

Caracterización de clústeres de genes biosintéticos para la producción de azafilonas de carácter polar en el género fúngico *Pseudogymnoascus*

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de Doctor(a) en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Por

Vicente Edmundo Oliva Galleguillos

Mayo, 2024

Director(a/es) de Tesis: Dra. Inmaculada Vaca Cerezo

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el/la candidato/a

Vicente Edmundo Oliva Galleguillos

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 2 de mayo de 2024.

Director/a de Tesis:

Dra. Inmaculada Vaca Cerezo

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Marcelo Baeza

Dra. Jennifer Alcaino

Dra. Claudia Stange

Dra. Beatriz Cámara



BIOGRAFÍA



Nacido en la madrugada del 31 de enero de 1995, Vicente Edmundo Oliva Galleguillos fue nombrado el segundo hijo de Jacqueline Ivonne Galleguillos Pérez y Pedro Antonio Oliva Flores.

Distraído, callado, quejumbroso y *cabeza de pollo* (como declara mi madre), crecí en un ambiente marcado por la innegable resiliencia de increíbles mujeres, entre ellas mi querida madre, mi incomparable tía Diome, mi loca prima Andrea, y mis dos abuelas, Ángela y Sofía, ambas mujeres fuertes como robles. Fueron ellas junto a mi hermano Ignacio quienes me enseñaron que se puede soñar, y quienes me dieron el valor para hacerlo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Inmaculada, gracias por ayudarme a visualizar el tipo de científico que quiero ser, gracias por alentarme en las buenas, no tan buenas y malas. Gracias Inmaculada por darme la oportunidad y el espacio para crecer en este periodo que recordaré como uno de los más intensos y valiosos de mi vida.

Gracias Mariana por ser mi hermana de doctorado, gracias Pablo y Anaí por ser mis hermanos cuando nos adentramos al mundo de los honguitos, gracias Diego por ser un pilar irremplazable durante los últimos 4 años. Gracias a todos ustedes por ser mi familia de laboratorio, por los destajos al *chancear*, por las risas, *pelambres* y penurias que vivimos juntos.

Gracias a cada una de las persona, profesores, tutores y amigos que aportaron con su grano de arena que en conjunto terminaron moldeando mi formación durante este periodo, en especial a Damián. Particularmente deseo agradecer al Dr. Thomas Ostenfeld Larsen por abrirme las puertas de su laboratorio y mostrarme otra cara de lo que es hacer ciencia.

Finalmente, y no menos importante, gracias Maxi, gracias por estar ahí desde marzo del año 2013 hasta hoy marzo del 2024, gracias por ser mi compañero de carrera, de doctorado y de trabajo, sin ti esta habría terminado siendo otra historia.

Financiamiento

Becas ANID Doctorado Nacional - 2018-21181056

Beca de Arancel de la Facultad de Ciencias

Proyecto FONDECYT 1211830

Centre of Microbial Secondary Metabolites (CeMiSt), DTU

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
1. Metabolitos secundarios fúngicos	1
2. Enzimas policétido sintetas	4
3. Pigmentos fúngicos.....	7
4. Azafilonas	9
5. Biosíntesis de azafilonas	14
6. Hongos del género <i>Pseudogymnoascus</i> como productores de azafilonas	20
HIPÓTESIS	25
Hipótesis Científica.....	25
Hipótesis Tecnológica.....	25
OBJETIVOS	26
Objetivo General	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Análisis bioinformático.....	27
1.1 Filogenia del género <i>Pseudogymnoascus</i>	27
1.2 Detección de BGCs e identificación de BCAs.....	28
1.3 Análisis de las enzimas principales y accesorias	28

2. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	29
2.1 Cepas fúngicas.....	29
2.2 Cepa bacteriana.....	30
2.3 Medios de cultivo.....	31
3. Análisis y manipulación de ácidos nucleicos.....	31
3.1 Extracción de ADN genómico desde micelio procedente de cultivo líquido	31
3.2 Extracción de ADN plasmidial.....	32
3.3 Reacciones de digestión con enzimas de restricción	32
3.4. Ligación de fragmentos de ADN	32
3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
3.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	34
3.7 Extracción de ADN desde geles de agarosa	34
3.8 Extracción de ARN desde micelio procedente de cultivos en placa	34
3.9 Electroforesis de ARN en geles de agarosa.....	35
3.10 Retro-transcripción de ARN y PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	35
4. Transformación genética de microorganismos.	36
4.1 Transformación química de <i>E. coli</i> DH5 α	36
4.2 Transformación de la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27 mediada por PEG..	37
5. Caracterización de las cepas transformantes de <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	39
5.1 Caracterización fenotípica de las cepas transformantes de <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27.....	39
5.2 Caracterización molecular de las cepas transformantes de <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27.....	39
5.3 Caracterización química del perfil de metabolitos secundarios de las cepas transformantes de <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	40
6. Análisis y purificación de pigmentos de la cepa <i>P. verrucosus</i> FAE27.....	41
6.1 Análisis por HPLC-DAD-MS/MS.....	41
6.2 Extracción y purificación de pigmentos.....	42
RESULTADOS	44

1. Caracterización bioinformática del potencial de biosíntesis de azafilonas en genomas del género <i>Pseudogymnoascus</i>	44
1.1 Identificación de clústeres biosintéticos de azafilonas en genomas del género <i>Pseudogymnoascus</i>	44
1.2 Análisis de la composición génica de los BCAs identificados en el género <i>Pseudogymnoascus</i>	55
1.2.1 Análisis de enzimas principales	55
1.2.2 Análisis de enzimas accesorias	58
1.3 Caracterización del clúster biosintético GymN para la síntesis de azafilonas en la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27.....	64
2. Análisis funcional del clúster GymN para determinar si es el responsable de la síntesis de los pigmentos producidos por la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	69
2.1 Construcción del plásmido de silenciamiento pJL-HNa.....	69
2.2 Obtención de cepas con el gen <i>gymNa</i> atenuado.....	70
2.3 Identificación de los pigmentos sintetizados por el clúster GymN.....	74
3. Elucidación de la naturaleza química de los pigmentos producidos por la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	78
3.1 Identificación de pigmentos candidatos para la purificación	78
3.2 Purificación de los pigmentos de la cepa <i>P. verrucosus</i> FAE27 cultivada en medio Cz-S	85
4. Evaluación de la polaridad y estabilidad de los pigmentos rojos producidos por la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	93
DISCUSIÓN	95
Identificación de clústeres biosintéticos de azafilonas en el género <i>Pseudogymnoascus</i> ..	97
Clústeres biosintéticos para la síntesis de azafilonas en <i>Pseudogymnoascus</i>	100
Caracterización bioinformática del clúster GymN.....	114
Silenciamiento del gen <i>gymNa</i> en la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27 e identificación de los pigmentos sintetizados por el clúster GymN	115
Purificación del (los) pigmento (s) sintetizados por el clúster GymN en la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27.....	118

Caracterización de los extractos acuosos pigmentados obtenidos de la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27.....	123
CONCLUSIONES	125
PROYECCIONES	127
REFERENCIAS	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Pigmentos fúngicos, clasificación y aplicaciones.	9
Tabla II. Clústeres de genes biosintéticos descritos para azafilonas y el policétido asperfuranona.	15
Tabla III. Metabolitos aislados desde cepas del género <i>Pseudogymnoascus</i> ...	21
Tabla IV. Cepas fúngicas transformantes generadas en este trabajo.	30
Tabla V. Partidores utilizados y sus secuencias.	33
Tabla VI. Clústeres de genes biosintéticos descritos para la síntesis de azafilonas y el metabolito relacionado asperfuranona en hongos filamentosos.	48
Tabla VII. BGCs identificados para la síntesis de azafilonas (BCAs) en cada genoma de <i>Pseudogymnoascus</i>	51
Tabla VIII. Composición de las proteínas codificadas en los genes del clúster GymN en la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27.....	66
Tabla IX. Formulas moleculares posibles de los iones m/z 385,2486 [M+H] ⁺ y m/z 427,2597 [M+H] ⁺	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de la estructura de un BGC y la ruta biosintética que origina.	3
Figura 2. Esquema de biosíntesis de policétidos en PKS iterativas de tipo I.	5
Figura 3. Estructuras y coloración de pigmentos fúngicos.	8
Figura 4. Estructura heterociclo pirano-quinona presente en las azafilonas.	10
Figura 5. Estructuras y coloración de la azafilona citrinina y de los MonAzPs producidos por <i>Monascus</i> y <i>Talaromyces</i>	11
Figura 6. Modificación de MonAzPs mediante incorporación de glutamato.	12
Figura 7. Rutas biosintéticas consenso de los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas y asperfuranona.	17
Figura 8. Esquema de la biosíntesis de MonAzPs en <i>Monascus pilosus</i>	19
Figura 9. Colonias pigmentadas de cepas fúngicas antárticas del género <i>Pseudogymnoascus</i>	22
Figura 10. Análisis químico y genético preliminar del potencial para la biosíntesis de azafilonas de la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27.	23
Figura 11. Análisis de correlación del indicador N50 con la completitud del genoma (%C), número de BGCs y porcentaje de <i>Edge</i> BGCs.	45
Figura 12. Distribución de BGCs en los 22 genomas de <i>Pseudogymnoascus</i> analizados de acuerdo con su filogenia.	46
Figura 13. Red de similitud de secuencia de los 631 BGCs identificados en los genomas de <i>Pseudogymnoascus</i> con BGCs de azafilonas de otros géneros fúngicos.	50
Figura 14. Arquitectura de los BCAs identificados en <i>Pseudogymnoascus</i>	53
Figura 15. Filogenia de los dominios KS de las enzimas de tipo PKS-NR de BGCs asociados a la síntesis de azafilonas y arquitectura de los dominios catalíticos de sus enzimas principales.	56
Figura 16. Composición enzimática de los BCAs identificados en <i>Pseudogymnoascus</i> y los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas.	60
Figura 17. Arquitectura de los BCAs representantes de los 6 clados descritos en <i>Pseudogymnoascus</i> y de los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas en otros géneros fúngicos.	63

Figura 18. Arquitectura del clúster GymN de la cepa <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	65
Figura 19. BGC candidato para la biosíntesis de hiphodiscorubrina en <i>Hyphodiscus hymeniphilus</i> ATCC 34498. A.....	67
Figura 20. Esquema de la construcción del plásmido pJL-HNa para la atenuación del gen <i>gymNa</i>	70
Figura 21. Cepas transformantes de <i>P. verrucosus</i> FAE27 con el plásmido pJL-HNa.	71
Figura 22. Cepas transformantes de <i>P. verrucosus</i> FAE27 con el plásmido pJL-H.	72
Figura 23. Caracterización fenotípica de las cepas transformantes de <i>P. verrucosus</i> FAE27 con los plásmidos pJL-HNa y pJL-H.	72
Figura 24. Caracterización molecular de las cepas transformantes de <i>P. verrucosus</i> FAE27 con los plásmidos pJLH-Na y pJL-H.	73
Figura 25. Cromatogramas a 254 y 530 nm del análisis por HPLC-DAD de los extractos obtenidos desde la cepa nativa y transformantes de <i>P. verrucosus</i> FAE27	76
Figura 26. Espectros de UV-visible de los compuestos que se encuentran presentes de forma diferencial en los extractos de las cepas transformantes analizados a 254 nm.	77
Figura 27. Espectros UV-visible de compuestos asociados a la expresión del gen <i>gymNa</i>	77
Figura 28. Caracterización por HPLC-DAD-MS/MS de los extractos obtenidos de la cepa <i>P. verrucosus</i> FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 cultivadas en medio PDA.	80
Figura 29. Identificación de los metabolitos candidatos a ser sintetizados por el clúster GymN por comparación de los cromatogramas de pico base (BPCs) y espectro de masas (modo positivo) de los extractos obtenidos de la cepa <i>P. verrucosus</i> FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 cultivadas en medio PDA.	81
Figura 30. Caracterización por HPLC-DAD-MS/MS de los extractos obtenidos de la cepa <i>P. verrucosus</i> FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 cultivadas en medio Cz-S	83
Figura 31. Identificación de metabolitos candidatos a ser sintetizados por el clúster GymN por comparación de los cromatogramas de pico base (BPC) y espectro de masas (modo positivo) de los extractos obtenidos de la cepa <i>P. verrucosus</i> FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 cultivadas en medio Cz-S.	84
Continuación de la Figura 31.	85

Figura 32. Purificación de pigmentos desde extractos obtenidos de la cepa <i>P. verrucosus</i> FAE27 cultivada en medio Cz-S	86
Figura 33. Análisis de la fracción A por HPLC-DAD-MS/MS.	89
Figura 34. Espectros UV-visible y espectros de fragmentación de los iones m/z 385,2486 [M+H]⁺ y m/z 427,2597 [M+H]⁺.....	90
Figura 35. Procedimiento para la extracción de pigmentos rojos desde agar liofilizado de placas de <i>P. verrucosus</i> FAE27 en PDA.....	93
Figura 36. Evaluación de la estabilidad de los pigmentos rojos obtenidos mediante extracción con agua de agar liofilizado de placas de PDA de <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27, en diferentes condiciones de pH y temperatura	94
Figura 37. Tamaño de los BGCs asociados a la síntesis de azafilonas.....	100
Figura 38. Ruta biosintética de MonAzPs en <i>Monascus</i> y proteínas ortólogas identificadas en los clústeres de biosíntesis de azafilonas en <i>T. marneffe</i> y <i>P. verrucosus</i> FAE27	104
Figura 39. BCAs en el género <i>Pseudogymnoascus</i>: distribución según análisis filogenético y análisis de dominios KS de la enzima PKS-NR principal.....	113
Figura 40. Cambios en el espectro de absorción de los pigmentos sintetizados en <i>Monascus</i>, <i>Hyphodiscus</i> y <i>Pseudogymnoascus</i> tras la aminación característica descrita para azafilonas.	121

LISTA DE ABREVIATURAS

Acil-CoA	Acil-coenzima A
ACP	Dominio portador de acilos
AT	Dominio acil-transferasa
BGC	Clúster de genes biosintéticos
BCA	BGC candidato a sintetizar azafilonas
CLC	Dominio ciclación de Claisen
cMT	Dominio metil transferasa
DMATS	Dimetilalil triptófano sintasas
DH	Dominio deshidratasa
ER	Dominio enoil-reductasa
FAD-Ox	Oxidasa dependiente de FAD
FAD-Monox	Monoxigenasa dependiente de FAD
FT	Factor de transcripción
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HPLC-MS/MS	HPLC acoplado a espectrometría de masas en tandem
ITS	Región del espaciador transcrito interno
PKS-HR	PKS altamente reductora (ej: PKS-HR)
KS	Dominio ceto-sintasa
KR	Dominio ceto-reductasa
LSU	Subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear
MonAzPs	Pigmentos del tipo azafilona producidos por hongos del género <i>Monascus</i>
MS	Metabolito secundario
NRP	Péptido no ribosomal
NRPS	Péptido no ribosomal sintetasa
O-MT	O-metil transferasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PK	Policétido
PKS-NR	PKS no reductora (ej: PKS-NR)
PK-NRPS	Híbrido policétido sintasa – péptido no ribosomal sintetasa
PKS	Policétido sintasa
PKS-PR	PKS parcialmente reductora (ej: PKS-PR)
PT	Dominio templado
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
R	Dominio tiol-ester reductasa
RPB2	Segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II
SAM	S-adenosil-metionina
SAT	Dominio iniciador ACP transacilasa
TC	Terpeno ciclasa
TE	Dominio tioesterasa
TEF9	Factor de traslación de elongación EF-1a

RESUMEN

El estudio del metabolismo secundario del género fúngico psicotolerante *Pseudogymnoascus* es aún muy incipiente, iniciándose tan solo en la última década. Entre los metabolitos sintetizados por hongos de este género, destaca la producción de pigmentos rojos por distintas cepas aisladas, confirmada solo de manera visual, no existiendo información sobre la naturaleza, origen biosintético o propiedades químicas de estos pigmentos. Recientemente, en la cepa antártica *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27, se ha identificado un clúster de genes biosintéticos, el cual se denominó GymN, similar a los descritos para la síntesis de azafilonas, una familia de metabolitos secundarios con alto potencial biotecnológico por su amplio rango de actividades biológicas, y por su uso como pigmentos en diversas industrias.

En este trabajo, se explora el potencial de biosíntesis de pigmentos del tipo azafilona en el género *Pseudogymnoascus* mediante una aproximación bioinformática a nivel de género, un análisis funcional del clúster GymN de la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27, y una caracterización de los pigmentos sintetizados por este clúster.

Como resultado, se determinó la existencia en los genomas del género *Pseudogymnoascus* de seis clados de clústeres biosintéticos con el potencial de sintetizar azafilonas de estructura distinta a las sintetizadas por los clústeres descritos en otros géneros fúngicos. Particularmente, el clúster GymN en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 posee un alto grado de similitud con los descritos en el género *Monascus*, *Talaromyces* e *Hyphodiscus* para la síntesis

de azafilonas. Mediante atenuación génica, se comprobó que GymN está encargado de sintetizar pigmentos de coloración roja en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27.

También, se identificaron dos metabolitos de coloración anaranjada, estructuralmente relacionados entre sí, como potenciales intermediarios de la ruta biosintética de azafilonas en *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. Mediante análisis de espectrometría de masas y de sus espectros visibles UV, se logró determinar que corresponden, con alta probabilidad, a azafilonas con características únicas que los diferencian de las descritas en otros géneros.

Finalmente, se determinó que los pigmentos rojos extraídos desde cultivos en placa de la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 poseen un fuerte carácter polar en comparación a los aislados desde cepas del género *Talaromyces*, *Monacus* o *Hiphodiscus*. Adicionalmente, presentan una alta estabilidad frente a un amplio rango de pH y temperatura. Estas características hacen a estos pigmentos llamativos desde un punto de vista productivo con respecto a los procesos de extracción y aplicación.

En resumen, este estudio pavimenta las bases químicas y genéticas para el estudio de la biosíntesis de azafilonas en el género fúngico *Pseudogymnoascus*.

ABSTRACT

The study of the secondary metabolism of the psychrotolerant fungal genus *Pseudogymnoascus* is still in its infancy, having begun only in the last decade. Among the metabolites synthesized by fungi of this genus, the production of red pigments by different isolates stands out but confirmed only visually, with no information on the nature, biosynthetic origin, or chemical properties of these pigments. Recently, in the Antarctic strain *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 a biosynthetic gene cluster has been identified, named GymN, similar to those described for the synthesis of azaphilones, a family of secondary metabolites with high biotechnological potential due to their wide range of biological activities and their use as pigments in various industries.

In the present work, the potential for azaphilone pigment biosynthesis in the genus *Pseudogymnoascus* is explored through a bioinformatic approach at the genus level, a functional analysis of the GymN cluster in the strain *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27, and a characterization of the pigments synthesized by this cluster.

As a result, the existence of six clades of biosynthetic gene clusters with the potential to synthesize azaphilones with different structure from those synthesized by clusters described in other fungal genera was determined in genomes of the genus *Pseudogymnoascus*. Particularly, the GymN cluster identified in the strain *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 has a high degree of similarity to those described in the genera *Monascus*, *Talaromyces*, and *Hyphodiscus* for the synthesis of azaphilones. Through gene attenuation, it was confirmed that the cluster GymN is responsible for synthesizing red pigments in the strain *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27.

Additionally, two orange-colored metabolites, structurally related to each other, were identified as potential intermediates in the biosynthetic pathway of azaphilones in *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. Through mass spectrometry analysis and UV-visible spectra, it was determined that they correspond, with high probability, to azaphilones with unique characteristics that differentiate them from those described in other genera.

Finally, it was determined that the red pigments extracted from plate cultures of the strain *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 have a strong polar nature compared to those isolated from strains of the genera *Talaromyces*, *Monascus*, or *Hyphodiscus*. Additionally, they exhibit high stability over a wide range of pH and temperature. These characteristics make these pigments attractive from a production standpoint regarding extraction processes.

In summary, this study lays the chemical and genetic groundwork for the study of azaphilone biosynthesis in the fungal genus *Pseudogymnoascus*.

INTRODUCCIÓN

1. Metabolitos secundarios fúngicos

Los metabolitos secundarios (MS) fúngicos son moléculas orgánicas, de bajo peso molecular, que históricamente se han definido como metabolitos que no cumplen un papel crucial en el ciclo vital de los organismos que los sintetizan. Hoy en día, se sabe que estas moléculas desempeñan múltiples roles para el desarrollo de los organismos productores en el nicho ecológico en el que habitan (Keller, 2019). La síntesis de metabolitos secundarios forma parte del conjunto de herramientas que poseen los organismos para favorecer su crecimiento y prevalencia frente a estrés, tanto del tipo biótico como abiótico, o para mediar la interacción con otros organismos de su mismo hábitat. Ejemplos de ello son el metabolito oosporeina, sintetizado por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, que inhibe el crecimiento bacteriano en el insecto que este parasita, favoreciéndolo sustancialmente en la competencia por nutrientes (Fan y cols., 2017), o la melanina, producida por el hongo criptoendolito *Cryomyces antarcticus* como pigmento fotoprotector para sobrevivir a condiciones hostiles de radiación UV (Gesler y cols., 2014). Desde una perspectiva biotecnológica, los hongos filamentosos ascomicetos son una fuente prolifera y atractiva para el aislamiento de MS con diversas actividades biológicas, como antibióticos, inmunosupresoras, antivirales o anticancerígenos (Aly y cols., 2011; Greco y cols., 2019).

Los MS fúngicos se pueden clasificar de acuerdo al precursor a partir del cual son sintetizados. Entre los MS más abundantes y estudiados en hongos filamentosos se encuentran los policétidos, los péptidos no ribosomales, los terpenos y los alcaloides de tipo indol (Robey y cols., 2021). Los policétidos (PK) son sintetizados a partir de la condensación de múltiples unidades de ácidos carboxílicos de cadena corta unidos a coenzima A (acil-CoA), como acetil-CoA y malonil-CoA. Esta reacción es mediada por enzimas modulares del tipo policétido sintasa (PKS). Los péptidos no ribosomales (NRP) son sintetizados a partir de la condensación de aminoácidos proteogénicos y no proteogénicos. Esta reacción es mediada por enzimas modulares del tipo péptido no ribosomal sintetasa (NRPS). De igual manera, los terpenos son sintetizados a partir de la ciclación y modificación de intermediarios de la vía del mevalonato, proceso mediado por enzimas del tipo terpeno ciclasas (TC). Los alcaloides de tipo indol son sintetizados mediante la prenilación de L-triptófano, reacción catalizada por enzimas dimetilalil triptófano sintasas (DMATS). Por último, también es posible encontrar MS del tipo híbrido, como es el caso de los metabolitos del tipo PK-NRP, cuya biosíntesis está mediada por una enzima PKS y otra enzima NRPS, las cuales pueden o no estar fusionadas (Keller, 2019).

Todas las enzimas mencionadas en el párrafo anterior, también conocidas como enzimas *core* o enzimas principales, catalizan la síntesis del núcleo estructural de un MS. Este núcleo es posteriormente modificado por enzimas accesorias, como enzimas oxidasas, reductasas y transferasas, que ornamentan el MS dando origen a una alta diversidad estructural. El conjunto de enzimas conformado por la enzima *core* y las enzimas accesorias se encuentra codificado por genes que se localizan de manera contigua en regiones del genoma denominadas clústeres de genes biosintéticos (BGCs) (Brakhage, 2013). De esta manera, la secuencia de reacciones que catalizan las enzimas codificadas en un BGC da origen a la ruta biosintética de un metabolito en particular (Figura 1). Además, en estos clústeres es posible encontrar genes codificantes para factores

de transcripción que regulan la expresión de los genes que componen el clúster, así como genes codificantes para proteínas transportadoras de intermediarios o del MS final de la vía.

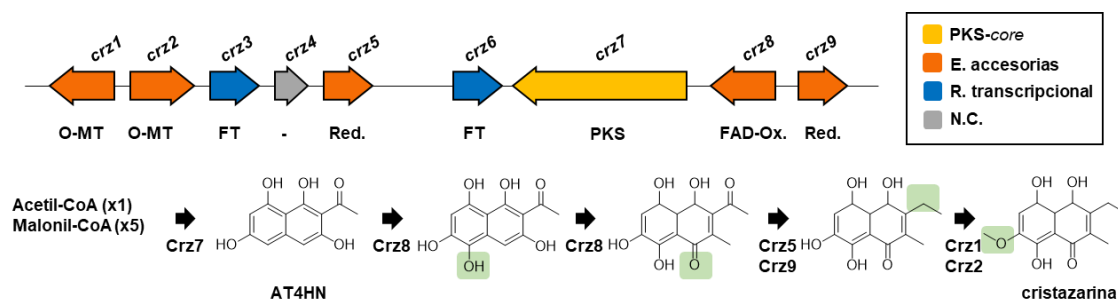


Figura 1. Ejemplo de la estructura de un BGC y la ruta biosintética que origina. Ruta propuesta para la biosíntesis de cristazarina en *Cladonia metacorallifera* (Paguirigan y cols., 2023). O-MT: O-metiltransferasa; FT: Factor de transcripción; Red: Reductasa; FAD-Ox: Oxidasa dependiente de FAD; N.C.: No conocido.

La agrupación física de los genes asociados a la biosíntesis de un metabolito conlleva diferentes características. La conformación de BGCs favorece la co-regulación de los genes que los conforman, ya que son susceptibles a mecanismos de regulación asociados al nivel de compactación de la cromatina. Los BGCs se encuentran principalmente en regiones cromosómicas sub-teloméricas, lo que los hace propensos a cambiar desde un estado compacto y silente de heterocromatina, a un estado relajado y activado de eucromatina, y viceversa (Palmer & Keller, 2010). Otra consecuencia de la conformación de BGCs y su ubicación en regiones de alta movilidad génica, es su propensión a ser blanco de eventos de duplicación, delección, inserción y transferencia horizontal. En conjunto, estos eventos actúan como motores moleculares que impulsan una rápida tasa de evolución que puede dar origen a el ensamblaje de nuevos BGCs, la pérdida total o parcial de BGCs, o la divergencia funcional que desemboca en cambios en los SM sintetizados (Rokas y cols., 2020).

2. Enzimas policétido sintasas

Los BGCs que tienen una enzima principal del tipo PKS son los más abundantes dentro de los genomas de los hongos ascomicetos. La conservación y modularidad de las enzimas PKS facilita enormemente su identificación y estudio, lo cual es crucial para la descripción de las rutas biosintéticas en las cuales participan. Las enzimas PKS se clasifican en tres clases o tipos: PKS tipo I, tipo II y tipo III (Tsai & Ames, 2009).

Las enzimas PKS tipo I son megasintasas en las que múltiples dominios catalíticos se yuxtaponen en una sola cadena polipeptídica. Se encuentran tanto en hongos, como bacterias y protozoos. Además, las enzimas PKS del tipo I se clasifican en dos sub-clases: iterativas (iPKS) y modulares (modPKS). Las enzimas iPKS catalizan múltiples ciclos de reacciones sobre una misma molécula para su elongación y modificación, mientras que las modPKS solo catalizan un ciclo de reacciones. En ambas sub-clases, una vez liberada la cadena, estas pueden ser objeto de modificación por otras enzimas (Keatinge-clay, 2012). Por otro lado, las enzimas PKS del tipo II también catalizan reacciones de manera iterativa, pero a diferencia de las del tipo I, sus dominios funcionales están separados en polipéptidos monofuncionales independientes que conforman complejos proteicos del tipo heterodiméricos, y solo se encuentran en bacterias. Por último, las enzimas PKS del tipo III o del tipo chalcona sintasa, son complejos proteicos del tipo homodímero, conformados por subunidades que contienen los dominios funcionales, catalizan reacciones de manera iterativa y son encontradas tanto en hongos, como en plantas y bacterias (Shimizu & cols., 2017; Smith & Tsai, 2007).

Las enzimas PKS de tipo I iterativas han sido ampliamente caracterizadas en hongos ascomicetos. Desde una perspectiva estructural, los dominios compartidos por todas las enzimas PKS del tipo I iterativas son el dominio cetosintasa (KS), el dominio acil-transferasa (AT) y el dominio portador de acilos

(ACP). Funcionalmente, al comienzo de la biosíntesis, una unidad iniciadora de acetil-CoA es cargada en el dominio KS, simultáneamente una unidad extensora de malonil CoA es reclutada por el dominio AT y cargada en el dominio ACP. La formación del enlace C-C entre estas dos moléculas es catalizada por el dominio KS a través de una condensación de Claisen descarboxilativa, generando así la extensión de la cadena policetílica. Posteriormente, el policétido naciente es transferido al dominio KS, y una nueva unidad extensora de malonil-CoA es cargada en el dominio ACP. Este proceso se repite iterativamente hasta alcanzar una longitud de cadena predeterminada, momento en el cual se libera el policétido (Figura 2).

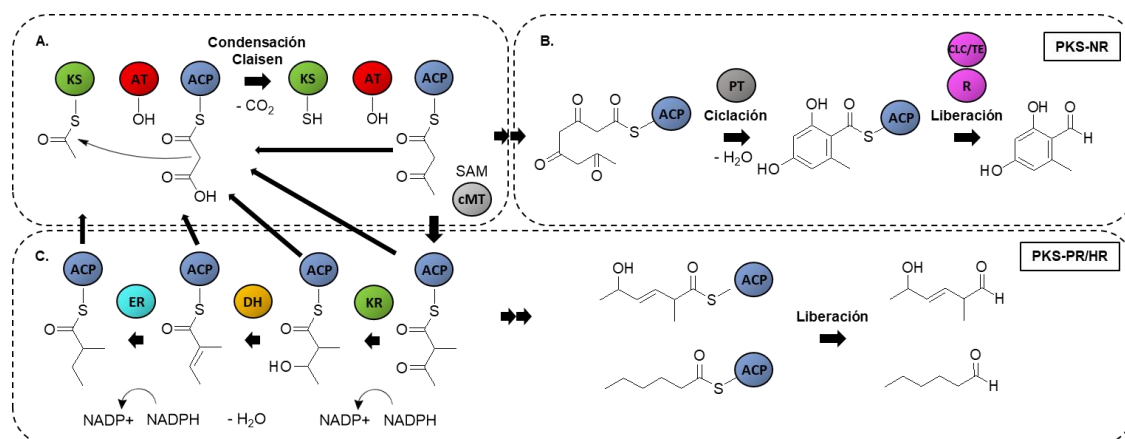


Figura 2. Esquema de biosíntesis de policétidos en PKS iterativas de tipo I. A. Mecanismo de síntesis de la cadena policetílica mediada por los dominios ceto sintasa (KS), acil transferasa (AT) y proteína portadora de acilos (ACP). Adicionalmente, se indica la posible acción de un dominio metil transferasa (cMT); **B.** Modelo de ciclación (dominio templado PT) y liberación de la cadena en PKS-NR; **C.** Reducción parcial o total mediada por los dominios ceto reductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoil reductasa (ER).

Además de los dominios compartidos, existen dominios ceto-reductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoil reductasa (ER) que pueden o no estar presentes en una enzima PKS. Las enzimas PKS se clasifican según su capacidad reductora en enzimas altamente reductoras (HR), parcialmente reductoras (PR), y no reductoras (NR). Las enzimas PKS del tipo HR poseen los tres dominios reductores simultáneamente, las enzimas PKS del tipo PR poseen un dominio KR

y, en algunos casos, un dominio ER opcional, mientras que las enzimas PKS del tipo NR carecen de los tres dominios reductores.

Desde el punto de vista funcional, las enzimas PKS-NR generan cadenas con múltiples grupos ceto, los cuales pueden ciclarse para formar anillos aromáticos con la ayuda de un dominio templado (PT) (Figura 2.B). Adicionalmente, las enzimas PKS-NR pueden contar con un dominio iniciador ACP transacilasa (SAT), que permite cargar unidades iniciadoras distintas a acetil-CoA en el dominio KS. Por otro lado, las enzimas PKS-PR y PKS-HR tienen dominios reductores que realizan una reducción total o parcial de la cadena sintetizada (Figura 2.C).

Otro dominio que puede opcionalmente estar presente es el dominio de metilación (CMeT), el cual cataliza la metilación de un carbono α en la cadena policetídica naciente empleando S-adenosil-metionina (SAM) como donador de grupo metilo.

Finalmente, la liberación de la cadena policetídica en enzimas PKS-NR es llevada a cabo por dominios de liberación. Estos pueden corresponder a dominios de ciclación de Claisen (CLC)/ tioesterasas (TE) o dominios tiol-éster reductasa (R). En el caso de las enzimas PKS-PR y PKS-HR, estas no suelen poseer dominios de liberación y dependen de otras enzimas para esta función (Crawford & Townsend, 2010).

Por sí solo, el conocimiento sobre la arquitectura de los dominios que componen una enzima PKS no permite determinar la estructura del policétido sintetizado. Entre los factores que dan origen a variaciones en la cadena naciente se encuentra el hecho que los distintos dominios opcionales KR, DH, ER y CMeT no suelen actuar todos simultáneamente en cada ciclo iterativo de biosíntesis, generando distintos niveles de reducción a lo largo de la cadena policetídica. A esto se le conoce como programación de una enzima PKS (Cox, 2023). A pesar de esto, el conocer la composición de los dominios de una enzima PKS permite

hipotetizar posibles estructuras del policétido sintetizado en términos de grado de reducción en sus grupos funcionales y ciclaciones.

3. Pigmentos fúngicos

Los hongos filamentosos producen una amplia variedad de metabolitos secundarios que pueden o no poseer coloración. Los metabolitos que poseen coloración son conocidos como pigmentos fúngicos (Narsing Rao y cols., 2017). La coloración de los pigmentos se debe a su capacidad de absorber y reflejar luz con longitudes de onda entre 380 y 750 nm. Esta propiedad está estrechamente relacionada con su estructura química, específicamente con la presencia de sistemas de dobles enlaces conjugados. Los electrones en estos sistemas son capaces de absorber fotones con una longitud de onda específica, que corresponde a la energía de los niveles del sistema conjugado. Esto resulta en el reflejo de los fotones con las longitudes de onda no absorbidas, dando origen a lo que es percibido por el ojo humano como color (Gürses y cols., 2016). Entre los pigmentos fúngicos más relevantes se encuentran carotenoides, melaninas, quinonas y azafilonas (Figura 3).

Los pigmentos de origen fúngico son considerados promisorias fuentes de pigmentos de origen biológico en conjunto a los pigmentos de origen bacteriano, animal y vegetal. Los pigmentos de origen biológico presentan aplicaciones en diversos sectores como son la industria cosmética, industria textil, como sensibilizadores de celdas solares y en la industria alimenticia (Dufossé y cols., 2014; Kumara y cols., 2017), poseyendo algunas de ellas buenas proyecciones económicas. Este es el caso del mercado de colorantes alimenticios. Al año 2021, este mercado presentó un tamaño de 3,75 billones de dólares, y se espera que para el año 2025, un tercio de este corresponda a pigmentos de origen biológico (Pimenta y cols., 2021). Adicionalmente a su capacidad de otorgar coloración, los

pigmentos biológicos pueden poseer propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, citotóxicas, antivirales y de protección frente a radiación UV (Tabla I). Estas propiedades otorgan a los pigmentos biológicos ventajas frente a los pigmentos de origen sintético, los cuales son frecuentemente asociados a daños a la salud humana y ambiental (Narsing Rao y cols., 2017).

En este contexto, los pigmentos fúngicos han cobrado relevancia y destacan frente a otras fuentes biológicas de pigmentos por su versatilidad para crecer en distintas condiciones de fermentación, utilizando variados sustratos de bajo costo, y poseer un crecimiento independiente de la estacionalidad, haciéndolos apropiados para su cultivo a gran escala (Sen y cols., 2019).

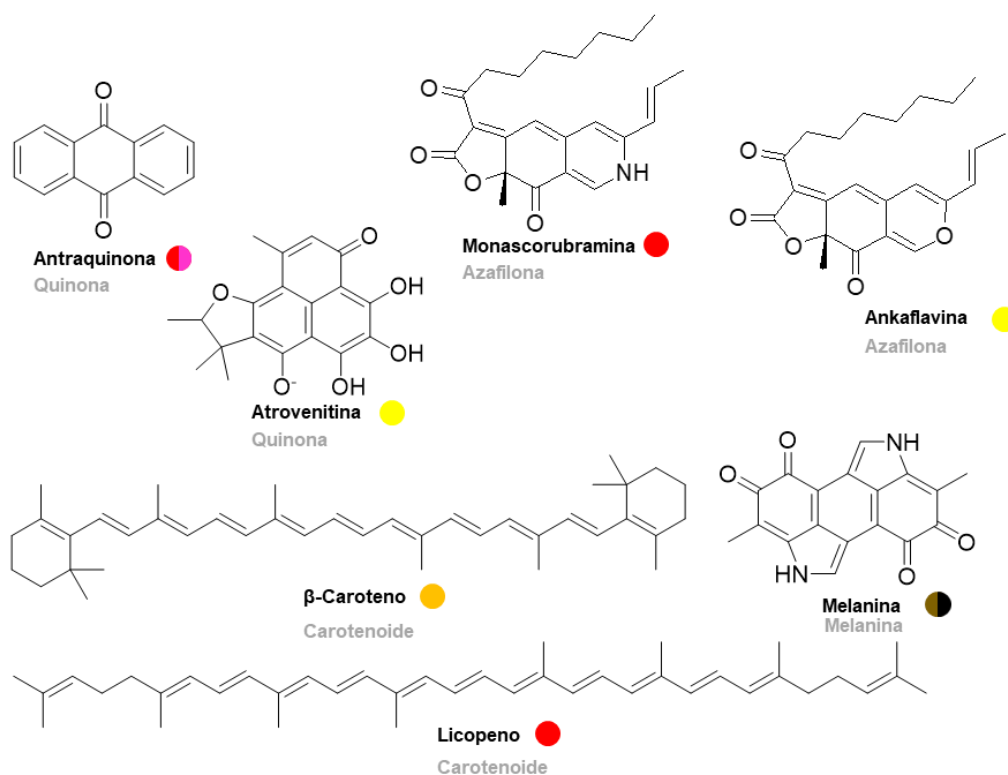


Figura 3. Estructuras y coloración de pigmentos fúngicos. Estructura de pigmentos fúngicos con su respectiva clasificación y coloración (círculo coloreado).

Tabla I. Pigmentos fúngicos, clasificación y aplicaciones.

Pigmento	Clasificación	Coloración	Cepa fúngica	Aplicaciones	Estado ^b
β-caroteno	Terpeno	Naranja, amarillo	<i>Blakeslea trispora</i>	Colorante alimenticio, actividad anticancerígena y antioxidante	PI
licopeno	Terpeno	Rojo	<i>Blakeslea trispora</i>	Colorante alimenticio, actividad anticancerígena	PI
antraquinona	Policétido	Rojo, violeta	<i>Penicillium oxalicum</i>	Colorante alimenticio, anticancerígeno, antifúngico	PI
atrovetina	Policétido	Amarillo	<i>Penicillium herquei</i>	Colorante alimenticio, actividad antioxidante	I
monascorubramina	Policétido	Rojo	<i>Monascus sp.</i>	Colorante alimenticio, actividad antioxidante	PI
ankaflavina	Policétido	Amarillo	<i>Monascus sp.</i>	Colorante alimenticio, actividad anticancerígena y antiinflamatoria	PI
melanina	Policétido o derivado de tirosina ^a	Café, negro	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Actividad antioxidante, protección a radiación UV	I

Tabla obtenida y modificada a partir de Afroz Toma y cols. (2023) y Dufossé (2022); ^aEisenman & Casadevall (2012); ^b PI: Producción industrial, I: Investigación.

4. Azafilonas

Las azafilonas son una clase de MS pertenecientes al grupo de los policétidos que tienen en común un núcleo estructural heterociclo-bicíclico del tipo pirano-quinona altamente oxigenado, con la capacidad de reaccionar con aminas primarias para formar γ-piridonas vinílogas (Figura 4). Entre los años 1932 y 2019 se han caracterizado más de 600 azafilonas a partir de 50 géneros de hongos ascomicetes, de las cuales 252 fueron identificadas recientemente entre los años 2012 y 2019. En particular, el 56% de estas azafilonas descritas han sido aisladas desde tan solo seis géneros fúngicos, correspondiendo a *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Hypoxylon* y *Monascus* (Gao y cols., 2013; Chen y cols., 2020). En recopilaciones más recientes, se ha reportado el aislamiento de 100 azafilonas con estructura novedosa entre los años 2020 y 2021 (Pimenta y cols., 2021), mientras que el número de géneros desde los cuales se han aislados compuestos del tipo azafilona ha aumentado de 50 a 60 (Pavesi y cols., 2021).

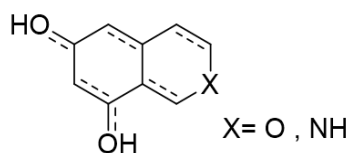
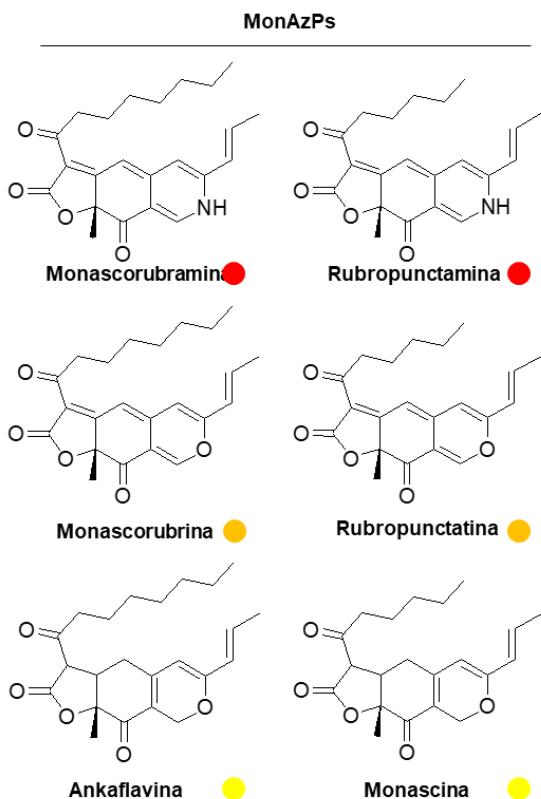


Figura 4. Estructura heterociclo pirano-quinona presente en las azafilonas. El átomo representado por una X en el anillo puede corresponder a un átomo de oxígeno (pirano) o de nitrógeno.

Las azafilonas son de interés biotecnológico debido a su utilización como pigmentos en la industria alimenticia. El caso más estudiado son las azafilonas producidas por hongos del género *Monascus*. Los hongos de este género han sido utilizados desde tiempos ancestrales en países asiáticos para procesos fermentativos como la producción de arroz fermentado rojo y embutidos. Los principales pigmentos del tipo azafilona producidos por el género *Monascus* (MonAzPs) corresponden a monascina y ankaflavina (pigmentos amarillos), rubropunctatina y monascorubrina (pigmentos anaranjados), y rubropunctamina y monascorubramina (pigmentos rojos) (Chen y cols., 2019) (Figura 5.A). Sin embargo, la comercialización de los pigmentos sintetizados por estas cepas en América y Europa se ha visto dificultada por la producción simultánea en estas cepas de citrinina, un policétido perteneciente también a la familia de las azafilonas, que posee actividad hepatotóxica (Dufossé y cols., 2014). En respuesta a esto, son múltiples los intentos que se han realizado para obtener extractos de MonAzPs carentes de citrinina, sea mediante la búsqueda de nuevas cepas del género *Monascus* no productoras de citrinina, modificaciones en las condiciones de fermentación, o bien mediante ingeniería genética (Kang y cols., 2014; Zhen y cols., 2019). Estas aproximaciones son posibles debido a que el BGC que da origen a los MonAzPs es distinto y funcionalmente independiente al BGC que da origen a la citrinina (He & Cox, 2016). Actualmente, para la producción de azafilonas estructuralmente similares a las obtenidas desde *Monascus*, se han utilizado como alternativa cepas fúngicas del género *Talaromyces*, capaces de sintetizar azafilonas del tipo MonAzPs, pero carentes

del BGC responsable de la biosíntesis de citrinina (Dufossé, 2022). Tal es el caso de la *start-up* danesa Chromologics (<https://www.chromologics.com/>) que produce pigmentos del tipo azaflona a partir de la cepa fúngica *Talaromyces atroseus* para uso alimenticio (Natu.Red®) y uso cosmético y textil (Sustainly.Red®) (Dufossé, 2022). Al igual que los hongos del género *Monascus*, *Talaromyces atroseus* es capaz de sintetizar MonAzPs como monascorubrina, rubropunctatina, monascorubramina y rubropunctamina, además de otros pigmentos estructuralmente relacionados con las azaflonas de *Monascus* como PP-O, PP-R y PP-V (Figura 5.B) (Frisvad y cols., 2013; Mapari y cols., 2008).

A *Monascus* spp.



B *Talaromyces atroseus*

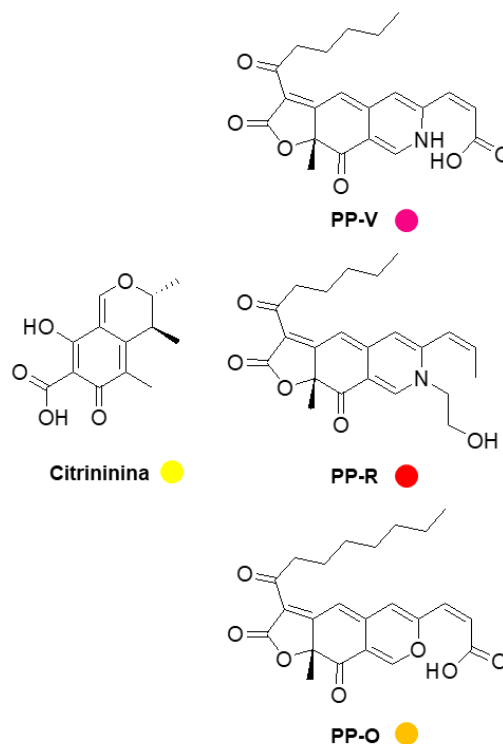


Figura 5. Estructuras y coloración de la azaflona citrinina y de los MonAzPs producidos por *Monascus* y *Talaromyces*. A. Estructura y coloración de los seis MonAzPs aislados desde *Monascus*, además de la toxina citrinina. **B.** Estructura y coloración de azaflonas del tipo MonAzPs aisladas desde *Talaromyces atroseus*.

Un aspecto relevante en el uso de MonAzPs y derivados de estos como pigmentos alimenticios, es su solubilidad en agua. Los seis pigmentos MonAzPs originales aislados desde hongos del género *Monascus* poseen un carácter mayormente hidrofóbico y en fermentaciones líquidas son principalmente intracelulares, por lo que la extracción de estos para su uso comercial se dificulta (de Oliveira y cols., 2022). Una manera de mejorar la solubilidad de estos pigmentos en solventes acuosos corresponde a la suplementación del medio de cultivo con glutamato para la obtención de N-glutaril rubropunctamina y N-glutaril monascorubramina a partir de la reacción entre el glutamato (amina primaria) y los MonAzPs rubropunctatina y monascorubrina, mejorando así no tan solo la solubilidad en agua, sino también la estabilidad frente a pHs extremos y foto estabilidad (Figura 6) (de Oliveira y cols., 2022).

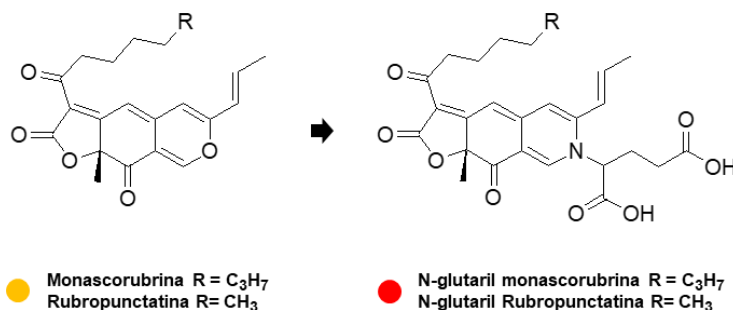


Figura 6. Modificación de MonAzPs mediante incorporación de glutamato. Estructura y coloración de los MonAzPs de coloración naranja monascorubrina y rubropunctatina, y sus derivados obtenidos de la reacción con ácido glutámico.

La solubilidad en solventes acuosos cobra importancia desde múltiples aspectos. En general los pigmentos solubles en agua son más fáciles de manejar y procesar en soluciones acuosas, que son comunes en muchas aplicaciones industriales. Esto simplifica su incorporación en productos como alimentos, bebidas, cosméticos y productos farmacéuticos. (Kalra y cols., 2020).

En el caso de los pigmentos alimenticios muchos alimentos y bebidas tienen un alto contenido de agua. Un pigmento soluble en agua puede integrarse

fácilmente, garantizando una coloración uniforme sin la necesidad de emulsionantes o dispersantes adicionales (Lin & Xu, 2022; Kalra y cols., 2020).

Como se mencionó, las azafilonas poseen una amplia variedad de actividades biológicas por lo que pueden ser empleados como fármacos. En la industria farmacéutica, la solubilidad en agua es crucial para la biodisponibilidad de compuestos activos. Los pigmentos que también actúan como agentes terapéuticos deben ser solubles en agua para garantizar una administración eficiente y una absorción adecuada en el cuerpo (Afroz Toma y cols., 2023).

