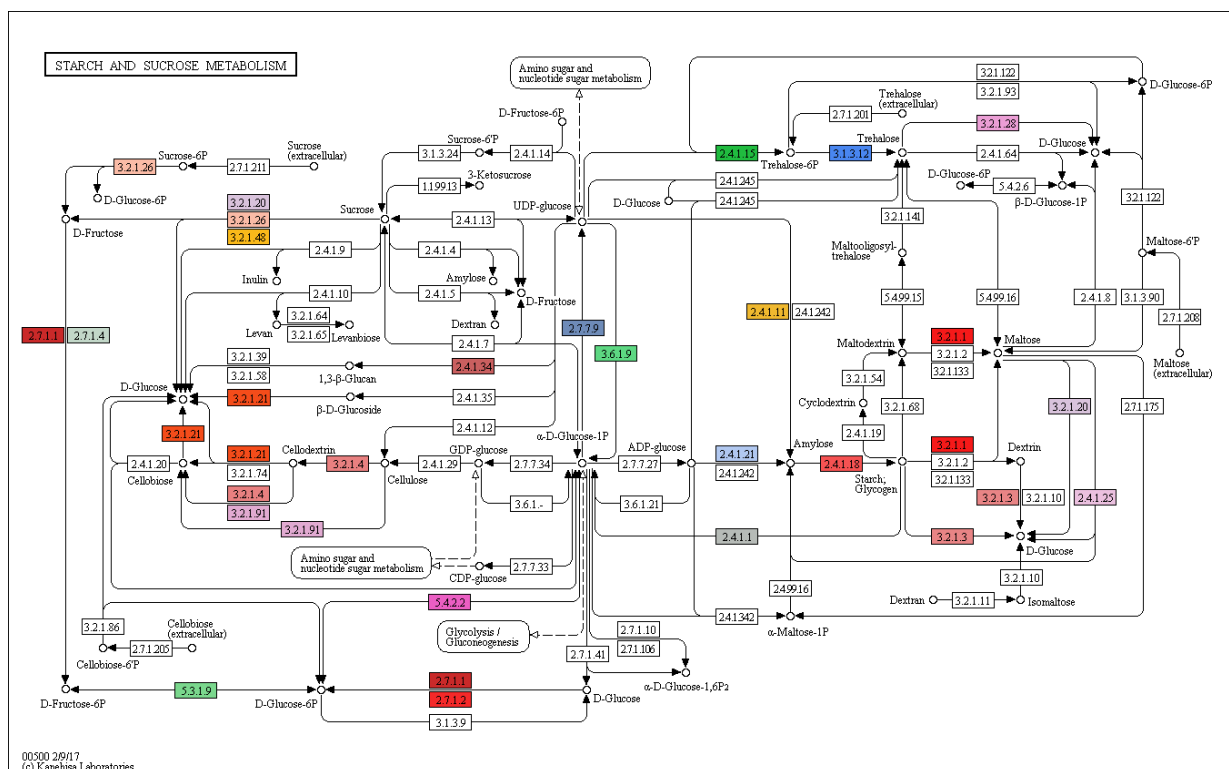


Figura 13. Metabolismo de almidón y sacarosa. En color las enzimas presentes en el transcriptoma de *A. loretoensis*

Tabla 10. Enzimas del transcriptoma de *A. loretoensis* involucradas en el metabolismo de glicerolípidos y en el de almidón y sacarosa.

Metabolismo de glicerolípidos		Metabolismo de almidón y sacarosa	
Código de la enzima	Nombre	Código de la enzima	Nombre
ec:2.7.1.107	kinase (ATP)	ec:2.7.1.2	glucokinase (phosphorylating)
ec:3.1.3.81	diphosphate phosphatase	ec:2.7.1.1	hexokinase type IV glucokinase
ec:2.7.1.29	kinase	ec:2.7.1.4	fructokinase (phosphorylating)
ec:2.3.1.158	acyltransferase	ec:3.1.3.12	trehalose-6- phosphatase
ec:3.1.3.21	alpha-glycerophosphatase	ec:2.7.7.9	uridylyltransferase
ec:3.1.1.23	lipase	ec:3.2.1.4	endo-1-4-beta-D-glucanase
ec:1.1.1.156	2-dehydrogenase (NADP+)	ec:3.2.1.3	1-4-alpha-glucosidase
ec:3.1.1.3	lipase	ec:3.2.1.1	glycogenase
ec:2.3.1.51	O-acyltransferase	ec:5.3.1.9	isomerase
ec:3.1.3.4	phosphatase	ec:3.2.1.48	alpha-glucosidase
ec:1.1.1.2	dehydrogenase (NADP+)	ec:3.2.1.91	1-4-beta-cellobiosidase (non-reducing end)
ec:1.2.1.3	dehydrogenase (NAD+)	ec:5.4.2.2	(alpha-D-glucose-1-6-bisphosphate dependent)
ec:3.2.1.22	melibiase	ec:3.2.1.20	maltase
ec:1.1.1.21	reductase	ec:3.2.1.21	gentiobiase
		ec:2.4.1.34	synthase
		ec:3.2.1.28	trehalase
		ec:3.2.1.26	invertase
		ec:2.4.1.1	phosphorylase
		ec:2.4.1.18	branching enzyme
		ec:2.4.1.15	synthase (UDP-forming)
		ec:2.4.1.11	synthase
		ec:2.4.1.25	disproportionating enzyme
		ec:2.4.1.21	synthase (glycosyl-transferring)

Tabla 11. Procesos metabólicos de interés biotecnológico encontrados en el transcriptoma de *A. loretoensis*

Metabolismo	Código del mapa Kegg	No de genes del transcriptoma de <i>A. loretoensis</i>
Producción de antibióticos		
Biosíntesis de antibióticos	map01130	129
Biosíntesis de neomicina, kanamicina y gentamicina	map00524	2
Biosíntesis de monobactámicos (Tabtoxinine β -lactam)	map00261	2
Biosíntesis de penicilina y cefalosporina	map00311	1
Biosíntesis de novobiocina	map00401	3
Biosíntesis de estreptomycin	map00521	5
Biosíntesis de carbapenem (Nortienamycin)	map00332	2
Degradación de hidrocarburos		
Degradación de tolueno	map00623	3
Degradación de xyleneo	map00622	1
Degradación de clorocyclohexaneo y clorobenceno	map00361	1
Vitaminas		
Metabolismo de la vitamin B6	map00750	4
Metabolismo de la riboflavina	map00740	7
Metabolismo de xenobióticos		
Metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450	map00980	4
Biosíntesis de hormonas		
Biosíntesis de hormonas esteroideas	map00140	3
Biosíntesis de esteroides	map00100	4
Metabolismo de fármacos y otras enzimas		
Metabolismo del Azathioprine y 6-Mercaptopurinan(Inmunosupresores en trasplantes y en leucemia linfocítica aguda)	map00983	4
Metabolismo del Irinotecan (Tratamiento contra el cáncer)	map00983	1
Metabolismo del Fluorouracil (Tópico quimioterapéutico)	map00983	5
Metabolismo del Isoniazid (Tratamiento para la tuberculosis)	map00983	3
Degradación de otros compuestos		
Degradación del naftaleno	map00626	1
Degradación del Benzoato	map00362	7

V. Discusión

VI.I. identificación

En este estudio se realizó una caracterización polifacética incluyendo datos morfológicos, fisiológicos y moleculares para la identificación y descripción de la nueva especie *A. loretoensis*, la cual fué aislada de sedimentos marinos. Los datos indican que la cepa pertenece al género *Aspergillus*, subgénero *Polypaecilum* (Kocsubé *et al.* 2016). Las especies que resultaron más relacionadas fueron *A. salinarus* (Greiner *et al.* 2014) y *A. baarnensis* (Pitt and Hocking 1985). El ancho de la hifa, la distancia entre septos, la forma del conidio, el diámetro, así como la presencia ocasional de conidios en forma de racimos de uva (observado principalmente al 4% NaCl) fue similar en la cepa CM-CNRG 624 y en *A. salinarus* (Greiner *et al.* 2014; Martinelli *et al.* 2017). El ancho de las fiálides fue similar en todas las especies comparadas, sin embargo, el largo de estas fue variable, la cepa CM-CNRG 624 presentó las fiálides más cortas en comparación con *A. keratitis* del cual se han reportado las más largas (Pitt and Hocking 1985; Hsieh *et al.* 2009; Sigler *et al.* 2010; Greiner *et al.* 2014; Martinelli *et al.* 2017). No se ha observado la presencia de clamidosporas en CM-CNRG 624 ni en *A. baarnensis* (Pitt and Hocking 1985), en comparación con *A. salinarus*, *A. atacamensis*, *A. salisburgensis* y *A. chlamydosporus* (Sigler *et al.* 2010; Martinelli *et al.* 2017). La única especie del subgénero *Polypaecilum* que ha presentado esclerocios es *A. sclerotialis* (Sigler *et al.* 2010). Pocos hongos han sido reportados como halófilos estrictos (incapaces de crecer en medio sin

sal): *A. baarnensis* (aislado de pescado seco salado, crece del 5 al 20% de NaCl; Pitt and Hocking 1985; Tanney *et al.* 2017), *A. salinarus* (aislado de salinas, crece del 4 al 25% de NaCl; Greiner *et al.*, 2014), *Wallemia ichthyophaga* (aislada de pescado seco salado y de salinas, crece del 9 al 30% de NaCl; Johan-Olsen 1887; Kunčič *et al.* 2010), *W. muriae* (aislado de comida contaminada y de salinas, crece del 4 al 25% de NaCl; Kunčič *et al.*, 2010; Zajc *et al.*, 2014), *Gymnoascus halophilus* (aislado de sedimentos del lago salado Chaka en China, crece del 7.5 al 22.5% of NaCl; Zhou *et al.*, 2016), *A. penicillioides* (aislado de sedimentos y de agua del mar muerto, crece del 2 al 15% de NaCl; Nazareth *et al.* 2012), *A. unguis* (aislado de agua del Mar Muerto, crece del 2 al 15% de NaCl; Nazareth *et al.*, 2012) y *Gymnascella marismortui* (aislado de la superficie del mar muerto, crece del 10 al 30% de NaCl; Buchalo *et al.*, 1998). CM-CNRG 624 es considerado como halófilo estricto ya que requiere al menos 4% de NaCl para crecer y tiene un rango de tolerancia a la salinidad comparable con el reportado para *A. salinarus* y *W. muriae*. A la fecha, CM-CNRG 624 es el primer hongo estrictamente halófilo aislado de sedimentos marinos.

