



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La función del reticulón RTN1 en la dinámica del retículo endoplásmico y el desarrollo sexual del hongo *Podospora anserina*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

López Fuentes Antonio de Jesús

Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Roberto Coria Ortega
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Luis Felipe Jiménez García
[Facultad de Ciencias](#)

Ciudad de México. Mayo, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

López Fuentes Antonio de Jesús
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **12 de noviembre** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "La función del reticulón RTN1 en la dinámica del retículo endoplásmico y el desarrollo sexual del hongo *Podospora anserina*", dirigida por el/la Dr(a). **Peraza Reyes Carlos Leonardo**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Funes Arguello Maria Soledad
VOCAL	Cardenas Torres Luis
VOCAL	Torres Quiróz Francisco
VOCAL	Aguilar Osorio José Guillermo de Jesús
SECRETARIO	Aguirre Linares Jesús

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de noviembre de 2018.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes, en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo de becas nacionales que otorga el **CONACYT** para el proyecto del Fondo de Cooperación Internacional en Ciencia y Tecnología (**FONCICYT**): **277869**; el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (**DGAPA**) de la UNAM, con claves: **IA201815** e **IA203317** y con el apoyo al proyecto de Investigación en Fronteras de la Ciencia **2015-I-319**.

Durante la realización del proyecto fui beneficiado con la beca para estudiantes de posgrado del **CONACYT (CVU 772886)**.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la UNAM y al programa de Posgrado de la Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, por la educación, enseñanzas y conocimientos adquiridos.

A mi tutor, Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su paciencia y gran labor para formarnos como científicos.

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por el apoyo, ayuda y asesoría otorgada para realizar las diferentes técnicas de laboratorio a lo largo de todo el proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Roberto Coria Ortega y Dr. Luis Felipe Jiménez García por su colaboración, sus consejos y correcciones para mejorar y fortalecer el proyecto.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular y la Unidad de Imagenología del I.F.C. por brindarme la correcta asesoría y permitirme el uso de los diferentes equipos que se utilizaron para este proyecto. Asimismo, agradezco al Dr. Jesús Aguirre por el acceso al uso del microscopio Nikon e600 equipado con la cámara ANDOR™-NEO sCMOS.

Y a todos los miembros del comité jurado conformado por la Dra. María Soledad Funes Argüello, Dr. Luis Cárdenas Torres, Dr. Francisco Torres Quiroz, Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio y Dr. Jesús Aguirre Linares por revisar y corregir mi tesis de maestría.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi esposo, Daniel Eduardo Benítez Sánchez por hacer que mi vida mejorara, por escucharme y ayudarme en los momentos más difíciles e incluso a pesar de la distancia. Cada día a tu lado es un día lleno de amor, entrega y compromiso. Juntos hemos llegado lejos y estoy seguro de que aún nos queda un maravilloso destino. Te amo con locura y con todo mi ser.

A Serena, una pequeña gatita glotona, dormilona y traviesa que llena mis días de paz, ternura y alegría.

A mis padres, con profundo amor, respeto y admiración pues cada uno de mis logros siempre será suyo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Francisco, Fernanda, Rosario, Paola y Rafal con quienes fue muy divertido pasar mi tiempo libre, reír y buscar soluciones a cada uno de los conflictos del día a día.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	4
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	5
ABREVIATURAS	9
I. RESUMEN	10
II. INTRODUCCIÓN	11
El retículo endoplásmico	11
Arquitectura del retículo endoplásmico.....	11
Funciones del retículo endoplásmico.....	14
III. ANTECEDENTES	19
<i>Podospora anserina</i> como modelo de estudio	19
Dinámica de los organelos en el desarrollo sexual de <i>P. anserina</i>	23
Las proteínas YOP y RTN1 en el desarrollo sexual de <i>P. anserina</i>	23
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	29
Cepas y plásmidos creados y utilizados para este estudio.....	29
Medios y condiciones de cultivo para <i>P. anserina</i>	31
Almacenamiento de las cepas de <i>P. anserina</i>	31
Medios selectivos para <i>P. anserina</i>	31
Otros medios de cultivo	31
Cruzadas sexuales	32
Citología para fijación y tinción de ascas.....	32
Porcentaje de anormalidad en esporas sexuales.....	33
Recuperación de esporas sexuales	34
Determinación de tipo sexual	34
Transformación de <i>P. anserina</i>	34
Formación de protoplastos.....	34
Transformación de protoplastos de <i>P. anserina</i>	35
Análisis por microscopía.....	38

Observación de fluorescencia por microscopía de epifluorescencia	38
Observación de la distribución nuclear en el micelio aéreo.....	38
Fluorescencia apical	39
Tinción con reactivo FM4-64	39
Técnicas de biología molecular.....	39
Extracción de DNA de <i>P. anserina</i>	39
Purificación de productos de PCR y plásmidos.....	40
Transformación para células competentes de <i>E. coli</i>	40
Almacenamiento de plásmidos.....	41
Análisis bioinformáticos	41
Análisis de secuencias para la localización, identificación y caracterización de los genes codificantes para la proteína SEC63 y NDC1 de <i>P. anserina</i>	41
Obtención del gen codificante para la proteína RTN1 de <i>P. anserina</i>	41
Diseño de las secuencias de los oligonucleótidos.....	41
VII. RESULTADOS	42
Caracterización de la dinámica del retículo endoplásmico durante la fase somática de <i>P.</i> <i>anserina</i>	42
Arreglo del RE en hifas vegetativas de <i>P. anserina</i>	46
La localización celular de RTN1-GFP.....	49
Una fracción de RTN1-GFP se asocia con el centro organizador del crecimiento polarizado ..	51
La localización de RTN1-GFP en relación con los núcleos de las hifas vegetativas.....	55
El arreglo del RE en hifas carentes de RTN1	57
La localización de RTN1 durante el desarrollo sexual de <i>P. anserina</i>	60
La ausencia de la proteína RTN1 afecta la dinámica nuclear durante el desarrollo meiótico	69
La eliminación de RTN1 afecta la germinación de las ascosporas	74
Los defectos en la formación de ascas generados por la ausencia de RTN1 no se exacerban tras la eliminación simultánea de las proteínas de la familia de Yop1	77
La ausencia de RTN1 afecta la dinámica de husos acromáticos en la meiosis I, la meiosis II y la mitosis post-meiótica de <i>P. anserina</i>	79
Formación y distribución del huso acromático durante el desarrollo de esporas silvestres y esporas $\Delta rtn1$	80
VIII. DISCUSIÓN	93
Dinámica y arreglo del RE en la fase somática de <i>P. anserina</i>	93

Dinámica y arreglo del RE durante la formación de esporas sexuales de <i>P. anserina</i>	95
Participación de otras proteínas estructurales de RE en la formación de esporas sexuales	97
Disposición del huso acromático en esporas $\Delta rtn1$ de <i>P. anserina</i>	97
IX. CONCLUSIONES	99
X. PERSPECTIVAS	100
XI. MATERIAL SUPLEMENTARIO	101
Generación de las construcciones para etiquetar a SEC63 con mCHERRY o GFP.....	101
Confirmación por PCR de las cepas con construcción endógena SEC63 ^{A541T} -GFP y SEC63 ^{F546L} -mCHERRY	103
Datos de la secuenciación del gen <i>SEC63</i>	105
La localización de SEC63 ^{A541T} -GFP, y de SEC63 ^{F546L} -mCHERRY en experimentos de doble marcaje con RTN1-GFP	107
Localización apical de RTN1 en hifas vegetativas de la cepa RTN1-GFP SEC63 ^{F546L} -mCHERRY ..	109
Localización de ER-GFP y SEC63 ^{A541T} -GFP en la formación de esporas sexuales	110
Formación de husos acromáticos en la cepa RTN1-GFP	111
Obtención y confirmación de cepas de delección doble $\Delta rtn1\Delta yop1$, $\Delta rtn1\Delta yop2$ o triple delección $\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$	114
Prueba múltiple de T para verificación de diferencia significativa en la anormalidad de ascas de mutantes de delección sencillas, dobles y triples	116
Generación de las cepas $\Delta rtn1$ con integración ectópica del plásmido pNDC1	116
XII. APÉNDICE 1: OLIGONUCLEÓTIDOS	119
XIII. APÉNDICE 2: SOLUCIONES MADRE	121
Extracción de DNA	121
Preparación de Medios	122
Citología.....	123
Reactivos para microscopía	124
Soluciones para protoplastos	124
Otros.....	125
XIV. APÉNDICE 3: MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	125
Medios para <i>E. coli</i>	125
Medios para <i>P. anserina</i>	126
Medios de regeneración para transformación de protoplastos.....	129
XV. BIBLIOGRAFÍA	130

ABREVIATURAS

(Ec)

Ectópica

BLAST¹

Herramienta básica de búsqueda mediante alineamientos locales (de secuencia)

DAPI

4',6-diamidino-2-finilindol

FM4-64¹

N-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenilo) hexatrienilo) dibromuro de piridinio

PAF

Paraformaldehído

PCR¹

Reacción en cadena de la polimerasa

PEG

Polietilenglicol

RE

Retículo endoplásmico

REL

Retículo endoplásmico liso

RER

Retículo endoplásmico rugoso

RHD¹

Dominio de homología de reticulón

RTN

Familia de proteínas de reticulón/reticulones

SGD¹

Base de datos de *Saccharomyces cerevisiae*

¹ Por sus siglas en inglés

I. RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo importante que cumple diversas funciones celulares. Estudiar este organelo ha permitido describir diversas proteínas que participan en su dinámica y en su arreglo. Entre las proteínas que estructuran el RE se encuentra la familia de proteínas de reticulón que ha sido descrita en diversos eucariontes. En particular, en el hongo filamentoso *Podospora anserina* se ha demostrado que se requiere a la proteína de reticulón -RTN1- para mantener la correcta formación de las esporas sexuales; por lo cual resulta interesante describir el arreglo y la dinámica del RE durante la fase somática y la fase de desarrollo sexual en este hongo.

Durante la fase somática de *P. anserina* la arquitectura del RE se distribuye por todo el interior de las hifas vegetativas como una red extensa que presenta movimiento continuo y que no se ve afectada con la formación de los septos que dividen las hifas vegetativas. Asimismo, la proteína RTN1 de *P. anserina* se distribuye de manera reticular y además se concentra en la punta de las hifas vegetativas y se asocia con el movimiento y la formación del *Spitzenkörper*.

Con respecto a la fase de desarrollo sexual, se muestra por primera vez la localización de la proteína RTN1, la cual mantiene una distribución reticular, pero diferencial en cada una de las etapas del desarrollo (*croziers*, ascas en meiosis o mitosis; esporas recién formadas y esporas maduras); y que además también mantiene su localización apical.

Asimismo, esta investigación esclarece la anormalidad más frecuente en las ascosporas $\Delta rtn1$ y para las cuales también se demuestra que el proceso de germinación se encuentra comprometido. Además, se demuestra que los defectos de formación de ascas generados en ausencia de RTN1 no se exacerban tras la eliminación simultánea de las proteínas de la familia de Yop1.

Finalmente, esta investigación también demuestra que la generación de esporas anormales y, por lo tanto, la distribución errónea del material genético en la cepa $\Delta rtn1$ está relacionada con una mala disposición de los husos acromáticos que se establecen durante la meiosis I, la meiosis II y la mitosis post-meiótica.

II. INTRODUCCIÓN

El retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo complejo y fundamental para la célula eucarionte. Estudiar su forma y su función ha generado información más detallada y relevante sobre el mantenimiento y la dinámica de su arquitectura, como lo es la identificación de las proteínas que lo estructuran y a su vez, entender los procesos biológicos en los cuales el RE se encuentra implicado (English y Voeltz, 2013; Nixon-Abell *et al.*, 2016; Shemesh *et al.*, 2014).

Arquitectura del retículo endoplásmico

La arquitectura del RE muestra dos diferentes dominios estructurales, el primer dominio se encuentra asociado a la envoltura nuclear y el segundo dominio es el área periférica del RE que se conforma de una red de láminas (cisternas) y túbulos que emergen de la envoltura nuclear y forman, junto con esta, una arquitectura continua y cerrada (Shibata *et al.*, 2008). El espacio interno que es delimitado entre las membranas del RE se le conoce como lumen o espacio cisternal (Alberts *et al.*, 2015). Por otra parte, debido a su asociación con los ribosomas, también se han descrito dos diferentes tipos de RE: el rugoso con ribosomas adheridos (RER), y el liso, carente de ribosomas (REL) (Chen, *et al.*, 2013).

Conformación de láminas y túbulos

Para entender cómo se mantiene estructurado el RE, es importante mencionar a todas las proteínas que favorecen su identidad en las diversas regiones que conforman las láminas y túbulos de este organelo. Entre las proteínas que se han descrito para la organización del arreglo del RE se encuentran las pertenecientes a la familia de los reticulones (RTN) y a la familia de proteínas DP1/YOP1 (English y Voeltz, 2013). Estas proteínas están presentes en las zonas tubulares del RE, en los sitios de unión entre los túbulos del RE y en los bordes de las cisternas. Asimismo, se piensa que

contribuyen a dar la curvatura de la membrana en los poros nucleares (Shemesh *et al.*, 2014).

Por otra parte, encontramos a las atlastinas/RHD3/Sey1p que es otra familia de proteínas que trabajan en conjunto con RTN o DP1/YOP1. Las atlastinas se encargan de mediar la interacción y fusión homotípica de los túbulos del RE, lo que permite la formación de uniones en tres sentidos. Asimismo, las atlastinas son responsables de conformar la red poligonal del dominio periférico. Por otra parte, también encontramos a las proteínas *lunapark* que actúan de forma antagónica a las atlastinas (Goyal y Blackstone, 2013).

Adicionalmente, en las láminas del RE, se han reportado proteínas membranales con dominios de hélice superenrollada (*coiled-coil*), las cuales operan como estabilizadores de las membranas laminares –como p180– o como espaciadores que mantienen la distancia entre sus membranas –como CLIPM-63– e impiden que el lumen de éstas se colapse (Goyal y Blackstone, 2013; Shibata, *et al.*, 2006).

Además, se ha reportado que algunas de las proteínas del complejo de translocación del RE incrementan la estabilidad de las cisternas (Puhka, *et al.*, 2012). Igualmente se ha descrito que las proteínas TMEM33 (o Per33) y TMEM170A se localizan en la membrana del RE periférico y/o en la envoltura nuclear y también promueven la formación de las láminas del RE; A la par, estas proteínas actúan de manera antagónica a los reticulones, con quienes establecen interacciones físicas (Christodoulou, *et al.*, 2016; Urade, *et al.*, 2014) (Figura 1).

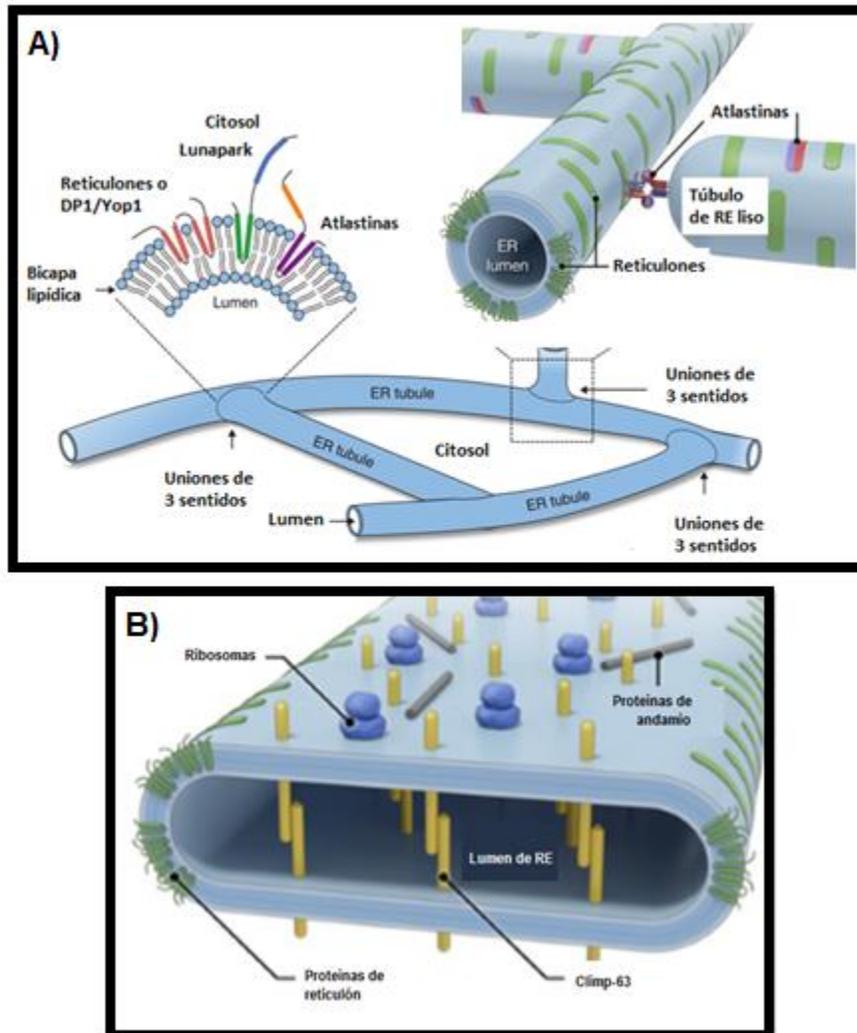


Figura 1. Modelo de la conformación de las proteínas estructurales del retículo endoplásmico. En A), se muestra el arreglo topológico de las proteínas de reticulón, DP1/YOP1, *lunapark* y las atlasinas en la bicapa lipídica y en las uniones de tres sentidos del RE. Las atlasinas forman complejos trans-oligoméricos que promueven la fusión de los túbulos del RE (recuadro). En B), se muestra la localización de las proteínas de reticulón, Climp63, las proteínas de andamio como p180 y los ribosomas en las cisternas laminares del RE (Modificado de (Chen *et al.*, 2013; Goyal y Blackstone, 2013)).

Los reticulones

Los reticulones son proteínas integrales de la membrana del RE que, junto con las proteínas de la familia DP1/YOP1, forman homo-oligómeros y se ha planteado que también podrían formar hetero-oligómeros que inducen una alta curvatura en la membrana del RE (Shibata, *et al.*, 2008; Voeltz, *et al.*, 2009; Voeltz y Barr, 2013). Tanto la familia de proteínas de los reticulones como la familia de proteínas DP1/YOP1 están relacionadas pues

presentan dos dominios estructurales que se han relacionado con su actividad de curvar membranas. El primero de ellos es conocido como dominio de homología de los reticulones (*RHD*) y está formado por alrededor de 200 residuos de aminoácidos que comprenden dos segmentos hidrofóbicos que se piensa conforman dos horquillas transmembranales separadas por un asa hidrofílica. Se ha determinado experimentalmente que los extremos amino y el carboxilo terminal de los reticulones se encuentran expuestos al citosol; de manera que el dominio *RHD* adopta una topología inusual en la que la horquilla transmembranal ocupa más espacio en la capa externa de la membrana del RE que en la capa interna (Figura 1), lo cual podría promover la flexión de la membrana y favorecer las regiones de alta curvatura del RE (Westrate *et al.*, 2015). El segundo dominio, descrito en ambas familias de proteínas, es una hélice anfipática (presente en el extremo C- terminal) y existe evidencia de que éste también regula la formación de los túbulos del RE (Brady, *et al.*, 2015; Breeze *et al.*, 2016).

Funciones del retículo endoplásmico

En el RE se llevan a cabo la síntesis, el procesamiento y la secreción de proteínas, la síntesis de lípidos, la acumulación y la liberación de calcio (Ca^{2+}) (Phillips y Voeltz, 2016). Además, es un organelo muy dinámico e incluso presenta interacciones con la mayoría de los organelos, algunas de las cuales también están relacionadas con su biogénesis (Joshi, *et al.*, 2017).

Síntesis, procesamiento y secreción de proteínas

El RE es el sitio de producción de las proteínas de secreción y de la membrana plasmática, así como de los organelos del sistema de endomembranas celulares (las vías endocítica y secretoria) (Gidalevitz, *et al.*, 2013; Johnson, *et al.*, 2013). En los eucariontes una parte de la síntesis de proteínas está asociada a los ribosomas del RER que principalmente se encuentran en las regiones laminares de este organelo (Chen, *et al.*, 2013). La asociación de los ribosomas al RE favorece que en las células eucariontes muchas de las proteínas comiencen a ser importadas a la membrana de este

organelo antes de que su cadena polipeptídica se haya sintetizado completamente, en un proceso llamado cotraducción, mientras que la importación de la mayoría de las proteínas a la mitocondria, los cloroplastos, el núcleo y los peroxisomas es de manera postraducciona (Johnson *et al.*, 2013). Las proteínas sintetizadas en el RE se clasifican en dos tipos: 1) proteínas transmembranales, que son parcialmente translocadas al organelo; y 2) las proteínas solubles, que son completamente translocadas a través de la membrana del RE (Alberts *et al.*, 2015). Todas las proteínas que se dirigen y mantienen en el RE presentan una secuencia señal que es reconocida por la partícula de reconocimiento de señal (SRP), quien actúa como un receptor citosólico de la secuencia señal de las proteínas del RE, y su receptor en la membrana del RE (Alberts, *et al.*, 2015; Johnson, *et al.*, 2013). Asimismo, las proteínas residentes del RE cuentan con una señal de retención conformada por cuatro aminoácidos (-KDEL o -HDEL) en su dominio carboxilo terminal (Alberts, *et al.*, 2015). Es el RER el sitio en cual se llevan a cabo muchas de las modificaciones postraduccionales y el plegamiento de las proteínas (Westrate, *et al.*, 2015). Para realizar estos procesos intervienen un gran número de proteínas chaperonas –como la proteína BiP– que facilitan el plegamiento correcto de las proteínas del RE conforme son importadas al organelo (Aebi, 2013; Gidalevitz, *et al.*, 2013). Por su parte, la proteína disulfuroisomerasa (PDI) y la prolil isomerasa (PPI) se encargan de la oxidación de los grupos sulfhidrilos libres (SH) en las cisteínas de las proteínas para formar su enlace disulfuro; con esto definen la estructura, la función y la regulación de las proteínas del RE (Gidalevitz, *et al.*, 2013). Por su parte, las proteínas del RE que siguen la vía secretoría son glicosiladas –mediante N-glicosilación– en el lumen de este organelo antes de ser exportadas y destinadas a otros compartimentos celulares (Srivastava, *et al.*, 2016; Wendland, 2016). La ruta de glicosilación que se lleva a cabo en el RE se realiza con un complejo enzimático de oligosacaril transferasa y una molécula lipídica especial llamada dolicol, que transfieren un bloque de oligosacáridos precursores a la cadena lateral del grupo amino o a un

aminoácido asparagina presente en las proteínas, logrando con ello múltiples implicaciones que son esenciales para la homeostasis del RE (Aebi, 2013; Cherepanova, *et al.*, 2016).

De manera simultánea al procesamiento de las proteínas, existe un sistema de control de calidad que ocurre en el RE, el cual monitorea los niveles de las proteínas mal plegadas e impide su acumulación. Este sistema, conocido como la respuesta a las proteínas desplegadas (*UPR*), tiene la capacidad de activar la vía de degradación asociada a RE (*ERAD*) (Cherepanova, *et al.*, 2016). El sistema *ERAD* también puede determinar el destino celular e inducir muerte celular programada (apoptosis) asociada a estrés de RE (Gidalevitz, *et al.*, 2013).

Por su parte, si las proteínas pasan el control de calidad en el RE, se genera un control de tráfico vesicular a partir de este organelo, el cual es esencial para que las proteínas sean destinadas por la vía secretoria y lleguen hasta el aparato de Golgi (D'Arcangelo, *et al.*, 2013), donde posteriormente serán dirigidos a los diferentes organelos del sistema de endomembranas (Fribley, *et al.*, 2009).

Síntesis de lípidos

El RE es el sitio de mayor biosíntesis de fosfolípidos, de colesterol y ceramidas requeridas para la producción de nuevas membranas celulares (Alberts, *et al.*, 2015; Armesto, *et al.*, 2011). Los fosfolípidos que más sintetiza el RE son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y, en menor proporción, el fosfatidilinositol (Bishop y Bell, 1988; Daleke, 2003). Respecto a esto, se ha descrito que la zona tubular del RE, específicamente el REL, es la región primaria en la cual estos lípidos se originan (Westrate, *et al.*, 2015).

Almacenamiento y liberación de calcio (Ca^{2+})

El RE puede almacenar calcio que funciona en muchas cascadas de transducción de señales (Meldolesi y Pozzan, 1998). La liberación del calcio en el RE, se regula con los receptores de inositol trifosfato y los receptores

de rianodina, mientras que su almacenamiento está mediado por una actividad de ATPasa (Wang, *et al.*, 2002); siendo el REL con una mayor formación de zonas tubulares el que beneficia el almacenamiento y liberación de calcio y como ejemplo, podemos mencionar al retículo sarcoplásmico que se forma en las células musculares (Alberts, *et al.*, 2015).

Dinámica e interacciones del retículo endoplásmico

El RE es un organelo dinámico, pues presenta procesos de retracción, expansión, fusión y división; lo cual favorece cada una de las funciones que desempeñan sus diferentes dominios (la envoltura nuclear o el área periférica) (Chen, *et al.*, 2013). Su arquitectura y dinámica se logra mantener ya que interactúa con el citoesqueleto y además cuenta con la actividad de diferentes proteínas estructurales, más la maquinaria de fusión homotípica de sus membranas (English y Voeltz, 2013). Tal es la importancia de su dinámica, que incluso se han propuesto modelos teórico-matemáticos que explican las diferentes morfologías que puede adoptar el RE; entre estas morfologías se incluyen la formación de las redes poligonales de túbulos interconectados y la formación de las fenestraciones que ocurren en las láminas (Shemesh, *et al.*, 2014).

Con respecto a las interacciones del RE con otros organelos celulares se sabe que la mayoría de sus interacciones se presentan en el REL (Chen, *et al.*, 2013). Estas interacciones se han demostrado con microscopía de fluorescencia de alta resolución; microscopía electrónica tridimensional; y con diversos ensayos de bioquímica que han caracterizado que el RE establece diversos sitios de contacto con otros organelos y con los cuales también participa en su biogénesis y con algunas de sus funciones (Agrawal, *et al.*, 2011; English y Voeltz, 2013; Friedman y Voeltz, 2011; Glick y Nakano, 2009; Lam, *et al.*, 2010; Rizzuto, *et al.*, 1998; van der Zand, *et al.*, 2012). Por ejemplo: 1) el transporte anterógrado y/o retrogrado de vesículas (mediado por COPII y COPI respectivamente) (Barlowe, *et al.*, 1994; D'Arcangelo, *et al.*, 2013; Hanada, 2010; Ladinsky, *et al.*, 1999; Malhotra,

et al., 1989) regula la transferencia de proteínas y lípidos del RE al aparato de Golgi (Glick y Nakano, 2009); 2) Existen sitios de contacto entre el RE y los endosomas que favorecen el intercambio de lípidos y esteroides (English y Voeltz, 2013) y donde se monitorean y regulan los niveles de colesterol de la vía endocítica (cuya acumulación afectaría la dirección del tráfico de los endosomas tardíos) (Rocha, *et al.*, 2009) y se facilita la división de los endosomas (Rowland, *et al.*, 2014); 3) el RE establece interacciones con las mitocondrias en sitios de contacto altamente conservados y que están asociados con funciones importantes, como la transferencia de calcio, la regulación de la señalización por esta molécula y la biosíntesis de lípidos (Friedman y Voeltz, 2011; Rizzuto, *et al.*, 1998; Vance, 1990). Tal es la magnitud de esta interacción que en los sitios de contacto RE-mitocondrias se facilita la biogénesis de la membrana mitocondrial, que requiere de la importación de fosfolípidos provenientes del RE (específicamente del transporte de fosfatidilserina) (Voss, *et al.*, 2012), y se controla tanto la división como la herencia de este organelo (Boldogh y Pon, 2007). Además se han identificado muchos de los componentes responsables de establecer los sitios de contacto entre estos dos organelos; por ejemplo, en hongos como *Saccharomyces cerevisiae*, las proteínas del complejo *ERMES* constituyen un cierre molecular que une el RE con la membrana externa mitocondrial (Kornmann y Walter, 2010); y finalmente, 4) organelos como los peroxisomas reciben mucho de su material inicial –incluyendo los lípidos y las proteínas de su membrana– del RE (Kim, *et al.*, 2006; Lam, *et al.*, 2010). Esto permite que los peroxisomas puedan formarse de *ново* en la célula (Agrawal y Subramani, 2016; David, *et al.*, 2013). Incluso el RE promueve una correcta orquestación de la dinámica y maduración peroxisomal (Agrawal, *et al.*, 2011; Lam, *et al.*, 2010; Raychaudhuri, *et al.*, 2006; van der Zand, *et al.*, 2012). Algunas de las proteínas responsables de establecer las interacciones físicas de estos organelos son las peroxinas Pex29 y Pex30, que en *S. cerevisiae* interactúan dinámicamente con proteínas integrales de la membrana del RE, como Rtn1 y Yop, y modulan la

biogénesis peroxisomal (Mast, et al., 2016). Estos hallazgos subrayan la importancia de estudiar la arquitectura del RE, y revelan que por medio de sus diversos dominios estructurales este organelo tiene la capacidad de interaccionar y comunicarse con otras estructuras subcelulares, con las que contribuye al desarrollo celular (Knoblach y Rachubinski, 2013).

III. ANTECEDENTES

Podospora anserina como modelo de estudio

P. anserina es un hongo filamentoso perteneciente al *Phylum* Ascomycota y que se clasifica en el orden de los Sordariales, donde se encuentran también géneros como *Sordaria* y *Neurospora*. Es un hongo saprobio con un ciclo de vida corto que se encuentra normalmente creciendo en materia vegetal en descomposición o en estiércol de animales herbívoros (Geydan, et al., 2012).

P. anserina es un hongo heterotálico con el cual se han estudiado procesos de desarrollo sexual. Se sabe que la identidad de su determinación sexual está definida por una región genómica conocida como locus del tipo sexual (*MAT+* y *MAT-*) (Peraza y Malagnac, 2016). Su desarrollo comienza con la germinación de las esporas sexuales, de las cuales brota un micelio vegetativo que puede crecer en promedio 7mm por día (Silar, 2013). Una vez que el micelio se ha desarrollado por tres días, comienza una formación rápida de gametos, los cuales se diferencian en espermacios y ascogonios, mismos que son independientes de los genes del tipo sexual (Borkovich y Ebbole, 2010). Cuando los gametos están presentes y poseen un tipo sexual opuesto, la fecundación se produce y comienzan a formarse los cuerpos fructíferos en un tiempo aproximado de cuatro días, produciendo una progenie de cientos de meiosporas (ascosporas) que son expulsadas de forma continua por cinco días y, que le permiten la dispersión lejana a su sustrato (Silar, 2013) (Figura 2.A). Específicamente, para llevar a cabo la plasmogamia, los ascogonios desarrollan una hifa diferenciada –tricógina- la

cual por medio de un sistema de feromonas se encarga de localizar a los espermacios (o microconidios) del sexo opuesto. La hifa tricógina permite la migración de los núcleos del microconidio hasta el ascogonio, donde posteriormente ocurrirá una replicación de núcleos y se desarrollará una serie de células dicarióticas denominadas hifas ascógenas, a partir de las cuales se desarrollan las ascas. El proceso de diferenciación inicia con una curvatura cerca del ápice denominada *crozier*. En los *croziers* un núcleo de tipo sexual *MAT+* y un núcleo de tipo sexual *MAT-* migran y se localizan hacia la parte superior; a continuación, ocurre una mitosis coordinada y se establecen un par de septos que producen tres células: una binucleada en la parte superior y dos flanqueantes uninucleadas. Las células uninucleadas se fusionan y forman un nuevo *crozier* que propaga el estado dicariótico, mientras que la célula de la parte superior lleva a cabo la cariogamia y se diferencia en un asca o meiocito. En este meiocito se llevan a cabo los procesos de meiosis y mitosis post-meiótica, los cuales culminan con la formación de cuatro ascosporas (Peraza y Malagnac, 2016; Wendland, 2016; Casselton, 2002) (Figura 2.B).

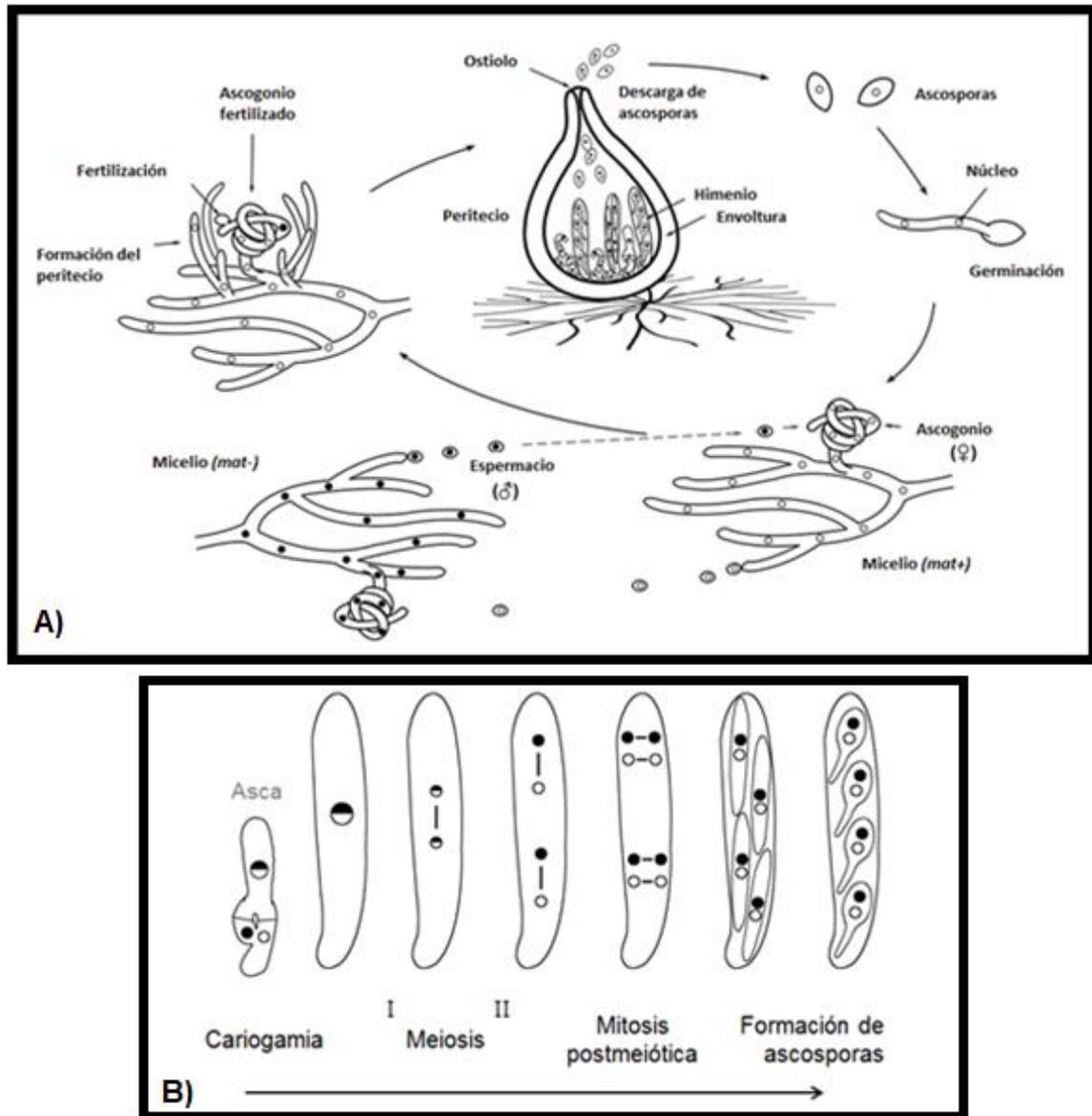


Figura 2. Ciclo de vida en *Podospora anserina*. A) El ciclo de vida de *P. anserina* comienza con la germinación de las ascosporas, las cuales desarrollarán un micelio (*MAT+* o *MAT-*) con capacidad de formar las estructuras sexuales (ascogonios y espermacios). La fertilización de un ascogonio por un espermacio del sexo opuesto da lugar a los peritecios, los cuerpos fructíferos donde se desarrollan el tejido fértil (himenio) en que se formarán las ascas (meiocitos) con las esporas sexuales (ascosporas). B) Esquema del desarrollo meiótico que lleva a la formación de las ascosporas en *P. anserina*. La flecha indica el sentido de la progresión del desarrollo sexual, comenzando con la cariogamia (formación del estado diploide, $2n$), seguida de la meiosis I y meiosis II, las cuales se dan en sentido vertical y producen la formación de cuatro núcleos haploides (n). Inmediatamente, pero en sentido horizontal, se da una mitosis post-meiótica, la cual resulta en ocho núcleos haploides (n). Finalmente, se da un empaquetamiento de núcleos cercanos no hermanos en cuatro nuevas células que conformarán a las cuatro ascosporas dicarióticas ($n+n$) (ver el texto para los detalles). Los círculos ilustran núcleos de distinto tipo sexual (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013).

Durante este proceso, la mayoría de las ascosporas generadas son binucleadas y sus núcleos usualmente contienen las versiones alternativas de los genes del tipo sexual, por lo cual estas ascosporas generan un micelio dicariótico que es susceptible de autofertilizarse (desarrollo pseudohomotático) (Peraza y Malagnac, 2016; Wendland, 2016). Sin embargo, en un pequeño porcentaje de ascas (~1 %) una de sus esporas binucleadas (grandes) es remplazada por dos esporas uninucleadas (pequeñas), las cuales dan lugar a un micelio homocariótico de un solo tipo sexual cuyos gametos solo pueden ser fertilizados por células del tipo sexual opuesto (desarrollo heterotático) (Silar, 2013). En el laboratorio ambos tipos de ascosporas, tanto dicarióticas como monocarióticas, se pueden obtener y aislar fácilmente, lo que permite realizar una gran diversidad de análisis genéticos.