En términos de purificación, la solubilidad en agua facilita la purificación y el procesamiento de los pigmentos durante su producción, eliminando la necesidad de usar solventes orgánicos, los cuales incluso los más inocuos son dañinos para el medio ambiente, además de evitar su acumulación y la necesidad de protocolos para la eliminación de estos desechos (Lin & Xu, 2022).

Finalmente, desde una perspectiva productiva y de extracción, la extracción de pigmentos solubles en agua a partir de los microorganismos productores puede ser más sencilla y eficiente, reduciendo costos y mejorando la eficiencia de producción, particularmente en procesos de fermentación en estado sólido. El emplear fermentaciones de estado sólido trae como ventaja una reducción en el costo de producción siendo posible usar directamente como sustrato desechos agroindustriales. Sin embargo, el proceso posterior de extracción es crucial para la determinación de la viabilidad del proceso, siendo ventajoso poder emplear como solvente agua u otras mezclas de carácter polar, que no dificulten su posterior procesamiento y aplicación como colorantes alimenticios, asociado a costos, seguridad e inocuidad ambiental (Daud y cols., 2020).

5. Biosíntesis de azafilonas

A la fecha, siete BGCs para la biosíntesis de azafilonas han sido descritos y cuentan con trabajos experimentales que, total o parcialmente, demuestran esta función. Los géneros fúngicos a los cuales estos BGCs pertenecen corresponden a los géneros *Monascus*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Chaetomium* y *Trichoderma* (Williams y cols., 2021) (Tabla II).

Las rutas biosintéticas de azafilonas difieren en cada caso particular, presentando múltiples intermediarios, ramificaciones, y reacciones espontáneas intra e intermoleculares (Williams y cols., 2021). Desde una perspectiva genética, la enzima principal de los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas corresponde a una enzima PKS del tipo no reductora. Sin embargo, es posible encontrar BGCs que además de la enzima principal PKS no reductora (enzima principal primaria), poseen una segunda enzima principal o enzima principal secundaria, como se les hará referencia en este trabajo, que puede corresponder a una enzima PKS del tipo HR, como es el caso de los BGC para la síntesis de preasperpiranona, asperfuranona, chaetoviridina E, azanigeronas y harzaafilonas, dos enzimas del tipo sintasa de ácidos grasos, como es el caso de los MonAZPs y PP-V, o bien no poseer una enzima principal secundaria, como es el caso del BGC para la síntesis de citrinina (Pavesi y cols., 2021).

Tabla II. Clústeres de genes biosintéticos descritos para azafilonas y el policétido asperfuranona.

Azafilona	Especie	Cepa	Referencia
preasperpiranona	<i>Aspegillus terreus</i>	NIH2624	Huang y cols., 2020
asperfuranona	<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4	Chiang y cols., 2009
azanigeronas	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 1015	Zabala y cols., 2012
chaetoviridina E	<i>Chaetomium globosum</i>	CBS 148.51	Winter y cols., 2012
MonAzPs	<i>Monascus pilosus</i>	ATCC 16363	Balakrishnan y cols., 2013
PP-V	<i>Talaromyces marneffeii</i>	ATCC 18224	Rasmussen K. B., 2015
citrinina	<i>Monascus ruber</i>	M7	He & Cox, 2016
harzifilonas	<i>Trichoderma guizhouense</i>	NJAU 4742	Pang y cols., 2020

A pesar de esta complejidad, es posible establecer una ruta biosintética consenso para la mayor parte de las azafilonas. Así, la síntesis convencional de azafilonas comienza con la generación de un intermediario benzaldehído a partir de unidades de acil-CoA y malonil-CoA por acción de una enzima PKS-NR (Figura 7.A). A continuación, una enzima del tipo monoxigenasa dependiente de FAD (FAD-Monox) hidroxila el carbono 4 generando un desplazamiento de electrones que lleva a la formación del segundo anillo (Hidroxilo C1-C9), dando origen al heterociclo pirano-quinona. Posteriormente, esta molécula es modificada por las diferentes enzimas accesorias específicas de cada BGCs, dando origen a distintas azafilonas como ankaflavina, monascorubramina, azanigerona, harzafilona y chaetoviridina E. (Figura 7.A).

La biosíntesis de citrinina se diferencia de esta ruta consenso porque para la formación del anillo heterocíclico pirano-quinona no interviene una enzima del tipo FAD-monox, sino que en este paso participan cuatro enzimas oxido-reductasas (Figura 7.B) (He & Cox, 2016).

Por último, es de destacar la ruta de biosíntesis de la asperfuranona (Tabla II). Si bien este metabolito no pertenece a la familia de las azafilonas, por no poseer el núcleo estructural característico de pirano-quinona, se considera un metabolito relacionado con las azafilonas debido a la similitud que la biosíntesis

de ambos tipos de compuestos presenta. El estudio de la biosíntesis de la asperfuranona ha contribuido de forma importante al conocimiento actual de la biosíntesis de azafilonas, razón por la cual habitualmente se le suele incluir en los estudios de biosíntesis de azafilonas (Williams y cols., 2021). En la biosíntesis de asperfuranona (Figura 7.C), tras la hidroxilación mediada por una enzima del tipo FAD-Monox la molécula sufre una segunda hidroxilación por una enzima del tipo oxidasa dependiente de FAD (FAD-Ox), ausente en la biosíntesis convencional de azafilonas. Esto desencadena el cierre del segundo anillo entre el grupo hidroxilo del carbono 1 y el carbono 8, generando un heterociclo furanoquinona, distinto al observado en la estructura clásica de las azafilonas (piranoquinona). Oportunamente en *Aspergillus terreus* NIH2624, el gen codificante para la enzima FAD-Ox no se encuentra funcional, por lo que el cierre del anillo se da de igual manera que en la biosíntesis de azafilonas descrita anteriormente, dando origen a la molécula de preasperpiranona, la cual pertenece a la familia de las azafilonas. Esto demuestra la relación existente entre la biosíntesis de ambas familias de compuestos (Huang y cols., 2020).

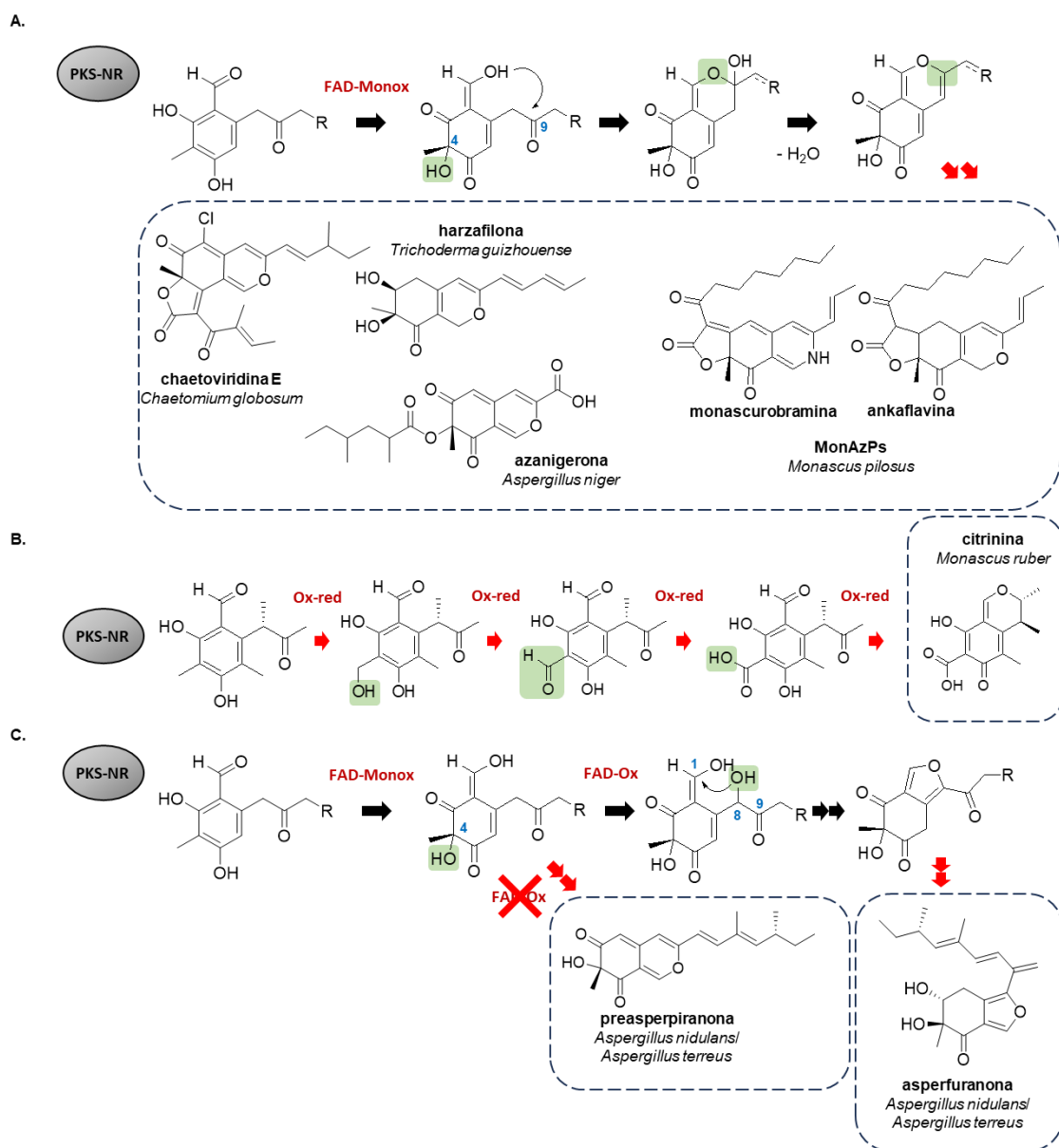


Figura 7. Rutas biosintéticas consenso de los BGCs descritos para la síntesis de azaflonas y asperfurana. **A.** Ruta biosintética de azaflonas descritas en *Monascus* sp., *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Chaetomium*. Una enzima FAD-Monox lleva a cabo el paso crucial de la vía para la formación del anillo heterocíclico pirano-quinona. Las reacciones catalizadas por enzimas accesorias (representadas por flechas rojas) otorgan la diversidad estructural observada en las azaflonas aisladas desde hongos de distintos géneros; **B.** Ruta biosintética de asperfurana en el género *Aspergillus*. Una segunda hidroxilación llevada a cabo por una enzima del tipo FAD-Ox provoca el cierre entre el grupo hidroxilo del carbono 1 y el carbono 8. En ausencia de esta enzima el metabolito sintetizado corresponde a la azaflona preasperpiranona; **C.** Ruta biosintética de la citrinina carente de la participación de una enzima FAD-Monox. **R:** Grupo alquilo.

Entre los ocho clústeres mencionados hasta el momento, el clúster descrito en *Monascus pilosus* para la biosíntesis de MonAzPs es el más estudiado y, a la vez, uno de los más complejos. Hasta el momento, este clúster es el único que cuenta con el análisis funcional de todos y cada uno de los genes que componen el clúster, lo cual ha permitido describir la ruta biosintética completa de estos pigmentos (Figura 8) (Chen y cols., 2017). Así, el clúster descrito en *M. pilosus* se caracteriza por poseer como enzima principal del tipo PKS-NR la enzima denominada MpPKS5, dos enzimas principales secundarias del tipo sintasa de ácidos grasos, MpFasA2 y MpFasB2 y nueve enzimas accesorias que modificaran la estructura del metabolito (Figura 8.A).

Entre los pasos que caracterizan la ruta biosintética de MonAzPs en *M. pilosus* se encuentra la incorporación de una cadena carbonada saturada al núcleo bicíclico pirano-quinona. Esta cadena es sintetizada por las enzimas principales secundarias MpFasA2 y MpFasB2, y transferida al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo en el carbono 4 del anillo bicíclico mediante la acción de la enzima O-aciltransferasa MppB (Figura 8.B). Más adelante en la ruta, la enzima oxido-reductasa dependiente de NAD MppC reduce el anillo pirano-quinona de manera que facilita la posterior ciclación espontánea de un tercer anillo del tipo lactona debido a un ataque nucleofílico del carbono C-2' al carbono C-5, y la posterior liberación de una molécula de agua. La formación de este tercer anillo juega un rol importante en la conformación del sistema conjugado presente en los pigmentos MonAzPs de coloración anaranjada y roja (Figura 8.B-C). A continuación, la ruta se bifurca dada la acción sobre un mismo intermediario de dos enzimas: la enzima reductasa MppE y la enzima oxido-reductasa dependiente de NAD MppG. En este punto, se originan por un lado los MonAzPs de coloración amarilla (monascina y ankaflavina) y por otro, los de coloración anaranjada (rubropunctatina y monascorubrina) (Chen y cols., 2017).

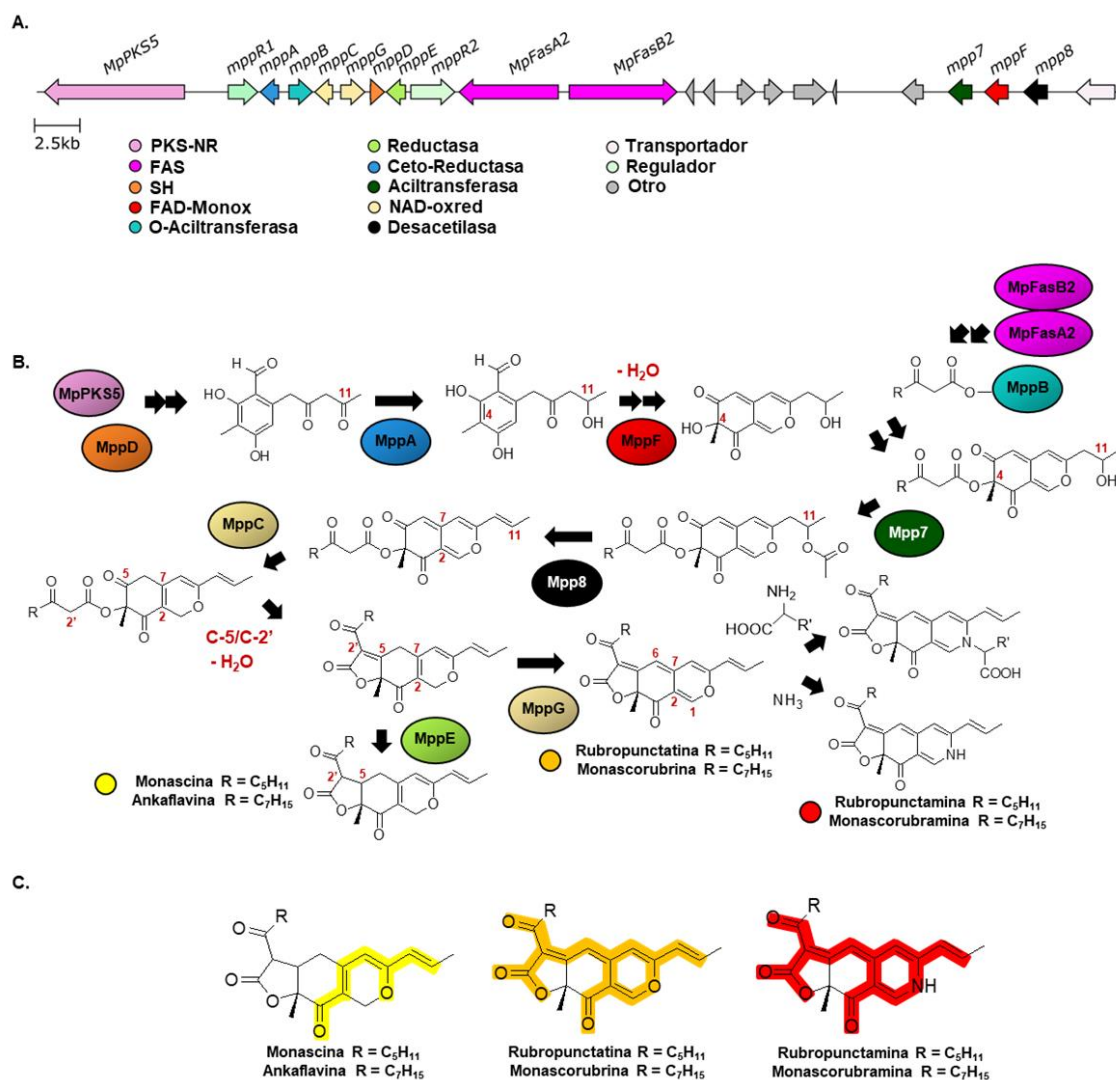


Figura 8. Esquema de la biosíntesis de MonAzPs en *Monascus pilosus*. **A.** Arquitectura del BGC para la síntesis de azaflonas en *Monascus pilosus*. **PKS-NR**: PKS no reductora, **FAS**: Sintasa de ácidos grasos, **SH**: Serina hidrolasa, **FAD-Monox**: Monoxigenasa dependiente de FAD, **NAD-Oxred**: Oxidoreductasa dependiente de NAD (Modificado de William y cols. 2021); **B.** Ruta biosintética de MonAzPs en *Monascus pilosus*. Inicialmente, la enzima MpPKS5 da origen al intermediario benzaldehído el cual es liberado de la enzima con la ayuda de la enzima serina-hidrolasa MppD. La enzima MppF lleva a cabo la hidroxilación que permite la ciclación y formación del anillo heterociclo pirano-quinona. Paralelamente, las enzimas sintasas de ácidos grasos MpFasA2 y MpFasB2, sintetizan una cadena carbonada saturada que es tomada por la enzima MppB y transferida al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo presente en el anillo quinona. A continuación, actúan el resto de las enzimas accesorias hasta obtener los pigmentos amarillos y naranjas correspondientes. Los pigmentos de tipo azaflona rojos son originados a partir de la aminación del anillo pirano (Chen y cols., 2017). **C.** Extensión de los sistemas conjugados de electrones en los pigmentos del tipo MonAzPs. La coloración del sistema indica la coloración del pigmento.

Finalmente, los pigmentos rubropunctatina y monascorubrina pueden sufrir una aminación espontánea al reaccionar el átomo de oxígeno del anillo pirano con un ión amonio o una amina primaria, dando origen a rubropunctamina y monascorubramina, o a una amplia variedad de pigmentos derivados de MonAzPs de coloración roja, en función de la naturaleza de la amina (Chen y cols., 2017, Isbrandt y cols., 2020).

6. Hongos del género *Pseudogymnoascus* como productores de azafilonas

En los últimos años, se ha reportado que las cepas fúngicas aisladas desde ambientes extremos son promisorias fuentes de compuestos bioactivos con estructuras novedosas (Chávez y cols., 2015). Las altas o bajas temperaturas, alta radiación UV, altos niveles de salinidad, baja actividad hídrica, entre otros, son factores ambientales adversos para el crecimiento y desarrollo de los hongos, por lo que han desarrollado diversas estrategias para su supervivencia. Entre estas estrategias, se encuentra la síntesis de metabolitos secundarios con actividades biológicas que favorezcan su crecimiento bajo estas condiciones (Sayed y cols., 2019; Vaca & Chávez, 2019).

Paralelamente, el avance y desarrollo de las herramientas bioinformáticas diseñadas para el estudio de BGCs codificados en genomas fúngicos, han permitido determinar que incluso entre cepas pertenecientes a una misma especie fúngica, existe una proporción cercana a un 20% de BGCs que son cepa específicos (Robey y cols., 2021). Esto sugiere que al estudiar cepas pertenecientes a géneros y especies fúngicas poco estudiadas, la probabilidad de aislar metabolitos secundarios de estructura novedosa es alta.

El género fúngico *Pseudogymnoascus* (Filo: *Ascomycetes*; Clase: *Leotiomycetes*; Orden: *Thelebolales*; Familia: *Pseudeurotiaceae*) es característico de climas fríos y, en particular, es frecuentemente aislado desde distintos ambientes antárticos (Duarte y cols., 2019; Rosa y cols., 2019; Henríquez y cols., 2014). En cuanto a los metabolitos secundarios sintetizados por este género, en los últimos años se ha incrementado el interés por su estudio, comprobándose la variedad biosintética que posee (Tabla III). Es de destacar que se ha descrito que múltiples aislados del género sintetizan compuestos que tiñen el agar de una coloración roja (Figura 9. A-C) (Duarte 2019; Rice & Currah 2006). De igual manera, en nuestro grupo de investigación se han aislado también cepas del género *Pseudogymnoascus* productores de una pigmentación roja similar (Figura 9. D-G). Sin embargo, hasta la fecha, se desconoce la naturaleza química de este pigmento, así como el BGC que lo produce.

Tabla III. Metabolitos aislados desde cepas del género *Pseudogymnoascus*.

Cepa	Metabolitos	Actividad/Naturaleza	Referencia
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. HDN17-933	psegimamidas A–F	tetrapéptidos con actividad analgésica	Hou y cols., 2022
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. HSX2#-11	pseudofenona A	policétido con actividad antibacteriana	Shi y cols., 2021a
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. HSX2#-11	pseudotremulanos A-F	sesquiterpenoides con actividad anticancerígena	Shi y cols., 2021b
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. HSX2#-11	4-(2-metoxicarbonil-etil)-piridina-2-ácido-carboxílico-metil-éster	compuestos nitrogenados	Shi y cols., 2021c
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	pseudogymnoascinas A–C	policétidos derivados del ácido nitroastérico	Figueroa y cols., 2015
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. VKM F-4518 <i>Pseudogymnoascus</i> sp. VKM F-4519	(+)-macrofélidos A -B	policétidos con actividad anticancerígena	Antipova y cols., 2023
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	pannomicina	policétido actividad antibacteriana	Parish y cols., 2008
<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	ferricromo, tri-acetil fusarinina C, citrinina	NRP Sideróforos y micotoxina	Mascush y cols., 2015
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. PF1464	amfiol	compuesto con actividad antifúngica	Fujita y cols., 2021
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. OUCMDZ-3578	derivados y dimeros de difenil-cetonas	actividad antiagregación de amiloide A β ₄₂	Han y cols., 2023

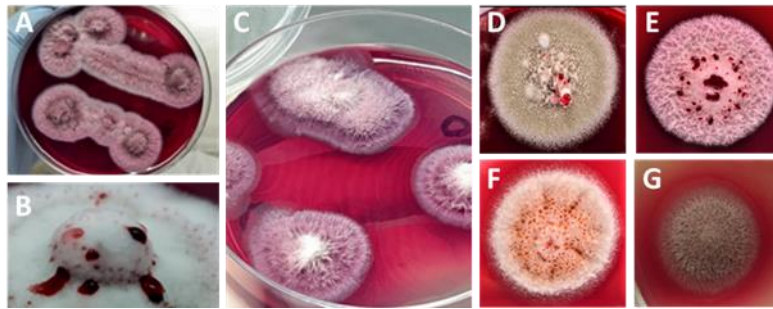


Figura 9. Colonias pigmentadas de cepas fúngicas antárticas del género *Pseudogymnoascus*. A-B: Colonias fúngicas antárticas productoras de pigmentos (modificado de Duarte y cols., 2019); **C:** *Pseudogymnoascus* sp. aislado desde el líquen antártico *Lecania brialmontii* (modificado de Duarte y cols., 2019); **D:** *Pseudogymnoascus* sp. FAE70; **E:** *Pseudogymnoascus* sp. FAE71; **F:** *Pseudogymnoascus* sp. FAE72; **G:** *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. Las cepas *Pseudogymnoascus* sp. FAE70, FAE71 y FAE72 fueron aisladas desde esponjas marinas en Bahía Collins, Península antártica. *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 fue aislada desde esponjas marinas en Bahía Fildes, Isla Rey Jorge.

Actualmente, nuestro grupo de investigación está estudiando el metabolismo secundario de la cepa fúngica antártica *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. Esta cepa es capaz de producir un pigmento con una intensa coloración rojo-violeta que tiñe al agar cuando es cultivada en medio agar papa dextrosa (PDA) (Figura 10). A partir de extracciones con acetato de etilo:metanol (1:1) del agar de placas pigmentadas, se obtuvo un extracto en el que se observó la presencia de metabolitos con máximos de absorción a 506 y 541 nm, longitudes de onda a la cual absorben compuestos de coloración roja-violeta (Figura 10.A).

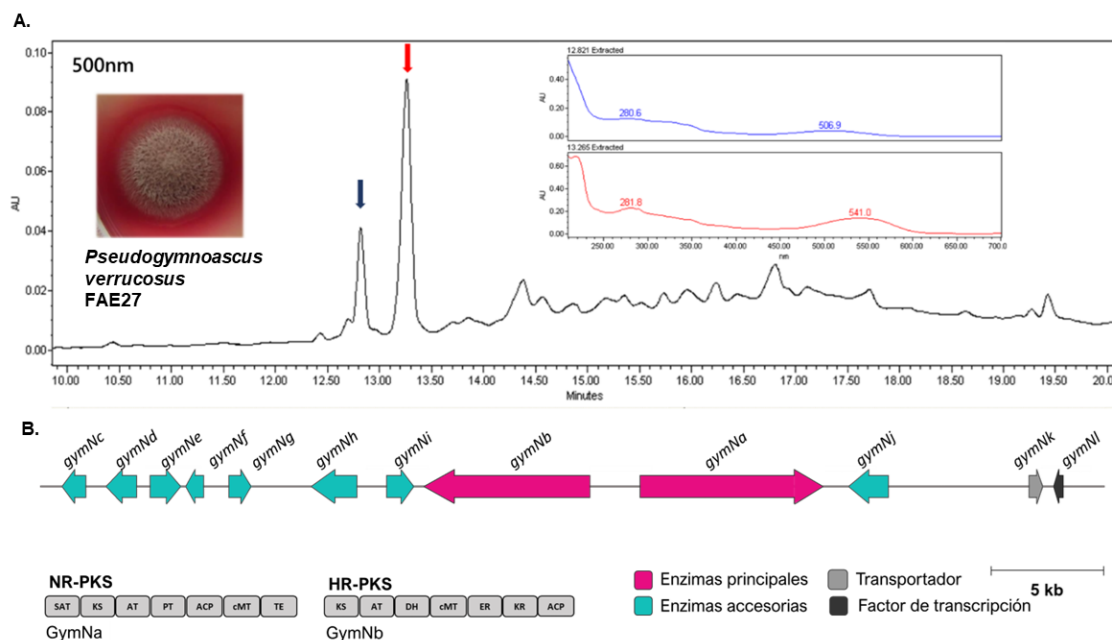


Figura 10. Análisis químico y genético preliminar del potencial para la biosíntesis de azafilonas de la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. A. Cromatograma a 500 nm de extractos obtenidos de placas PDA pigmentadas por la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. En flechas de color azul y rojo se señalan los picos cromatográficos de dos compuestos candidatos a pigmentos. Insertos en el cromatograma, se muestran los espectros UV de dichos picos en color azul y rojo respectivamente, en donde se observan máximos de absorción a 280, 506 y 541 nm. También como inserto, se incluye la foto de una colonia del hongo, donde se observa el agar fuertemente teñido de rojo; **B.** Arquitectura génica del clúster *GymN*.

A nivel genético, tras secuenciar el genoma de la cepa *P. verrucosus* FAE27 y mediante un análisis bioinformático de este genoma con la herramienta antiSMASH (Blin y cols., 2019), se logró identificar un BGC candidato para la producción de azafilonas denominado clúster *GymN* (Figura 10.B). Interesantemente, una búsqueda bibliográfica mostró que no había reportes de la producción de azafilonas en el género *Pseudogymnoascus*, lo que sugería que el estudio de este cluster podría ser de interés.

El análisis con la herramienta antiSMASH indicó que el clúster *GymN* posee como enzima principal una enzima del tipo PKS-NR, codificada por el gen *gymNa*, que posee un porcentaje de similitud aminoacídico mayor al 45% con las enzimas principales del tipo PKS-NR de los clústeres de azafilonas encontrados en el género *Monascus*. Por otro lado, al comparar la composición de ambos clústeres, se observa que el clúster *GymN* posee codificada una segunda enzima

PKS del tipo HR (GymNb) en lugar de las dos enzimas sintasas de ácidos grasos presentes en *Monascus*. Por último, en el clúster GymN se observa la presencia de dos enzimas oxidasas dependientes de FAD (GymNh y GymNj) y una enzima citocromo P450 (GymNi), todas ellas ausentes en el clúster de *Monascus*.

En este contexto, bajo el supuesto que la ruta biosintética para la síntesis de azafilonas en *P. verrucosus* FAE27 sea similar a la descrita en *Monascus*, estructuralmente las azafilonas sintetizadas por *P. verrucosus* FAE27 podrían poseer un mayor grado de oxidación debido a la participación de las enzimas GymNh, GymNi y GymNj. Por otro lado, la cadena carbonada sintetizada en *Monascus* por dos enzimas sintasas de ácidos grasos, en *P. verrucosus* FAE27 sería sintetizada por la enzima PKS-HR GymNb, por lo que ésta podría no estar completamente saturada, como si ocurre en los pigmentos MonAzPs sintetizados en *Monascus*. Este escenario sugiere que las azafilonas sintetizadas por *P. verrucosus* FAE27 poseerían un mayor carácter polar en comparación a las azafilonas MonAzPs y, por ende, una mayor solubilidad en solventes acuosos, una característica deseada dentro de los pigmentos biológicos empleados industrialmente como se mencionó con anterioridad.

Considerando estos antecedentes, los hongos del género *Pseudogymnoascus* son promisorios candidatos a ser productores de pigmentos fúngicos cuya naturaleza química aún no ha sido descrita. Particularmente, la cepa *P. verrucosus* FAE27 posee un BGC denominado GymN que corresponde a un promisorio candidato para la síntesis de pigmentos de tipo azafilona. Bajo estas premisas y la información expuesta anteriormente, es que se plantea para este trabajo las siguientes hipótesis y objetivos.

HIPÓTESIS

Hipótesis Científica

El género fúngico *Pseudogymnoascus* es una fuente para el aislamiento de azafilonas de estructura novedosa. Particularmente, en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27, el clúster biosintético GymN es responsable de la síntesis de pigmentos de tipo azafilona.

Hipótesis Tecnológica

Los pigmentos de tipo azafilona producidos por la cepa antártica *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 poseen un carácter polar, permitiendo su extracción y posterior disolución en solventes acuosos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el potencial de los hongos del género *Pseudogymnoascus*, y en particular la cepa antártica *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27, como nueva fuente de azafilonas.

Objetivos específicos

1. Caracterizar bioinformáticamente el potencial de biosíntesis de azafilonas en genomas del género *Pseudogymnoascus*.
2. Determinar si el clúster GymN es el responsable de la síntesis de los pigmentos producidos por la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27.
3. Elucidar la naturaleza química de los pigmentos producidos por la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27.
4. Evaluar la polaridad y estabilidad de los pigmentos rojos producidos por la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Análisis bioinformático

1.1 Filogenia del género *Pseudogymnoascus*

Para establecer la relación filogenética de las cepas fúngicas del género *Pseudogymnoascus* estudiadas en este trabajo (Anexo 1) se hizo uso de cinco marcadores moleculares, la región del espaciador transcrito interno (ITS), la subunidad grande del ADN ribosomal nuclear (LSU), el factor de traslación de elongación EF-1a (TEF9), la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2) y el factor de inicio de la replicación de ADN (MCM7) (Minnis y Lindner, 2013). La secuencia de los marcadores fue obtenida de GenBank o mediante alineamiento con la herramienta BLAST en los respectivos genomas (Anexo 1).

Las secuencias de los cinco marcadores fueron alineadas individualmente mediante el uso de la herramienta MAFFT v.7 con parámetros por defecto (Kato y Standley, 2013), y posteriormente concatenadas. El análisis de inferencia bayesiana fue realizado con la herramienta MrBayes v3.2 (Ronquist & cols., 2012; Villanueva y cols., 2021). Como árbol inicial se empleó uno aleatorio. El análisis incluyó 1100000 generaciones con 4 cadenas. El modelo de sustitución utilizado fue GTR + I + G y el primer 25% de los árboles generados fueron descartados. El árbol consenso fue visualizado en FigTree V1.4.4.

1.2 Detección de BGCs e identificación de BCAs

La detección de BGCs fue llevada a cabo con la herramienta antiSMASH webservice (v6.1.0) (Blin y cols, 2021). Como entrada se utilizó el genoma y los datos de anotación respectivos disponibles en la base de datos de la NCBI (Anexo 2). Los parámetros utilizados para este análisis fueron: Detection strictness: relaxed; Extra features: All on (Known Cluster Blast, MIBiG cluster comparison, Cluster Pfam analysis, ClusterBlast, Active Site Finder, Pfam-based GO term annotation, SubClusterBlast, RREFinder, TIGRFam analysis); Cluster-border prediction based on transcription factor binding sites (CASSIS): On.

El análisis de completitud del genoma se realizó con la herramienta BUSCO v5.4.2. Como entrada se utilizó las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas en cada genoma. Como linaje se empleó la base de datos de *Leotiomycetes* (leotiomycetes_odb10).

Para la identificación de BCAs se empleó la herramienta BiGSCAPE v1.0.0 (Navarro-Muñoz & cols, 2020). El resultado fue visualizado en Cytoscape v3.9.1 (<https://cytoscape.org/>).

1.3 Análisis de las enzimas principales y accesorias

La predicción de dominios fue realizada empleando la base de datos de dominios conservados (CDD) de la NCBI e InterPro (Paysan-Lafosse & cols., 2022).

Para el análisis filogenético de los dominios KS se realizó un alineamiento con la herramienta MAFFT v.7 con los parámetros seleccionados por defecto (Kato y Standley, 2013). La matriz generada (552 caracteres) fue analizada posteriormente con la herramienta Prottest v3.4.2 (Darriba y cols., 2011) y se determinó el modelo LG + G como el mejor modelo de sustitución aminoacídica. El análisis de inferencia bayesiana fue realizado con la herramienta MrBayes v3.2

(Ronquist & cols., 2012). Como árbol inicial se empleó uno aleatorio. El análisis incluyó 250000 generaciones con 8 cadenas. El modelo de sustitución utilizado fue LG + G y el primer 25% de los árboles generados fueron descartados. El árbol consenso fue finalmente visualizado en FigTree v1.4.4.

La determinación de proteínas ortólogas entre las enzimas accesorias presentes en los clústeres analizados se realizó mediante la herramienta Proteinortho v6.2.4 (Lechner & cols., 2011). Como valor de *coverage* se empleó 30, el resto de los parámetros se mantuvo por defecto.

Para la visualización de los clústeres se empleó la herramienta Clinker v1.1.0 (Gilchrist y Chooi, 2021).

2. Microorganismos y condiciones de cultivo

2.1 Cepas fúngicas

En el Laboratorio de Química Microbiológica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile se dispone de la cepa fúngica *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 para la investigación a realizar. Para crecimiento y mantención, esta cepa se cultivó en placas de medio sólido PDA a 15°C durante 15 días. Una vez transcurridos estos días, los conidios procedentes de las placas se colectaron raspando el agar con una solución estéril de NaCl al 0,9%, y se filtraron usando un filtro de nylon estéril de 35 µm de tamaño de poro. Estas soluciones acuosas de conidios se cuantifican mediante una cámara Newbauer y se guardan a 4°C hasta su uso.

Adicionalmente, durante el trabajo de Tesis se generaron cepas transformantes (Tabla IV), las cuales se mantuvieron y cultivaron del mismo modo que la cepa parental.

Todas las cepas fueron mantenidas adicionalmente en crio preservación a -80°C . Las muestras para preservación a -80°C se prepararon empleando una razón de 1:1 entre la solución de conidios mencionada anteriormente y glicerol 100%.

Tabla IV. Cepas fúngicas transformantes generadas en este trabajo.

Cepa		Plásmido empleado en la transformación
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	THNa2.1	pJL-HNa
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	THNa3.13	pJL-HNa
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	THNa3.17	pJL-HNa
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	THNa4.15	pJL-HNa
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	THNa4.20	pJL-HNa
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	TH3.3	pJL-H
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> FAE27	TH4.6	pJL-H

2.2 Cepa bacteriana

Para la mantención de plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli*, la cual se cultivó en medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 180 rpm y 37°C . Para la selección de colonias transformantes, se usó medio LB sólido (agar 2%) suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Todas las cepas obtenidas con los plásmidos construidos fueron mantenidas adicionalmente en crio preservación a -80°C . Las muestras para preservación a -80°C se prepararon empleando una razón de 3:1 entre un cultivo fresco de *E. coli* DH5 α (Incubación por 16 hrs a 37°C y 180 rpm en medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) y glicerol 100%.

2.3 Medios de cultivo

PDA (Medio de papa y dextrosa agar) (Difco): 39 g/L, agar 0,5%, pH 5.4.

PDB (Medio de papa y dextrosa caldo) (Difco): 24 g/L, pH 5.6.

LB (Luria Bertani): Triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L, agar (0% para medio líquido y 2% para medio sólido)

CM (Medio completo): Glucosa 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, extracto de malta 5 g/L, agar (0% para medio líquido y 1 o 2% para medio sólido)

Cz-S (Medio Czapek Dox suplementado con almidón): Sacarosa 30 g/L, almidón de papa 25 g/L, NaNO_3 3 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, MgSO_4 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, FeSO_4 0,001 g/L, pH 8.0, agar 2%.

3. Análisis y manipulación de ácidos nucleicos

3.1 Extracción de ADN genómico desde micelio procedente de cultivo líquido

El micelio se obtuvo inoculando 50 mL de medio PDB en un matraz de 250 mL con 1 mL de una solución 5×10^7 esporas/mL de esporas. Las condiciones de cultivo son de 3 días a 180 rpm y 15°C . Al finalizar el tiempo de cultivo, se colectó el micelio con un filtro de nylon con un tamaño de poro de $35 \mu\text{m}$, se secó con papel filtro estéril y se almacenó a -80°C .

Para la extracción del ADN, se molió el micelio en un mortero con nitrógeno líquido y se transfirieron 100 mg del polvo obtenido a un tubo de 2 mL. A este tubo, se le agregaron 800 μL de tampón de lisis (Tris HCl 0,2M, EDTA 10 mM, SDS 1%, pH 8,2.) y 800 μL de fenol básico. Posteriormente, esta mezcla se incubó a 50°C por 30 min, siendo agitada en vortex cada 5 min. Finalizado el

tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó por 10 min a 15000 rpm, y se le extrajo la fase acuosa. A esta fase acuosa se le realizaron dos lavados con 1 volumen de Fenol:CIA (1:1), agitando y centrifugando a 15000 rpm por 6 min. A la fase acuosa resultante, se le realizó un último lavado con 1 volumen de CIA (Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:1)) a 15000 rpm por 5 min. Tras rescatar la fase acuosa, se le agregaron 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Esta mezcla se dejó a -20°C por 16 h. Finalmente, el ADN fue colectado centrifugando por 40 min a 4°C y 15000 rpm. El pellet resultante fue lavado con 500 μL de etanol 70%, secado al aire y resuspendido en 100 μL de tampón TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) para, por último, ser almacenado a -20°C .

3.2 Extracción de ADN plasmidial

Las extracciones de ADN plasmidial desde *E. coli* fueron realizadas con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermofisher), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3 Reacciones de digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión se realizaron con la enzima de restricción *Xba*I (Thermofisher) siguiendo las instrucciones del fabricante: 5 μg de ADN, 1 μL de tampón Tango (10x), agua libre de nucleasas hasta un volumen de 9 μL , 1 μL de enzima (10u/ μL). Las reacciones fueron incubadas a 37°C por 2 h y posteriormente, a 80°C por 10 min para inactivar la enzima.

3.4. Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación fueron realizadas con la enzima ADN ligasa T4 (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante: 2 μL Buffer T4 DNA ligase, 50 ng de plásmido, 30-50 ng de inserto, 1 μL T4 DNA ligase, agua libre de nucleasas hasta un volumen de 20 μL . La reacción fue incubada a 16°C por 16 h y

posteriormente, se utilizó para la transformación de *E. coli* DH5 α quimio-competentes.

3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de ADN por PCR se utilizó el reactivo GoTaq[®] Green Master Mix (Promega) en un volumen total de 20 μ L. Para esta reacción se utilizaron 10 μ L de GoTaq[®] Green Master Mix (2x), 0,8 μ L (10 μ M) de cada partidor; 7,6 μ L de agua libre de nucleasas y 0,8 μ L de ADN. El programa estándar utilizado para la amplificación fue: Denaturación inicial de 3 min a 95°C, 35 ciclos de denaturación a 95°C por 40 s, hibridación de los partidores a 55°C por 45 s, elongación a 72°C por un tiempo acorde al tamaño de amplicón (1 min/Kb) y, por último, elongación final a 72°C por 5 min. Los partidores utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla V. En los partidores GymNa-RNAi-Fw y GymNa-RNAi-Rv se señala subrayada la secuencia de corte para la enzima *Xba*I.

Tabla V. Partidores utilizados y sus secuencias.

Nombre	Secuencia 5' - 3'
GymNa-RNAi-Fw	AGACTAT <u>CTAG</u> AGTACTTCCTTACGGGATACG
GymNa-RNAi-Rv	AGACTAT <u>CTAG</u> AGAGACCTCAGTTGCTCTTTC
RNAi-conf-Fw	GCATGCCATTAACCTAGG
RNAi-conf-Rv	ACGGTGGCTGAAGATTC
qRT-btub-Fw	GAACTCCTCACGGATCTTGG
qRT-btub-Rv	TCCAAGGTTTCCAGATCACC
GymNa-Q-Fw	AGACCATAGCACAGCCAACAAG
GymNa-Q-Rv	TTCCATCAGTCGCTCCAGTCAA

3.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los productos de reacción de PCR y digestión enzimática fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.7 Extracción de ADN desde geles de agarosa

Para realizar la extracción de ADN desde geles de agarosa se empleó el kit Wizard® Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8 Extracción de ARN desde micelio procedente de cultivos en placa

Para la extracción de ARN desde micelio se utilizó el reactivo TRIsure™ (Bioline). Para cada extracción, con un bisturí limpio se raspó el micelio desde placas de PDA de 15 días de incubación. El micelio fue molido en mortero con nitrógeno líquido. Después, 50 mg del polvo obtenido fue transferido a un tubo nuevo de 2 mL y se le agregó 1 mL de reactivo TRIsure™. La mezcla fue homogeneizada por vortex y luego se utilizó un Tissueruptor® para aumentar el grado de ruptura celular. El lisado se incubó a 65°C por 5 min y posteriormente, se dejó a temperatura ambiente por 5 min. A continuación, fue centrifugado a 14000 rpm y 4°C por 15 min, y la fase acuosa obtenida fue transferida a un nuevo tubo de 1,5 mL. A este tubo se le agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se le dejó a temperatura ambiente por 3 min. La mezcla fue centrifugada a 14000 rpm y 4°C por 15 min. Entonces, la fase acuosa fue rescatada, transferida a un nuevo tubo y sometida a un segundo lavado con 200 µL de cloroformo. A la nueva fase acuosa se le agregaron 500 µL de isopropanol, fue mezclada por inversión y dejada a temperatura ambiente por 10 min. Luego,

se centrifugó a 14000 rpm y 4°C por 15 min, para posteriormente eliminar el sobrenadante y lavar el pellet formado con 500 µL de etanol 70% (en agua tratada con DEPC) frío, centrifugando a 14000 rpm por 5 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado por 45 min a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en 60 µL de agua tratada con DEPC. La cuantificación de ARN fue realizada por espectrofotometría y su integridad fue verificada mediante visualización por gel de agarosa. Para la eliminación de ADN residual tras la extracción de ARN, el ARN se trató con la enzima DNase I (RNase-free) (NEB) por 45 min a 37°C. La enzima posteriormente fue inactivada agregando 10 µL de EDTA 50 mM e incubando a 75°C por 10 min.

3.9 Electroforesis de ARN en geles de agarosa

El ARN total extraído desde micelio fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados en tampón TAE 1x - DEPC (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8, DEPC 0,1%), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.10 Retro-transcripción de ARN y PCR cuantitativa (qRT-PCR)

La síntesis de ADNc desde ARN se llevó a cabo mediante la acción de la transcriptasa reversa. Para ello, se empleó el kit 5x All-In-One RT MasterMix (Applied Biological Materials Inc., Canada) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de qRT-PCR fueron preparadas en volúmenes de 20 µL, con 10 µL de KAPA SYBR Fast qRT-PCR Master Mix 2x (Kapa Biosystems, USA), 0,4 µL de los partidores forward y reverse (10 µM), 0,4 µL de ROX High/Low 50x, 6,8 µL de agua grado biología molecular y 2 µL de ADNc. Las reacciones de qRT-PCR fueron llevadas a cabo en un equipo StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Las condiciones de amplificación

fueron de 20 s a 95°C y 40 ciclos de 3 s a 95°C y 30 s a 50°C. La cuantificación se realizó por triplicado. Los datos fueron analizados utilizando el método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) y normalizados con los datos de amplificación del gen de la beta-tubulina, empleando los partidores qRT-btub-Fw y qRT-btub-Rv (Tabla V).

4. Transformación genética de microorganismos.

4.1 Transformación química de *E. coli* DH5 α

Para inducir el estado de competencia de las células de *E. coli* DH5 α , se siguió el siguiente protocolo: se inoculó una colonia aislada de *E. coli* DH5 α procedente de una placa fresca de medio LB sólido, en 6 mL de medio LB líquido y se incubó a 37°C y 200 rpm por 16 h, para ser usado como preinóculo. Después, se inocularon 5 mL de este preinóculo en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB. Este cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una D.O. a 600 nm entre 0,4 y 0,6. En ese momento, el matraz se colocó en hielo y el cultivo se alicuotó en volúmenes de 10 mL en tubos falcon de 15 mL, los cuales se incubaron en un baño de agua-hielo por 10 min. Posteriormente, estos tubos se centrifugaron por 5 min a 6000 rpm y 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en 5 mL de CaCl₂ 100 mM e incubado en baño agua-hielo por 30 min. Después, se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm y 4°C. Finalmente, el pellet se resuspendió en 500 μ L de CaCl₂ 100 mM y se alicuotó en volúmenes de 50 μ L en tubos eppendorff. Tras agregar a cada tubo con células 30 μ L de glicerol estéril, éstos fueron almacenados a -80°C.

Para cada transformación, a 80 μ L de células *E. coli* DH5 α quimio-competentes se agregó 50 ng del plásmido y se incubó 1 h en hielo. Posteriormente, se aplicó un choque térmico a 42°C por 50 s y, rápidamente, se incubó en hielo por 5 min. A continuación, a la mezcla se le agregó 500 μ L de

medio LB y se dejó recuperando las células por 1,5 h a 150 rpm y 37°C. Después, las células fueron centrifugadas por 3 min a 5000 rpm. Finalmente, el pellet se resuspendió en un volumen de 100 µL y se sembró en placas de LB sólido con 100 µg/mL de ampicilina como marcador de selección.

4.2 Transformación de la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 mediada por PEG

Para la transformación de la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 se empleó el protocolo descrito en Díaz y cols. (2019), el cual fue desarrollado durante el transcurso de esta Tesis.

Para la obtención de protoplastos, se realizaron cultivos líquidos en medio CM inoculados con una solución de esporas en razón 1 mL de esporas a una concentración de 10^7 esporas/mL por matraz con 100 mL de medio. El cultivo se incubó por 48 h a 15°C y 180 rpm. El micelio obtenido fue colectado en filtro Miracloth y lavado 3 veces con una solución de NaCl 0,9%.

Un gramo de micelio húmedo secado con papel filtro estéril fue transferido estérilmente a un tubo de 50 mL con 10 mL del tampón TPP (50 mM K_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , 0,7 M KCl, pH 5.8). Paralelamente, se prepararon 10 mL de una solución de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (SigmaAldrich, USA) a una concentración de 40 mg/mL en tampón TPP. La solución de enzimas líticas fue filtrada y esterilizada mediante un filtro estéril de 0.22 µm (Millex®GP, EMD Millipore, USA).

Las soluciones de micelio y enzimas líticas fueron mezclados en un matraz Erlenmeyer estéril de 100 mL e incubadas a 28°C y 80 rpm. Tras 3 h, se chequeó la liberación de protoplastos mediante el uso de microscopía óptica. Es posible aumentar las horas de incubación si la liberación de protoplastos es baja. Los protoplastos liberados fueron posteriormente filtrados con filtro Miracloth y con un filtro de nylon con un tamaño de poro de 35 µm, con el fin de separarlos del

micelio remanente. Los protoplastos fueron colectados por centrifugación a 4000 rpm por 4 min.

Los protoplastos obtenidos fueron lavados y centrifugados tres veces con el tampón KCM (0,5 M MES, 0,7 M KCl, 50 mM CaCl₂, pH 5.8), y luego resuspendidos en el tampón STC (20% Sorbitol, 10 mM Tris-HCl, 50 mM CaCl₂, pH 8.0). La solución de protoplastos fue ajustada a una concentración de 1×10^7 protoplastos/mL.

Para la transformación de protoplastos, se utilizaron 100 μ L de solución de protoplastos la cual se incubó por 30 min en hielo en conjunto a 10 μ g de ADN plasmidial (10 μ L aproximadamente), 10 μ L de ácido aurintricarboxílico 0,1 M (ATA), y 10 μ L de tampón PCM (0,5 M MES, 50 mM CaCl₂ y polietilenglicol (PEG) 3350 50%). Posteriormente, se agregaron 500 μ L de PCM y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 30 min. Transcurrido este tiempo, se agregaron 600 μ L de tampón STC y 2 mL de CM líquido suplementado con sorbitol (1 M), y fueron incubados para su recuperación a 15°C y 80 rpm por 24 h.