Comparando la utilización de sustratos, CM-CNRG 624 degradó lignina y quitina al contrario de *A. salinarus*. No hay información de la degradación de lignina o quitina en las otras especies relacionadas. Por otro lado, CM-CNRG 624 presentó similitud con *A. salinarus* en la incapacidad de degradar lípidos y proteínas. CM-CNRG 624 fue similar a *A. atacamensis* en la falta de degradación de celulosa y

proteína. Finalmente, CM-CNRG 624 al igual que *A. salisburgensis* presentaron una débil actividad para la degradación de almidón.

El uso de las regiones de ITS para la identificación de hongos han sido muy utilizadas, sin embargo, hasta el año 2012 Schoch *et al.* propusieron las regiones ITS como marcadores universales para los estudios filogenéticos y sistemáticos de hongos, no obstante, que en algunos grupos como en los Ascomycota se tiene poco éxito. En el caso del género *Aspergillus* se necesita de un segundo marcador molecular (Geiser *et al.*, 2007; Samson *et al.* 2014). Samson *et al.*, (2014) sugieren el uso de CaM, BenA y RPB2 como marcadores de identificación secundarios, refiriendo a CaM como el más útil, ya que es fácil de amplificar por PCR y existe una buena base de datos de muchas especies. En otro estudio, Houbraken *et al.*, (2014) incluyeron RPB1, TSR1 y CcT8. En este trabajo todos los marcadores antes mencionados fueron probados. RPB1 Y TSR1 colocaron a CM-CNRG 624 cerca de *A. salinarus*, con un soporte de bootstrap débil, con menos del 65%. Los genes RPB2, CcT8 y BenA colocaron CM-CNRG 624 cerca de *A. baarnensis* con un soporte de bootstrap entre el 35 y 75%. La región ITS colocó a CM-CNRG 624 cerca de *A. baarnensis* con un soporte de bootstrap del 50%. El análisis utilizando el gen CaM relacionó a CM-CNRG 624 a ambas especies, sin embargo, el clado no se encuentra bien consolidado. El análisis filogenético basado en los marcadores moleculares utilizados demostró que CM-CNRG 624 puede ser caracterizado como una nueva especie halófila obligada proveniente de sedimentos marinos, la cual se encuentra cercanamente

relacionada a *A. baarnensis* y *A. salinaurs*. Por otro lado, existen similitudes morfológicas entre ellas, pero por el otro también se observaron diferencias. El análisis molecular identificó a CM-CNRG 624 como una nueva especie del género *Aspergillus*, subgénero *Polypaecilum*. Por lo anterior se propone como nombre de la especie *A. loretoensis* en relación a la localización geográfica de la Bahía de Loreto donde fue la cepa encontrada.

VI.II. Transcriptoma

El número de genes putativos encontrados en *A. loretoensis* (10,507 genes) se encuentra dentro del rango de los genes reportados para otras especies de *Aspergillus* sp. entre las cuales se encuentran *A. fumigatus* (10,087 genes), *A. nidulans* (10,937 genes), *A. niger* (14,405 genes) y *A. oryzae* (12,322 genes) (Cerqueria *et al.*, 2014). Existe el reporte del genoma y transcriptoma de dos especies del subgénero *Polypaecilum*, mismo al que pertenece *A. loretoensis* entre las cuales *A. sclerotialis* presentó un número de genes mayor que *A. loretoensis* con 11,307, mientras que *A. salisburgensis* presentó un número menor de genes (8,895) (Tafer *et al.*, 2019). Por otro lado, el contenido de guanina y citosina (GC) en *A. loretoensis* fue alto (60%), ya que fue superior a otras especies del género *Aspergillus* (*A. fumigatus* 49.5%, *A. nidulans* 50.32%, *A. niger* 49.55% y *A. oryzae* 48.3% y *A. sclerotialis* 46.9%) (Gene Bank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se tiene el registro del porcentaje de GC de la levadura halófila obligada *W. ichthyophaga* (45.35%) (Zajc *et al.*, 2013) el cual también resultó menor que el encontrado en *A. loretoensis*. Por lo anterior el

contenido de GC no está relacionado a la condición de *A. loretoensis* a la alta salinidad y se requieren más estudios de otros hongos del subgénero *Polipaecilum* para ver si tiene una relación con estos ya que del único que se tiene la información disponible hasta el momento es de *A. sclerotialis* (contenido GC 46.9%) que también presenta un contenido de GC inferior que *A. loretoensis*.

Comparando los genes sobre expresados diferencialmente bajo dos salinidades (5 y 20 % NaCl) de otras especies del género *Polipaecilum*, *A. sclerotialis* presentó una mayor cantidad de; 1121 (976 sub expresados) y *A. salisburgensis* 306 genes sobre expresados (no se presenta la cantidad de genes sub expresados). Por lo anterior la cantidad de genes sobre expresados de la especie halófila *A. salisburgensis* es similar a la cantidad de genes sobre expresados en *A. loretoensis*. En *A. loretoensis* es muy marcado que los genes que se sobre expresan en una condición se encuentran sub expresados en la otra y viceversa.

Después del enriquecimiento se observaron algunos genes de interés en las dos condiciones. Al 15% NaCl se encontró la sobre expresión del gen ZRT1 el cual codifica por una proteína transportadora de Zn activada por bajas concentraciones. Se ha observado que los transportadores de Zn no son específicos pudiendo transportar otros metales en condiciones de estrés, lo anterior cual sugiere que existen mecanismos de regulación que actúan de forma similar bajo condiciones no óptimas para la célula. En *A. sclerotialis*, se ha reportado la sobre expresión de genes codificantes de transportadores de zinc

bajo condiciones de alta salinidad. Contrario a la levadura *Pichia kudriavzevii*, donde la expresión de ZRT1 se ha visto sub regulada bajo condiciones de estrés salino. Tafer *et al.* (2019) mencionan que este mecanismo de regulación bajo condiciones de alta salinidad se encuentra relacionado a los procesos de óxido reducción y al intercambio iónico que ocurren durante condiciones de alta salinidad (Li *et al.*, 2018; Tafer *et al.*, 2019.).

Otro gen de interés sub expresado bajo el 15% NaCl es TPN1 el cual codifica para un transportador (simporte) de pirridoxina (vitamina B6) en la membrana plasmática perteneciente a MFS (mayor facilitator superfamily, por sus siglas en inglés). Los MFS son capaces de transportar iones, carbohidratos, lípidos, aminoácidos, péptidos, y otras moléculas por lo que no son específicos. En cuanto a los hongos se ha reportado que hasta un 50% del genoma codificante para transportadores pertenecientes a las familias MFS y ABC (Proteínas permeasas transportadoras de aminoácidos) se han visto relacionados a la resistencia a fármacos. En *W. ichthyophaga* y en *A. salisburgensis*, los MFS se han encontrados sub expresados bajo condiciones de estrés salino, sin embargo, en *A. loetoensis* se encontró una sobre expresión de MFS al 15% NaCl, condición similar que ha sido reportada para *A. sclerotialis*. Zajc *et al.* (2013) mencionan que esta sub expresión en hongos halófilos como *W. ichthyophaga* y *A. salisburgensis* es debida a que en los ambientes de alta salinidad de donde pertenecen ambas especies la competencia con otras especies es limitada. En

el caso de *A. loetoensis* la presencia de MFS puede indicar que, aunque es un halófilo obligado, su nicho ecológico presenta una alta competencia en la cual requiere estos transportadores (Zajc *et al.*, 2013; Tafer *et al.*, 2019).

Continuando con los genes sobre expresados al 15% de NaCl encontramos HTX13 el cual codifica para una proteína putativa transmembranal transportadora de polioles, la cual se ha encontrado presente en *S. cerevisiae* (Jordan *et al.*, 2016). Este mecanismo está directamente relacionado a la osmoregulación en hongos como lo describe en su revisión Salma *et al.*, (2015). Por lo anterior la presencia de este gen indica que la estrategia de *A. loetoensis* para regular la salinidad se basa en el sistema de solutos compatibles por medio de la utilización de polioles. A este respecto también se encontró el gen STL1 el cual codifica para una proteína simporte de glicerol – portón presente en la membrana plasmática, este gen ha sido reportado con anterioridad en *W. ichthyophaga*, el cual actúa durante un shock hiperosmótico evitando la salida de glicerol de la célula, en estas condiciones se cierran los canales de aqua-glicerol-porinas Fps1 (Zajc *et al.*, 2013). Por lo tanto, el poliol que se encuentra regulando la osmolaridad en *A. loetoensis* es el glicerol.

En cuanto a los genes sobre expresados al 4% NaCl se encontraron dos genes relacionados al estrés: ZRC1 y ASG1. ZRC1 es un gen que codifica para un transportador de Zn presente en la vacuola, la cual actúa almacenando Zn. En condiciones de shock de Zn provoca un flujo repentino de Zn hacia el citosol. Li *et al.*, (2018) ha estudiado la expresión de transportadores de zinc bajo diferentes

condiciones de estrés encontrando que estos pueden llegar a expresarse para mantener la homeostasis celular utilizando otros metales. Por otro lado, el gen ASG1 codifica para otros genes activadores de estrés. Se ha visto en las plantas; *Solanum tuberosum* y *Arabidopsis thaliana* que la sobre expresión de este gen incrementa la resistencia a la tolerancia de la salinidad en el estoma, por lo que se relaciona a la respuesta al estrés salino (Batelli *et al.*, 2012). El hallazgo de estos genes relacionados con estrés bajo la condición del 4% NaCl indican que la condición de estrés para *A. loretoensis* es mayor al 4% que al 15% NaCl.

En *A. loretoensis* no se encontraron sobre expresados ninguno de los genes que codifican para proteínas transportadoras relacionadas al mantenimiento de la homeostasis reportados para *W. ichthyophaga* (Zajc *et al.*, 2013).

En el transcriptoma de *A. loretoensis* se pudo identificar la vía metabólica de glicerolípidos responsable de la producción de glicerol en *A. loretoensis* que como ya se describió con anterioridad es el polirol encargado de la osmolaridad en este hongo, aunque esta vía no se encuentra descrita en trabajos anteriores relacionados a alta salinidad en hongos halófilos, si se reportó en la especie *W. ichthyophaga* (Zajc *et al.*, 2013). Por otro lado, también se identificó la vía de degradación del almidón y sacarosa, lo que da soporte a las pruebas metabólicas realizadas en *A. loretoensis* donde se encontró que es capaz de degradar el almidón. Por último, se reportan las vías metabólicas donde se encontraron enzimas relacionadas a procesos de biosíntesis, degradación o metabolismo de productos de interés biotecnológico. Para continuar explorando a esta especie y

sus potenciales genes para su uso comercial se requieren más estudios complementarios.