Asimismo, *P. anserina* es considerado un modelo experimental de fácil manipulación (Espagne *et al.*, 2008). Con respecto a otros hongos filamentosos, *P. anserina* ha sido utilizado como modelo de envejecimiento, pues presenta senescencia (Malagnac, *et al.*, 2007; Scheckhuber y Osiewacz, 2008). Este hongo también ha sido estudiado en procesos de bioremediación, ya que presenta una gran maquinaria enzimática para degradar desde la celulosa hasta la lignina, lo cual a su vez se ve favorecido por no ser un hongo patógeno (Harms, *et al.*, 2011; Silar *et al.*, 2011). Igualmente, durante su desarrollo sexual se puede estudiar la diferenciación de muchos tipos celulares y a su vez, presenta morfogénesis de estructuras multicelulares complejas y, tiene estructuras subcelulares fácilmente observables (mitocondrias, peroxisomas, RE, núcleos, cromosomas), por lo que se puede estudiar con detalle la dinámica de estos organelos y el progreso nuclear a lo largo del desarrollo sexual (cariogamia, meiosis, mitosis, etc.) (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013; Scheckhuber, *et al.*, 2008; Silar, 2013). Finalmente, el genoma de *P. anserina* se encuentra

secuenciado, está bien anotado y cuenta con una base de datos con toda la información, bibliografía y protocolos para trabajar con él (Silar, 2013).

Dinámica de los organelos en el desarrollo sexual de *P. anserina*

En el laboratorio, se ha demostrado que distintos organelos como los peroxisomas, las mitocondrias y el RE desempeñan un papel fundamental para que se orqueste de manera eficiente y completa el desarrollo sexual de *P. anserina*. En este hongo se ha comprobado que durante el desarrollo meiótico se requiere de una regulación precisa de la dinámica y el ensamblaje de los peroxisomas. Defectos en estos procesos generan alteraciones en eventos clave del desarrollo sexual, como la cariogamia, la entrada en la meiosis, la segregación de los núcleos meióticos y la distribución de los núcleos postmeióticos en las esporas sexuales. Asimismo, la morfogénesis de los cuerpos fructíferos y la maduración y germinación de las esporas sexuales también dependen de este organelo (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013; Takano, *et al.*, 2016; Suaste, *et al.*, 2018). Para las mitocondrias, las cepas de *P. anserina*, que son carentes de la proteína de fisión mitocondrial y peroxisomal FIS1 presentan defectos en la formación de las ascas que son consistentes con una disposición anormal del huso acromático durante el desarrollo meiótico (Takano Rojas, 2018). Con respecto al RE, en *P. anserina* hemos encontrado tres genes que codifican proteínas estructurales de RE. Dos de estos genes codifican proteínas de la familia YOP; mientras que el otro gen codifica una proteína de la familia de los reticulones (Nachón Garduño, 2016; López Fuentes, 2016).

Las proteínas YOP y RTN1 en el desarrollo sexual de *P. anserina*

De los dos genes que codifican para proteínas YOP, se demostró que YOP1 de *P. anserina* no es requerida en el desarrollo somático y sexual del hongo; mientras que la ausencia de YOP2 provoca defectos en la producción de melanina bajo estrés por frío, en la morfología nuclear del micelio aéreo o en algunas ascosporas y en sus procesos de diferenciación (Nachón Garduño, 2016). Además, los genes de la familia YOP muestran interacciones

genéticas en las que el fenotipo de pigmentación de fase somática $\Delta yop2$ es rescatado si se suma la delección $\Delta yop1$, por el contrario, mostraron que el fenotipo de fase sexual se acentúa en la mutante doble $\Delta yop1\Delta yop2$.

Respecto al gen que codifica para la proteína RTN1 de *P. anserina*, se ha demostrado que su ausencia tiene implicaciones en la formación de un porcentaje elevado ($22\pm 2\%$) de ascas anormales, que desarrollan ascosporas de tamaños desiguales y en números anormales. Asimismo, se demostró que estos defectos están relacionados con una mala segregación del material genético, lo que genera una distribución anormal de los núcleos derivados de la meiosis en las ascosporas (López Fuentes, 2016) (Figura 3). Del mismo modo, algunos defectos en la biogénesis peroxisomal, específicamente de mutantes carentes de PEX5 y PEX7, que son los receptores de importación de proteínas peroxisomales, generan un fenotipo semejante al de las cepas carentes de RTN1 (Bonnet *et al.*, 2006; Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013).

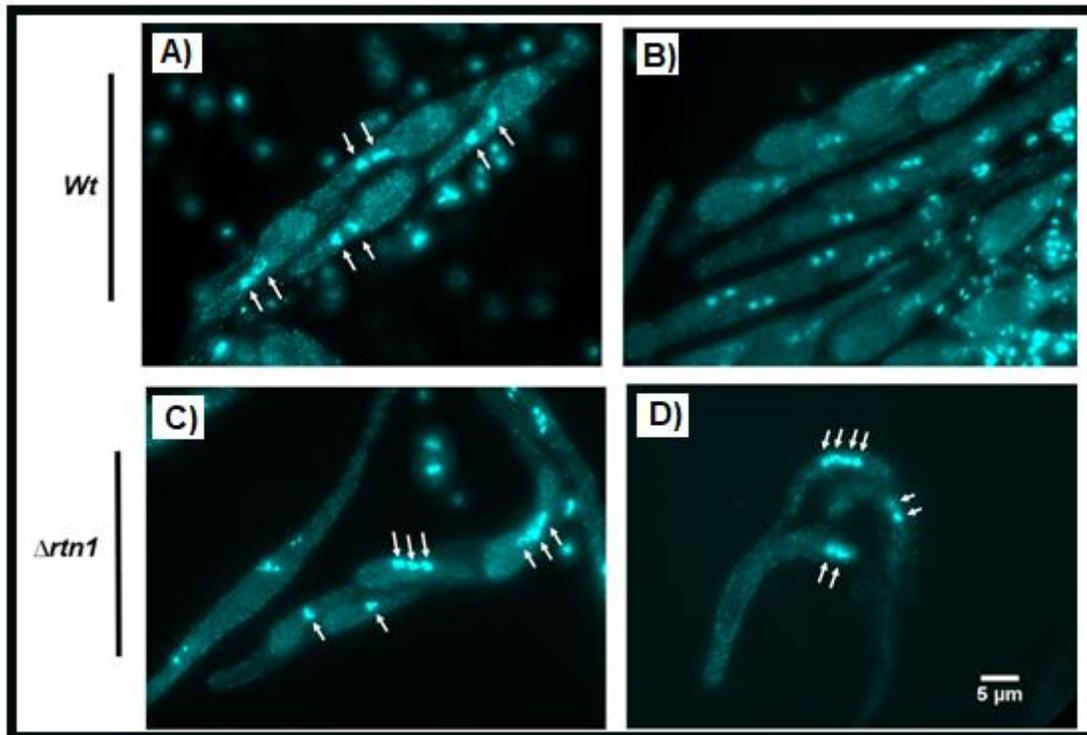


Figura 3. La ausencia de RTN1 afecta la distribución nuclear de las ascosporas. En una cruce sexual entre cepas silvestres, en cada asca los núcleos derivados de la meiosis se dividen mitóticamente y los ocho núcleos resultantes son distribuidos en cuatro ascosporas binucleadas (A y B, nótese en B la presencia de ascas en diferentes estadios de desarrollo, portando todas ellas ascosporas binucleadas). Por el contrario, las ascas formadas en cruces homócigas entre mutantes $\Delta rtn1$ presentan una distribución nuclear alterada (C y D). En los ejemplos se puede observar la formación de cuatro ascosporas con una distribución nuclear desigual (C, dos esporas con tres núcleos y dos esporas con un solo núcleo), o bien, la formación de un número reducido de esporas con un número aberrante de núcleos (D, dos esporas binucleadas y una espora con cuatro núcleos). Los núcleos y el DNA mitocondrial fueron teñidos con DAPI. Las flechas señalan núcleos. (López Fuentes, 2016).

Estudio y función de los reticulones en otros organismos

De entre las proteínas que conforman el RE, las proteínas de reticulón son los componentes estructurales que más se han estudiado en animales, plantas y hongos; ya que sus genes codificantes han sido encontrados en todos los linajes de eucariontes (Chen *et al.*, 2013; Oertle, *et al.*, 2003; Oertle y Schwab, 2003; Shibata *et al.*, 2008). Evolutivamente, se caracterizan por ser una familia de proteínas altamente conservadas y, mientras que para la mayoría de las especies de animales y plantas existen numerosas isoformas de reticulones (Westrate *et al.*, 2015), para la mayoría

de los hongos existe únicamente un gen de reticulón. Por ejemplo, en la mayoría de los ascomicetos filamentosos, incluido *P. anserina*, existe únicamente un gen que codifica para la proteína de reticulón RTN1 (López Fuentes, 2016).

El estudio de las proteínas de reticulón ha demostrado que son necesarias y suficientes para promover el arreglo tubular del RE (Westrate *et al.*, 2015). De hecho, estudios *in vitro* han demostrado que las proteínas de reticulón son capaces de generar una curvatura en las membranas lipídicas (Voeltz, *et al.*, 2006). Asimismo, se ha reportado que la sobreproducción de estas proteínas, en células de animales, plantas y levaduras, genera un alargamiento de las zonas tubulares del RE y un decremento de sus zonas laminares (Shibata *et al.*, 2008); por el contrario, la ausencia de las proteínas de reticulón genera un decremento de las zonas tubulares y un incremento en las zonas laminares (Tolley *et al.*, 2010; Tolley *et al.*, 2008; Voeltz *et al.*, 2006). A nivel fisiológico, la eliminación de los reticulones en *S. cerevisiae* se ha relacionado con una disminución en el crecimiento de las colonias. Efectos similares se han comprobado en conjunto con otras proteínas estructurales, como DP1/YOP1, *lunapark* y las atlastinas (Chen, *et al.*, 2012; Voeltz *et al.*, 2006); mientras que la eliminación de proteínas de reticulón en *Caenorhabditis elegans* provoca un decremento de un 60% en la viabilidad embrionaria (Audhya, *et al.*, 2007). Asimismo, en los mamíferos se ha demostrado que los reticulones participan en la remodelación del RE que incluye la transformación entre cisternas y túbulos asociada al ensamblaje y desensamblaje de la envoltura nuclear durante la división celular (Lu, *et al.*, 2011; Puhka *et al.*, 2012). Las proteínas de reticulón también favorecen el anclaje y la formación del complejo del poro nuclear y participan en el ensamblaje de los cuerpos polares del huso acromático (Casey *et al.*, 2012; Goyal y Blackstone, 2013). Estas evidencias han demostrado la importancia que tiene el correcto arreglo tubular del RE (Shibata *et al.*, 2008; Voeltz *et al.*, 2006).

Sin embargo, en los hongos filamentosos poco se sabe sobre la función que desempeñan las proteínas de reticulón e incluso no se conoce nada con respecto a su localización o dinámica celular. Nuestros hallazgos han implicado a estas proteínas en el desarrollo de *P. anserina* y sugieren que ellas tienen un papel importante en la regulación del desarrollo sexual, donde podrían contribuir en la progresión del desarrollo meiótico.

IV. HIPÓTESIS

En *P. anserina*, la proteína de reticulón RTN1 es necesaria para establecer la arquitectura del retículo endoplásmico a lo largo del desarrollo del hongo y su función es determinante para el correcto ensamblaje y/o posicionamiento de los husos acromáticos durante el desarrollo meiótico y postmeiótico.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el papel del reticulón RTN1 en la dinámica del retículo endoplásmico y el desarrollo sexual del hongo *P. anserina*.

Objetivos particulares

1. Determinar la localización celular de RTN1.
2. Determinar cómo la ausencia de RTN1 afecta el arreglo del retículo endoplásmico.
3. Analizar la localización celular de RTN1 a lo largo del desarrollo sexual.
4. Determinar cómo la ausencia de RTN1 afecta el arreglo de los husos acromáticos durante el desarrollo sexual.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y plásmidos creados y utilizados para este estudio

Para realizar este estudio, se utilizó los plásmidos de *Escherichia coli*: pUC-Hygro-mCHERRY; pUC-Hygro-GFP; pGFP-BIP y pNDC1. Por su parte, se utilizó las cepas de *P. anserina*: Silvestre (Wt); $\Delta Ku 70$; $\Delta rtn1$; SEC63^{A541T}-GFP; SEC63^{F546L}-mCHERRY; $\Delta rtn1$ NDC1 (EC); $\Delta rtn1 \Delta yop1$ (KN31); $\Delta rtn1 \Delta yop2$ (KN28); $\Delta rtn1 \Delta yop1 \Delta yop2$ (KN35) y $\Delta rtn1 \Delta yop1 \Delta yop2$ (KN36). Asimismo, en este estudio se diseñó las cepas de *P. anserina*: RTN1-GFP; WT ER-GFP (EC); $\Delta rtn1$ ER-GFP (EC); RTN1-GFP SEC63^{F546L}-mCHERRY; $\Delta rtn1 \Delta yop1$ (AL236) y $\Delta rtn1 \Delta yop2$ (AL238). Cada una de las cepas de *P. anserina* utilizadas y generadas se obtuvieron en los contextos sexuales MAT+ y MAT-; y sus características correspondientes se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *P. anserina* y plásmidos creados y utilizados en este estudio

Cepa	Genotipo y propiedades	Referencia
<i>E. coli</i>		
pUC-Hygro-mCHERRY	Contiene el casete de resistencia a higromicina (30 µg/mL) y el gen que codifica para la proteína mCherry	(Suaste, 2014)
pUC-Hygro-GFP	Contiene el casete de resistencia a higromicina (30 µg/mL) y el gen que codifica para la proteína GFP	(Suaste, 2014)
pGFP-BIP	Modificación del plásmido pBC-Phleo (Silar, 1995) que contiene la inserción de la proteína GFP adicionada a la secuencia de retención -KDEL de la proteína BIP de retículo endoplásmico	(Meizoso, 2016)
pNDC1	Modificación del plásmido pBC-Phleo (Silar, 1995) que contiene la inserción para sobreexpresar a la proteína NDC1 de <i>P. anserina</i> bajo el control del promotor <i>gpd</i> de <i>A. nidulans</i>	(Suaste, 2018)
<i>P. anserina</i>		
WT S (+)	Cepa silvestre con tipo sexual MAT+	(Silar, 2013)
WT S (-)	Cepa silvestre con tipo sexual MAT-	(Silar, 2013)
$\Delta Ku70$ (+)	Cepa mutante carente del gen <i>ku70</i> y tipo sexual MAT+	(El-Khoury et al., 2008)

<i>Δrtn1</i> (AL02)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Higromicina B (75 μg/mL)	(López Fuentes, 2016)
<i>Δrtn1</i> (AL04)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> y tipo sexual <i>MAT-</i> . Resistente a Higromicina B (75 μg/mL)	(López Fuentes, 2016)
RTN1-GFP (AL146)	Cepa modificada con la integración endógena de la proteína GFP unida a RTN1 y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Higromicina B (30 μg/mL)	Este trabajo
RTN1-GFP (AL142)	Cepa modificada con la integración endógena de la proteína GFP unida a RTN1 y tipo sexual <i>MAT-</i> . Resistente a Higromicina B (30 μg/mL)	Este trabajo
WT ER-GFP (EC) (AL120)	Cepa silvestre modificada con la integración ectópica del plásmido pGFP-BIP y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Fleomicina (25 μg/mL)	Este trabajo
WT ER-GFP (EC) (AL125)	Cepa silvestre modificada con la integración ectópica del plásmido pGFP-BIP y tipo sexual <i>MAT-</i> . Resistente a Fleomicina (25 μg/mL)	Este trabajo
<i>Δrtn1</i> ER-GFP(EC) (AL117)	Cepa <i>Δrtn1</i> modificada con la integración ectópica del plásmido pGFP-BIP y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Fleomicina (25 μg/mL)	Este trabajo
<i>Δrtn1</i> ER-GFP(EC) (AL115)	Cepa <i>Δrtn1</i> modificada con la integración ectópica del plásmido pGFP-BIP y tipo sexual <i>MAT-</i> . Resistente a Fleomicina (25 μg/mL)	Este trabajo
SEC63 ^{F546L} -mCHERRY (AL164)	Cepa modificada con la integración endógena de la proteína mCHERRY unida a SEC63 y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Higromicina B (30 μg/mL)	(Suaste, 2017)
SEC63 ^{A541T} -GFP (AL180)	Cepa modificada con la integración endógena de la proteína GFP unida a SEC63 y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Higromicina B (30 μg/mL)	(Suaste, 2017)
SEC63 ^{A541T} -GFP (AL184)	Cepa modificada con la integración endógena de la proteína GFP unida a SEC63 y tipo sexual <i>MAT-</i> . Resistente a Higromicina B (30 μg/mL)	(Suaste, 2017)
RTN1-GFP SEC63 ^{F546L} -mCHERRY (AL206)	Cepa modificada con la integración endógena de la proteína GFP unida a RTN1, mCHERRY unida a SEC63 y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Higromicina B (30 μg/mL)	Este trabajo
<i>Δrtn1</i> NDC1 (EC) (AL232)	Cepa <i>Δrtn1</i> modificada con la integración ectópica del plásmido pNDC1 y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Geneticina (100 μg/mL)	(Suaste, 2018)
<i>Δrtn1</i> NDC1 (EC) (AL234)	Cepa <i>Δrtn1</i> modificada con la integración ectópica del plásmido pNDC1 y tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Geneticina (100 μg/mL)	(Suaste, 2018)
<i>Δrtn1 Δyop1</i> (KN31)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> y <i>yop1</i> con tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Higromicina B (75 μg/mL) y Nourseotricina (40 μg/mL)	(Nachón, 2016)
<i>Δrtn1 Δyop1</i> (AL236)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> y <i>yop1</i> con tipo sexual <i>MAT-</i> . Resistente a Higromicina B (75 μg/mL) y Nourseotricina (40 μg/mL)	Este trabajo

$\Delta rtn1 \Delta yop2$ (AL238)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> y <i>yop2</i> con tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Higromicina B (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Este trabajo
$\Delta rtn1 \Delta yop2$ (KN28)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> y <i>yop2</i> con tipo sexual <i>MAT-</i> . Resistente a Higromicina B (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	(Nachón, 2016)
$\Delta rtn1 \Delta yop1 \Delta yop2$ (KN35)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> , <i>yop1</i> y <i>yop2</i> con tipo sexual <i>MAT+</i> . Resistente a Higromicina B (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Nourseotricina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	(Nachón, 2016)
$\Delta rtn1 \Delta yop1 \Delta yop2$ (KN36)	Cepa mutante carente del gen <i>rtn1</i> , <i>yop1</i> y <i>yop2</i> con tipo sexual <i>MAT-</i> . Resistente a Higromicina B (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Nourseotricina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	(Nachón, 2016)

Medios y condiciones de cultivo para *P. anserina*

P. anserina creció en medio mínimo M2 (Apéndice 3), con dextrina como fuente de carbono. Todos los cultivos se incubaron por 48 horas a 27°C con una humedad relativa del 85% y en obscuridad. Para analizar la fase sexual se mantuvieron las mismas condiciones, pero los cultivos se incubaron con iluminación continua (Silar, 2013).

Almacenamiento de las cepas de *P. anserina*

Para mantener las cepas del hongo, implantes de agar con micelio fueron inmersos en 1 mL, de medio RG líquido (Apéndice 3) y congelados a -70°C.

Medios selectivos para *P. anserina*

Para analizar cada una de las cepas a su marcador de resistencia se adicionó al medio mínimo M2 con Higromicina B (75 o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Nourseotricina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Geneticina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Fleomicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), según correspondió (Apéndice 3).

Otros medios de cultivo

Con las mismas condiciones que el medio mínimo M2, se utilizó el medio mínimo MA para la colecta de esporas sexuales; el medio mínimo GYE para la germinación inicial de las esporas; el medio mínimo MM para los análisis en microscopía confocal y/o epifluorescencia; así como el medio

sólido RG para la obtención de transformantes primarias de *P. anserina*. La elaboración de cada uno se indica en el apéndice 3.

Cruzas sexuales

Para las cruzas sexuales de *P. anserina* se dividió en dos una caja de medio mínimo M2, se tomó tres inóculos de un solo tipo sexual (*MAT+* o *MAT-*) y se colocó en uno de los dos lados de la caja. En la otra mitad de la caja se colocó los inóculos del tipo sexual opuesto de la cepa deseada y se dejó crecer en la incubadora por 72 horas. Al término de este tiempo se adicionó 3mL de agua estéril que ayudó a distribuir homogéneamente los espermacios para favorecer su fertilización con los ascogonios y se dejó por 72 horas más dentro de la incubadora para que se desarrollaran los peritecios con las ascas. Al tercer día post-fertilización, los peritecios desarrollaron ascas que fueron muy útiles para realizar citología, mientras que al cuarto día post-fertilización los peritecios tenían ascas que ya habían terminado de formar esporas sexuales. Por ello, el cuarto día fue el día adecuado para cuantificar los porcentajes de anormalidad o recuperar esporas.

Citología para fijación y tinción de ascas

Para la fijación de ascas en láminas, primero se colocó una lámina de *Parafilm* sobre cajas de Petri de vidrio y se lavó laminillas con alcohol que se limpiaron con ayuda de *Kimwipes*. En seguida, se colocó en cada laminilla 20 μ L de poli-lisina con tritón 100X al 10% (Apéndice 2), se esperó 10 minutos y se enjuagó con agua desionizada y al finalizar se retiró el exceso. Las laminillas se almacenaron en la caja de Petri con *Parafilm* en oscuridad y a temperatura ambiente por 24 horas o hasta que se secaron completamente. Posteriormente, de una cruce sexual con tres días post-fertilización se recuperó las ascas del interior de 10-20 peritecios y se colocaron en un pozo de una placa de *Mazzini*. Previamente se adicionó al pozo de la placa 485 μ L de paraformaldehído (PAF) y 15 μ L de tritón 100X al 10% y se dejó por 10 minutos las ascas recuperadas para fijarlas. Posteriormente se retiró el PAF y se lavó con 500 μ L de PBS 1X. Se transfirieron las muestras a un

portaobjetos siliconado y se colocó un cubreobjetos con poli-L-lisina y con ayuda de una aguja de punta achatada se aplastaron las muestras para que se adhirieran. A continuación, se tomó la laminilla y se lavó con 250 μ L de PBS + Tritón 100X, se retiró el exceso y se añadió 250 μ L de PEM + Lisolecitina dejando en oscuridad a 37°C por 1 hora. Se lavó después con 250 μ L de PBS + Tritón 100X (Apéndice 2). Y luego, se adicionó 200 μ L de anticuerpo primario anti- α -tubulina de ratón (Abcam, Cambridge UK, ab80779) (diluido 2:1000 de PBS) y se dejó en una cámara húmeda toda la noche. Luego de 24 horas se realizó dos lavados con 250 μ L de PBS + TX esperando 15 minutos entre cada uno y posteriormente se colocó 100 μ L de anticuerpo secundario ALEXA-594 (Jackson Immuno Research, Baltimore Pike PA, 715-585-150) o FITC (Jackson Immuno Research, 715-095-150) (diluidos 1:100 de PBS), se dejó incubar por 45 minutos a 37°C dentro de una cámara húmeda y al finalizar se lavó con 250 μ L de PBS + TX y se llevó a cabo la tinción de DAPI donde se añadió 250 μ L de PBS+DAPI+TX a las muestras en la laminilla siliconada por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó con dH₂O y se montó entre un porta y un cubreobjetos a los cuales se añadió una gota de *prolong* asegurándose de no dejar burbujas en la muestra y colocándolas en oscuridad por 24 horas hasta secar completamente. Finalmente, las laminillas se almacenaron a -4°C hasta su posterior visualización en el microscopio confocal (Thompson-Coffe y Zickler, 1994).

Porcentaje de anormalidad en esporas sexuales

De una cruce sexual de tipo homóciga y pasados cuatro días post-fertilización, se reventaron tres peritecios de los cuales se recuperó y cuantificó el número de ascas totales conformada por la muestra. Se agrupó en ascas normales y anormales, y posteriormente se determinó el porcentaje de anormalidad recuperado en cada muestra. Para cada cepa, este proceso se realizó por triplicado y el porcentaje final fue el promedio de cada cuantificación. Se consideraron como ascas normales aquellas que presentaron cuatro esporas del mismo tamaño o cinco esporas (tres grandes

del mismo tamaño y dos pequeñas). Como ascas anormales, se tomaron aquellas que presentaron seis, cinco, cuatro, tres, dos o una espora de distinto tamaño, así como las bananas (ascas melanizadas).

Recuperación de esporas sexuales

A los cuatro días post-fertilización de las cruza sexuales, se recuperó las esporas expulsadas por los peritecios en medio MA (Apéndice 3). Después de su recolección se aislaron, separaron y trasladaron con ayuda de una aguja de disección a un medio GYE (Apéndice 3), en el cual se incubó en oscuridad hasta su germinación. Posteriormente se propagó en medios selectivos y se determinó su tipo sexual.

Determinación de tipo sexual

El tipo sexual de una cepa se determinó tras confrontarla en una cruza sexual ante una cepa silvestre de un tipo sexual conocido (*MAT+* o *MAT-*) en medio mínimo M2. El resultado de la determinación sexual depende de si ocurrió o no fertilización, misma que se observó en los bordes de encuentro de ambas colonias, siempre y cuando la cruza no se haya fertilizado con agua.

Transformación de *P. anserina*

Para transformar a *P. anserina* se empleó protoplastos $\Delta Ku 70$ o $\Delta rtn1$ (Tabla 1).

Formación de protoplastos

Para hacer los protoplastos se recuperó dos colonias, de 48 horas de crecimiento cultivadas en medio mínimo M2, en un tubo tipo *Falcon* con 5 mL de agua estéril y el micelio se fragmentó con un homogenizador. Éste fue utilizado para inocular un matraz *Fernbach* con 250 mL de medio líquido M2 adicionado con extracto de levadura (Apéndice 3), que posteriormente se incubó por dos días a 27°C. El micelio formado se recuperó en un embudo estéril con gasa, se lavó con 200 mL de amortiguador TPS1 frío (Apéndice 2) y se determinó su peso húmedo. A continuación, se añadió una solución de

enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* a una concentración de 40 mg/mL y usando el amortiguador TPS1. Esto se incubó con agitación a 37°C por tres horas.

El micelio digerido se filtró utilizando de 25-50 mL de TPS1 y se centrifugó por 10 minutos a 3200 r.p.m. usando la centrífuga SORVALL ST8 de la marca *Thermo Scientific*. Los protoplastos recuperados fueron lavados por centrifugación dos veces adicionales. Primero con 10 mL de amortiguador TPS1 y después con 5 mL de TPC (Apéndice 2). Finalmente, el precipitado se resuspendió en un mismo volumen de TPC y la suspensión se distribuyó en alícuotas de 200 µL cada una, que se congelaron a -70°C hasta su uso. El número de protoplastos fue determinado mediante la cámara de *Neubauer*.

Transformación de protoplastos de *P. anserina*

Una alícuota de 200 µL de protoplastos se calentó por 5 minutos a 48°C e inmediatamente se transfirió a hielo por 30 segundos. Posteriormente, se agregó entre 2 a 5 µg/mL del DNA molde y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron de 1.5- 2 mL de PEG pH 7.5 (Apéndice 2), se mezcló cuidadosamente y se dejó incubar por 15 minutos y se adicionaron 5 mL de medio RG de cobertura (Apéndice 3) a 42°C. Finalmente, antes de que este gelificara se vertió a cajas de Petri con medio de recuperación RG con el antibiótico correspondiente (Apéndice 3) y se incubó las cajas de tres a seis días en oscuridad hasta que aparecieron colonias transformantes (Coppin-Raynal *et al.*, 1989).

Obtención de cepas ectópicas ER-GFP de *P. anserina*

La construcción ectópica ER-GFP para *P. anserina* se encuentra dentro del plásmido pGFP-BIP que fue generado, purificado y recuperado por el estudiante de LIBB Aldo Meizoso Huesca. Este plásmido se insertó siguiendo el protocolo de transformación de protoplastos en la cepa $\Delta rtn1$. Las transformantes primarias recuperadas se seleccionaron por su resistencia a fleomicina (25 µg/mL). Posteriormente por cruza sexuales homócigas se obtuvieron las cepas $\Delta rtn1$ ER-GFP (Ec) en el contexto sexual *MAT+* y *MAT-*. Por cruza sexuales heterócigas se obtuvieron las construcciones ectópicas

silvestres en ambos contextos sexuales. Finalmente, en cada una de las cepas obtenidas se evaluó la presencia de fluorescencia tanto en el micelio vegetativo como en la fase sexual por microscopía de epifluorescencia y se realizó por microscopía confocal el perfil de intensidad de fluorescencia.

Obtención de la cepa con la construcción endógena RTN1-GFP de P. anserina

Para generar la construcción RTN1-GFP, se siguió la técnica de PCR de fusión (Silar, 2013). Primero, se llevó a cabo la amplificación de los extremos flanqueantes al codón de paro del gen *RTN1*. Para amplificar el extremo 5' de 1418 pb se utilizó los oligonucleótidos n-rtn1-f (*forward*) y lkt-rtn1-r (*reverse*), y para el extremo 3' de 1510 pb se utilizó los oligonucleótidos hph-rtn1-3f (*forward*) y n-rtn1-3r (*reverse*). En ambos casos se utilizó de templado el DNA genómico de una cepa silvestre de *P. anserina* y la DNA polimerasa *Primer Star* (TAKARA) con el programa de amplificación rápida de 30 ciclos con los siguientes pasos: 98°C por 10 segundos para desnaturalizar, 60°C por 15 segundos para alinear y 68°C por 50 segundos para polimerizar.

Asimismo, se llevó a cabo la amplificación de la secuencia bisagra, la secuencia codificante para GFP y la secuencia del gen *HPH*, codificante para la resistencia a higromicina (C') de 2.6 kb, en la que se utilizó los oligonucleótidos rtn1-lkt-f (*forward*) y rtn1-hph-ru (*reverse*). En esta reacción se usó como templado el DNA del plásmido pUC-Hygro-GFP y se volvió a utilizar el mismo programa para la DNA polimerasa *Primer Star*.

Al finalizar cada PCR los productos se purificaron con el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band purification* de la marca *GE-Healthcare*, con los que se realizó el PCR de fusión y se generó la construcción de 5.5 kb, en la cual se utilizó los oligonucleótidos n-rtn1-f (*forward*) y n-rtn1-3r (*reverse*). En esta reacción se usó como templado los PCR purificados 5', 3' y C' en una relación molar 1:1:3 respectivamente y la DNA polimerasa *Dream-Taq*, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 94°C por 3 minutos. Paso dos, 30 ciclos con los siguientes pasos: 94°C por 30 segundos para desnaturalizar, 60°C por 30 segundos para alinear, 68°C

por 4.5 minutos para polimerizar. Paso tres, una extensión final de 5 minutos a 68°C.

El producto final del PCR de fusión fue purificado con el mismo kit de purificación en gel de electroforesis (*GE-Healthcare*) y se usó para transformar a una cepa $\Delta ku70$ (Figura 4). De esta transformación se seleccionaron cepas primarias resistentes a higromicina, las cuales fueron verificadas por PCR al igual que las cepas purificadas RTN1-GFP (*MAT+* y *MAT-*) obtenidas mediante cruza con la cepa silvestre. Las reacciones de PCR de revisión se llevaron a cabo en 25 μ L de volumen total.

El reemplazo completo de *rtn1* por la construcción RTN1-GFP se verificó utilizando los oligonucleótidos n-rtn1-fch (*forward*) y n-rtn1-3ch (*reverse*). La longitud esperada de la amplificación es de 3 kb en cepas sin la integración del casete y de 5.6 kb en cepas con integración de la construcción. En esta reacción se usó como templado de manera independiente DNA genómico de *P. anserina* de las cepas *Wt+*, *Wt-*, la transformante primaria y las transformantes purificadas. En este caso se usó la DNA polimerasa *Acu-taq*, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 94°C por 3 minutos. Paso dos, 25 ciclos de la siguiente manera: 94°C por 30 segundos para desnaturalizar, 60°C por 30 segundos para alinear, 68°C por 4.5 minutos para polimerizar. Paso tres, una extensión final de 5 minutos a 68°C.

Asimismo, se usó el programa de la polimerasa *Acu-taq* para realizar los PCR de revisión de integración de la construcción, que amplifican el extremo 5' de 3007 pb, usando los oligonucleótidos n-rtn1-fch (*forward*) y hph-rc (*reverse*); para el extremo 3' de 1637 pb se utilizaron los oligonucleótidos hph-fc (*forward*) y n-rtn1-3ch (*reverse*) (Figura 5). Sumado a esto, también se revisó por secuenciación la cepa AL146 con modificación endógena RTN1-GFP. Para este proceso se amplificó y purificó una banda de PCR con los oligonucleótidos n-rtn1-fch (*forward*) y rtn-3r (*reverse*) (Figura 6).

Obtención de las cepas con la construcción endógena SEC63-GFP y SEC63-mCHERRY

Las construcciones endógenas SEC63-GFP y SEC63-mCHERRY estuvieron a cargo del Dr. Fernando Suaste Olmos y mismo quien purificó y usó ambas construcciones para transformar y obtener a las transformantes primarias. Posteriormente yo realicé su purificación, la confirmación por PCR y analicé los resultados de la secuenciación (Figura suplementaria 1;Figura suplementaria 2;Figura suplementaria 3).

Análisis por microscopía

Las imágenes del microscopio óptico de fluorescencia *Nikon e600* se tomaron con la cámara *ANDOR™-NEO sCMOS* y se analizaron con el programa *imageJ*. Las imágenes del microscopio confocal *Zeiss LSM-800* se tomaron con el objetivo 63X y se analizaron con el software del programa *ZEN*. En ambos casos las imágenes recuperadas también fueron analizadas con el programa *imageJ* donde se realizó las proyecciones en 3D y los videos correspondientes (Schindelin, *et al*, 2012).

Observación de fluorescencia por microscopía de epifluorescencia

Se colocó inóculos de cepas en medio mínimo M2. A las 48 horas de incubación se tomó el micelio y se montó en un portaobjetos con 20 µL de agua, se colocó un cubreobjetos y se revisó la ausencia o presencia de fluorescencia. Para la cuantificación de estos ensayos se revisó bajo el objetivo 10X o 100X un total de 500 hifas por cepa; se tomó en cuenta la presencia de la fluorescencia a lo largo de la hifa y su localización en la punta.

Observación de la distribución nuclear en el micelio aéreo

En cajas de Petri con 15 mL de medio mínimo M2 se inoculó las cepas deseadas. Se dejaron crecer por 24 horas en presencia de luz y se colocó un cubreobjetos con un ángulo de $\sim 45^\circ$ para recuperar micelio aéreo. Se adicionó 200 µL de solución DAPI y se dejó reposar por 10 minutos en oscuridad. Se quitó el exceso y se dejó reposar por tres minutos antes de ser revisadas en el microscopio confocal.

Fluorescencia apical

Se tomó un inóculo de las cepas en medio mínimo M2 y se traspasó a un medio MM (Apéndice 3). Se dejó crecer por 24 horas y se recuperó la colonia colocándola en un cubreobjetos alargado para posicionarlo en el microscopio confocal. Las muestras fueron observadas con el objetivo 63X con aceite de inmersión. Las imágenes recuperadas de cada cepa se sometieron a un proceso de cuantificación de fluorescencia en el cual, con ayuda del programa *ZEN*, se trazó un transecto libre al interior de cada hifa para poder visualizar el perfil de intensidad de fluorescencia.

Tinción con reactivo FM4-64

Para determinar si en la punta de las hifas existe colocación entre la señal RTN1-GFP y el *Spitzenkörper*, se realizó una tinción con el reactivo FM4-64 (Fischer-Partor *et al.*, 2000) (Apéndice 2). Estas muestras se evaluaron por microscopía confocal en el objetivo 63X. Para esto, primero se realizó un precultivo de la cepa deseada en medio mínimo M2; luego de 24 horas se traspasó a medio MM y se dejó incubar por 24 horas más. Posteriormente se realizó un corte en el medio y se tomó una muestra de micelio a la cual se añadió 30 μ L del reactivo FM4-64 con una concentración 7 μ M, se esperó por 5 minutos y se lavó. Posterior al lavado, se dejó reposar la muestra por 30 min adicionales para así favorecer la entrada del reactivo a la membrana celular.

Técnicas de biología molecular

Extracción de DNA de *P. anserina*

En el medio mínimo M2 se colocó un papel celofán estéril sobre el cual se realizó inóculos de la cepa deseada. Posterior a las 48 horas de crecimiento se recuperó el micelio con ayuda de una espátula estéril y se almacenó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Esta muestra se liofilizó por una hora y luego se trituró con una espátula hasta conseguir un polvo fino. A continuación, se resuspendió con 500 μ L de la solución EDTA (50 mM, pH 8)

con SDS (0.2%) y se incubó por 15 minutos a 70°C. Después se adicionó 50 µL de acetato de potasio 5M para precipitar proteínas y se colocó los tubos por 30 minutos en hielo. Al finalizar este tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 13 mil r.p.m. en la centrifuga 5418R de la marca *ependorf* y se recuperó el sobrenadante en tubos limpios, para su posterior adición de 200 µL de fenol/cloroformo (1:1). Se volvió a centrifugar por cinco minutos a 13 mil r.p.m. y se recuperó la fase acuosa; a la cual se adicionó 200 µL de cloroformo y se centrifugó nuevamente por cinco minutos a 13 mil r.p.m. Se recuperó otra vez la fase acuosa hasta la marca de proteínas y se colocó 1 mL de etanol al 100%, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se repitió este último paso con alcohol al 70% y finalmente se resuspendió la muestra en 100 µL DE TE 1X estéril (pH 8). Las muestras se cuantificaron utilizando un *nanodrop* de la marca *Thermo Scientific*.

Purificación de productos de PCR y plásmidos

Los productos de PCR y los plásmidos de *E. coli* se purificaron siguiendo el protocolo del kit *ilustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band purification* de la marca *GE-Healthcare* para geles de agarosa y el kit de extracción de DNA *Spin miniprep* y microcentrifuga *QIAGEN*.