Transcurrido el tiempo de recuperación, los protoplastos fueron plaqueados por método de cobertera mezclando estos con 10 mL de medio CM sólido (agar 1%, sorbitol 1 M) temperado a 42°C y suplementado con higromicina 40 μ g/mL, y vertidos sobre una base 10 mL de CM sólido (agar 2%, sorbitol 1 M) suplementado con higromicina 40 μ g/mL en placas Petri. Las placas son incubadas a 15°C por 10 días o hasta evidenciar la aparición de colonias transformantes.

Las colonias transformantes resultantes fueron repicadas en medio PDA suplementando con 40 μ g/mL de higromicina. Desde cada repique de cepa transformante se colectaron esporas utilizando una solución de NaCl 0,9% y se plaquearon diluciones con el fin de obtener colonias únicas en placas de PDA suplementadas con 40 μ g/mL de higromicina. De manera aleatoria, se seleccionó una de estas colonias la cual fue repicada en placas de medio PDA

suplementadas con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina por tres generaciones para la obtención de cultivos monoespóricos estables de las cepas transformantes obtenidas.

5. Caracterización de las cepas transformantes de *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

5.1 Caracterización fenotípica de las cepas transformantes de *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

La cuantificación de la esporulación se realizó inoculando las cepas transformantes junto a la cepa nativa en placas independientes de medio PDA en tres puntos (colonias) empleando un palillo estéril impregnado en esporas. Estas placas fueron incubadas a 15°C por 14 días. El conteo de esporas se realizó en una cámara newbauer a partir de una solución de esporas obtenidas al raspar las colonias con una solución de NaCl 0,9% seguido de un filtrado con filtro miracloth.

La determinación del área de colonia se realizó mediante la herramienta ImageJ 1.6.0. a partir de fotos de colonias de las cepas transformantes junto a la cepa nativa en placas de PDA incubadas a 15°C por 14 días.

5.2 Caracterización molecular de las cepas transformantes de *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

La amplificación del cassette de interferencia se realizó con los partidores RNAi-conf-Fw y RNAi-conf-Rv empleando ADN genómico de cada cepa como templado.

La determinación de transcrito relativo del gen *gymNa* en la cepa nativa y cepas transformantes se realizó mediante qRT-PCR empleando los partidores GymNa-Q-Fw y GymNa-Q-Rv (10 μ M).

Las condiciones del PCR y qRT-PCR se detallan en la sección 3.5 y 3.10 de materiales y métodos respectivamente.

5.3 Caracterización química del perfil de metabolitos secundarios de las cepas transformantes de *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

Los metabolitos secundarios de las cepas transformantes, así como de la cepa parental, fueron extraídos desde el agar de las placas de medio de cultivo. Así, para la obtención de estos extractos, se realizaron cultivos de 14 días a 15 °C en medio sólido PDA de la cepa nativa y de las cepas transformantes analizadas. Para llevar a cabo la extracción, se removió el micelio utilizando un bisturí y se extrajo los pigmentos desde 1/3 del agar correspondiente a una placa Petri. La extracción se realizó con una mezcla acetato de etilo:metanol 1:1. Transcurrido un tiempo de maceración de 24 hrs en estado estático a temperatura ambiente el solvente fue separado del agar por filtración y centrifugado a 13000 rpm para la eliminación de elementos insolubles. Los extractos fueron llevados a sequedad en un rotavapor y almacenados a -20°C.

Para el análisis de los extractos por HPLC se utilizó un equipo conformado de un detector de fotodiodo (Waters 2998), un conjunto binario de bombas (Waters 1525), un horno de columna (Waters 1500) y un desgasificador (Waters in-line degasser AF). Para todos los análisis se utilizó una columna C-18 de fase reversa (Sunfire C18, Waters, 4,6 x 25 cm, 5 μ m) estabilizada a 35°C.

El programa utilizado para el tratamiento de datos fue el EMPOWER 3. Las muestras inyectadas fueron de 50 μ L (disueltas en agua:metanol 1:1). Los solventes utilizados fueron agua (solvente A) y metanol (solvente B), ambos de calidad cromatográfica y acidificados con 0,01% de ácido trifluoroacético (TFA). El gradiente de elución fue: 10% de solvente B a 100% solvente B de manera

lineal por 20 min, seguido de un flujo isocrático de 100% solvente B por 8 min y finalmente 100% solvente B a 10 % solvente B de manera lineal por 2 min. El flujo utilizado fue de 1 mL/min.

6. Análisis y purificación de pigmentos de la cepa *P. verrucosus* FAE27

6.1 Análisis por HPLC-DAD-MS/MS

Desde placas inoculadas a 15°C con la cepa *P. verrucosus* FAE27 nativa y transformantes, se extrajeron tres *plugs* circulares (0,5 cm de diámetro) con agar y micelio. Estos fueron extraídos con una mezcla de acetato de etilo:isopropanol 3:1 (1% ácido fórmico) sonicando por 10 minutos. El solvente fue separado del agar y centrifugado a 13000 rpm para la eliminación de elementos insolubles. Los extractos fueron llevados a sequedad con flujo de nitrógeno y almacenados a -20°C. El extracto seco fue resuspendido en 100 µL de metanol:agua 3:1, sonicado, y centrifugado a 14000 rpm por 5 min para la eliminación de elementos no solubles.

El análisis por HPLC-DAD-MS fue realizado en un sistema Agilent Infinity 1290 UHPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un detector de arreglo de diodos. La cromatografía se llevó a cabo en una columna Fenil-Hexil 150 × 2.1 mm i.d., 1.9 µm, Poroshell 120 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) mantenida a 40°C. El flujo de elución utilizado fue de 0,35 mL/min utilizando un gradiente lineal desde 10% acetonitrilo (grado LC-MS) en agua Milli-Q acidificada con 20 mM de ácido fórmico, hasta un 100% de acetonitrilo en 10 min, seguido de un flujo isocrático de 2 min 100% acetonitrilo, y luego un gradiente lineal desde 100% de acetonitrilo hasta un 10% de acetonitrilo en 0.1 min, manteniendo ese flujo por 3 min antes de finalizar la elución.

El registro de la espectrometría de masas se realizó en un sistema Agilent 6545 QTOF MS equipado con un sistema de ionización Agilent Dual Jet Stream electrospray ion source (ESI) con una temperatura de gas de secado de 250°C y un flujo de 8 L/min, y de gas envolvente a 300°C con un flujo de 12 L/min. El voltaje del capilar utilizado fue de 4000 V y un voltaje de boquilla de 500V en modo positivo. Los espectros MS fueron registrados y la fragmentación MS/HRMS fue realizada a tres energías de colisión (10, 20 y 40 eV). La tasa de registro fue de 10 espectros/min. La solución patrón en 70% MeOH utilizada fue constituida por 1 µM tributilamina (Sigma-Aldrich) and 10 µM Hexakis (2, 2, 3, 3-tetrafluoropropoxy) fosfaceno (Apollo Scientific Ltd., Cheshire, UK) (m/z 186,2216 y 922,0098 respectivamente). Como muestra se utilizó un volumen de 2 µL para cada inyección.

El análisis de los datos se realizó en el programa Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

6.2 Extracción y purificación de pigmentos

La purificación de los metabolitos con iones moleculares de m/z 385,2489 y m/z 427,2591 se realizó a partir de 112 placas Petri de la cepa *P. verrucosus* FAE27 cultivada en colonias en medio Cz-S por 21 días a 15°C. Para la extracción de los pigmentos se emplearon placas completas (agar y colonias), a las cuales se les realizaron dos extracciones consecutivas. La primera extracción se realizó con acetato de etilo (ácido formico 1%) y la segunda se realizó con acetato de etilo:metanol 1:1 (ácido formico 1%). En ambas se utilizó un volumen de 2 L, de modo que el solvente cubriera perfectamente el agar. Cada extracción se llevó a cabo por maceración por 16 hrs a temperatura ambiente y sin agitación, posteriormente se filtró el extracto crudo empleando papel filtro para luego ser llevados a sequedad en rotavapor.

El extracto de acetato de etilo:metanol 1:1 fue resuspendido en 200 mL de una mezcla agua:metanol (1:9) y extraído tres veces con 100 mL de n-heptano mediante un embudo de decantación. La fase acuosa resultante, fue llevada a una razón agua:metanol 1:1 mediante la adición de agua y se extrajo tres veces con 100 mL de diclorometano en un embudo de decantación. Adicionalmente, se agregó metanol (obteniendo una mezcla con mayor proporción de metanol) para favorecer la separación de las fases y eliminación de emulsiones. La fase de diclorometano fue llevada a sequedad en un rotavapor.

El extracto seco de diclorometano fue fraccionado en un sistema Isolera flash purification (Biotage) en una columna C18 (50 g) con ocho pasos de elución utilizando como solventes agua y metanol acidificados con 1% ácido fórmico. Cada paso constó de un lavado con tres volúmenes (150 mL) de mezclas agua-metanol, con una composición que va desde 30% metanol hasta un 100% metanol (8 fracciones).

La fracción correspondiente a la elución en 100% metanol fue llevada a sequedad en un rotavapor, resuspendida en 300 μ L de metanol:agua 3:1 y fraccionada en un sistema HPLC-DAD semipreparativo Gilson 332 semi-prep – La columna empleada fue C6-Phenyl 110A (250 x 10.00 mm, 5 μ m, Phenomenex). El flujo de elución utilizado fue de 3 mL/min utilizando dos gradientes lineales consecutivos, primero desde 20% acetonitrilo (grado LC) en agua Milli-Q acidificada con 1% ácido fórmico, hasta un 63% de acetonitrilo en 8 min, seguido de un segundo gradiente lineal desde 63% acetonitrilo hasta un 100% en 7 min. Para finalizar la elución, se fijó un flujo isocrático de 3 min de acetonitrilo 100% y luego un gradiente lineal desde 100% de acetonitrilo hasta un 20% de acetonitrilo en 1 min para volver a la condición inicial.

RESULTADOS

1. Caracterización bioinformática del potencial de biosíntesis de azafilonas en genomas del género *Pseudogymnoascus*

1.1 Identificación de clústeres biosintéticos de azafilonas en genomas del género *Pseudogymnoascus*

Para la identificación de BGCs en genomas del género *Pseudogymnoascus* se consideraron inicialmente todos los genomas disponibles de referencia en la base de datos de la NCBI (Anexo 2), con un total de 27 (búsqueda realizada en abril del año 2023). De estos genomas, 6 no se encuentran anotados, por lo que fueron descartados para los posteriores análisis. Adicionalmente, se incluyó el genoma no publicado de la cepa antártica *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 disponible en nuestro laboratorio.

Al llevar a cabo un análisis a nivel genómico, hay que tener en consideración la calidad de los genomas tanto para la predicción de BGCs como para los posteriores análisis. Un genoma fragmentado favorece la predicción de BGCs en los bordes de los *contigs/scaffolds* (*Edge* BGCs), lo cual no permite asegurar que los clústeres predichos se encuentren completos o que un BGC pueda estar fragmentado y pueda identificarse como dos BGCs independientes. El considerar clústeres incompletos en los análisis puede dar origen a artefactos o interpretaciones erróneas de los resultados, por lo que es muy importante tener presente esta circunstancia. Como indicador del nivel de fragmentación de un genoma, el parámetro N50 da cuenta de la calidad del ensamblaje obtenido tras la secuenciación. El valor de este indicador hace referencia al tamaño del

contig/scaffold el cual, al ordenar de manera creciente los *contig/scaffold* de acuerdo con su tamaño, la suma de pares de bases que contiene dicho *contig/scaffold* más los pares de bases de los *contig/scaffold* de mayor tamaño, corresponde a un porcentaje igual o mayor al 50% respecto a la totalidad del genoma secuenciado. Así, a menor N50 el genoma se encuentra más fragmentado que uno que posee un mayor N50.

De este modo, cuando analizamos los genomas de *Pseudogymnoascus* que se utilizarán en este estudio, se observó que a mayor índice N50 de los genomas, éstos poseen un mayor porcentaje de completitud (%C), y concordantemente un menor porcentaje de BGCs predichos en bordes de *contigs/scaffolds* (Figura 11). Sin embargo, no se observa una correlación entre el número de BGCs y el indicador N50 (Figura 11). A partir de estos resultados, con la finalidad de no perder información respecto a los BGCs presentes, se determinó incluir la totalidad de los genomas anotados en los análisis posteriores, y no solo los de mayor N50. No obstante, se mantendrá para dichos análisis siempre la consideración de la posible presencia de BGCs fragmentados y/o BGCs incompletos (entendiéndose como BGCs incompleto aquellos que podrían no poseer todos los genes que componen realmente dicho clúster).

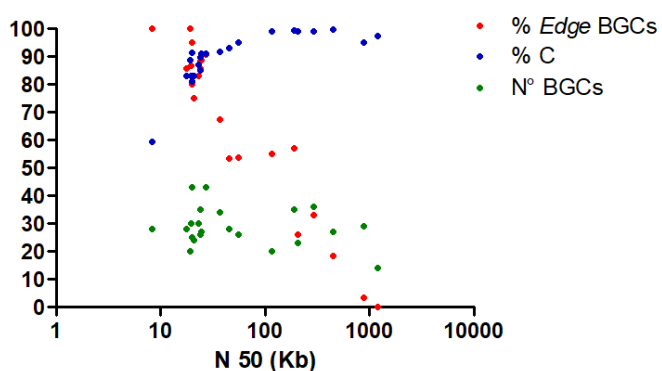


Figura 11. Análisis de correlación del indicador N50 con la completitud del genoma (%C), número de BGCs y porcentaje de *Edge* BGCs.

En este contexto, el análisis con antiSMASH (v6.1.0) de los 22 genomas de *Pseudogymnoascus* considerados, predijo un total de 631 BGCs, entre 14 y 43 BGCs por genoma (Figura 12). De estos 631 BGCs, 188 (29,8 %) poseen un clúster conocido similar registrado en la base de datos de MIBiG (v2.0), mientras que 433 no presentan un BGC similar.

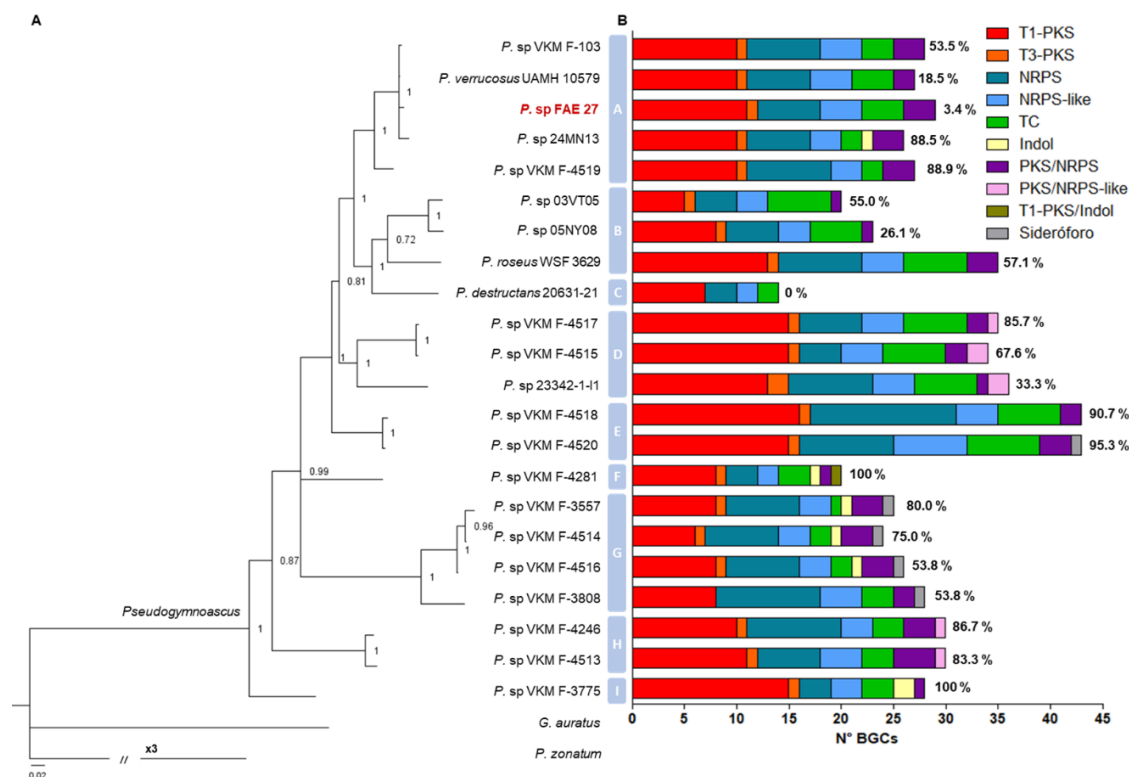


Figura 12. Distribución de BGCs en los 22 genomas de *Pseudogymnoascus* analizados de acuerdo con su filogenia. **A.** Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana de *Pseudogymnoascus* generado en base a un concatenado de 5 loci (ITS, LSU, TEF1, RPB2 y MCM7). La probabilidad posterior bayesiana (BPP) se indican en los nodos. La cepa antártica *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 se destaca en rojo. La barra de distancia indica 0,02 cambios de nucleótidos por sitio. Las barras grises verticales, a la derecha de los nombres de las cepas, muestran las agrupaciones taxonómicas (clados), desde la A a la I definidos en este trabajo. **B.** Distribución según abundancia y clase de los BGC identificados en los genomas de *Pseudogymnoascus*. En la leyenda inserta se especifican, por colores, la clase a la que pertenecen los BGCs, clasificados según la naturaleza de la enzima principal/BGC. En cada barra se especifica el porcentaje de BGCs de cada genoma predicho en el borde de un *contig/scaffold* (Edge BGC). Como *outgroup* se emplearon las cepas *Geomyces auratus* y *Pseudeurotium zonatum*. (Minnis & Lindler 2014).

Entre todos los BGCs identificados, la clase más abundante corresponde a los clústeres que poseen una enzima principal del tipo T1-PKS con 232 BGCs

(36,8%), seguido de los clústeres con una enzima del tipo NRPS con 146 BGCs (23,1%).

Empleando los marcadores moleculares que actualmente se utilizan en los análisis taxonómicos del género *Pseudogymnoascus* (materiales y métodos 1.1), se realizó un análisis filogenético de todas las cepas cuyos genomas fueron analizados con antiSMASH. El árbol filogenético resultante se muestra en la Figura 12 junto con el resultado de antiSMASH. El análisis conjunto de ambos nos permite observar que el número y distribución de las clases de clúster se correlacionan con los distintos clados generados en la filogenia. Por un lado, los genomas con mayor número de BGCs corresponden a los de las cepas presentes en los clados D y E, mientras que el menor número de BGCs se encuentra en el genoma de *P. destructans* (clado C). De igual manera, existen clases de BGCs localizados principalmente en los genomas de las cepas de determinados clados. Este es el caso de los BGC del tipo sideróforo localizados en las cepas pertenecientes al clado G, o el caso de los BGC PKS/NRPS-like que están únicamente en los genomas de las cepas de los clados D y H, y el caso de los BGC de clase indol que se encuentran presentes solo en las cepas de los clados F, G e I, además de en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13 (clado A).

Una vez determinados todos los BGCs presentes en los genomas de *Pseudogymnoascus* a estudiar, la búsqueda se centró en los BGCs específicos para azafilonas. Para la identificación de BGCs que codifican enzimas para la síntesis de azafilonas se emplearon dos aproximaciones. Primero, se consideraron los resultados obtenidos del análisis de los genomas con la herramienta antiSMASH, ya que estos son capaces de indicar la existencia de similitud entre clústeres predichos con clústeres para la síntesis de azafilonas registrados en la base de datos curada de MIBiG. Como segunda aproximación, se empleó la herramienta BiG-SCAPE (v1.1.0). Esta herramienta permite agrupar y generar redes de similitud de secuencia entre múltiples clústeres biosintéticos que sintetizan metabolitos secundarios estructuralmente relacionados (Navarro y

cols., 2020). Para identificar los potenciales BGCs para la síntesis de azafilonas entre los BGCs predichos en los genomas de *Pseudogymnoascus*, se incorporaron al análisis por BiG-SCAPE los 15 BGCs descritos o hipotéticos para la síntesis de azafilonas, correspondientes al total de BGCs que se pudo identificar en la literatura al momento de realizar este trabajo (Tabla VI). Así, los BGCs de *Pseudogymnoascus* que se agrupen con estos, serán considerados como BGCs candidatos para la síntesis de este tipo de metabolitos.

Tabla VI. Clústeres de genes biosintéticos descritos para la síntesis de azafilonas y el metabolito relacionado asperfuranona en hongos filamentosos.

BGC	Metabolito	Especie	Cepa/aislado	Fuente	Referencia
BGC0000022.1	asperfuranona	<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4	MIBiG	Chiang y cols., 2009
BGC0000027.1	MonAzPs	<i>Monascus pilosus</i>	ATCC 16363	MIBiG	Balakrishnan y cols., 2013
BGC0001143.1	azanigeronas	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 1015	MIBiG	Zabala y cols., 2012
BGC0001338.1	citrinina	<i>Monascus ruber</i>	M7	MIBiG	He & Cox, 2016
BGC0001405.1	chaetoviridina E	<i>Chaetomium globosum</i>	CBS 148.51	MIBiG	Winter y cols., 2012
BGC0002206.1	harziflonas	<i>Trichoderma guizhouense</i>	NJAU 4742	MIBiG	Pang y cols., 2020
BGC0002255.1	lijiquinona	-	<i>Ascomycota</i> sp. F53	MIBiG	Cain y cols., 2020
BGC0002267.1	preasperpiranona	<i>Aspergillus terreus</i>	NIH2624	MIBiG	Huang y cols., 2020
NT_165982.1 (1.345.294..1.392.335)	chaetoglobina A	<i>Chaetomium globosum</i>	CBS 148.51	GCA_000143365.1	Nakazawa y cols., 2013
NW_002196664.1 (3.079.245..3.108.139)	mitorubrina	<i>Talaromyces marneffeii</i>	ATCC 18224	GCA_000001985.1	Woo y cols., 2012
NW_002196664.1 (3.142.320..3.197.369)	MonAzPs	<i>Talaromyces marneffeii</i>	ATCC 18224	GCA_000001985.1	Rasmussen ,2015
NW_002990113.1 (480.754..553.723)	MonAzPs	<i>Talaromyces stipitatus</i>	ATCC 10500	GCA_000003125.1	Rasmussen ,2015
NW_002990113.1 (555.073..626.407)	mitorubrina	<i>Talaromyces stipitatus</i>	ATCC 10500	GCA_000003125.1	Woo y cols., 2012
VIFY01000048.1 (30.176..79.950)	MonAzPs	<i>Monascus purpureus</i>	HQ1	GCA_006542485.1	Chen y cols., 2017
VIFY01000224.1 (1..30.620)	citrinina	<i>Monascus purpureus</i>	HQ1	GCA_006542485.1	Chen y cols., 2017

Para la agrupación de BGCs por BiG-SCAPE, se emplearon valores de *cut-off* de 0.5, 0.6 y 0.7 con la intención de encontrar el valor que permitiera agrupar la mayor parte de BGCs vinculados con la síntesis de azafilonas sin

generar una sobre agrupación de BGCs que no están relacionados (Figura 13, Anexos 3 y 4). Tras analizar visualmente las redes de similitud resultantes, se seleccionó la obtenida con un valor de *cut-off* de 0,6, ya que este valor permitió agrupar de mejor manera los 15 BGCs descritos en la literatura sin generar una sobre agrupación de BGCs (Figura 13; Anexos 3 y 4).

Como resultado de ambas aproximaciones, se identificaron un total de 18 BGCs candidatos para la síntesis de azafilonas (BCAs) en *Pseudogymnoascus*, distribuidos en 14 de los 22 genomas analizados. De ellos, 12 BCAs fueron identificados por ambas aproximaciones de manera independiente, 4 fueron identificados solo por antiSMASH y 2 fueron identificados solo por BiG-SCAPE (Tabla VII, Figura 13).

En cada genoma se identificó un único BCA a excepción de los genomas de las cepas *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-3808, *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13, *P. roseus* WSF 3629 y *P. destructans* 20631-21, en donde se identificaron dos BCAs por genoma. Estos BCAs fueron analizados en detalle para determinar en cada caso si se trata de dos BGCs independientes o el resultado de la fragmentación de uno.

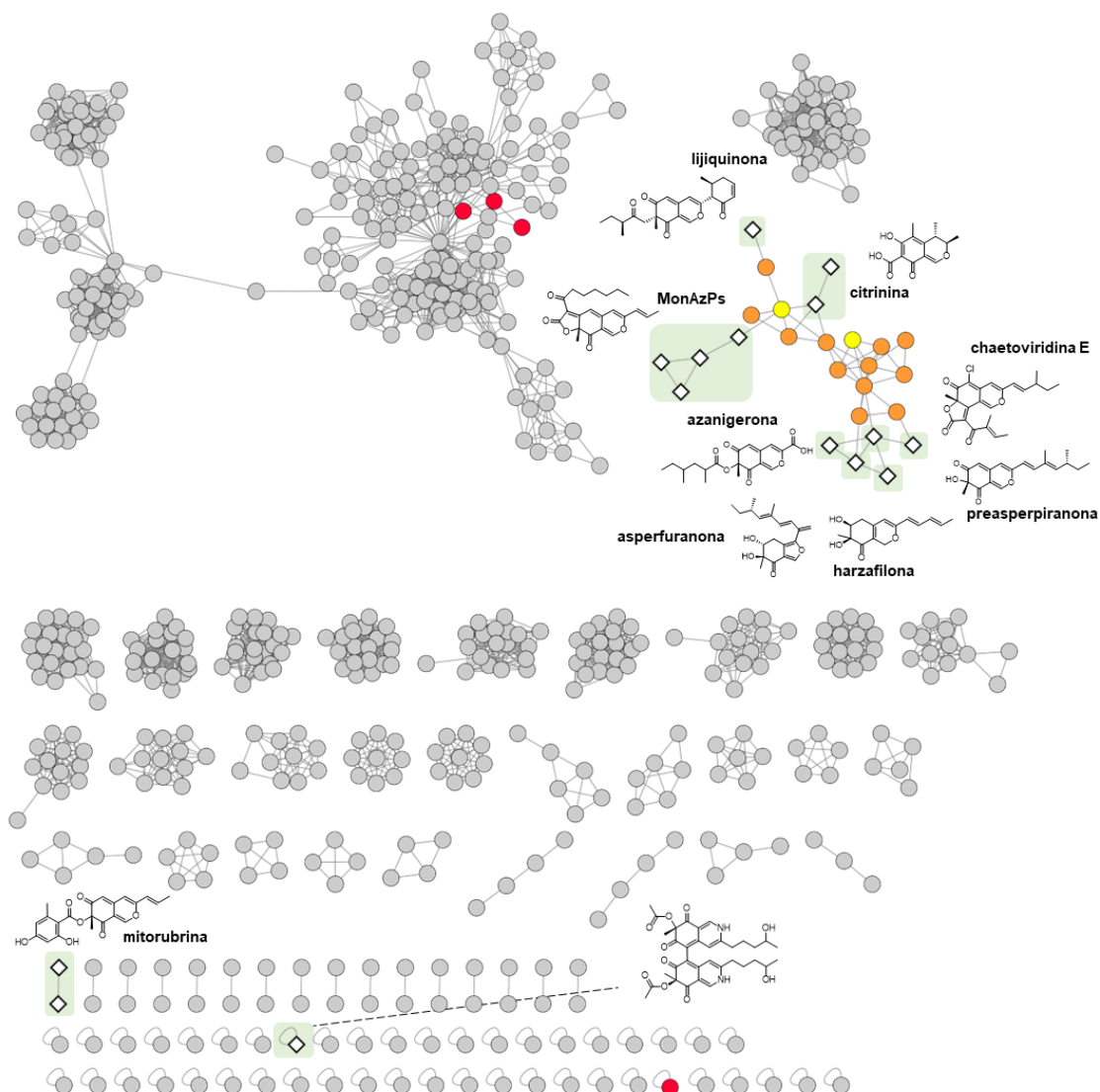


Figura 13. Red de similitud de secuencia de los 631 BGCs identificados en los genomas de *Pseudogymnoascus* con BGCs de azafilonas de otros géneros fúngicos. Cada BGC de *Pseudogymnoascus* es representado por un círculo coloreado. Los BGCs de azafilonas de otros géneros fúngicos se representan con rombos blancos encasillados en rectángulos verdes, en caso de sintetizar el mismo metabolito o familia de estos, los rombos se encuentran encasillados en un mismo rectángulo. (Tabla VI). La estructura de las azafilonas sintetizadas por estos clústers se muestran próximas al BGC productor. La red se construyó con la herramienta BiG-SCAPE (v1.1.0) empleando un *cut-off* de 0.6. Código de colores de los círculos: Gris (BGCs sin relación con las azafilonas); Rojo (BGCs candidatos para producción de azafilonas asignados por antiSMASH); Amarillo (BGCs candidatos para producción de azafilonas asignados por agrupación en BiG-SCAPE); Naranja (BGCs candidatos para producción de azafilonas asignados tanto por antiSMASH como por agrupación de BiG-SCAPE).

Tabla VII. BGCs identificados para la síntesis de azafilonas (BCAs) en cada genoma de *Pseudogymnoascus*

Cepa	BCA (<i>contig</i>) *	Localización del BCA en cada <i>contig</i>	BGC conocido similar (MIBiG)	Identificación **
<i>P. destructans</i> 20631-21	KV441426.1.region001 / KV441434.1.region001	(29.678-77.663) / (6.118-54.194)	Asperfuranona (BGC0000022) / Monascorubrina (BGC0000099)	AS / AS-BS
<i>P. sp.</i> 03VT05	-	-	-	-
<i>P. sp.</i> 05NY08	KV458832.1.region001	(94.199-166.564)	Azanigeronas (BGC0001143)	AS-BS
<i>P. sp.</i> 23342-1-11	-	-	-	-
<i>P. sp.</i> 24MN13	KV456276.1.region001 / KV456573.1.region001	(1-25.858) <i>Edge</i> / (1-15.346) <i>Edge</i>	-/ citrinina (BGC0001338)	BS / AS-BS
<i>P. sp.</i> VKM F-103	JPKB01000031.1.region001	(17.110-81.544) <i>Edge</i>	Azanigeronas (BGC0001143)	AS-BS
<i>P. sp.</i> VKM F-3557	JPJS01000596.1.region001	(520-47.433) <i>Edge</i>	MonAzPs (BGC0000027)	AS-BS
<i>P. sp.</i> VKM F-3775	JPJT01004145.1.region001	(10.929-53.953) <i>Edge</i>	MonAzPs (BGC0000027)	AS
<i>P. sp.</i> VKM F-3808	JPJR01001873.1.region001 / JPJR01000584.1.region001	(1-12.085) <i>Edge</i> / (491-43.657) <i>Edge</i>	-/ MonAzPs (BGC0000027)	BS / AS-BS
<i>P. sp.</i> VKM F-4246	-	-	-	-
<i>P. sp.</i> VKM F-4281 (FW-2241)	-	-	-	-
<i>P. sp.</i> VKM F-4513 (FW-928)	JPJW01002357.1.region001	(1-34.702) <i>Edge</i>	Chaetoviridinas (BGC0001405)	AS
<i>P. sp.</i> VKM F-4514 (FW-929)	-	-	-	-
<i>P. sp.</i> VKM F-4515 (FW-2607)	-	-	-	-
<i>P. sp.</i> VKM F-4516 (FW-969)	JPJZ01000766.1.region001	(72.098-134.759)	Asperfuranona (BGC0000022)	AS-BS
<i>P. sp.</i> VKM F-4517 (FW-2822)	-	-	-	-
<i>P. sp.</i> VKM F-4518 (FW-2643)	-	-	-	-
<i>P. sp.</i> VKM F-4519 (FW-2642)	JPKD01000228.1.region001	(1-43.063) <i>Edge</i>	Azanigeronas (BGC0001143)	AS-BS
<i>P. sp.</i> VKM F-4520 (FW-2644)	JPKE01001742.1.region001	(1-37.340) <i>Edge</i>	MonAzPs (BGC0000027)	AS-BS
<i>P. roseus</i> WSF 3629	KV454724.1.region001 / KV454762.1.region001	(1-28.884) <i>Edge</i> / (1-39.818) <i>Edge</i>	Asperfuranona (BGC0000022) / Asperfuranona (BGC0000022)	AS / AS-BS
<i>P. verrucosus</i> UAMH 10579	KV460206.1.region001	(1.046.681-1.117.559)	Azanigeronas (BGC0001143)	AS-BS
<i>P. verrucosus</i> FAE27	000047F.region001 (GymN)	(19.098-76.865)	MonAzPs (BGC0000027)	AS-BS

*: La denominación de cada BCA corresponde a la otorgada por antiSMASH en donde cada BGC lleva por nombre el *contig* donde se identificó y un número (#) asociado a la enumeración de este respecto a el posible resto de BGCs identificados en el mismo *contig* (i.e. region00#).

** AS: Identificado por AntiSMASH; BS: Identificado por BiG-SCAPE; AS-BS: Identificado por AntiSMASH y BiG-SCAPE.

En la cepa *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-3808 se identificaron dos BCAs, el clúster JPJR01000584.1.region001 y el clúster JPJR01001873.1.region001. El clúster JPJR01000584.1.region001 posee dos enzimas PKS y un conjunto de enzimas accesorias concordante con los descritos para los BGCs de síntesis de azafilonas. Además, este BGC fue identificado por ambas aproximaciones utilizadas, por lo que será considerado como BCA de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-3808. Por otro lado, el clúster JPJR01001873.1.region001 ubicado en el borde de un *contig* está compuesto por solo una enzima del tipo PKS trunca (Figura 14), que si bien posee similitud con las identificadas en los otros BCAs, por sí solo no es capaz de conformar un BGC candidato a sintetizar azafilonas. Es por ello que este clúster no se considerará para los siguientes análisis.

En la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13 se identificaron el clúster KV456276.1.region001 y el clúster KV456573.1.region001. En este caso, cada uno de ellos posee una sola enzima del tipo PKS, PKS-HR y PKS-NR, respectivamente. Además, ambos BCAs corresponden a *Edge* BGCs. Considerando estos datos, y al comparar la arquitectura y composición de estos BCAs con la de otros BCAs predichos en *Pseudogymnoascus*, se deduce que probablemente conformen un solo BCA que se encuentra fragmentado como artefacto del ensamble del genoma, por lo que serán considerados como un solo BCA para efecto de análisis posteriores (Figura 14).



Figura 14. Arquitectura de los BCAs identificados en *Pseudogymnoascus*. En rojo se señala las cepas en las que se identificaron dos BCAs de manera inicial. El borde de *contig/scaffold* es indicado con líneas rojas. **PKS-HR**: PKS altamente reductora; **PKS-NR**: PKS no reductora; **FAS**: Sintasa de ácidos grasos. Representación gráfica obtenida desde resultados de BiG-SCAPE, los colores indican la presencia de secuencias codificantes de diferentes dominios PFAM identificados.

Los dos BCA de la cepa *P. roseus* WSF3629, KV454724.1.region001 y KV454762.1.region001, corresponden ambos a *Edge* BGCs y cada uno de ellos posee solamente una enzima PKS, siendo PKS-HR y PKS-NR específicamente (Figura 14). Por tanto, probablemente estos dos clústeres conformen un solo BCA que se encuentra fragmentado como artefacto de ensamblaje del genoma, por lo que serán considerados como un solo BCA para efecto de análisis posteriores, de igual manera que ocurría en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13.

En la cepa *P. destructans* 20631-21 se identificaron dos BCAs, KV441426.1.region001 y KV441434.1.region001, conteniendo cada uno de ellos una única PKS (PKS-NR y PKS-HR). De acuerdo con los resultados de antiSMASH, ninguno de los dos BGCs corresponde a un *Edge* BGCs. Por otro lado, y de manera particular, estos dos BGCs poseen una densidad génica menor a la observada en los otros BCAs identificados en *Pseudogymnoascus* (Figura 14). Estos antecedentes permiten sugerir que estos BGCs podrían encontrarse distanciados genómicamente y pudiesen haber sufrido modificaciones en su arquitectura debido a eventos de movilidad génica dentro de las regiones donde se localizan, conllevando a una pérdida de genes que componen dichos BGCs. Para el efecto de posteriores análisis serán considerados como un solo BCA en la cepa *P. destructans* 20631-21.

Finalmente, el BCA identificado en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4513, JPJW01002357.1.region001, a pesar de ser identificado como BCA por antiSMASH, carece de la enzima principal del tipo PKS-NR (Figura 14), por lo que no se incluirá en los análisis posteriores.

De esta manera a partir de los 18 BCAs identificados inicialmente, bajo los criterios mencionados, para efectos de este análisis se considera la existencia de 13 BCAs distribuidos en 13 genomas de los 22 analizados, los cuales serán caracterizados en cuanto a su composición génica en comparación a los descritos en literatura.

1.2 Análisis de la composición génica de los BCAs identificados en el género *Pseudogymnoascus*

El metabolito sintetizado por un BGC es determinado por las enzimas principales que dan origen al núcleo de la molécula, y por el conjunto de enzimas accesorias que modificarán este núcleo mediante reacciones que definirán su estructura final. Con el objetivo de caracterizar los BCAs identificados en los genomas del género *Pseudogymnoascus* se analizaron de manera independiente las enzimas principales primarias y secundarias, y las enzimas accesorias que componen los clústeres.

1.2.1 Análisis de enzimas principales

En los clústeres descritos para la síntesis de azafilonas se observa que la enzima principal primaria que da origen al núcleo estructural de la molécula corresponde a una enzima del tipo PKS-NR. Para comparar las enzimas principales primaria del tipo PKS-NR en los BCAs de *Pseudogymnoascus* detectados con las presentes en los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas en otros géneros fúngicos, se realizó una filogenia mediante alineamiento de la secuencia aminoacídica de los dominios KS de la enzima principal del tipo PKS-NR (Lin y cols., 2012) (Figura 15.A). En las enzimas PKS el dominio KS tiende a ser el más conservado dentro de este grupo de enzimas, sin embargo, posee la suficiente variabilidad como para poder clasificarlos con relación a la naturaleza del metabolito sintetizado por la enzima (Kroken y cols., 2003). El árbol filogenético generado indica que los dominios KS presentes en las enzimas PKS pertenecientes al género *Pseudogymnoascus* conforman 6 clados (señalados en colores y números romanos).

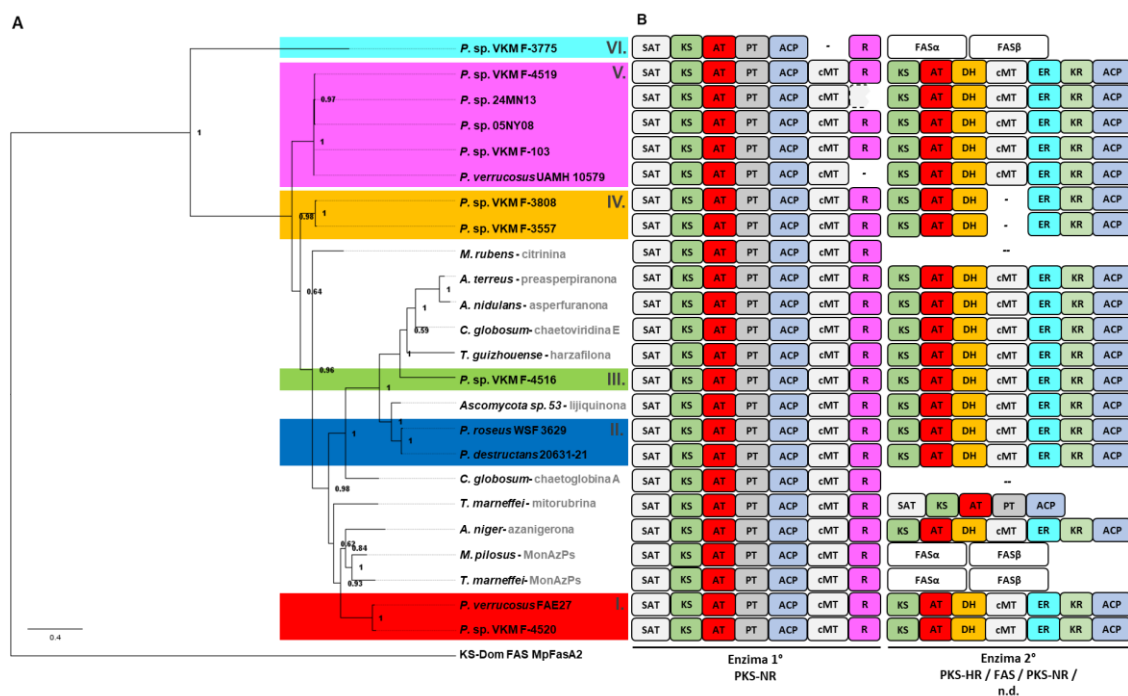


Figura 15. Filogenia de los dominios KS de las enzimas de tipo PKS-NR de BGCs asociados a la síntesis de azafilonas y arquitectura de los dominios catalíticos de sus enzimas principales. A. Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana de los dominios KS identificados en la enzima PKS-NR de cada BGC generado en base su secuencia aminoacídica. La probabilidad posterior bayesiana (BPP) se indican en los nodos. Los clados conformados por los BCAs identificados en *Pseudogymnoascus* se encuentran destacados en colores y enumerados en números romanos. La barra de distancia indica 0,4 cambios aminoacídicos por sitio. Como *outgroup* se empleó la secuencia aminoacídica del dominio KS de la enzima del tipo FAS MpFasA2. **B.** Arquitectura de los dominios catalíticos de las enzimas principales primarias y secundarias de cada clúster. NR-PKS: PKS no reductora; HR-PKS: PKS altamente reductora; SAT: Dominio iniciador ACP transacilasa; KS: Dominio ceto-sintasa; AT: Dominio acil-transferasa; PT: Dominio de templado de producto; ACP: Dominio de proteína portadora de acilos; cMT: Dominio de carbón metil-transferasa; R: Dominio reductor; DH: Dominio deshidratasa; ER: Dominio enoil-reductasa; KR: Dominio ceto-reductasa; FAS: Sintasa de ácidos grasos (subunidades α y β).

El clado I se encuentra conformado por los dominios KS identificados en *P. verrucosus* FAE27 y *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4520, y se agrupan con los identificados en las enzimas PKS-NR presentes en los BGCs para la producción de azanigerona y MonAzPs en *Aspergillus niger*, *Monascus pilosus* y *Talaromyces marneffeii*, respectivamente. El clado II es conformado por los dominios KS identificados en las cepas *P. roseus* y *P. destructans*, agrupándose con el dominio KS de la enzima PKS-NR presente en el BGC para la producción de lijquinona. El clado III compuesto solo por el dominio KS identificado en

Pseudogymnoascus sp. VKM F-4516 se agrupa con múltiples dominios KS de enzimas pertenecientes a los BGCs para la producción de harzafilona, chaetoviridina E, asperfuranona y preasperpiranona. Por último, los clados IV, V y VI se encuentran conformados por los dominios KS de las enzimas PKS-NR presentes en los BCA de cepas de *Pseudogymnoascus* únicamente. Es interesante hacer notar que estos tres clados se agrupan de manera independiente de los dominios KS de las enzimas PKS-NR descritas para la síntesis de azafilonas de otros géneros fúngicos.

Las enzimas PKS-NR caracterizadas para la síntesis de azafilonas pertenecen al grupo de las policétido sintetas no reductoras del tipo VII. Estas enzimas PKS poseen los dominios catalíticos SAT, KS, AT, PT, ACP, cMT (opcional), y R. Para complementar el análisis de los dominios KS de las enzimas PKS-NR de los BCA identificados, se analizó la composición de dominios de las enzimas PKS-NR en conjunto a las descritas para la síntesis de azafilonas (Figura 15.B). Como resultado, se observó que las enzimas cuyos dominios KS se agrupan en los clados I, II, III y IV poseen estos siete dominios en su arquitectura. Por otro lado, dos enzimas PKS-NR cuyo dominio KS se agrupan en el clado V, pertenecientes a las cepas *P. verrucosus* UAMH y *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13, carecen de dominios reductores de liberación (R). En particular, el extremo 3' de la región codificante para la enzima PKS-NR identificada en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13, se encuentra en borde del *contig* (Figura 14), implicando que la falta de este dominio podría ser debido a un artefacto producto del ensamble de dicho genoma. Por último, la enzima PKS-NR que contiene el dominio KS que conforma el clado VI, identificado en *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-3775, carece del dominio de metilación opcional.

Por otro lado, también se identificaron los dominios catalíticos de las enzimas principales secundarias de cada uno de los clústeres (Figura 15.B). La naturaleza de las enzimas secundarias puede corresponder a PKS-NR, PKS-HR o un par de enzimas del tipo FAS (subunidad α y β), observándose por lo tanto

mayor variabilidad. Como resultado, se obtuvo que las enzimas secundarias de los BCAs cuyos dominios KS se agrupa en los clados I, II, III y V corresponden a enzimas PKS-HR que poseen los dominios KS-AT-DH-cMT-ER-KR-ACP. En el caso de las enzimas secundarias de los BCAs cuyos dominios KS se encuentran en el clado IV, estas corresponden a enzimas PKS-HR con arquitectura KS-AT-DH-ER-KR-ACP. Finalmente, en el caso del BCA identificado en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. F-3775, como enzimas secundarias se observan dos enzimas del tipo FAS, subunidad α y β , al igual que en los clústeres descritos para la síntesis de MonAzPs en el género *Monascus* y *Talaromyces*.

1.2.2 Análisis de enzimas accesorias

Los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas son clústeres que poseen una alta variabilidad en cuanto a la composición de enzimas accesorias. Así, hay desde clústeres que presentan 3 enzimas accesorias, como el clúster propuesto en *Talaromyces marneffe* para la síntesis de mitorubrina, hasta clústeres que presentan 10 enzimas accesorias, como el clúster descrito en *Monascus pilosus* para la síntesis de MonAzPs. Esta alta variabilidad genera dificultades para determinar que enzimas codificadas en los BCAs detectados por antiSMASH participan de la biosíntesis de azafilonas. Por un lado, descartar genes que no presentan homólogos en otros BGCs similares puede llevar a la pérdida de enzimas clave en la ruta biosintética de un clúster en particular, como sería el caso del clúster descrito en *Chaetomium globosum*, en donde el gen codificante para la enzima halogenasa Cazi no presenta homólogos en el resto de BGCs descritos para la síntesis de azafilonas. Al contrario, considerar la totalidad de enzimas codificantes predichas por antiSMASH en estas regiones, puede implicar sobreestimar el número de genes involucrados en la ruta, ya que las reglas que definen los bordes de éstos en antiSMASH favorecen la inclusión de genes adyacentes a los clústeres.

Frente a este escenario, y para facilitar el análisis, se decidió analizar el conjunto de enzimas accesorias identificadas que presenten al menos una enzima ortóloga en el conjunto de BCAs descritos. Por otro lado, también se tomará en consideración la presencia de dominios PFAM en su secuencia, vinculables con rutas biosintéticas de metabolitos secundarios. Para la determinación de enzimas ortólogas se empleó el programa Proteinortho (v6.2.4). Este programa determina relaciones de ortología basadas en alineamiento, con un porcentaje de cobertura y similitud mínima para el establecimiento de dicha relación.

Como resultado de este análisis se obtuvo el *heatmap* mostrado en la Figura 16, en donde se observa que existen enzimas accesorias con un grado de conservación alto, como es el caso de las enzimas del tipo monoxigenasas dependientes de FAD (FAD-monox) y serina-hidrolasas (SH), presentes en el 87,5% y 79,2% de los clústeres analizados, respectivamente. Por otro lado, también existen enzimas accesorias cuya presencia se encuentra limitada a solo uno o dos clústeres. A continuación, se analizarán las enzimas accesorias de los BCAs conforme a los clados conformados en el análisis filogenético anterior (Figura 15).

El clado I, está compuesto por los BCAs identificados en *P. verrucosus* FAE27 y *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4520. Sin embargo, el BCA de *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4520 se encuentra fragmentado tanto por el extremo 5' como por el 3' (Figura 14), por lo que la probabilidad de que este clúster no se encuentre completo es alta. En este caso solo se analizará la composición del BCA identificado en *P. verrucosus* FAE27.