VI. Conclusiones

1. Por medio del análisis polifacético utilizado se logró identificar a la especie halófila *Aspergillus* sp como la nueva especie *Aspergillus loretoensis*.
2. Se realizó el registro de la nueva especie en la colección de microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP y en la base de datos de hongos de MycoBank.
3. Se obtuvo el transcriptoma de *A. loretoensis* bajo las dos condiciones de cultivo (4 y 15% NaCl) determinando los genes que se expresaban diferencialmente en las mismas.
4. Por último, se analizaron los genes homólogos los cuales ya habían sido descritos en otras especies, sin embargo, no todos habían sido reportados específicamente en relación a la alta salinidad o presentaban un comportamiento distinto al reportado como es el caso de MFS y ZRC1 y ASG1.
5. No se encontraron genes nuevos relacionados al estrés osmótico.
6. Se encontraron genes relacionados al metabolismo del glicerol como un metabolito utilizado para tolerar el estrés salino.

VII. Referencias

- Aggarwal, M., Bansal, P., & Mondal, A. K. (2005). Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 22, 457–470.
<https://doi.org/10.1002/yea.1223>
- Agrawal, T., & Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in central India. *SpringerPlus*, 1(73), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-73>
- Ali, I., Siwarungson, N., Punnapayak, H., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Bankeeree, W., & Rakshit, S. K. (2014). Screening of potential biotechnological applications from obligate halophilic fungi, isolated from a man-made solar saltern located in Phetchaburi Province, Thailand. *Pakistan Journal of Botany*, 46(3), 983–988.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrews S. (2010). FastQC. Retrieved July 31, 2018, from <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

- Batelli, G., Massarelli, I., Van Oosten, M., Nurcato, R., Vannini, C., Raimondi, G., Grillo, S. (2012). Asg1 is a stress-inducible gene which increases stomatal resistance in salt stressed potato. *Journal of Plant Physiology*, 169(18), 1849–1857. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.07.004>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Buchalo, A. S., Nevo, E., Wasser, S. P., Oren, A., & Molitoris, H. P. (1998). Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *The Royal Society*, 265, 1461–1465. <https://doi.org/10.1007/BF00193160>
- Cerqueira, G. C., Arnaud, M. B., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Simison, M., Wortman, J. R. (2014). The Aspergillus Genome Database: Multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D705–D710. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1029>
- Claus, W. (1989). *Understanding microbes*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Cronwright, G. R., Rohwer, J. M., & Prior, B. A. (2002). Metabolic Control Analysis of Glycerol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and*

Environmental Microbiology, 68(9), 4448–4456.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4448>

Fang, J., Han, X., Xie, L., Liu, M., Qiao, G., Jiang, J., & Zhuo, R. (2014). Isolation of salt stress-related genes from *Aspergillus glaucus* CCHA by random overexpression in *Escherichia coli*. *Scientific World Journal*, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2014/620959>

Flowers, T. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 307–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh003>

Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59, 1–10.
<https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>

Gisbert, C., Rus, A. M., Bolarín, M. C., López-Coronado, J. M., Arrillaga, I., Montesinos, C., ... Moreno, V. (2000). The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology*, 123(1), 393–402.
<https://doi.org/10.1104/pp.123.1.393>

Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2018). Overview of oxidative stress response genes in selected halophilic fungi. *Genes*, 9, 1–13.
<https://doi.org/10.3390/genes9030143>

- Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitaš, A. (2011). Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. In G. Gadd & S. S (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 77, pp. 71–96). Burlington: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387044-5.00003-0>
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36(10), 3420–3435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>
- Grabherr, M., Haas, B., Yassour, M., Levin, J., Thompson, D., Amit, I., Regev, A. (2013). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Greiner, K., Peršoh, D., Weig, A., & Rambold, G. (2014). *Phialosimplex salinarum*, a new species of Eurotiomycetes from a hypersaline habitat. *IMA Fungus*, 5(2), 161–172. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2014.05.02.01>
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113(11), 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., De Hoog, S., & Plemenitaš, A. (2000). Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black

yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(3), 235–240.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00032-5)

Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, (2014), 1–19.

Gupta, K. J., Stoimenova, M., & Kaiser, W. M. (2005). In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2601–2609.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri252>

Houbraken, J., & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology*, 70, 1–51. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>

Houbraken, J., de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. In S. Sariaslani & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 86, pp. 199–249). Netherlands: Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>

Hsieh, H. M., Ju, Y. M., Hsueh, P. R., Lin, H. Y., Hu, F. R., & Chen, W. L. (2009). Fungal keratitis caused by a new filamentous hyphomycete *Sagenomella*

keratitidis. Botanical Studies, 50, 331–335.

<https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2015.08.005>

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.

Nature Protocols, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>

Huang, J., Hirji, R., Adam, L., Rozwadowski, K. L., Hammerlindl, J. K., Keller, W.

a, & Selvaraj, G. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology, 122*(3), 747–56. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.747>

Johan-Olsen, O. (1887). Om sop på klipfisk den såkaldte mid. *Christiania Videnskabs-Selskabs Forhandlinger, 12*, 3–20.

Jordan, P., Choe, J. Y., Boles, E., & Oreb, M. (2016). Hxt13, Hxt15, Hxt16 and Hxt17 from *Saccharomyces cerevisiae* represent a novel type of polyol transporters. *Scientific Reports, 6*(October 2015), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep23502>

Joshi, A., Dang, H. Q., Vaid, N., & Tuteja, N. (2009). Isolation of high salinity stress tolerant genes from *Pisum sativum* by random overexpression in *Escherichia coli* and their functional validation. *Plant Signaling & Behavior, 4*(January 2015), 400–412. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8387>

- Kis-Papo, T., Weig, A. R., Riley, R., Peršoh, D., Salamov, A., Sun, H., ... Nevo, E. (2014). Genomic adaptations of the halophilic Dead Sea filamentous fungus *Eurotium rubrum*. *Nature Communications*, 5(3745), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms4745>
- Kocsubé, S., Perrone, G., Magistà, D., Houbraken, J., Varga, J., Szigeti, G., Samson, R. A. (2016). *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*, 85, 199–213. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.006>
- Koneman, E., Allen, S., Dowell, V. R., Janda, W., Sommers, H., & Winn, W. (1988). *Diagnóstico Microbiológico* (3a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Konte, T., Terpitz, U., & Plemenitaš, A. (2016). Reconstruction of the high-osmolarity glycerol (HOG) signaling pathway from the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00901>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Kunčič, M. K., Kogej, T., Drobne, D., & Gunde-Cimerman, N. (2010). Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 329–337. <https://doi.org/10.1128/AEM.02318-09>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Laurie, S., Feeney, K. a., Maathuis, F. J. M., Heard, P. J., Brown, S. J., & Leigh, R. a. (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant Journal*, 32(2), 139–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01410.x>
- Li, C., Yang, X., Xu, Y., Li, L., & Wang, Y. (2018). Cadmium detoxification induced by salt stress improves cadmium tolerance of multi-stress-tolerant *Pichia kudriavzevii*. *Environmental Pollution*, 242, 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.058>
- Mandigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (Fourteenth). New York: Pearson.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>

- Martinelli, L., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., Azua-Bustos, A., Sterflinger, K., & 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. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0941-3>
- Michiels, A., Van den Ende, W., Tucker, M., Van Riet, L., & Van Laere, A. (2003). Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*, 315(1), 85–89. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00665-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00665-6)
- National Center for Biotechnology Information. (2019). NCBI. Retrieved May 1, 2019, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nazareth, S., Gonsalves, V., & Nayak, S. (2012). A first record of obligate halophilic aspergilli from the Dead Sea. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 22–27. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0225-z>
- Pitt, J. I. (1975). Xerophilic fungi and the spoilage of food of plant origin. In *Water relations of foods* (pp. 273–307). New York: Academic press.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1985). New species of fungi from Indonesian dried fish. *Micotaxon*, 22, 197–208.

- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Xerophiles. In *Fungi and Food Spoilage* (Third edit, pp. 339–355). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00199>
- Rodríguez-Peña, J. M., García, R., Nombela, C., & Arroyo, J. (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast*, 27, 495–502. <https://doi.org/10.1002/yea.1792>
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., ... Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

- Shen, Y., DQ, Y., Zhang, W., Du, B., JS, Z., Liu, Q., & Chen, S. (2003). Novel halophyte EREBP/AP2-type DNA binding protein improves salt tolerance in transgenic tobacco. *Acta Botanica Sinica*, 45, 82–87.
- Sigler, L., Sutton, D. A., Gibas, C. F. C., Summerbell, R. C., Noel, R. K., & Iwen, P. C. (2010). *Phialosimplex*, a new anamorphic genus associated with infections in dogs and having phylogenetic affinity to the Trichocomaceae. *Medical Mycology*, 48, 335–345.
<https://doi.org/10.3109/13693780903225805>
- Silva-Graça, M., Neves, L., & Lucas, C. (2003). Outlines for the definition of halotolerance/halophily in yeasts: *Candida versatilis* (halophila) CBS4019 as the archetype? *FEMS Yeast Research*, 3, 347–362.
[https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00200-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00200-3)
- Sklenář, F., Jurjević, Z., Zalar, P., Frisvad, J. C., Visagie, C. M., Kolařík, M., Hubka, V. (2017). Phylogeny of xerophilic aspergilli (subgenus *Aspergillus*) and taxonomic revision of section *Restricti*. *Studies in Mycology*, 88, 161–236. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.002>
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., & Saviouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany*, 115, 433–447.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcu239>

- Smith-Unna, R., Boursnell, C., Patro, R., Hibberd, J. M., & Kelly, S. (2016). TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Research*, 26, 1134–1144. <https://doi.org/10.1101/gr.196469.115>
- Stratford, M., Steels, H., Novodvorska, M., Archer, D. B., & Avery, S. V. (2019). Extreme osmotolerance and halotolerance in food-relevant yeasts and the role of glycerol-dependent cell individuality. *Frontiers in Microbiology*, 9(JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03238>
- Strucko, T., Zirngibl, K., Pereira, F., Kafkia, E., Mohamed, E. T., Rettel, M., ... Forster, J. (2018). Laboratory evolution reveals regulatory and metabolic trade-offs of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 47(November 2017), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.006>
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Von Mering, C. (2015). STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D447–D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- Tafer, H., Poyntner, C., Lopandic, K., Sterflinger, K., & 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*, 10(381), 1–21. <https://doi.org/10.3390/genes10050381>

- Tanney, J. B., Visagie, C. M., Yilmaz, N., & Seifert, K. A. (2017). *Aspergillus* subgenus *Polypaecilum* from the built environment. *Studies in Mycology*, 88, 237–267. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.11.001>
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503–527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>
- Thomson, W., Frady, C., & Oross, J. (1992). Salt glands. In *Solute transport in plants* (First Edit, pp. 138–142). New Delhi: Springer-Science+Buisness Media Dordrecht.
- Trigiano, R., & Ament, M. (2004). Detecting and measuring extracellular enzymes of fungi and bacteria. In R. Trigiano, M. Windham, & A. Windham (Eds.), *Plant Pathology* (pp. 247–259). New York: CRC.
- Washington, U. of. (2018). SQL share: uniprot-reviewed-annotations_041017.
- Wheeler, K. A., Hocking, A. D., & Pitt, J. I. (1988). Influence of temperature on the water relations of *Polypaecilum pisce* and *Basipetospora halophila*, two halophilic fungi. *Jurnal of General Microbiology*, 134, 2255–2260. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-8-2255>