Transformación para células competentes de *E. coli*

Se tomó una alícuota de 200 µL y se adicionaron 10 µL con no más de 50 ng del plásmido a transformar pUC-mCHERRY/GFP, pGFP-BIP o pNDC1 (Tabla 1) y se colocó en hielo por 30 minutos. Inmediatamente se colocó en una parrilla a 42°C por 1.5 minutos y posteriormente se trasladó a hielo por 1 minuto. A continuación, se añadió 1 mL de medio LB líquido (Apéndice 3) y se dejó incubar a 37°C por 1 hora. Al finalizar este tiempo se realizó un plaqueo en cajas de Petri con medio LB sólido (Apéndice 3) adicionado con diferentes concentraciones (50, 100 y 250 µL) del antibiótico correspondiente y se incubó a 37°C por 12 horas.

Almacenamiento de plásmidos

Las cepas de *E. coli* que contienen los plásmidos generados y utilizados fueron almacenados en medio LB con 20% de glicerol (Apéndice 3).

Análisis bioinformáticos

Análisis de secuencias para la localización, identificación y caracterización de los genes codificantes para la proteína SEC63 y NDC1 de *P. anserina*

Se utilizó la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* (*Saccharomyces Genome Database, SGD*, <http://www.yeastgenome.org/>) con la cual se localizó las secuencias de las proteínas Sec63 y Ndc1. Con estas secuencias se realizó una búsqueda de alta similitud en la base de datos del genoma de *P. anserina* (Espagne et al., 2008) utilizando el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* y se recuperó la secuencia homóloga de acuerdo con su valor-e de corte significativo ≥ 0.005 ; el cual arrojó a la proteína SEC63 de *P. anserina* en la posición Pa_7_10810 y a la proteína NDC1 en la posición Pa_3_9200.

Obtención del gen codificante para la proteína RTN1 de *P. anserina*

Los datos de la secuencia para la localización, identificación y caracterización del gen codificante para la proteína RTN1 de *P. anserina* con posición Pa_1_22550 fueron recuperados de la tesis de licenciatura: "La proteína de reticulón RTN1 del hongo filamentoso *Podospora anserina* y su papel en el desarrollo sexual" (López Fuentes, 2016).

Diseño de las secuencias de los oligonucleótidos

Las secuencias de nucleótidos y proteínas fueron analizadas con los programas *Bioedit 7.0* (Hall, 2005) y *Serial Cloner* (V.2.6.1.) y para las secuencias genómicas se utilizó el programa *ARTEMIS* (Carver et al., 2005). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron diseñadas manualmente y posteriormente verificadas con ayuda del programa *Primer 3* (Untergasser et al., 2007) (Apéndice 1, Tabla 4).

VII. RESULTADOS

Caracterización de la dinámica del retículo endoplásmico durante la fase somática de *P. anserina*

Para conocer cómo se comporta y visualiza el RE en el micelio vegetativo de *P. anserina*, primero generamos una construcción que codifica para una proteína GFP que se localiza en el lumen del RE ya que cuenta con la secuencia de residuos de aminoácidos que dirigen y retienen a la proteína Bip (Aebi, 2013; Gidalevitz *et al.*, 2013). El plásmido que contiene la construcción ER-GFP se utilizó para transformar protoplastos *Δrtn1*. Se obtuvieron 30 transformantes primarias, de las cuales se analizaron 7 para verificar su fluorescencia. Posteriormente, tras tres cruza sexuales se recuperaron 6 cepas silvestres y 10 cepas *Δrtn1* que integraron la construcción ER-GFP. Este ensayo de recuperación de esporas por medio de cruza sexuales nos indicó que el patrón de segregación, de la construcción ER-GFP, fue consistente con un solo evento de integración.

En segundo lugar, se diseñó una construcción para modificar el gen endógeno *SEC63*. La familia de proteínas SEC, se han descrito como proteínas integrales de la membrana del RE, las cuales conforman al complejo de translocación para las proteínas que entraran en la vía secretoria (Sanders, *et al.*, 1992; Johnson, *et al.*, 1999). Esta construcción modificó el terminador de la secuencia codificante de la proteína *SEC63* y la unió con una secuencia bisagra que a su vez está asociada con la secuencia codificante de la proteína GFP o mCHERRY, de tal suerte que la nueva proteína *SEC63* estuviera etiquetada por su extremo -C terminal a la proteína fluorescente correspondiente y además se demostró por análisis de PCR la correcta inserción de los genes de GFP y mCHERRY en el locus *SEC63* de las cepas obtenidas (Figura suplementaria 2). Sin embargo, la fluorescencia asociada a *SEC63* etiquetada tanto con GFP como con mCHERRY fue muy tenue y desafortunadamente los datos obtenidos por secuenciación mostraron que ambas construcciones (*SEC63*^{A541T}-GFP y *SEC63*^{F546L}-mCHERRY) presentaban

mutaciones puntuales que podrían interferir con la interpretación de los resultados observados en el fenotipo de las cepas (Figura suplementaria 3). Por ello, para llevar a cabo el análisis del RE de *P. anserina* continuamos con la caracterización de ER-GFP.

Dado que las proteínas de la familia de los reticulones en los hongos miceliales no han sido caracterizadas decidimos etiquetar y definir la localización celular de RTN1 en *P. anserina*. Para ello generamos una construcción que modifica la secuencia del terminador del gen *RTN1* y la une con una secuencia bisagra que a su vez está unida a la secuencia codificante para la proteína fluorescente GFP. El diseño de esta construcción y los fragmentos de DNA que componen a la misma se pueden apreciar en la figura 4, y sirvieron para transformar protoplastos de *P. anserina* de la cepa $\Delta ku70$.

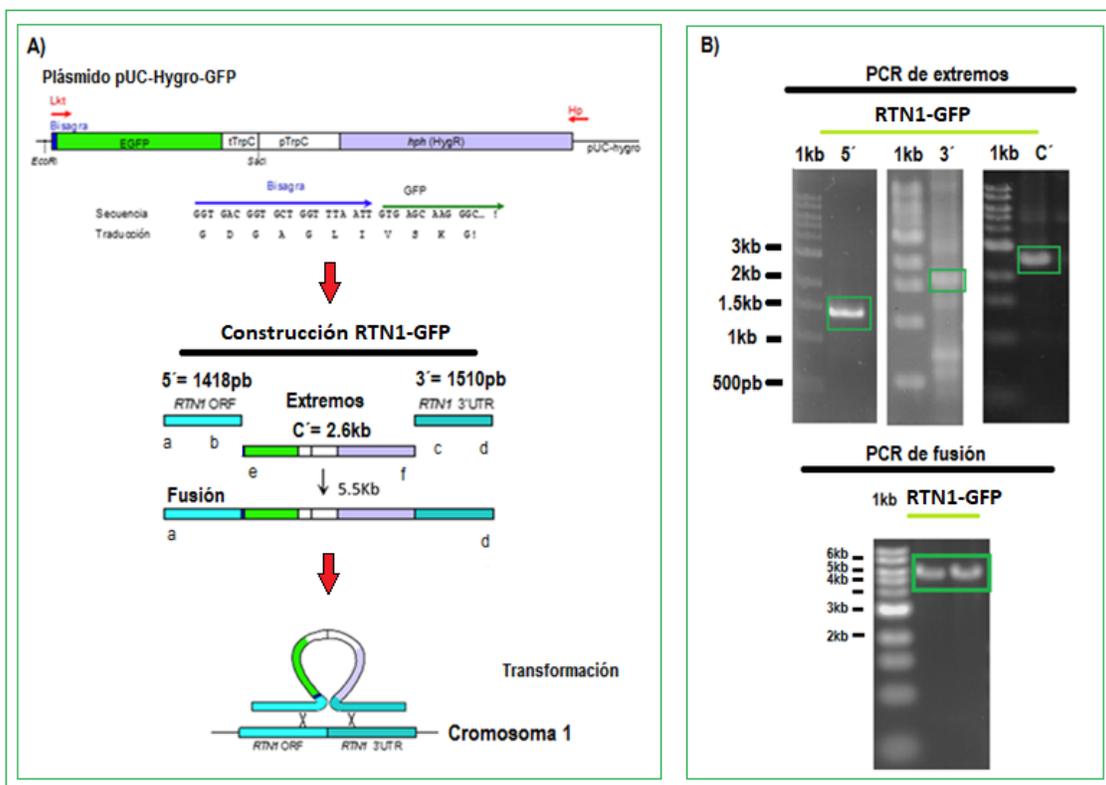


Figura 4. Construcción del casete para etiquetar al gen *RTN1* CON *GFP* en su sitio cromosomal. A) Diagrama del plásmido pUC-Hygro-GFP con el cual se recuperó el gen codificante para EGFP y el gen hph codificante para el marcador de resistencia a higromicina. Se muestra la bisagra de unión a la región adyacente para RTN1, así como la construcción diseñada para la fusión RTN1-GFP y su transformación por recombinación

homóloga. B) Se muestran los fragmentos generados para la construcción RTN1-GFP con el extremo 5' de 1418 pb, el 3' de 1510 pb y el C' de 2.6 kb. Asimismo, se muestra el PCR de fusión de 5.5 kb. 1 kb= marcador de peso molecular; las letras a-f indican los oligonucleótidos utilizados para cada PCR (Apéndice 1).

Se obtuvieron 19 transformantes primarias y se purificaron 6 con la modificación RTN1-GFP (recuperadas mediante cruza sexuales con la cepa WT). se analizó por medio de PCR la correcta inserción del gen GFP en el locus *RTN1* de las cepas obtenidas (Figura 5).

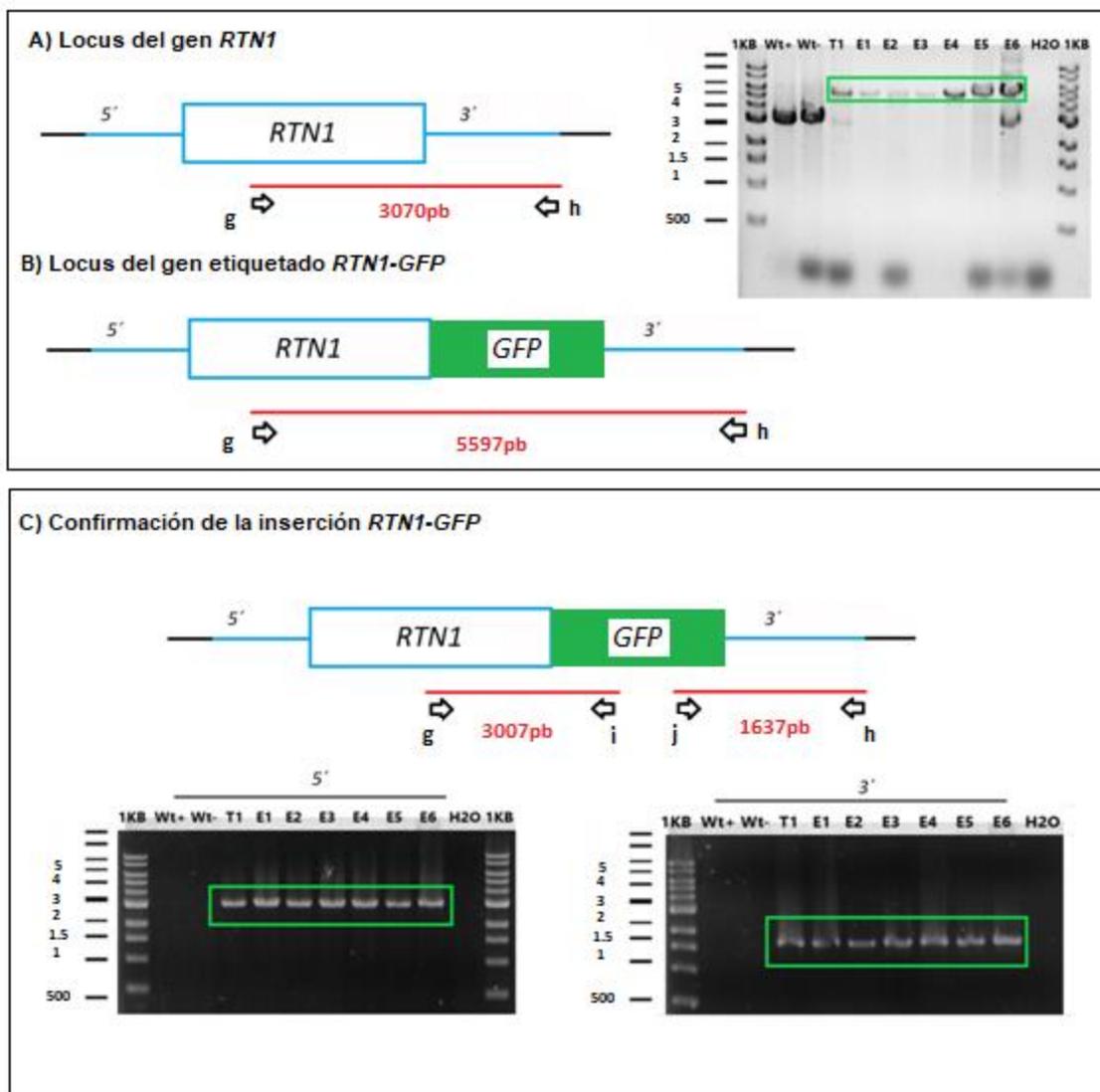


Figura 5. Verificación por PCR en las cepas que expresan *RTN1-GFP*. Arriba: en (A) locus *RTN1* silvestre; en (B) locus *RTN1* etiquetado con GFP; a su derecha, gel de electroforesis que muestra la amplificación por PCR del locus *RTN1* en una cepa silvestre (Wt, fragmento esperado 3070 pb), una mutante primaria (T1) y las cepas purificadas *RTN1-GFP* (E1-E6) (5597 pb). Abajo: en (C) locus *RTN1* etiquetado mostrando el tamaño de los productos de PCR 5' y 3' para su verificación (3007 pb y 1637 pb)

respectivamente); abajo se muestra el gel de electroforesis para cada una de las regiones, se observa su comparación entre las cepas silvestres de ambos tipos sexuales, la transformante primaria (T1) y las cepas purificadas RTN1-GFP (E1-E6). 1 kb= Marcador de peso molecular; H₂O, control negativo usando agua como templado; se encerró en un recuadro las bandas esperadas. Las letras g-h indican los oligonucleótidos utilizados en cada uno de los PCRs (Apéndice 1).

Asimismo, se comprobó por medio de secuenciación que la construcción RTN1-GFP no tenía mutaciones (Figura 6). No observamos alteraciones ni en el crecimiento ni en el desarrollo de las cepas de *P. anserina* que expresan RTN1-GFP, incluyendo la formación de las ascosporas para las cuales se demostró con cruza homocigas RTN1-GFP, en las que se evaluaron aproximadamente 100 ascas provenientes de tres peritecios con cuatro días post-fertilización (n=3), que el porcentaje de ascas anormales fue igual a cero (Figura 7). También fue importante realizar este experimento para descartar algún fenotipo similar al reportado en la cepa de delección $\Delta rtn1$ (López Fuentes, 2016).

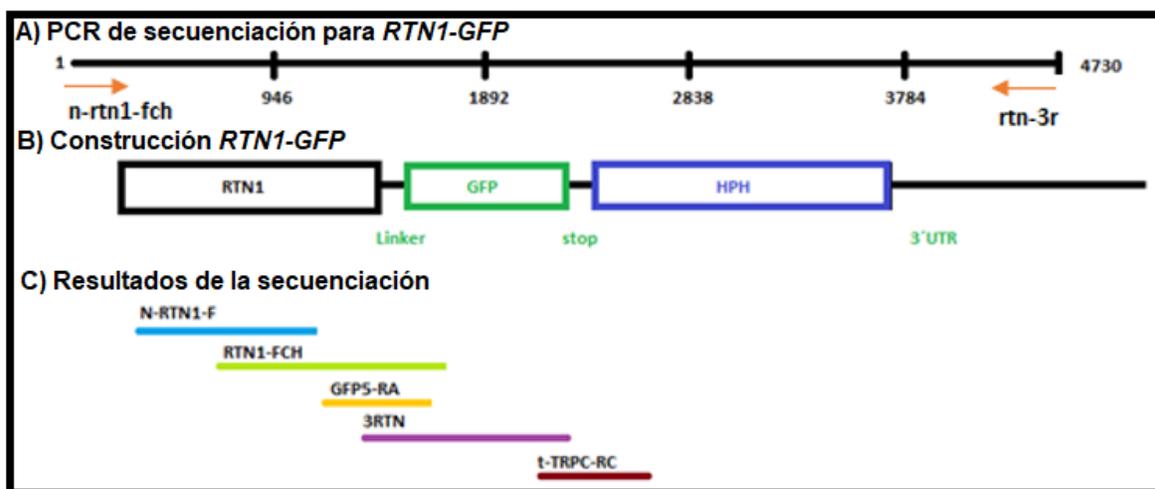


Figura 6. Estrategia de secuenciación de la cepa AL146 con integración endógena RTN1-GFP. A y B) Para secuenciar el alelo *RTN1::GFP* se generó un fragmento de 4730 pb que abarca el locus de *RTN1* en el que se integró el casete *GFP::HPH* que se compone por parte de la secuencia del gen codificante para *RTN1*, más el linker (bisagra), más el gen codificante para *GFP*, más su codón de paro y el gen que codifica para el marcador de resistencia a higromicina. C) Se muestran las zonas que fueron secuenciadas (línea azul, verde, amarilla, morada y café).

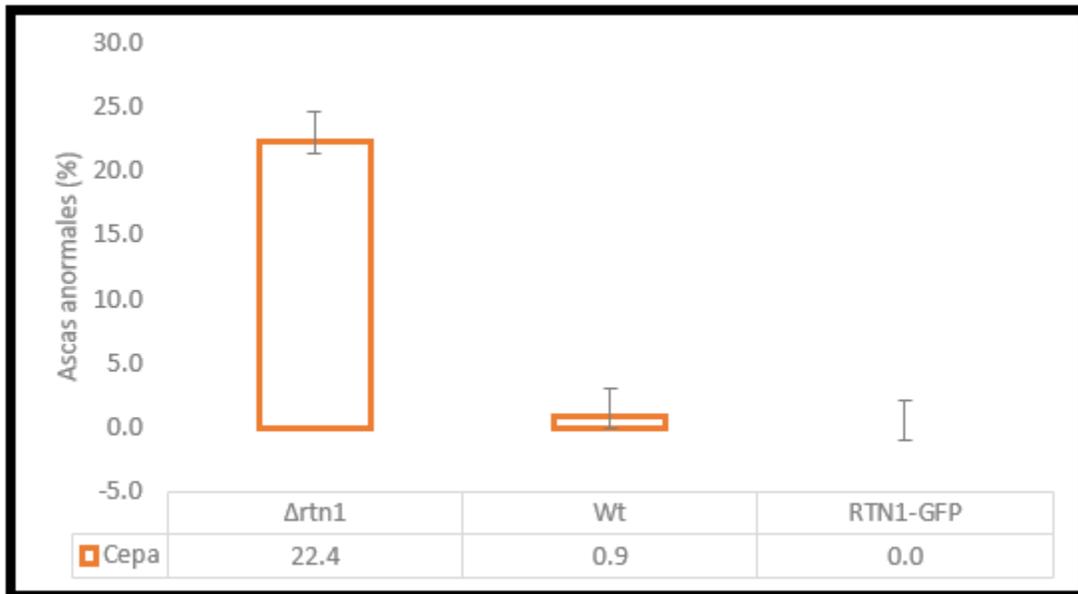


Figura 7. Cuantificación de los defectos en la formación de las ascas durante el desarrollo sexual en la cepa RTN1-GFP. Se muestra que la cruz homociga RTN1-GFP no presenta ascas anormales (porcentaje igual a 0%). El eje de las abscisas corresponde a un experimento independiente para cada cruz donde se evaluaron ~100 ascas provenientes de peritecios de cuatro días post-fertilización por experimento. Como controles se utilizaron las cruces homociga $\Delta rtn1$ y silvestre (Wt). Se indican las barras de error (n=3 para cada cepa).

Arreglo del RE en hifas vegetativas de *P. anserina*

Se caracterizó por primera vez el arreglo del RE de *P. anserina* con la inserción de la construcción ectópica que codifica a la proteína ER-GFP. La señal de la fluorescencia ER-GFP se evaluó por microscopía confocal en distintos segmentos hifales de ~90 μm por hifa (n=43) y en los cuales, para algunos de ellos se siguió el arreglo del RE en tres segmentos hifales subsecuentes que corresponden al ápice hifal, la región subapical y la región distal (n=15). Estos análisis demostraron que el arreglo del RE se distribuye en forma de red a lo largo de toda la hifa (Figura 8). Respecto a su dinámica, el RE presenta movimientos rápidos y continuos. Esto lo demostraron los movimientos que se observaron en dos hifas silvestres, que se grabaron *in vivo*, y en las que se logró capturar un movimiento continuo del RE que se mantuvo durante el tiempo de observación en el microscopio (datos no mostrados). Resultados semejantes se observaron al intentar generar una reconstrucción tridimensional del arreglo del RE y para la cual se planteó

tomar distintos planos en Z que tuvieran un intervalo de 0.37-0.43 μm entre todo el volumen celular. Sin embargo, a pesar de que se recuperaron los distintos planos en Z, la distribución del RE variaba entre uno y otro.

Por su parte, observamos que la distribución del RE está polarizada ya que en distintas regiones hifales se observa una mayor o menor concentración de la señal ER-GFP. De hecho, para algunas hifas (n=16), en las regiones hifales apicales se logra observar que existen cúmulos o parches de señal ER-GFP. Asimismo, en todas las hifas observadas se ve una disminución de la señal ER-GFP en la zona en la que se acumulan las vacuolas. Para demostrar esto se realizaron transectos lineales a lo largo del eje medio de las hifas vegetativas en los cuales se aprecia que la intensidad de la fluorescencia ER-GFP aumenta con dirección a la zona apical y que de la misma forma presenta una disminución visible que se asocia con la zona vacuolar (Figura 8).

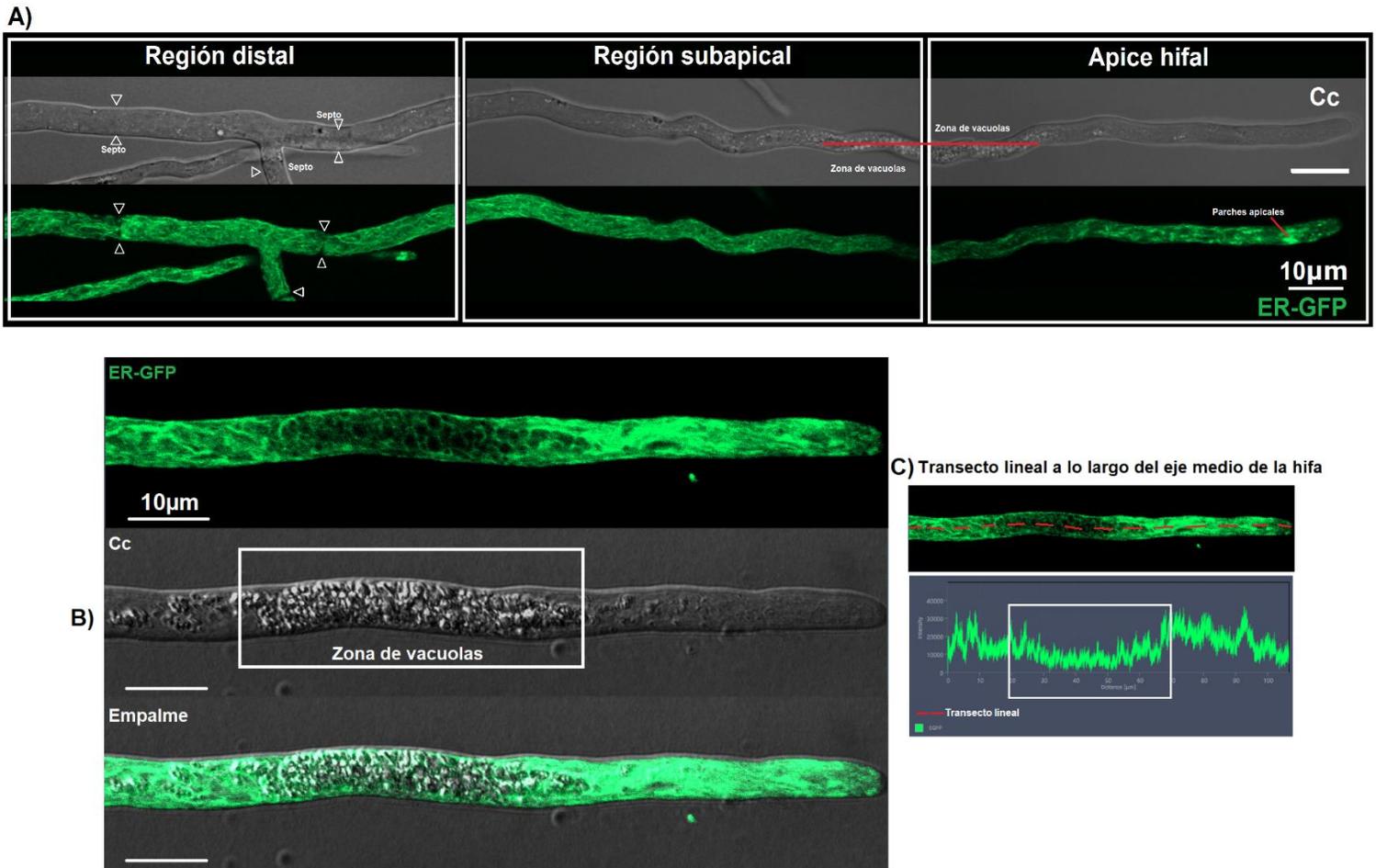


Figura 8. Arreglo del RE en hifas vegetativas de *P. anserina*. A) Se muestra una hifa vegetativa en la cual se analizaron tres segmentos hifales subsecuentes (Región apical 0-90 μm; región subapical 90-180 μm; y región distal 180-270 μm). A lo largo de estos tres segmentos se aprecia la estructura de red que forma el arreglo del RE. En el ápice hifal se indica un parche apical; entre la región hifal y la región subapical se observa la zona de vacuolas (línea roja); y en la región distal se señalan algunos de los septos observados. Abajo en B), se muestra un ápice hifal y a su derecha en C) se muestra el transecto lineal generado a lo largo del eje medio de la hifa; el recuadro blanco señala la zona de acumulación de vacuolas, donde se puede ver que existe una disminución de la señal ER-GFP. Se muestra el campo claro (Cc); la distribución del RE (ER-GFP); y su empalme. La barra blanca indica la escala (10 μm).

Asimismo, a pesar de que las hifas vegetativas se encuentran divididas por medio de septos celulares, el arreglo y la distribución del RE en forma de red se conservó entre cada compartimento. Incluso, a pesar de que en las regiones cercanas a los septos se aprecia una disminución de RE, también es posible ver que existe al menos un punto de continuidad en la estructura de red del RE (Figura 9).

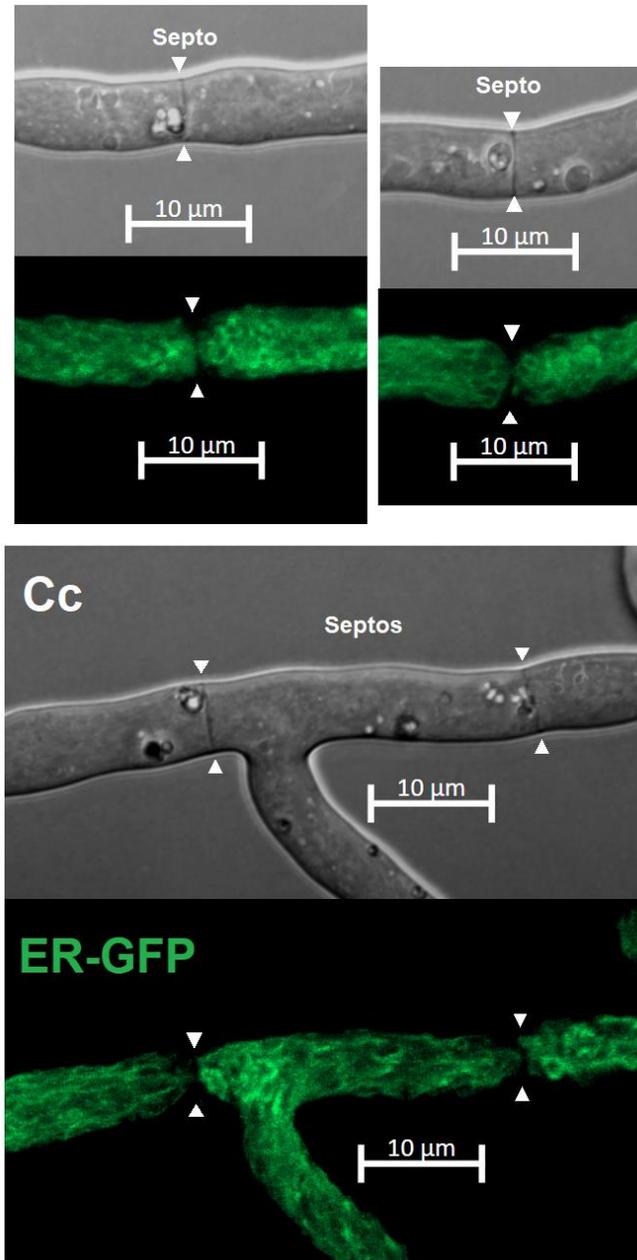


Figura 9. Distribución del RE entre los septos de hifas vegetativas de *P. anserina*. Se muestran tres diferentes imágenes que son acercamientos a las zonas celulares en las que se forman septos entre las células que conforman una hifa vegetativa. Específicamente en la región donde se forma el septo (flechas blancas), se observa que existe una disminución de la señal ER-GFP; pero también se observa que existe una pequeña continuidad en la red de RE entre cada una de las células. Se muestra el campo claro (Cc); y la distribución del RE (ER-GFP). La barra blanca indica la escala (10 μ m).

La localización celular de RTN1-GFP

Con ayuda del microscopio confocal se recuperó información de 13 hifas RTN1-GFP en las que se evaluó el segmento del ápice hifal y el cual

media aproximadamente 45 μm por hifa. En estos segmentos, observamos que al igual que en la cepa Wt ER-GFP (Ec), el arreglo de RTN1-GFP se distribuye a lo largo de toda la hifa vegetativa en forma de red y que también presenta movimientos rápidos y continuos. Asimismo, notamos un incremento fluorescente de RTN1-GFP en la punta de las hifas. Esta condición la confirmaron los transectos lineales realizados en el eje medio de las hifas, los cuales demostraron que el perfil de fluorescencia de la señal RTN1-GFP se incrementa notablemente en la zona apical (Figura 10).

RTN1-GFP

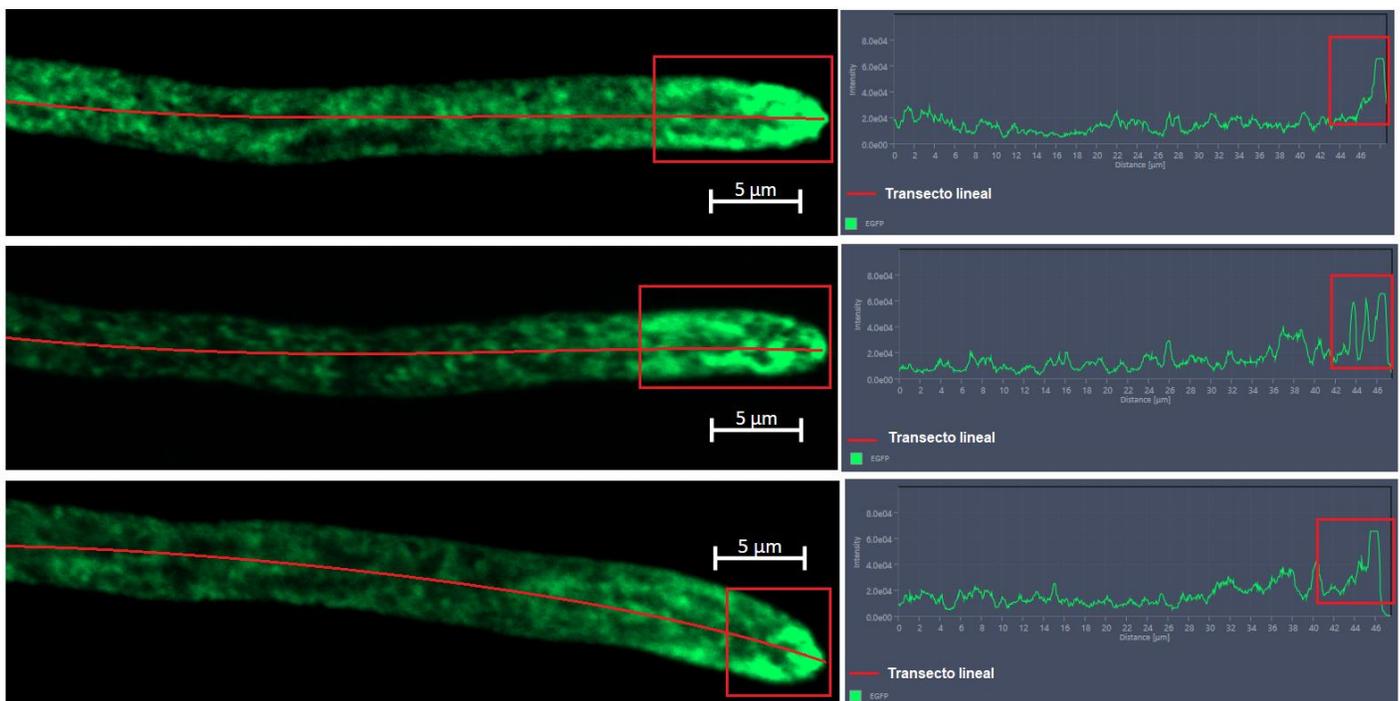


Figura 10. La localización de RTN1-GFP en hifas de *P. anserina*. RTN1-GFP se distribuye a lo largo de toda la hifa en forma de red. Sin embargo, la intensidad de su fluorescencia se incrementa en las puntas de las hifas. En las gráficas de la derecha se cuantifica la intensidad de la fluorescencia de RTN1-GFP en un transecto lineal (línea roja) trazado en el eje medio de las hifas correspondientes. Se muestran tres ejemplos representativos de hifas de diferente grosor; nótese el incremento de la fluorescencia en la zona apical (recuadro rojo). La barra blanca indica la escala (5 μm).

De manera paralela, para evaluar cuantitativamente la localización de la señal apical observada en la cepa RTN1-GFP, se determinó por microscopía de epifluorescencia el porcentaje de hifas en que RTN1-GFP tiene esta

distribución polarizada (en 5 experimentos independientes, con una n= 100 c/u). Como resultado, se obtuvo que el 99% de las hifas RTN1-GFP presentan fluorescencia apical. Esta condición, en la cual la fluorescencia de la proteína GFP incrementa en la zona apical, no fue observable ni en la cepa con la construcción ectópica *Δrtn1* ER-GFP, ni en la cepa con la construcción endógena SEC63^{A541T}-GFP (Figura suplementaria 7).

Una fracción de RTN1-GFP se asocia con el centro organizador del crecimiento polarizado

Luego de demostrar que la señal GFP presenta un incremento en la zona apical y -específicamente- en la punta de las hifas, se postuló evaluar la localización de la señal RTN1-GFP con respecto al *Spitzenkörper*. El *Spitzenkörper* es un centro organizador de vesículas que dirige el crecimiento en las hifas (Riquelme, 2013). Para ver ambas estructuras, se desarrolló un experimento en el cual se visualizó, por microscopía confocal, las hifas RTN1-GFP teñidas con el reactivo FM4-64 (n=29). Este reactivo se integra en la membrana plasmática y posteriormente se internaliza por endocitosis tiñendo así a los organelos de la vía endocítica. Se ha demostrado que este colorante tiñe eficientemente al *Spitzenkörper*.

Con este ensayo se demostró que la señal del *Spitzenkörper* y la señal RTN1-GFP se acumulan en la punta de las hifas, y que existe una colocalización entre ambas (Figura 11). Se sabe que la presencia y la distribución en la punta del *Spitzenkörper* está relacionada con el crecimiento polarizado de los hongos miceliales y con la dirección de este crecimiento. Aquí, encontramos que la ubicación de RTN1 en el *Spitzenkörper* también estuvo asociada con la dirección del crecimiento hifal, y que eventos de pérdida y reaparición de la fluorescencia de RTN1 estuvieron asociados tanto con la desaparición y aparición de *Spitzenkörper* marcados con FM4-64, como con eventos en que el crecimiento hifal se pausó (Figura 12).