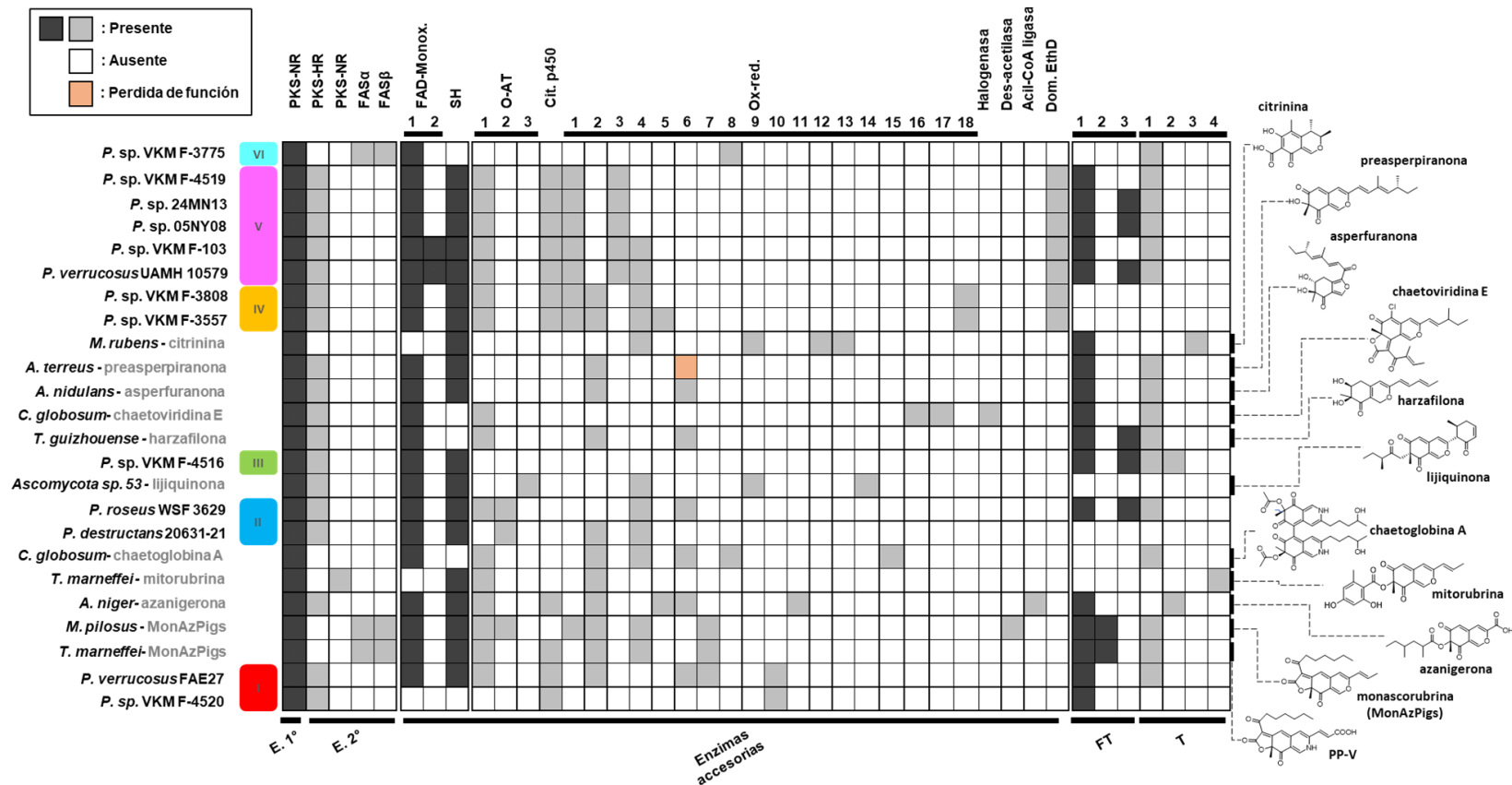


Figura 16. Composición enzimática de los BCAs identificados en *Pseudogymnoascus* y los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas. En la cuadrícula se observa la presencia o ausencia de las enzimas en los BCAs identificados y BGCs descritos para la síntesis de azafilonas. La coloración negra o gris significa presencia de dicho gen de igual manera, mientras que la coloración blanca implica ausencia de dicho gen en el BGC. Izquierda: Cepas que poseen los BCA y BGCs analizados; El orden corresponde al obtenido en el análisis filogenético del dominio KS de la enzima principal PKS-NR (Figura 15), al igual que los clados indicados con colores y números romanos. Inferior: Clasificación correspondiente a la enzima principal primaria (E. 1°), enzima principal secundaria (E. 2°) y enzimas accesorias. Adicionalmente, se incluyen factores de transcripción (FT) y transportadores (T) identificados en los clústeres. Superior: Clasificación de las enzimas identificadas en los clústeres. FAD-Monox: Monoxigenasa dependiente de FAD; SH: Serina-hidrolasa; O-AT: O-aciltransferasa; Cit. p450: Citocromo p450; Ox-red: Óxido-reductasa. Derecha: Para los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas se muestra la estructura del metabolito sintetizado.

Como se observa en la Figura 16, el clado I se encuentra cercano filogenéticamente a los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas en *Monascus pilosus*, *Talaromyces marneffeii* y *Aspergillus niger*. Como principales características del BCA identificado en *P. verrucosus* FAE27, se encuentra que posee enzimas accesorias en común con los BCAs de estas tres especies. Así, en común al BGC de azanigerona de *A. niger*, presenta como enzima principal secundaria una enzima PKS-HR y una enzima óxido-reductasa (Ox-red 6). Esta enzima Ox-red 6 no está presente en los BGCs para la síntesis de MonAzPs de *Talaromyces* y *Monascus*. Además, el BCA de *P. verrucosus* FAE27 posee una enzima citocromo P450 que se encuentra presente en los BGCs de *T. marneffeii* y *A. niger*, pero ausente en el BCA de *M. pilosus*. También, el BCA de *P. verrucosus* FAE27 posee una enzima oxido-reductasa (Ox-red. 7) que solo se encuentra presente en los BGCs para la síntesis de MonAzPs, vinculada a la formación de un anillo del tipo lactona en su estructura. Finalmente, el BCA de *P. verrucosus* FAE 27 posee una enzima oxido-reductasa (Ox-red. 10) que solo está presente en los clústeres de BCA del clado I.

El clado II, conformado por los BCA identificados en *P. destructans* y *P. roseus*, cercanos al BGC para la síntesis de lijiquinona, presentan múltiples diferencias entre sí. *P. roseus* por un lado posee dos enzimas del tipo O-aciltransferasa al igual que el BGC de MonAzPs de *M. pilosus*, mientras que *P. destructans* solo posee una O-aciltransferasa (O-AT 2), la cual solo se encuentra presente en el clado II y en *M. pilosus*. Adicionalmente, *P. destructans* posee una enzima óxido-reductasa (Ox-red. 2) ausente en *P. roseus* y *Ascomycota* sp. 53, mientras que *P. roseus* posee una enzima oxido reductasa (Ox-red. 6) ausente en *P. destructans* y en *Ascomycota* sp. 53.

El clado III compuesto por el BCA identificado en *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4516 posee solo dos enzimas accesorias en común con los BCA identificados en *Pseudogymnoascus* y en otros géneros, una enzima monoxigenasa dependiente de FAD y una enzima serina-hidrolasa. El BCA de

Pseudogymnoascus sp. VKM F-4516 presenta además diez proteínas a analizar que forman parte del clúster (datos no mostrados) que no poseen similitud con las descritas en este análisis. Para afirmar si estas proteínas pudiesen estar vinculadas a la síntesis de azafilonas o no, es necesario un análisis más detallado.

Los clados IV y V contienen BCAs que poseen particularidades en común respecto a los BCAs de otros géneros fúngicos. Primero, estos clados poseen en común una enzima citocromo P450 y una enzima oxido-reductasa (Ox-red. 1) que solo se encuentran presentes simultáneamente en estos clústeres. Además, estos BCA poseen una enzima que presenta un dominio EthD que no se encuentra presente en los BCA de los otros clados de *Pseudogymnoascus*. Particularmente, también destaca en el clado IV la presencia de una enzima oxido-reductasa (Ox-red. 18) ausente en el resto de los BCA analizados. Por último, el clado V destaca por poseer una enzima óxido-reductasa que solo está presente en este clado (Ox-red. 3).

El clado VI, conformado por el BCA presente en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-3775, destaca por ser el clúster más alejado del resto de los clústeres analizados. Este BCA posee como enzimas principales secundarias dos enzimas FAS que solo se encuentran en los BGCs para la síntesis de MonAzPs de *Monascus* y *Talaromyces*. Sin embargo, no comparte ninguna de las otras enzimas accesorias con estos clústeres. El BCA presente en *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-3775, al igual que el BCA de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4516 del clado III, posee cuatro proteínas que no presentan similitud con el resto de las enzimas analizadas, por lo que para ser vinculadas a la síntesis de azafilonas requieren de un análisis más exhaustivo. Por último, la enzima accesoria que si presenta similitud con otra de las enzimas presentes en BGCs descritos corresponde a la enzima óxido reductasa número 8 (Ox-red. 8) presente en el BGC para la síntesis de chaetoglobina A.

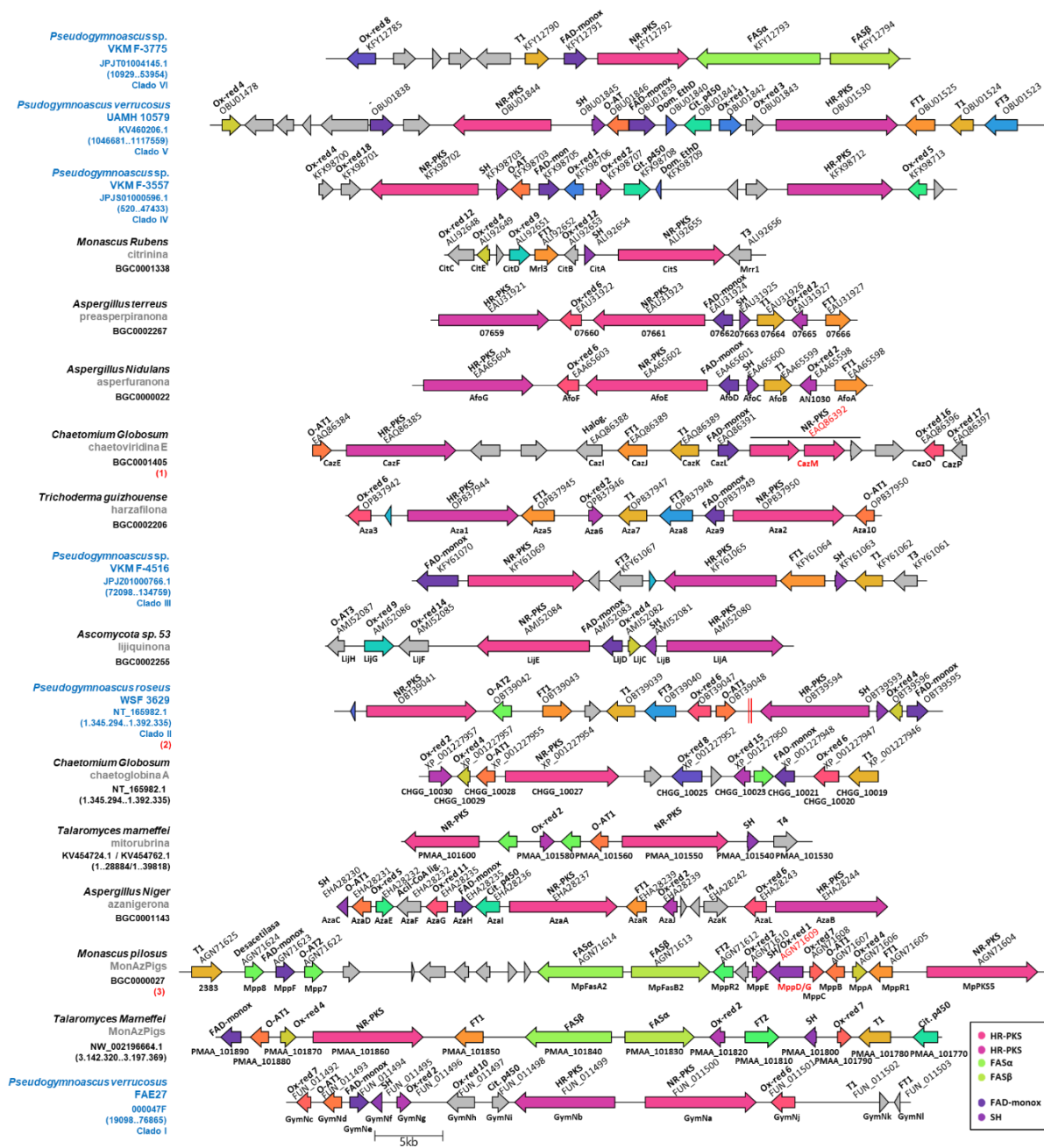


Figura 17. Arquitectura de los BCAs representativos de los 6 clados descritos en *Pseudogymnoascus* y de los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas en otros géneros fúngicos. Figura obtenida usando el programa Clinker (v1.1.0). La leyenda indica la coloración los genes codificantes para las enzimas principales primarias y secundarias, además de las enzimas del tipo FAD-monoxigenasa y serina-hidrolasa. La coloración de un mismo color indica una identidad mayor a un 35% con las enzimas codificadas en el resto de los clústeres, los genes en gris indican que la proteína codificada no posee una enzima con un porcentaje de identidad mayor al 35% con las enzimas codificadas en el resto de los clústeres. Para cada clado de los BCA identificados en *Pseudogymnoascus* se muestra un solo representante. (1) El gen codificante para la enzima CazM en el clúster BGC0001405 se encuentra erróneamente anotado, los 3 CDS indicados con línea negra conforman el CDS codificante para CazM. (2) En *Pseudogymnoascus roseus* se muestran los dos clústeres que conforman el BCA concatenados (unión con líneas rojas). (3) El CDS codificante para la enzima 2367B en *Monascus* se encuentra anotado erróneamente y codifica para dos enzimas, una enzima SH y una enzima Ox-red. 1.

De esta forma, los resultados del análisis de enzimas accesorias muestran concordancias con los obtenidos en el análisis de dominio KS de la enzima PKS-NR primaria, de manera que los BCAs de *Pseudogymnoascus*, dentro de un mismo clado, tienden a compartir la composición de enzimas accesorias.

Finalmente, el análisis de los dominios KS de las enzimas principales del tipo PKS-NR, junto a la descripción del conjunto de enzimas que conforman cada BCA, permite sugerir que en los genomas analizados de *Pseudogymnoascus* existen clústeres biosintéticos con la potencialidad de dar origen a 6 familias o clases estructurales de azafilonas distintas a las ya descritas (Figura 17).

1.3 Caracterización del clúster biosintético GymN para la síntesis de azafilonas en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

Para el estudio de la biosíntesis de azafilonas en la cepa *P. verrucosus* FAE27, se analizó el BCA identificado en su genoma, denominado clúster GymN. El clúster GymN, perteneciente al clado I de los BCA descritos en *Pseudogymnoascus*, tiene como enzimas principales una PKS-NR y una PKS-HR. Además, posee 8 enzimas accesorias, un transportador y un factor de transcripción (Figura 18). Las proteínas codificadas por los genes que componen el clúster GymN se detallan en la Tabla VIII. En esta Tabla también se incluyen los resultados obtenidos mediante BLASTP e InterPro-scan, análisis que fueron realizados con el fin de respaldar la función asignada de acuerdo con la clasificación observada en el análisis de enzimas accesorias de los BGC vinculados a la síntesis de azafilonas.

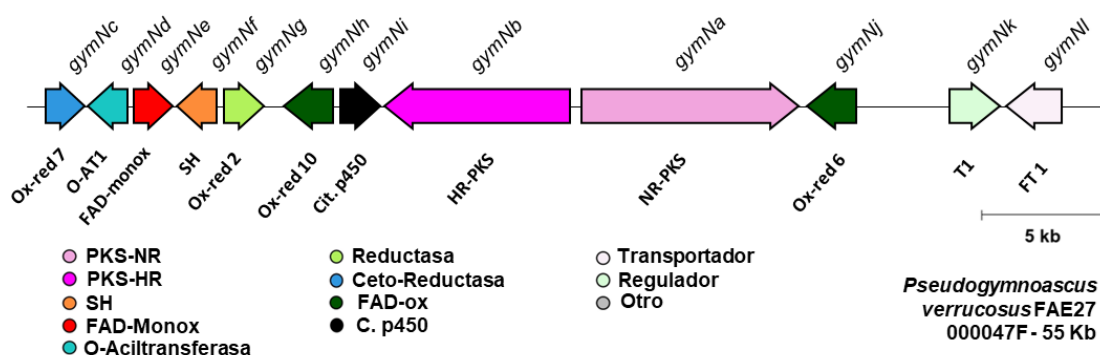


Figura 18. Arquitectura del clúster GymN de la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. Las funciones predichas de las proteínas codificadas en el clúster corresponden a la clasificación detallada en la Figura 16 Las funciones hipotéticas de estas proteínas se detallan en la Tabla VIII.

El alto grado de similitud en la composición génica que posee el clúster GymN con los descritos para la producción de pigmentos de tipo azafilona en *Monascus* y *Talaromyces*, sugiere que los pigmentos del tipo azafilona que sintetizaría el clúster GymN estarían estructuralmente relacionados con las azafilonas sintetizadas por estos dos géneros fúngicos.

Analizando en mayor profundidad los resultados de BLASTP, se observó que cuatro de las doce proteínas analizadas pertenecientes al clúster GymN tienen como primer resultado por BLASTP una proteína encontrada en una cepa fúngica de la especie *Hyphodiscus hymeniophilus*. En el estudio bibliográfico de azafilonas fúngicas realizado en los antecedentes, no se encontraron referencias a azafilonas aisladas desde cepas fúngicas pertenecientes al género *Hyphodiscus* (Gao y cols., 2013; Chen y cols., 2020, Pimenta y cols., 2021, Pavesi y cols., 2021). Sin embargo, en base a este resultado se buscaron específicamente, encontrándose una publicación del año 2020 en donde Kramer y cols. describieron el aislamiento de un compuesto estructuralmente similar a una azafilona denominado hiphodiscorubrina en conjunto a un posible clúster de biosíntesis (Figura 19) (Kramer y cols., 2020).

Tabla VIII. Composición de las proteínas codificadas en los genes del clúster GymN en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27.

Proteína	N° AA	Función predicha	BLASTP*	Número de acceso	Ident. (%)	Cover. (%)	E-value	InterPro
GymNa	2698	NR-PKS	<i>Conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase, Monascus pilosus.</i>	AGN71604.1	61,48	99,0	0.0	-
GymNb	2315	HR-PKS	<i>Highly reducing polyketide synthase, Hyphodiscus hymeniophilus.</i>	KAG0646234.1	58,52	99,0	0.0	-
GymNc	347	Aldo-cetoreductasa Ox-red.7	<i>Aldo-keto reductase, Pleurostoma richardsiae.</i>	KAJ9142955.1	53,43	99,0	2.00E-129	IPR023210-NADP-dependent oxidoreductase domain
GymNd	455	O-acetil transferasa O-AT1	<i>O-acetyltransferase, Hyphodiscus hymeniophilus.</i>	KAG0646383.1	68,15	98,0	0.0	IPR023213-Chloramphenicol acetyltransferase-like domain superfamily
GymNe	445	FAD-monoxigenasa FAD-monox	<i>FAD-dependent monooxygenase, Hyphodiscus hymeniophilus.</i>	KAG0646384.1	73,06	98,0	0.0	IPR002938-FAD-binding domain
GymNf	268	Serine-hidrolase SH	<i>Citrinin biosynthesis oxidoreductase CtnB, Pyrenophora teres f. maculata.</i>	CAA9959114.1	62,16	95,0	1.00E-112	IPR005645-Serine hydrolase FSH
GymNg	346	Enoil-reductasa Ox-red. 2	<i>Zinc-binding dehydrogenase, Colletotrichum limeticola.</i>	KAK0381543.1	58,81	99,0	2.00E-154	IPR047122-Trans-enoyl reductase-like
GymNh	644	FAD-oxidasa Ox-red. 10	<i>FAD binding domain-containing protein, Rutstroemia sp. NJR-2017a BBW.</i>	PQE20434.1	54,33	96,0	0.0	IPR006094-FAD linked oxidase
GymNi	368	Citocromo P450 Cit. p450	<i>Putative cytochrome P450 alkane hydroxylase, Stipitochalara longipes BDJ.</i>	KAE9362723.1	65,04	99,0	7.00E-171	IPR001128-Cytochrome P450
GymNj	482	FAD-oxidasa Ox-red. 6	<i>FAD-linked oxidoreductase, Hyphodiscus hymeniophilus.</i>	KAG0646385.1	55,6	94,0	7.00E-175	IPR006094-FAD linked oxidase
GymNk	216	Transportador T1	<i>MFS transporter, Aureobasidium subglaciale.</i>	KAI5207263.1	55,66	97,0	2.00E-76	IPR036259-MFS transporter superfamily
GymNI	119	Factor de transcripción TF1	<i>Citrinin biosynthesis transcriptional activator CtnR, Glonium stellatum.</i>	OCL02954.1	53,21	90,0	7.00E-31	no detectado

*: Como resultado de BLASTP se indicó el primer *hit* con una función asignada en su descripción.

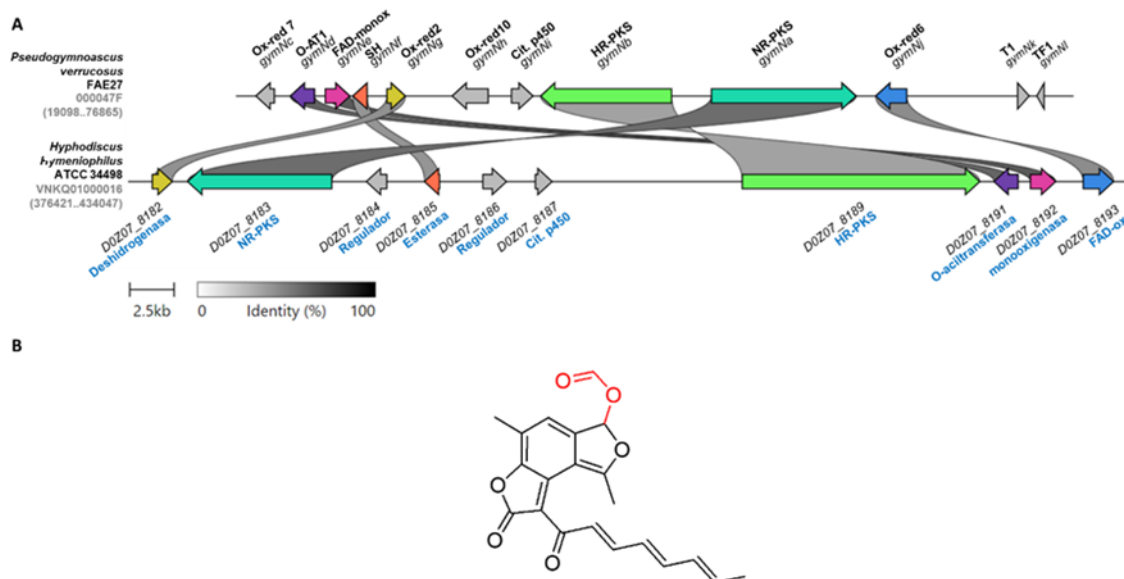


Figura 19. BGC candidato para la biosíntesis de hiphodiscorubrina en *Hyphodiscus hymeniophilus* ATCC 34498. A. Comparación del BGC descrito para la biosíntesis de hiphodiscorubrina en *Hyphodiscus hymeniophilus* con el clúster GymN de *P. verrucosus* FAE27. Genes con un mismo color indican la existencia de una similitud mayor a un 30% entre las enzimas que codifican. Los genes en gris indican que la proteína codificada no posee una enzima con un porcentaje de identidad mayor al 30% con las enzimas codificadas en el otro clúster. En la leyenda se indica el gradiente de color que da cuenta del porcentaje de identidad entre las enzimas codificadas. La nomenclatura y función de las enzimas del clúster de *Hyphodiscus* es la señalada en Kramer y cols., 2020. **B.** Estructura de la hiphodiscorubrina. En rojo se señala un grupo formiato cuyo origen es atribuido por los autores a una reacción ocurrida durante el proceso de purificación en presencia de ácido fórmico.

Al comparar los clústeres se observa que el BGC propuesto en *Hyphodiscus* contiene los genes codificantes para las enzimas clave de la síntesis del núcleo pirano-quinona, es decir, una enzima PKS-NR (D0Z07_8183) y una enzima FAD-monoxigenasa (D0Z07_8192). Por otro lado, al igual que el clúster GymN, contiene genes codificantes para enzimas del tipo PKS-HR (D0Z07_8189), serina-hidrolasa (D0Z07_8185), O-aciltransferasa (D0Z07_8191), Cit. P450 (D0Z07_8187) y dos enzimas oxido-reductasas (D0Z07_8182 y D0Z07_8193) (Figura 19. A). Al observar la estructura de la hiphodiscorubrina se ve que posee un núcleo del tipo furano-quinona, similar al presente en la estructura de la asperfuranona. Así, este biclico podría formarse de manera similar a como se describió para la biosíntesis de asperfuranona

(Figura 7), en donde una hidroxilación en el carbono C8 del intermediario acetaldehído, mediada por una enzima del tipo óxido reductasa (Ox-red. 6), facilitaría la ciclación en un anillo furano. Sin embargo, la presencia de Ox-red. 6 no es una condición suficiente para la formación del furano, ya que existen enzimas Ox-red. 6 en los clústeres para la síntesis de harzafilona, chaetoglobina A y azanigerona en *Trichoderma*, *Chaetomium* y *Aspergillus* respectivamente, azafilonas que tienen un biciclo pirano-quinona en su estructura. Por esta razón, a pesar de la presencia de una enzima del tipo Ox-red. 6 en el clúster GymN (GymNj), no es posible determinar bioinformáticamente que tipo de núcleo tendría la azafilona sintetizada por *P. verrucosus* FAE27.

Por otro lado, en la estructura descrita de la hiphodiscorubrina se observa una cadena de carbonos completamente insaturada, característica la cual es asociada por los autores a la función de la enzima PKS-HR codificada en este clúster (Kramer y cols., 2020). De igual manera, la presencia del gen *gymNb* en el clúster GymN, codificante para una enzima del tipo PKS-HR con un porcentaje de similitud aminoacídico del 58,68% con la enzima PKS-HR de *Hyphodiscus*, sugiere que las azafilonas sintetizadas por *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 podrían presentar de igual manera una cadena de carbonos insaturada.

2. Análisis funcional del clúster GymN para determinar si es el responsable de la síntesis de los pigmentos producidos por la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

Con el objetivo de asociar la función del clúster GymN con la producción de pigmentos en la cepa *P. verrucosus* FAE27, se planteó como estrategia el silenciamiento del gen *gymNa*, codificante para la enzima PKS-NR principal.

Para el silenciamiento del gen *gymNa* en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 se empleó la técnica de ARN de interferencia (Ullán et al., 2008). Esta técnica consiste en transformar la cepa con un plásmido que posee los elementos génicos necesarios para la generación de una molécula de ARN de doble hebra correspondiente a la secuencia de un fragmento del gen blanco a silenciar. Este ARN de doble hebra es utilizado por la maquinaria endógena de interferencia para mediar la degradación del transcrito del gen blanco (Anexo 5).

2.1 Construcción del plásmido de silenciamiento pJL-HNa

Para la construcción del plásmido de atenuación del gen *gymNa* se empleó como base el plásmido pJL-H (Oliva, 2018). El plásmido pJL-H posee el gen *hph* como marcador de resistencia contra higromicina, también posee dos promotores convergentes, *pGPD* y *pCBC*, cuya finalidad es dar origen a dos transcritos complementarios que conformaran una molécula de ARNd_h (Figura 20). Para la atenuación del gen *gymNa*, un fragmento de 413 pb del gen fue amplificado desde ADN genómico de la cepa *P. verrucosus* FAE27, utilizando los partidores GymNa-RNAi-Fw y GymNa-RNAi-Rv. La banda fue purificada desde gel de agarosa y posteriormente digerida con la enzima de restricción *Xba*I (los sitios de corte para la enzima *Xba*I del fragmento clonado fueron incorporados mediante PCR con los partidores GymNa-RNAi-Fw y GymNa-RNAi-Rv). A continuación, este fragmento fue clonado en el plásmido pJL-H, previamente digerido con la misma enzima, y transformado en *E. coli* DH5 α quimio-competentes para la

posterior selección de colonias transformantes con el plásmido ensamblado (Figura 20).

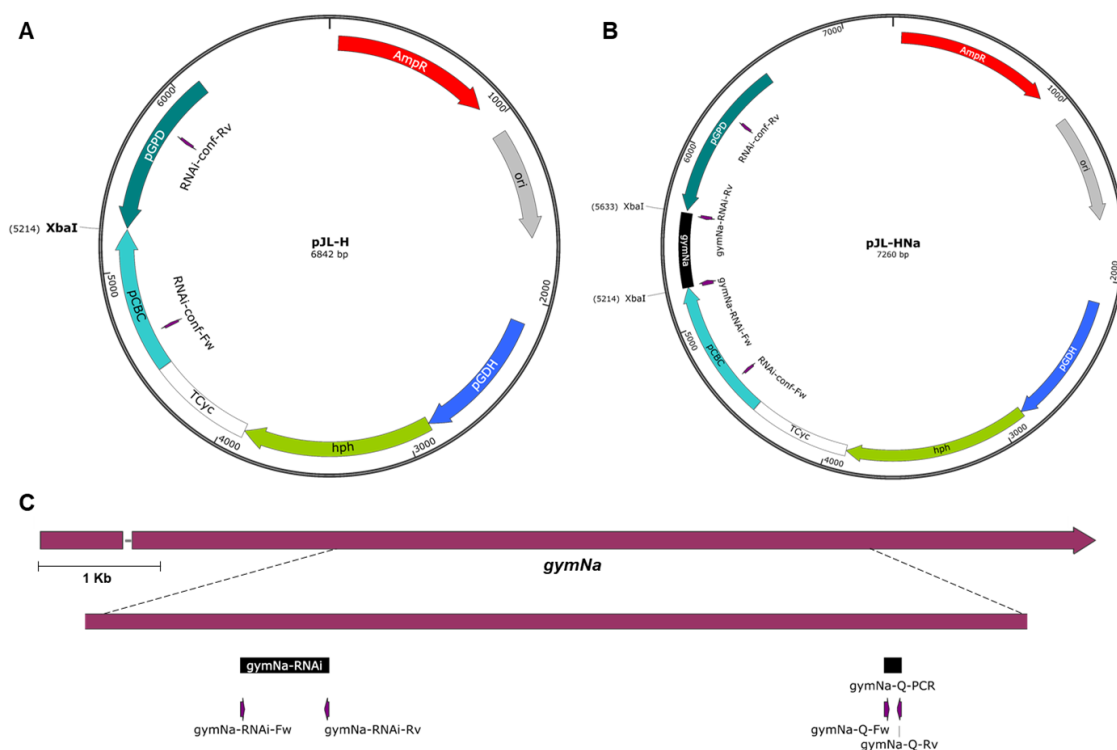


Figura 20. Esquema de la construcción del plásmido pJL-HNa para la atenuación del gen *gymNa*. **A.** Mapa del plásmido pJL-H; **B.** Mapa del plásmido pJL-HNa. **C.** Esquema del gen *gymNa* y regiones de amplificación de los pares de partidores *gymNa*-RNAi (425 pb) y *gymNa*-Q-PCR (80 pb). **pGDH:** Promotor de la enzima glutamato deshidrogenasa de *Aspergillus awamori*; **hph:** Higromicina-B 4-O-Quinasa; **TCYC:** Terminador de la enzima citocromo oxidasa de *S. cerevisiae*; **pCBC:** Promotor de la enzima n-isopenicilina sintasa de *Acremonium chrysogenum*; **pGPD:** Promotor de la enzima gliceraldehido fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*. **AmpR:** Cassette de resistencia a ampicilina; **ori:** Origen de replicación en *E. coli*.

2.2 Obtención de cepas con el gen *gymNa* atenuado

El plásmido pJL-HNa fue transformado en la cepa *P. verrucosus* FAE27 mediante transformación de protoplastos mediada por PEG (Díaz et al., 2019), metodología que fue desarrollada durante este trabajo de Tesis. Para la evaluación fenotípica de las cepas transformantes, aleatoriamente se seleccionaron 60 cepas a partir de 3 experimentos de transformación independientes. Estas cepas transformantes se crecieron en medio PDA

suplementado con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina por 14 días a 15 °C (Figura 21). De las 60 cepas analizadas, 8 presentaron una completa interrupción en la producción de pigmentos rojos (13,3%), mientras que el resto (86,7%) presentó un fenotipo de pigmentación similar a la cepa nativa. De manera aleatoria las cepas THNa 2.1, THNa 3.17, THNa 4.20 (cepas blancas carentes de pigmentación), y las cepas THNa 3.13 y THNa 4.15 (cepas rojas con pigmentación) fueron seleccionadas para una posterior caracterización.

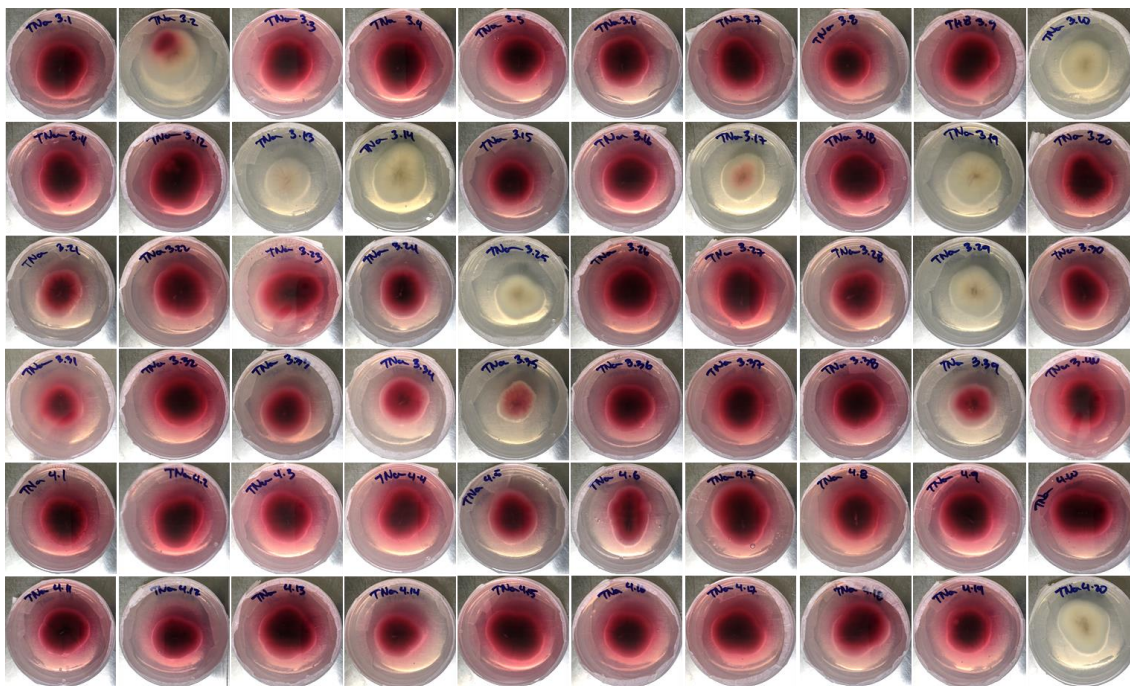


Figura 21. Cepas transformantes de *P. verrucosus* FAE27 con el plásmido pJL-HNa. Se muestra el reverso de las placas para apreciar la coloración del agar. Cultivo en medio PDA suplementado con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina e incubado por 14 días a 15°C.

Por otro lado, también se transformó la cepa *P. verrucosus* FAE27 con el plásmido pJL-H, con el fin de tener un control de la transformación con el plásmido vacío. Para la evaluación fenotípica de las cepas transformantes en este caso, se seleccionaron un total de 30 cepas de manera aleatoria. De las 30 cepas analizadas, ninguna presentó defectos en la pigmentación (Figura 22). De manera aleatoria, las cepas TH 3.3 y TH 4.6 fueron seleccionadas para la posterior caracterización.

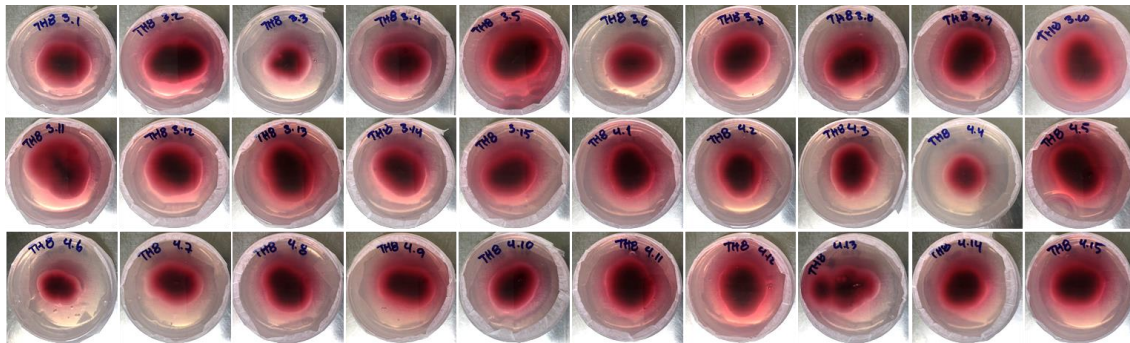


Figura 22. Cepas transformantes de *P. verrucosus* FAE27 con el plásmido pJL-H. Se muestra el reverso de las placas para apreciar la coloración del agar. Cultivo en medio PDA suplementado con 40 μ g/mL de higromicina, e incubado por 14 días a 15°C.

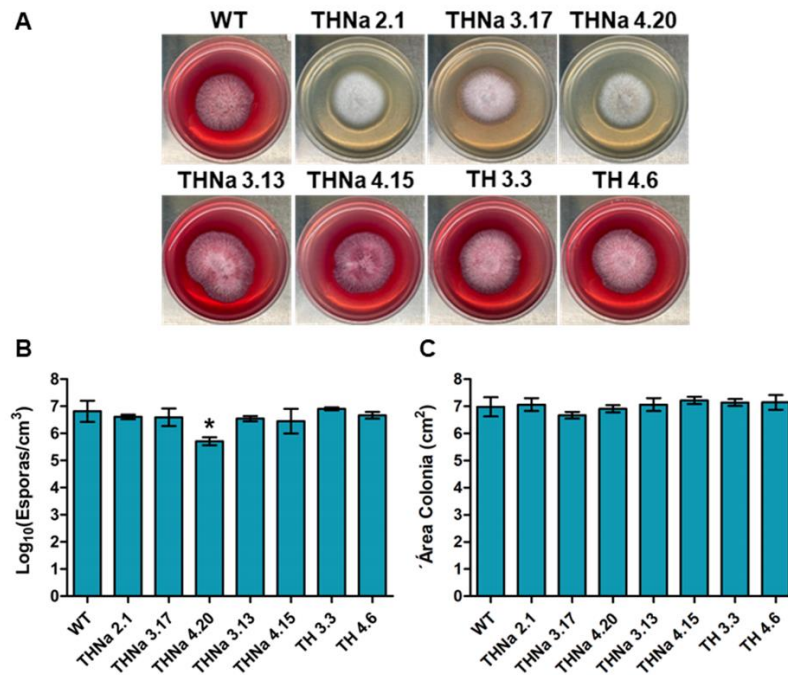


Figura 23. Caracterización fenotípica de las cepas transformantes de *P. verrucosus* FAE27 con los plásmidos pJL-HNa y pJL-H. **A:** Morfología de las colonias en medio PDA; **B:** Cuantificación de la esporulación (n=3); **C:** Determinación del área de colonia (n=3). El cultivo de las cepas para todos los experimentos se realizó en medio PDA, incubando por 14 días a 15 °C. Las barras indican desviación estándar; * indican diferencia estadísticamente significativa en comparación a la cepa WT (P < 0.05 empleando test ANOVA y Tukey).

La cepa nativa (WT) y las siete cepas seleccionadas fueron caracterizadas fenotípicamente (Figura 23). Morfológicamente, tanto la cepa nativa como las cepas transformantes con ambos plásmidos no presentaron diferencias fenotípicas, aparte de la pigmentación, en el desarrollo de la colonia (Figura 23.A), esporulación (Figura 23.B) o área de la colonia (Figura 23.C).

La integración de los correspondientes plásmidos en el genoma de las cepas transformantes se comprobó mediante PCR utilizando los partidores RNAi-conf-Fw y RNAi-conf-Rv. En las siete cepas transformantes se corroboró la integración de los cassette de interferencia correspondientes de los plásmidos pJL-HNa y pJL-H (Figura 24.A). La cuantificación de los niveles de transcrito del gen *gymNa* se realizó por qRT-PCR con los partidores *gymNa*-q-Fw y *gymNa*-q-Rv. Como resultado de este análisis cuantitativo, se obtuvo que las cepas transformadas con el plásmido pJL-HNa presentaron una disminución del transcrito relativo mayor al 59,2%, y de estas, solo las cepas con una disminución mayor al 97,3%, las cepas THNa 2.1, THNa 3.17 y THNa 4.20, presentaron un fenotipo carente de pigmentación. Las cepas transformantes con el plásmido vacío no presentaron diferencias significativas respecto a la cepa nativa (Figura 24.B).

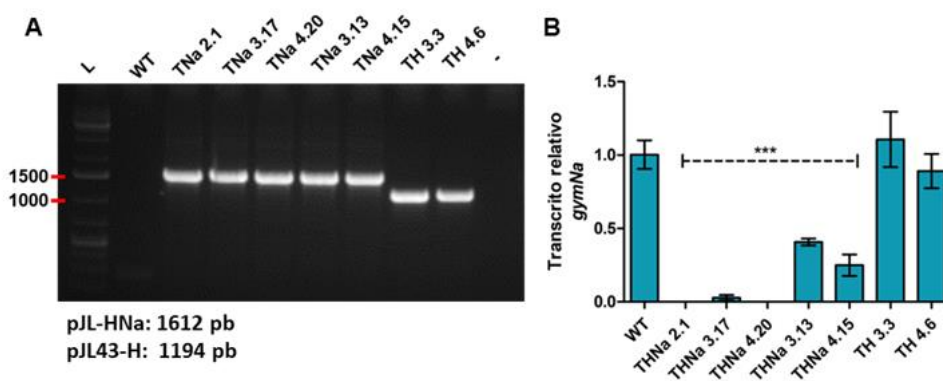


Figura 24. Caracterización molecular de las cepas transformantes de *P. verrucosus* FAE27 con los plásmidos pJLH-Na y pJL-H. A. Corroboración por PCR de la integración de los plásmidos pJL-HNa y pJL-H en el genoma en las cepas respectivas (amplificación pJL-HNa: 1612 pb; amplificación pJL-H: 1194 pb); L: Marcador de peso molecular 1 Kb plus; -: Control negativo (sin ADN templado); **B:** Cuantificación del nivel de transcrito relativo del gen *gymNa* mediante qRT-PCR. Los valores se encuentran normalizados respecto a la cepa nativa (WT). *** indican diferencia estadísticamente significativa en comparación a la cepa WT ($P < 0.0001$ empleando test ANOVA y Tukey).

2.3 Identificación de los pigmentos sintetizados por el clúster GymN

Confirmada la atenuación del gen *gymNa*, y con el objetivo de identificar que metabolitos pigmentados estarían asociados a la función del gen *gymNa*, se procedió a analizar los metabolitos sintetizados por la cepa nativa y las cepas atenuantes.

El análisis de la composición de los extractos se realizó mediante la comparación de perfiles cromatográficos en HPLC-DAD. Al analizar los perfiles a 254 nm no se observa un evidente cambio en el perfil de metabólicos observado entre la cepa nativa y las cepas TH3.3, TH4.6, THNa 2.1, THNa 3.17 y THNa 4.20 (Figura 25.A). En las cepas THNa 3.13 y THNa 4.15 se observa el incremento de un pico con RT 15,10 min con respecto a la cepa nativa y otras cepas transformantes que posee un espectro UV con máximos de absorción en 251 y 304 nm (Figura 26). De igual manera se observa en las transformantes TH3.3 y TH4.6 un pico con RT 25,98 min y espectro UV con máximos en 271, 281 y 294 nm, correspondiente a ergosterol (Figura 26).

Al analizar los perfiles a 530 nm se observa la ausencia total de compuestos que absorben a esta longitud de onda en los extractos de las cepas THNa 2.1, THNa 3.17 y THNa 4.20 (Figura 25.B), lo que concuerda con el fenotipo albino de estas cepas. Por otro lado, y acorde a los menores niveles de transcrito del gen *gymNa*, se observa una disminución parcial de la intensidad de los compuestos que absorben a 530 nm en las cepas THNa 3.13 y THNa 4.15. En cuanto a las cepas control TH 3.3 y TH 4.6, presentaron un perfil de metabolitos que absorben a 530 nm similar al observado en la cepa nativa. Al analizar en más detalle los picos con tiempo de retención 12,61, 12,83, 13,83, 14,07 y 17,70 min se observa que poseen en común un máximo de absorción entre los 530 y 540 nm (Figura 27).

En su conjunto estos resultados sugieren que el clúster biosintético GymN es responsable de la biosíntesis de una familia de metabolitos con máximos de absorbancia cercano a los 535 nm y, por lo tanto, que presentan una coloración roja.

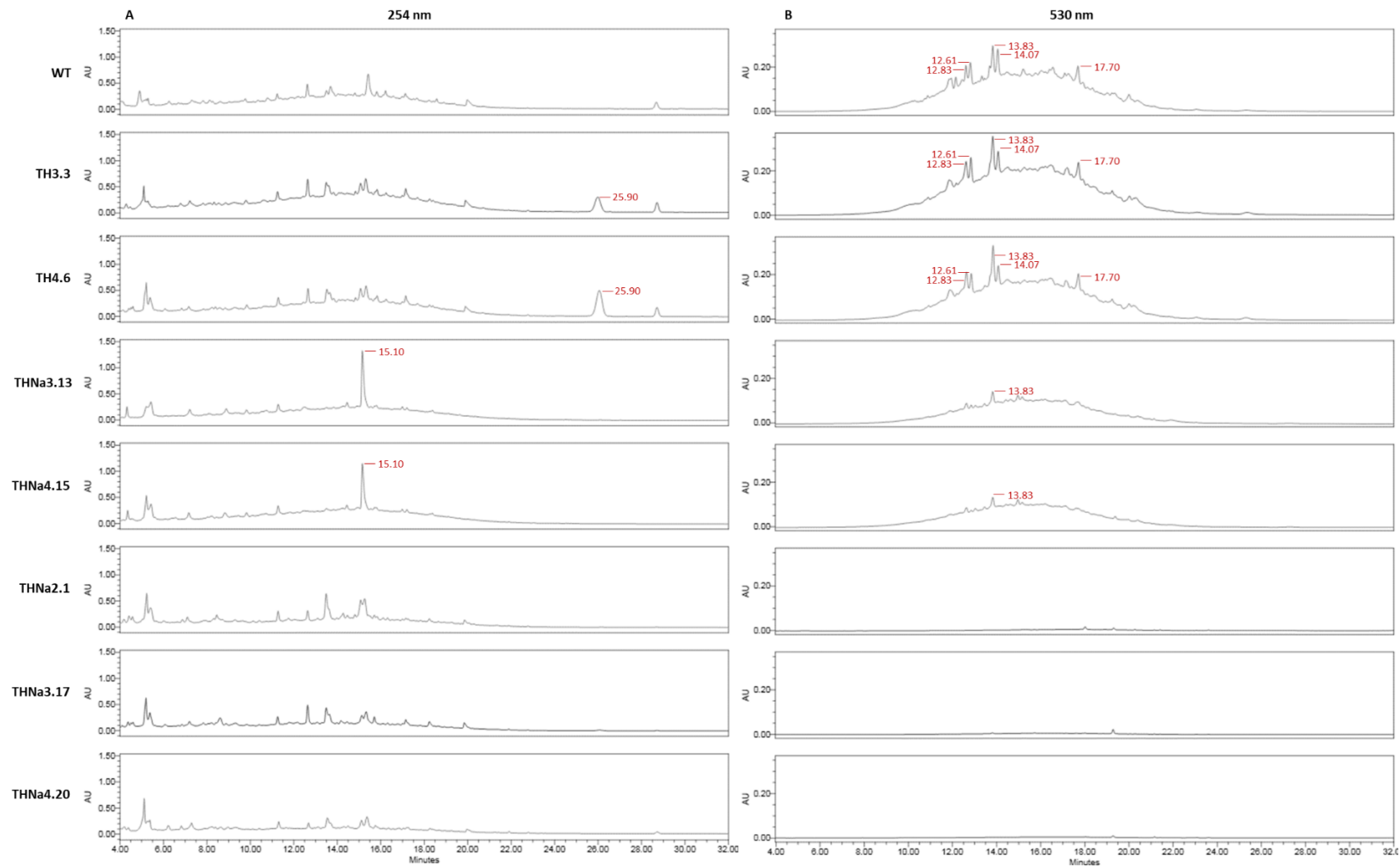


Figura 25. Cromatogramas a 254 y 530 nm del análisis por HPLC-DAD de los extractos obtenidos desde la cepa nativa y transformantes de *P. verrucosus* FAE27. Los tiempos de retención de los compuestos de interés son señalados en rojo. (A) Cromatogramas a 254 nm; (B) Cromatogramas a 530 nm. Nótese la ausencia de compuestos que absorben a esta longitud de onda en las cepas transformantes blancas (THNa2.1, THNa3.17 y THNa4.20).