- Wheeler, K. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Anggawati, A. M. (1986). Fungi associated with Indonesian dried fish. *Food Microbiology*, 3, 351–357. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(86\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0740-0020(86)90020-1)
- Winicov, I. (2000). Alfin1 transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. *Planta*, 210(3), 416–422. <https://doi.org/10.1007/PL00008150>
- Zajc, J., Zalar, P., Plemenitas, A., & Gunde-Cimerman, N. (2012). The microbiota of the salterns. In C. Raghu Kumar (Ed.), *Biology of marine fungi* (pp. 133–158). New York: Springer.
- Zajc, J., Kogej, T., Galinski, E. A., Ramos, J., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 247–256. <https://doi.org/10.1128/AEM.02702-13>
- Zajc, J., Liu, Y., Dai, W., Yang, Z., Hu, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2013). Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-617>
- Zalar, P., Sybren de Hoog, G., Schroers, H. J., Frank, J. M., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia*

(Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 311–328. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6783-x>

Zhou, N., Zhang, Y., Liu, F., & Cai, L. (2016). Halophilic and thermotolerant *Gymnoascus* species from several special environments, China. *Mycologia*, 108(1), 179–191. <https://doi.org/10.3852/15-086>



Aspergillus loretoensis, a single isolate from marine sediment of Loreto Bay, Baja California Sur, México resulting as a new obligate halophile species

Sophia González-Martínez¹ · Clara Galindo-Sánchez² · Edgar López-Landavery² · Carmen Paniagua-Chávez² · Amelia Portillo-López¹

Received: 21 March 2019 / Accepted: 9 June 2019
© Springer Japan KK, part of Springer Nature 2019

Abstract

An obligate halophile fungal was isolated from 275 m deep marine sediments and is characterized here for the first time. Its optimal growth was at 15% NaCl even though it was able to grow at 25% and is incapable of growth with no NaCl. Based on its morphological characteristics as conidia chain production in a single phialide, the fungal is related to the genus *Aspergillus*, subgenus *Polypaecilum*. Phylogenetic molecular analysis using several markers (ITS1–2; RPB1; RPB2; Cct8; TSR1; CaM; BenA) places the fungal isolate closer to *Aspergillus salinarus* and *A. baarnensis*. However, its morphological and molecular differences establish it as a new species, *Aspergillus loretoensis* sp. nov.

Keywords Ascomycota · Extremophile fungi · Salt tolerance · Marine fungi · Micromycetes

Abbreviations

YPD Yeast, peptone, dextrose media
BSA Bovine serum albumin
GBAN Genbank accession number
avg Average

Introduction

In ecology, one way to classify microorganisms is based on their physicochemical requirements for growth where the osmolarity and water activity (a_w) play a key role. Seawater contains about 3% NaCl as well as other minerals and an a_w of 0.98. Those organisms that require NaCl and grow optimally at the seawater activity are known as halophiles (Madigan et al. 2015). However, Pitt (1975) established that fungi that are capable of growing on substrates with a_w less

than or equal to 0.85 (17% NaCl) can be classified as xerophilic or xerotolerant. He also points out that the term halophilic is used in fungi that have superior growth in a medium with NaCl as a control solute (Gunde-Cimerman et al. 2000).

Before 1998, salt tolerant fungi were known as a food contaminant (Wheeler et al. 1986, 1988; Pitt and Hocking 2009). Then in 1998, Buchalo et al. isolated fungi from the Dead Sea, and a few years later Gunde-Cimerman et al. (2000) described the fungal population of the hypersaline waters from Sečovlje salterns at Slovenia.

Some years later, Greiner et al. (2014) described a new halophile species isolated from a hypersaline habitat related to the genus *Phialosimplex*, at the same year Samson et al. (2014) reclassified the genus *Phialosimplex* to *Aspergillus*. Then, Kocsubé et al. (2016) placed the halophiles or osmophilic *Aspergillus* sp. with conidiogenous cells simple phialides into the subgenus *Polypaecilum*. Recently Sklenár et al. (2017) described some halotolerant fungi as members of the genus *Aspergillus* section *Restricti*. Only a few fungi are known to be obligate halophiles: *Aspergillus baarnensis* (Pitt and Hocking 1985), *Gymnascella marismortui* (Buchalo et al. 1998), *Wallemia ichthyophaga* (Zalar et al. 2005), *A. penicillioideus*, *A. unguis* (Nazareth et al. 2012), *A. salinarus* (Greiner et al. 2014), *W. muriae* (Zalar et al. 2005), *Gymnoascus halophilus* (Zhou et al. 2016), *A. salisburgensis* and *A. atacamensis* (Martinelli et al. 2017). Further research into these understudied organisms is required.

Communicated by A. Oren.

✉ Amelia Portillo-López
portillo@uabc.edu.mx

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Km 103, Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada 22860, Baja California, Mexico

² Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada 22860, Baja California, Mexico

Having previously isolated a hypersaline fungal from marine sediments (275 m deep) of Loreto Bay, Baja California Sur, México (González-Martínez et al. 2017), in this study, we sought to identify and characterize this fungal isolate (CM-CNRG 624). This isolate is determined to be obligate halophile as it requires, at least, 4% of NaCl to grow and can survive up to 25% of NaCl, with optimum growth at 15%. Morphological, physiological, and molecular data indicate that this halophile obligate fungal isolate of the Southern California Gulf is a new species.

Materials and methods

On a previous study (González-Martínez et al. 2017), we isolated fungi from marine sediments from Loreto Bay, Baja California Sur, México. Sediments were taken using a modified Kahlsico grab sampler (model # 214WA110) from 26 sampling stations. Each sample was transferred to a sterile bag (Nasco whirl-pack) and stored at 4 °C until used. Samples were diluted 1:10 in 2% saline solution and 0.5% glucose. Dilutions were incubated for 1 h at room temperature (RT). Then, they were inoculated in YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar, ampicillin 50 µg mL⁻¹) with 50% natural filtered (0.45 µm) seawater (37 ppt). Plates were grown for 2 months at RT at dark, and they were examined every 48 h. Mycelia were transferred to new YEPD agar with 100% of seawater. We isolate 38 fungi and only one of them was hypersaline (coordinates: 25° 89' 14" N 111° 25' 09" W, 275 m deep). The isolate was deposited in the CM-CNRG collection from INIFAP (Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, México), accession number CM-CNRG 624 holotype culture (<http://www.inifap.gob.mx/SitePages/centr>

[os/cnrg.aspx](http://www.inifap.gob.mx/SitePages/centr/os/cnrg.aspx)) and the isotype culture to Herbario BCMEX-UABC fungi collection, accession number 6006.

Halotolerance and growth rates

The isolate was grown at 0, 4, 15 and 25% of NaCl (w/v) in YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar). The agar plates were incubated in darkness at 28 °C for 6 weeks. Mycelia diameter was measured each week. Experiments were done by duplicate. Hyphae and reproductive spores were observed and photographed with a light microscope (Motic® B1).

Substrate degradation

To evaluate the physiology from the isolate, its ability to degrade chitin, starch, cellulose, proteins, lignin, and lipids was tested; each essay was incubated at 28 °C for 14 days in darkness. The media used to identify each activity are summarized in Table 1.

Morphology

Several characteristics were chosen to identify the isolate, specifically: colony color, texture, sporulation, mycelia color, conidiophores characteristics, conidia, and phialides morphology (Samson et al. 2014).

DNA purification and PCR

The isolate was cultured for 7 days in YPD broth with 15% NaCl. Then, the mycelium was collected for purified DNA using Michiels et al. (2003) protocol. PCR reactions to amplify ITS (Internal transcribed spacer) 1–2 region were performed in a 25 µL volume: 1X Go-Taq green master mix

Table 1 Growth media and substrate degradation assays

Substrate	Growth media	Detection
Starch	0.8% peptone; 15% NaCl; 1% starch, distilled water (modified according to Greiner et al. 2014)	Benedict's test for reducing sugars. Positive color change (blue to orange or brick red)
Chitin	0.45% colloidal chitin; 0.2% NaH ₂ PO ₄ ; 0.3% (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0.03% MgSO ₄ ; 0.1% citric acid; 0.01% phenol red; 15% NaCl; 1.5% agar; 0.02% tween 80, distilled water, pH 4.7 (Agrawal and Kotasthane 2012)	Agar color change (yellow to red)
Cellulose	0.2% KH ₂ PO ₄ ; (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0.03% urea; 0.03% MgSO ₄ ; CaCl ₂ ; 0.1% peptone; 1% carboxyl methyl cellulose; 15% NaCl; distilled water; pH 5.5 (Trigiano and Ament 2004)	Benedict's test
Protein	10% Skim milk; 2% peptone; 15% NaCl; 1.5% agar; distilled water (Claus 1989)	Cleared zone indicates protease activity
Lipid	Spirit blue agar; 15% NaCl, distilled water (Claus 1989)	Intense blue color around the colony indicates lipases activity
Lignin	0.4% lignin; 1% malt extract; 0.4% yeast extract; 0.4% dextrose; 15% NaCl; 1.5% agar; water distilled (modified according to Greiner et al. 2014)	Cleared zone indicates lignases activity 1% w/v aqueous solution of K ₃ [Fe (CN) ₆] and FeCl ₃ (Pointing 1999)

(PROMEGA®), 10 µM of each primer (ITS1 5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3' and ITS2 5'-GCTGCGTTCTTC ATCGATGC-3'), 20 ng of DNA, 10 µM of BSA (bovine serum albumin), final concentration. The cycling condition was as follows: 1 cycle of 3 min at 95 °C, 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 59 °C, 1 min at 72 °C, followed by a final extension of 10 min at 72 °C (Martin and Rygiewicz 2005). Two hundred sixty-seven bp amplicons were verified by 2% agarose electrophoresis and visualized by UV-light. PCR products were purified and sequenced by Allele Biotech at San Diego CA, USA.

cDNA synthesis

Total RNA was purified using E.Z.N.A. Fungal RNA mini kit (OMEGA®). RNA quality and quantity were verified by absorbance and gel electrophoresis followed by cDNA libraries synthesis using TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina®). Sequences were obtained using MiSeq system (Illumina®).