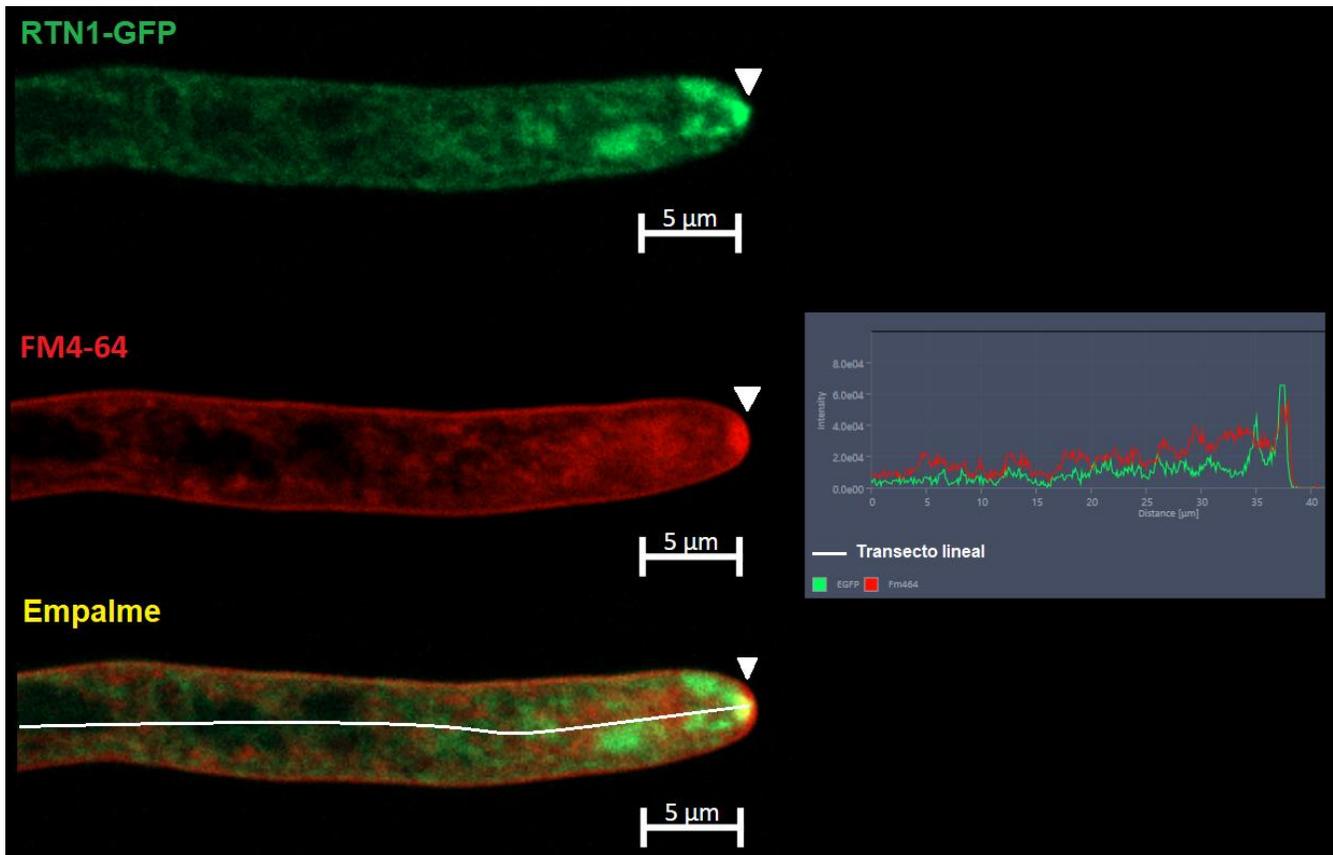


Figura 11. Una fracción de RTN1 se localiza en el *Spitzenkörper* de *P. anserina*. A la izquierda se muestra una hifa en crecimiento que expresa RTN1-GFP (arriba) teñida con FM4-64 (panel medio). La imagen inferior muestra el empalme entre ellas. Se aprecia la acumulación apical de RTN1-GFP que coincide con la del *Spitzenkörper* en la punta de la hifa (flecha blanca). El empalme muestra la colocalización entre RTN1-GFP y el *Spitzenkörper*; A la derecha se muestra la intensidad de la fluorescencia para cada uno de los canales (GFP y FM4-64) donde se observa la colocalización por medio del transecto lineal del perfil generado. La barra blanca indica la escala (5 μm).

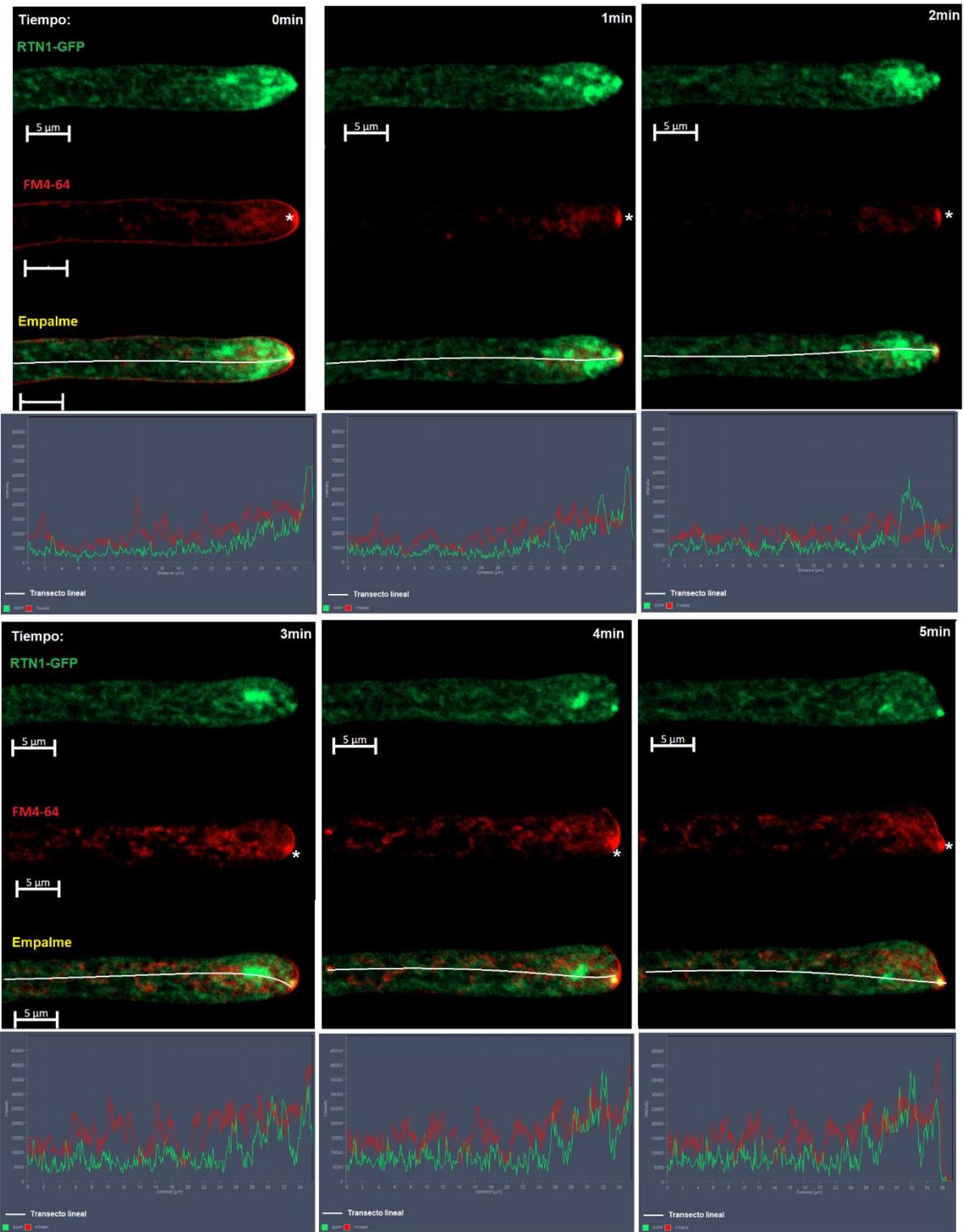


Figura 12. Una fracción de RTN1 se deslocaliza del *Spitzenkörper* al bifurcarse una hifa de *P. anserina*. En cada imagen se muestra una hifa que se grabó creciendo continuamente por 5 minutos y misma que expresa RTN1-GFP (arriba), está teñida con FM4-64 (panel medio) y donde se muestra el empalme entre ambas señales (abajo). Se aprecia la acumulación apical de RTN1-GFP que coincide con la del *Spitzenkörper*

en la punta de la hifa (asterisco blanco). El empalme muestra la colocalización entre RTN1-GFP y el Spitzenkörper; el cual se deslocaliza entre el minuto 2-4 para iniciar la bifurcación de la hifa. Debajo de cada imagen se muestra la intensidad de la fluorescencia para cada uno de los canales (GFP y FM4-64) donde se observa la colocalización por medio del transecto lineal del perfil generado. La barra blanca indica la escala (5 μm).

La localización de RTN1 en el *Spitzenkörper* sugiere una participación en el crecimiento polarizado del hongo. Por ello, también determinamos si la ausencia de RTN1 afecta el crecimiento de las hifas vegetativas o al arreglo del RE. Sin embargo, observamos que la intensidad relativa de la fluorescencia asociada a ER-GFP, el reportero utilizado para marcar RE, no se vio alterada tras eliminar a RTN1. Pues no existen cambios ni en el tamaño de las hifas, ni en la densidad del RE. Esto se evaluó en tres segmentos hifales subsecuentes de $\sim 90 \mu\text{m}$ por hifa ($n=10$ en c/u), donde se determinó que su grosor se mantiene entre un intervalo de 4.3 a 4.9 μm y que el valor promedio de la fluorescencia (*mean gray*) se mantuvo para cada uno de los tres segmentos evaluados (Figura 13). Esto sugiere que el potencial de importación de proteínas al RE tampoco se afecta tras eliminar a la proteína RTN1.

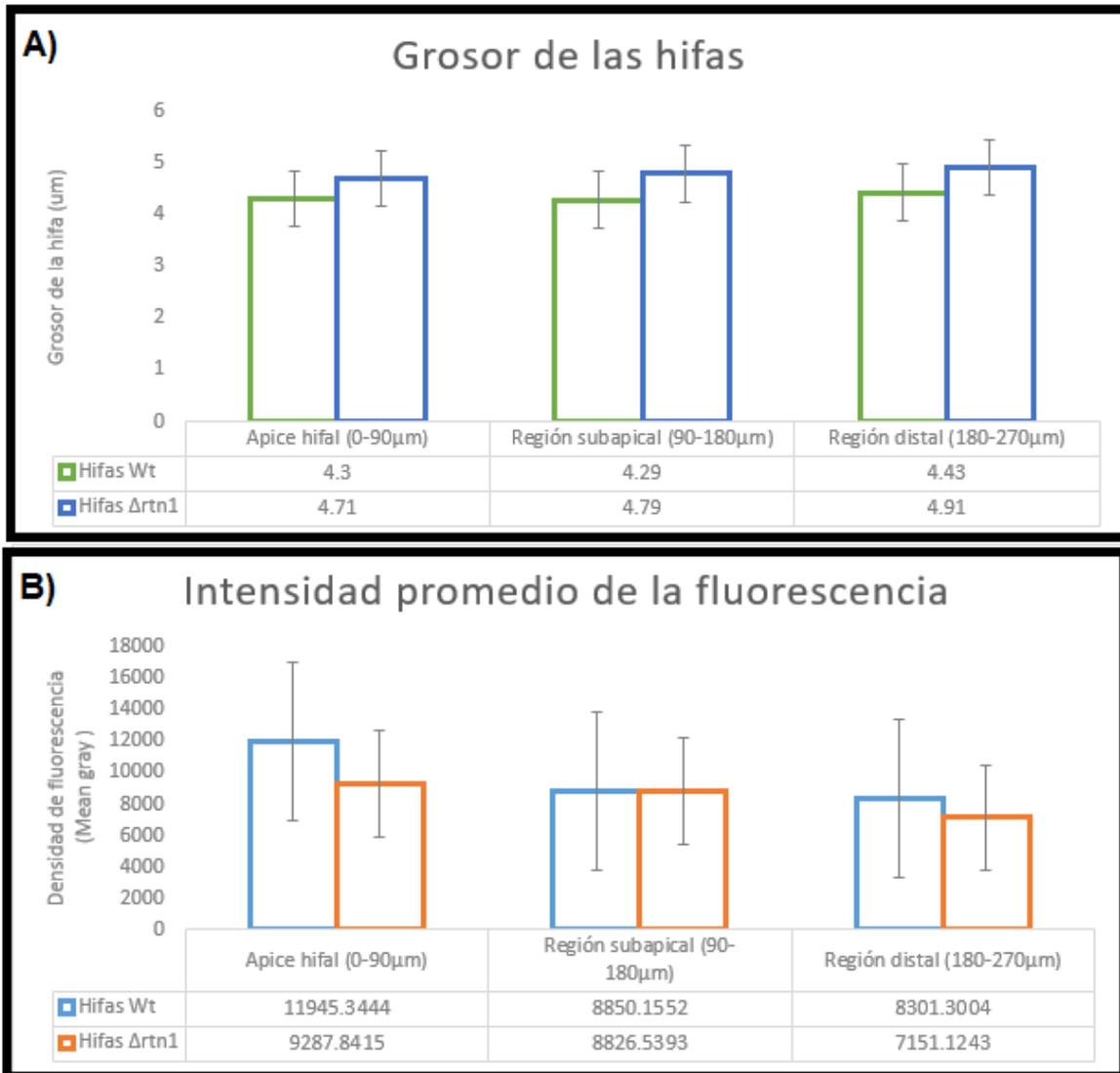


Figura 13. Graficas de grosor y densidad de fluorescencia para tres segmentos de las hifas de cepas con integración ectópica ERGFP. A) Esta grafica muestra que el grosor de cada región se mantuvo entre 4.3 y 4.9 μ m; B) Esta gráfica muestra el valor del *mean gray* relacionado a la densidad de fluorescencia para cada una de las regiones. En cada gráfica el eje de las abscisas muestra el ápice hifal (0-90 μ m); la región subapical (90-180 μ m); y la región distal (180-270 μ m) que se evaluaron para cada una de las hifas de la cepa Wt- ERGFP (Ec) y Δ rtn1 ER-GFP (Ec). Cada región (o segmento) tiene una n=10. Se indican las barras de error.

La localización de RTN1-GFP en relación con los núcleos de las hifas vegetativas

A continuación, determinamos la localización de RTN1 con respecto a la distribución nuclear de las hifas de *P. anserina*. En primer lugar, observamos que los núcleos se distribuyen de manera regular a lo largo de las hifas, pero que están ausentes en la zona apical en donde RTN1 está

enriquecido (Figura 14.A). Sin embargo, una fracción de RTN1 se localiza en regiones del RE periférico en zonas aledañas de la envoltura nuclear (Figura 14.B-C). Estos dominios del RE están cercanamente asociados a la periferia de los núcleos más nunca los rodearon por completo, sugiriendo que RTN1 no se localiza en la envoltura nuclear.

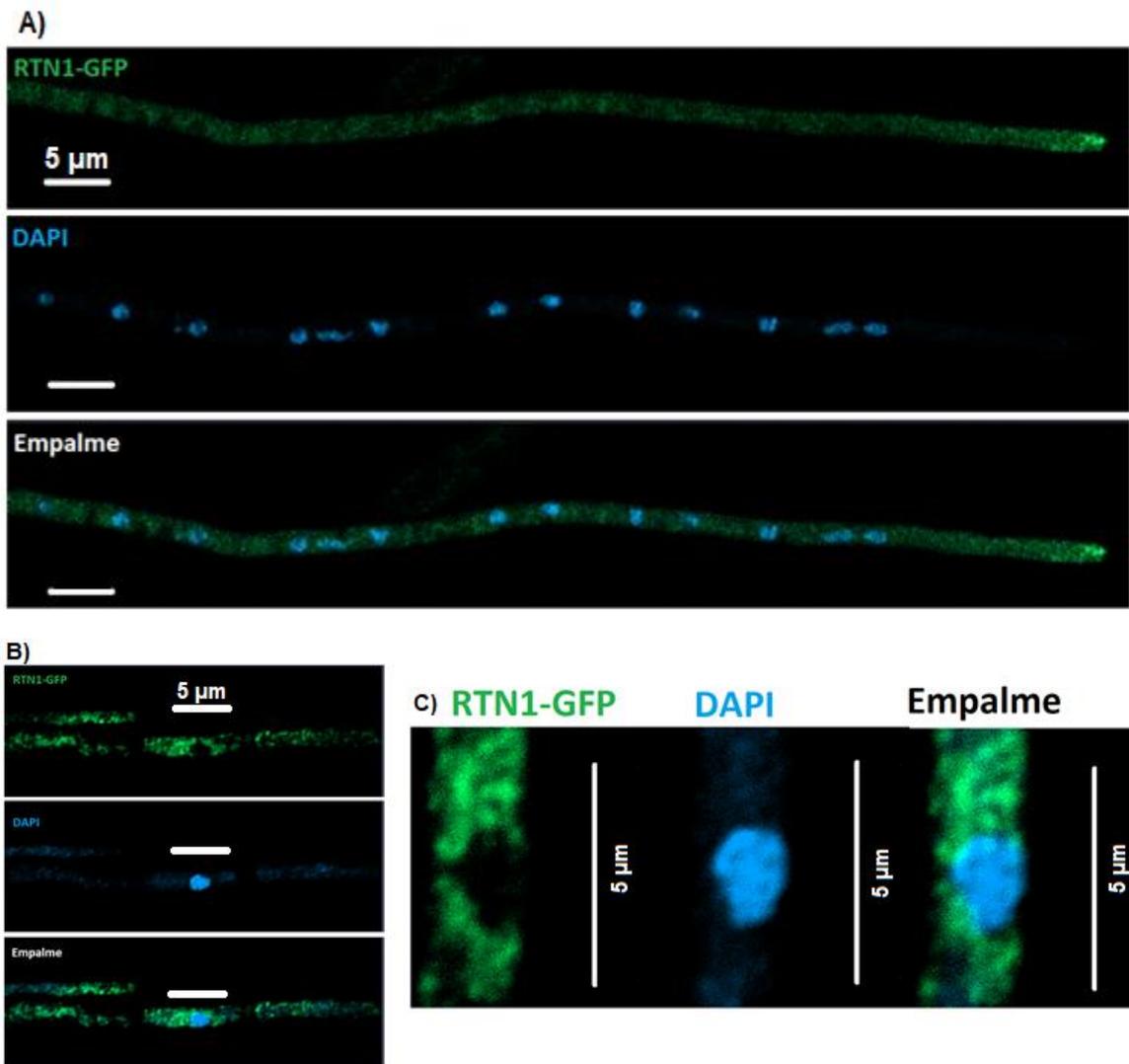


Figura 14. Distribución nuclear en hifas de la cepa RTN1-GFP. En A) se observa la localización de RTN1-GFP RE a lo largo de una hifa, donde se aprecia la acumulación característica de la señal GFP en la punta, y además se muestra la distribución de los núcleos teñidos con DAPI los cuales están ausentes en la zona apical. En B), puede apreciarse un segmento de una hifa con un núcleo rodeado por el RE y a su derecha en C) se muestra un acercamiento en donde es posible ver zonas decoradas con RTN1-GFP adyacentes, más no completamente rodeando al núcleo. La barra blanca indica la escala (5 μm).

El arreglo del RE en hifas carentes de RTN1

A continuación, determinamos el efecto de eliminar a RTN1 en el arreglo del RE. Para ello, utilizamos cepas $\Delta rtn1$ que tienen de manera ectópica a la construcción ER-GFP. La señal de la fluorescencia ER-GFP en la cepa $\Delta rtn1$ se evaluó por microscopía confocal en distintos segmentos hifales de $\sim 90 \mu\text{m}$ por hifa ($n=35$) y en los cuales, para algunos de ellos también se siguió el arreglo del RE en tres segmentos hifales subsecuentes que corresponden al ápice hifal, la región subapical y la región distal ($n=12$). Estos análisis demostraron que el arreglo del RE también se distribuye en forma de red a lo largo de toda la hifa (Figura 15). Por su parte, el arreglo del RE conserva una dinámica de movimientos rápidos y continuos en su estructura de red que fue igual al observado en la cepa silvestre. De hecho, el arreglo del RE en la cepa $\Delta rtn1$, también presenta una distribución polarizada; siendo la región hifal en la que se acumulan las vacuolas el sitio en el que también se observa una disminución de la concentración de la señal ER-GFP. Para demostrar esto se realizaron los transectos lineales correspondientes a lo largo del eje medio de las hifas vegetativas en los cuales se aprecia que la intensidad de la fluorescencia ER-GFP aumenta con dirección a la zona apical y que asimismo presenta una disminución visible que se asocia con la zona vacuolar (Figura 15).

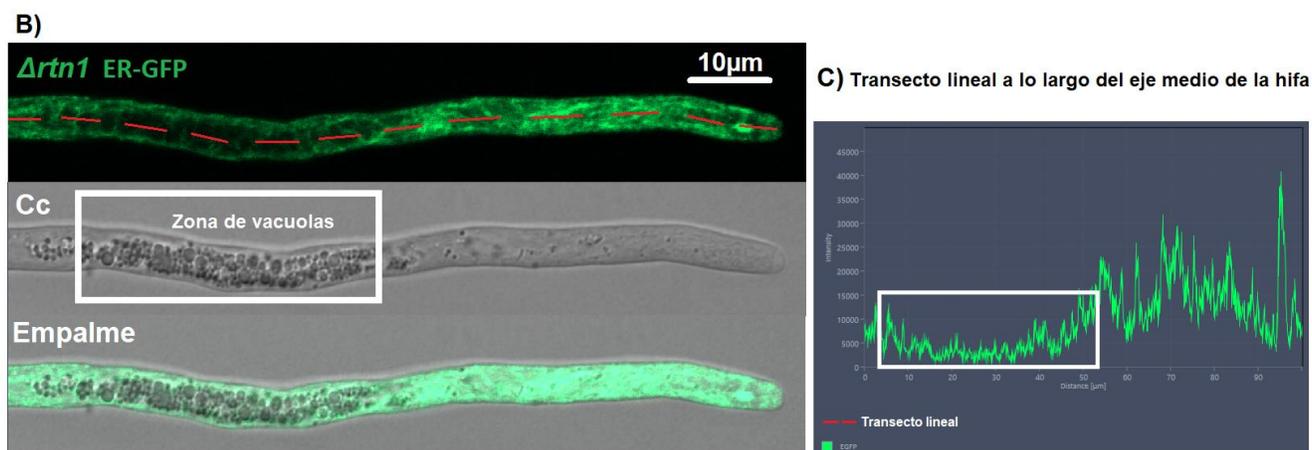
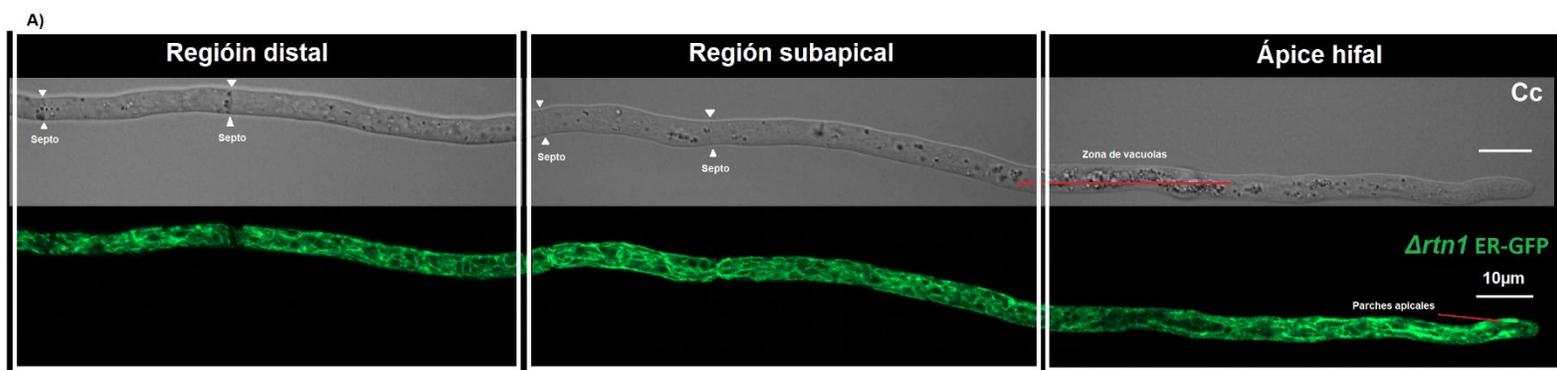


Figura 15. Arreglo del RE en hifas vegetativas $\Delta rtn1$ de *P. anserina*. Arriba, se muestra una hifa vegetativa en la cual se analizaron tres segmentos hifales subsecuentes (Región apical 0-90 μm ; región subapical 90-180 μm ; y región distal 180-270 μm). A lo largo de estos tres segmentos se aprecia la estructura de red que forma el arreglo del RE en la cepa $\Delta rtn1$. En el ápice hifal se indica un parche apical; entre la región hifal y la región subapical se observa la zona de vacuolas (línea roja); y en la región distal se señalan algunos de los septos observados. Abajo, se muestra un ápice hifal y a su derecha se muestra el transecto lineal generado a lo largo del eje medio de la hifa; el recuadro blanco señala la zona de acumulación de vacuolas, donde se puede ver que existe una disminución de la señal ER-GFP. Se muestra el campo claro (Cc); la distribución del RE (ER-GFP); y su empalme. La barra blanca indica la escala (10 μm). Estas imágenes se pueden comparar con la Figura 8.

Con respecto a las regiones de las hifas donde se forman los septos también se observó que el arreglo del RE de la cepa $\Delta rtn1$ presenta una disminución en las regiones adyacentes a los septos, así como una continuidad en la estructura de red del RE que existe entre cada una (Figura 16). En resumen, la ausencia del reticulón RTN1 no afecta la distribución subcelular del RE.

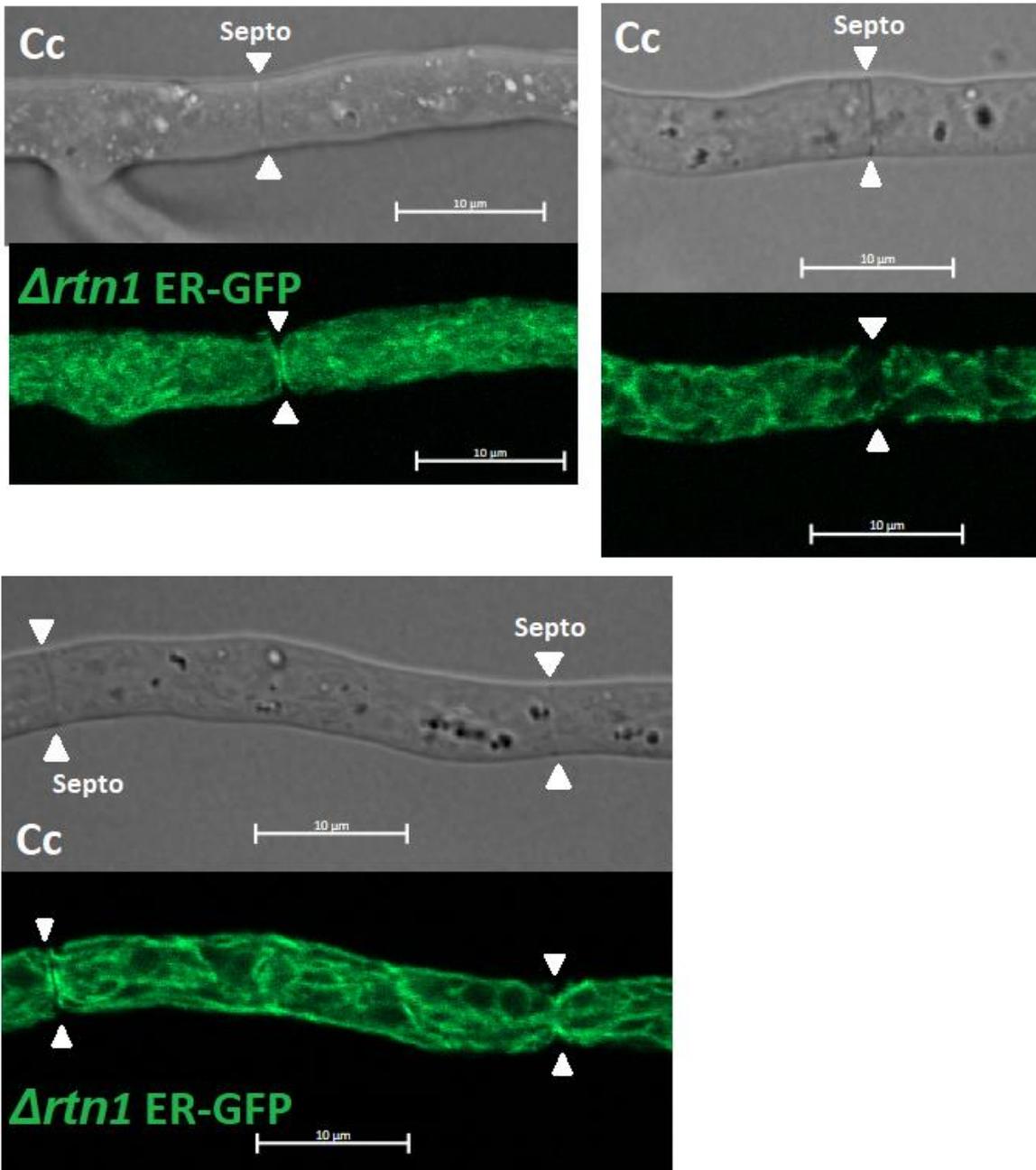


Figura 16. Arreglo del RE entre los septos de hifas vegetativas *Artn1* de *P. anserina*. Se muestran tres diferentes imágenes que son acercamientos a las zonas celulares en las que se forman septos entre las células que conforman una hifa vegetativa. Específicamente en la región donde se forma el septo (flechas blancas), se observa que existe una disminución de la señal ER-GFP; pero también se observa que existe una pequeña continuidad en la red de RE entre cada una de las células. Se muestra el campo claro (Cc); y la distribución del RE (ER-GFP). La barra blanca indica la escala (10 μm). Estas imágenes se pueden comparar con la Figura 9.

La localización de RTN1 durante el desarrollo sexual de *P. anserina*

A continuación, estudiamos la localización y la función de RTN1 durante el desarrollo sexual de *P. anserina*. En primer lugar, determinamos la localización intracelular de RTN1-GFP en los diferentes tipos celulares y etapas del desarrollo sexual del hongo (Figura 17).

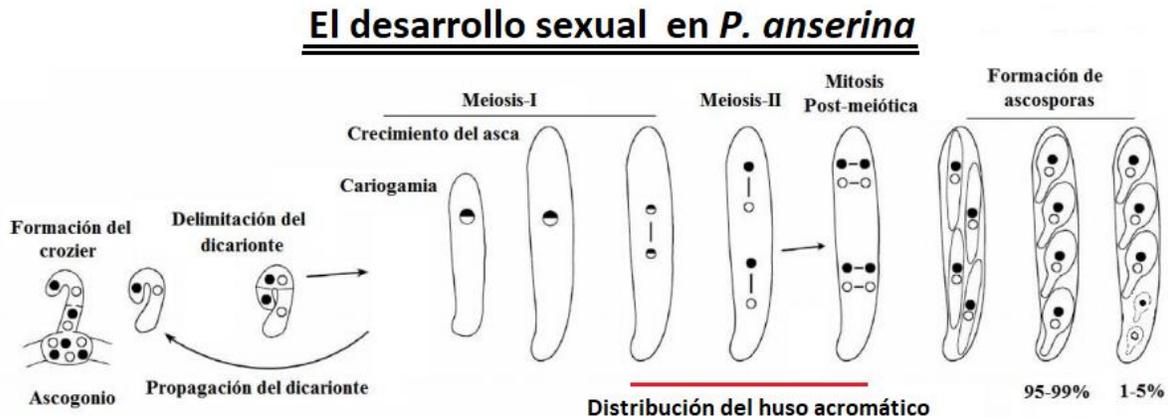


Figura 17. Desarrollo sexual en *P. anserina*. Se muestra un esquema que explica la progresión del desarrollo sexual. De izquierda a derecha: este proceso inicia en la formación del crozier, que es la célula en que se lleva a cabo la compartimentalización dicariótica ($n+n$); continúa con la cariogamia ($2n$), con la cual comienza la elongación del asca (meiocito), en la cual se llevan a cabo las dos divisiones meióticas resultando en cuatro núcleos haploides recombinantes (n); que se dividen por mitosis. A continuación, los ocho núcleos derivados de la mitosis post-meiótica son empacados en ascosporas que se desarrollan dentro del asca. En el 99% de las ascas se forman cuatro esporas dicarióticas ($n+n$) y en el 1% de las ascas se forman tres esporas dicarióticas y dos esporas uninucleadas (n). La segregación de los núcleos derivados de la meiosis (etapas señaladas con una línea roja) depende de la disposición del huso acromático (ilustrado mediante las líneas que unen los puntos, núcleos) el cual se orienta longitudinalmente durante ambas divisiones meióticas, pero transversalmente durante la mitosis post-meiótica).

En los *croziers* ($n=10$), observamos que la intensidad de la fluorescencia de RTN1-GFP fue perceptiblemente menor a la presente en otros tipos celulares, como el micelio vegetativo y las ascosporas. Si bien, esta característica dificultó el análisis de esta proteína en esta etapa del desarrollo, pudimos observar que RTN1-GFP se distribuye en una red de filamentos a todo lo largo de los *croziers*, así como en un número de parches o puntos de mayor brillo asociados a esta red (Figura 18). De la misma forma, observamos que en la primera profase meiótica RTN1-GFP adquiere una distribución en forma de red al interior del asca, así como en un número de

regiones puntuales asociadas a esta red que exhiben mayor brillo. Además de la distribución reticular observada, observamos una importante acumulación de RTN1-GFP en la parte apical de las ascas en la primera profase meiótica (n=16) (Figura 19). Es importante mencionar que es durante esta etapa de la meiosis donde ocurre el crecimiento de las ascas, de alrededor de 10 a más de 150 μm . De hecho, la distribución apical de RTN1-GFP en las etapas iniciales de la meiosis fue reminiscente a la observada para los *Spitzenkörper* de las hifas vegetativas (Figura 20). Estas observaciones sugieren que RTN1 podría participar en el crecimiento polarizado tanto de las células vegetativas como de las ascas. Por su parte en las etapas tardías de la meiosis I (n=2), que corresponden a la metafase y la telofase, RTN1 no solo se distribuyó en una región más extendida de la punta, sino que también se observó una concentración en la región media del asca (Figura 21).

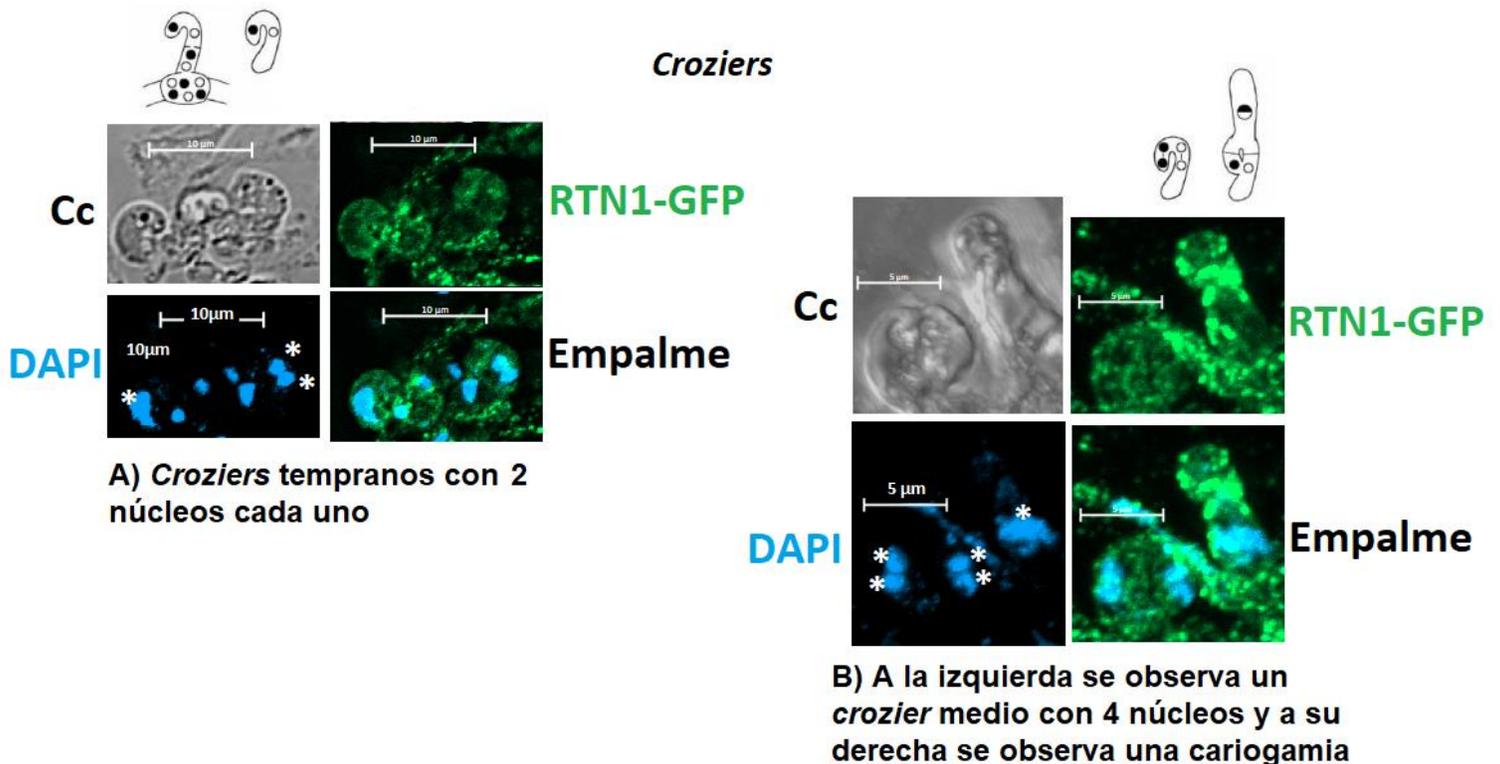


Figura 18. Distribución de RTN1-GFP en croziers. Se muestran diferentes croziers en desarrollo donde es posible observar la distribución y disposición que adopta RTN1-GFP al interior de cada uno. En cada imagen

se muestra el esquema correspondiente, el campo claro (Cc), la señal RTN1-GFP, la tinción de núcleos (DAPI) y el empalme; las barras indican la escala (5 o 10 μm según se indica). Se anexa un esquema representativo de la etapa correspondiente y se indican con asteriscos blancos al material genético.