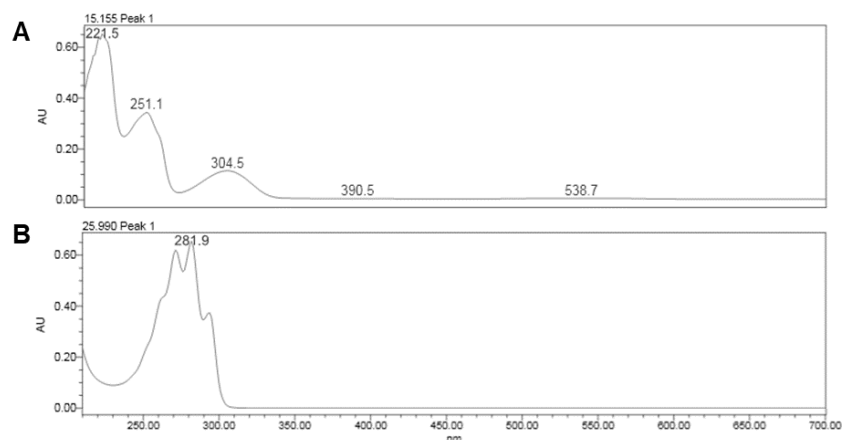


Figura 26. Espectros de UV-visible de los compuestos que se encuentran presentes de forma diferencial en los extractos de las cepas transformantes analizadas a 254 nm. A. Espectro de UV-visible del compuesto con RT 15,1 presente en los extractos de las cepas THNa 3.13 y THNa 4.15. **B.** Espectro de UV-visible del compuesto con RT 25,9 presente en los extractos de las cepas TH3.3 y TH4.6. Este espectro, y su tiempo de retención en las condiciones cromatográficas empleadas, es concordante con el ergosterol.

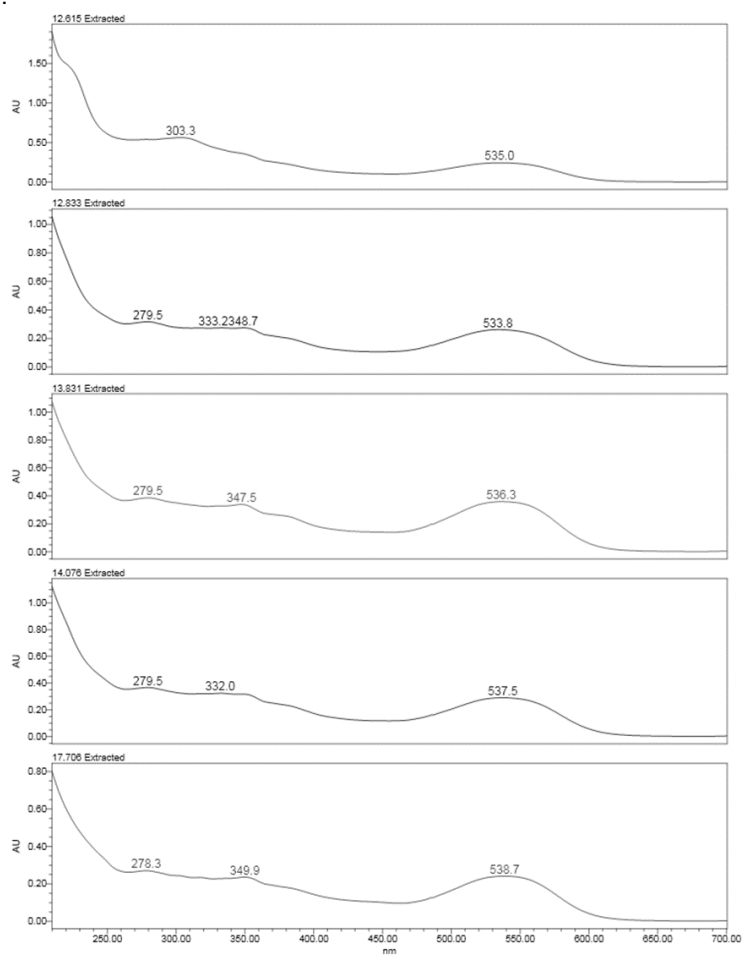


Figura 27. Espectros UV-visible de compuestos asociados a la expresión del gen *gymNa*. Destáquese los máximos de absorción entre 530 y 540 nm, indicadores de coloración rojiza.

3. Elucidación de la naturaleza química de los pigmentos producidos por la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

Con objetivo de confirmar la naturaleza química de los pigmentos sintetizados por el clúster GymN en la cepa *P. verrucosus* FAE27, se propuso llevar a cabo la purificación de, a lo menos, uno de estos pigmentos y llevar a cabo su elucidación estructural.

3.1 Identificación de pigmentos candidatos para la purificación

Para identificar los pigmentos asociados a la expresión del gen *gymNa* se realizaron análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-DAD-MS/MS). Como primera aproximación, se creció la cepa *P. verrucosus* FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 en medio PDA, observándose la característica pigmentación roja en el caso de la cepa nativa, y albina en el caso de la transformante (Figura 28.A). Al igual que en el análisis anterior, se observó que en los extractos de la cepa THNa2.1 desaparecen los compuestos con absorbancia a 530 nm (Figura 28.B-C). Al analizar el BPC (Base Peak Chromatogram) de esta separación cromatográfica, no se observaron diferencias significativas en la región de interés, es decir entre los tiempos de retención 2-5 min que es donde eluyen los compuestos con absorbancia a 530 nm (Figura 28.D). Esto implicaba que, en los extractos de ambas cepas, se ionizaron prácticamente los mismos compuestos en la misma intensidad, no pudiendo identificar el m/z de ningún compuesto producido diferencialmente. Al realizar un análisis pormenorizado, compuesto por compuesto, a lo largo de todo el cromatograma, la única diferencia significativa que se encontró fue la existencia

de un compuesto con RT 3,73 min y m/z 367,1369 que se encuentra en menor cantidad en los extractos de la cepa THNa2.1 (Figura 29).

Este resultado evidenció que intentar aislar los pigmentos desde extractos obtenidos de cultivos en medio PDA era muy complejo debido a la cantidad de compuestos que se producen y eluyen en los mismos tiempos que los compuestos coloreados. Si bien se observa una intensa coloración roja en los extractos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 en PDA, esta parece estar dada por múltiples metabolitos que absorben a 530 nm, que coeluyen entre los 2 y 5 min, y que presentan una baja absorción (y por tanto cantidad). Ello impide la obtención de picos cromatográficos definidos y aislados que permitan la purificación.

Estructuralmente las azafilonas poseen un heterociclo del tipo pirano-quinona altamente susceptible a la aminación. Esto implica que, en medios complejos, en donde existe una alta abundancia de moléculas con aminas primarias en su estructura, la ramificación de la vía de biosíntesis de azafilonas por aminación de todos los intermediarios con distintas aminas, conlleva a una alta diversidad de compuestos que absorben sobre los 500 nm (Tolborg y cols., 2020). Con el fin de obtener un extracto con una menor diversificación de compuestos de la ruta de azafilonas, se creció tanto la cepa nativa como la cepa transformante THNa2.1 en medio Czapek Dox suplementado con almidón de papa (Cz-S). El medio Czapek corresponde a un medio definido simple (carente de aminas), no empleado usualmente para el aislamiento de MS, por lo que se suplementó con almidón, uno de los principales componentes del medio PDA en el cual se observa una inducción de la pigmentación en medio sólido en la cepa *P. verrucosus* FAE27.

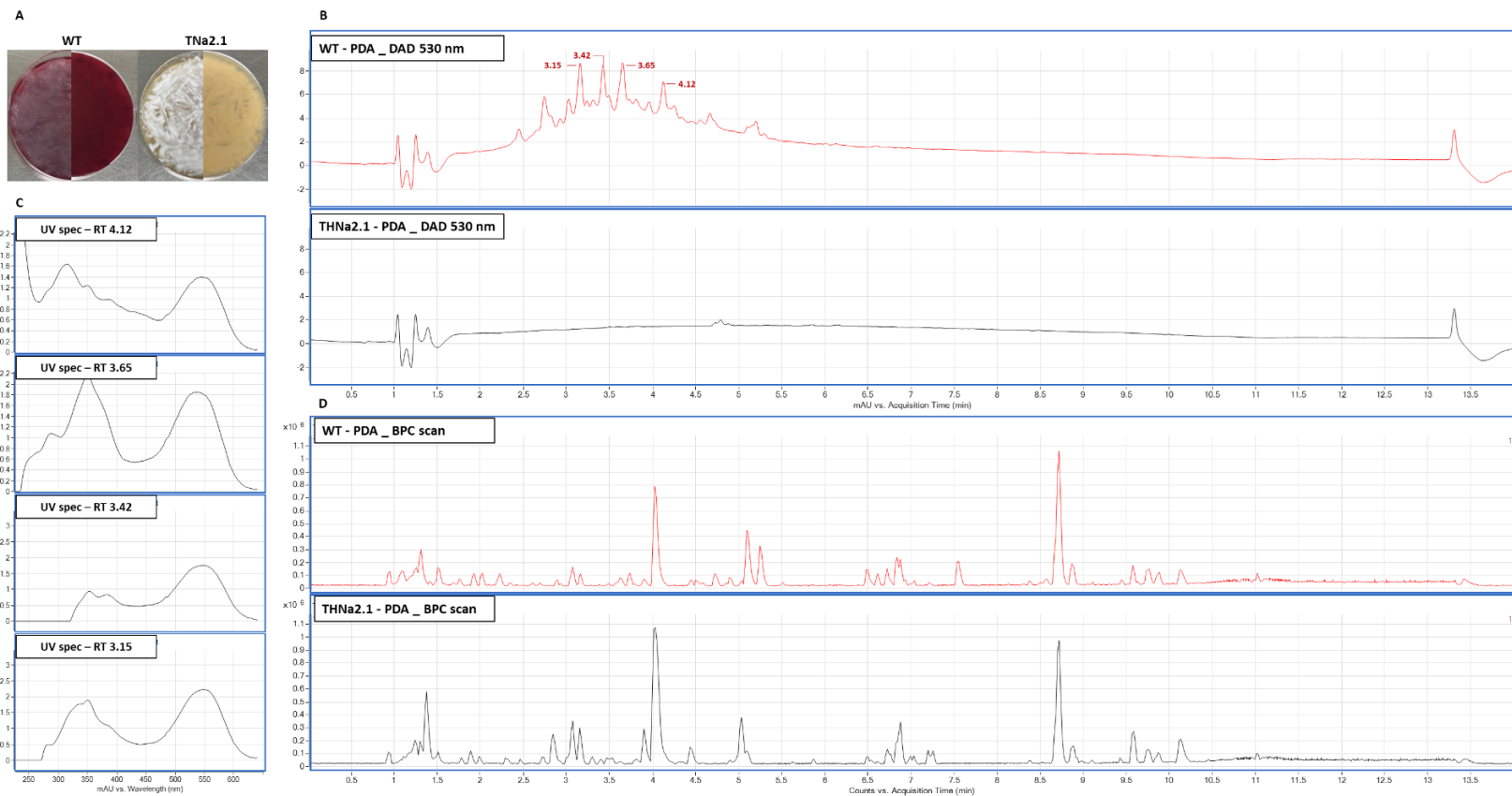


Figura 28. Caracterización por HPLC-DAD-MS/MS de los extractos obtenidos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 cultivadas en medio PDA. A. Anverso y reverso de placas de la cepa *P. verrucosus* FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 en medio PDA, tras el cultivo a 15°C por 15 días; **B.** Cromatograma a 530 nm de los extractos obtenidos de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 en medio PDA. Se destacan en rojo los tiempos de retención algunos compuestos de interés producidos únicamente por la cepa *P. verrucosus* FAE27; **C.** Espectros UV-visible de los compuestos destacados en (B). Obsérvese la presencia de máximos de absorción entre los 500 y 600 nm. **D;** Cromatograma de pico base (BPC, Base Peak Chromatogram) del análisis de masas de los extractos. En la parte superior se muestra el BPC del extracto obtenido de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27, y en la parte inferior el BPC del extracto obtenido de cultivos de la cepa transformante THNa2.1.

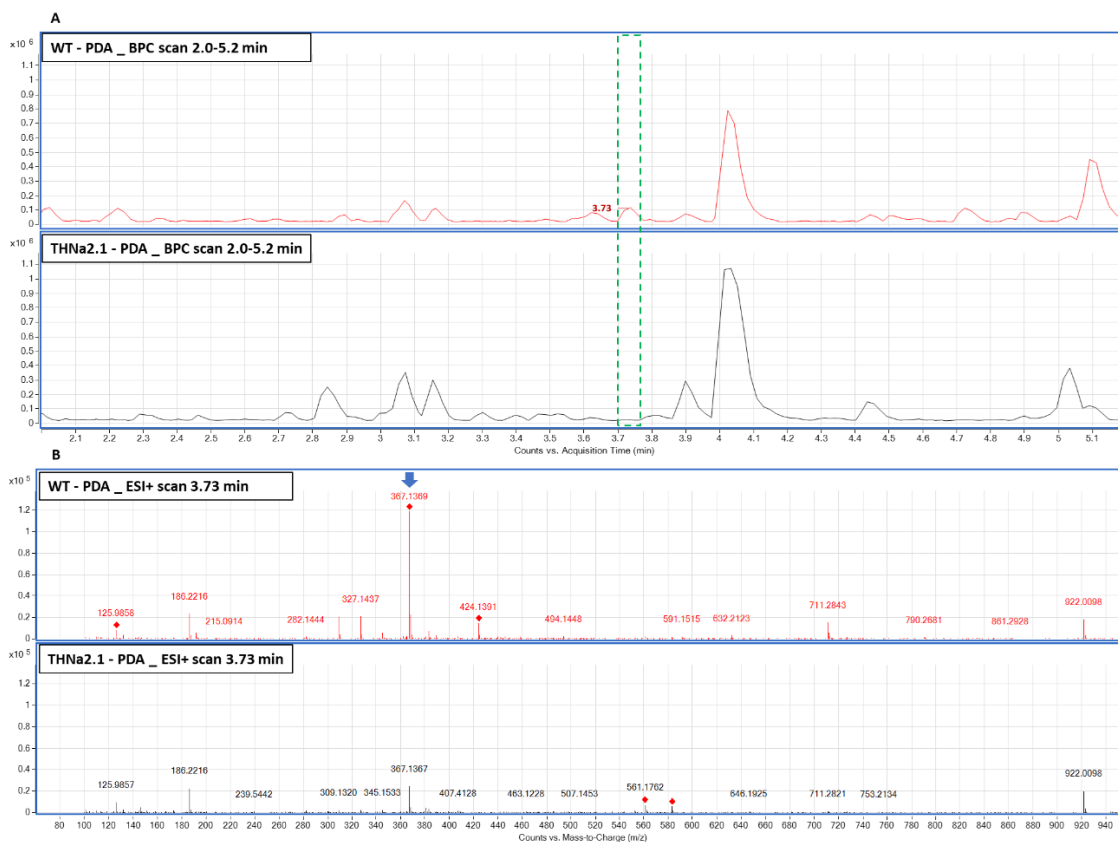


Figura 29. Identificación de los metabolitos candidatos a ser sintetizados por el clúster GymN por comparación de los cromatogramas de pico base (BPCs) y espectro de masas (modo positivo) de los extractos obtenidos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 cultivadas en medio PDA. A. BPCs de la región comprendida entre los tiempos de retención 2,0-5,2 min. En la parte superior se muestra el BPC del extracto obtenido de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 (WT), y en la parte inferior el BPC del extracto obtenido de cultivos de la cepa transformante THNa2.1. Se destaca en un cuadro verde el compuesto de interés, con un tiempo de retención de 3,73 minutos, el cual está presente en el extracto de la cepa nativa, pero ausente en la cepa transformante. **B.** Espectros de masas en modo positivo al tiempo de retención 3,73 min. En la parte superior se muestra el espectro del extracto obtenido de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 (WT), y en la parte inferior el espectro del extracto obtenido de cultivos de la cepa transformante THNa2.1. Se destaca con una flecha azul el ión m/z 367,1369 como mayoritario en el extracto de la cepa WT. Los rombos rojos indican que el correspondiente ión posee datos de fragmentación.

Como resultado de crecer la cepa nativa y atenuante en medio Czapek Dox suplementado con almidón, se observó en una primera instancia una pigmentación café tanto en el micelio como en el agar de la cepa nativa. Por el contrario, en la cepa transformante esta pigmentación está mucho muy atenuada (Figura 30.A). Al analizar los extractos obtenidos desde estas placas en HPLC-DAD-MS/MS, se observó, en el cromatograma de HPLC de la cepa nativa, la

presencia de dos compuestos con tiempos de retención 6,68 min y 7,75 min y máximos de absorción cercanos a 450 nm. Estos dos compuestos estaban ausentes en el cromatograma de la cepa transformada (Figura 30. B-C).

Al analizar los cromatogramas de pico de base correspondientes a la región entre 6 y 9 min de tiempo de retención, no se observó ningún pico mayoritario a los tiempos de retención 6,68 y 7,75 min, indicando que los compuestos que eluyen a estos tiempos no presentan buena ionización. Sin embargo, al examinar los iones presentes en cada uno de estos tiempos de retención, se lograron identificar 4 iones que se encuentran presentes en el extracto de la cepa nativa y prácticamente desaparecen en el extracto de la cepa transformante. En concreto, estos iones son: el ion m/z 385,2489 en el tiempo de retención 6,74 min, y los iones m/z 427,2591, m/z 449,2404 y m/z 501,3918 en el tiempo de retención 7,83 min (Figura 31). La diferencia de masa entre los iones m/z 427,2591 y m/z 449,2404 sugiere que uno corresponde a $[M+H]^+$ y el otro a $[M+Na]^+$, siendo por lo tanto dos iones de un mismo compuesto con masa M .

Por último, se compararon los espectros de fragmentación MS/MS de los iones candidatos identificados tanto en los extractos obtenidos desde cultivos en medio PDA como en los obtenidos desde cultivos en medio Cz-S. Si dos compuestos forman parte de una misma familia, al fragmentarse, presentarán iones comunes que corresponden a las partes estructurales comunes que poseen esos compuestos. De este modo, únicamente se observó un patrón de fragmentación similar entre los iones m/z 385,2489 y m/z 427,2591 (Anexo 6).

En su conjunto, estos resultados sugieren que los iones m/z 385,2489 y m/z 427,2591, identificados en extractos de cultivos en medio Cz-S, son candidatos a pertenecer a la familia de pigmentos sintetizados por el clúster GymN.

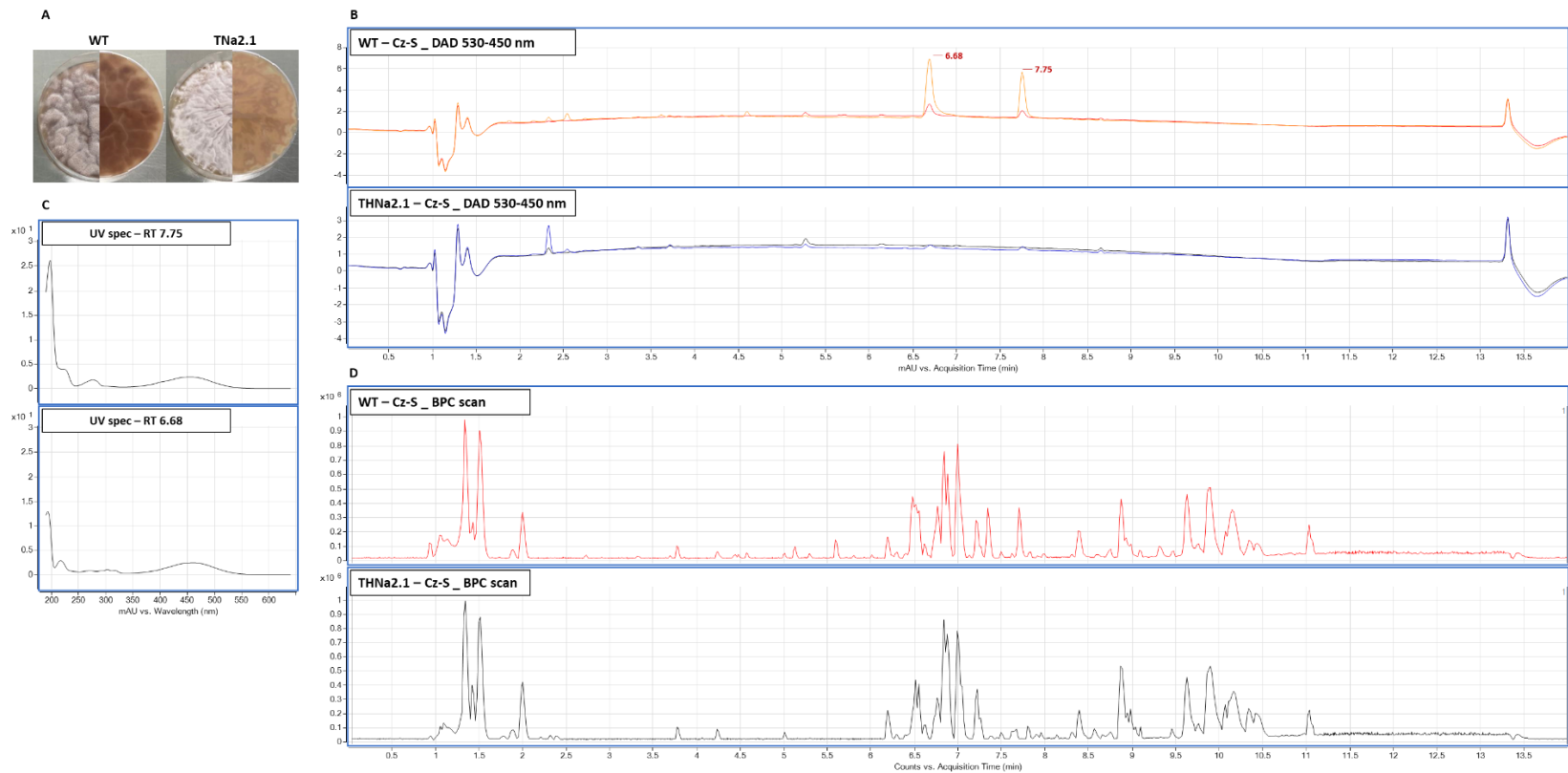


Figura 30. Caracterización por HPLC-DAD-MS/MS de los extractos obtenidos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 cultivadas en medio Cz-S. A. Anverso y reverso de placas de la cepa *P. verrucosus* FAE27 y THNa2.1 en medio sólido Cz-S, tras el cultivo a 15°C por 15 días; **B.** En la parte superior se muestran los cromatogramas a 530 (rojo) y a 450 (naranja) nm de los extractos obtenidos de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27. En la parte inferior se muestran los cromatogramas a 530 (negro) y a 450 (azul) nm de los extractos obtenidos de cultivos de la cepa transformante THNa2.1. Se destacan en rojo los tiempos de retención de dos compuestos de interés producidos únicamente por la cepa nativa; **C.** Espectros UV-visible de los compuestos destacados en (B). **D.** Cromatograma de pico base (BPC, Base Peak Chromatogram) del análisis de masas de los extractos. En la parte superior se muestra el BPC del extracto obtenido de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27, y en la parte inferior el BPC del extracto obtenido de cultivos de la cepa transformante THNa2.1.

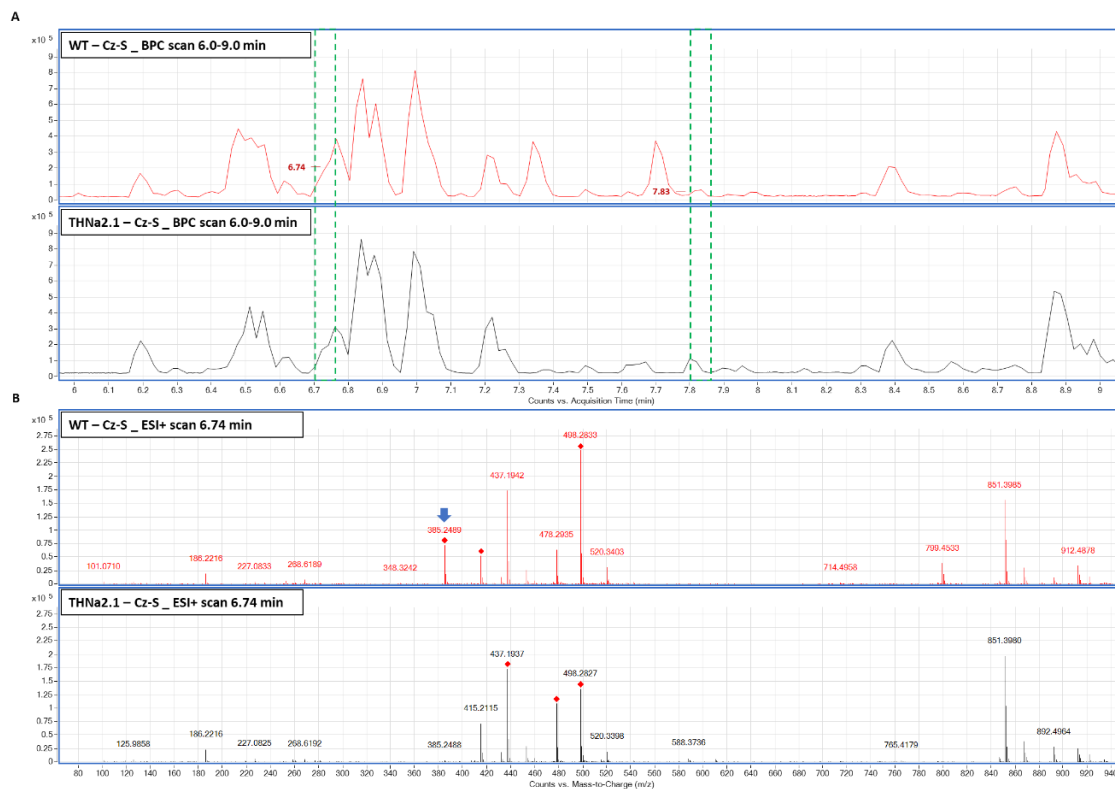
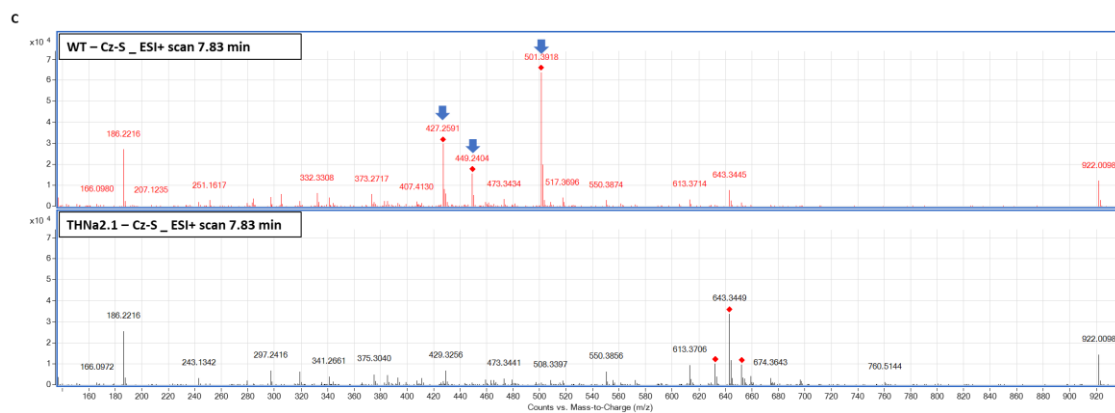


Figura 31. Identificación de metabolitos candidatos a ser sintetizados por el clúster GymN por comparación de los cromatogramas de pico base (BPC) y espectro de masas (modo positivo) de los extractos obtenidos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 y la cepa transformante THNa2.1 cultivadas en medio Cz-S. A. BPCs de la región comprendida entre los tiempos de retención 6,0-9,0 min. En la parte superior se muestra el BPC del extracto obtenido de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 (WT), y en la parte inferior el BPC del extracto obtenido de cultivos de la cepa transformante THNa2.1. Se destacan con cuadros verdes las regiones de interés a tiempos de retención 6,74 y 7,83 min; **B.** Espectros de masas en modo positivo al tiempo de retención 6,74 min. En la parte superior se muestra el espectro del extracto obtenido de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 (WT), y en la parte inferior el espectro del extracto obtenido de cultivos de la cepa transformante THNa2.1. Se destaca con una flecha azul el ión m/z 385,2489 presente en el extracto obtenido desde la cepa nativa y ausente en el extracto obtenido de la cepa transformante.



Continuación de la Figura 31. C. Espectros de masas en modo positivo al tiempo de retención 7,83 min. En la parte superior se muestra el espectro del extracto obtenido de cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 (WT), y en la parte inferior el espectro del extracto obtenido de cultivos de la cepa transformante THNa2.1. Se destacan con flechas azules los iones m/z 427,2591, m/z 449,404 y m/z 501,3918 presentes en el extracto obtenido desde la cepa nativa y ausente en el extracto obtenido de la cepa THNa2.1. Los rombos rojos indican que el correspondiente ión posee datos de fragmentación.

3.2 Purificación de los pigmentos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 cultivada en medio Cz-S

Con el fin de realizar la purificación de los metabolitos identificados asociados a los iones m/z 385,2489 y m/z 427,2591, se realizó un cultivo de 112 placas Petri de la cepa *P. verrucosus* FAE27 en medio Cz-S por 21 días a 15°C (Figura 32). Transcurrido este tiempo, las placas completas (es decir, agar y micelio) se extrajeron primero con AcOEt (1% FA) y posteriormente, con una mezcla AcOEt:MeOH 1:1 (1% FA), obteniendo las fracciones E.1 (0,1763 g) y E.2 (7,7264 g), respectivamente (Figura 32.A). Al analizar ambos extractos por HPLC-MS/MS se observó que los metabolitos con m/z 385,2489 y m/z 427,2591 se encontraban principalmente en la fracción E.2 (Anexo 7).

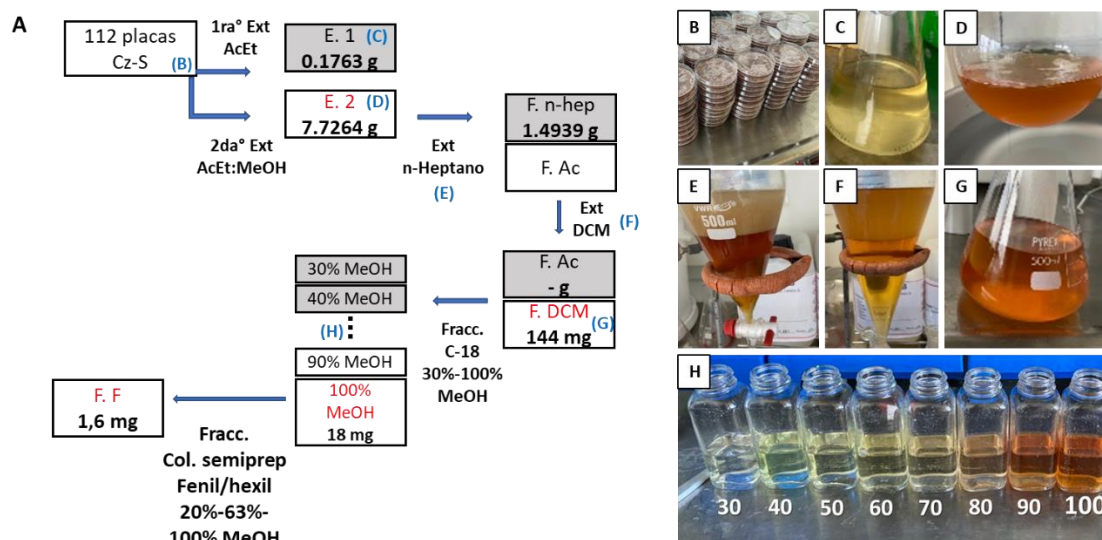


Figura 32. Purificación de pigmentos desde extractos obtenidos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 cultivada en medio Cz-S. **A.** Diagrama de purificación. Las fracciones de interés se destacan en rojo. La masa en peso seco se señala en cada extracto correspondientemente. Las letras mayúsculas azules hacen referencia a las fotografías, para ir visualizando cada uno de los pasos del proceso; **B.** Placas Petri de la cepa *P. verrucosus* FAE27 cultivadas en medio Cz-S por 21 días a 15°C; **C.** Extracción E1 (AcOEt); **D.** Extracción 2 (AcOEt:MeOH). Obsérvese la diferencia de coloración con respecto al extracto 1; **E.** Extracción con n-heptano; **F.** Extracción con DCM; **G.** Fase DCM; **H.** Fraccionamiento en gradiente de MeOH: H₂O.

Por lo tanto, se continuó el trabajo con esta fracción E2. Para ello, el extracto seco de la fracción E2 se disolvió inicialmente en agua destilada, y posteriormente se le adicionó metanol, hasta llevar la mezcla a una razón 9:1 (MeOH:H₂O). A esta mezcla hidroalcohólica se le realizaron extracciones con n-heptano con la finalidad de separar los compuestos apolares (Figura 32), obteniéndose así una fase orgánica y una fase acuosa. La fase orgánica de n-heptano, se concentró a sequedad, obteniendo un extracto de 1,49 g. A la fase acuosa se le añadió agua destilada hasta llevar la mezcla a una razón 1:1 (MeOH:H₂O). A esta nueva fase acuosa se le realizaron extracciones con DCM para extraer los metabolitos pigmentados (Figura 32). La fase orgánica de DCM se concentró hasta sequedad obteniendo un extracto de 144 mg. De este modo, tras finalizar las extracciones liquido-liquido se obtuvieron tres fracciones, una de n-heptano, otra de DCM y una acuosa. Todas ellas fueron analizadas mediante HPLC-DAD-MS/MS con el objetivo de evaluar la presencia de los metabolitos

asociados a los iones m/z 385,2489 y m/z 427,2591 (Anexo 8). Como resultado, se encontró que los metabolitos con relación masa carga m/z 385,2489 y m/z 427,2591 estaban presentes mayoritariamente en la fracción extraída con DCM, siendo, por tanto, esta fracción la seleccionada para continuar con el proceso de purificación. Así, la fracción DCM fue particionada mediante cromatografía en fase reversa empleando un cartucho con resina del tipo C18. Las eluciones se realizaron con distintas mezclas MeOH: H₂O, iniciando desde 30% hasta 100% de MeOH (Figura 32). De las ocho fracciones obtenidas, las fracciones eluidas con 90% (7,9 mg) y 100% (18 mg) de metanol corresponden a las que poseen visualmente una mayor cantidad de pigmentos y, por lo tanto, son en las que potencialmente se encontrarían los compuestos de interés. Esto fue corroborado mediante un análisis HPLC-DAD-MS/MS (Anexo 9), en el que se determinó que en la fracción de 100% MeOH se encontraba en mayor abundancia el compuesto m/z 385,2489 y, en la fracción de 90% metanol, el compuesto con m/z 427,2597. Debido a la menor masa de la fracción 90% metanol, así como el mayor número de compuestos que eluyen muy próximos entre sí en esta fracción, no es factible el uso de esta fracción para el aislamiento del compuesto de interés. Es por ello, que se continuó la purificación con la fracción 100% MeOH. Esta fracción fue purificada mediante HPLC-DAD semi-preparativo para el aislamiento del compuesto con m/z 385,2489. Como resultado, se logró obtener una fracción, denominada fracción A, en donde se encontraba el compuesto con m/z 385,2489 como metabolito principal (Figura 33). Tras el proceso de concentración y secado esta misma fracción A seca (1,6 mg), se volvió a analizar mediante HPLC-DAD-MS/MS antes de ser caracterizada espectroscópicamente. Se observó que la abundancia del compuesto aislado con m/z 385,2489 disminuyó, pero además aparecieron otros iones no presentes anteriormente (Figura 33 y Anexo 10). Debido a que la composición de esta fracción era distinta a la inicial, se la renombró como fracción F. El análisis de esta fracción (Anexo 10 y Anexo 11), indicaba claramente la presencia de una mezcla de compuestos, cuyos patrones de fragmentación diferentes, sin iones en común, sugerían que no presentaban

relación estructural. Dado este cambio, y a la cantidad y pureza de la fracción F, no se pudo continuar con el análisis de resonancia magnética nuclear.

De esta manera, como resultado del proceso de purificación, se lograron identificar los metabolitos con m/z 385,2489 y 427,2597 como compuestos coloreados producidos por el cluster GymN, y caracterizarlos mediante sus espectros UV-visible y patrones de fraccionamiento (Figura 34).

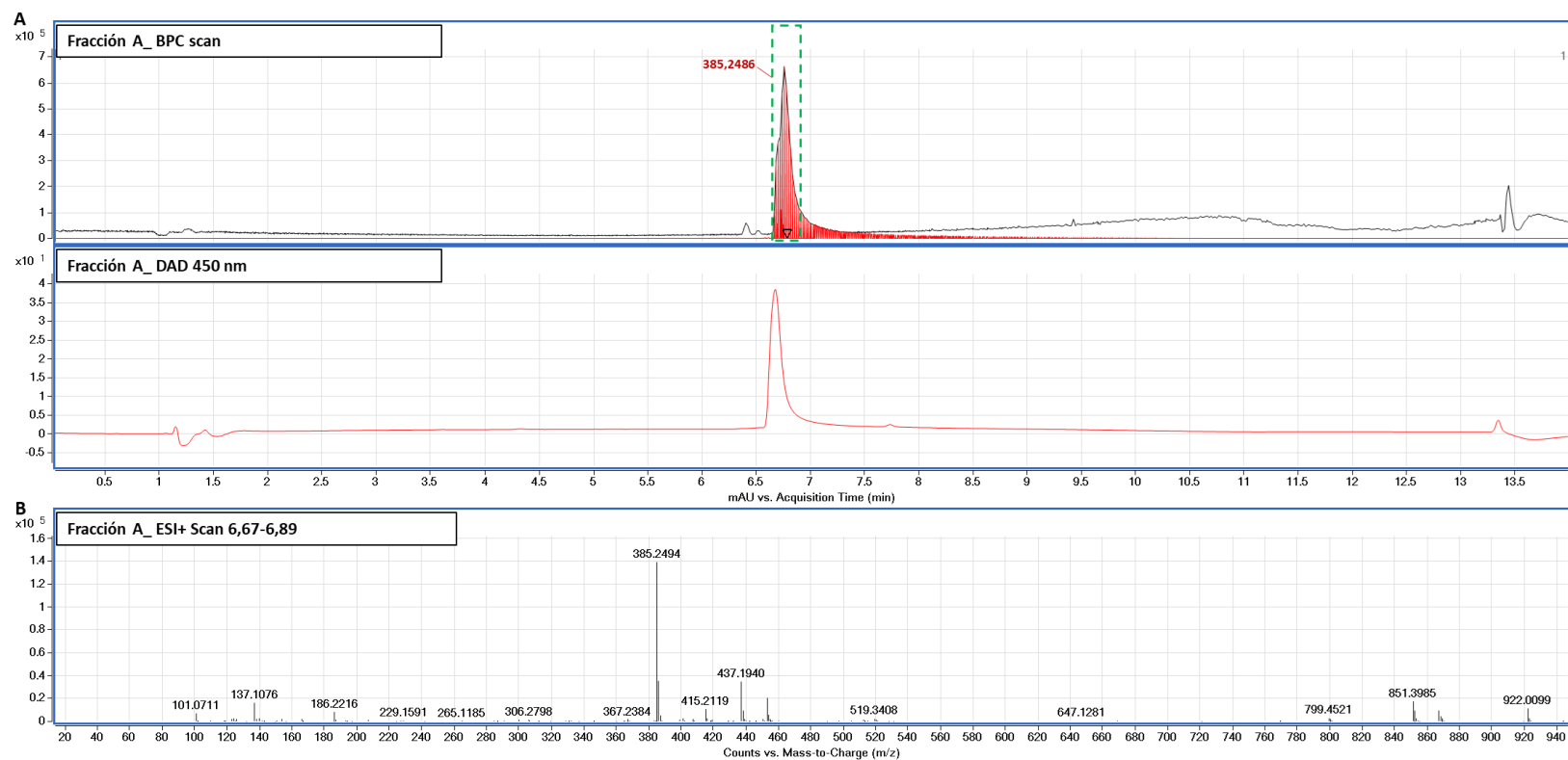


Figura 33. Análisis de la fracción A por HPLC-DAD-MS/MS. A. En la parte superior se muestra el cromatograma de pico base (BPC) del análisis de masas de la fracción A. En rojo se señala la presencia del ion m/z $385,2486 \pm 0.001$ en el pico de mayor intensidad. En la parte inferior se muestra el cromatograma a 450 nm de la fracción A. Obsérvese que a esta longitud de onda, el compuesto de interés es el mayoritario. **B.** Espectro de masas obtenido en el rango 6,67-6,89 min (marcado con un cuadro verde en el BPC). Se destaca el ión m/z 385,2494 presente en la fracción obtenida como el ión mayoritario.

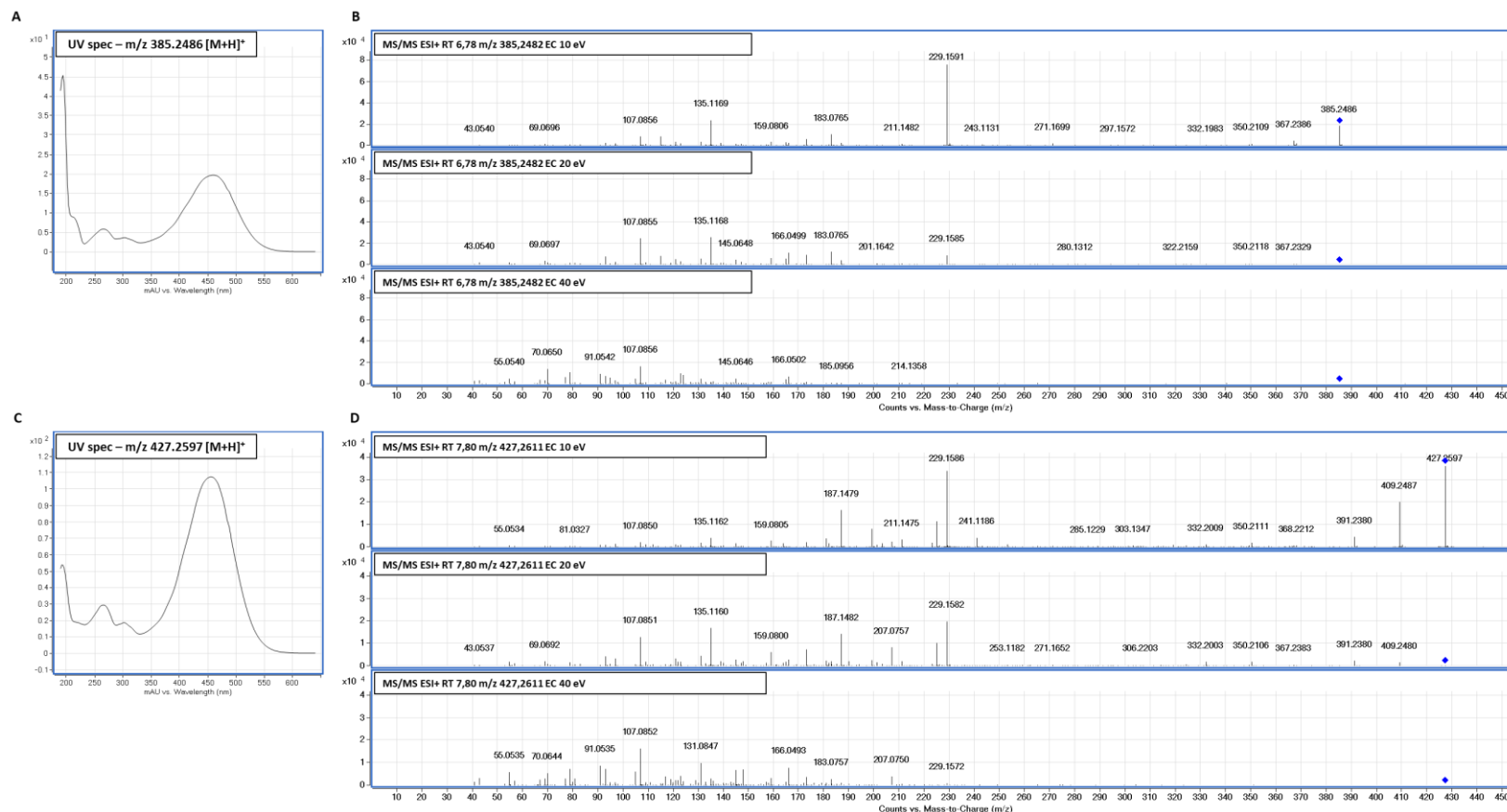


Figura 34. Espectros UV-visible y espectros de fragmentación de los iones m/z 385,2486 [M+H]⁺ y m/z 427,2597 [M+H]⁺. **A.** Espectro UV-visible del ión 385,2486 [M+H]⁺; **B.** Espectros de fragmentación del ión 385,2486 [M+H]⁺ a tres energías de colisión (10, 20 y 40 eV). Los tiempos de retención, relación m/z del ión y energía de colisión (EC) se señalan en el título de cada espectro. Obsérvese que al incrementar la energía de colisión disminuye la intensidad del ión molecular (marcado con un rombo azul), apareciendo mayor número de iones de menor m/z ; **C.** Espectro UV-visible del ión 427,2597 [M+H]⁺; **D.** Espectros de fragmentación del ión 427,2597 [M+H]⁺ a tres energías de colisión (10, 20 y 40 eV). Los tiempos de retención, relación m/z del ión y energía de colisión (EC) se señalan en el título de cada espectro. Obsérvese que al incrementar la energía de colisión disminuye la intensidad del ión molecular (marcado con un rombo azul), apareciendo mayor número de iones de menor m/z .

Con el objetivo de identificar posibles estructuras de los iones m/z 385,2486 $[M+H]^+$ y m/z 427,2597 $[M+H]^+$ se empleó *molecular networking* como herramienta con distintas bases de datos de GNPS utilizando los espectros de fragmentación de ambas moléculas. Sin embargo, no se logró encontrar una coincidencia con alguno de los metabolitos presentes en las bases de datos empleadas. Entre los métodos de búsqueda se empleó MASST (*databases: all; Parent Mass Tolerance: 0,2; Ion Tolerance: 0,2; Min Matched Peaks: 3; Score Threshold: 0,7*) y comparación con set de datos MassIVE que tuviesen relación con estudios de azafilonas (MSV000091281) y MS aislados desde *Talaromyces* (MSV000092823, MSV000091553 y MSV000085992). No se encontraron set de datos MassIVE vinculados a MS aislados desde *Monascus*.

Con la finalidad de obtener más información de los pigmentos producidos por *P. verrucosus* FAE27 se estimaron las posibles fórmulas moleculares de los metabolitos correspondientes a los iones m/z 385,2486 $[M+H]^+$ y m/z 427,2597 $[M+H]^+$ (Tabla IX). De esta manera se estimó que las fórmulas más probables corresponden a $C_{23}H_{32}N_2O_3$ y $C_{25}H_{34}N_2O_4$.

Tabla IX. Formulas moleculares posibles de los iones m/z 385,2486 $[M+H]^+$ y m/z 427,2597 $[M+H]^+$.

m/z (experimental)	Formula [M]	Fórmula ión [M+H] ⁺	m/z (Calc)	Diff (ppm)
385,2486	C18 H32 N4 O5	C18 H33 N4 O5	385,2445	-10.55
-	C19 H28 N8 O	C19 H29 N8 O	385,2459	-7.07
-	C23 H32 N2 O3	C23 H33 N2 O3	385,2486	-0.08
-	C12 H32 N8 O6	C12 H33 N8 O6	385,2518	8.22
-	C28 H32 O	C28 H33 O	385,2526	10.39
427,2597	C21 H30 N8 O2	C21 H31 N8 O2	427,2564	-7.63
-	C25 H34 N2 O4	C25 H35 N2 O4	427,2591	-1.33
-	C26 H30 N6	C26 H31 N6	427,2605	1.81
-	C14 H34 N8 O7	C14 H35 N8 O7	427,2623	6.15
-	C30 H34 O2	C30 H35 O2	427,2632	8.11
-	C15 H30 N12 O3	C15 H31 N12 O3	427,2637	9.29

Respecto a la determinación de posibles fórmulas moleculares (Tabla IX), se observa la presencia de dos átomos de nitrógeno presentes en los intermediarios anaranjados. Este resultado es interesante ya que, como se plantea en este trabajo, estas dos moléculas corresponderían a intermediarios de la ruta biosintética cuyo átomo de oxígeno del anillo pirano aún no ha sido intercambiado por un átomo de nitrógeno y, por tanto, presentan coloración anaranjada. De esta manera, los dos átomos de nitrógeno presentes en ambas fórmulas corresponderían a átomos presentes en la estructura basal de estas azafilonas, previo a una posible reacción de aminación.

4. Evaluación de la polaridad y estabilidad de los pigmentos rojos producidos por la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

Para llevar a cabo una caracterización inicial de los pigmentos rojos sintetizados por la cepa *P. verrucosus* FAE27, se realizó un cultivo de 50 placas Petri en medio PDA por 14 días a 15 °C. Tras eliminar el micelio de todas estas placas, el agar fue fragmentado y liofilizado, rindiendo un peso de 40,47 g. (Figura 35. A). A partir de este agar liofilizado, se realizaron extracciones consecutivas, primero con etanol, después con metanol y finalmente con agua destilada (Figura 35. B-D), siguiendo un criterio de menos a más polar.