Gene sequence analysis (RPB1, RPB2, Cct8, TSR1, CaM, BenA)

The readings obtained from the MiSeq sequencer were filtered using Trimmomatic (PHRED quality higher than Q30 with a length greater than 36 bp; Bolger et al. 2014) to remove adapters and homopolymers. Sequence quality control was verified by FastQC (Wingett and Andrews 2018; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

The filtered sequences were assembled de novo using Trinity (trinityrnaseq-Trinity-v2.6.6; Grabherr et al. 2013). The assembly quality control was performed with Transrate v 1.0.3 (Smith-Unna et al. 2016). FASTA file from the quality control was queried in BlastX (version 2.4.0+; Altschul et al. 1990) from the National Center of Biotechnology (NCBI) using the Uniprot database, with an *E*-value of 0.05. Files from BlastX were used to find functional annotations into uniprot-reviewed-annotations_041017 (<https://rest.sqlsh.ore.uw.edu>; Washington University 2018). Gene sequences of RPB1 (DNA-directed RNA polymerase II subunit), RPB2 (RNA polymerase beta), Cct8 (Chaperonin containing TCP1 subunit 8), TSR1 (Ribosome maturation factor), CaM (calmodulin), BenA (tubulin beta chain), and ITS1–2 were subjected to BLASTn in the Genbank of NCBI to look for species similarity, excluding clones and uncultured data. Sequences were aligned using ClustalW (Larkin et al. 2007) from MEGA X software (Kumar et al. 2018), which was also used for the phylogenetic analysis. Sequence analysis was conducted using maximum likelihood based on 1000 repetitions of bootstrap. Trees were obtained based on the appropriate model from each data set to estimate evolutionary rate

differences among sites. All sequences were deposited into Genbank (NCBI).

Results

Morphology

Colony morphology of CM-CNRG 624 in YPD containing 4% of NaCl was granular texture with an ivory color appearance; sometimes it looked yeast-like. Colonies at 15% NaCl were white, velvety and powdery. Colonies at 25% NaCl had the same characteristics as 15% NaCl. Hyphae grew straight and branched with septa. Conidiogenous cells were simple phialides born laterally and apical on a short unbranched conidiophore. Phialides (monophialidic) were cylindrical and straight to occasionally slightly narrow at the base. Conidia were a little roughened; they were in long chains, occasionally in heads raceme-like, with a globose and subglobose shape. There was an absence of sclerotia and chlamydospores (Fig. 1, Table 2).

Halotolerance and grow rates

CM-CNRG 624 was unable to grow in media with no NaCl. The optimal growth was exhibited at 15% of NaCl with a maximum colony diameter of 3.7 cm at 26 days. Colony at 4% showed less growth after 42 days, and its diameter reached only 1.8 cm. However, at 25% NaCl it showed slow growth with a colony diameter of 3.6 cm at 42 days (Fig. 2).

Substrate degradation

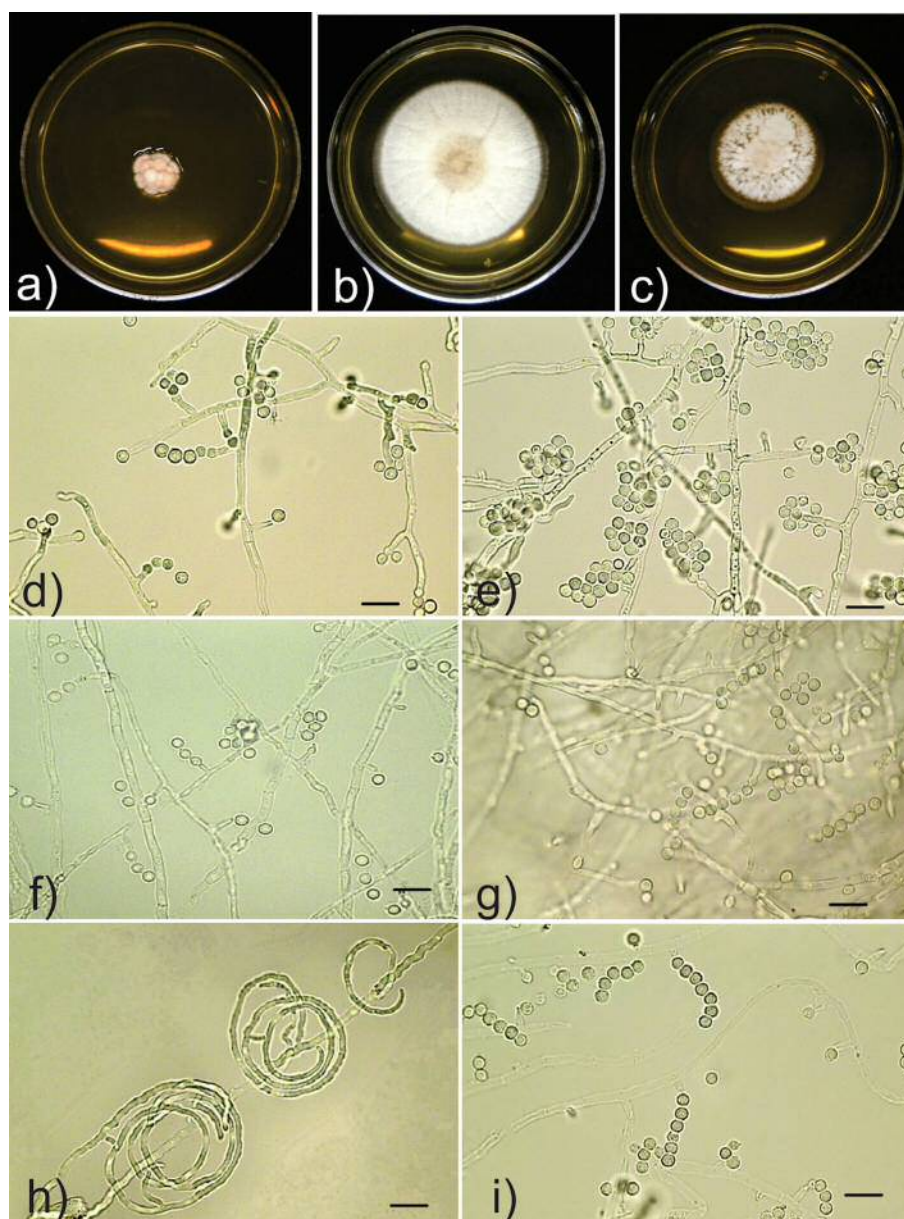
CM-CNRG 624 degraded lignin, chitin slightly, and starch. It was unable to decompose lipids, cellulose, and protein (Table 3).

BLAST molecular analysis

Blast analysis of ITS1–2 region of CM-CNRG 624 (Genbank accession number (GBAN): K236325.1) showed similarity to *Aspergillus baarnensis* (GBAN: KY980621.1; *E*-value 5e−94, 97% identity and 80% coverage) and *A. salinarus* (GBAN: NR_157473.1; *E*-value 3e−91, 96% identity and 80% coverage). Regarding the bootstrap analysis, CM-CNRG 624 was similar to *A. baarnensis* with 50% support (Fig. 3).

CM-CNRG 624 RPB1 gene (GBAN: MK312161) was similar to *A. vadensis* (GBAN: XM_025705365.1; *E*-value 0.0, 81% identity and 90% coverage), *A. salinarus* (GBAN: KY704175.1; *E*-value 0.0, 96% identity and 24% coverage) and *A. baarnensis* (GBAN: JN121666.1; *E*-value 0.0, 97% identity and 16% coverage). The bootstrap analysis placed

Fig. 1 *Aspergillus loretoensis* (CM-CNRG 624) on YPD agar. Colony growing at different NaCl concentrations: **a** 4%; **b** 15%; **c** 25%. **d** Phialides producing conidia chains at 4%; **e** phialides producing conidia in heads at 4%; **f, g** phialides with conidia in chains at 15%; **h** hyphae growing in a spiral shape at 25%; **i** phialides producing conidia in chains at 25%. Bars = 10 μ m



CM-CNRG 624 closer to *A. salinarus* with 65% support (Fig. 4a).

CM-CNRG 624 TSR1 (GBAN: MK312164) showed similarity to *A. salinarus* (GBAN: KJ855528.1; *E*-value 0.0, 95% identity and 87% coverage) and *A. baarnensis* (GBAN: KY980518.1; *E*-value 0.0, 95% identity and 78% coverage). The bootstrap analysis located CM-CNRG 624 with *A. salinarus* with 33% support (Fig. 4b).

CM-CNRG 624 RPB2 gene (GBAN: MK312162) showed similarity to *A. salinarus* (GBAN: KY704176.1; *E*-value 0.0, 97% identity) and *A. baarnensis* (GBAN: KY980450.1; *E*-value 0.0, 97% identity); however, the coverage was 26% and 22%, respectively. The bootstrap analysis grouped CM-CNRG 624 in the same clade of *A. baarnensis* with 36% support (Fig. 4c).

CM-CNRG 624 Cct8 gene (GBAN: MK309401) was similar to *A. salinarus* (GBAN: KY704179.1; *E*-value of 0.0, 97% of identity and 69% coverage) and *A. baarnensis* (GBAN: JN121910.1; *E*-value 0.0, 97% identity and 37% coverage). The bootstrap analysis showed CM-CNRG 624 closer to *A. baarnensis* with 52% support (Fig. 4d).

CM-CNRG 624 BenA gene (GBAN: MK309399) was more similar to *A. mundensis* (GBAN: XM_026764535.1; *E*-value 0.0, 89% identity and 100% coverage) than *A. baarnensis* (GBAN: KY980553.1; *E*-value $4e-75$, 99% identity and 19% coverage) and *A. salinarus* (GBAN: KY704177.1; *E*-value $4e-80$, 98% identity and 22% coverage). The bootstrap analysis showed CM-CNRG 624 closer to *A. baarnensis* with 75% support (Fig. 4e).