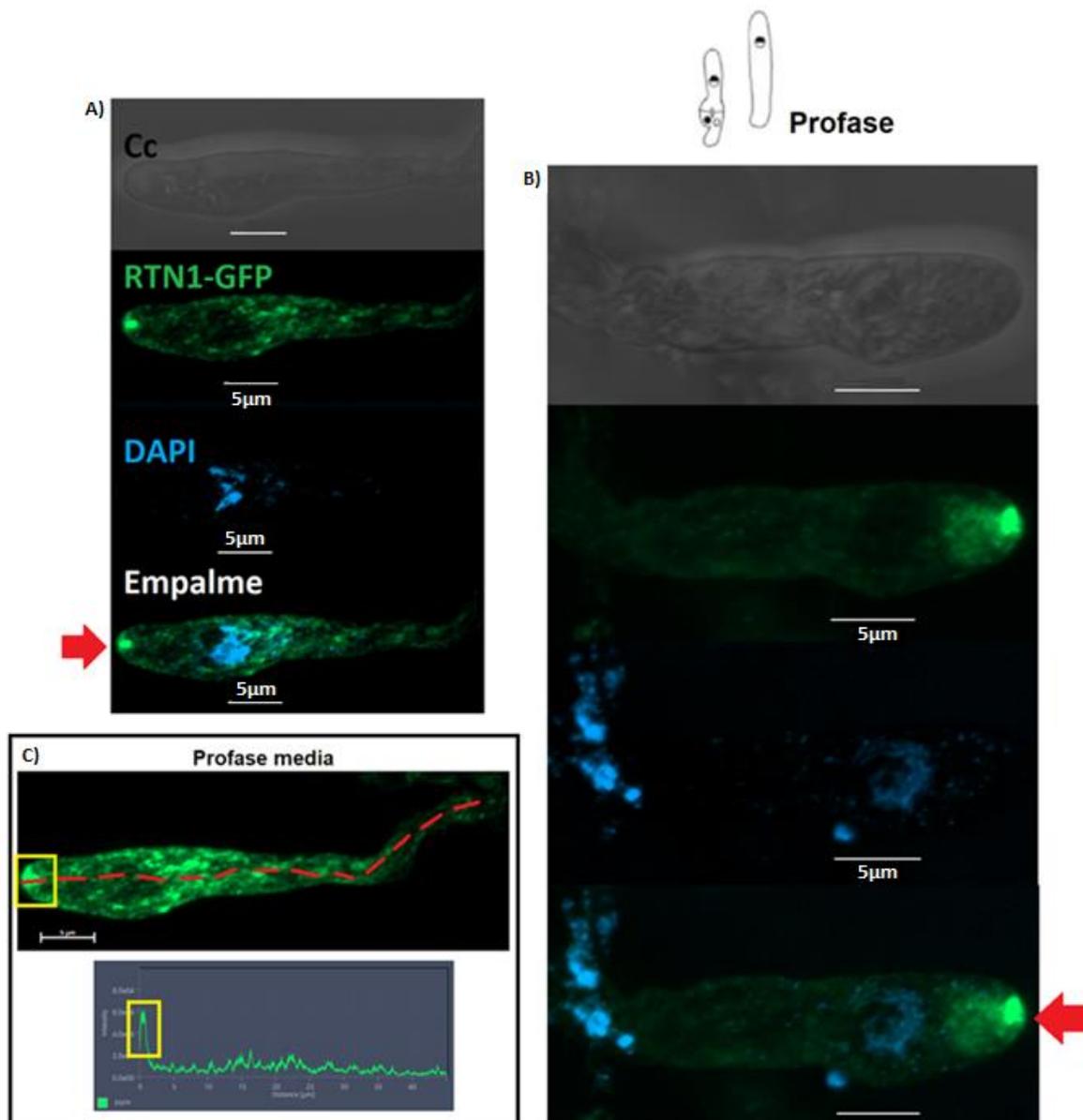


Figura 19. La distribución de RTN1-GFP en etapas tempranas de la primera profase meiótica. En A y B) se muestran ascas de la profase temprana de la meiosis I en las cuales se observa la distribución de RTN1-GFP. La flecha roja indica la acumulación apical de RTN1-GFP. En el recuadro negro (C) se muestra el perfil de intensidad de fluorescencia de RTN1-GFP en el eje medio del asca (línea roja). La imagen en C) corresponde al asca mostrada en A), pero en ella se incrementó digitalmente el brillo para apreciar mejor la distribución de RTN1-GFP a lo largo del asca (recuadro amarillo). Se anexa el esquema correspondiente a la profase y se muestra el campo claro (Cc), la señal RTN1-GFP, la distribución de su material genético (DAPI) y el empalme. Las barras indican la escala (5 μm). Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula.

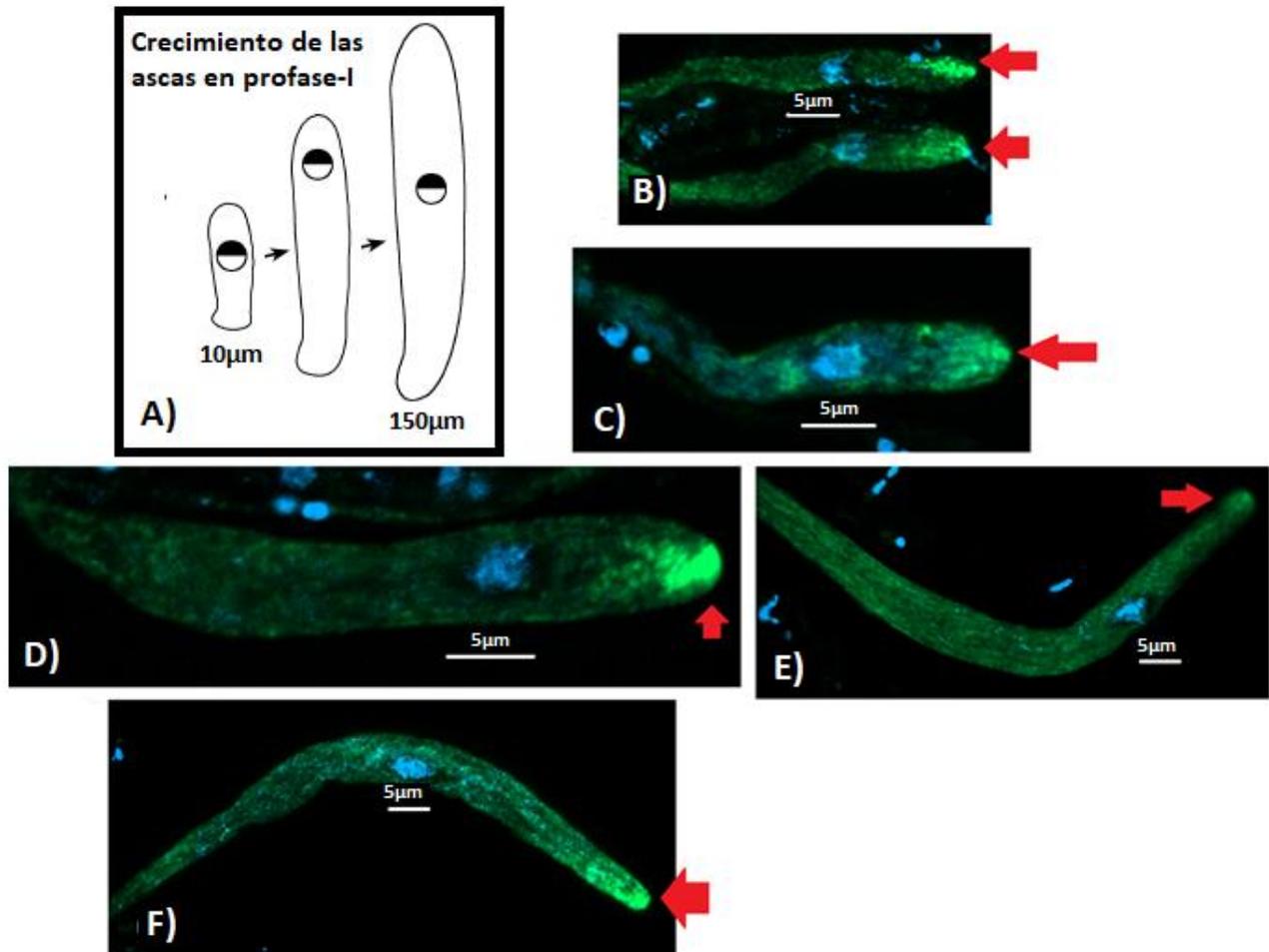


Figura 20. La distribución de RTN1-GFP hacia el final de la primera profase meiótica. Se muestra la localización de RTN1-GFP en seis ascas en la primera profase meiótica. La imagen A) muestra un esquema del avance de la profase meiótica. La imagen B) muestra profases tempranas; las imágenes C-D) muestran profases medias; mientras que la imagen E-F) contienen profases tardías. Nótese la migración del núcleo de la región apical (D) a la región media del asca hacia el final de la profase (F). En todas ellas es posible apreciar que RTN1-GFP se distribuye por toda el asca y que presenta una acumulación en la zona apical del asca (flecha roja). Para todas se muestra el empalme entre la señal RTN1-GFP y el DAPI. Las barras blancas indican la escala (5 μm). Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0,34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula.

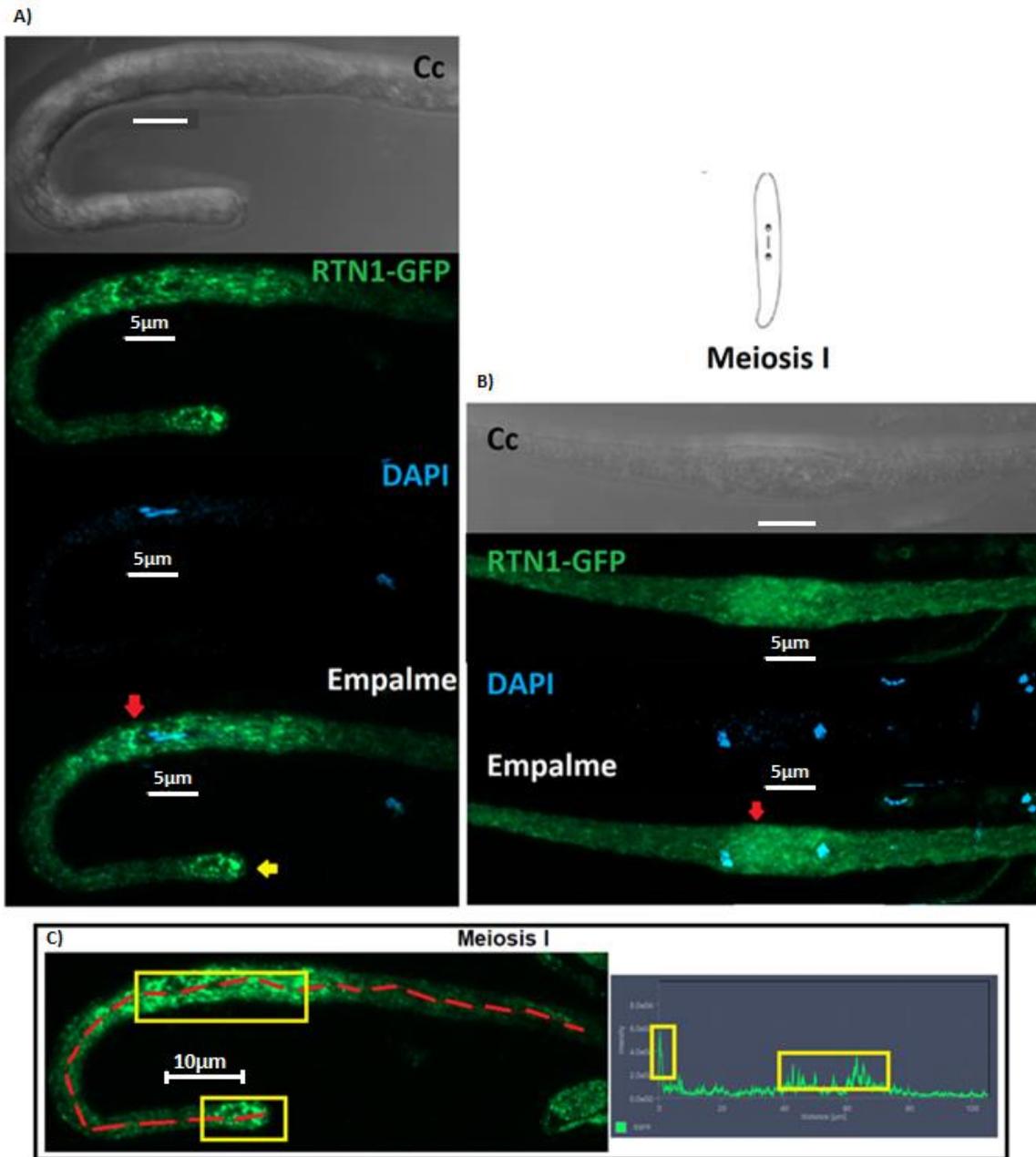


Figura 21. La distribución de RTN1-GFP al final de la meiosis I. Se muestra la localización de RTN1-GFP durante la metafase (A) y la telofase (B) de la primera división meiótica. En ellas la intensidad de RTN1-GFP se incrementa en la parte media del asca (flecha roja); pero también se mantiene en la zona apical (flecha amarilla). En el recuadro negro (C) se aprecia el perfil de intensidad de fluorescencia en la metafase; los recuadros amarillos indican una acumulación de RTN1-GFP en la zona media del asca y en la región apical. Se incluye un esquema de meiosis I y para cada caso se indica el campo claro (Cc), la señal RTN1-GFP, la distribución de su material genético (DAPI) y el empalme. Las barras blancas indican la escala (5 o 10 μm). Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula.

La distribución de RTN1-GFP en la zona media del asca, también se visualizó durante la mitosis postmeiótica (n=5) y donde también existe una acumulación apical en los extremos de las ascas (Figura 22).

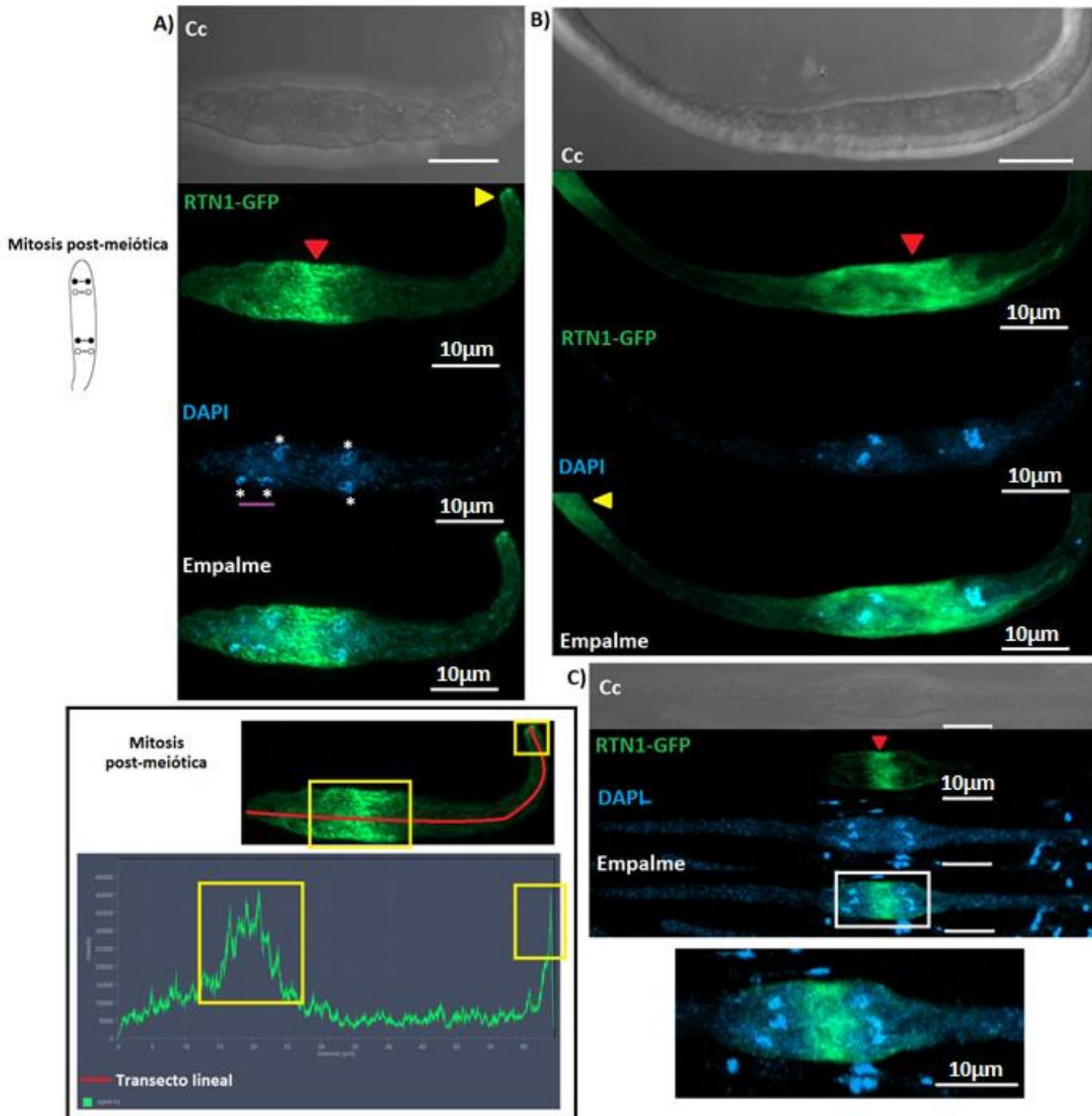


Figura 22. La distribución de RTN1-GFP en la mitosis post-meiótica. Se muestran tres ascas independientes en mitosis post-meiótica. En ellas RTN1-GFP se localiza en la parte media del asca (flecha

roja); y para algunos casos también se mantuvo en la zona apical (flecha amarilla). Abajo, en el recuadro negro se aprecia el perfil de intensidad de fluorescencia de la mitosis post-meiótica de la imagen (A) (los recuadros amarillos indican una acumulación de la señal RTN1-GFP en la zona media del asca y en la región apical). En (A), nótese que tres pares de núcleos producto de la mitosis se traslapan (asteriscos blancos), mientras que el eje de división del cuarto par es longitudinal en lugar de transversal (línea morada). Este arreglo tiene como consecuencia la formación de ascas de 5 esporas (ver introducción). En (C) el recuadro blanco muestra un acercamiento. Se incluye un esquema de la mitosis postmeiótica y para cada caso se indica el campo claro (Cc), la señal RTN1-GFP, la distribución de su material genético (DAPI) y el empalme. Las barras blancas indican la escala (10 μm). El recuadro blanco indica un acercamiento para el asca dos (abajo). Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula.

Durante la compartimentalización de las esporas, RTN1-GFP comienza nuevamente a distribuirse por toda el asca, cubre a los núcleos que previamente ya se habían organizado en pares después de la mitosis post-meiótica y también se observa una concentración apical en cada espora. Esta condición se puede apreciar desde las esporas recién formadas ($n=8$) (Figura 23), hasta que estas diferencian una célula delgada (cola) separada de una célula globosa, la cual dará lugar a la espora madura, etapa en la cual este fenómeno se acentuó ($n=24$) (Figura 24). De hecho, se observó que el arreglo que adopta RTN1-GFP en las esporas sexuales se establece en forma de red por todo su interior y presenta algunas regiones donde se forman cúmulos o parches de fluorescencia, que justamente corresponden a las zonas apicales de la célula globosa y al pie o punta de la cola de las esporas; por su parte, también se observó que la distribución de los núcleos es correcta al interior de cada espora. En resumen, el arreglo reticular de RTN1-GFP es diferencial para cada una de las etapas en la que se forman las esporas sexuales y, podría estar relacionado con la localización del *Spitzenkörper* en las esporas sexuales.

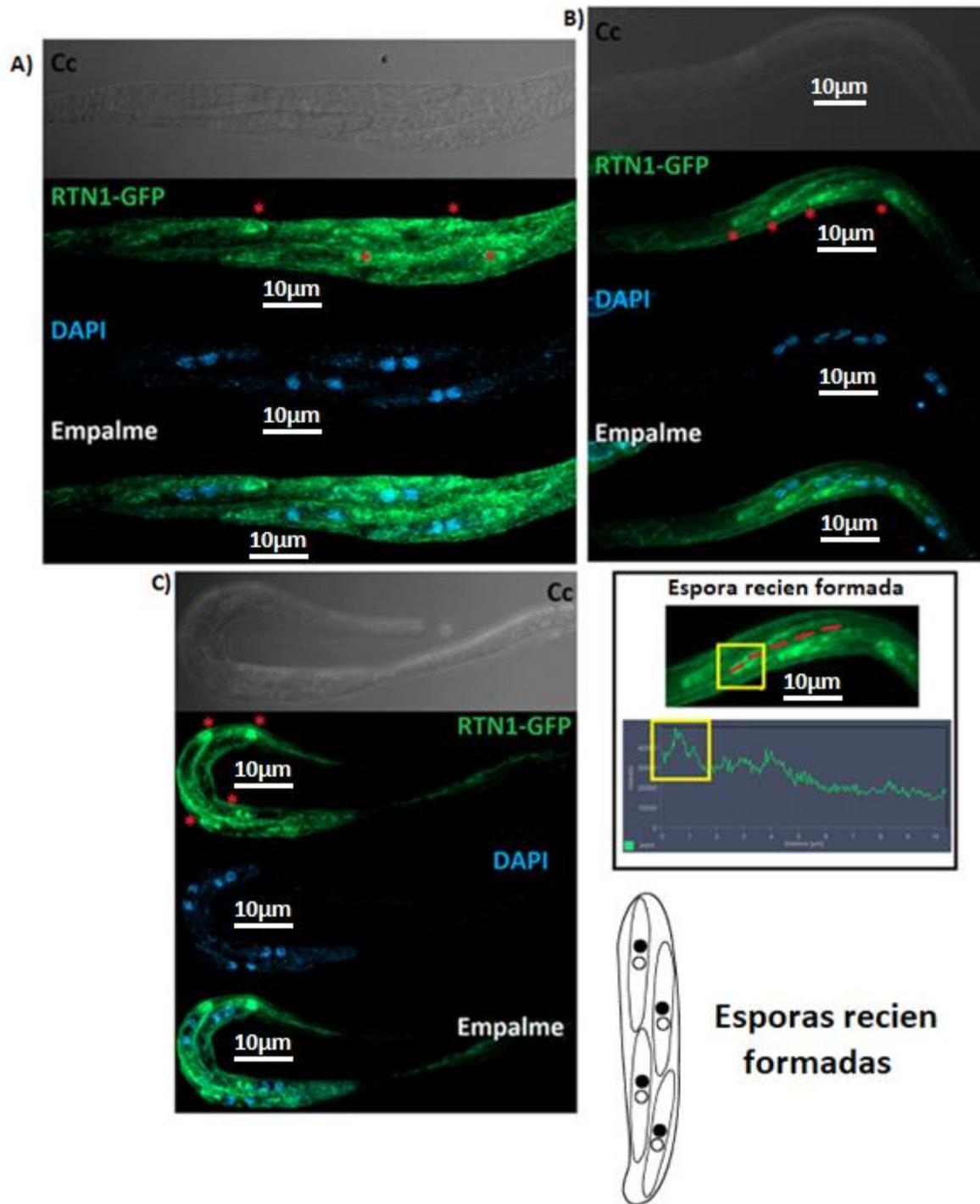
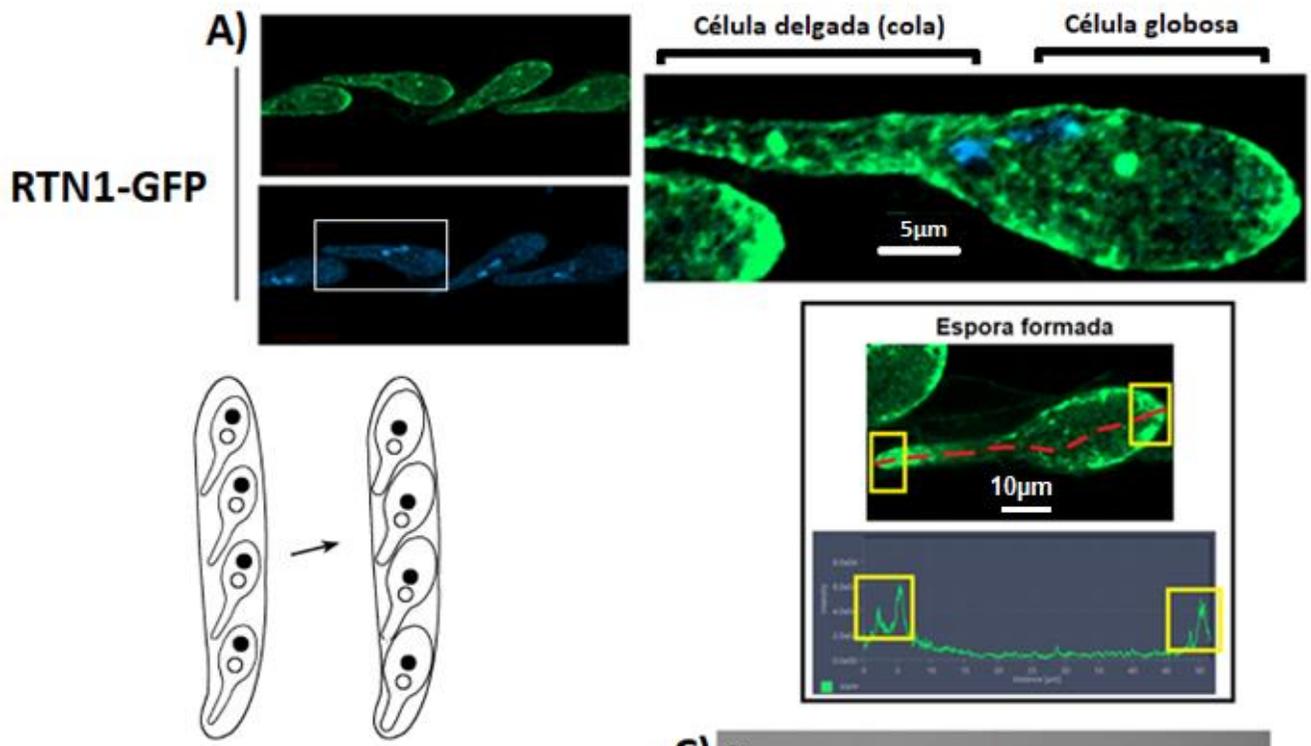


Figura 23. La distribución de RTN1-GFP en esporas recién formadas. Se muestran tres ascas independientes con esporas recién formadas en las cuales se observa que RTN1-GFP comienza a distribuirse en su interior. En estas muestras se observa una acumulación apical en cada una de las esporas recién formadas (asterisco rojo). A la derecha, el recuadro negro muestra el perfil de intensidad de fluorescencia en una espora de la imagen (B); el recuadro amarillo muestra que RTN1-GFP se localiza en la región apical. Se incluye un esquema de esporas recién formadas y para cada caso se indica el campo claro (Cc), la señal RTN1-GFP, la distribución de su material genético (DAPI) y el empalme. Las barras blancas indican la escala (10 μm). Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula.



Crecimiento de las esporas

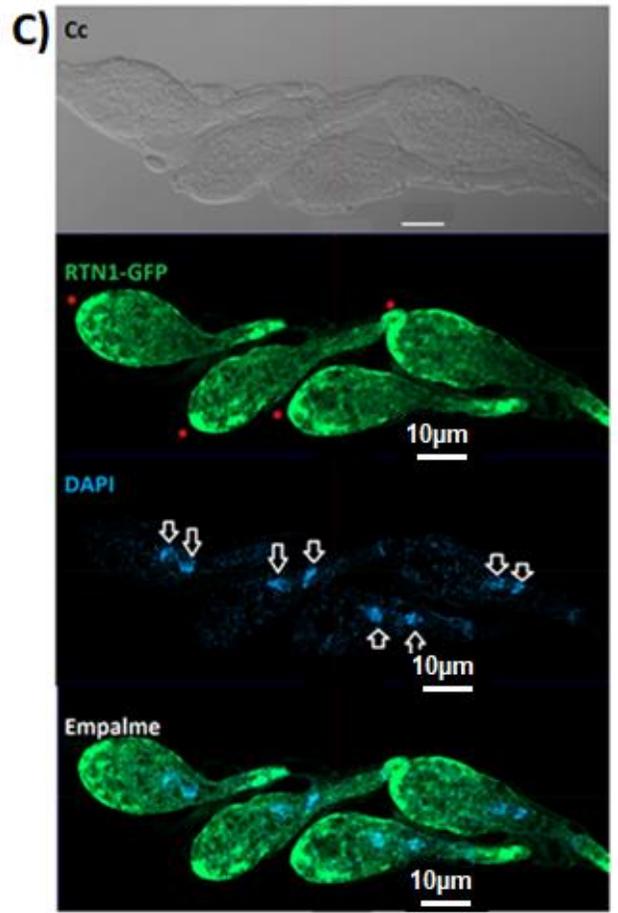
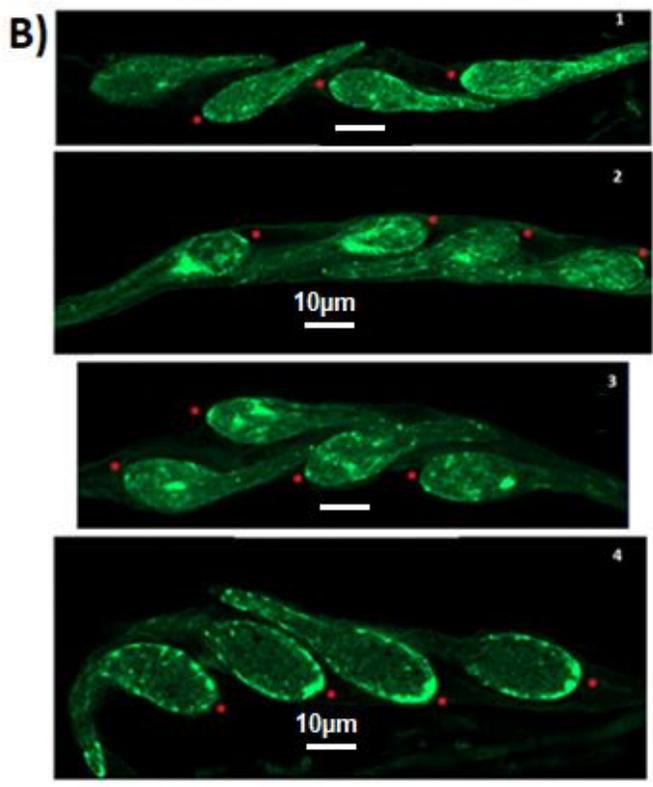


Figura 24. La distribución de RTN1-GFP en ascosporas. En (A) se muestra un asca de cuatro esporas en la que se observa como RTN1-GFP se distribuye en forma de red al interior de cada espora; el recuadro blanco muestra el acercamiento de una de sus ascosporas (a la derecha). Por su parte, el recuadro negro muestra el perfil de intensidad de fluorescencia de una ascospora y los recuadros amarillos indican que RTN1-GFP se acumula en las zonas apicales de la cola y la célula globosa. En (B) se anexan cuatro ejemplos de ascas independientes, cuyas ascosporas presentan un crecimiento que va de chico a grande (1-4), y en las cuales también se observa la distribución reticular de RTN1-GFP. Se incluye el esquema del crecimiento de esporas sexuales, en cual se aprecia cómo se ensanchan. En (C) se incluye otro ejemplo de un asca con esporas maduras. Según corresponda, se indica el campo claro (Cc), la señal RTN1-GFP, la distribución de su material genético (DAPI) y el empalme. Los asteriscos rojos (*), señalan acumulación de la fluorescencia en la zona apical; las flechas blancas (->) indican la distribución binuclear en las ascosporas. Las barras blancas indican la escala (5 o 10 μm). Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula (pág. 68).

La ausencia de la proteína RTN1 afecta la dinámica nuclear durante el desarrollo meiótico

Estudios previos demostraron que la eliminación de RTN1 afecta la distribución de los núcleos en las ascosporas (López Fuentes, 2016). Para entender mejor la participación de RTN1 en el proceso de formación de las ascosporas, aquí analizamos el tipo de defectos que se generan en este proceso tras la eliminación de RTN1.

En primer lugar, analizamos las etapas tempranas del desarrollo meiótico (por ejemplo, la etapa dicariótica y la profase I) y encontramos que en ellas no hubo diferencias notables en la distribución de los núcleos/cromosomas. Nuestro análisis, sin embargo, no tuvo una resolución que nos permitiera analizar con detalle la progresión de las diferentes etapas de la profase-I (Figura 25).

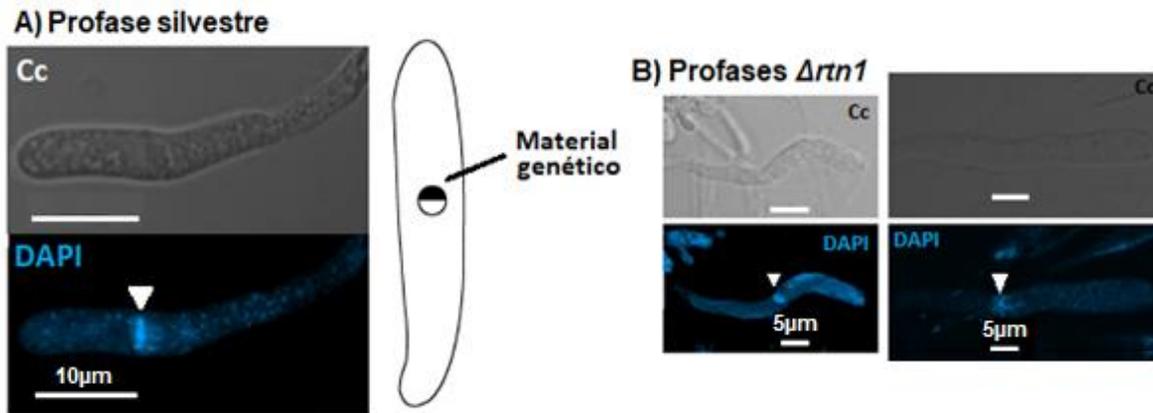
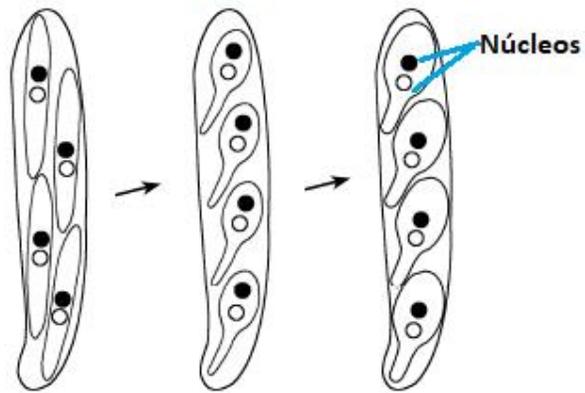


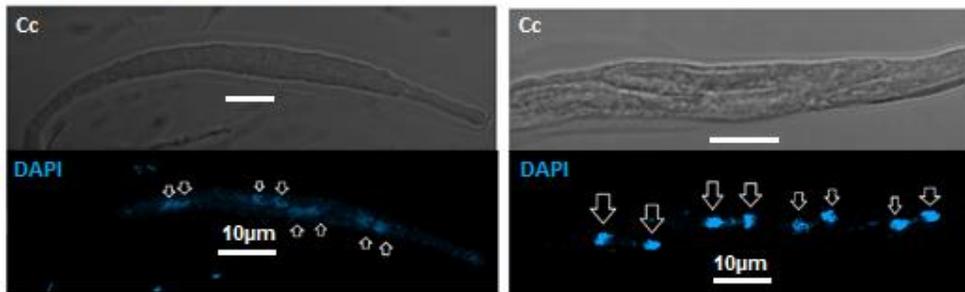
Figura 25. Profases obtenidas en cruces homocigas silvestres y $\Delta rtn1$. En esta etapa las profases de ambas cruces no muestran diferencias significativas entre una y otra. Para cada ejemplo se ve el campo claro (Cc) y la tinción de núcleos con DAPI (señalados con una flecha blanca); además se anexa el esquema representativo. La barra blanca indica la escala 5 o 10 μm .

Por su parte, en *P. anserina* el material genético que se recombina, divide y segrega durante la meiosis I, meiosis II y mitosis post-meiótica, se compartamentaliza en las esporas sexuales que se forman al interior del asca. Para la cepa silvestre se forman un total de ocho núcleos por asca, mismos que se distribuyen por pares en cuatro esporas sexuales para el 99% de los casos. El otro 1% de los casos forman cinco esporas sexuales, de las cuales tres esporas son binucleadas y dos son uninucleadas. En la cepa $\Delta rtn1$ se ha reportado un incremento del $20 \pm 2\%$ en la generación de esporas de tamaños y números anormales; y mismas que coinciden con una mala segregación de núcleos en su interior (López Fuentes, 2016) (Figura 26).

Crecimiento y formación de esporas



A) Esporas silvestres



B) Esporas $\Delta rtn1$

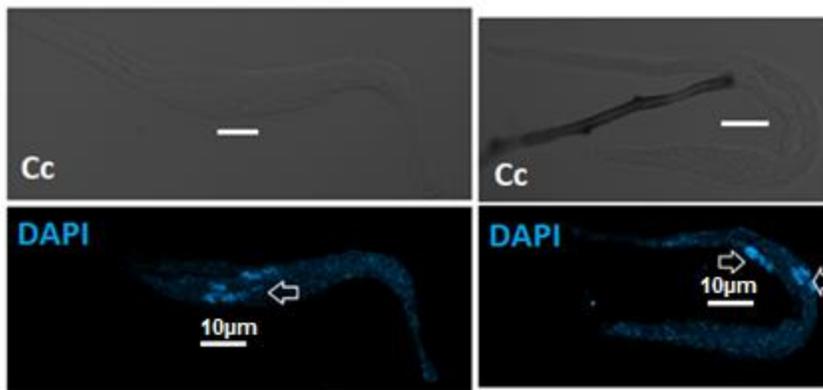
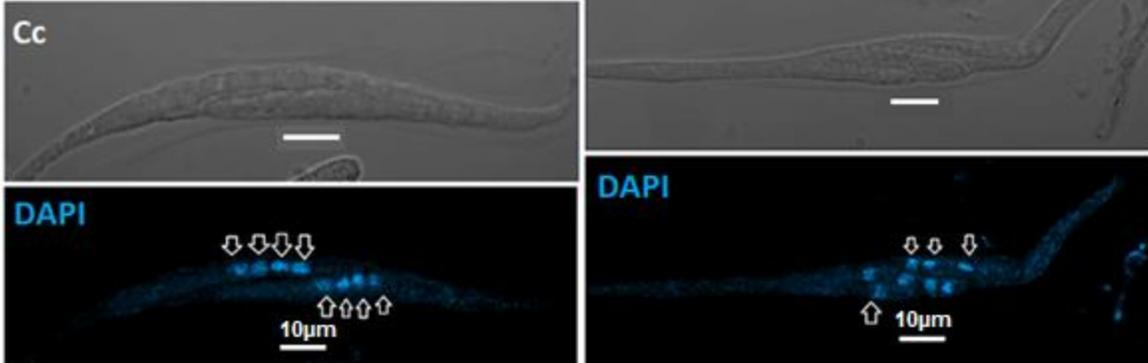


Figura 26. Análisis por microscopía confocal de la distribución nuclear en ascosporas silvestres y $\Delta rtn1$. Se muestran los resultados obtenidos por microscopía confocal al analizar la citología de esporas provenientes de una cruce sexual homóciga silvestre o $\Delta rtn1$. En A) se muestra la formación de esporas silvestres normales binucleadas; en B) se muestra la formación de esporas $\Delta rtn1$ anormales multinucleadas. Para cada una se muestra el campo claro (Cc) y la tinción de núcleos con DAPI. Se anexa el esquema representativo. Las flechas indican los núcleos. La barra blanca indica la escala (10 μm) (pág. 71).