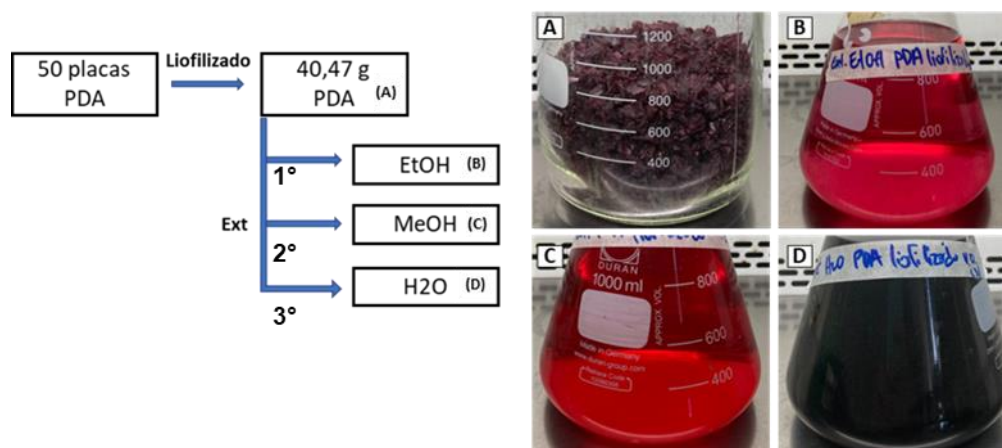


Figura 35. Procedimiento para la extracción de pigmentos rojos desde agar liofilizado de placas de *P. verrucosus* FAE27 en PDA. A: Agar de placas de PDA liofilizado. Obsérvese el color rojo que presenta; **B:** Extracción del agar liofilizado con etanol; **C:** Extracción del agar liofilizado con metanol; **D:** Extracción del agar liofilizado con agua destilada.

La extracción final con agua fue la que permitió obtener una mayor concentración de pigmentos rojos desde el agar liofilizado, siendo esto evaluado visualmente. Por ello, se seleccionó esta fracción para realizar una caracterización de la estabilidad de los pigmentos presentes frente a distintos rangos de pH y temperatura. Como resultado, se obtuvo que tras la incubación de 1 h a distintas temperaturas entre 4 y 95°C y diferentes pH entre 2 y 12, el espectro de absorción de la solución de pigmentos en agua no se vio modificado

significativamente, indicando su estabilidad en los rangos de temperatura y pH empleados (Figura 36).

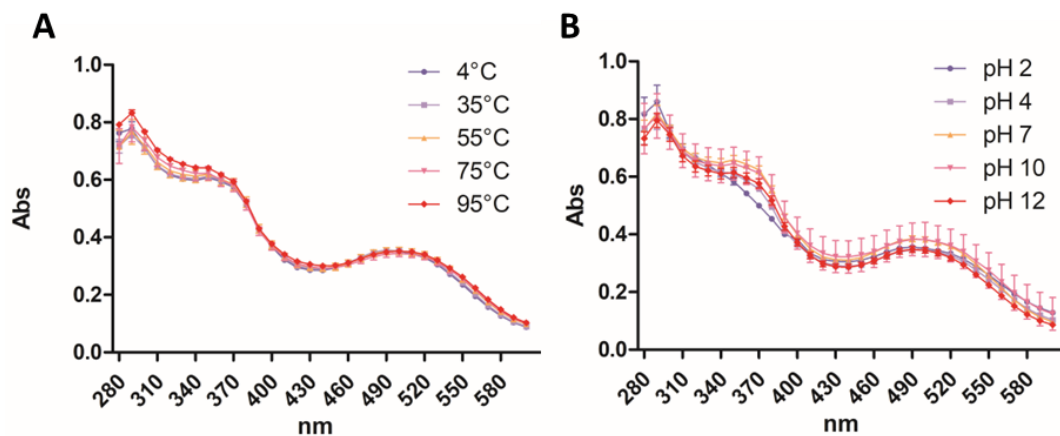


Figura 36. Evaluación de la estabilidad de los pigmentos rojos obtenidos mediante extracción con agua de agar liofilizado de placas de PDA de *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27, en diferentes condiciones de pH y temperatura. A. Perfil de absorbancia entre 280 y 600 nm de una solución acuosa de pigmentos tras ser incubados por 1 h a distintas temperaturas entre 4°C y 95°C. **B.** Perfil de absorbancia entre 280 y 600 nm de una solución acuosa de pigmentos tras ser incubados por 1 h a distintos pH entre pH2 y pH 12. La desviación estándar corresponde a la realización de tres mediciones independientes (n=3).

DISCUSIÓN

Desde tiempos inmemoriales el color ha jugado un rol crucial en los sistemas biológicos, en el arte, en las comunicaciones, en aspectos culturales y en la industria alimenticia. Hoy en día, los pigmentos de origen microbiológico, en particular los de origen fúngico, han cautivado la atención del ser humano dado su potencial de aplicación en múltiples áreas y, por tanto, su potencial para desplazar a los pigmentos sintéticos por diversas razones vinculadas a la salud, bio-sustentabilidad y bien estar ecológico (Elkhateeb & Daba, 2023).

El registro más antiguo que se conoce del uso de pigmentos fúngicos corresponde al uso de hongos del género *Monascus* para la producción de arroz fermentado rojo en culturas asiáticas (Mapari y cols., 2010). Al igual que ocurre con la búsqueda de cepas fúngicas productoras de nuevos antibióticos, o anticancerígenos, la búsqueda de nuevas cepas productoras de pigmentos no ha perdido interés con el paso de los años (Pimenta y cols., 2021, Lagashetti y cols., 2019). En este contexto, el estudio de cepas nuevas pertenecientes a géneros fúngicos poco estudiados favorece la identificación de MS novedosos y, por lo tanto, de nuevos pigmentos, dado el carácter especie-específico y/o género-específico que poseen los clústeres de genes biosintéticos (Robey y cols., 2021).

Los hongos del género *Pseudogymnoascus* son hongos psicotolerantes aislados principalmente desde ambientes fríos, cuyo metabolismo secundario solo se ha comenzado a estudiar en la última década. Como resultado de este reciente incremento en el interés sobre los MS sintetizados por hongos del género *Pseudogymnoascus*, un total de 12 familias de MS de diversa naturaleza y con

diferentes actividades biológicas se han aislado y caracterizado (Tabla III). Entre ellos, hasta el momento, no se encuentra ningún metabolito coloreado o pigmento. Por otro lado, debido a las características inherentes a la biología de este género como, por ejemplo, su crecimiento lento y el requerimiento de temperaturas bajas para un crecimiento óptimo, los hongos del género *Pseudogymnoascus* no son candidatos idóneos desde un punto de vista productivo, pues su cultivo en biorreactores a gran escala sería poco eficiente. Así, la búsqueda no solo de la molécula de interés, sino también de los genes involucrados en su biosíntesis es crucial para poder desarrollar estrategias que permitan hacer uso de los metabolitos de *Pseudogymnoascus* de manera eficiente y competitiva.

En base a la identificación de un BGC candidato para la producción de azafilonas (denominado GymN) en la cepa de origen antártico *P. verrucosus* FAE27, y el continuo reporte de cepas aisladas del género con la capacidad de sintetizar pigmentos rojos, en este trabajo se planteó como objetivo estudiar el potencial de biosíntesis de pigmentos del tipo azafilona en el género fúngico *Pseudogymnoascus*. Actualmente, se ha descrito que algunas cepas de *Pseudogymnoascus* producen pigmentos rojos, pero se desconoce qué tan extendida a nivel de género está la producción de estos pigmentos, ni tampoco hay datos acerca de su naturaleza química. Así, primero desde una perspectiva del género mediante un análisis bioinformático y, posteriormente, mediante el análisis funcional del gen *gymNa* de la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27, y purificación de pigmentos asociados a la función de este gen, en esta Tesis se propone al género *Pseudogymnoascus* como nuevo género fúngico productor de interesantes pigmentos de tipo azafilona.

Identificación de clústeres biosintéticos de azafilonas en el género *Pseudogymnoascus*

Con el fin de abordar el potencial de biosíntesis de pigmentos del tipo azafilona en el género fúngico *Pseudogymnoascus*, se emplearon todos los genomas anotados disponibles de este género. El género *Pseudogymnoascus* cuenta actualmente con 27 genomas públicos en la base de datos de la NCBI (búsqueda realizada en diciembre del año 2023), de los cuales 21 están anotados. Este número es muy bajo al comparar con el número de genomas disponibles de los géneros más comúnmente estudiados como *Aspergillus* (1200 genomas) y *Penicillium* (507 genomas), pertenecientes a la clase *Eurotiomycetes*. Particularmente estos dos géneros poseen un alto número de genomas disponibles debido a su importancia biotecnológica en la producción de enzimas y MS a nivel industrial (Houbraken y cols., 2014). Es por ello que, con el fin de contar con la visión más completa posible del género es que, a pesar de no contar con buenos parámetros de completitud, se emplearon todos los genomas disponibles de *Pseudogymnoascus* en este estudio. Por otro lado, en la base de datos fúngicos Mycobank (búsqueda realizada en diciembre del año 2023), es posible encontrar un total de 37 especies descritas pertenecientes al género *Pseudogymnoascus*. De todas ellas, solo 4 poseen un genoma asociado a la especie (*P. verrucosus*, *P. roseus*, *P. destructans* y *P. pannorum*). El resto de los genomas pertenecen a especies aún no descritas o que no han sido clasificados taxonómicamente. Es por ello que, con el fin de analizar de mejor forma el repertorio de biosíntesis de metabolitos secundarios en el género *Pseudogymnoascus*, y posteriormente, en concreto la posible biosíntesis de azafilonas, es que se vincularon los BGCs de los genomas analizados con el análisis filogenético de los mismos.

A partir de los 22 genomas analizados del género *Pseudogymnoascus*, 21 obtenidos desde la base de datos de la NCBI y el genoma de la cepa *P. verrucosus* FAE27, se predijeron un total de 631 BGCs, con un número de BGCs

por genoma entre 14 y 43. Este número se encuentra dentro del rango reportado en hongos de la clase *Leotiomycetes* (Robey y cols., 2021).

Entre estos genomas, destaca la cepa *P. destructans* por poseer el número de BGCs que más diverge entre las cepas analizadas (n=14), siendo además la única cepa que carece de BGCs del tipo TC e híbridos PKS-NRPS. Ello hace que, respecto a las otras especies del género, posee un arsenal considerablemente menor de MS. *Pseudogymnoascus destructans* es una especie del género *Pseudogymnoascus* conocida por causar el síndrome de nariz blanca (WNS) en murciélagos (*Myotis lucifugus*) durante los periodos de hibernación, causando altas tasas de mortalidad (Lorch y cols., 2011). Su estilo de vida patogénico supone un nicho ecológico muy específico y, consecuentemente, se ha reportado que esta especie es capaz de crecer en un limitado repertorio de fuentes de carbono y nitrógeno en comparación a los miembros no patógenos del género, asimilando preferencialmente azúcares simples, dipéptidos y metabolitos intermediarios fosforilados del metabolismo primario (Chaturvedi y cols, 2018). De igual manera que con el metabolismo primario, la conservación o pérdida de BGCs se ve fuertemente influenciada por selección natural, donde elementos génicos que no significan una ventaja o mejora para su crecimiento y desarrollo en nichos específicos, tienden a perderse en procesos de especiación, lo cual concuerda con el bajo número de BGCs presente en el genoma de *P. destructans* (Rokas y cols., 2018).

Una vez identificados todos los BGCs de los genomas disponibles de *Pseudogymnoascus*, se procedió a identificar cual de todos ellos podían ser candidatos a sintetizar azafilonas. Para ello, se emplearon dos aproximaciones. Primero, se asignó la función de los BGCs considerando los resultados de antiSMASH. Este software realiza este análisis comparando la identidad de las proteínas predichas con la de las presentes en los clústeres descritos en la base de datos de BGCs curados MIBiG. La segunda aproximación fue realizada mediante el uso de la herramienta BiG-SCAPE, que permite generar redes de

similitud de secuencia en base a la presencia de dominios PFAM, porcentaje de identidad aminoacídica y sintenia de los genes codificantes en cada BGC, además de poder incorporar clústeres adicionales manualmente.

Los resultados obtenidos por ambas aproximaciones resultaron ser complementarios, permitiendo identificar un total de 18 clusters candidatos para la producción de azafilonas. Tras el posterior análisis clúster a clúster, este número se vio reducido a 13 clusters. Es necesario destacar que para una correcta identificación de BGCs se debe contar con genomas de buena calidad, ya que si se cuenta con un genoma altamente fragmentado la probabilidad de encontrar BGCs fragmentados o en los bordes de los *contigs* aumenta considerablemente (Figura 12), lo que podría traducirse en una sobre representación de un BGC en concreto o de una familia de BGCs.

Esto se hace aún más importante para clústeres de gran tamaño como es el caso de los clústeres para la síntesis de azafilonas (BCAs), donde la probabilidad de que el clúster se presente fragmentado tras la secuenciación es mayor. La diferencia de tamaño de los BCAs con respecto al resto de los BGCs identificados, se comprobó realizando la comparación que se muestra en la Figura 37, donde se observa que el tamaño promedio de un BCA es mayor al de un BGC promedio en *Pseudogymnoascus*, además de que el tamaño de los BCA de *Pseudogymnoascus* se encuentran en el rango de tamaño de los BCAs de otros géneros fúngicos.

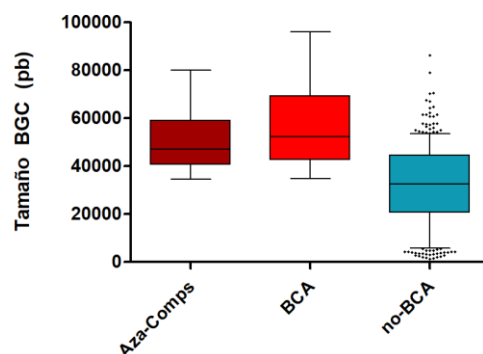


Figura 37. Tamaño de los BGCs asociados a la síntesis de azafilonas. **Aza-Comps:** Clústeres descritos para la síntesis de azafilonas en varios géneros fúngicos (Tabla VI) (n=15); **BCA:** Clústeres candidatos para la síntesis de azafilonas identificados en el género *Pseudogymnoascus* (n=13) (en el caso de los genomas con clústeres fragmentados el tamaño fue calculado sumando ambos fragmentos); **no-BCA:** Clústeres identificados en *Pseudogymnoascus* no vinculados con la síntesis de azafilonas en este estudio (n=613). Gráficos de caja de percentiles 5-95. Datos aislados se muestran como puntos.

Clústeres biosintéticos para la síntesis de azafilonas en *Pseudogymnoascus*

Recientemente, las rutas biosintéticas de azafilonas han sido objeto de múltiples revisiones bibliográficas (Williams y cols., 2021; Pavesi y cols., 2020). En estas revisiones se puede constatar que, a pesar de contar con la descripción de varios BGCs asociados a la producción de azafilonas en diferentes géneros fúngicos, la mayor parte de estas rutas biosintéticas asociadas son todavía tentativas. Es decir, son rutas en las cuales pocos pasos catalíticos han sido demostrados mediante experimentos de actividad enzimática *in-vitro* o generación y análisis de cepas *knock out*. En parte, la razón de la falta de evidencia experimental sería la alta reactividad de los intermediarios, que, al acumularse y reaccionar, darían origen a moléculas derivadas que no corresponden a los productos finales identificados en condiciones estándar, imposibilitando su aislamiento (Chen y cols. 2019). Debido a esto, la predicción de estructuras o rutas biosintéticas a partir solo de la información proveniente de la composición de un BCA es dificultosa, más aún en los pasos mediados por las

enzimas accesorias que catalizan reacciones del tipo óxido-reducción posterior a la formación del núcleo pirano-quinona.

Teniendo esto en consideración, la predicción de posibles estructuras que se sintetizarían a partir de BCAs encontrados en este trabajo en *Pseudogymnoascus* no es factible. Sin embargo, si es posible analizarlos en función de la presencia o ausencia de enzimas y en función a su distribución en el género. Esto permite tener una idea de la diversidad estructural que tendrían los metabolitos sintetizados por estos clústeres.

Desde una perspectiva general, todos los BCA identificados en *Pseudogymnoascus* poseen una enzima PKS-NR del tipo VII y una enzima del tipo monoxigenasa dependiente de FAD (Figura 14), por lo que poseen la maquinaria enzimática necesaria para generar el núcleo estructural bicíclico pirano-quinona característico de una azafilona (Figura 5) (Williams y cols., 2021).

Además de estas dos enzimas cuya función se encuentra bien caracterizada, existen otras dos enzimas que cumplen funciones conservadas dentro de la biosíntesis de azafilonas, las enzimas del tipo serina-hidrolasa y O-acetiltransferasa. Por un lado, las enzimas del tipo SH facilitan la liberación del policétido naciente unido a la enzima PKS-NR mediante un enlace tioéster, aumentando la producción del metabolito (He & Cox, 2016). Por otro lado, las enzimas O-AT catalizan la acilación del grupo hidroxilo unido al átomo de carbono C4. La cadena carbonada cargada en las enzimas O-AT proviene principalmente de la enzima principal secundaria presente en el clúster, pudiendo esta ser una enzima PKS-HR como en el BGC para la síntesis de azanigerona en *Aspergillus nidulans* (Zabala y cols., 2012), una enzima PKS-NR como en el BGC para la síntesis de mitorubrina en *Talaromyces marneffe* (Woo y cols., 2012), o dos enzimas del tipo sintasa de ácido graso (FAS) como en el caso de la síntesis de MonAzPs en *Monascus pilosus* (Balakrishnan y cols., 2013) (Figura 8) (Anexo 12.A). En caso de no presentar una enzima del tipo O-AT, la incorporación de la cadena carbonada proveniente de la enzima secundaria a la estructura de la

azaflona puede darse mediante la función del dominio SAT presente en las enzimas PKS-NR del tipo VII. Este dominio permite el uso de estas cadenas secundarias accesorias como unidad iniciadora en su proceso de síntesis, tal como ocurre en la síntesis de asperfuranona y preasperpiranona en *A. nidulans* y *A. terreus*, respectivamente (Huang y cols., 2020).

Para poder describir la composición enzimática del conjunto de BCAs identificados en *Pseudogymnoascus*, se procedió a clasificar las enzimas PKS-NR principales de cada BCA mediante un análisis filogenético de los dominios KS presentes en cada una de estas enzimas. Como se mencionó anteriormente, son tres los dominios presentes en toda enzima PKS, los dominios KS, AT y ACP. Entre estos tres dominios el dominio KS corresponde al más conservado de estos, y que a la vez permite poder clasificar estos con relación a la naturaleza del metabolito sintetizado por la enzima (Kroken y cols., 2003).

Como resultado del análisis de los dominios KS de las enzimas principales PKS-NR pertenecientes a cada BCA, los dominios KS fueron clasificados en seis clados. Con relación a la composición enzimática de los BCA de estos clados se puede indicar lo siguiente:

Clado I

El clado I está conformado por los BCAs identificados en *P. verrucosus* FAE27 y *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4520. A diferencia de los demás clados analizados, los dos BCA que conforman el clado I poseen una gran diferencia en el contenido de enzimas accesorias entre sí. El BCA identificado en *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4520 posee 6 enzimas accesorias menos, incluyendo entre las enzimas ausentes las enzimas del tipo FAD-monoxigenasa y serina-hidrolasa (Figura 16). Esto sugiere que el clúster identificado en la cepa VKM F-4520 además de estar fragmentado, carece de enzimas cruciales en la ruta biosintética de azaflonas. Por estas razones su composición no será discutida.

El clúster GymN identificado en *P. verrucosus* FAE27 posee múltiples genes ortólogos a los genes principales de la ruta biosintética de MonAzPs de *Monascus pilosus* (Chen y cols., 2017). Además de las enzimas PKS-NR (MpPKS5/GymNa), FAD-monox (MppF/GymNe), SH (MppD/GymNf) y OAT (MppB/GymNd), el clúster GymN posee enzimas ortólogas a enzimas de las clasificaciones ox-red. 7 (MppC/GymNc) y ox-red. 2 (MppE/GymNg), ambas enzimas reductasas. Al intentar reconstruir la ruta biosintética de MonAzPs de *Monascus* con las proteínas ortólogas encontradas en GymN (Figura 38), destaca la ausencia de una de las enzimas involucradas en los últimos pasos que da origen a azafilonas de colores anaranjado y rojo, la enzima MppG (Ox-red. 1). En concreto esta enzima cataliza la desaturación de los carbonos C1 y C6, dando paso a la formación de un mayor número de insaturaciones, y por tanto conjugación, en el cromóforo. Interesantemente, el clúster de biosíntesis de MonAzPs descrito en *Talaromyces* también carece de esta última enzima, por lo que debe existir otro mecanismo para incrementar la conjugación del cromóforo, el cual está presente en la azafilona PP-V aislada desde *Talaromyces* (Rasmussen, 2015).

Por su parte, el clúster GymN también cuenta con enzimas adicionales que no se encuentran presentes en el clúster de *Monascus*. Entre ellas destaca una enzima del tipo citocromo P450 GymNi y dos enzimas oxidasas dependientes de FAD, GymNh y GymNj (Ox-red. 10 y 6 respectivamente). La enzima GymNj posee ortólogos en los BGCs descritos en *A. nidulans* (AzaL, AfoF) y *A. terreus* (07660), y se hipotetiza que en estas rutas, GymNj cataliza hidroxilaciones de átomos de carbono. En cuanto a la enzima GymNh, no posee ortólogos en el conjunto de clústeres analizados, por lo que lo único que se puede inferir es que modifica el grado de oxidación de la molécula.

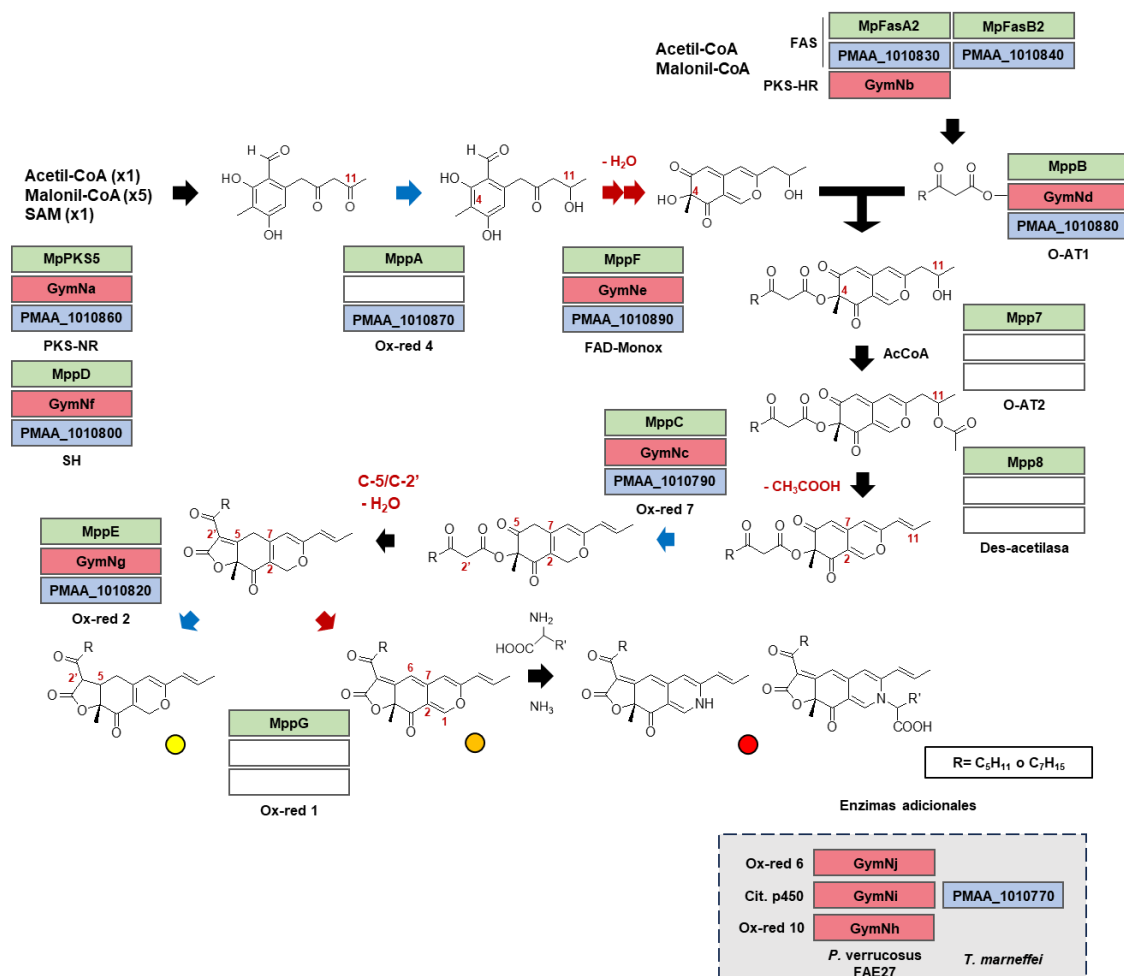


Figura 38. Ruta biosintética de MonAzPs en *Monascus* y proteínas ortólogas identificadas en los clústeres de biosíntesis de azafilonas en *T. marneffei* y *P. verrucosus* FAE27. En cajas de colores se especifican las enzimas de la ruta en *Monascus* (verde) y las presentes en los clústeres de *Pseudogymnoascus* (rojo) y *Talaromyces* (azul). La función de cada enzima se indica con las abreviaciones siguientes: FAD-Monox: Monoxigenasa dependiente de FAD; SH: Serina-hidrolasa; O-AT: O-aciltransferasa; Cit. P450: Citocromo P450; Ox-red: Óxido-reductasa. Las reacciones de reducción y oxidación se indican con flechas de color azul y rojo, respectivamente.

La enzima citocromo P450 GymNi también está presente en el clúster de *Talaromyces* (GymNi/PMAA_101770), y en el BGC de azanigerona en *A. nidulans*, en donde se denominó Azal. En el trabajo donde se describe el BGC de la azanigerona, se propuso que la enzima Azal cataliza un clivaje oxidativo C-C que permite la liberación de un grupo hidroxipropil y la posterior generación de un grupo aldehído en el extremo de la cadena (Anexo 13) (Zabala y cols., 2012).

Las enzimas citocromo P450 (CYP) son monoxigenasas que catalizan una amplia variedad de reacciones. Entre las funciones descritas en hongos para las CYP se encuentra la degradación de xenobióticos, la participación en la síntesis y modificación de esteroides, y la participación en la síntesis de metabolitos secundarios (Durairaj, 2016). Ejemplos de su participación en la síntesis de metabolitos secundarios corresponden a la síntesis de las micotoxinas aflatoxina y tricoteceno. En el caso del clúster de aflatoxina descrito en *A. flavus*, este posee seis enzimas CYP que catalizan diferentes reacciones de oxidación como AflU (epoxidasa), AflN (oxidasa), AflG (hidroxilasa) y AflQ (hidroxilasa) (Ehrlich y cols., 2004). Por otro lado, en el clúster de la biosíntesis del tricoceteno en hongos del género *Fusarium*, es posible encontrar la enzima Tri4 (CYP58) capaz de catalizar cuatro reacciones consecutivas, tres hidroxilaciones y una epoxidación para la transformación de tricodieno a isotricotriol (Tokai y cols., 2007). A pesar de contar con información sobre la secuencia aminoacídica y la función de múltiples enzimas CYP fúngicas, su amplia diversidad hace necesaria la validación experimental en cada caso particular para determinar su función, por lo que no es posible predecir certeramente la función de una CYP en el contexto de una ruta de biosíntesis de un MS sin información adicional (Ichinose, 2014).

Por otro lado, el clúster GymN en lugar de poseer dos enzimas del tipo FAS como *Monascus* y *Talaromyces* para generar la cadena carbonada que es transferida al grupo hidroxilo del carbono C4, posee una enzima del tipo PKS-HR (KS-AT-DH-cMT-ER-KR-ACP). Es importante destacar que las enzimas de tipo FAS dan origen a cadenas carbonadas completamente saturadas, mientras que las enzimas PKS-HR, a pesar de poseer los tres dominios necesarios para producir una cadena carbonada completamente saturada (KR, DH y ER), pueden dar origen a cadenas carbonadas saturadas o insaturadas (Anexo 12) debido a que en las reacciones consecutivas de extensión descarboxilativa no todos los dominios actúan en cada iteración (Figura 2). Esto depende de la llamada programación de las enzimas PKS iterativas, cuyo mecanismo al día de hoy no

se conoce del todo, complejizando la predicción de la cadena carbonada generada solo a partir de la arquitectura de sus dominios (Herbst y cols., 2018).

La presencia de cadenas insaturadas en la estructura de las azafilonas del tipo MoAzPs generarían una extensión del sistema de electrones conjugados del cromóforo, y por ende, un desplazamiento en el máximo de absorción a mayores longitudes de onda provocando un cambio en la coloración de la molécula.

De acuerdo con lo planteado, como propuesta a partir del análisis bioinformático se plantea que las azafilonas sintetizadas por el clúster GymN se asemejarían a las azafilonas sintetizadas por los hongos del género *Monascus*, presentando tres anillos en su estructura, pero con un mayor grado de oxidación de la misma, y por lo tanto una mayor polaridad.

Clado II

El clado II está conformado por los BCA identificados en *P. destructans* y *P. roseus*. Ambos poseen una enzima PKS-NR del tipo VII y una enzima PKS-HR (KS-AT-DH-cMT-ER-KR-ACP) como enzima principal secundaria, además de enzimas accesorias del tipo FAD-monoxigenasa, serina-hidrolasa y O-AT (Figura 14 y 16). Respecto a las enzimas del tipo óxido reductasa, cada uno de estos BCA posee dos, del tipo ox-red. 2 y 4, para el caso de *P. destructans* y del tipo ox-red. 4 y 6, para el caso del BCA de *P. roseus*. La enzima PKS-NR más cercana filogenéticamente a la PKS-NR de este grupo, cuya funcionalidad ha sido comprobada es la de la biosíntesis de la azafilona lijiquinona (Figura 15). Sin embargo, debido a que estos clústeres no comparten el set de enzimas accesorias del tipo óxido reducción, no se puede concluir que los metabolitos sintetizados por los BCA de este clúster serían similares a la lijiquinona.

Por otro lado, el BCA identificado en *P. destructans* posee una menor densidad génica (Figura 14) en comparación al resto de los BCA identificados en *Pseudogymnoascus*. Además, se encuentra fragmentado en dos BGCs predichos ubicados en *contigs* distintos, que no se encuentran en bordes de

contigs. Esto sugiere que en *P. destructans* el clúster de biosíntesis de azafilonas pudiese estar en proceso de desintegración debido a eventos de movilidad génica, en un contexto de pérdida general del BGCs como se discutió anteriormente, y que por lo tanto hubiera perdido su funcionalidad. De manera llamativa, Mascuch y colaboradores en el año 2015 describieron la identificación de la azafilona citrinina o una molécula similar a partir de análisis por HPLC-MS/MS desde alas de murciélago infectadas con *P. destructans*. Sin embargo, esta identificación se realizó mediante *molecular networking* con la librería de estándares del GNPS empleando para la identificación de la citrinina únicamente un valor m/z con un solo decimal (m/z 272,3 [M+Na]). Considerando que para la identificación inequívoca de una molécula por su masa se requiere que la diferencia entre el dato experimental y el de la fórmula molecular predicha sea de menos de 5 ppm, es muy probable que la molécula identificada como citrinina no sea tal. Por otro lado, desde un punto de vista genético la ruta biosintética de citrinina descrita en *Monascus* contempla un set completamente distinto de enzimas (Figura 14), por lo que para afirmar que *P. destructans* es capaz de sintetizar citrinina es necesario un análisis más exhaustivo (Mascuch y cols., 2015).

Clado III

El clado III se encuentra formado únicamente por el BCA identificado en *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4516. Al igual que el resto de los BCA identificados en *Pseudogymnoascus*, posee una enzima PKS-NR del tipo VII, una enzima PKS-HR (KS-AT-DH-cMT-ER-KR-ACP), una enzima del tipo FAD-monoxigenasa y una enzima serina-hidrolasa, permitiendo teóricamente sintetizar la base de la estructura de una azafilona. Respecto al resto de las enzimas accesorias, este BCA posee 10 genes que no presentaron ortología con ninguno de los genes presentes en los clústeres de azafilonas descritos (Figura 15). Por tanto, para poder ahondar en la estructura de las potenciales azafilonas

sintetizadas por este clúster, es necesario realizar un análisis bioinformático mucho más exhaustivo.

Clado IV y V

Los clados IV y V son los clados con mayor cantidad de BCAs identificados en los genomas de *Pseudogymnoascus* analizados. Respecto a las enzimas necesarias para sintetizar el núcleo estructural característico de una azaflona, todos ellos poseen una enzima PKS-NR del tipo VII, una enzima PKS-HR, enzimas del tipo FAD-monoxigenasa, una enzima serina-hidrolasa y una enzima del tipo O-AT. Particularmente, todas las enzimas PKS-HR presentes en el clado IV carecen del dominio cMT, por lo que generarían una cadena carbonada carente de metilaciones (Figura 15). Por otro lado, las enzimas PKS-NR identificadas en *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13 y *P. verrucosus* UAMH (clado V) carecen de un dominio reductor de liberación, lo cual podría dificultar la liberación de la molécula tras su síntesis. Con el fin de descartar errores bioinformáticos del análisis, se analizaron en más detalle ambas PKS-NR. En el caso de *P. verrucosus*, se confirmó que la enzima PKS-NR posee considerablemente menor tamaño respecto al resto de las PKS-NR identificadas en *Pseudogymnoascus* (Figura 14). Si esto corresponde a un error en la anotación o si corresponde a una pérdida de función, deberá ser corroborado en futuras investigaciones. Por su parte, en *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13 la enzima PKS-NR se encuentra codificada en el borde del *contig* donde está predicho el BCA, por lo que no es claro si corresponde a la secuencia de la enzima completa o no (Figura 14). Por tanto, en este primer análisis no se puede confirmar la razón de la ausencia del dominio reductor. En cualquier caso, la función que cumple puede ser suplida por la presencia de las enzimas serina-hidrolasa presentes en dichos clústeres, por lo que se propone que aún son capaces de llevar a cabo la síntesis del metabolito final (He & Cox, 2016).

Por otro lado, los BCA descritos en *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-103 y *P. verrucosus* UAMH presentan dos enzimas accesorias FAD-monoxigenasa. La

presencia de dos enzimas FAD-monoxigenasa es característica de estos dos BCA, ya que en el resto únicamente hay presente una enzima FAD-monoxigenasa. El origen y confirmación de la participación de la ruta biosintética de azafilonas de la segunda enzima FAD-monoxigenasa necesita de análisis adicionales.

Respecto al resto de las enzimas accesorias, estos BCAs poseen una combinación de enzimas distintas a los BCAs analizados anteriormente. Entre las características distintivas destacan la presencia de una enzima CYP (característica que comparte con los BCA del clado I de *Pseudogymnoascus*), la cual no es frecuente entre los BGCs de azafilonas descritos en otros géneros. En cuanto a las enzimas de tipo óxido-reducción, los BCAs del clado V poseen una enzima ox-red. tipo 3 que es exclusiva de este grupo. Estas enzimas en particular poseen un dominio PFAM PF13561, el cual está clasificado como un dominio perteneciente a enzimas del tipo enoil-reductasa. Si bien estas enzimas podrían cumplir una función similar a las enzimas del tipo ox-red. 2 como está descrito en el clúster de MonAzPs descrito en *Monascus* (Figura 36), poseen el suficiente grado de diferencia en su secuencia aminoacídica para ser clasificados en grupos ortólogos distintos. Similarmente, el BCA descrito en *Pseudogymnoascus* sp. VKM-F3557 posee una enzima del tipo ox-red. 5, al igual que el clúster para la síntesis de azanigeronas en *A. nidulans* (denominada AzaE). AzaE en el clúster para la síntesis de azanigeronas cumpliría una función como enzima ceto-reductasa de manera similar a lo observado en la síntesis de MonAzPs de *Monascus* con la enzima MppA del tipo ox-red. 4 (Figura 38).

Por su parte, los BCAs identificados el clado IV poseen una enzima del tipo ox-red. 18 que es característica de este grupo. Estas enzimas poseen en su secuencia aminoacídica dominios PFAM PF00106. Este dominio está clasificado como de óxido reducción y está presente en múltiples deshidrogenasas, cumpliendo posiblemente un rol en la potencial biosíntesis de azafilonas en este clado.

Finalmente, los BCAs descritos en los clados IV y V posee una enzima que contiene un dominio EthD (Dom. EthD) no descrito anteriormente en la biosíntesis de azafilonas (Figura 16). Este dominio (IPR009799) está descrito formando parte de algunas decarboxilasas como la enzima GedI perteneciente al BGC de biosíntesis de geodina de *Aspergillus terreus*. También se ha vinculado a la función de enzimas betalactamasas que facilitan la liberación de la cadena carboxílica naciente de una enzima PKS (Awakawa y cols., 2014). Esto sugiere que estas enzimas podrían participar en la ruta hipotética para la síntesis de azafilonas en los clados IV y V, aunque se requiere confirmación experimental.

Consideradas en conjunto las características propias de los BCAs pertenecientes a los clados IV y V, sumado a su prevalencia en el género, convierte a estos BCAs en buenos candidatos a sintetizar azafilonas de estructura única y característica del género.

Clado VI

Por último, el clado VI se encuentra conformado solo por el BCA identificado en *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-3775. Este BCA destaca por ser el más lejano al resto de los BGCs descritos para la síntesis de azafilonas. Primero, posee una enzima PKS-NR que carece de dominio cMT y una enzima del tipo FAD-monoxigenasa. Esta ausencia de dominio cMT podría traducirse en la síntesis de un intermediario benzaldehído carente de grupo metilo en el carbono C4, característico en la biosíntesis de azafilonas descritas. El efecto de esta modificación en la posterior hidroxilación por parte de la enzima FAD-monoxigenasa no está claro, por lo que no es posible determinar si este BCA sería capaz de sintetizar el núcleo bicíclico pirano-quinona.

Llamativamente este BCA posee como enzimas principales secundarias dos enzimas del tipo FAS al igual que los BGCs descritos en *Monascus* y *Talaromyces*. Sin embargo, carece de una enzima O-AT que permita transferir la cadena carbonada sintetizada por estas enzimas a la estructura de la molécula.

Respecto a las enzimas accesorias, este BCA al igual que el clúster descrito en el clado III posee 4 enzimas que no se agrupan en el análisis de ortología con las descritas en BGCs para la síntesis de azafilonas, y una enzima ortóloga a CHGG_10025 descrita en el clúster para la síntesis de chaetoglobina de *Chaetomium globosum* (ox-red. 8) (Figura 16). Esta enzima de tipo ox-red. 8 posee un dominio PFAM PF07732 clasificado como una oxidasa dependiente de cobre, y en la síntesis de chaetoglobina se cree puede estar vinculada a la dimerización de la molécula (Nakasawa y cols., 2013).

A modo de síntesis del análisis realizado, los BCA identificados en el género *Pseudogymnoascus* poseen características génicas únicas, sugiriendo que existe un gran potencial de aislamiento de azafilonas de estructura novedosa desde este género.

Desde una perspectiva evolutiva, es interesante destacar la distribución de estos BCAs dentro del género. Como se observa en la Figura 38, la distribución de los BCA en las cepas de *Pseudogymnoascus* estudiadas tiene un carácter discontinuo respecto a los clados filogenéticos establecidos (A-I). De manera simplificada, los clados de dominio KS VI, V, IV, III y II se distribuyen en los clados filogenéticos I, A, G, B y C correspondientemente, donde su diferencia en composición enzimática obedecería a procesos de especiación. La ausencia de BCAs en las cepas de estos mismos clados filogenéticos sugiere la ocurrencia de múltiples eventos de pérdida del clúster, estando completamente ausente en los clados D y H.

Respecto al clado I de BCAs, las dos cepas que poseen estos BGCs se encuentran completamente separadas en el árbol filogenético. Esto sumado a el alto grado de similitud que posee el clúster GymN de la cepa *P. verrucosus* FAE27 con los descritos en *Monascus* y *Talaromyces* sugiere la ocurrencia de eventos de transferencia génica horizontal (HGT) de los BGCs completos. Las diferencias que posee con estos por otro lado podrían explicarse asociado a procesos de especiación y a transferencia de genes particulares desde BCAs

provenientes de *Pseudogymnoascus*, explicando parcialmente la presencia de una PKS-HR en lugar de dos enzimas FAS como en *Monascus*, además de la presencia de enzimas CYP que poseen un carácter más abundante en *Pseudogymnoascus* (Figuras 16 y 38). Esto último corresponde a una hipótesis que necesita, para ser sustentada, una mayor cantidad de evidencia genética y el correspondiente análisis bioinformático.

Este tipo de distribuciones, eventos de pérdida de BGCs completos y especiación no es extraño en hongos filamentosos. Un trabajo reciente realizado con 16 genomas de hongos del género *Botrytis* (también perteneciente a la clase *Leotiomycetes*), describió un patrón complejo de distribución de los BGCs para la síntesis de las fitotoxinas ácido botcinico (clúster BOA) y botridial (clúster BOT) que no puede sustentarse solo en transferencia vertical. Particularmente, en el clúster BOA se observa incluso la pérdida completa del BGC y posterior recuperación por HGT desde otras especies del mismo género (Valero-Jiménez y cols., 2020).

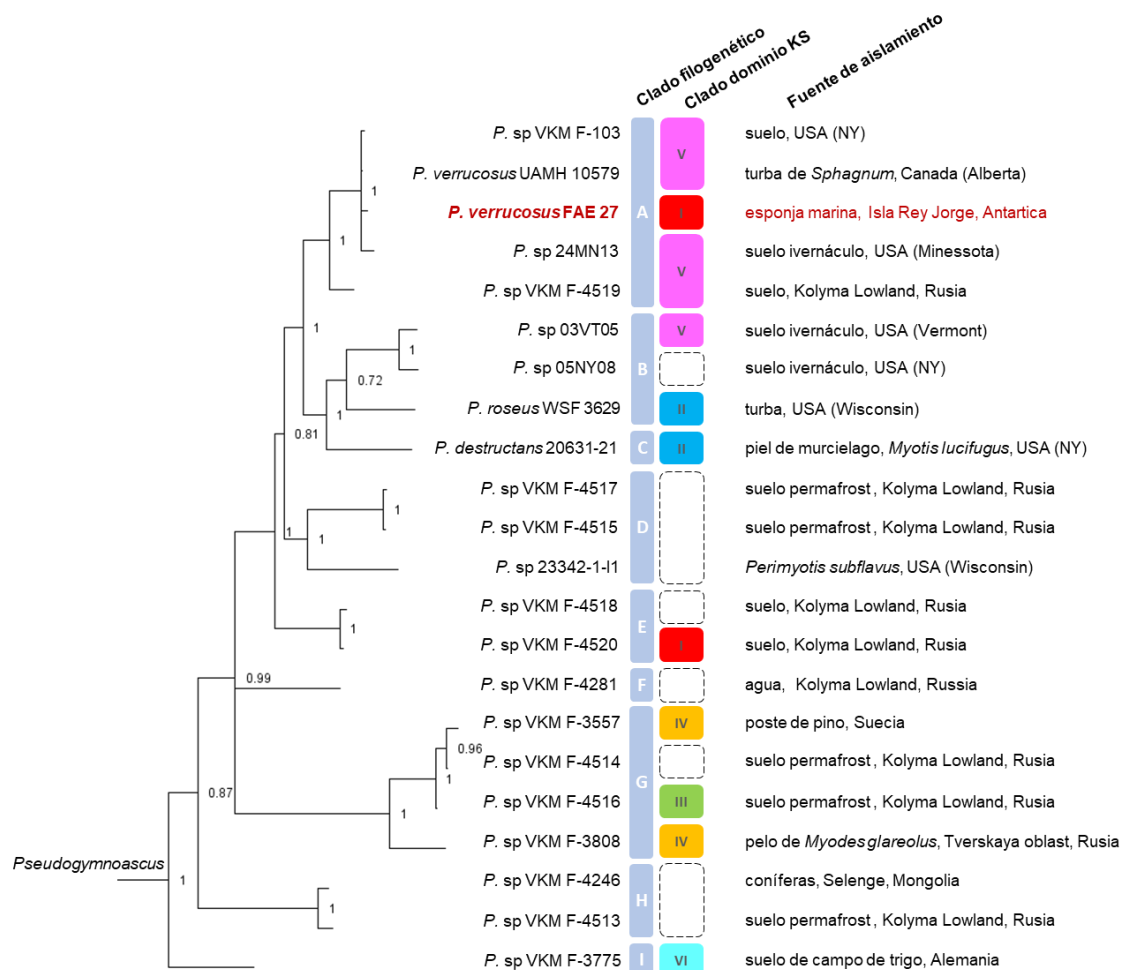


Figura 39. BCAs en el género *Pseudogymnoascus*: distribución según análisis filogenético y análisis de dominios KS de la enzima PKS-NR principal. Fragmento del Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana de *Pseudogymnoascus* generado en base a un concatenado de 5 loci (ITS, LSU, TEF1, RPB2 y MCM7) mostrado en la Figura 9. La distribución de los BCAs y sus correspondientes clados de acuerdo con el análisis de los dominios KS de la enzima PKS-NR se señala en colores. Adicionalmente, se señala la fuente de aislamiento para cada cepa.

En relación con la fuente de aislamiento de las cepas cuyos genomas se analizaron, la mayor parte de estos provienen de cepas aisladas de regiones predominantemente frías, distribuidas entre diferentes países de Europa, destacando Rusia, y aislados obtenidos en Norte América, principalmente USA (Figura 39). Respecto a la presencia de BCAs en el genoma de las cepas estudiadas, no existe una preferencia por determinado nicho ambiental. Entre los clados filogenéticos destaca el clado A por presentar cepas aisladas en USA, Canadá y Rusia. Particularmente, la cepa *P. verrucosus* FAE27 es la única cepa

proveniente del hemisferio sur del planeta, y destaca porque, a pesar de encontrarse filogenéticamente ubicada en el clado A junto a la cepa *P. verrucosus* UAMH, posee un BCA que no se asemeja con los identificados en su mismo clado filogenético. Esto sugiere que, a pesar de pertenecer a una misma especie, cepas aisladas desde regiones distantes geográficamente pueden dar origen a la identificación de nuevos BGCs, y por ende nuevos MS.

Caracterización bioinformática del clúster GymN

Para corroborar la función de cada una de las proteínas codificadas en el clúster GymN, se realizó un análisis de las secuencias aminoacídicas por BLASTP y la base de datos de dominios proteicos de InterPro (Tabla VIII). Como resultado, se observó una concordancia entre las funciones predichas por InterPro y BLASTP con las observadas en el análisis comparativo con los clústeres descritos de azafilonas en otros géneros.

Particularmente, se observó que cuatro de las doce proteínas analizadas pertenecientes al clúster GymN tienen como primer resultado por BLASTP una proteína encontrada en una cepa fúngica de la especie *Hyphodiscus hymeniophilus*.

A diferencia de las estructuras de las azafilonas sintetizadas por hongos del género *Monascus* y *Talaromyces* (MonAzPs), las cuales se sugiere en este trabajo que serían similares estructuralmente a las sintetizadas por *P. verrucosus* FAE27, la hiphodiscorubrina posee un tercer anillo del tipo lactona angular y no lineal, similar al observado en la estructura de la azafilona chaetoviridina E sintetizada por *Chaetomium globosum* (Figura 16). La conformación del anillo lactona en azafilonas es catalizada por una reacción de condensación de Knoevenagel. Esta reacción puede dar tanto origen a un anillo lactona angular o lineal de manera espontánea (Pavesi y cols., 2021). En este contexto, investigaciones con cepas mutantes para diferentes genes de la ruta de biosíntesis de MonAzPs en *Monascus* sugieren que la conformación de un anillo

lactona angular se ve favorecida regioselectivamente en escenarios espontáneos, y que para la conformación de un sistema con un anillo lactona lineal es necesaria la acción de una enzima del tipo oxido-reductasa (MppC) (Figura 38) (Bijinu y cols., 2014). El análisis de enzimas accesorias realizado en este trabajo muestra que solo en los BGCs para la síntesis de MonAzPs en *Monascus* y *Talaromyces*, además del clúster GymN, es posible encontrar una enzima homóloga a MppC (GymNc y PMAA_1010790) (Figura 16 y 38), mientras que en el clúster descrito en *Chaetomium* y *Hyphodiscus*, que dan origen a azafilonas con anillos lactona angulares, esta se encuentra ausente.

En conjunto, la evidencia recolectada sugiere que el clúster GymN presenta tanto similitudes con el clúster identificado en *Hyphodiscus* como con el clúster caracterizado de *Monascus*, y que, por lo tanto, podría dar origen a azafilonas con características de ambos tipos; un sistema con un tercer anillo del tipo lactona lineal como en *Monascus*, y una cadena accesoria de carbonos insaturada como en *Hyphodiscus*.

Silenciamiento del gen *gymNa* en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 e identificación de los pigmentos sintetizados por el clúster GymN

Mediante la transformación de la cepa *P. verrucosus* FAE27 con el plásmido de atenuación pJL-HNa se lograron obtener 8 cepas transformantes con un fenotipo carente de pigmentación, de un total de 60 transformantes seleccionadas al azar. En términos de eficiencia, se obtuvieron un 13,3% de las cepas transformantes con un fenotipo de *Knock-down* del gen *gymNa*, comparable con el obtenido en *Penicillium chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum* que es de un 15 a 20% (Ullán y cols., 2008). De igual manera, se obtuvieron cepas transformantes con un fenotipo de atenuación parcial, confirmado mediante HPLC y qRT-PCR (cepas THNa 3.13 y THNa 4.15).