Table 2 Morphology of *Aspergillus*, subgenus *Polypaecilum* related to *Aspergillus loretoensis*

Species	Hyphae		Phialides		Conidia		Heads width (µm)	Diameter (single) (µm)	Shape	Chlamydospores		Sclerotia
	With (µm)	Distance between septa (µm)	Length (µm)	Width (µm)	Heads length (µm)					Presence		
<i>A. loretoensis</i> 15% NaCl (this study)	1.6–3.5 $\bar{X}$ = 2.39	4.9–28.8 $\bar{X}$ = 12.03	3.4–6.7 $\bar{X}$ = 4.75	1.1–2.5 $\bar{X}$ = 1.8	Occasionally in raceme like form			2.5–3.9 $\bar{X}$ = 3.28	Globose, subglobose	None	None	None
<i>A. salinarus</i> 15–25% NaCl (Greiner et al. 2014; ^{*1} Martinelli et al. 2017 ^{*2})	1.5–2.5 ^{*1} 2.5–4 $\bar{X}$ = 3 ^{*2}	9.5–16.0 ^{*1} 3.0–32.0 $\bar{X}$ = 10.0 ^{*2}	1.5–8.5 ^{*1} 2.0–18.0 $\bar{X}$ = 18.0 ^{*2}	1–1.5 ^{*1} 2–3.3 $\bar{X}$ = 2.6 ^{*2}	Occasionally in raceme like form	–		3.0–4.0 ^{*1} 2.4–3 $\bar{X}$ = 3.5 ^{*2}	Globose to subglobose	3.0–4.0 × 3.0–4.0 ^{*2}	None	None
<i>A. baarnensis</i> (Pitt and Hocking 1985)	–	–	3.0–20.0	2.0–3.0	None	None		3.5–6.0	Spherical, barely ellipsoidal, pyriform	None	None	None
<i>A. carinus</i> 5% NaCl (Martinelli et al. 2017; ^{*2} Sigler et al. 2010 ^{*3})	1.5–2.8 $\bar{X}$ = 1.9 ^{*2}	5.3–17.1 $\bar{X}$ = 10.6 ^{*2}	Base 4.5–16 $\bar{X}$ = 11.9 Tip 0.7–1.5 $\bar{X}$ = 1.1 ^{*3} 7.2–20.7 $\bar{X}$ = 12.0 ^{*2}	2.0–4.0 $\bar{X}$ = 2.1 ^{*3} 1.5–2.2 $\bar{X}$ = 1.9 ^{*2}	2.0–4.5 ^{*3} 2.5–4.1 $\bar{X}$ = 3.3 ^{*2}	1.5–3.2 ^{*3} 1.9–2.7 $\bar{X}$ = 2.3 ^{*2}		2.2–4.0 × 1.8–3.7 ^{*3} 2.4–3.1 $\bar{X}$ = 2.9 ^{*2}	Subglobose ^{*3}	None	None	None
<i>A. atacamensis</i> 10% NaCl (Martinelli et al. 2017)	1.5–3.0 $\bar{X}$ = 2.0	2.0–33.0 $\bar{X}$ = 12.5	3.0–23.5 $\bar{X}$ = 10.5	Base 2.0–3.0 Tip 1.5	None	None		Length 3.5–4.5 $\bar{X}$ = 4.0 Width 3.5–4.5 $\bar{X}$ = 3.7	Globose	3.5 × 3.5	None	None
<i>A. salisburgensis</i> (Martinelli et al. 2017)	1.5–5.5 $\bar{X}$ = 3.0	1.5–21.0 $\bar{X}$ = 8	3–23.5 $\bar{X}$ = 8.5	Base 2–3 Tip 1.5	None	None		Length 2.5–4.5 $\bar{X}$ = 3.5 Width 2.0–4.0 $\bar{X}$ = 3.0	Subglobose	3.0 × 3.5	None	None
<i>A. chlamydosporus</i> 5–15% NaCl (Martinelli et al. 2017; ^{*2} Sigler et al. 2010) ^{*3}	1.5–2.7 $\bar{X}$ = 2.0 ^{*2}	7.5–44.7 $\bar{X}$ = 22 ^{*2}	3.0–14.0 ^{*3}	Base 1.5–2.3 Tip 1–1.5 ^{*3}	1.8–3.5 ^{*3}	1.3–2.0 ^{*3}		2.3–5.8 × 1.7–3 ^{*3} 3.0–4.5 × 2.0–3.0 $\bar{X}$ = 4.0 × 2.5 ^{*2}	Ovoid, pyriform ^{*3}	2.8–5.5 × 2.5–4.8 ^{*3} 4.0–6.7 × 3.5–5.0 $\bar{X}$ = 5.0 × 4.0 ^{*2}	None	None

Table 2 (continued)

Species	Hyphae		Phialides		Conidia		Shape	Chlamydospores Presence	Sclerotia Presence
	With (µm)	Distance between septa (µm)	Length (µm)	Width (µm)	Heads length (µm)	Heads width (µm)			
<i>A. sclerotialis</i> (Sigler et al. 2010)	–	–	5.0–15.0	Base 1.2–1.8 Tip 1.0	None	None	Ovoid, truncate base	None	Present
<i>A. keratitis</i> (Hsieh et al. 2009)	–	–	14.0–30.0	2.0–2.5	None	None	Globose to subglobose	None	–

Asterisk + number indicates the reference of the data that was cited in the same line first column

Consequently, the most similar species in blast analysis for CM-CNRG 624 CaM gene (GBAN: MK309400) was *A. candidus* (GBAN: LT626978.1; *E*-value $7e-118$, 88% identity and 81% coverage). A DNA sequence of 208 bp of CM-CNRG 624 sequence (total length of 339 bp) was compared with *A. baarnensis* (GBAN: KY980585.1), and it got an *E*-value $2e-105$, 99% identity and 83% coverage. In addition, a DNA sequence of 124 bp from CM-CNRG 624 was compared with *A. salinarus* (GBAN: KY980583.1) and it got an *E*-value $2e-105$, 99% identity and 83% coverage. The bootstrap analysis showed in the same clade: *A. salinarus*, *A. baarnensis* and CM-CNRG 624 with 95% of bootstrap (Fig. 4f). Sequences from those genes were deposited at Genbank. All the results are summarized in Table 4.

Taxonomy

Aspergillus loretoensis, González-Martínez and Portillo-López, sp. nov.

MycoBank MB830181

(Figure 1)

Etymology: from the Latin *loretoensis* pertaining to Bahía de Loreto (Baja California Sur, México) where, this species was isolated and discovered.

Description: colonies grew fastest in 15% NaCl. They had a white velvet-powdery texture at 15% and 25% NaCl. Colonies at 4% NaCl had a granular aspect with ivory color. Growth was not observed in the medium without NaCl. Hyphae grew straight mostly unbranched with septa at 15% NaCl; they measured from 4.9 to 25.8 µm between septa (avg 11.44) and 1.4–2.8 µm width (avg 2.26). Conidiogenous cells were simple phialides borne laterally on a short unbranched conidiophore. Phialides were hyaline, cylindrical and straight at 15% NaCl; they measured from 3.4 to 6.7 µm long (avg 4.75) and 1.1–2.5 µm width (avg 1.88). Conidia were borne in long chains, occasionally in raceme-like heads, with a globose and subglobose shape. A single conidia diameter was from 2.5 to 3.9 µm (avg 3.28) at 15% NaCl and the chain length was from 13.1 to 26.8 µm long (avg 18.95). There was an absence of ascocarp, sclerotia and, chlamydospores. Even though at 4% and 25% on NaCl the structure measurement was similar (Table 2), there were some shape differences. At 25% NaCl, some hyphae grew from curved to a spiral shape (Fig. 1h, j), and at 4% NaCl, the conidia grew mostly in heads raceme-like form (Fig. 1c, Table 5).

Ecology: *A. loretoensis* was isolated from sea sediments from Loreto Bay, Baja California Sur, México at 275 m deep (coordinates 25° 89' 14" N 111° 25' 09" W). It was found together with *Cladosporium* sp. in vitro cultures exhibited growth in YPD medium at 28 °C with a salt concentration between 4 and 25%. *A. loretoensis* grew slower in MEA media under the same conditions.

Fig. 2 Growth curve of *Aspergillus loretoensis* at different NaCl concentration on YPD media. This graph was done in Excel 2010 (Microsoft® office)

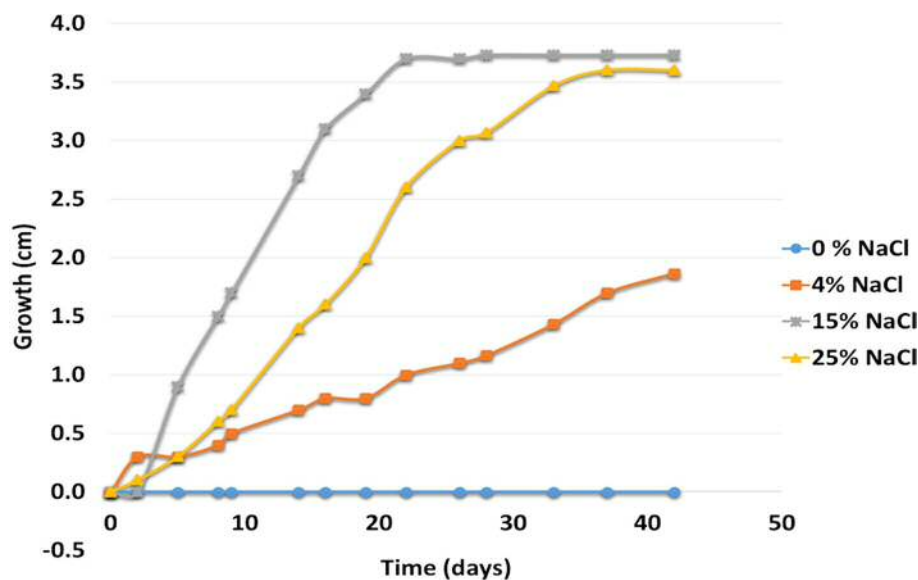


Table 3 Enzymatic activities of *A. loretoensis* compared to related fungi

	<i>A. loretoensis</i> This study	<i>A. salinarus</i> Greiner et al. (2014)	<i>A. salinarus</i> Martinelli et al. (2017)	<i>A. atacamensis</i> Martinelli et al. (2017)	<i>A. salisburgensis</i> Martinelli et al. (2017)
Lipids	–	–	±	+	+
Lignin	+	–	NT	NT	NT
Chitin	±	–	NT	NT	NT
Cellulose	–	+	+	–	+
Protein	–	+	–	–	±
Starch	±	+	–	+	±