Respecto al 20% (± 2) de ascas anormales cuantificado para las cruces homócigas de la cepa $\Delta rtn1$ aquí se demuestra (con un total de 45 ascas anormales con diferente número de ascosporas y que a su vez presentan tamaños diferentes) que las ascas anormales que forman tres esporas son predominantes con una frecuencia del 40%; le siguen las ascas anormales de cuatro esporas con una frecuencia del 27%; luego las ascas anormales con dos esporas sexuales con un 13%; continúan las ascas anormales con cinco o seis esporas con un 7% cada una; mientras que con una frecuencia del 4% están las ascas con una espora anormal y finalmente con una frecuencia del 2% se presentaron ascas con una morfología de bananas. Las bananas se describieron por primera vez en *Neurospora crassa* como una mutación dominante en la que células del ascogonio producen ascas que se diferencian en una sola y gigante ascospora, la cual es producto de una serie de divisiones nucleares erróneas (Raju y Newmeyer, 1997; Peraza y Malagnac, 2016; Wendland, 2016) (Figura 27).

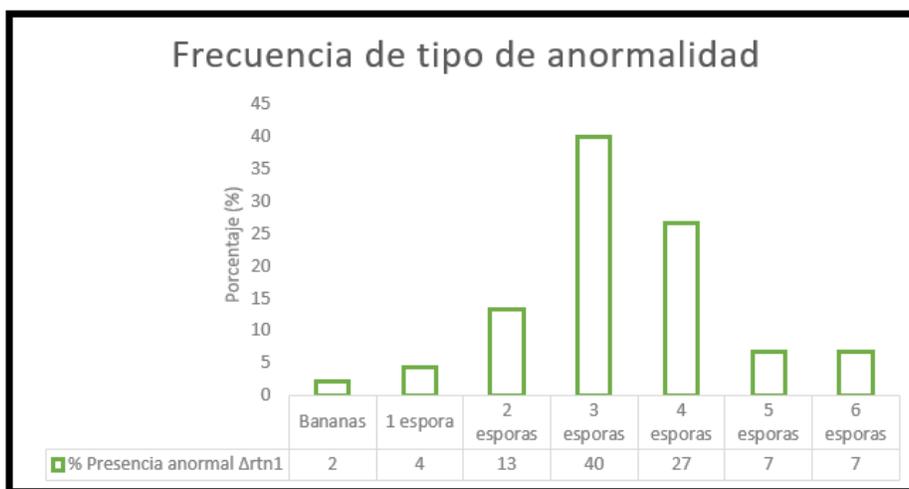


Figura 27. Frecuencia de tipo de anomalía en ascas de la cepa $\Delta rtn1$. En el eje de las abscisas se muestran las categorías: bananas; ascas de 1 espora; ascas de 2 esporas; 3 esporas; 4 esporas; 5 esporas;

y 6 esporas. Para cada una el eje Y, muestra el porcentaje de su frecuencia en una muestra donde se incluyeron 45 ascas anormales. En ese sentido se observa que las ascas anormales con 3 esporas sexuales son la categoría mayor representada (40%).

En cuanto a la distribución nuclear, se determinó que el 41% de las esporas anormales tienen un núcleo; 32% son esporas anormales binucleadas de menor o mayor tamaño que las esporas binucleadas silvestres; 20% esporas anormales trinucleadas y 7% esporas anormales tetranucleadas (Figura 28). Estos datos, se recuperaron de 12 ascas con esporas sexuales anormales en las que se realizó la tinción del material genético con DAPI. En estas 12 ascas se visualizaron un total de 96 núcleos (8 por cada asca), que se distribuyeron indistintamente en ascas que formaron entre dos a cuatro ascosporas anormales (que son las categorías con mayor frecuencia de aparición). Sin embargo, no fue posible asociar el número de núcleos con el tamaño de las esporas ya que, por decir un ejemplo, se encontraron ascas con tres esporas anormales en las que la distribución de los ocho núcleos era 1:3:4; 2:2:4; o 3:3:2. Estos resultados son consistentes con una segregación nuclear defectuosa debida a alteraciones en el movimiento de los núcleos derivados de la meiosis o a un posicionamiento incorrecto de los husos acromáticos durante la segunda división meiótica y/o la mitosis postmeiótica. En resumen, se podría inferir que la anomalía más representada en la formación de esporas de la cepa *Δrtn1* son las ascas que tienen 3 esporas y mismas que en su mayoría presentan un núcleo cada una.

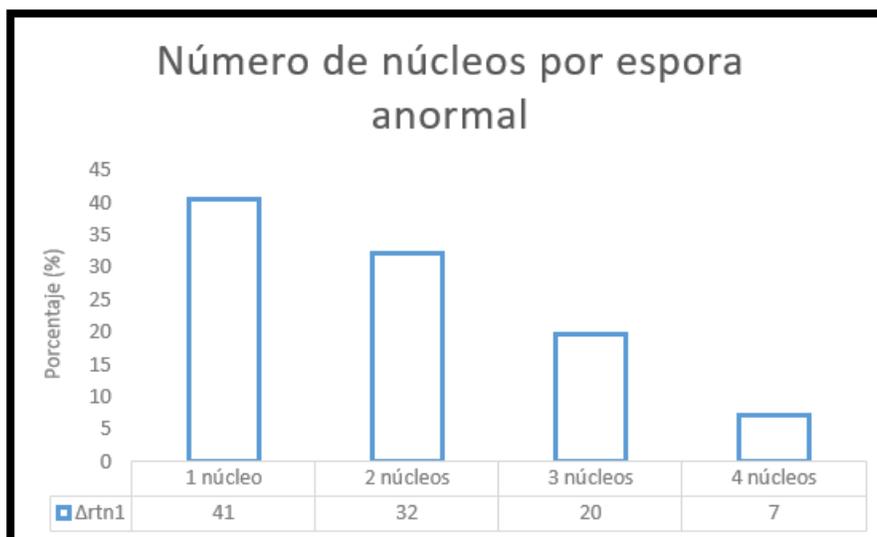


Figura 28. Porcentaje de número de núcleos en esporas anormales de la cepa $\Delta rtn1$. En una muestra de 12 ascas anormales, donde el total de núcleos formados es 96 (8 por cada asca). Se observó que el 41% de las esporas formadas presentan un núcleo; el 32% de las esporas formadas 2 núcleos; el 20% de las esporas tienen 3 núcleos; y 7% de las esporas presentan 4 núcleos. Estos datos, se recuperaron de esporas sexuales anormales en las que se realizó la tinción del material genético con DAPI.

La eliminación de RTN1 afecta la germinación de las ascosporas

Por otra parte, se observó que, sin importar la presencia o ausencia de ascas anormales en las cruces homocigas $\Delta rtn1$, las esporas sexuales son expulsadas por los peritecios. De hecho, recuperamos un total de 102 esporas de ascas anormales y 102 esporas de ascas normales de la cepa $\Delta rtn1$ y determinamos su porcentaje de germinación. Nuestros resultados muestran que, en contraste con el porcentaje de germinación de esporas silvestres, que es cercano al 95%, la germinación de las esporas se ve afectada en ausencia de RTN1, en relación con los defectos de su formación. Observamos que las esporas de ascas anormales $\Delta rtn1$ muestran un 55% de germinación que contrasta con el 86% de esporas de ascas normales $\Delta rtn1$ (Figura 29).

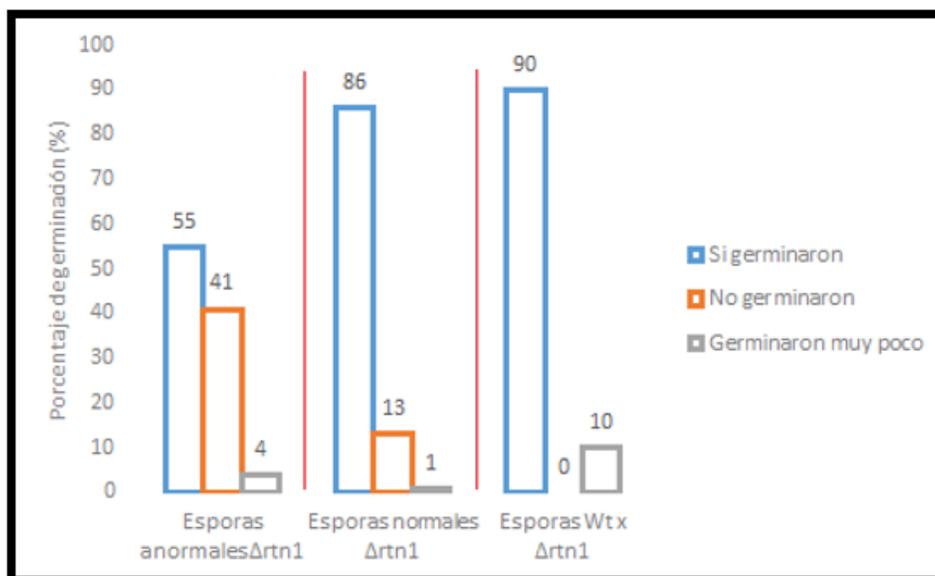
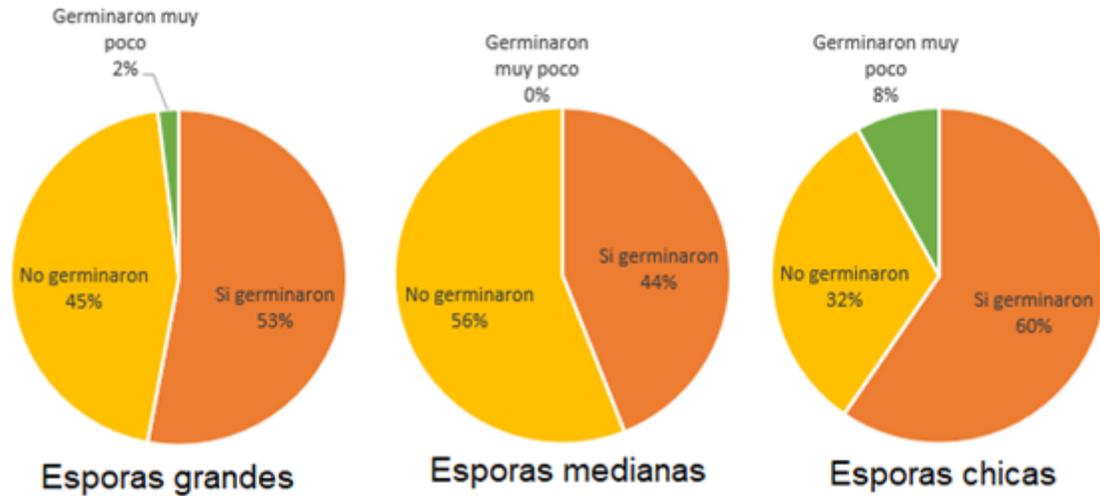


Figura 29. Porcentaje de germinación de las esporas de ascas anormales y normales de la cepa $\Delta rtn1$. En la cepa $\Delta rtn1$, las esporas anormales tienen un porcentaje de germinación del 55%; mientras que las esporas normales tienen un porcentaje de germinación del 86% (n=102 en cada categoría). También se muestra que las esporas normales de una cruce heterocigica Wt x $\Delta rtn1$ presentan un 90% de germinación (n=52). La categoría "germinaron muy poco" representa esporas que tuvieron un brote de micelio inicial, pero que ya no crecieron en comparación con las que si germinaron.

De otra forma, si categorizamos las ascas anormales en esporas grandes, medianas y chicas. Donde esperaríamos que las esporas grandes tuvieran tres o más núcleos; las medianas dos núcleos y las chicas un núcleo. Encontramos que, de 47 esporas grandes el 53% si germina, el 45% no germina y el 2% germina muy poco; en 18 esporas medianas, el 44% germina y el 56% no lo hace; mientras que, de 37 esporas chicas el 60% si germinan, el 32% no germinan y el 8% germinan muy poco. Esto se puede comparar con las ascas normales, para las cuales no existió ninguna espora grande. Pero de las 90 esporas medianas (o binucleadas) el 87% si germinó; el 12% no germinó y únicamente el 1% germinó muy poco. Asimismo, de 12 esporas chicas el 83% si germinó y el 17% no germinó (Figura 30).

Ascas anormales $\Delta rtn1$



Ascas normales $\Delta rtn1$

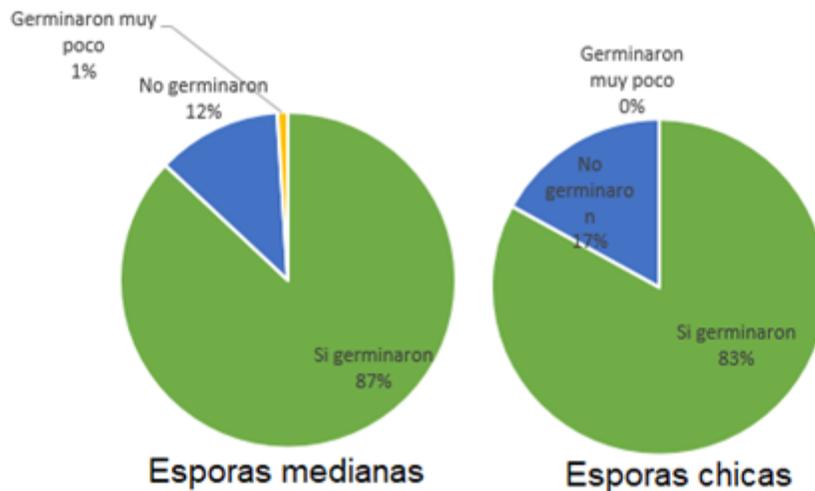


Figura 30. Clasificación del porcentaje de germinación de esporas sexuales provenientes de ascas anormales y normales de la cepa $\Delta rtn1$, dependiente del tamaño de la espora. Arriba, se muestran las gráficas de pastel de esporas de ascas anormales, cuyo tamaño es grande; mediano; o chico. Abajo, se muestran las gráficas de pastel de esporas de ascas normales, cuyo tamaño es mediano; o chico. En todas, se indica el porcentaje de germinación.

Asimismo, se ha demostrado que el fenotipo $\Delta rtn1$ es recesivo durante el desarrollo sexual. Es decir, no se observa en cruza heterocigotas de una cepa mutante $\Delta rtn1$ por una silvestre (López-Fuentes, 2016). En este sentido, también observamos que el porcentaje de germinación de esporas derivadas de una cruz heterocigota $\Delta rtn1 \times Wt$ es cercano al 90% tanto para

las esporas silvestres como para las mutantes *Δrtn1* (n=52) (Figura 29). Estos resultados indican que los defectos de germinación de las esporas están relacionados con una alteración durante el desarrollo del asca, previa a la individualización de las esporas, posiblemente durante el desarrollo meiótico.

Los defectos en la formación de ascas generados por la ausencia de RTN1 no se exacerban tras la eliminación simultánea de las proteínas de la familia de Yop1

Otro de los análisis que realizamos fue determinar si existía un deterioro como resultado de la ausencia múltiple de proteínas estructurales del RE, para lo cual se postuló evaluar y comparar el desarrollo de ascas provenientes de cruza homocigas de la cepa silvestre (Wt); la cepa sencilla de delección *Δrtn1*; las cepas de doble delección *Δrtn1Δyop1* y *Δrtn1Δyop2*; así como la cepa de triple delección *Δrtn1Δyop1Δyop2*. El genotipo de algunas de estas cepas fue verificado por PCR (Figura suplementaria 10). Se realizó un experimento donde fueron cuantificadas aproximadamente 100 ascas provenientes de tres peritecios con cuatro días post-fertilización (n=3). Con esto, se demostró que el porcentaje de ascas anormales de una cruce *Δrtn1Δyop1* alcanza el 25%; el de la cruce *Δrtn1Δyop2* un 20%; mientras que la cruce *Δrtn1Δyop1Δyop2* un 23% (Figura 31). Valores que son cercanos al porcentaje de anomalía de las ascas de una cruce homociga *Δrtn1*.

Para confirmar estadísticamente si existen o no diferencias significativas entre cada una de las cepas, se realizó una prueba ANOVA de dos factores con la comparación múltiple de *Dunnnett*. Para todos los casos se comparó con el porcentaje de ascas normales y anormales de la cepa de delección sencilla *Δrtn1* con un alfa de 0.05. De entre todas, la única cepa que mostró diferencias significativas en el número de ascas normales con respecto a *Δrtn1* fue la cepa silvestre, lo cual corresponde adecuadamente (Tabla 2). Resultados similares se encontraron al realizar de manera

independiente con una prueba múltiple de T (Ver material suplementario, Tabla 3).

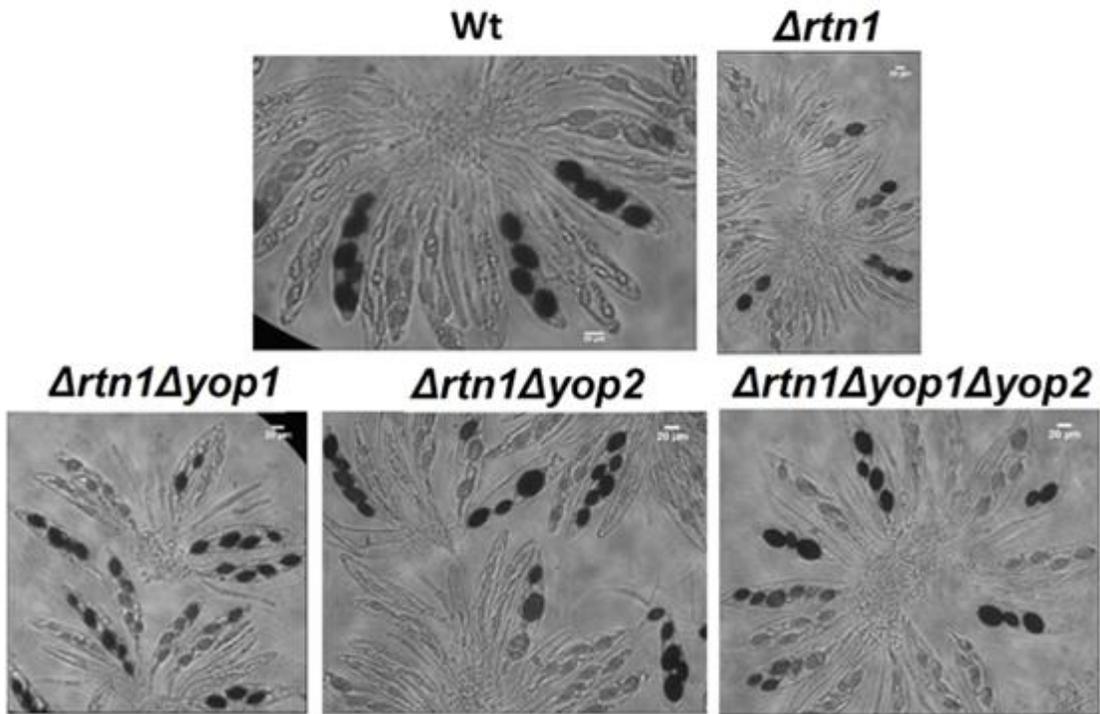
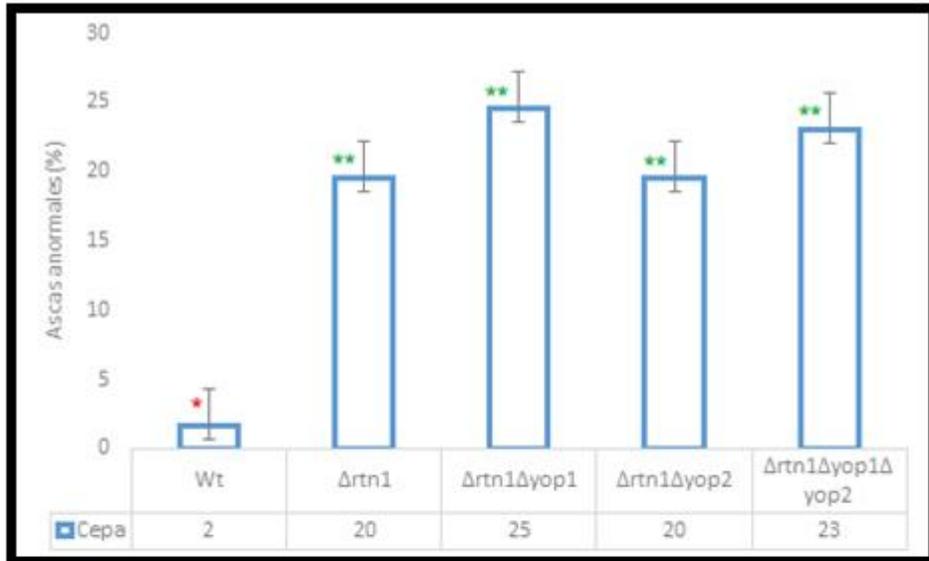


Figura 31. Cuantificación de los defectos en la formación de ascas durante el desarrollo sexual en cruza homocigas de cepas con delección doble $\Delta rtn1\Delta yop1$; $\Delta rtn1\Delta yop2$ y triple $\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$. El eje de las abscisas muestra el promedio de experimentos independientes para cada cruza donde se evaluaron ~ 100 ascas provenientes de peritecios con cuatro días post-fertilización. Se observa que las cruza de delección doble y triples se comportan como la cepa $\Delta rtn1$. Se usó como control la cruza homocigá silvestre

(Wt) y $\Delta rtn1$. Se indican las barras de error y se anexan las imágenes recuperadas para cada cruce. El (*) indica que la diferencia es significativa y los (**) que la diferencia no es significativa entre el porcentaje de ascas anormales con respecto a $\Delta rtn1$ (para más información ver la tabla 2).

Tabla 2. Prueba ANOVA de dos factores con la comparación múltiple de Dunnett

Prueba de comparación múltiple de Dunnett's	Diferencia promedio	Significativo?	Valor ajustado de p
Ascas normales			
$\Delta rtn1$ vs. Silvestre	-17.9	Si	0.0012
$\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop1$	5.733	No	0.4614
$\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop2$	-0.03333	No	>0.9999
$\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$	3.433	No	0.8226
Ascas anormales			
$\Delta rtn1$ vs. Silvestre	17.9	Si	0.0012
$\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop1$	-5.733	No	0.4614
$\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop2$	0.03333	No	>0.9999
$\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$	-3.433	No	0.8226

Se compararon dos familias (Ascas normales y anormales), cada una en cuatro muestras diferentes: $\Delta rtn1$ vs. Silvestre; $\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop1$; $\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop2$; y $\Delta rtn1$ vs. $\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$. El valor de alfa fue de 0.05. Se muestra la diferencia promedio entre las muestras, si es significativo o no y el valor ajustado de p. (La prueba se realizó usando el programa GraphPad Prism 7.05).

Lo anterior sugiere que no existe un fenotipo aditivo de las cepas de delección dobles o triples carentes de proteínas estructurales de RE.

La ausencia de RTN1 afecta la dinámica de husos acromáticos en la meiosis I, la meiosis II y la mitosis post-meiótica de *P. anserina*

Debido a que la distribución del material genético se encuentra comprometida en la formación de esporas sexuales en la cepa carente de la proteína de reticulón RTN1; decidimos determinar si la eliminación de RTN1 afecta la dinámica de los husos acromáticos durante el desarrollo meiótico.

Para ello se prepararon muestras citológicas de ascas en las cuales se marcó el material genético con DAPI y el citoesqueleto de los microtúbulos utilizando anticuerpos primarios para α -tubulina y secundarios acoplados a la fluorescencia FITC (verde) o a Alexa-594 (rojo). La tinción con α -tubulina permitió esclarecer la distribución de los husos acromáticos que se forman específicamente entre la meiosis I, la meiosis II y la mitosis post-meiótica.

Formación y distribución del huso acromático durante el desarrollo de esporas silvestres y esporas $\Delta rtn1$

Cómo referencia en la cepa silvestre la disposición del huso acromático se establece de manera vertical (o longitudinal) durante la meiosis I y meiosis II; u horizontal (o transversal) durante la mitosis post-meiótica. Lo anterior genera y concluye con la distribución correcta o normal del material genético al interior de las esporas (Figura 32).

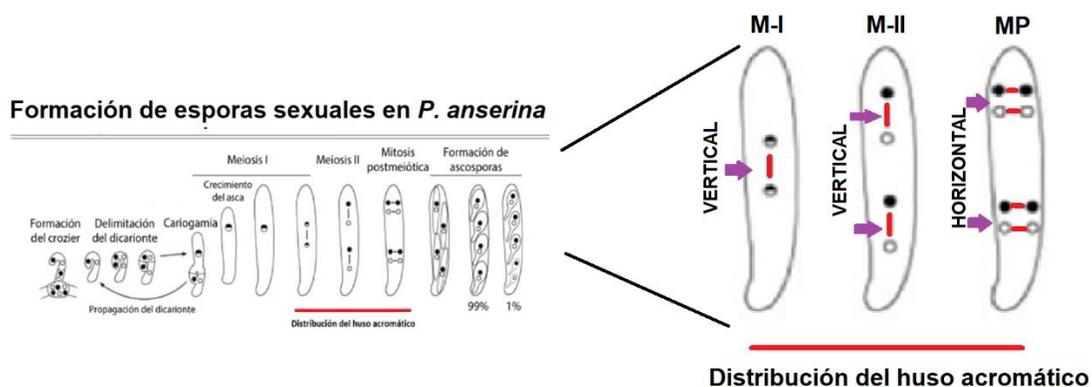


Figura 32. Disposición del huso acromático durante la formación de esporas silvestres. A la izquierda, se muestra el esquema que explica la progresión en la formación de esporas sexuales. A la derecha, se muestra un acercamiento de la disposición del huso acromático: vertical durante la meiosis I (M-I) y meiosis II (M-II); u horizontal durante la mitosis post-meiótica (MP).

Entre nuestras muestras citológicas fue posible verificar la correcta disposición vertical de los husos acromáticos durante el desarrollo de la cepa silvestre en la meiosis I (n=7) (Figura 33); así como la adecuada disposición horizontal de los husos acromáticos de la mitosis post-meiótica (n=7) (Figura 34). Sin embargo, a pesar de nuestros esfuerzos no hemos recuperado

ejemplos de la meiosis II, lo que probablemente es un reflejo de que es una etapa rápida del desarrollo.

Meiosis I silvestre

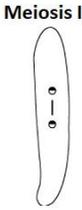
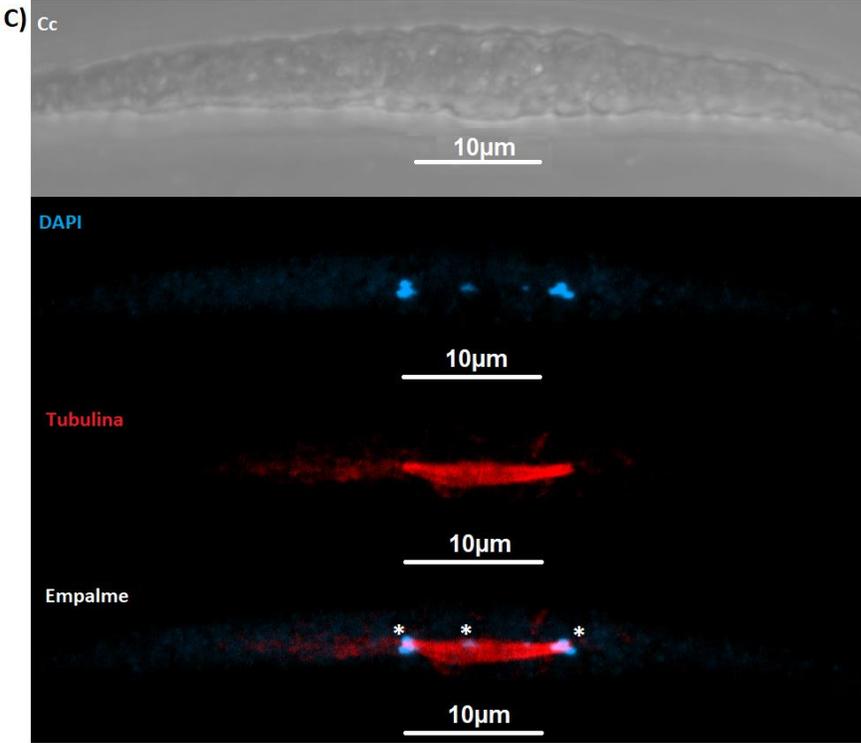
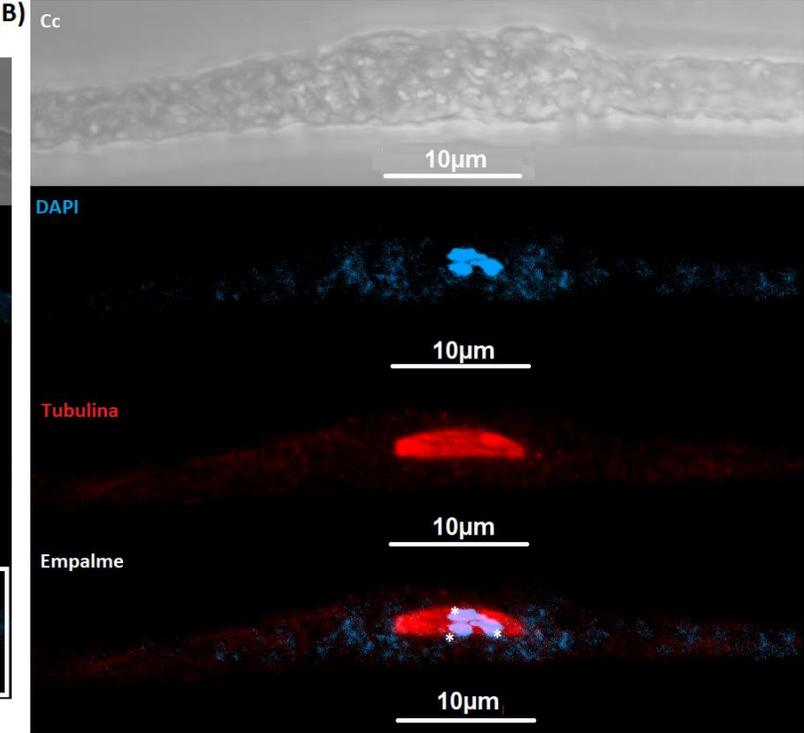
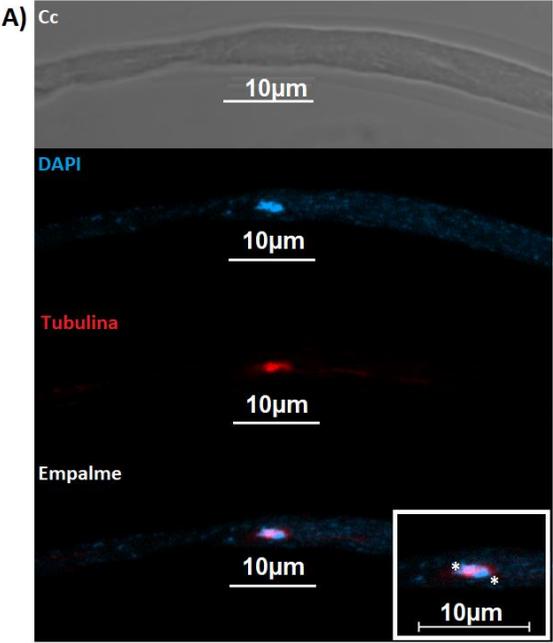


Figura 33. Distribución de husos acromáticos en la meiosis I de la cepa silvestre. Se muestran los resultados obtenidos por microscopía confocal al analizar la citología de esporas provenientes de una cruce sexual homóciga silvestre; se pueden apreciar meiosis I en una etapa inicial (A), en metafase (B) y en telofase (C), en donde la disposición del huso acromático es vertical. Para cada una de las muestras se aprecia el campo claro (Cc), la tinción de núcleos con DAPI, la tinción de husos acromáticos con tubulina en rojo (ALEXA-594) y el empalme de ambos. En (A) el recuadro blanco muestra un acercamiento. Los asteriscos blancos señalan el material genético. Se anexa un esquema de la meiosis I. La barra blanca indica la escala (10 μ m). Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μ m a lo largo de todo el volumen de la célula (pág. 81).

Mitosis post-meiótica silvestre

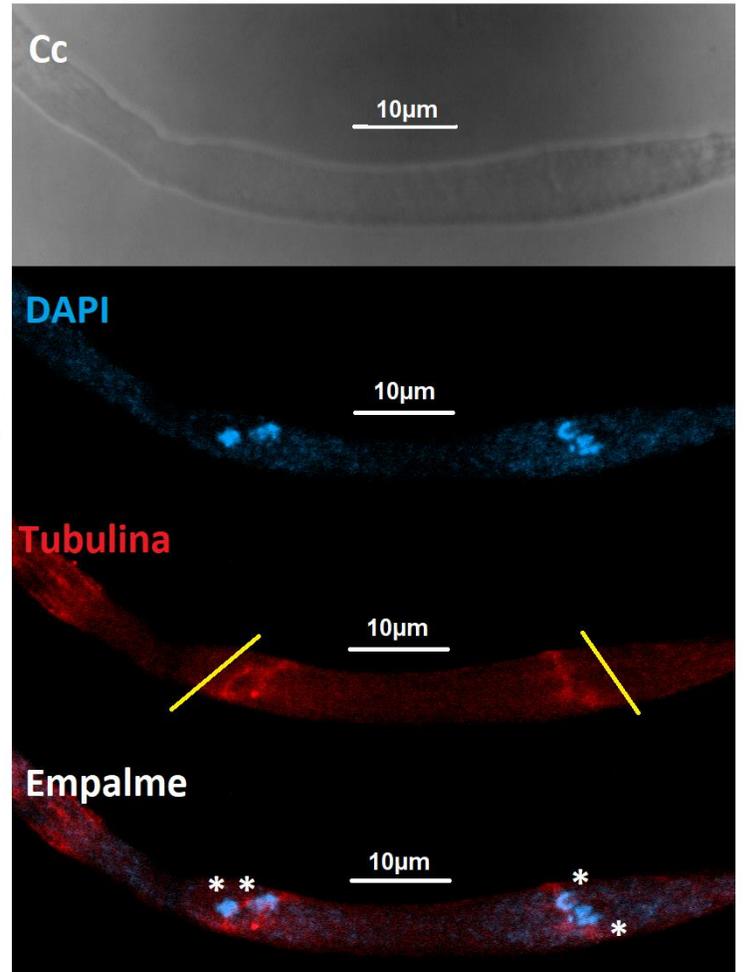
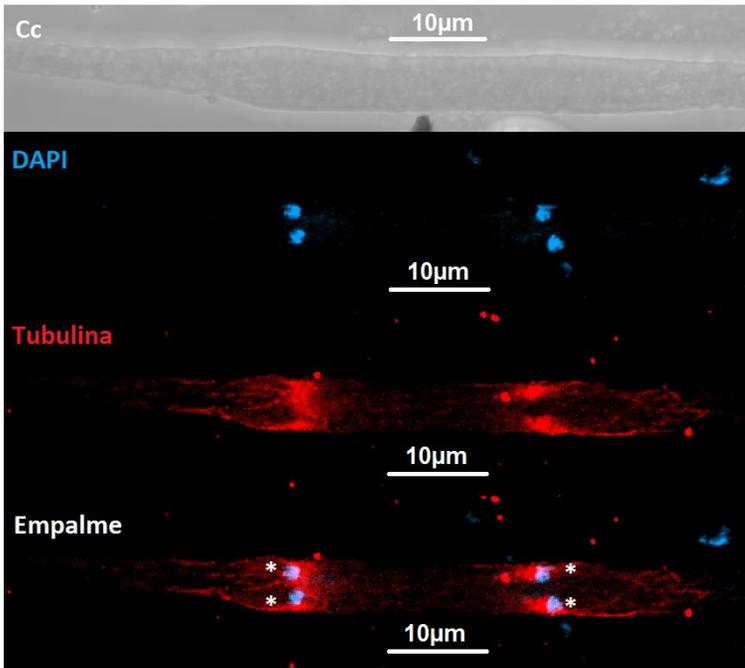


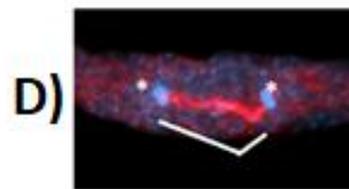
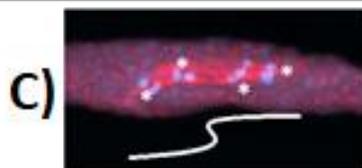
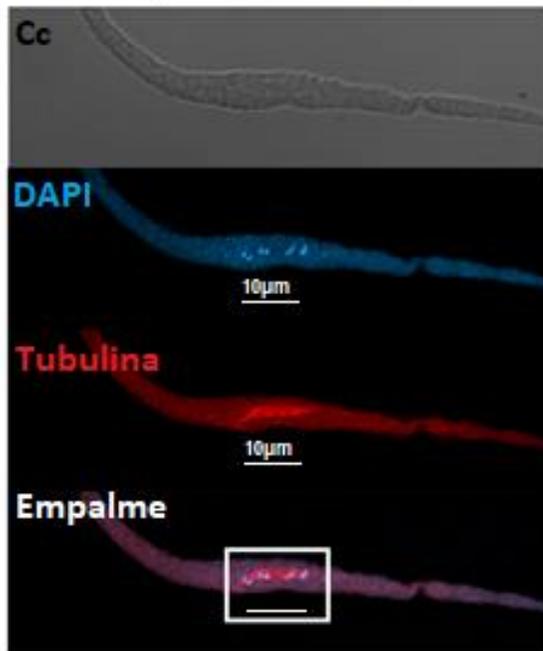
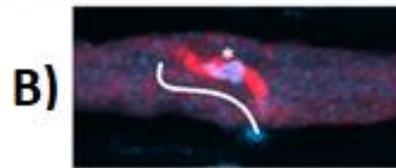
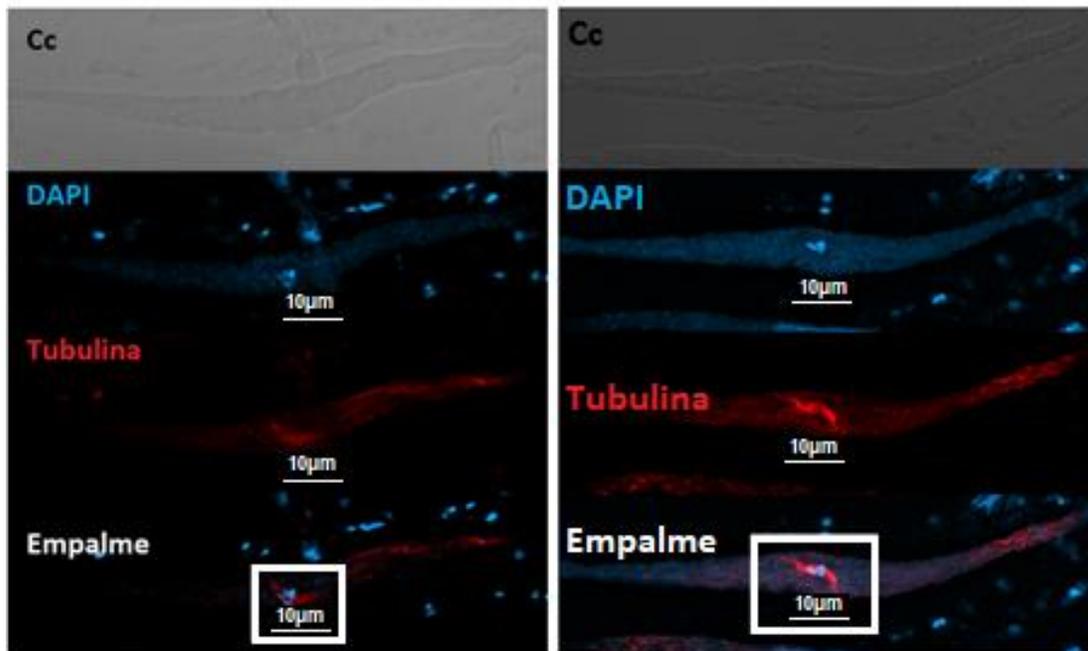
Figura 34. Distribución de husos acromáticos en la mitosis post-meiótica de la cepa silvestres. Se muestran los resultados obtenidos por microscopia confocal al analizar la citología de esporas provenientes de una cruce sexual homóciga silvestre; se pueden apreciar el final de dos telofases de mitosis post-meióticas en donde la disposición del huso acromático es horizontal. Para cada una de las muestras se aprecia el campo claro (Cc), la tinción de núcleos con DAPI, la tinción de husos acromáticos con tubulina en rojo (ALEXA-594) y el empalme de ambos. Las líneas amarillas en la imagen de la derecha muestran la forma que adoptaron los husos acromáticos y con asteriscos se señala el material genético. Se anexa un esquema de la mitosis post-meiótica. La barra blanca indica la escala (10 μm). Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula (pág. 82).