De las cepas con fenotipo carente de pigmentación, las cepas THNa 2.1, THNa 3.17 y THNa 4.20 fueron seleccionadas para análisis por HPLC y qRT-

PCR. Como resultado, se evidenció que estas cepas carentes de pigmentación presentaron una disminución en el transcrito relativo del gen *gymNa* mayor a 97,3%, concordando con la desaparición completa de un amplio grupo de picos cromatográficos con máximos de absorción cercanos a 535 nm en el análisis realizado por HPLC de extractos obtenidos del agar de cultivos en placa (Figuras 24 y 25).

Por su parte, en las cepas con fenotipos de atenuación parcial, THNa 3.13 y THNa 4.15, se observó la acumulación de un compuesto que presentaba un máximo de absorción a 304 nm y un tiempo de retención de 15,1 min en el análisis cromatográfico (Figura 26). Al no conocer la identidad de este metabolito es difícil determinar la razón de su acumulación. Interrumpir o disminuir el flujo metabólico de una determinada vía, como es este caso, puede ocasionar el aumento del flujo de otras vías. Particularmente con las rutas que involucran enzimas del tipo PKS puede ocurrir este desplazamiento de los flujos debido a que comparte el *pool* de precursores (malonil-CoA y acetil CoA). Sin embargo, de ser el caso, se esperaría ver un fenómeno similar en las cepas con mayor porcentaje de atenuación del gen, complicando el entendimiento de este fenómeno. Al analizar fenotípicamente el conjunto de cepas transformantes con los plásmidos pJL-HNa y pJL-H no se observaron diferencias significativas (Figura 23). De igual manera, tampoco se observaron mayores diferencias, además de la ya mencionada, en los análisis por HPLC de los extractos obtenidos. Para elaborar alguna hipótesis de la razón por la cual se dio la acumulación de este metabolito en concreto sería necesario aislarlo e identificarlo.

En los extractos de las transformantes TH3.3 y TH4.6, transformadas con el plásmido control pJL-H, se observó un compuesto con tiempo de retención de 25,90 min correspondiente al ergosterol (Figura 25 y 26). El ergosterol es una molécula crucial en las membranas de las células fúngicas que corresponde a un componente estructural y aporta fluidez a la membrana celular (Rodrigues, 2018). Si bien su aparición en los cromatogramas obtenidos a partir de extractos de

estas dos cepas podría deberse a diferencias en los procedimientos de extracción entre las cepas, parece ser poco probable debido a que todas las cepas se extrajeron usando el mismo procedimiento, y el ergosterol solo se observa incrementado en estas dos cepas. Además, al corresponder a las cepas transformantes con el plásmido control, se descarta la posibilidad que un efecto en los niveles de transcrito del gen *gymNa* y/o el efecto de esto sobre la producción de pigmentos rojos haya influenciado en la síntesis de ergosterol. Una posible explicación a este fenómeno corresponde a que las cepas transformantes obtenidas tienden a ser resultado de integraciones aleatorias en el genoma que pueden o no repercutir en el fenotipo de la cepa si la integración conlleva la interrupción de determinado *locus* (Takeda y cols., 2018). Los plásmidos empleados no poseen secuencias que permitan su replicación autónoma, y tampoco poseen secuencias que, mediante similitud de secuencia, dirijan su integración al genoma mediante un evento de recombinación homóloga. Como se observó un aumento en la presencia de ergosterol similar en ambas cepas transformantes TH3.3 y TH4.6, para poder confirmar si la integración se realizó en un mismo locus sería necesario poder realizar una secuenciación de genoma para cada una de estas cepas.

Como se mencionó anteriormente, el clúster GymN posee un alto grado de similitud a los descritos en *Monascus* y *Talaromyces*. En varias cepas de estos géneros se ha reportado la síntesis de más de un tipo de azafilonas como productos de los BGCs descritos. Particularmente, Chen y colaboradores en el año 2019 publicaron un trabajo en donde se correlacionó la síntesis de 111 MonAzPs con el único BGC descrito en *Monascus* que sintetizaba las seis azafilonas identificadas inicialmente en este género. La síntesis de este ingente número de azafilonas, fueron atribuidas a reacciones del tipo aminación, degradación, apertura de anillos y ciclaciones espontáneas, entre otras (Chen y cols., 2019), que suceden en el propio medio de producción, y por tanto, no necesariamente son resultados de procesos catalizados exclusivamente por las

enzimas que están configuradas en el clúster. Así, se propone que procesos similares podrían ocurrir cuando se cultiva la cepa *P. verrucosus* FAE27 en medio PDA, y se observan no la aparición de un número concreto de compuestos que absorben por encima de los 500 nm, sino un número indefinido de estos con tiempos de retención muy similares que en el cromatograma correspondiente adquiere la forma de una loma (Figuras 25 y 28).

En resumen, mediante la técnica de RNAi se logró comprobar experimentalmente que la enzima del tipo PKS-NR GymNa participa en la producción de una familia de pigmentos rojos en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. Además, este trabajo es el primer ejemplo de uso de la técnica de RNAi para el estudio de biosíntesis de azafilonas (estudiadas hasta ahora mediante la técnica de *knock-out*, expresión heteróloga y ensayos enzimáticos *in-vitro* (Chen y cols., 2019)), y a la vez también, el primer ejemplo de estudio funcional génico en el género *Pseudogymnoascus*.

Purificación del (los) pigmento (s) sintetizados por el clúster GymN en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

La purificación de los compuestos que absorben a 530 nm desde extractos obtenidos en placas de PDA de la cepa *P. verrucosus* FAE27 es muy compleja. Como se concluyó en la sección anterior, la existencia de múltiples tipos de reacciones a partir de los intermediarios de la ruta de biosíntesis de azafilonas que se producen en el medio de reacción, hace que por la acción de esta única vía se produzcan un elevado número de compuestos, lo cual se traduce en complejos cromatogramas donde se evidencia la presencia de muchos picos cromatográficos. Por otro lado, cuanto más diversificada es la ruta, hace que los compuestos producidos estén presentes en menor concentración. Ello lo podemos evidenciar en la baja absorción obtenida (Figuras 25 y 28). Por último, la presencia de otros compuestos en el mismo extracto, procedentes de otras

vías metabólicas, que coeluyen en los mismos tiempos de retención, hacen que los procesos de purificación sean muy complejos de abordar (Figura 29). En este complicado contexto, y con el fin de elucidar al menos un compuesto de la familia de los pigmentos sintetizados por la cepa *P. verrucosus* FAE27, se planteó purificar y elucidar estructuralmente un intermediario de la vía, en lugar de los productos finales, para obtener así, información del núcleo estructural de esta familia de pigmentos.

Como se observa en la ruta biosintética de azafilonas en *Monascus*, un punto importante de diversificación se da por la aminación de pigmentos anaranjados como rubropunctatina y monascorubrina, debido al intercambio del átomo de oxígeno en el anillo quinona por un átomo de nitrógeno proveniente de un ion amonio o de aminas primarias, como es el caso de los aminoácidos, presentes en los medios de cultivo (Figura 8). Es por ello que, con el objetivo de facilitar el aislamiento de un intermediario de la ruta previo a esta ramificación por aminación, se decidió realizar cultivos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 en el medio definido Czapek Dox, cuya fuente de nitrógeno es nitrato de sodio (NaNO_3) suplementado con almidón (Cz-S). De esta manera, se espera que al no haber una alta disponibilidad de ion amonio y/o aminoácidos libres, se acumule uno de los intermediarios previos de la ruta cuya coloración sea de una tonalidad anaranjada.

Esta aproximación se ha utilizado exitosamente para el aislamiento de azafilonas en cepas del género *Penicillium* y *Talaromyces*, en donde se ha logrado dirigir la biosíntesis de azafilonas induciendo la acumulación de intermediarios de la ruta, evitando así la producción de mezclas de azafilonas cuya composición es altamente dependiente del medio de cultivo (Hebra y cols., 2023; Tolborg y cols., 2020).

Como resultado, y mediante esta aproximación, en este trabajo se lograron identificar dos compuestos con máximos de absorción cercanos a los 450 nm, tiempos de retención de 6,78 y 7,80 min y masas de m/z 385,2486 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y m/z

427,2597 [M+H]⁺, respectivamente (Figura 30 y 34). La comparación de los perfiles metabólicos de los extractos de la cepa nativa a 450 nm con la cepa atenuante THNa 2.1 permitió determinar que estos metabolitos serían sintetizados por el clúster GymN, ya que no se encuentran presentes en la cepa atenuante THNa2.1, al igual que ocurría con la amplia familia de pigmentos rojos observados al crecer ambas cepas en medio PDA (Figura 28).

Mediante análisis de espectrometría MS/MS, y por comparación de los patrones de fraccionamiento de ambas moléculas, se planteó que estas estarían estructuralmente relacionadas. En los espectros de fragmentación de ambas moléculas se puede observar, a las tres energías de ionización registradas, la prevalencia de, a lo menos, 4 iones mayoritarios comunes que se mantienen constantes, los iones m/z 229,15, m/z 183,07-187,14, m/z 135,11 y m/z 107,08 (con sus respectivas variaciones bajo los 3 decimales) (Figura 34).

Respecto a la determinación de posibles fórmulas moleculares (Tabla IX) y la presencia de dos átomos de nitrógeno en la estructura de los posibles intermediarios de la ruta, al indagar en la estructura de las 676 azafilonas reportadas (Pavesi y cols., 2021), entre las azafilonas nitrogenadas no se encontró una que tuviese átomos de nitrógeno presenten en su estructura además de las incorporadas tras una reacción de intercambio entre el átomo de oxígeno del anillo pirano con un átomo de nitrógeno de una molécula con una amina primaria, por lo que esta correspondería a una característica única.

Como se mencionó anteriormente, los iones m/z 385,2486 [M+H]⁺ y m/z 427,2597 [M+H]⁺ están probablemente relacionados estructuralmente dada la concordancia de sus espectros de fragmentación. Adicionalmente, al comparar las fórmulas moleculares predichas para ambas moléculas se observa que la diferencia entre estas corresponde a C₂H₂O (Δ 42). Esta diferencia podría corresponder a la incorporación de un grupo acetilo, por lo que considerando todos los antecedentes, el ion m/z 427,2597 podría ser el compuesto de m/z 385,2486 acetilado.

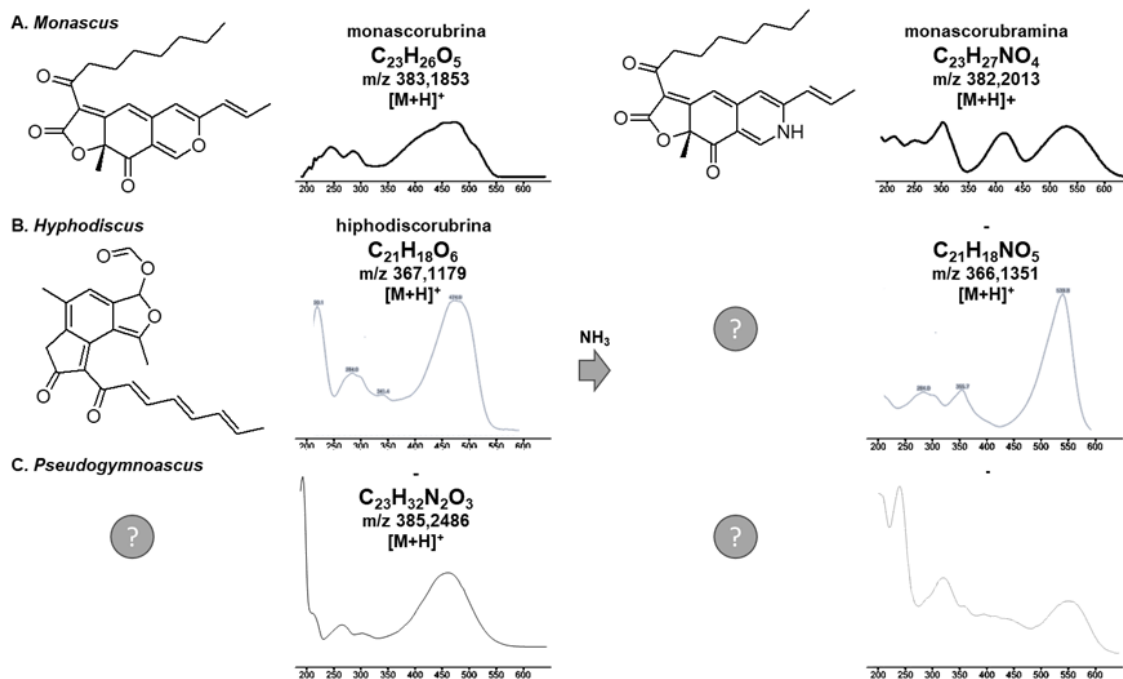


Figura 40. Cambios en el espectro de absorción de los pigmentos sintetizados en *Monascus*, *Hyphodiscus* y *Pseudogymnoascus* tras la aminación característica descrita para azafilonas. A. Estructura, fórmula y espectro UV de monascorubrina y monascorubramina (modificado desde Rasmussen, 2015); **B.** Estructura, fórmula y espectro UV de la hiphodiscorubrina y su correspondiente molécula nitrogenada (modificado desde Kramer y cols, 2020); **C.** Fórmula y espectro UV del metabolito correspondiente al ion 385,2486 $[M+H]^+$ y uno de los pigmentos sintetizados por *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 en medio PDA.

Finalmente, al analizar el cambio en el espectro UV-visible en el paso de monascorubrina a monascorubramina en *Monascus*, tras la aminación de la molécula se observa el cambio de un máximo de absorción cercano a los 450 nm a poseer dos máximos de absorción, uno cercano a 400 nm y otro entre 500-550 nm (Figura 40). Esto mismo es observado en los pigmentos de *Talaromyces* y *Aspergillus*. Sin embargo, en los pigmentos sintetizados por *Pseudogymnoascus* se observa en el posible intermediario anaranjado de m/z 385,2486 $[M+H]^+$ un máximo de absorción cercano a los 450 nm, y en los pigmentos rojos obtenidos de extractos desde medio PDA un máximo de absorción cercano a los 550 nm. Interesantemente, estos perfiles son muy similares a los descritos para la hiphodiscorubrina, ya que la hiphodiscorubrina presenta un máximo de absorción cercano a 450 nm, el cual se desplaza a 550 nm al aminarse (Figura 40) (Kramer

y cols., 2020). Esto sugiere que el sistema conjugado de los pigmentos sintetizados por *Pseudogymnoascus* sería similar al observado en la estructura de la hiphodiscorubrina.

A modo de síntesis, aunando la discusión de los resultados obtenidos desde aproximaciones tanto bioinformáticas y químicas, se puede hacer una propuesta de las características estructurales de los pigmentos sintetizados por *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27. Por un lado, bioinformáticamente se sugiere que los pigmentos sintetizados por la cepa FAE27 corresponderían a azafilonas con un tercer anillo del tipo lactona lineal dada la presencia del gen *gymNc* (Ox-red. 7) en el clúster GymN, el cual se ha vinculado a la formación de un anillo de tipo lactona en la síntesis de MonAzPs. Se sugiere además que la cadena carbonada accesoria no correspondería a una cadena completamente saturada dada la presencia del gen *gymNb* (PKS-HR), codificante para una enzima con un elevado porcentaje de similitud aminoacídica con la enzima PKS-HR de *Hyphodiscus*. Estos resultados se condicen en parte con los obtenidos desde una perspectiva química. Por un lado, al analizar los espectros UV-visible observados en azafilonas producidas por *Monascus* e *Hyphodiscus*, los pigmentos sintetizados por la cepa FAE27 poseerían un sistema conjugado similar al observado en la hiphodiscorubrina, con una cadena completamente insaturada, sin embargo, la hiphodiscorubrina posee un anillo lactona angular, no concordando con lo propuesto desde una perspectiva bioinformática. Así, considerando lo descrito, es indispensable aislar al menos uno de los pigmentos sintetizados por la cepa *P. verrucosus* FAE27 en una cantidad suficiente para poder caracterizarlo estructuralmente mediante resonancia magnética nuclear y dilucidar su estructura inequívocamente.

Caracterización de los extractos acuosos pigmentados obtenidos de la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27

La solubilidad de un pigmento y su estabilidad frente a amplios rangos de temperatura y pH son características cruciales a la hora de determinar posibles aplicaciones de estos. En particular, los pigmentos de tipo azafilona aislados desde *Monascus* poseen problemas de estabilidad a pH bajo limitando el rango de sus aplicaciones, lo cual ha incentivado la búsqueda de maneras de mejorar su estabilidad mediante la modificación de la estructura de estos o el aislamiento de azafilonas de estructura similar desde otras cepas fúngicas (de Oliveira y cols., 2022; Liu y cols., 2021). De igual manera, la solubilidad en solventes acuosos es una característica deseada tanto por facilitar los procesos de extracción como para su uso en aplicaciones como pigmentos alimenticios. Es por ello que se ha tratado de mejorar la solubilidad en agua de los pigmentos de *Monascus* mediante reacciones de sulfonación (Liu y cols., 2020).

En este trabajo se caracterizó la estabilidad de los pigmentos extraídos en agua de la cepa *P. verrucosus* FAE27 frente a rangos amplios de temperatura y pH. Como resultado, se obtuvo que la pigmentación se mantuvo estable en los rangos testeados. Respecto a su solubilidad, al realizar extractos desde agar pigmentado liofilizado se observó que la mayor cantidad de coloración fue obtenida tras extraer con agua (Figura 33), indicando el alto carácter polar de los pigmentos sintetizados por *P. verrucosus* FAE27.

Usualmente dentro de los protocolos para el aislamiento y purificación de pigmentos de tipo azafilona desde un extracto acuoso se incluye un paso de extracción líquido-líquido en el cual se utiliza acetato de etilo acidificado, obteniéndose una fracción de acetato de etilo enriquecida en azafilonas (de Oliveira y cols., 2022; Tolborg y cols., 2020; Wu y cols., 2013). En este trabajo también se probó dicha extracción, pero no se logró obtener una fracción orgánica enriquecida de pigmentos (Anexo 14), quedando estos

mayoritariamente en la fase acuosa. Ello sugiere fuertemente un mayor carácter polar de los pigmentos sintetizados por *P. verrucosus* FAE27. De igual manera también se ha reportado la extracción de azafilonas producidas en *Monascus purpureus* desde micelio seco, empleando etanol 95%, etanol 60% y agua destilada. Los mejores resultados se obtuvieron con el etanol 60%, seguido de etanol 95%, y por último agua destilada, la cual tuvo un rendimiento cercano al 5% en relación con la cantidad de pigmento extraída con etanol 60% (Daud y cols., 2020). Este resultado contrasta con lo observado en este trabajo, donde las extracciones desde agar liofilizado con agua muestran ser la mejor metodología de extracción (Figura 35).

Por último, en el trabajo realizado por Kramer y cols. en el año 2020, se logró purificar el metabolito hiphodiscorubrina a partir de una extracción desde micelio en placa tan solo con acetato de etilo 100%. Considerando la evidencia obtenida durante este trabajo, la hiphodiscorubrina sería uno de los candidatos a asemejarse de mejor manera a los pigmentos sintetizados por la cepa *P. verrucosus* FAE27. Sin embargo, en el proceso de purificación del ion m/z 385,2486 $[M+H]^+$ se evidenció que la polaridad de esta molécula no permite llevar a cabo su extracción solo con este solvente, necesitando la presencia de un solvente de mayor polaridad como metanol (Figura 32 y Anexo 7).

Al no conocer la estructura de los pigmentos sintetizados por la cepa *P. verrucosus* FAE27 no es posible determinar que característica en su estructura o grupos funcionales pudiesen contribuir a esta mayor solubilidad en solventes acuosos en comparación a sus contrapartes sintetizadas en *Monascus* o *Hyphodiscus*. Sin embargo, como se mencionó anteriormente en la discusión, los iones m/z 385,2486 $[M+H]^+$ y m/z 427,2597 $[M+H]^+$, candidatos a intermediarios de la ruta biosintética de estos pigmentos en la cepa FAE27, poseen fórmulas propuestas con dos átomos de nitrógeno que podrían estar formando parte de grupos funcionales que aumenten la polaridad de estas moléculas.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos del análisis bioinformático de los genomas del género *Pseudogymnoascus*, se determinó que *Pseudogymnoascus* es un nuevo género productor de azafilonas. Tras el análisis de la composición enzimática de los BGCs identificados, se determinó la existencia de 6 clados de BCAs, cada uno de ellos con el potencial de sintetizar azafilonas de estructura novedosa y distinta entre sí.

El clúster GymN identificado en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 es único dentro de los BCAs identificados en el género *Pseudogymnoascus*. Si bien posee un alto grado de similitud a los descritos en los géneros *Monascus*, *Talaromyces* e *Hyphodiscus*, el análisis de las enzimas que lo componen sugiere que sintetiza azafilonas de estructura completamente distinta.

En la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27, se vinculó la función del clúster GymN con la producción de pigmentos rojos mediante el silenciamiento del gen *gymNa*.

Se logró la caracterización de dos pigmentos anaranjados candidatos a ser intermediarios de la ruta biosintética de azafilonas en la cepa *P. verrucosus* FAE27. Si bien su elucidación estructural no fue posible, mediante el análisis de sus espectros UV, MS/MS y formulas moleculares propuestas, se determinó que presentarían características estructurales únicas en comparación a las descritas en *Monascus* e *Hyphodiscus*.

Tanto los pigmentos rojos como anaranjados obtenidos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 poseen un carácter polar mayor a los reportados en la literatura en *Monascus*, *Talaromyces* e *Hyphodiscus*, siendo principalmente solubles en agua. Los pigmentos rojos además son estables en un rango amplio de temperaturas y pH.

Finalmente, este trabajo describe el primer análisis genético funcional en una cepa del género *Pseudogymnoascus*, y cimienta tanto las bases moleculares como químicas, para el estudio de la producción de azafilonas en el género.

PROYECCIONES

El estudio del potencial de biosíntesis de metabolitos secundarios en el género fúngico *Pseudogymnoascus* es aún muy incipiente. Particularmente, a la fecha no existen trabajos que describan su potencial como productores de metabolitos pertenecientes a la familia de las azafilonas. Desde una perspectiva evolutiva, el estudio bioinformático de los BCAs descritos en *Pseudogymnoascus* en este trabajo aportará información interesante para el estudio del origen y evolución de esta familia de BGCs en el filo de los *Ascomycetes*.

Previo a este trabajo no se contaba con ningún estudio que demostrara el uso de herramientas de biología molecular para el estudio funcional génico en *Pseudogymnoascus*, y por tanto en el contexto de estudio de su metabolismo secundario. Es por ello que se espera que este trabajo sirva de base para el estudio del metabolismo secundario en *Pseudogymnoascus* mediante el uso de ARN de interferencia o técnicas similares de edición genética.

Como se mencionó durante el desarrollo de la discusión de este trabajo, es necesaria la elucidación estructural de los pigmentos estudiados, y de esta manera validar los resultados de las aproximaciones bioinformáticas y químicas desarrolladas en este trabajo. En este sentido los datos proporcionados en este trabajo servirán de guía para el desarrollo de las metodologías necesarias.

La síntesis de metabolitos secundarios en hongos filamentosos conforma parte del repertorio evolutivo que poseen estos microorganismos para adaptarse frente a diferentes situaciones propias del nicho ecológico en el cual estos se

desarrollan. En ese sentido las azafilonas son de interés biotecnológico debido a su amplio repertorio de actividades biológicas. Sin embargo, pocos casos han sido descritos de su producción en un contexto de interacción con otros microorganismos. Un ejemplo corresponde al del hongo micoparásito *Trichoderma guizhouense* que sintetiza las azafilonas trigazaafilonas como mecanismo de defensa contra estrés oxidativo al antagonizar al hongo *Fusarium oxysporum* (Pang y cols 2020). En este sentido, la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 fue aislada desde una esponja marina en las costas de la Isla Rey Jorge (Antártida), por este motivo es difícil determinar a cuál corresponde el nicho ecológico al que pertenece debido a que las esporas de esta cepa pueden haber quedado atrapadas en dicha esponja dado su proceso natural de filtración de grandes cantidades de agua. Para poder asociar la producción de azafilonas en la cepa *Pseudogymnoascus verrucosus* FAE27 con alguna interacción con otro microorganismo sería interesante enfrentar esta cepa con otras cepas fúngicas o bacterianas aisladas desde nichos ecológicos similares.

Desde una perspectiva biotecnológica, los pigmentos fúngicos del tipo azafilona que hoy se comercializan son producidos por cepas de los géneros *Monascus* y *Talaromyces*, ambos géneros considerados GRAS (siendo el primero comercializado principalmente en regiones asiáticas). En este contexto el género *Pseudogymnoascus* es un género que recientemente se ha comenzado a estudiar desde una perspectiva química, por lo que para que un producto derivado de este género pueda ser comercializado debe pasar aún por múltiples pruebas de seguridad y toxicidad.

Finalmente, en ese trabajo no se exploraron las posibles actividades biológicas de los pigmentos sintetizados por la cepa en estudio, lo cual quedará pospuesto para un futuro trabajo. Esta actividad ha de incentivarse debido a las características estructurales únicas descritas en este trabajo de los pigmentos estudiados. Es debido a esta diversidad estructural presente en las azafilonas que las convierte en una fuente de MS con un amplio abanico de actividades

biológicas, destacando actividades antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria, inhibición enzimática, antioxidante y antiviral. Ejemplo de esto último corresponde a el hallazgo reciente de azafilonas capaces de inhibir la unión de la proteína *spike* del virus SARS-CoV-2 al receptor ACE2, dando cuenta el enorme potencial que aún alberga esta familia de metabolitos (Jansen-Olliges y cols., 2022).

REFERENCIAS

- Afroz Toma, M., Rahman, M. H., Rahman, M. S., Arif, M., Nazir, K. N. H., & Dufossé, L. (2023). Fungal Pigments: Carotenoids, Riboflavin, and Polyketides with Diverse Applications. *Journal of Fungi*, 9(4), 454. doi: 10.3390/jof9040454.
- Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Diversity*, 50(1),3. doi: 10.1007/s13225-011-0116-y.
- Antipova, T. V., Zaitsev, K. V., Zhelifonova, V. P., Tarlachkov, S. V., Grishin, Y. K., Kochkina, G. A., & Vainshtein, M. B. (2023). The Potential of Arctic *Pseudogymnoascus* Fungi in the Biosynthesis of Natural Products. *Fermentation*, 9(8), 702. doi: 10.3390/fermentation9080702.
- Awakawa, T., Yokota, K., Funa, N., Doi, F., Mori, N., Watanabe, H., & Horinouchi, S. (2009). Physically discrete β -lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochryson synthesis by iterative type I polyketide synthase. *Chemistry & biology*, 16(6), 613-623. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.04.004.
- Balakrishnan, B., Karki, S., Chiu, S. H., Kim, H. J., Suh, J. W., Nam, B., Yoon, Y.M., Chen, C.C. & Kwon, H. J. (2013). Genetic localization and in vivo characterization of a *Monascus azaphilone* pigment biosynthetic gene cluster. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 6337-6345. doi: 10.1007/s00253-013-4745-9.
- Bijinu, B., Suh, J. W., Park, S. H., & Kwon, H. J. (2014). Delineating *Monascus azaphilone* pigment biosynthesis: oxidoreductive modifications determine the ring cyclization pattern in azaphilone biosynthesis. *Rsc Advances*, 4(103), 59405-59408. doi: 10.1039/c4ra11713a.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic acids research*, 49(W1), W29-W35. doi: 10.1093/nar/gkab335.
- Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21-32. doi: 10.1038/nrmicro2916.
- Cappellini L. T., Goering, A. W., Thomson, R. J., Metcalf, W. W., Kelleher, N. L., Barona-Gomez, F. & Medema, M. H. (2020). A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature chemical biology*, 16(1), 60-68. doi: 10.1038/s41589-019-0400-9.
- Chaturvedi, V., DeFiglio, H., & Chaturvedi, S. (2018). Phenotype profiling of white-nose syndrome pathogen *Pseudogymnoascus destructans* and closely-related *Pseudogymnoascus pannorum* reveals metabolic differences underlying fungal lifestyles. *F1000Research*, 7. doi: 10.12688/f1000research.15067.
- Chávez, R., Fierro, F., García-Rico, R. O. & Vaca, I. (2015). Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Frontiers in microbiology*, 6, 903. doi: 10.3389/fmicb.2015.00903.
- Chen, W., Chen, R., Liu, Q., He, Y., He, K., Ding, X., Kang, L., Guo, X., Xie, N., Zhou, Y., Lu, Y., Cox, R., Molnár, I., Li, M., Shao, Y. & Chen, F. (2017). Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *Chemical Science*, 8(7), 4917-4925. doi: 10.1039/c7sc00475c.
- Chen, W., Feng, Y., Molnár, I. & Chen, F. (2019). Nature and nurture: confluence of pathway determinism with metabolic and chemical serendipity diversifies *Monascus azaphilone* pigments. *Natural product reports*, 36, 561. doi: 10.1039/c8np00060c.

Chen, C., Tao, H., Chen, W., Yang, B., Zhou, X., Luo, X., & Liu, Y. (2020). Recent advances in the chemistry and biology of azaphilones. *RSC Advances*, 10(17), 10197-10220. doi: 10.1039/D0RA00894J.

Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Keller, N., Oakley, B. R., & Wang, C. C. (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8), 2965-2970. doi: 10.1021/ja8088185.

Cox, R. J. (2023). Curiouser and curiouser: progress in understanding the programming of iterative highly-reducing polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 40(1), 9-27. doi: 10.1039/D2NP00007E

Crawford, J. M., & Townsend, C. A. (2010). New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), 879-889. doi: :10.1038/nrmicro2465.

de Oliveira, F., Rocha, I. L., Pinto, D. C. G. A., Ventura, S. P., Dos Santos, A. G., Crevelin, E. J., & Ebinuma, V. D. C. S. (2022). Identification of azaphilone derivatives of *Monascus colorants* from *Talaromyces amestolkiae* and their halochromic properties. *Food Chemistry*, 372, 131214. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131214.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 27:1164-1165, 2011. doi: 10.1093/bioinformatics/btr088.

Daud, N. F. S., Said, F. M., Ramu, M., & Yasin, N. M. H. (2020). Evaluation of bio-red pigment extraction from *Monascus purpureus* FTC5357. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 736, No. 2, p. 022084). IOP Publishing. doi: 10.1088/1757-899X/736/2/022084.

Duarte, A. W. F., de Menezes, G. C. A., e Silva, T. R., Bicas, J. L., Oliveira, V. M. & Rosa, L. H. (2019). Antarctic fungi as producers of pigments. In Rosa L. (eds) *Fungi of Antarctica*, 305. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-030-18367-7_14.

Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S. A. & Sutthiwong, N. (2014). Filamentous fungi are large scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 56. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.007.

Dufossé, L. (2022). Back to nature, microbial production of pigments and colorants for food use. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 102, pp. 93-122). Academic Press. doi: 10.1016/bs.afnr.2022.04.008.

Durairaj, P., Hur, J. S., & Yun, H. (2016). Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microbial cell factories*, 15(1), 1-16. doi: 10.1186/s12934-016-0523-6.

Elkhateeb, W., & Daba, G. (2023). Fungal Pigments: Their Diversity, Chemistry, Food and Non-Food Applications. *Applied Microbiology*, 3(3), 735-751. doi: 10.3390/applmicrobiol3030051.

Ehrlich, K. C., Chang, P. K., Yu, J., & Cotty, P. J. (2004). Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6518-6524. doi 10.1128/AEM.70.11.6518-6524.2004.

Fan, Y., Liu, X., Keyhani, N. O., Tang, G., Pei, Y., Zhang, W., & Tong, S. (2017). Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), E1578-E1586. doi: 10.1073/pnas.1616543114.

Figueroa, L., Jiménez, C., Rodríguez, J., Areche, C., Chávez, R., Henríquez, M., de la Cruz, M., Díaz, C., Segade, Y. & Vaca, I. (2015). 3-Nitroasterric acid derivatives from an Antarctic sponge-

- derived *Pseudogymnoascus* sp. fungus. *Journal of natural products*, 78, 919. doi: 10.1021/np500906k.
- Fujita, K., Ikuta, M., Nishimura, S., Sugiyama, R., Yoshimura, A., & Takeya, H. (2021). Amphiol, an antifungal fungal pigment from *Pseudogymnoascus* sp. PF1464. *Journal of Natural Products*, 84(4), 986-992. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c01010.
- Gao, J. M., Yang, S. X., & Qin, J. C. (2013). Azaphilones: chemistry and biology. *Chemical reviews*, 113(7), 4755-4811. doi: 10.1021/cr300402y.
- Gessler, N. N., Egorova, A. S., & Belozerskaya, T. A. (2014). Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, 105-113. doi: 10.1134/S0003683814020094.
- Gilchrist, C. L., & Chooi, Y. H. (2021). Clinker & clustermap. js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, 37(16), 2473-2475. doi: 10.1093/bioinformatics/btab007.
- Greco, C., Keller, N. P., & Rokas, A. (2019). Unearthing fungal chemodiversity and prospects for drug discovery. *Current opinion in microbiology*, 51, 22-29. doi: 10.1016/j.mib.2019.03.002.
- Gürses, A., Açıkyıldız, M., Güneş, K., Gürses, M.S. (2016). Dyes and pigments: their structure and properties. *Dyes and pigments*, 13-29. doi: 10.1007/978-3-319-33892-7_2.
- Han, X., Gao, H., Lai, H., Zhu, W., & Wang, Y. (2023). Anti-A β 42 Aggregative Polyketides from the Antarctic Psychrophilic Fungus *Pseudogymnoascus* sp. OUCMDZ-3578. *Journal of Natural Products*, 86(4), 882-890. doi: 10.1021/acs.jnatprod.2c01101.
- He, Y., & Cox, R. J. (2016). The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi. *Chemical science*, 7(3), 2119-2127. doi: 10.1039/c5sc04027b.
- Hebra, T., Eparvier, V., & Touboul, D. (2023). Nitrogen Enriched Solid-State Cultivation for the Overproduction of Azaphilone Red Pigments by *Penicillium sclerotiorum* SNB-CN111. *Journal of Fungi*, 9(2), 156. doi: 10.3390/jof9020156.
- Henríquez, M., Vergara, K., Norambuena, J., Beiza, A., Maza, F., Ubilla, P., Araya, I., Chávez, R., San Martín, A., Darías, J., Darías, M.J & Vaca, I. (2014). Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World journal of microbiology and biotechnology*, 30(1), 65-76. doi: 10.1007/s11274-013-1418-x.
- Herbst, D. A., Townsend, C. A., & Maier, T. (2018). The architectures of iterative type I PKS and FAS. *Natural product reports*, 35(10), 1046-1069. doi: 10.1039/C8NP00039E.
- Hou, X., Li, C., Zhang, R., Li, Y., Li, H., Zhang, Y., Tae, H.S., Yu, R., Che, Q., Zhu, T., Li, D. & Zhang, G. (2022). Unusual Tetrahydropyridoindole-Containing Tetrapeptides with Human Nicotinic Acetylcholine Receptors Targeting Activity Discovered from Antarctica-Derived Psychrophilic *Pseudogymnoascus* sp. HDN17-933. *Marine Drugs*, 20(10), 593. doi: 10.3390/md20100593.
- Houbraken, J., de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in applied microbiology*, 86, 199-249. doi: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4.
- Huang, X., Zhang, W., Tang, S., Wei, S., & Lu, X. (2020). Collaborative biosynthesis of a class of bioactive azaphilones by two separate gene clusters containing four PKS/NRPSs with transcriptional crosstalk in fungi. *Angewandte Chemie*, 132(11), 4379-4383. doi: 10.1002/anie.201915514.

- Ichinose, H. (2014). Metabolic diversity and cytochromes P450 of fungi. In: Yamazaki, H. (eds) *Fifty Years of Cytochrome P450 Research*. Springer, Tokyo. doi: 10.1007/978-4-431-54992-5_11.
- Isbrandt, T., Tolborg, G., Ødum, A., Workman, M., & Larsen, T. O. (2020). Atrorosins: a new subgroup of *Monascus* pigments from *Talaromyces atrovirens*. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 615-622. doi: 10.1007/s00253-019-10216-3.
- Jansen-Olliges, L., Chatterjee, S., Jia, L., Stahl, F., Bär, C., Stadler, M., Surup, F. & Zeilinger, C. (2022). Multiformin-Type Azaphilones Prevent SARS-CoV-2 Binding to ACE2 Receptor. *Cells*, 12(1), 83. doi: 10.3390/cells12010083.
- Kalra, R., Conlan, X. A., & Goel, M. (2020). Fungi as a potential source of pigments: harnessing filamentous fungi. *Frontiers in Chemistry*, 8, 369. doi: 10.3389/fchem.2020.00369.
- Kang, B., Zhang, X., Wu, Z., Wang, Z., & Park, S. (2014). Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. *Enzyme and microbial technology*, 55, 50-57. doi:
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010.
- Keatinge-Clay, A. T. (2012). The structures of type I polyketide synthases. *Natural product reports*, 29(10), 1050-1073. doi: 10.1039/C2NP20019H.
- Kramer, G. J., Pimentel-Elardo, S., & Nodwell, J. R. (2020). Dual-PKS Cluster for Biosynthesis of a Light-Induced Secondary Metabolite Found from Genome Sequencing of *Hyphodiscus hymeniophilus* Fungus. *ChemBioChem*, 21(15), 2116-2120. doi: 10.1002/cbic.201900689.
- Kroken, S., Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15670-15675. doi: 10.1073/pnas.2532165100.
- Kumara, N. T. R. N., Lim, A., Lim, C. M., Petra, M. I. & Ekanayake, P. (2017). Recent progress and utilization of natural pigments in dye sensitized solar cells: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 301. doi: 10.1016/j.rser.2017.04.075.
- Lagashetti, A. C., Dufossé, L., Singh, S. K., & Singh, P. N. (2019). Fungal pigments and their prospects in different industries. *Microorganisms*, 7(12), 604. doi: 10.3390/microorganisms7120604.
- Lechner, M., Findeiß, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P. F., & Prohaska, S. J. (2011). Proteinortho: detection of (co-) orthologs in large-scale analysis. *BMC bioinformatics*, 12(1), 1-9. doi: 10.1186/1471-2105-12-124.
- Lin, S. H., Yoshimoto, M., Lyu, P. C., Tang, C. Y., & Arita, M. (2012). Phylogenomic and domain analysis of iterative polyketide synthases in *Aspergillus* species. *Evolutionary Bioinformatics*, 8, EBO-S9796. doi: 10.4137/EBO.S9796.
- Lin, L., & Xu, J. (2022). Production of fungal pigments: Molecular processes and their applications. *Journal of Fungi*, 9(1), 44. doi: 10.3390/jof9010044.
- Liu, L., Wu, S., Wang, W., Zhang, X., & Wang, Z. (2020). Sulfonation of *Monascus* pigments to produce water-soluble yellow pigments. *Dyes and Pigments*, 173, 107965. doi: 10.1016/j.dyepig.2019.107965.

- Liu, L., Zhang, X., & Wang, Z. (2021). Highly efficient production of tailored *Monascus* pigments by using a biocompatible chemical reaction interfacing with microbial metabolism. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(8), 3347-3356. doi: 10.1021/acssuschemeng.0c09422.
- Lorch, J. M., Meteyer, C. U., Behr, M. J., Boyles, J. G., Cryan, P. M., Hicks, A. C., Ballmann, A. E., Coleman, J. T. H., Redell, D. N., Reeder, D. M. & Blehert, D. S. (2011). Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature*, 480(7377), 376-378. doi: 10.1038/nature10590.
- Mapari, S. A., Thrane, U. & Meyer, A. S. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural foodcolorants?. *Trends in biotechnology*, 28, 300. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.03.004.
- Mascuch, S. J., Moree, W. J., Hsu, C. C., Turner, G. G., Cheng, T. L., Blehert, D. S., Kilpatrick, A. M., Frick, W. F., Meeham, M. J., Dorrestein, P. C. & Gerwick, L. (2015). Direct detection of fungal siderophores on bats with white-nose syndrome via fluorescence microscopy-guided ambient ionization mass spectrometry. *PloS one*, 10(3), e0119668. doi: 10.1371/journal.pone.0119668.
- Minnis, A. M., & Lindner, D. L. (2013). Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal biology*, 117(9), 638-649. doi: 10.1016/j.funbio.2013.07.001.
- Navarro-Muñoz, J. C., Selem-Mojica, N., Mallowney, M. W., Kautsar, S. A., Tryon, J. H., Parkinson, E. I., De los Santos, E.L.C., Yeong, M., Cruz-Morales, P., Abubucker, S., Roeters, A., Lokhorst, W., Fernandez-Guerra, A., Cappellini, L.T.D., Goering, A.W., Thomson, R.J., Metcalf, W.W., Kelleher, N.L., Barona-Gomez, F. & Medema, M. H. (2020). A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature chemical biology*, 16(1), 60-68. doi: 10.1038/s41589-019-0400-9.
- Oliva, V. (2019). Estudio de genes codificantes para enzimas policétido sintasa de la cepa fúngica antártica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB. Tesis para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. oai: repositorio.uchile.cl:2250/168440.
- Osmanova, N., Schultze, W. & Ayoub, N. (2010). Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 9, 315. doi: 10.1007/s11101-010-9171-3.
- Paguirigan, J. A. G., Kim, J. A., Hur, J. S., & Kim, W. (2023). Identification of a biosynthetic gene cluster for a red pigment cristazarin produced by a lichen-forming fungus *Cladonia metacorallifera*. *Plos one*, 18(6), e0287559. doi: 10.1371/journal.pone.0287559.
- Palmer, J. M., & Keller, N. P. (2010). Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter?. *Current opinion in microbiology*, 13(4), 431-436. doi: 10.1016/j.mib.2010.04.008.
- Pang, G., Sun, T., Yu, Z., Yuan, T., Liu, W., Zhu, H., Gao, Q., Yang, D., Kubicek, C.P., Zhang, J. & Shen, Q. (2020). Azaphilones biosynthesis complements the defence mechanism of *Trichoderma guizhouense* against oxidative stress. *Environmental Microbiology*, 22(11), 4808-4824. doi: 10.1111/1462-2920.15246.
- Parish, C. A., Cruz, M. D. L., Smith, S. K., Zink, D., Baxter, J., Tucker-Samaras, S., Collado, J., Platas, G., Bills, G., Díez, M.T., Vicente, F., Pelaéz, F. & Wilson, K. (2008). Antisense-guided isolation and structure elucidation of pannomycin, a substituted cis-decalin from *Geomyces pannorum*. *Journal of natural products*, 72, 59. doi: 10.1021/np800528a.
- Pavesi, C., Flon, V., Mann, S., Leleu, S., Prado, S., & Franck, X. (2021). Biosynthesis of azaphilones: a review. *Natural Product Reports*, 38(6), 1058-1071. doi: 10.1039/D0NP00080A.
- Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S, Grego T, Pinto BL, Salazar GA, Bileschi ML, Bork P, Bridge A, Colwell L, Gough J, Haft DH, Letunić I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Orenge CA,

- Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A (2022). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, Nov 2022. doi: 10.1093/nar/gkac993.
- Pimenta, L. P., Gomes, D. C., Cardoso, P. G., & Takahashi, J. A. (2021). Recent findings in azaphilone pigments. *Journal of Fungi*, 7(7), 541. doi: 10.3390/jof7070541.
- Rasmussen, K. B. (2015). *Talaromyces atrovirens*: Genome sequencing, Monascus pigments and azaphilone gene cluster evolution. PhD Thesis, Technical University of Denmark.
- Robey, M. T., Caesar, L. K., Drott, M. T., Keller, N. P., & Kelleher, N. L. (2021). An interpreted atlas of biosynthetic gene clusters from 1,000 fungal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(19), e2020230118. doi: 10.1073/pnas.2020230118.
- Rodrigues, M. L. (2018). The multifunctional fungal ergosterol. *MBio*, 9(5), 10-1128. doi: 10.1128/mBio.01755-18.
- Rokas, A., Wisecaver, J. H., & Lind, A. L. (2018). The birth, evolution and death of metabolic gene clusters in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 731-744. doi: 10.1038/s41579-018-0075-3.
- Rokas, A., Mead, M. E., Steenwyk, J. L., Raja, H. A., & Oberlies, N. H. (2020). Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. *Natural product reports*, 37(7), 868-878. doi: 10.1039/c9np00045c.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542. doi: 10.1093/sysbio/sys029.
- Sayed, A. M., Hassan, M. H., Alhadrami, H. A., Hassan, H. M., Goodfellow, M. & Rateb, M. E. (2019). Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of applied microbiology*. doi: 10.1111/jam.14386.
- Shi, T., Yu, Y. Y., Dai, J. J., Zhang, Y. T., Hu, W. P., Zheng, L., & Shi, D. Y. (2021)^a. New polyketides from the Antarctic fungus *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11. *Marine Drugs*, 19(3), 168. doi: 10.3390/md19030168.
- Shi, T., Li, X. Q., Zheng, L., Zhang, Y. H., Dai, J. J., Shang, E. L., Yu, Y. Y., Zhang, Y. T., Hu, W. P. & Shi, D. Y. (2021)^b. Sesquiterpenoids from the Antarctic fungus *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11. *Frontiers in Microbiology*, 12, 688202. doi: 10.3389/fmicb.2021.688202.
- Shi, T., Zheng, L., Li, X. Q., Dai, J. J., Zhang, Y. T., Yu, Y. Y., Hu, W. P. & Shi, D. Y. (2021)^c. Nitrogenous Compounds from the Antarctic Fungus *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11. *Molecules*, 26(9), 2636. doi: 10.3390/molecules26092636.
- Shimizu, Y., Ogata, H., & Goto, S. (2017). Type III polyketide synthases: functional classification and phylogenomics. *ChemBioChem*, 18(1), 50-65. doi: 10.1002/cbic.201600522.
- Smith, S., & Tsai, S. C. (2007). The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural product reports*, 24(5), 1041-1072. doi: 10.1039/B603600G.
- Takeda, A. K., Udagawa, H., Uemura, Y., & Takagi, S. (2018). Identifying the inserted locus of randomly integrated expression plasmids by whole-genome sequencing of *Aspergillus* strains. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 82(11), 1880-1888. doi: 10.1080/09168451.2018.1506312.