(±) weak, (+) positive, (–) negative, (NT) not tested

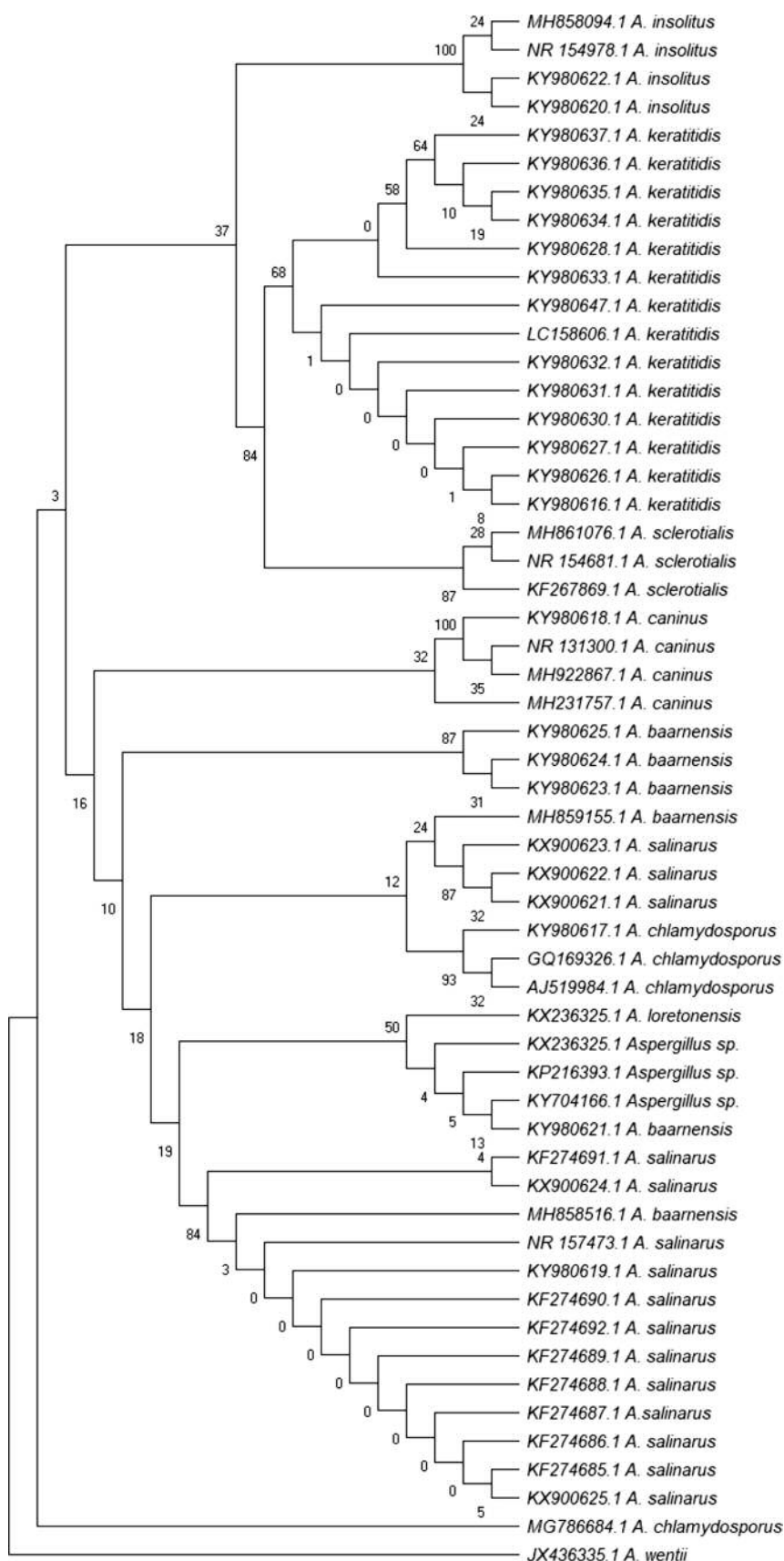
Aspergillus loretoensis differs from its known most related species, *A. baarnensis* and *A. salinarus* in having a shorter phialides length. In addition, it differs from *A. salinarus*, *A. atacamensis*, *A. salisburgensis* and *A. chlamydosporus* in the absence of chlamydoconidia, from *A. baarnensis*, differs in the globose or subglobose conidia shape and the presence of conidia in heads, from *A. sclerotialis* in the lack of sclerotia, from *A. keratitis* in a shorter phialides length, and from *A. caninus* it was unable to grow without NaCl. The common characteristics shared with all members of the subgenus Polypaecilum are the simple phialides producing conidia in long chains and the hyphae width.

Discussion

In this study, we combined a polyphasic characterization including morphology, physiology, and molecular data for the identification and description of the new species *A.*

loretoensis isolated from sea sediments. The data indicate that the strain is a member of the genus *Aspergillus*, subgenus Polypaecilum (Kocsubé et al. 2016). The more related species were *A. salinarus* (Greiner et al. 2014) and *A. baarnensis* (Pitt and Hocking 1985). Hyphae width, the distance between septa, conidia shape, and diameter, as well as the occasional presence of conidia in heads (observed at 4% of NaCl) were similar between CM-CNRG 624 and *A. salinarus* (Greiner et al. 2014; Martinelli et al. 2017). Phialides width was similar in all the species compared; however, the length of the phialides is different being shorter in CM-CNRG 624 and the longest in *A. keratitis* (Pitt and Hocking 1985; Hsieh et al. 2009; Sigler et al. 2010; Greiner et al. 2014; Martinelli et al. 2017). There was no observation of chlamydoconidia in CM-CNRG 624 and *A. baarnensis* (Pitt and Hocking 1985), contrary to *A. salinarus*, *A. atacamensis*, *A. salisburgensis*, and *A. chlamydosporus* that belong to the same subgenus (Sigler et al. 2010; Martinelli et al. 2017). The only species that presents sclerotia in the subgenus Polypaecilum is *A. sclerotialis* (Sigler et al. 2010). Only a few fungi have been reported to be strict halophiles (unable to grow in medium without salt): *A. baarnensis* (isolated from dry salt fish, it grew from 5 to 20% NaCl; Pitt and Hocking 1985; Tanney et al. 2017), *A. salinarus* (isolated from salterns, it grew from 4 to 25% of NaCl; Greiner et al. 2014), *Wallemia ichthyophaga* (isolated from dry salt fish and salterns, it grew from 9 to 30% of NaCl; Johan-Olsen 1887; Kunčič et al. 2010), *W. muriae* (isolated from contaminated food and salterns, it grew from 4 to 25% of NaCl; Kunčič et al. 2010; Zajc et al. 2014), *Gymnoascus halophilus* (isolated from sediments of Chaka salt lake in China, it grew from 7.5 to 22.5% of NaCl; Zhou et al. 2016), *A. penicillioides* (isolated from

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the maximum likelihood method with bootstrap values expressed as a percentage of different sequences data. ITS1–2; Taxon names are preceded by the GBAN. *Aspergillus wentii* was used as an outgroup



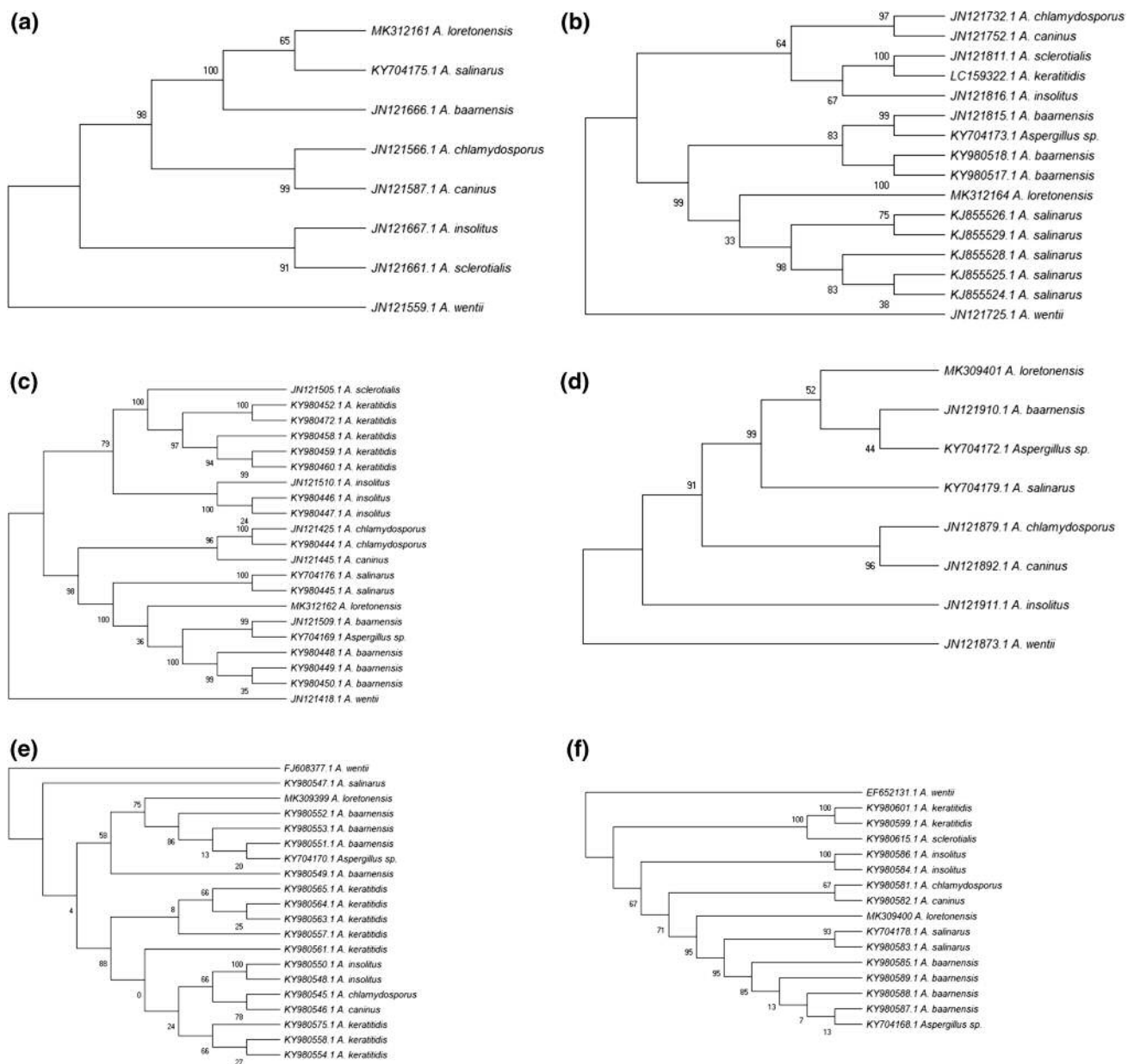


Fig. 4 Phylogenetic tree based on the maximum likelihood method with bootstrap values expressed as a percentage of different sequences data. **a** RPB1; **b** TSR1; **c** RPB2; **d** Cct8; **e** BenA; **f** CaM. Taxon names are preceded by the GBAN. *Aspergillus wentii* was used as an outgroup

sediment and water of the Dead Sea, it grew from 2 to 15% of NaCl; Nazareth et al. 2012), *A. unguis* (isolated from the Dead Sea water, it grew from 2 to 15% of NaCl; Nazareth et al. 2012) and *Gymnascella marismortui* (isolated from surface water from the Dead Sea, it grew from 10 to 30% of NaCl; Buchalo et al. 1998). CM-CNRG 624 is considered as a strict halophile because it requires at least 4% of NaCl to grow and it had a comparable range of salinity to *A. salinarus* and *W. muriae*. To date, CM-CNRG 624 is the first strict halophile fungus isolated from marine sediments.

Regarding comparative substrate utilization, CM-CNRG 624 was able to degrade lignin and chitin in contrast to *A. salinarus* that was not. There is no information about the degradation of lignin or chitin with the related species. In addition, CM-CNRG 624 was similar to *A. salinarus* in the lack of degradation of lipids and protein. It was also similar to *A. atacamensis* in its inability to degrade cellulose and protein. Finally, CM-CNRG 624 presents the same weak activity of starch degradation as *A. salisburgensis*.