En la cepa Δrtn1 observamos que en términos generales el huso acromático de la meiosis I presenta una orientación longitudinal (n=5). Sin embargo, también observamos alteraciones en la disposición de los husos acromáticos que no se observaron en la cepa silvestre (n=8). Estas consistieron principalmente en una disposición diagonal de los husos, o en la presencia de curvaturas a lo largo de estos (Figura 35).

Por otra parte, si bien, no pudimos evidenciar el huso acromático en células silvestres de la meiosis II, también encontramos anomalías en esta etapa en las cepas Δrtn1 (n=11), éstas consistieron en la formación de husos acromáticos curvados, discontinuidades en los microtúbulos de los husos, así como cromosomas no anclados a estos (Figura 36). Debido a que fue más fácil encontrar ascas en meiosis II en la cepa Δrtn1 , suponemos que el desarrollo sexual de las mutantes carentes de RTN1 sería más lento en comparación al desarrollo sexual silvestre.

Finalmente, la cepa Δrtn1 también mostró anomalías en los husos acromáticos de la mitosis post-meiótica (n=14). Entre estas muestras erróneas, los husos acromáticos se observaron en forma de gancho, con curvas o inclinaciones; así como husos que no se asocian al material genético (Figura 37).

Meiosis I $\Delta rtn1$



Meiosis I anormal



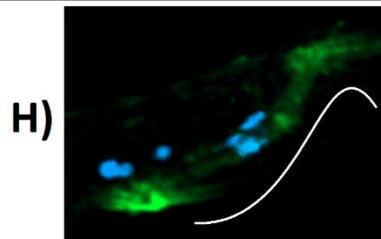
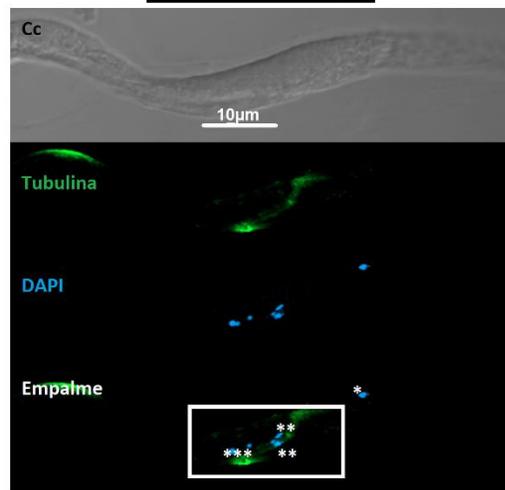
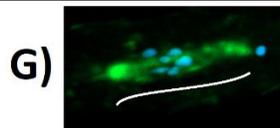
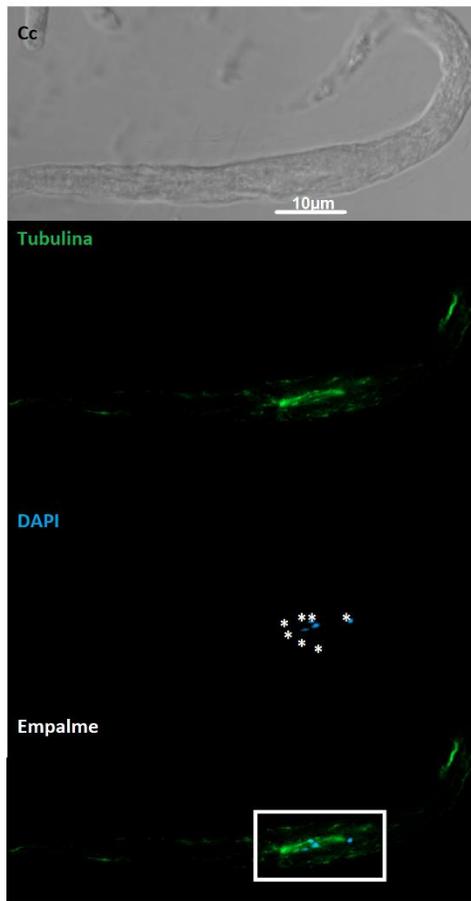
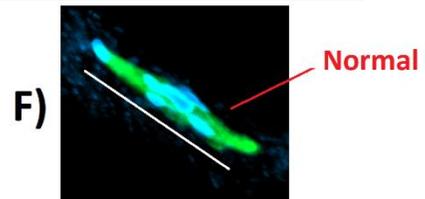
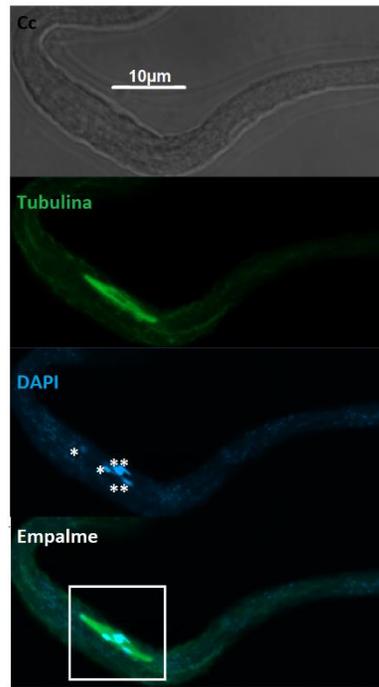
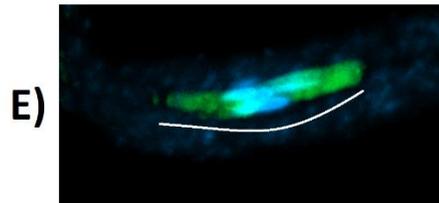
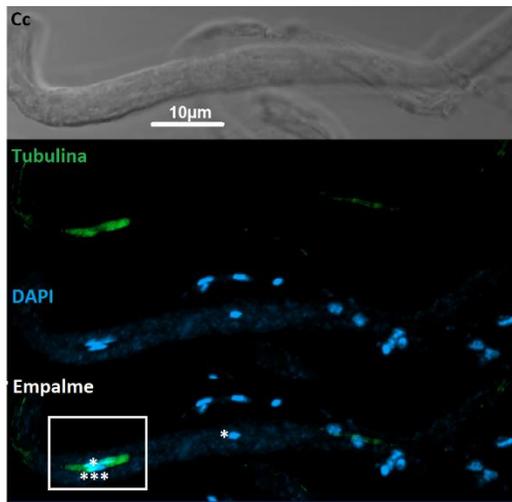
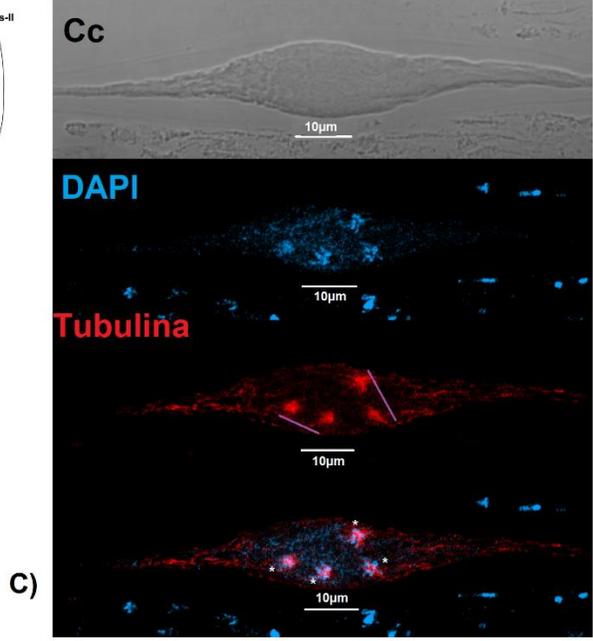
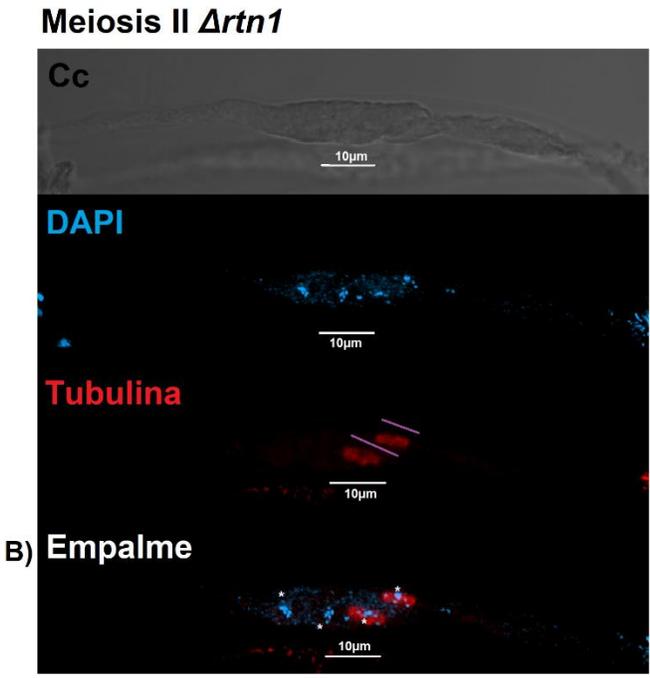
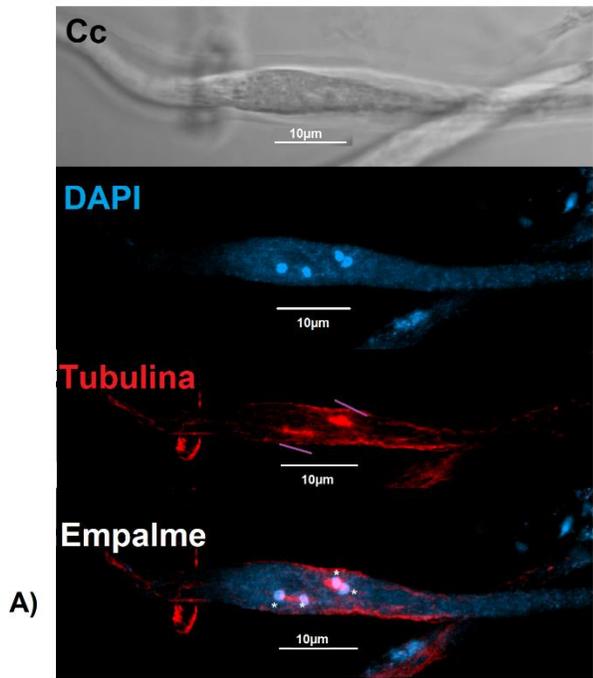


Figura 35. Distribución de husos acromáticos en la meiosis I de la cepa $\Delta rtn1$. Se muestran los resultados obtenidos para la meiosis I de una cruce sexual homociga $\Delta rtn1$; En las muestras (A-B y E) se observan dos metafases que tienen husos acromáticos curvos; en (C y G) se muestra el inicio de una telofase con huso acromático curvo; en (D) se observa una telofase final con un huso que no es diagonal (longitudinal); y en (F) se ve una telofase normal; en (H) se observa un huso acromático curvo y además material genético que no está asociado a él. Para cada una de las muestras se aprecia el campo claro (Cc), la tinción de núcleos con DAPI, la tinción de husos acromáticos con tubulina en rojo (ALEXA-594) o tubulina en verde (FITC) y el empalme de ambos. En todos los ejemplos se hizo un acercamiento (recuadro blanco) en el cual se señalan con línea blanca la forma que adoptaron los husos acromáticos y con asteriscos el material genético. Se anexa un esquema de la meiosis I. La barra blanca indica la escala 10 μm . Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula (págs. 84 y 85).



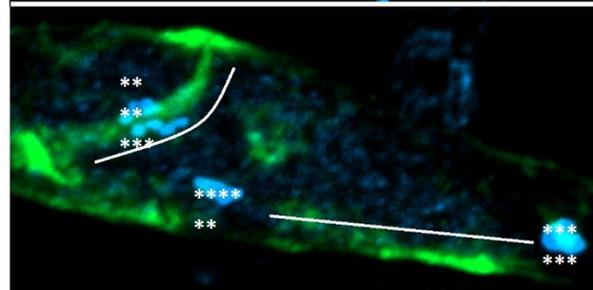
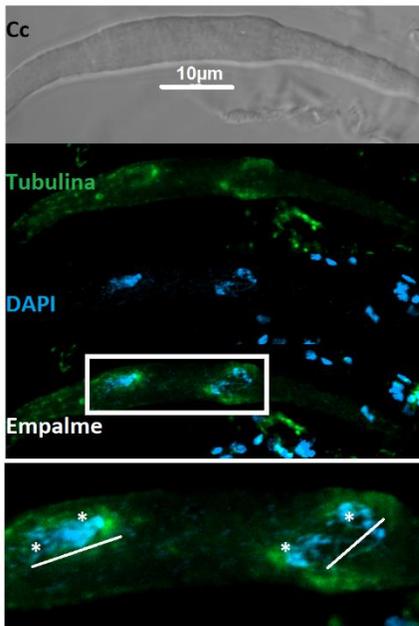
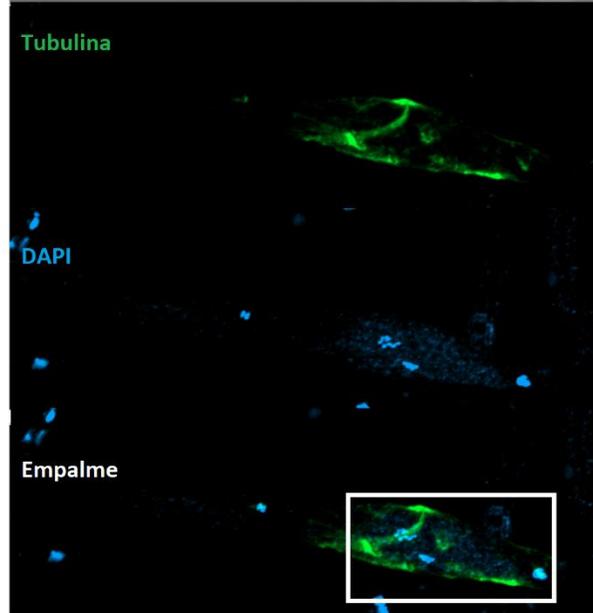
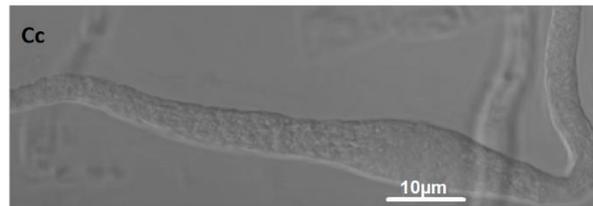
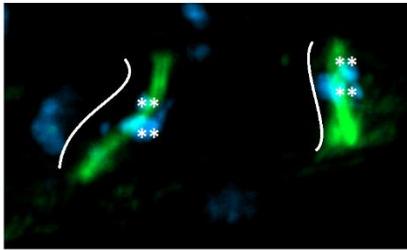
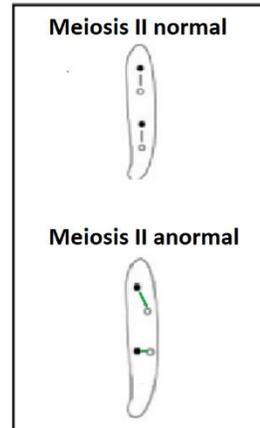
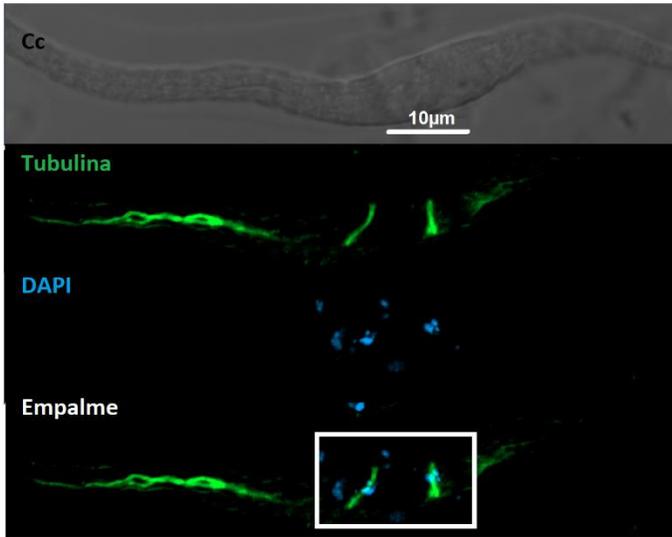
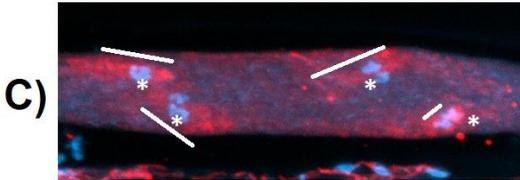
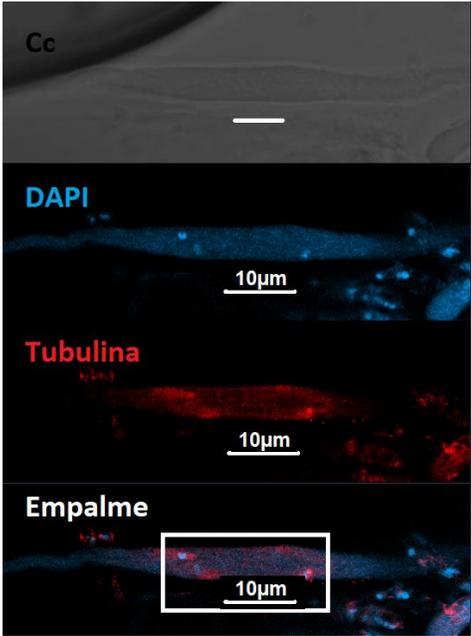
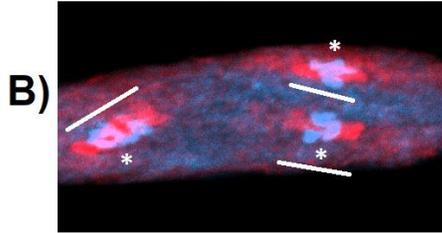
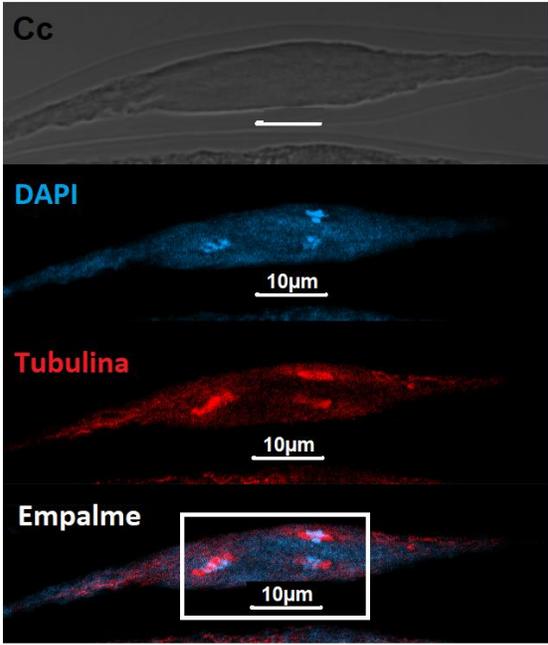
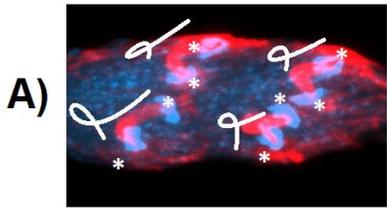
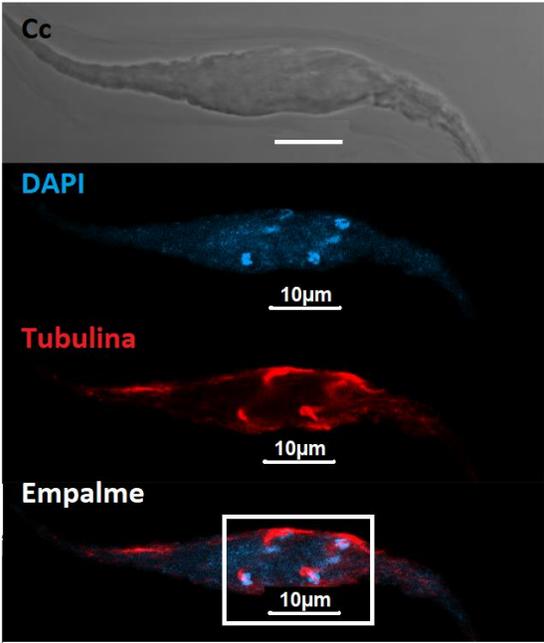
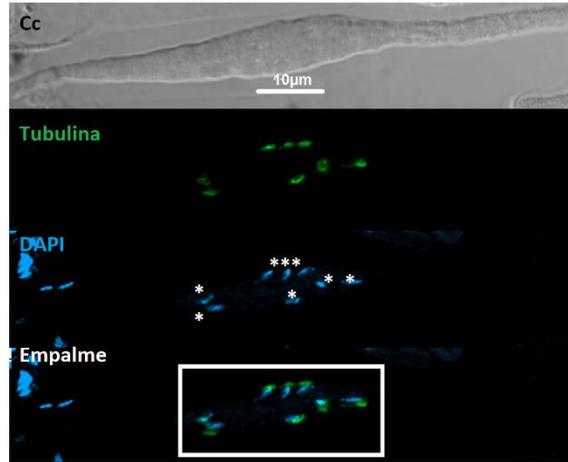
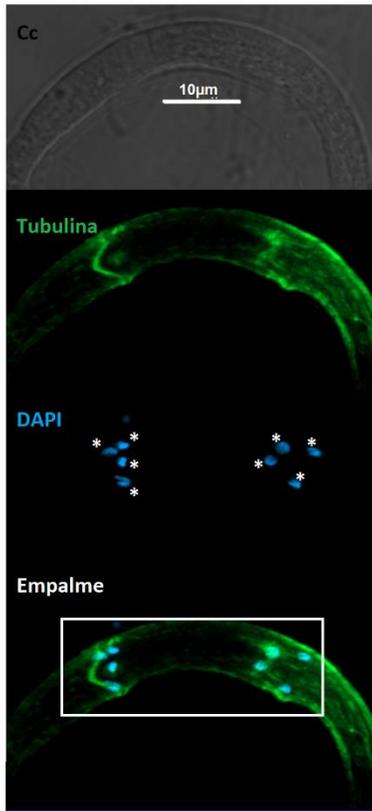


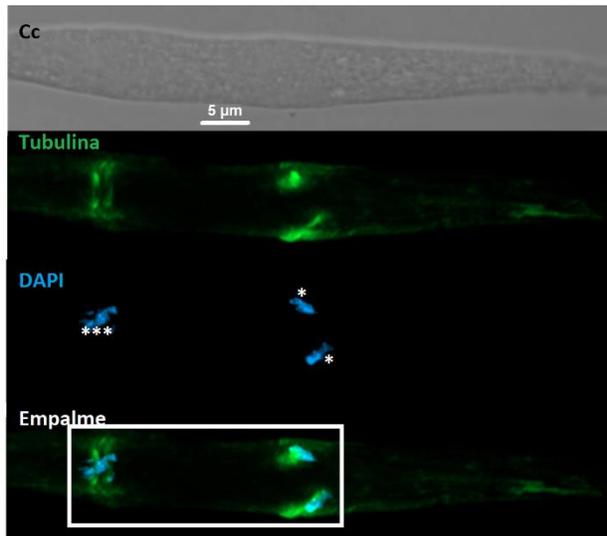
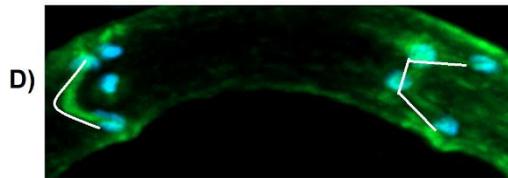
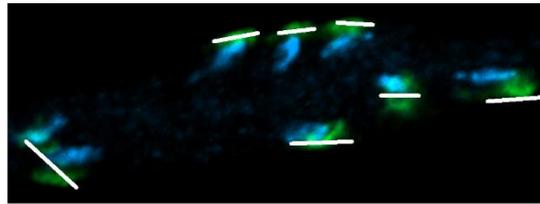
Figura 36. Distribución de husos acromáticos en la meiosis II de la cepa *Δrtn1*. Se muestran los resultados de meiosis II obtenidos por microscopia confocal al analizar la citología de esporas provenientes de una cruce sexual homóciga *Δrtn1*. En las muestras (A, C y E) se observan telofases que tienen husos acromáticos que no son longitudinales y presentan inclinaciones; en (B) se observan dos husos acromáticos y al mismo tiempo material genético que no está asociado a ninguno de ellos; en (D) se muestra una metafase de meiosis II con husos acromáticos curvos; y en (F) se aprecia una meiosis II con dos husos acromáticos, el de la izquierda muestra material genético en metafase y el de la derecha muestra material genético en telofase y que además se encuentra asociado a la pared del asca. Para cada una se muestra el campo claro (Cc), la tinción de núcleos con DAPI, la tinción de husos acromáticos con tubulina en rojo (ALEXA-594) o tubulina en verde (FITC) y el empalme de ambos. El recuadro blanco de las muestras (D-F) indica la zona de acercamiento en la cual se señalan con líneas blancas la forma y posición que adoptan los husos acromáticos y con asteriscos el material genético. Se anexa un esquema de la meiosis II. La barra blanca indica la escala 10 μm . Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula (págs. 87 y 88).

Mitosis
post-meiótica
Δrtn1

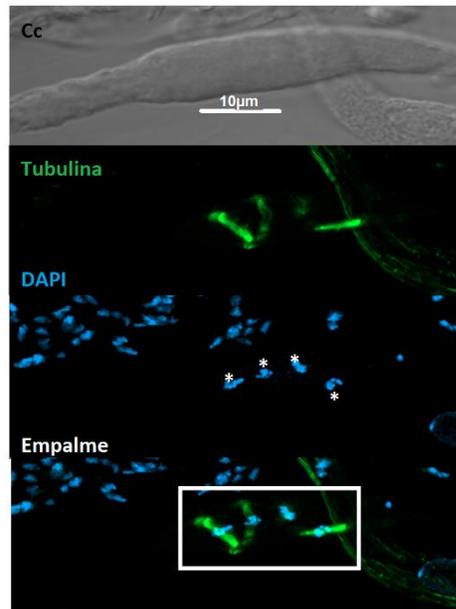
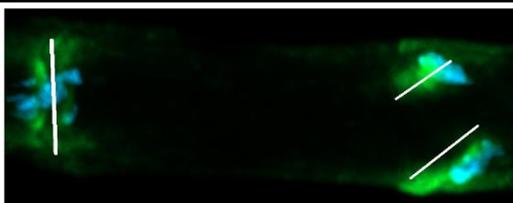




E)



F)



G)

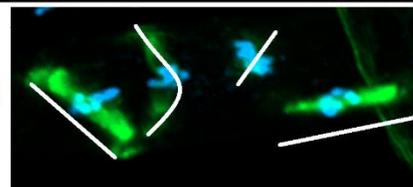


Figura 37. Distribución de husos acromáticos en la mitosis post-meiótica de la cepa *Artn1*. Se muestran los resultados obtenidos para la mitosis post-meiótica de una cruce sexual homociga *Artn1*; en (A) se observa una telofase con cuatro husos acromáticos en forma de gancho; en (B y F) ocurre una metafase, pero falta un huso acromático; en (C y G) se muestra una metafase con cuatro husos acromáticos que presentan inclinaciones y/o están curvos; en (D) se observa una telofase con husos curvos; en (E) se observa que el material genético está desordenado y asociado a la pared del asca. Para cada una de las muestras se aprecia el campo claro (Cc), la tinción de núcleos con DAPI, la tinción de husos acromáticos con tubulina en rojo (ALEXA-594) o tubulina en verde (FITC) y el empalme de ambos. En todos los ejemplos se hizo un acercamiento (recuadro blanco) en el cual se señalan con línea blanca la forma que adoptaron los husos acromáticos y con asteriscos el material genético. Se anexa un esquema de la mitosis post-meiótica. La barra blanca indica la escala 5 o 10 μm según se indica. Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0.34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula (págs. 90 y 91).

VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación buscó vislumbrar más ampliamente el papel que ocupa la proteína de reticulón RTN1 en el crecimiento y desarrollo del hongo filamentoso *P. anserina*. Para cumplir con esto, se determinó la localización de RTN1 tanto en la fase vegetativa como en el desarrollo sexual. En el desarrollo sexual se determinó la importancia que tiene la proteína RTN1 para llevar a cabo una correcta formación de esporas sexuales.

Dinámica y arreglo del RE en la fase somática de *P. anserina*

Esta investigación ha demostrado que el RE de *P. anserina* es un organelo que se distribuye a lo largo de toda la hifa vegetativa cuya arquitectura se modifica continuamente y como se ha propuesto, incluso en modelos teóricos (Shemesh *et al.*, 2014), adopta diversas morfologías (Figura 8 y Figura 15). Esto es posible pues la identidad del RE se mantiene por la participación del citoesqueleto, la maquinaria de fusión homotípica de sus membranas y todas las proteínas estructurales con las que cuenta (English y Voeltz, 2013).

En análisis detallados de microscopía de células vivas ha sido posible ver cómo el arreglo del RE presenta ramificaciones, retracciones y fusión de diferentes dominios (Chen *et al.*, 2013). En los ascomicetos miceliales, las hifas vegetativas se dividen y organizan mediante septos intercelulares que, sin embargo, son perforados y permiten la comunicación entre células. En *Aspergillus oryzae* se ha reportado que la dinámica de la red del RE, visualizada con la proteína BipA-EGFP, presenta una distribución discreta entre las células de hifas vegetativas que están divididas por los septos (Maruyama, *et al.*, 2006). En *P. anserina* observamos que, en efecto, numerosos septos están flanqueados por laminas del RE entre las que no se observa continuidad. Sin embargo, también observamos que la distribución del RE puede ser entre los compartimentos aledaños a los septos, sugiriendo

que puede existir gran continuidad en las membranas del RE a lo largo del micelio (Figura 9 y Figura 16).

Por su parte, el análisis comparativo del RE en las cepas silvestre y la *Δrtn1*, demostró que no se afecta su distribución en forma de red, su dinámica o incluso el grosor y la densidad de la intensidad de fluorescencia (ER-GFP) (Figura 13). Esto concuerda con datos que anteriormente demostraron que la ausencia de la proteína RTN1 no afecta ni el crecimiento, ni la pigmentación, ni el envejecimiento de *P. anserina* (López Fuentes, 2016); y sugiere que hay una participación de otras proteínas estructurales como DP1/YOP1, las atlastinas o *lunapark* (Shibata *et al.*, 2009), para evitar que la alteración en la estructura del RE afecte funciones esenciales en hifas de fase somática. Esto también coincide con la investigación sobre *S. cerevisiae* donde se ha reportado que el arreglo del RE no presenta defectos en su estructura en las mutantes de delección sencillas *Δrtn1*, o dobles *Δrtn1Δyop1* y *Δrtn2Δyop1* dada la redundancia funcional entre las tres proteínas (Voeltz *et al.*, 2006).

Por otra parte, el análisis de la distribución de RTN1-GFP reveló que su distribución tiene un arreglo reticular y que además existe una disposición polarizada de RTN1-GFP en la que ella se acumula en la punta de las hifas, lo cual se demostró con los perfiles de intensidad generados (Figura 10). Es de llamar la atención esta localización apical, ya que podría indicar que RTN1 participa en el proceso de secreción de proteínas de *P. anserina*. Consistente con esta observación, otros estudios proponen que existen proteínas de reticulón que interactúan con los componentes del exocisto y podrían intervenir en la secreción de vesículas (De Crane *et al.*, 2006). En *P. anserina* esta participación podría ser particularmente relevante durante la secreción polarizada, evento que es clave para el crecimiento hifal del hongo.

En los hongos filamentosos existe una estructura que funciona como un centro organizador de vesículas o *Spitzenkörper*; la cual dirige el

crecimiento de las hifas de fase somática a partir de la organización de la vía de secreción (Riquelme, 2013). Esta estructura está conformada por diversas capas de macro y microvesículas, las cuales contienen a las diferentes enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular, mismas que se desplazan a lo largo del citoesqueleto de actina (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989; Riquelme y Sánchez, 2014). Evaluamos y buscamos saber por primera vez si existía colocalización entre la proteína RTN1-GFP y el *Spitzenkörper*; y encontramos que, en efecto, ocurre una colocalización entre ambas señales (Figura 11). Resulta interesante que la señal RTN1-GFP desaparece del *Spitzenkörper* pero no de la zona apical, cuando la hifa deja de moverse (Figura 12). Esto último se relaciona a la disociación que sufre el *Spitzenkörper* cuando ya no se requiere.

De manera paralela, también demostramos que la proteína RTN1-GFP se distribuye de manera cercana a la envoltura nuclear de los núcleos que se distribuyen al interior de las hifas (Figura 14). Estas zonas de convergencia podrían indicar que RTN1 es una proteína que se asocia a dominios específicos de la envoltura nuclear. De hecho, se ha descrito que las proteínas de reticulón también favorecen el anclaje y formación del complejo del poro nuclear (Dawson, *et al.*, 2009; Goyal y Blackstone, 2013). Igualmente, si bien nuestras dos construcciones para etiquetar a Sec63 presentaron mutaciones, encontramos una colocalización de SEC63 con RTN1 dentro de la estructura de red (Figura suplementaria 5); sin embargo, únicamente RTN1-GFP se acumuló en el *Spitzenkörper* (Figura suplementaria 6). Tampoco observamos que ER-GFP, una proteína de la matriz del RE, se localizase en el *Spitzenkörper*, lo cual es importante porque señala que únicamente la proteína RTN1 se localiza en la punta de las hifas.

Dinámica y arreglo del RE durante la formación de esporas sexuales de *P. anserina*

Con respecto a la proteína RTN1, también conocemos que el gen correspondiente se expresa durante la fase de desarrollo sexual (López Fuentes, 2016). Esto lo corroboramos al ver que la proteína RTN1-GFP está

presente durante las distintas fases de desarrollo sexual (Figura 18 a Figura 24). De hecho, demostramos que RTN1-GFP se organiza diferencialmente en algunas etapas. Al iniciar la meiosis, durante la primera profase, se observa un arreglo para RTN1 en forma de red. Esta distribución se caracteriza por mostrar una distribución uniforme del arreglo de red a lo largo del asca y mostrar una acumulación en la zona apical que se mantiene en profases tempranas, medias y tardías (Figura 20).

Durante la división cromosomal de la meiosis y la mitosis post-meiótica RTN1 se concentra en la parte media del asca (Figura 21 y Figura 22); finalmente en la formación de las esporas y a lo largo de su diferenciación se aprecia una reorganización de la estructura de red de RTN1; la cual también muestra una acumulación apical al interior de cada ascospora (Figura 23 y Figura 24). Esto muestra que RTN1, que está involucrada en estructurar al RE, presenta una alta dinámica durante la fase sexual de *P. anserina*.