- Terlouw, B. R., Blin, K., Navarro-Munoz, J. C., Avalon, N. E., Chevrette, M. G., Egbert, S., Lee, S., Meijer, D., Recchia, M.J.J., & Medema, M. H. (2023). MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic acids research*, 51(D1), D603-D610.
- Tolborg, G., Ødum, A. S., Isbrandt, T., Larsen, T. O., & Workman, M. (2020). Unique processes yielding pure azaphilones in *Talaromyces atroroseus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 603-613. doi: 10.1007/s00253-019-10112-w.
- Vaca, I. & Chávez, R. (2019). Bioactive Compounds Produced by Antarctic Filamentous Fungi. In Rosa L. (eds) *Fungi of Antarctica*, 265. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-030-18367-7_12.
- Valero-Jiménez, C. A., Steentjes, M. B., Slot, J. C., Shi-Kunne, X., Scholten, O. E., & van Kan, J. A. (2020). Dynamics in secondary metabolite gene clusters in otherwise highly syntenic and stable genomes in the fungal genus *Botrytis*. *Genome biology and evolution*, 12(12), 2491-2507. doi: 10.1093/gbe/evaa218.
- Villanueva, P., Vásquez, G., Gil-Durán, C., Oliva, V., Díaz, A., Henríquez, M., Álvarez, E., Laich, F., Chávez, R. & Vaca, I. (2021). Description of the first four species of the genus *Pseudogymnoascus* from Antarctica. *Frontiers in microbiology*, 12, 713189. doi: 10.3389/fmicb.2021.713189.
- Williams, K., Greco, C., Bailey, A. M., & Willis, C. L. (2021). Core steps to the azaphilone family of fungal natural products. *ChemBioChem*, 22(21), 3027-3036. doi: 10.1002/cbic.202100240.
- Winter, J. M., Sato, M., Sugimoto, S., Chiou, G., Garg, N. K., Tang, Y., & Watanabe, K. (2012). Identification and characterization of the chaetoviridin and chaetomugilin gene cluster in *Chaetomium globosum* reveal dual functions of an iterative highly-reducing polyketide synthase. *Journal of the American Chemical Society*, 134(43), 17900-17903. doi: 10.1021/ja3090498.
- Woo, P. C., Lam, C. W., Tam, E. W., Leung, C. K., Wong, S. S., Lau, S. K., & Yuen, K. Y. (2012). First discovery of two polyketide synthase genes for mitorubrinic acid and mitorubrinol yellow pigment biosynthesis and implications in virulence of *Penicillium marneffei*. doi: 10.1371/journal.pntd.0001871.
- Wu, M. D., Cheng, M. J., Yech, Y. J., Chen, Y. L., Chen, K. P., Yang, P. H., Chen, S.I. & Yuan, G. F. (2013). Monascusazaphilones A–C, three new azaphilone analogues isolated from the fungus *Monascus purpureus* BCRC 38108. *Natural Product Research*, 27(13), 1145-1152. doi: 10.1080/14786419.2012.715289.
- Zabala, A. O., Xu, W., Chooi, Y. H., & Tang, Y. (2012). Discovery and characterization of a silent gene cluster that produces azaphilones from *Aspergillus niger* ATCC 1015 reveal a hydroxylation-mediated pyran-ring formation. *Chemistry & biology*, 19(8), 1049. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.07.004.
- Zhen, Z., Xiong, X., Liu, Y., Zhang, J., Wang, S., Li, L., & Gao, M. (2019). NaCl inhibits citrinin and stimulates *Monascus* pigments and monacolin K production. *Toxins*, 11(2), 118. doi: 10.3390/toxins11020118

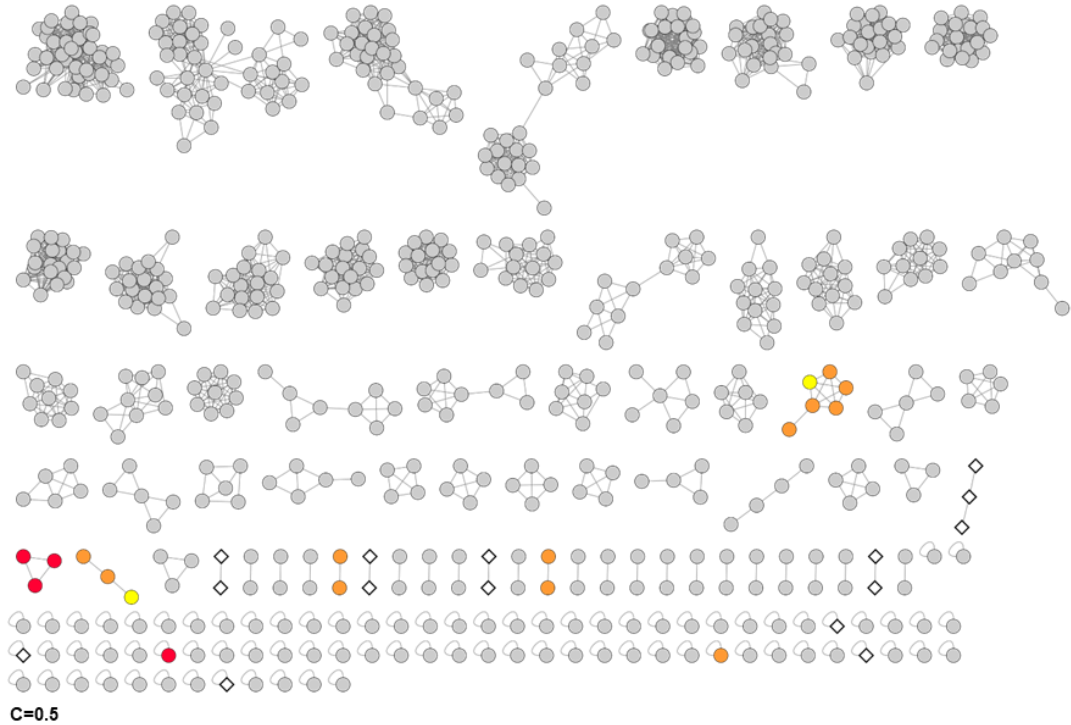
ANEXOS

Anexo 1. Secuencia de los marcadores moleculares ITS, LSU, MCM7, RPB2 y TEF1 de las cepas fúngicas del género *Pseudogymnoascus* estudiadas en este trabajo. En la Tabla se indica o el número de acceso GenBank de los marcadores o la región del genoma en que se encuentra dicho marcador, la cual fue identificada mediante BLAST.

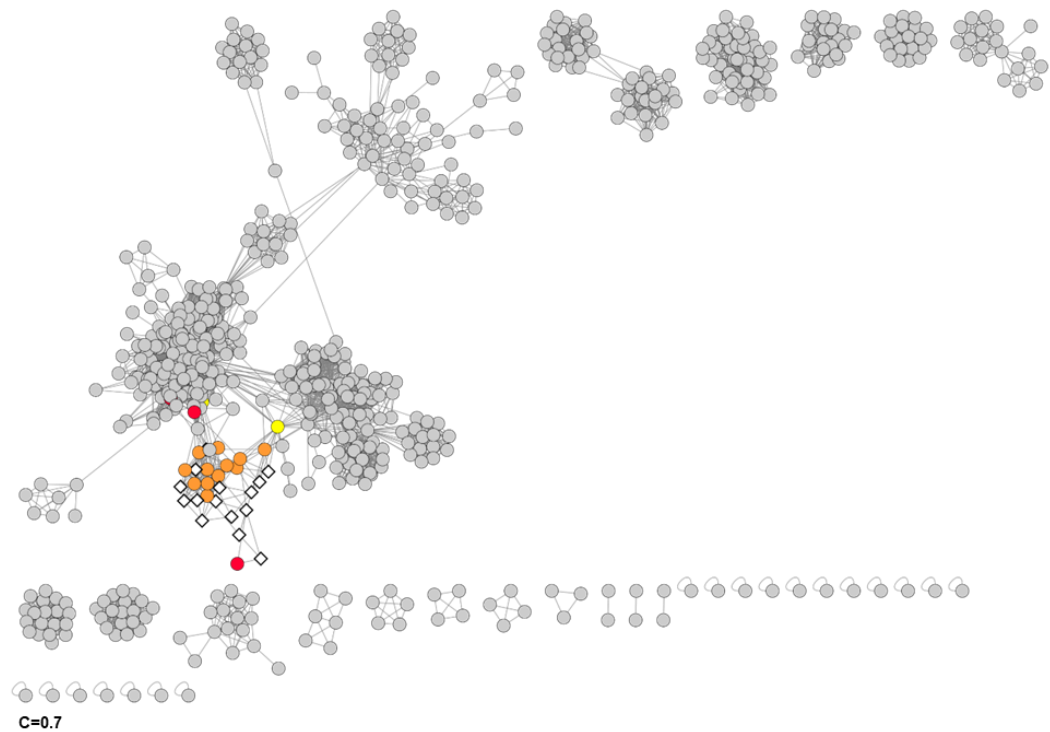
Cepa	ITS	LSU	MCM7	RPB2	TEF1	Genoma
<i>P. destructans</i> 20631-21	EU884921	KF017865	KF017691	KF017747	KF017806	GCA_001641265.1
<i>P. sp.</i> 03VT05	KF039892	KF017820	KF017651	KF017705	KF017760	GCA_001662645.1
<i>P. sp.</i> 05NY08	JX270387	KF017825	KF017656	KF017710	KF017765	GCA_001662605.1
<i>P. sp.</i> 23342-1-11	LAJL01000014 156311-156374	-	LAJL01000012 140968-141470	LAJL01000151 233339-234103	LAJL01000062 26827-27625	GCA_001662575.1
<i>P. sp.</i> 24MN13	JX270621	KF017861	KF017687	KF017743	KF017802	GCA_001662595.1
<i>P. sp.</i> VKM F-103	JPKB01001524 1-440	JPKB0100152 4 560-1413	JPKB01001753 13559-14177	JPKB01001744 6668-7432	JPKB01001786 12082-12985	GCA_000750895.1
<i>P. sp.</i> VKM F-3557	JPJS01003284 503-1004	JPJS0100328 4 1101-1913	JPJS01000543 6602-7220	JPJS01001480 6094-6857	JPJS01000667 1539-2390	GCA_000750665.1
<i>P. sp.</i> VKM F-3775	JPJT01006801 2205-2706	JPJT0100680 1 2803-3615	JPJT01006817 1917-2535	JPJT01004817 6048-6812	JPJT01000524 8398-9301	GCA_000750715.1
<i>P. sp.</i> VKM F-3808	-	-	JPJR01000532 3466-4084	JPJR01000009 6304-7067	JPJR01001397 1916-2767	GCA_000750675.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4246	JPJU01003588 1 - 463	JPJU0100358 8 560-1757	JPJU01001151 12991-13609	JPJU01001166 6541-7304	JPJU01001757 36097-36948	GCA_000750735.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4281 (FW-2241)	-	-	JPJV01000788 3323-3941	JPJV01001849 6265-709	JPJV01002434 10709-11613	GCA_000750745.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4513 (FW-928)	JPJW01003315 2732 - 3233	JPJW010033 15 3330-4527	JPJW01003405 13000-13618	JPJW01003387 6612-7375	JPJW01002286 35463-36314	GCA_000750755.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4514 (FW-929)	JPJX01002711 206-707	JPJX0100281 2 1-973	JPJX01000952 6565-7183	JPJX01000486 13808-14571	JPJX01001337 38159-39010	GCA_000750795.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4515 (FW-2607)	JPJY01002228 1-461	JPJY0100223 0 1317-120	JPJY01001926 10180-10798	JPJY01001107 31637-32401	JPJY01000966 11435-12339	GCA_000750805.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4516 (FW-969)	JPJZ01000403 39-540	JPJZ0100040 3 637-1900	JPJZ01001160 122430-123048	JPJZ01001010 37944-38707	JPJZ01001204 23011-23862	GCA_000750815.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4517 (FW-2822)	JPKA01004704 393-710	JPKA0100425 5 1-372	JPKA01001860 11910-12528	JPKA01001781 31538-32302	JPKA01000311 3625-4529	GCA_000750875.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4518 (FW-2643)	JPKC01003371 3392-3854	JPKC010033 71 3295-2098	JPKC01002610 5374-5992	JPKC01002504 15434-16197	JPKC01002322 23212-24117	GCA_000750925.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4519 (FW-2642)	JPKD01002957 1-463	JPKD010029 57 560-1757	JPKD01003285 3140-3758	JPKD01003264 6238-7002	JPKD01003322 11861-12764	GCA_000750935.1
<i>P. sp.</i> VKM F-4520 (FW-2644)	JPKE01002613 37652-37745	JPKE0100310 1 1-372	JPKE01002801 11023-11641	JPKE01003069 15191-15954	JPKE01002324 21914-22818	GCA_000750995.1
<i>P. sp.</i> WSF 3629	KF039897	KF017870	KF017696	KF017751	KF017811	GCA_001662585.1
<i>P. verrucosus</i> UAMH 10579	NR_111197	-	LAJO01000005 296387-297005	LAJO01000014 85965-86729	LAJO01000120 25355-26258	GCA_001662655.1

Anexo 2. Caracterización de los genomas del género *Pseudogymnoascus* utilizados en este trabajo

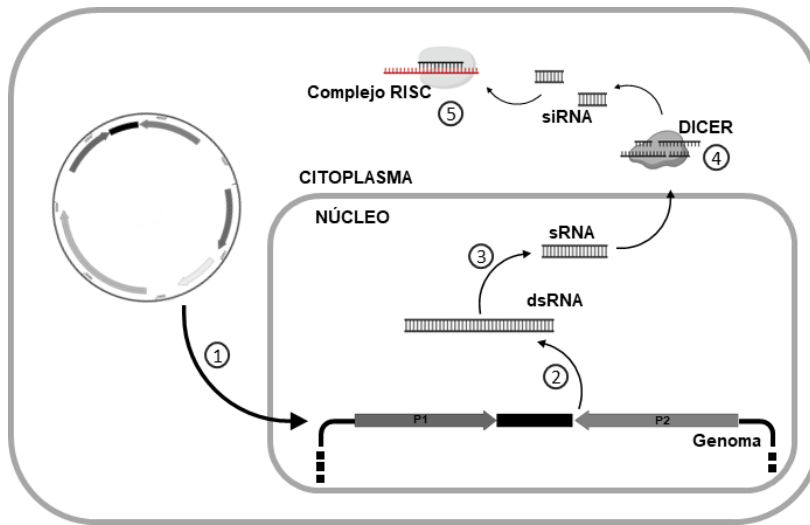
Cepa	Tamaño genoma (Mb)	N 50 (Kb)	N° scaffolds	GC %	Genes	Proteínas codificantes	GenBank	Fuente de aislamiento
<i>P. destructans</i> M1379	30.3	17.7	5304	49.5	-	-	GCA_000496955.1	piel de murciélago, <i>Myotis lucifugus</i> , USA (NY)
<i>P. pannorum</i> M1372	29.5	87	971	50.5	-	-	GCA_000497305.1	suelo, USA (CA)
<i>P. destructans</i> 20631-21	35.8	1200	86	49	9620	9405	GCA_001641265.1	piel de murciélago, <i>Myotis lucifugus</i> , USA (NY)
<i>P. pannorum</i> ATCC 16222	30.5	266.2	595	49.5	-	-	GCA_001630605.1	suelo de campo de trigo, Alemania
<i>P. sp.</i> 03VT05	33.3	115.5	856	49	10393	10252	GCA_001662645.1	Suelo de invernáculo, USA (Vermont)
<i>P. sp.</i> 04NY16	31.3	28.6	3118	50	-	-	GCA_001630575.1	invernáculo de murciélago, cueva, USA (NY)
<i>P. sp.</i> 05NY08	32.2	205.2	571	49.5	10669	10514	GCA_001662605.1	Suelo de invernáculo, USA (NY)
<i>P. sp.</i> 23342-1-11	32.9	289.6	978	50	10914	10762	GCA_001662575.1	<i>Perimyotis subflavus</i> , USA (Wisconsin)
<i>P. sp.</i> 24MN13	30.2	24.1	2827	50	10368	10368	GCA_001662595.1	suelo de invernáculo, USA (Minnesota)
<i>P. sp.</i> BL308	31.4	56.9	3125	50.5	-	-	GCA_001630595.1	piel de murciélago, <i>Myotis lucifugus</i> , USA
<i>P. sp.</i> BL549	25.8	39.5	2100	51	-	-	GCA_001630585.1	piel de murciélago, <i>Myotis lucifugus</i> , USA
<i>P. sp.</i> VKM F-103	30.3	45.3	1794	50	9802	9802	GCA_000750895.1	suelo, USA (NY)
<i>P. sp.</i> VKM F-3557	27.6	20	3339	50	9482	9482	GCA_000750665.1	poste de pino, Suecia
<i>P. sp.</i> VKM F-3775	28.5	8.2	6880	48.5	9472	9472	GCA_000750715.1	suelo de campo de trigo, Alemania
<i>P. sp.</i> VKM F-3808	27.8	17.5	3534	50	9929	9929	GCA_000750675.1	pelo de <i>Myodes glareolus</i> , Tverskaya oblast, Rusia
<i>P. sp.</i> VKM F-4246	25.8	19.5	3685	51	8540	8540	GCA_000750735.1	coníferas, Selenge, Mongolia
<i>P. sp.</i> VKM F-4281 (FW-2241)	26.5	19	3783	50.5	8728	8728	GCA_000750745.1	agua, Kolyma Lowland, Russia
<i>P. sp.</i> VKM F-4513 (FW-928)	26.4	22.8	3425	50.5	8669	8669	GCA_000750755.1	suelo permafrost, Kolyma Lowland, Rusia
<i>P. sp.</i> VKM F-4514 (FW-929)	27	20.8	3221	50	8865	8865	GCA_000750795.1	suelo permafrost, Kolyma Lowland, Rusia
<i>P. sp.</i> VKM F-4515 (FW-2607)	32	36.6	2437	50	10676	10676	GCA_000750805.1	suelo permafrost, Kolyma Lowland, Rusia
<i>P. sp.</i> VKM F-4516 (FW-969)	27.6	55.2	1601	50	9363	9363	GCA_000750815.1	suelo permafrost, Kolyma Lowland, Rusia
<i>P. sp.</i> VKM F-4517 (FW-2822)	32.9	24	5378	50	10744	10744	GCA_000750875.1	suelo permafrost, Kolyma Lowland, Rusia
<i>P. sp.</i> VKM F-4518 (FW-2643)	35.5	27.3	3669	50	11619	11619	GCA_000750925.1	suelo, Kolyma Lowland, Rusia
<i>P. sp.</i> VKM F-4519 (FW-2642)	32.6	24.5	3348	50	10630	10630	GCA_000750935.1	suelo, Kolyma Lowland, Rusia
<i>P. sp.</i> VKM F-4520 (FW-2644)	34.1	19.9	4294	50	11551	11551	GCA_000750995.1	suelo, Kolyma Lowland, Rusia
<i>P. roseus</i> WSF 3629	35.5	189.9	409	48.5	11193	11033	GCA_001662585.1	turba, USA (Wisconsin)
<i>P. verrucosus</i> UAMH 10579	30.2	446.3	151	50	10715	10573	GCA_001662655.1	turba de <i>Sphagnum</i> , Canada (Alberta)
<i>P. verrucosus</i> FAE27	35.9	879.7	88	50	11858	11482	-	esponja marina, Isla Rey Jorge, Antártica



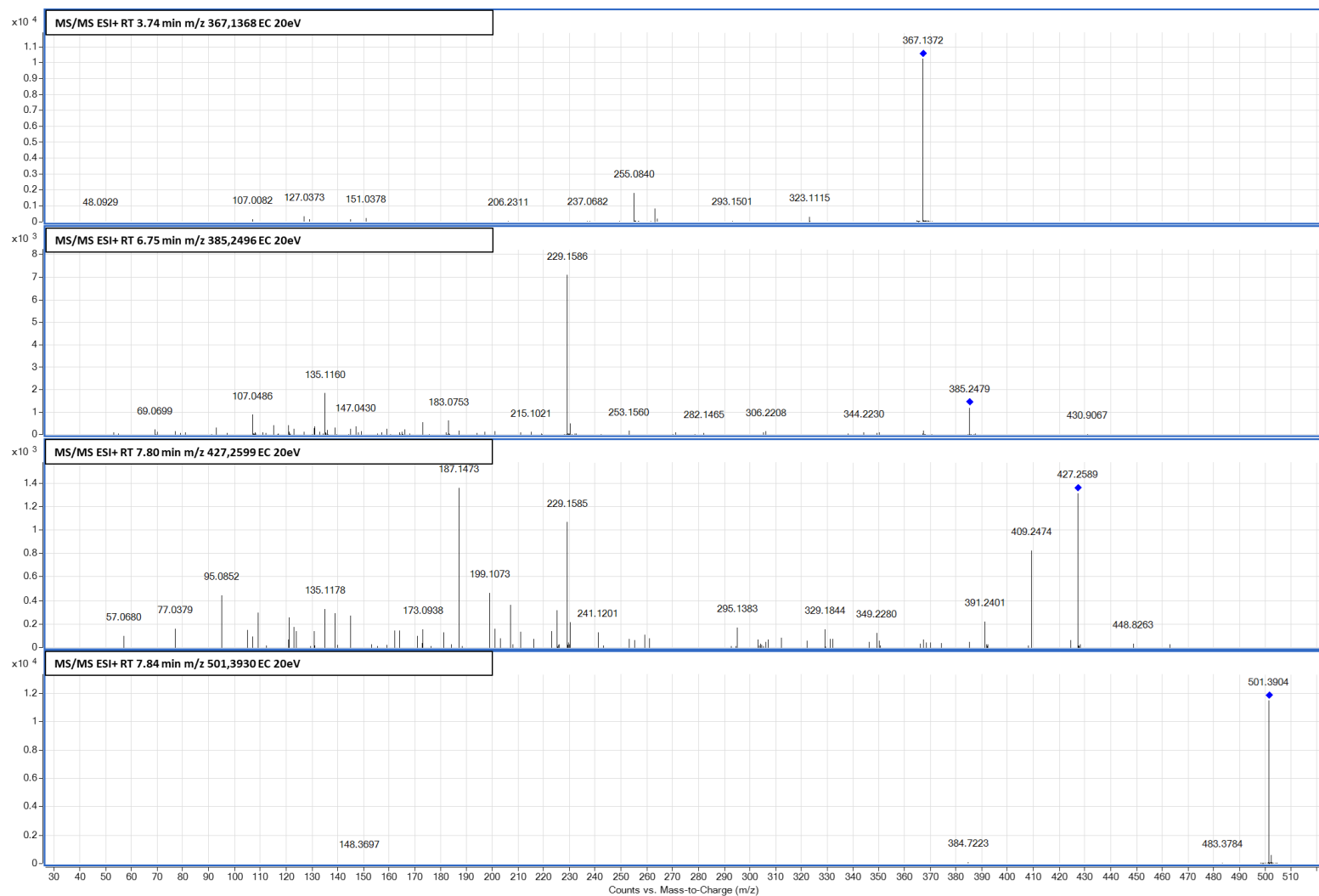
Anexo 3. Red de similitud de secuencia (SNN) de los 631 BGCs identificados en los genomas de *Pseudogymnoascus* (círculos). Para la identificación de BGCs de azafilonas por agrupación con la herramienta BiG-SCAPE (BS) ($c=0.5$) se incorporaron adicionalmente los 15 BGCs descritos para la síntesis de azafilonas (rombos blancos) (Tabla x2). Rojo: BCAs asignados por antiSMASH; Amarillo: BCAs asignados por agrupación en BiG-SCAPE; Naranja: BCAs asignados por antiSMASH y agrupación de BiG-SCAPE.



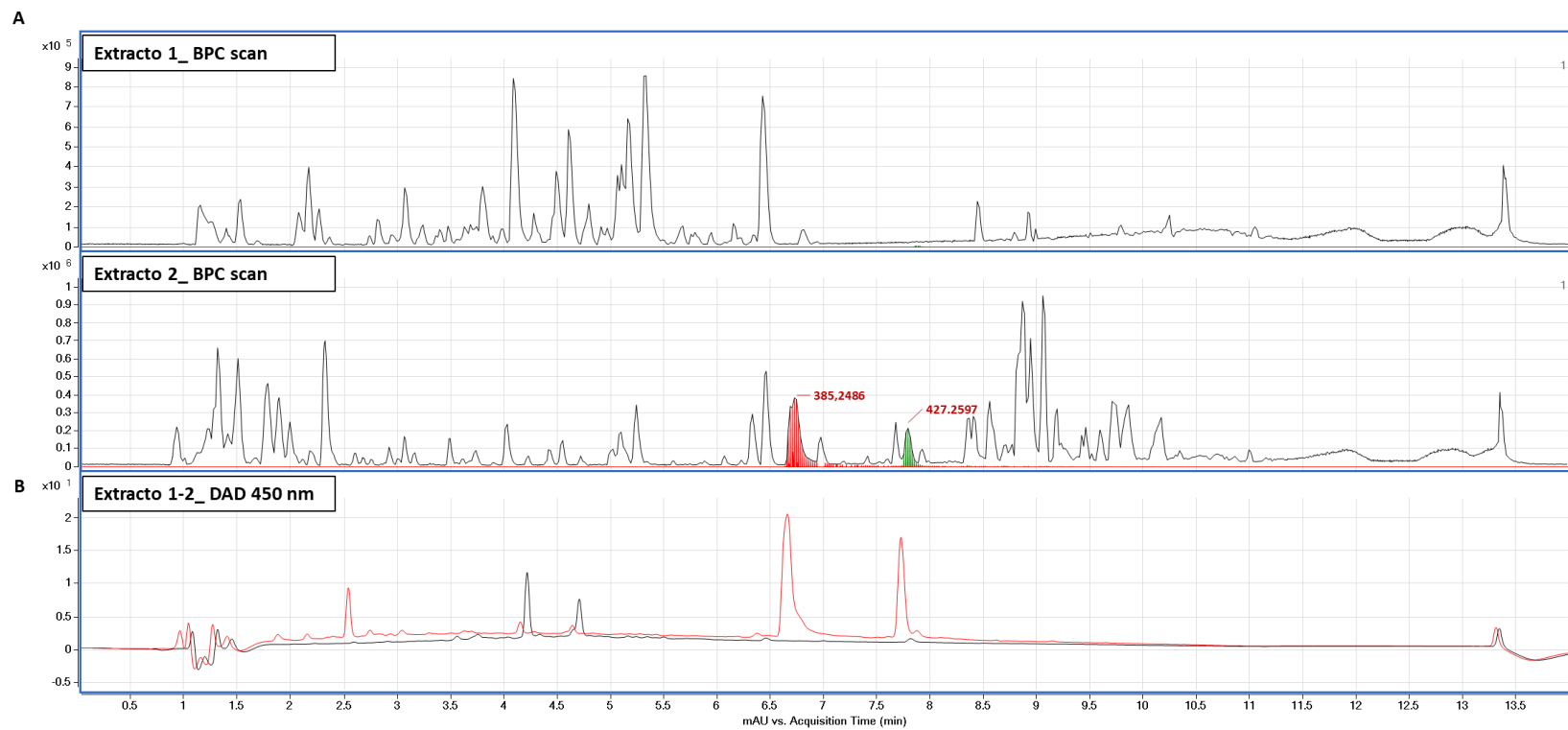
Anexo 4. Red de similitud de secuencia (SNN) de los 631 BGCs identificados en los genomas de *Pseudogymnoascus* (círculos). Para la identificación de BGCs de azafilonas por agrupación con la herramienta BiG-SCAPE (BS) ($c=0.7$) se incorporaron adicionalmente los 15 BGCs descritos para la síntesis de azafilonas (rombos blancos) (Tabla x2). Rojo: BCAs asignados por antiSMASH; Amarillo: BCAs asignados por agrupación en BiG-SCAPE; Naranja: BCAs asignados por antiSMASH y agrupación de BiG-SCAPE.



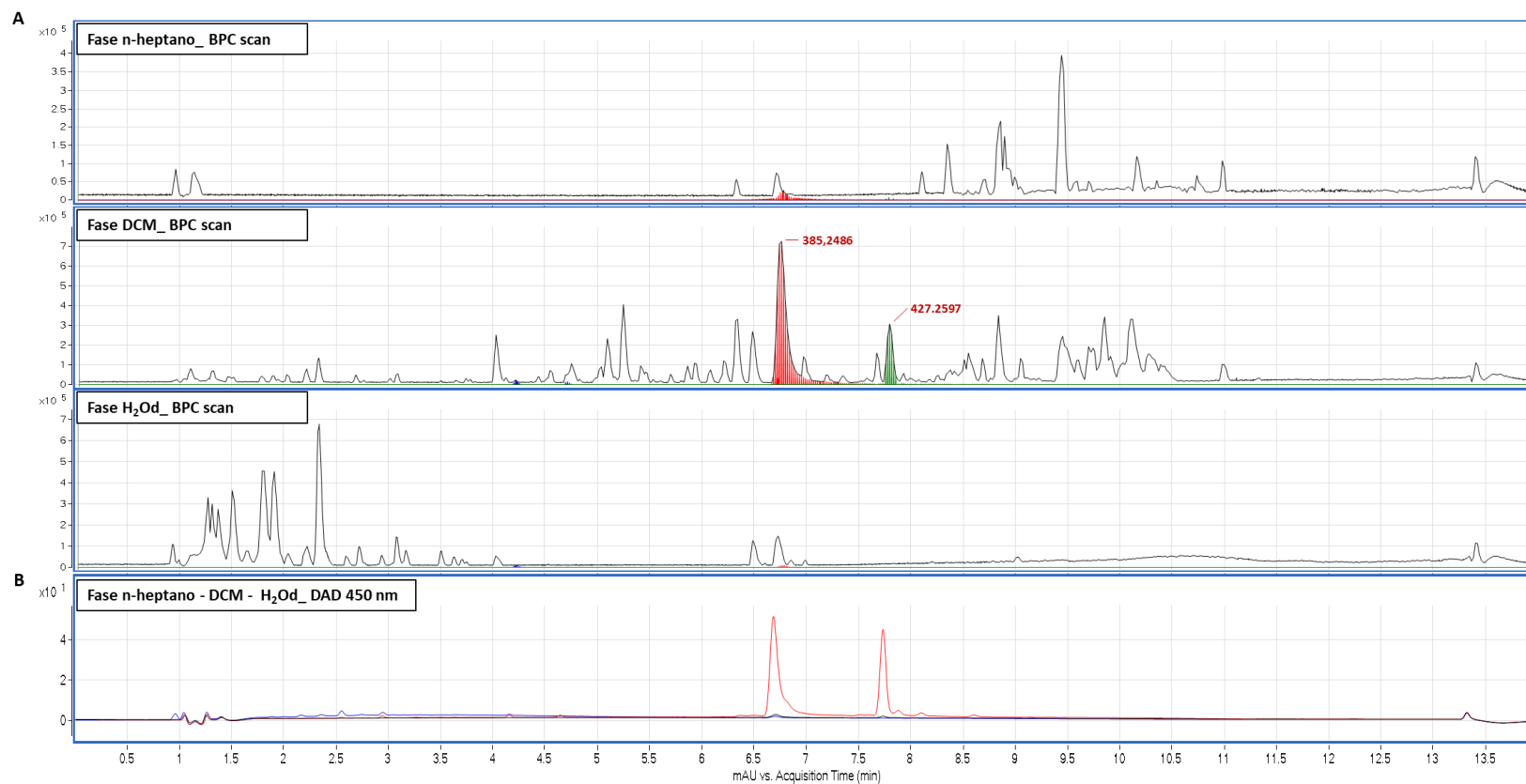
Anexo 5. Esquema del funcionamiento de la técnica de ARN de interferencia. (1) La cepa es transformada con el plásmido que posee los elementos génicos necesarios para llevar a cabo la generación de un ARN de doble hebra. Las colonias seleccionadas por el marcador de selección son cepas en las cuales se ha integrado el plásmido en el genoma dado que no posee elementos de replicación. (2) Los promotores convergentes dan origen a un ARN de doble hebra (dsRNA). (3) La RNasa Drosha se encarga de procesar el dsRNA y genera ARN pequeños doble hebra (sRNA). (4) La RNasa DICER reconoce los sRNA en el citoplasma y los procesa generando ARNs pequeños de interferencia (siRNA). (5) El complejo RISC reconoce estos siRNA, forman un complejo activo y en base a complementariedad de bases degrada los ARNs mensajeros blancos, generando una disminución en los niveles de transcrito.



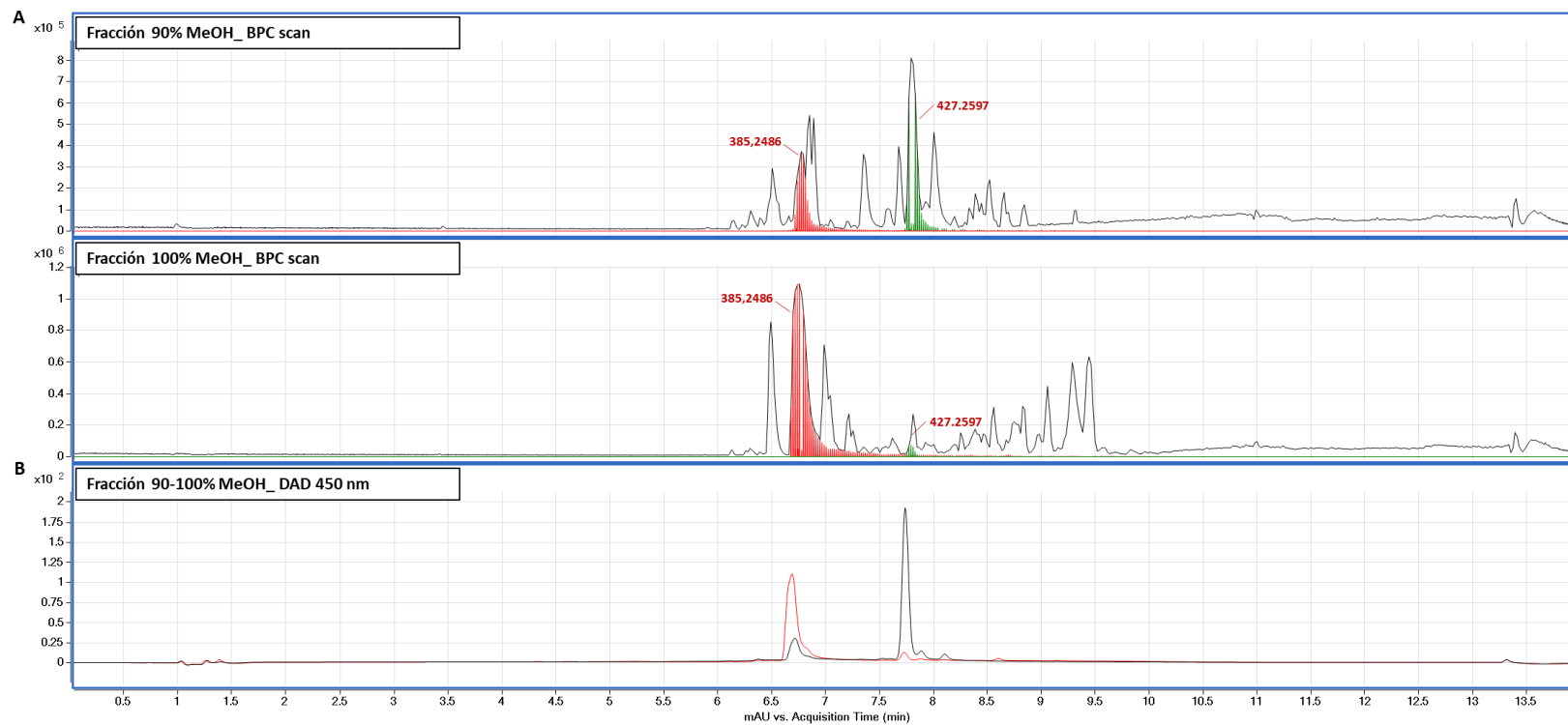
Anexo 6. Patrones de fragmentación obtenidos de los iones de interés identificados en extractos de la cepa *P. verrucosus* FAE27 cultivada en medio PDA y Cz-S. Los tiempos de retención, relación m/z del ión y energía de colisión (EC) se señala en el título de cada espectro de masas. Con un rombo azul se destaca el ión molecular de cada muestra. Obsérvese que los espectros de los compuestos mayoritarios a RT 6,75 y 7,80 presentan varios m/z comunes.



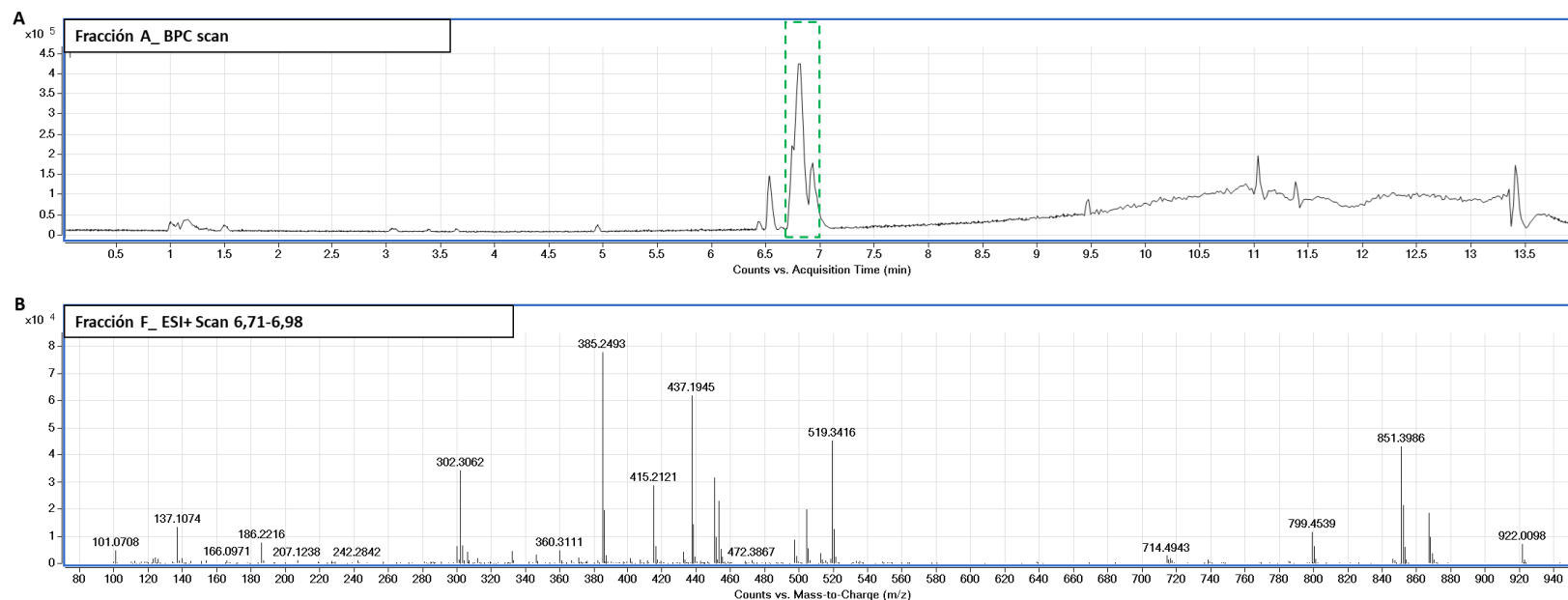
Anexo 7. Análisis por HPLC-DAD-MS/MS de las fracciones E1 y E2. A. BPCs de las fracciones E1 y E2. En la parte superior se muestra el BPC de la fracción E1 (extracto 1), y en la parte inferior el BPC de la fracción E2 (extracto 2). En rojo y verde se marcan los peaks del BPC donde existe la presencia de iones m/z 385,2486 y m/z 427,2597, respectivamente. Obsérvese que solo se encontraron en la fracción E2; **B.** Cromatogramas UV a 450 nm de las fracciones E1 (negro) y E2 (rojo).



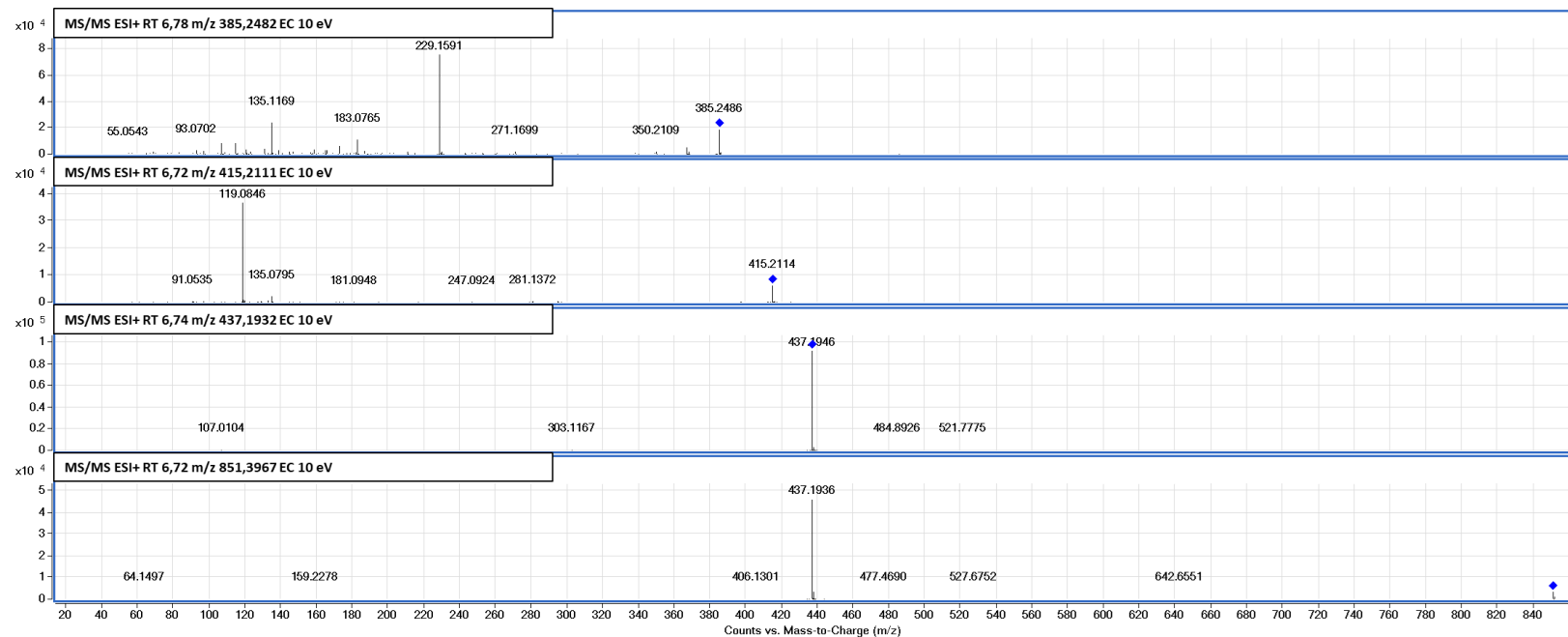
Anexo 8. Análisis de las fases n-heptano, DCM y H₂O por HPLC-DAD-MS/MS. A. BPCs de las fases n-heptano, DCM y H₂O. En la parte superior se muestra el BPC de la fase n-heptano, en el medio el BPC de la fase DCM y abajo el BPC de la fase H₂O. En rojo y verde se señala la presencia de los iones m/z $385,2486 \pm 0.001$ y m/z $427,2597 \pm 0.001$, respectivamente; **B.** Cromatogramas UV-visible a 450 nm de las fases n-heptano (línea negra), DCM (línea roja) y H₂O (Línea azul).



Anexo 9. Análisis las fracciones 90% y 100% MeOH por HPLC-DAD-MS/MS. A. Cromatogramas (BPC) de pico base de las fracciones 90% (superior) y 100% MeOH (inferior). En rojo y verde se señala la presencia de los iones m/z $385,2486 \pm 0.001$ y m/z $427,2597 \pm 0.001$, respectivamente; **B.** Cromatogramas UV-visible a 450 nm de las fracciones 90% (negra) y 100% MeOH (roja).



Anexo 10. Análisis de la fracción A por HPLC-DAD-MS/MS. A. Cromatograma de pico base (BPC) de la fracción A. En verde se recuadra el tiempo de retención donde estaba el compuesto de interés. Obsérvese la aparición de más iones. Al modificarse la composición, a esta fracción se la renombró como Fracción F; **B.** Espectro de masas obtenido en el rango 6,71-6,98 min de la fracción F. Se destaca que además del ión m/z 385,2494 presente en la fracción A prácticamente como ión único, ahora se detecta la presencia de varios otros iones.



Anexo 11. Patrones de fragmentación obtenidos de los iones presentes en la fracción F. Los tiempos de retención, relación m/z del ión y energía de colisión (EC) se señalan en el título de cada espectro de masas. Con un rombo azul se destaca el ión molecular de cada muestra. Obsérvese que los patrones de fragmentación de los distintos m/z no presentan iones comunes, y por tanto, una relación estructural evidente.

A

Aspergillus niger (PKS-HR / AzaB)
azanigerona



Talaromyces marneffei (PKS-NR / PMAA_101600)
mitorubrina



Monascus pilosus (FAS / MpFasA2-MpFasB2)
MonAZPs



B

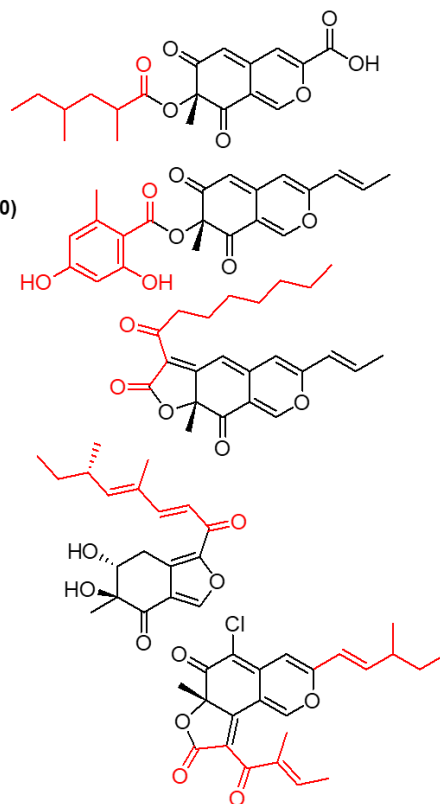
Aspergillus nidulans (PKS-HR / AfoG)
asperfuranona



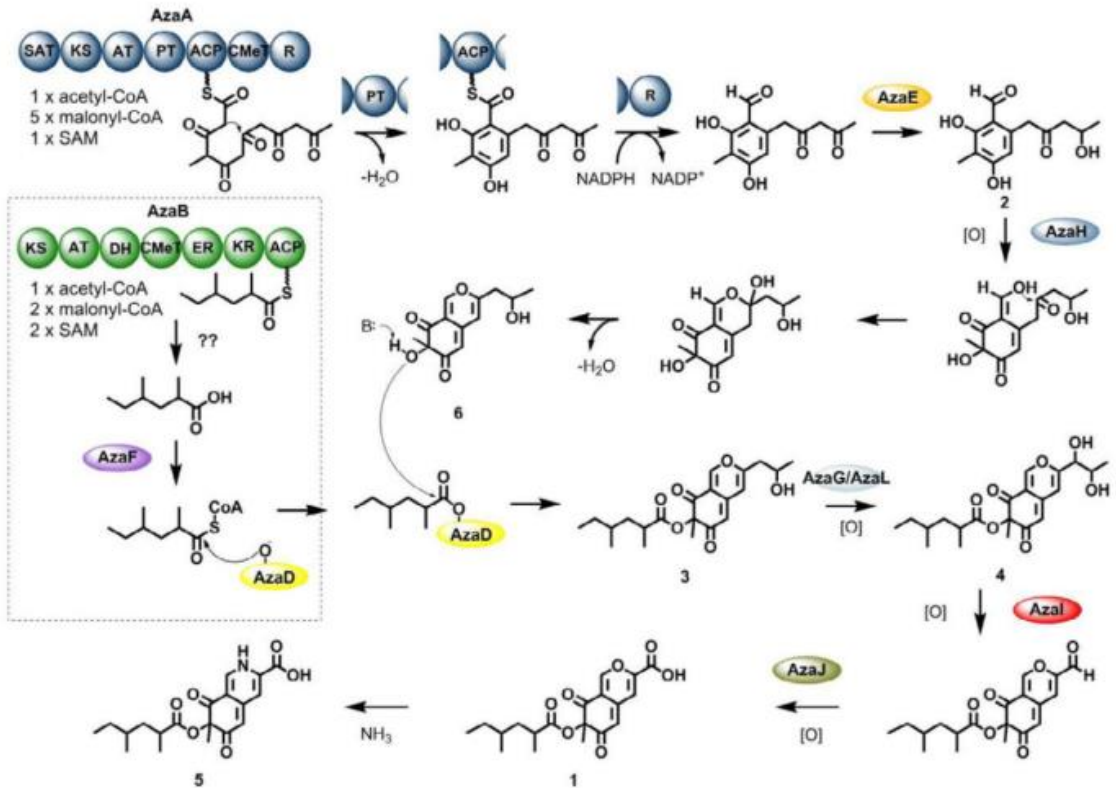
Chaetomium globosum (PKS-HR / CazF)
chaetoviridina E



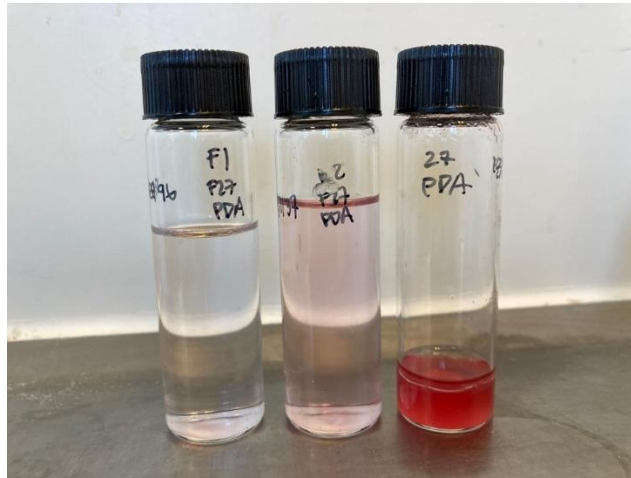
Azafilona



Anexo 12. Enzimas PKS-NR, PKS-HR y FAS como fuente de la cadena accesoria en la síntesis de azafilonas. En rojo se señala el fragmento de la molécula sintetizado por la enzima principal secundaria correspondiente. **A.** Composición de dominios de las distintas enzimas principales secundarias (PKS-HR, PKS-NR y FAS) y estructuras de las azafilonas sintetizadas por los clústeres donde se encuentran estas enzimas. Obsérvese las diferencias entre las cadenas carbonadas principalmente concernientes a las ramificaciones o base de la cadena; **B.** Composición de dominios de PKS-HR de otros géneros fúngicos y estructuras de las azafilonas sintetizadas. Obsérvese la variabilidad estructural de la cadena lateral, tanto en longitud como en número de insaturaciones principalmente. También es posible la síntesis de dos cadenas secundarias para una misma molécula como en el caso de la chaetoviridina E. NR-PKS: PKS no reductora; HR-PKS: PKS altamente reductora; SAT: Dominio iniciador ACP transacilasa; KS: Dominio ceto-sintasa; AT: Dominio acil-transferasa; PT: Dominio de templado de producto; ACP: Dominio de proteína portadora de acilos; cMT: Dominio de carbón metil-transferasa; DH: Dominio deshidratasa; ER: Dominio enoil-reductasa; KR: Dominio ceto-reductasa; FAS: Sintasa de ácidos grasos (subunidades α y β).



Anexo 13. Síntesis de la azafilona azaginerona en *Aspergillus nidulans* descrita en Zabala y cols., 2012. Obsérvese la acción de la enzima AzaI, que mediante una ruptura oxidativa C-C de un dihidroxilo permite la liberación de grupo hidroxipropil y la generación de un grupo aldehído en el extremo de la cadena.



Anexo 14. Extracción con acetato de etilo de una solución acuosa de pigmentos rojos obtenidos de *P. verrucosus* FAE27 a distintos pH. De derecha a izquierda: Extracción con AcOEt a pH 10; Extracción con AcOEt a pH 2; Fase acuosa restante. Obsérvese la prevalencia del color rojo principalmente en la fase acuosa.