Schoch et al. (2012) proposed the ITS region as the standard fungi barcode; however, these authors also warn about

Table 4 Blast analysis information

Locus	Species	Genbank no.	E-value	Identity	Coverage	More related species	Bootstrap (%)
ITS1–2	<i>A. baarnensis</i>	KY980621.1	5.00e–94	97	80	<i>A. baarnensis</i>	73
	<i>A. salinarus</i>	NR_157473.1	3.00e–91	96	80		
RPB1	<i>A. vadensis</i>	XM_025705365.1	0.00	81	90	<i>A. salinarus</i>	41
	<i>A. salinarus</i>	KY704175.1	0.00	96	24		
	<i>A. baarnensis</i>	JN121666.1	0.00	97	16		
RPB2	<i>A. fumigatus</i>	AY485610.1	0.00	63	81	<i>A. baarnensis</i>	43
	<i>A. salinarus</i>	KY704176.1	0.00	97	26		
	<i>A. baarnensis</i>	KY980450.1	0.00	97	22		
Cct8	<i>A. salinarus</i>	KY704179.1	0.00	97	69	<i>A. baarnensis</i>	65
	<i>A. baarnensis</i>	JN121910.1	0.00	97	37		
TSR1	<i>A. salinarus</i>	KJ855528.1	0.00	95	87	<i>A. salinarus</i>	41
	<i>A. baarnensis</i>	KY980518.1	0.00	95	78		
CaM	<i>A. candidus</i>	LT626978.1	7.00e–118	88	81	<i>A. salinarus</i>	100
	<i>A. baarnensis</i>	KY980585.1	2.00e–105	99	83	<i>A. baarnensis</i>	100
	<i>A. salinarus</i>	KY980583.1	2.00e–105	99	83		
BenA	<i>A. mundensis</i>	XM_026764535.1	0.00e+00	89	100	<i>A. baarnensis</i>	64
	<i>A. baarnensis</i>	KY980553.1	4.00e–75	99	19		
	<i>A. salinarus</i>	KY704177.1	4.00e–80	98	22		
Top1	<i>A. baarnensis</i>	KY980486.1	0.00	84	92	<i>A. baarnensis</i>	87
	<i>A. salinarus</i>	KY980479.1	0.00	83	81	<i>A. salinarus</i>	87

Table 5 Microscopic morphology measures at 4, 15 and 25% of NaCl

	NaCl concentration (%)	Hyphae		Phialides		Conidia	
		Length between septa (μm)	Width (μm)	Length (μm)	Width (μm)	Single diameter (μm)	Chain length (μm)
4							
Min–max		4.7–29.7	1.6–3.5	2.2–11.6	1.2–2.9	2.5–4.3	11.5–27.2
Average		11.44	2.39	5.95	1.93	3.49	18.43
15							
Min–max		4.9–25.8	1.4–2.8	3.4–6.7	1.1–2.5	2.5–3.9	13.1–26.8
Average		12.03	2.26	4.75	1.88	3.28	18.95
25							
Min–max		6.5–31	1.6–3.6	1.6–7.7	1.2–2.4	2.3–4.1	20.7–30
Average		12.18	2.47	4.51	1.76	3.24	23.51

the slightly low success in some groups as Ascomycota, where the genus *Aspergillus* needs a second barcode (Geiser et al. 2007; Samson et al. 2014). Samson et al. (2014) suggest the use of CaM, BenA and RPB2 genes as second identification markers, with CaM being the most suitable since it is easy to amplify by PCR and there is a good sequence database for many species. However, Houbraken et al. (2014) include RPB1, TSR1 and Cct8 genes in their study. In this study, all these markers were tested. RPB1 and TSR1 genes place CM-CNRG 624 closer to *A. salinarus*. However, they were supported by a weak bootstrap of less than 65%. RPB2, Cct8 and BenA genes place CM-CNRG 624 closer to *A.*

baarnensis with bootstrap support between 35 and 75%. The ITS region places CM-CNRG 624 closer to *A. baarnensis* with low bootstrap support of 50%. Analysis using CaM gene relate CM-CNRG 624 to both species, but the cluster is not clear enough.

The approaches used in this study demonstrate that CM-CNRG 624 can be characterized as a new obligate halophile species from marine sediment that is closely related to *A. baarnensis* and *A. salinarus*. While there were some morphological similarities among them, there were also differences. The molecular analysis identifies *A. loretoensis* as a new species in the genus *Aspergillus*,

subgenera *Polypaecilum*. We propose the species name *loretoensis* since it is related to the geographical location of Loreto Bay where it was found.

Acknowledgements We thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for their support with the Ph.D. scholarship. We are grateful to Universidad Autónoma de Baja California and Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada to allow us to use their facilities.

References

- Agrawal T, Kotasthane AS (2012) Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in central India. Springerplus 1:1–10. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-73>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Buchalo AS, Nevo E, Wasser SP, Oren A, Molitoris HP (1998) Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. R Soc 265:1461–1465. <https://doi.org/10.1007/BF00193160>
- Claus W (1989) Understanding microbes. W. H. Freeman and Company, New York
- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J et al (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Stud Mycol 59:1–10. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>
- González-Martínez S, Soria I, Ayala N, Portillo-López A (2017) Culturable halotolerant fungal isolates from Southern California Gulf sediments. Open Agric 2:292–299. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0033>
- Grabherr M, Haas B, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA et al (2013) Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. Nat Biotechnol 29:644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Greiner K, Peršoh D, Weig A, Rambold G (2014) *Phialosimplex salinarum*, a new species of Eurotiomycetes from a hypersaline habitat. IMA Fungus 5:161–172. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2014.05.02.01>
- Gunde-Cimerman N, Zalar P, De Hoog S, Plemenitaš A (2000) Hypersaline waters in salterns—natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiol Ecol 32:235–240. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00032-5)
- Houbraken J, De Vries RP, Samson RA (2014) Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Adv Appl Microbiol 86:199–249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>
- Hsieh HM, Ju YM, Hsueh PR, Lin HY, Hu FR et al (2009) Fungal keratitis caused by a new filamentous hyphomycete *Sagenomella keratitidis*. Bot Stud 50:331–335. <https://doi.org/10.1016/j.comps citech.2015.08.005>
- Johan-Olsen O (1887) Om sop på klipfisk den såkaldte mid. Christ Vidensk Forh 12:3–20
- Kocsubé S, Perrone G, Magistà D et al (2016) *Aspergillus* is monophyletic: evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. Stud Mycol 85:199–213. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.006>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kunčič MK, Kogej T, Drobne D, Gunde-Cimerman N (2010) Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. Appl Environ Microbiol 76:329–337. <https://doi.org/10.1128/AEM.02318-09>
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Madigan M, Martinko J, Bender K, Buckley DH, Stahl DA (2015) Brock biology of microorganisms, 14th edn. Pearson, New York
- Martin KJ, Rygielwicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiol 5:28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
- Martinelli L, Zalar P, Gunde-Cimerman N, Azua-Bustos A, Sterflinger K et al (2017) *Aspergillus atacamensis* and *A. salisburgensis*: two new halophilic species from hypersaline/arid habitats with a *Phialosimplex*-like morphology. Extremophiles 21:755–773. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0941-3>
- Michiels A, Van den Ende W, Tucker M, Van Riet L, Van Laere A (2003) Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. Anal Biochem 315:85–89. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00665-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00665-6)
- National Center for Biotechnology Information (2019) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 1 May 2019
- Nazareth S, Gonsalves V, Nayak S (2012) A first record of obligate halophilic aspergilli from the Dead Sea. Indian J Microbiol 52:22–27. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0225-z>
- Pitt JI (1975) Xerophilic fungi and the spoilage of food of plant origin. In: Duckworth RB (ed) Water relations of foods. Academic press, New York, pp 273–307
- Pitt JI, Hocking AD (1985) New species of fungi from Indonesian dried fish. Micotaxon 22:197–208
- Pitt JI, Hocking AD (2009) Xerophiles. In: Fungi and food spoilage, 3rd edn. Springer, pp 339–355. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Pointing SB (1999) Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. Fungal Divers 2:17–33
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V et al (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol 78:141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL et al (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proc Natl Acad Sci USA 109:6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Sigler L, Sutton DA, Gibas CFC, Summerbell RC, Noel RK et al (2010) *Phialosimplex*, a new anamorphic genus associated with infections in dogs and having phylogenetic affinity to the Trichocomaceae. Med Mycol 48:335–345. <https://doi.org/10.3109/13693780903225805>
- Sklenář F, Jurjević Z, Zalar P, Frisvad JC, Visagie CM et al (2017) Phylogeny of xerophilic aspergilli (subgenus *Aspergillus*) and taxonomic revision of section restricti. Stud Mycol 88:161–236. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.002>
- Smith-Unna R, Boursnell C, Patro R, Hibberd JM, Kelly S (2016) TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. Genome Res 26:1134–1144. <https://doi.org/10.1101/gr.196469.115>
- Tanney JB, Visagie CM, Yilmaz N, Seifert KA (2017) *Aspergillus* subgenus *Polypaecilum* from the built environment. Stud Mycol 88:237–267. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.11.001>

- Trigiano R, Ament M (2004) Detecting and measuring extracellular enzymes of fungi and bacteria. In: Trigiano R, Windham M, Windham A (eds) Plant pathology. CRC, New York, pp 247–259
- Washington University (2018) SQL share: uniprot-reviewed-annotations_041017
- Wheeler KA, Hocking AD, Pitt JI, Anggawati AM (1986) Fungi associated with Indonesian dried fish. Food Microbiol 3:351–357. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(86\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0740-0020(86)90020-1)
- Wheeler KA, Hocking AD, Pitt JI (1988) Influence of temperature on the water relations of *Polypaecilum pisce* and *Basipetospora halophila*, two halophilic fungi. J Gen Microbiol 134:2255–2260. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-8-2255>
- Wingett SW, Andrews S (2018) FastQ Screen: a tool for multi-genome mapping and quality control. F1000Res 7:1338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>
- Zajc J, Kogej T, Galinski EA, Ramos J, Gunde-Cimermana N (2014) Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. Appl Environ Microbiol 80:247–256. <https://doi.org/10.1128/AEM.02702-13>
- Zalar P, Sybren de Hoog G, Schroers HJ, Frank JM, Gunde-Cimerman N (2005) Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). Antonie Van Leeuwenhoek 87:311–328. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6783-x>
- Zhou N, Zhang Y, Liu F, Cai L (2016) Halophilic and thermotolerant *Gymnoascus* species from several special environments, China. Mycologia 108:179–191. <https://doi.org/10.3852/15-086>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.