La señal apical asociada a RTN1-GFP en las ascosporas podría estar relacionada con su morfogénesis, la cual es orquestada por los cuerpos polares del huso acromático que actúan como centros de reclutamiento de vesículas que ensamblan la membrana de las esporas durante su formación (Nakase *et al.*, 2008; Neiman, 2011). De igual forma, como se demostró para las hifas vegetativas, la acumulación apical de RTN1-GFP podría estar asociada al centro organizador de vesículas o *Spitzenkörper*, ya que las ascas también crecen de manera polarizada y con una orientación adecuada para desarrollarse.

Desafortunadamente, a pesar de analizar numerosas cepas independientes en las que se integró ectópicamente la construcción para expresar a ER-GFP, en ninguna de ellas fue posible analizar claramente el desarrollo sexual, por lo que no fue posible esclarecer la estructura que adopta el RE durante el desarrollo (Figura suplementaria 8).

Participación de otras proteínas estructurales de RE en la formación de esporas sexuales

Trabajos previos en *P. anserina* encaminados a evaluar la función de las proteínas estructurales de RE pertenecientes a la familia Yop1/DP1 habían demostrado que YOP1 no se requiere para el desarrollo somático y sexual del hongo, mientras que YOP2, participa en la producción de melanina bajo estrés por frío. No obstante, la eliminación de ninguna de las dos proteínas afectó la distribución nuclear en las ascosporas (Nachón Garduño, 2016).

Por lo tanto, para evaluar una posible redundancia en la función de las proteínas estructurales del RE en la formación de las esporas, evaluamos las interacciones genéticas entre las distintas mutaciones de los genes codificantes para las proteínas de la familia de los reticulones y Yop1/DP1. Sin embargo, no existe un deterioro acumulativo en la formación de ascas anormales entre cepas de delección sencillas $\Delta rtn1$; dobles $\Delta rtn1\Delta yop1$ o $\Delta rtn1\Delta yop2$; o triples $\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$ (Figura 31). En todas ellas, el porcentaje de anormalidad de ascosporas oscila entre 20-25%, lo cual encaja en el porcentaje de anormalidad de la cepa de delección sencilla $\Delta rtn1$. Esto también podría tener relación con datos de *S. cerevisiae*, que reportan que únicamente el crecimiento de la mutante $\Delta rtn1$ se ve afectado por la ausencia de otra proteína estructural de RE de la familia *lunapark* ($\Delta lnp1$). Recalco que este fenómeno también se presenta en las mutantes triples $\Delta lnp1\Delta rtn1\Delta yop1$ o cuádruples $\Delta lnp1\Delta rtn1\Delta rtn2\Delta yop1$ (Chen, et al., 2012).

Disposición del huso acromático en esporas $\Delta rtn1$ de *P. anserina*

Finalmente, en la cepa desprovista del gen codificante para la proteína RTN1, observamos alteraciones de los planos de división del material genético durante el desarrollo meiótico. Durante el desarrollo de una cepa silvestre la disposición de los husos acromáticos es vertical durante la meiosis I y meiosis II; pero horizontal durante la mitosis post-meiótica (Figura 32). Sin embargo, en la cepa $\Delta rtn1$ se lograron observar varios ejemplos en que en la meiosis I la disposición del huso acromático fue anormal (Figura 35).

En algunas meiosis II, se observó que no todo el material genético estaba asociado a un huso acromático; o que mientras uno de los husos presentaba la disposición vertical, el otro adoptaba una disposición horizontal (Figura 36). Estos contextos también se repitieron en la mitosis post-meiótica; donde además encontramos husos que, en lugar de ser completamente horizontales, presentaban una forma de gancho (Figura 37). Estos escenarios podrían explicar por qué finalmente, el proceso culmina con la formación de esporas anormales que presentan mayor o menor número de núcleos (Figura 26); y de las cuales, ahora sabemos que la categoría que más se representa son ascas anormales de tres esporas sexuales (Figura 27); mismas que resultan ser uninucleadas (Figura 28) y que comprometen su proceso de germinación (Figura 29).

De manera interesante, estudios recientes en las cepas de *P. anserina*, que son carentes de la proteína de fisión mitocondrial y peroxisomal FIS1, mostraron que el porcentaje de anormalidad de las ascas aumenta hasta más de 40% y que presentan una disposición anormal del huso acromático (Takano Rojas, 2018). Asimismo, algunos defectos en la biogénesis peroxisomal, específicamente de mutantes carentes de PEX5 y PEX7, generan un fenotipo semejante al de las cepas carentes de RTN1 (Bonnet *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que defectos en la biogénesis peroxisomal perjudican la abundancia y el arreglo del RE (Dirkx *et al.*, 2005); por lo que sería interesante estudiar si estos fenómenos están relacionados.

De manera independiente, también hemos comenzado a estudiar el efecto que se generaría si sobreexpresamos el factor de ensamblaje de los cuerpos polares del huso acromático y de los poros nucleares nombrado como Ndc1p, del cual se conoce su interacción con Rtn1p y con Yop1p de *S. cerevisiae* (Casey *et al.*, 2012; Dawson, *et al.*, 2009). Pensamos que al sobreexpresar este factor el fenotipo de ascas anormales podría recuperarse; sin embargo, los datos de las dos cepas $\Delta rtn1$ que cuentan con la integración del plásmido pNDC1 mostraron un porcentaje de anormalidad que oscila

entre el 14-20% (Figura suplementaria 11). Sin embargo, aún se desconoce si la construcción efectivamente está sobreexpresando a NDC1 y tampoco se conoce el efecto que ocasionaría la sobreexpresión de la proteína NDC1 en una cepa silvestre. También se desconoce la disposición que adoptan los husos acromáticos durante la formación de sus esporas sexuales. Igualmente, no conocemos la localización dentro del genoma de *P. anserina* en donde se insertó el plásmido pNDC1 y mismo que podría estar interfiriendo con algún otro factor. Además, para interpretar correctamente los datos de NDC1, aún se debe generar un mayor número de mutantes y verificarlas.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se caracterizó la distribución y el arreglo del RE durante la fase somática del hongo filamentoso *P. anserina*, así como de una de las proteínas potencialmente involucradas en su regulación.

Se detectó por primera vez, que el RE se distribuye y presenta un movimiento continuo por todo el espacio interno de las hifas vegetativas y se demostró que RTN1 forma parte de la red de RE.

Se determinó que la ausencia de la proteína RTN1, perteneciente a la familia de los reticulones, no genera un cambio notable en el arreglo que adopta el RE al interior de las hifas vegetativas. Asimismo, se mostró por primera vez que RTN1-GFP se acumula en la zona apical y se asocia con el *Spitzenkörper* en la dirección que adquieren las hifas.

Por otra parte, se verificó que el RE se encuentra presente durante la formación de las esporas sexuales en *P. anserina*; demostrándose de manera concreta que la proteína RTN1-GFP cambia su distribución durante las distintas etapas por las que transcurre el desarrollo sexual. Del mismo modo que en la fase vegetativa; para algunas etapas como meiosis I, meiosis II,

mitosis post-meiótica o formación de esporas, también se manifestó una distribución apical de RTN1-GFP.

Esta investigación también confirmó que la ausencia de la proteína RTN1 afecta la formación de ascosporas. Lo anterior, está relacionado con la correcta distribución del material genético e interfiere con la germinación de las esporas. Asimismo, se muestra evidencia de que la ausencia de esta proteína ocasiona que la disposición de los husos acromáticos durante la meiosis I, meiosis II o mitosis post-meiótica sea de forma irregular.

Finalmente, se determinó que la ausencia de otras proteínas estructurales de RE –YOP1 o YOP2- no afecta la formación de las esporas incluso tras la ausencia simultánea de la proteína RTN1.

X. PERSPECTIVAS

Nuestra investigación aún no aborda un análisis comparativo entre el arreglo del RE y su interacción con otros organelos como las mitocondrias, los peroxisomas o los endosomas. Este aspecto podría aportar información interesante sobre la organización celular. Asimismo, todavía falta caracterizar a las proteínas estructurales de RE pertenecientes a la familia de las atlastinas y las *lunapark*, lo que permitiría entender mucho más la dinámica e importancia del RE en el hongo filamentoso *P. anserina*. También se plantea abordar un análisis exhaustivo sobre la distribución de los SPB, para lo cual se propone etiquetar a la proteína NUD1 y así entender mucho mejor el proceso de la meiosis en el cual RTN1 está implicado. Si se requiere obtener más y mejor información de la localización de la proteína SEC63, se debe realizar nuevamente su marcaje con proteínas fluorescentes. Finalmente, también se propone demostrar si la sobreexpresión del factor de ensamblaje NDC1 logra restaurar el fenotipo observado en las cepas carentes de la proteína RTN1.

XI. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Generación de las construcciones para etiquetar a SEC63 con mCHERRY o GFP

Primero, se llevó a cabo la amplificación de los extremos flanqueantes al codón de paro del gen *SEC63*. Para amplificar el extremo 5' de 633 pb se utilizaron los oligonucleótidos *sec63-orf-f* (*forward*) y *lkt-sec63-R* (*reverse*); para el extremo 3' de 661 pb se utilizaron los oligonucleótidos *hph-sec63-f* (*forward*) y *sec63-3r* (*reverse*). En ambos casos se utilizó de templado el DNA genómico de una cepa silvestre de *P. anserina* y la DNA polimerasa *Primer Star* (TAKARA) con el programa de amplificación rápida de 30 ciclos con los siguientes pasos: 98°C por 10 segundos para desnaturalizar, 60 °C por 15 segundos para alinear, 68°C por 50 segundos para polimerizar y, almacenados finalmente a 4°C.

Asimismo, se llevó a cabo la amplificación de la secuencia bisagra, el gen codificante para la fluorescencia (GFP o mCHERRY) y el gen *HPH* codificante para la resistencia a higromicina (C') de 2.6 kb, en la que se utilizaron los oligonucleótidos *sec63-lkt-f* (*forward*) y *sec63-hph-r* (*reverse*). En esta reacción se usó como templado el DNA del plásmido pUC-Hygro-mCHERRY o pUC-Hygro-GFP respectivamente y se volvió a utilizar el mismo programa para la DNA polimerasa *Primer Star*.

Al finalizar cada PCR los productos fueron purificados con el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band purification* de la marca *GE-Healthcare*, con los cuales se realizó el PCR de fusión y se generó la construcción de 3.9 kb, donde se utilizaron los oligonucleótidos *sec63-orf-f* (*forward*) y *sec63-3r* (*reverse*). En esta reacción se usaron como templados los PCR purificados 5', 3' y C' en una relación molar 1:1:3 respectivamente y la DNA polimerasa *Dream-Taq*, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 94°C por 3 minutos. Paso dos, 30 ciclos con los siguientes pasos: 94°C por 30 segundos para desnaturalizar, 60°C por 30 segundos para alinear, 68°C por 4.5 minutos para polimerizar. Paso tres, una extensión final de 5 minutos a 68°C.

El producto final del PCR de fusión fue purificado con el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band purification* de la marca *GE-Healthcare* y fue usado para transformar a una cepa $\Delta ku70$ (Figura suplementaria 1).

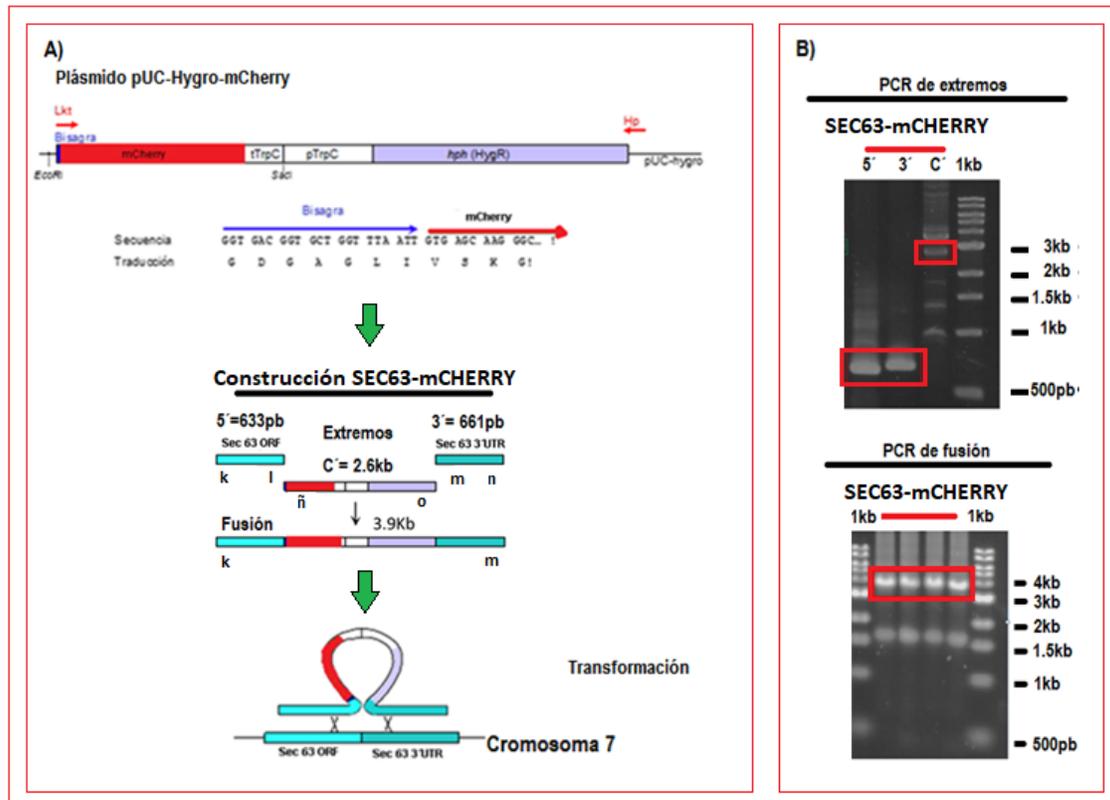


Figura suplementaria 1. Construcción del casete para etiquetar al gen *SEC63* con *GFP* o *mCherry* en su sitio cromosomal. A) Diagrama del plásmido pUC-Hygro-mCherry con el cual se recuperó el gen codificante para mCherry y el gen hph codificante para el marcador de resistencia a higromicina. Se muestra la bisagra de unión a la región adyacente para SEC63, así como la construcción diseñada para la fusión SEC63-mCherry y su transformación por recombinación homóloga. B) Se muestran los fragmentos generados para la construcción SEC63-mCherry con el extremo 5' de 633 pb, el 3' de 661 pb y el C' de 2.6 kb. Asimismo, se muestra el PCR de fusión de 3.9 kb. 1 kb = marcador de peso molecular; las letras k-o indican los oligonucleótidos utilizados para cada PCR (Apéndice 1).

De esta transformación, se seleccionaron cepas primarias resistentes a higromicina, las cuales fueron verificadas por PCR. Adicionalmente esta revisión también se llevó a cabo con las cepas purificadas SEC63-mCherry y SEC63-GFP (*MAT+* y *MAT-*) obtenidas mediante cruces heterocigas con la cepa silvestre.

Confirmación por PCR de las cepas con construcción endógena SEC63^{A541T}-GFP y SEC63^{F546L}-mCHERRY

Las reacciones de PCR de revisión se hicieron en un volumen total de 25 µL donde se utilizaron los oligonucleótidos sec63-orf-fa (*forward*) y sec63-3rc (*reverse*). La longitud esperada de la amplificación son 1.4 kb en cepas sin la integración del casete y de 3.9 kb en cepas con integración de la construcción. En esta reacción se usa como templado de manera independiente DNA genómico de *P. anserina* de las cepas Wt+, Wt-, la transformante primaria y las transformantes purificadas. En este caso se usó la DNA polimerasa *Acu-taq*, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 94°C por 3 minutos. Paso dos, 25 ciclos de la siguiente manera: 94°C por 30 segundos para desnaturalizar, 60°C por 30 segundos para alinear, 68°C por 4.5 minutos para polimerizar. Paso tres, una extensión final de 5 minutos a 68°C.

De igual forma y con el mismo programa de PCR, se realizó la revisión de integración de la construcción, que amplifican el extremo 5' de 2243 pb, se utilizaron los oligonucleótidos sec63-orf-fa (*forward*) y hph-rc (*reverse*); para el extremo 3' de 759 pb se utilizaron los oligonucleótidos hph-fc (*forward*) y sec63-3rc (*reverse*)(Figura suplementaria 2).

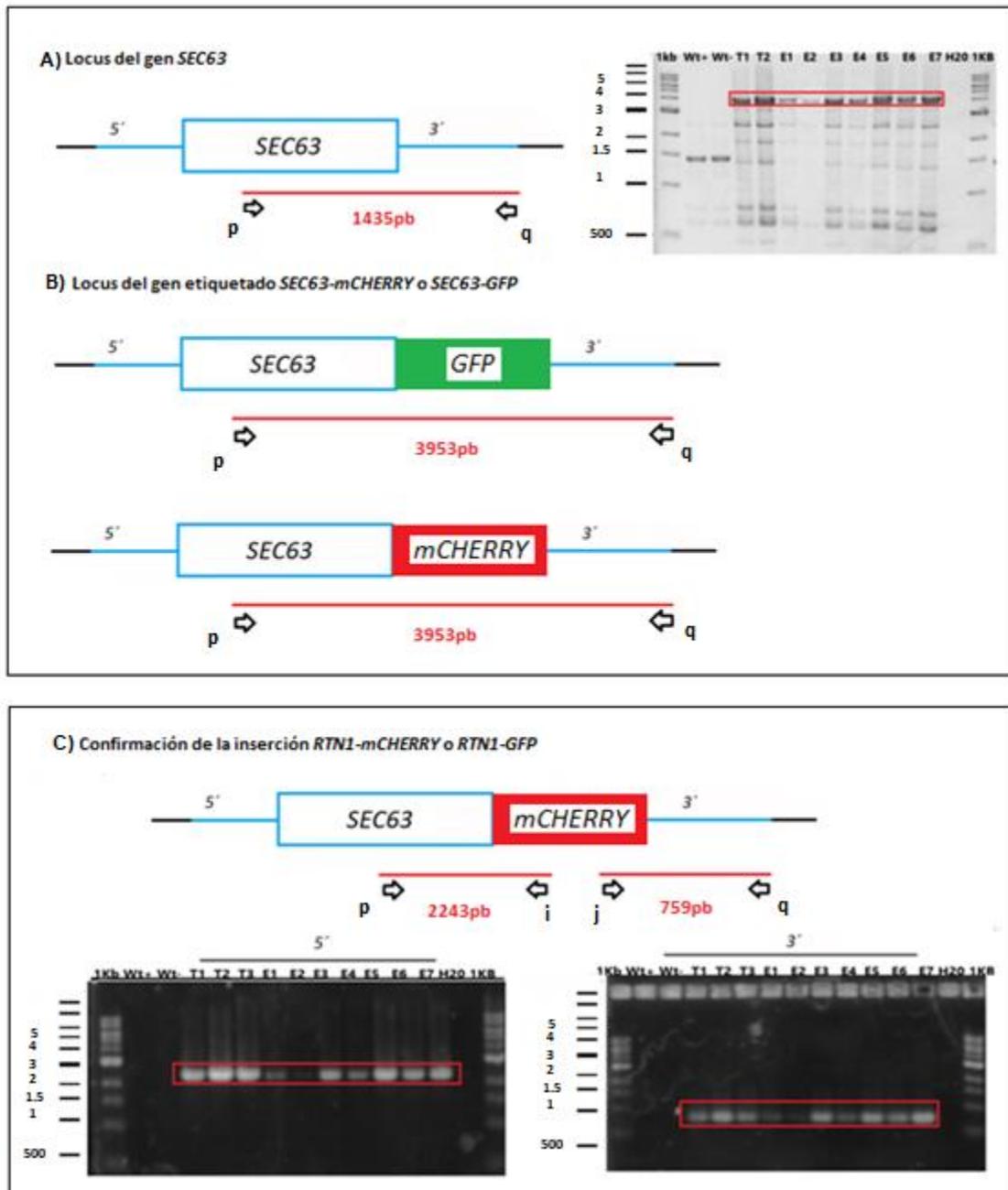
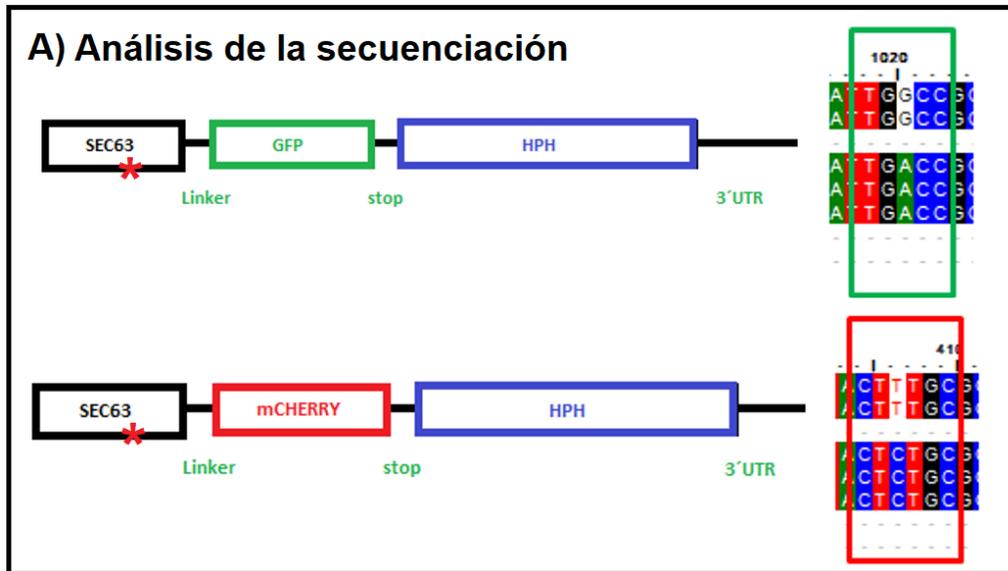


Figura suplementaria 2. Verificación por PCR en las cepas que expresan *SEC63-mCHERRY* o *SEC63-GFP*. Arriba (A), locus *SEC63* silvestre; en (B) locus *SEC63* etiquetado con *mCHERRY* o *GFP*; a su derecha, gel de electroforesis que muestra la amplificación por PCR del locus *SEC63* en una cepa silvestre (Wt, fragmento esperado 1435 pb), mutantes primarias (T1 y T2) y las cepas purificadas *SEC63-mCHERRY* (E1-E2) o *SEC63-GFP* (E3-E7) (3953 pb). Abajo (C), locus *SEC63* etiquetado mostrando el tamaño de los productos de PCR 5' y 3' para su verificación (2243 pb y 759 pb respectivamente); abajo se muestra el gel de electroforesis para cada una de las regiones, se observa su comparación entre las cepas silvestres de ambos tipos sexuales, las transformantes primarias (T1, T2 y T3) y las cepas purificadas *SEC63-mCHERRY* (E1-E3) o *SEC63-GFP* (E4-E7)). 1 kb= Marcador de peso molecular; H₂O, control negativo usando agua como templado; se encerró en

un recuadro las bandas esperadas. Las letras i-j y p-q indican los oligonucleótidos utilizados en cada uno de los PCR (Apéndice 1).

Datos de la secuenciación del gen *SEC63*

Los resultados de la secuenciación vislumbraron una mutación puntual. El análisis de los resultados obtenidos determinó que ambas mutaciones se encuentran dentro del ORF del gen *SEC63* y no en la secuencia codificante para las proteínas fluorescentes GFP o mCHERRY, ni tampoco en la bisagra que los une. Asimismo, se determinó que el marco de lectura de *SEC63* está en fase con toda la construcción. Particularmente para la construcción *SEC63*-GFP se determinó que ocurrió una transición de guanina en adenina, lo que genera un cambio en la secuencia de residuos de aminoácidos en la posición 541 que convierte una alanina en una treonina. Del mismo modo, para la construcción *SEC63*-mCHERRY se determinó que ocurrió una transición de timina a citosina, lo que generó un cambio en la secuencia de residuos de aminoácidos en la posición 546 de una fenilalanina a una leucina. Este análisis también demostró que ninguna de las mutaciones se encuentra dentro de las hélices transmembranales de la proteína (Figura suplementaria 3).



B) Características de la proteína SEC63

Hélices transmembranas: #rojos
 Motivos: GXXXG
 Triptófanos y tirosinas: W, Y
 Prolinas conservadas: P

1-11: MSTDYAYDEEG
 12-34: YLWPFVFTLTLIITLPLTYILV
 35-72: KRSRDPAAASFPRIRTSFKHKHTDVVDSLRKKEKRKRKL
 73-93: LWLIIVAVGWVVMGYMLVLI
 94-202:
 QNTETPTQKLWNPYDILGISESATEKQIKSAYRKLKLFHPDKIKPDASKNETMDDLNARYVEITKAHQALTD
 EEVRNNYIQYGNPDGKQGYGINIALPKAIVSDGNGK
 203-225: YVLLYSALFGILLPLVGSWWY
 226-710:
 GTLRRSKEGVLMEANRFLFREYKDNIDEGGVIGALSTGQEQYDELFRGDKADSGLSKVESRILAEGELSPLAGG
 LSVKDKLELEDLESGPQRKALALLWAYLGRVELDDPILEKAKFAVAPIAEALNKSFATAISLAYMNTAPLLSSYYA
 SQLLIQALPKPSSPLLQLPHFTPATVKAVDGDGSKVHTNVQDFMDRDPADARRSLVVGKLLTDEQYREAVSV
 AKQLPFFRVAKAYFKVTGEKELPSSLVTLVVKGRFVPPGSENVPEIPLDEDIDPAEDDLDAILGRKAKKQIG
 KDEKGRPIYEETPDEPISAPILASPYFA RDHSPRWHVFLTDSKQGRVAVPPFTFAQDFKPIFEADGKTPTFA
 MQLTKAQFQAPPQAGHYTFVMHVVCDSYVGLDTKMEVTLIVEEASKAAEMEQQVVEISEPEEDSLAGIM
 HAAKGGAPPKPKKKVVKESDEEDSDEESGTDDEESDDTSDTNTDTEEDN*

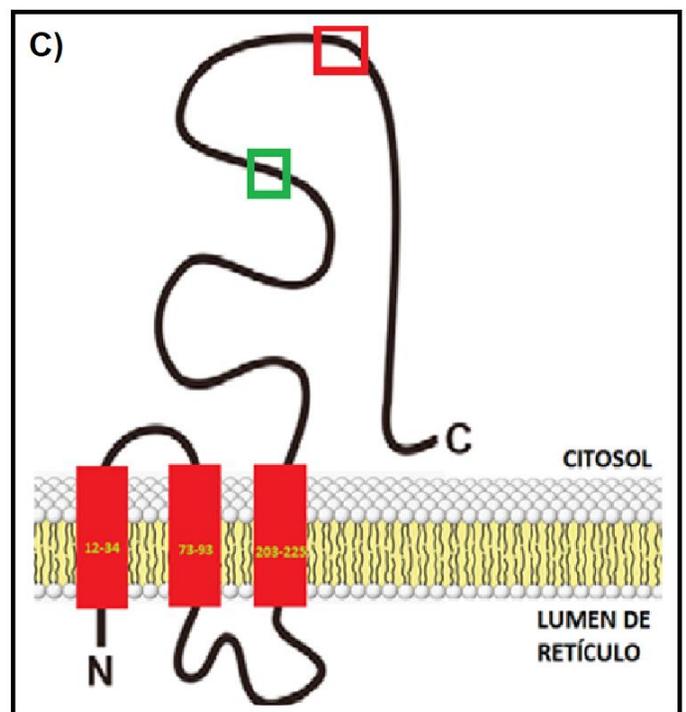


Figura suplementaria 3. Análisis de la secuenciación de las cepas con integración endógena SEC63-GFP y SEC63-mCHERRY. A) Se muestran las construcciones que se integraron en cada cepa y las cuales se componen por parte de la secuencia del gen codificante para SEC63, el linker (bisagra), el gen codificante para GFP o mCHERRY, su codón de stop y el gen que codifica para el marcador de resistencia a higromicina. En cada caso se indica con un asterisco rojo (*) la mutación encontrada en la secuenciación y a su derecha se muestra la transición de base nitrogenada correspondiente. B) Características de la proteína SEC63, se enlistan las hélices transmembrana, los motivos GXXXG, los triptófanos o tirosinas en las hélices transmembrana y las prolinas conservadas. El recuadro verde indica la mutación SEC63-GFP (A->T) y el recuadro rojo la mutación SEC63-mCHERRY (F->L). C) Diagrama de la proteína SEC63: se observa el grupo amino al interior del lumen

del RE, las tres hélices transmembranales entre la posición de residuos de aminoácidos 12-34; 73-93; y 203-225. El carboxilo terminal se encuentra hacia el citosol y además se observa que el cambio en los residuos de aminoácidos para SEC63-GFP ocurrió en la posición 541 (recuadro verde) y para SEC63-mCHERRY ocurrió en la posición 546 (recuadro rojo).

No obstante, destaco que aún se desconocen las implicaciones a las que están sujetas dichas mutaciones, las cuales podrían generar modificaciones postraduccionales que interfirieran con el papel de la proteína SEC63 o la proteína fluorescente a la que se fusionaron. De hecho, esto podría explicar por qué la construcción SEC63^{F546L}-mCHERRY emitiera una fluorescencia menor a la construcción SEC63^{A541T}-GFP; o por qué ninguna de las construcciones sirvió para esclarecer el arreglo que adopta el RE durante la fase de desarrollo sexual. De tal suerte que, para futuras investigaciones se deben generar de nuevo las construcciones en la proteína SEC63 y de ser el caso contrastarlas con los datos expuestos en la presente tesis.

[La localización de SEC63^{A541T}-GFP, y de SEC63^{F546L}-mCHERRY en experimentos de doble marcaje con RTN1-GFP](#)

De manera paralela mientras esperábamos los resultados de la secuenciación, fueron evaluadas 13 hifas de la construcción endógena SEC63^{A541T}-GFP en las cuales es posible apreciar un arreglo del RE que se distribuye a lo largo de toda la hifa vegetativa en forma de red y que también presenta un movimiento rápido y continuo (Figura suplementaria 4).

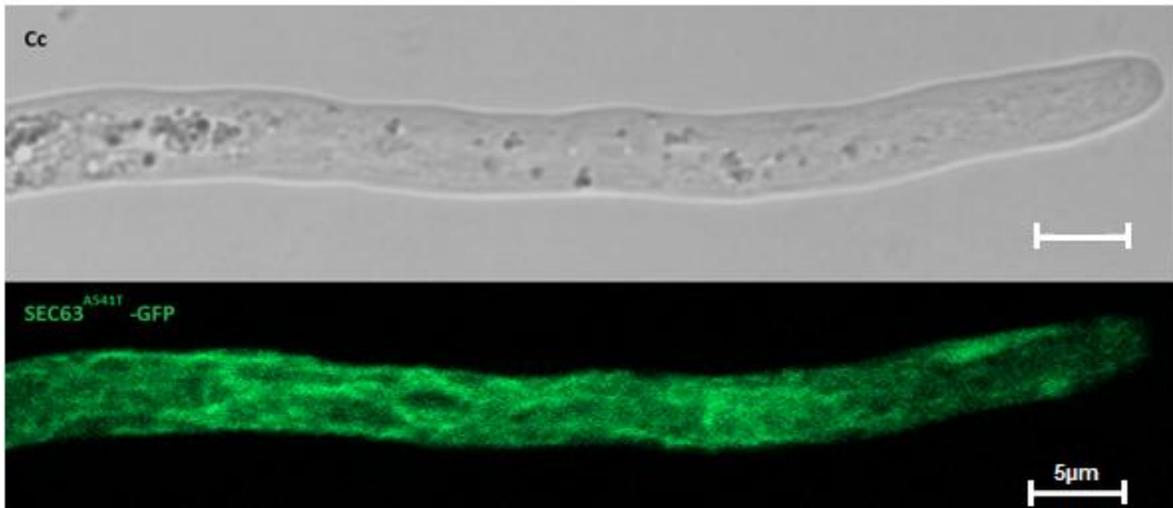


Figura suplementaria 4. Fenotipo observado en la cepa modificada SEC63^{A541T}-GFP durante la fase vegetativa. El arreglo del retículo endoplásmico se distribuye a lo largo de toda la hifa en forma de red. Se muestra el campo claro (Cc) y la señal SEC63-GFP. La barra blanca indica la escala (5 μm).

Asimismo, por medio de cruza sexuales se obtuvo una cepa que expresa la construcción RTN1-GFP y SEC63-mCHERRY. Con la cual se evaluaron 18 hifas en las que fue posible observar la presencia de colocalización, sugiriendo que la distribución reticular de RTN1 se localiza en el RE (Figura suplementaria 5).

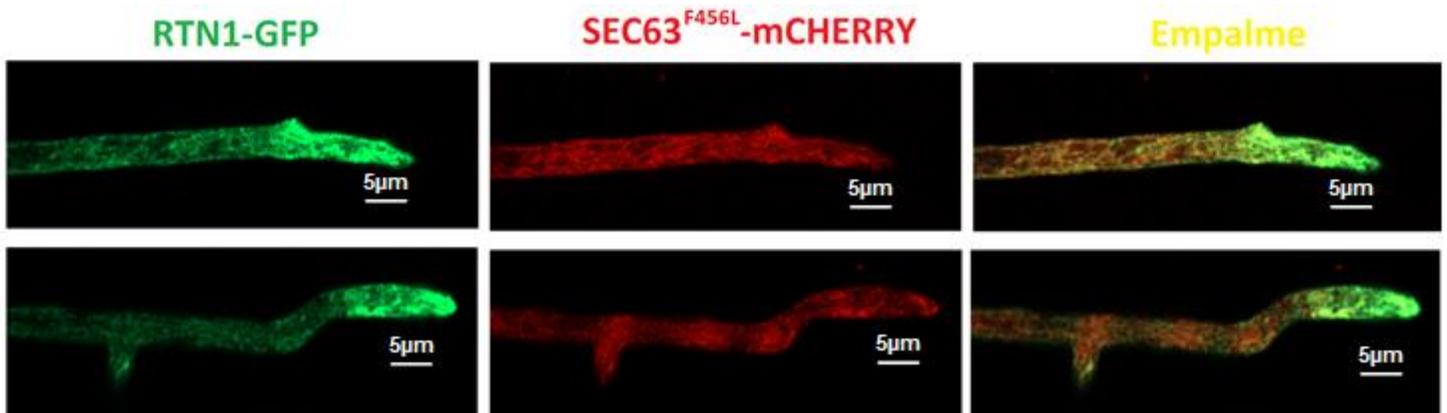


Figura suplementaria 5. Análisis por microscopía confocal de la cepa doble RTN1-GFP SEC63^{F456L}-mCHERRY. Se observa el arreglo del RE para dos diferentes hifas durante la fase vegetativa, con la presencia de RTN1-GFP (verde) y SEC63-mCHERRY (rojo), así como su colocalización (empalme). La barra blanca indica la escala (5 μm).

Localización apical de RTN1 en hifas vegetativas de la cepa RTN1-GFP SEC63^{F546L}-mCHERRY

Los transectos para la cepa RTN1-GFP SEC63^{F546L}-mCHERRY, muestran que RTN1-GFP se acumula en la zona apical; mientras que la señal SEC63^{F546L}-mCHERRY se distribuye de manera uniforme a lo largo de la hifa (Figura suplementaria 6).

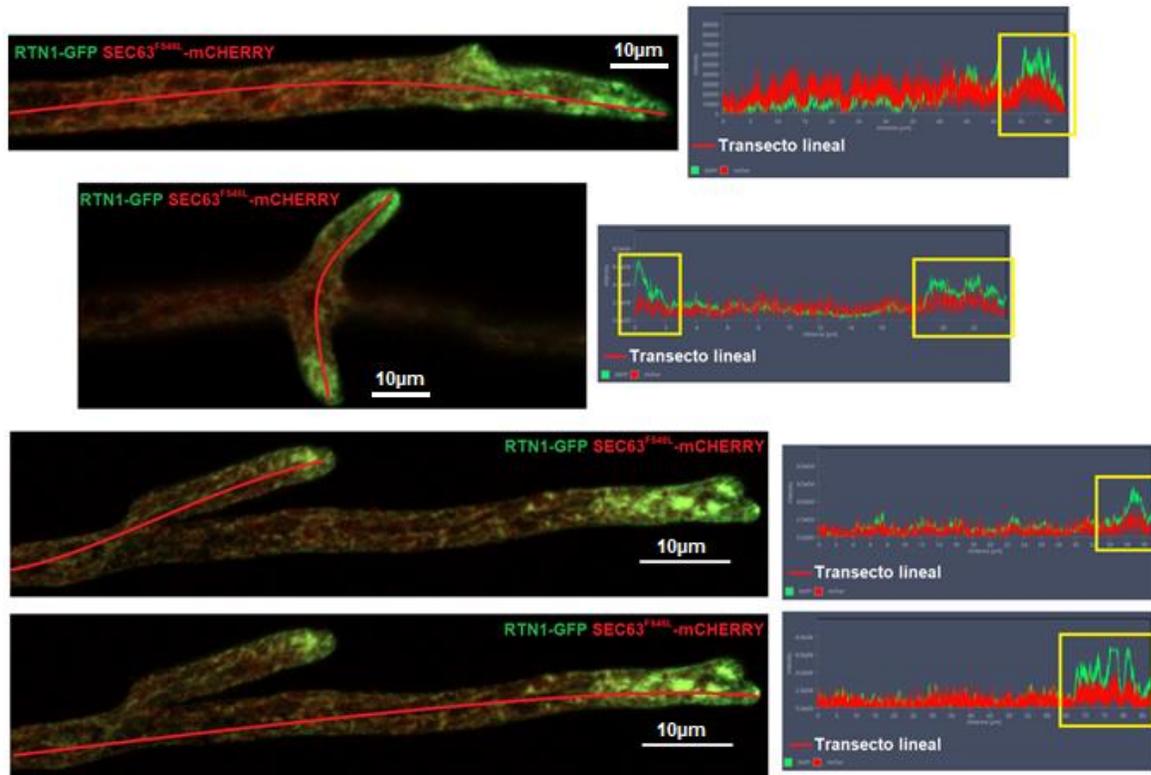


Figura suplementaria 6. Perfil de intensidad de fluorescencia en la cepa RTN1-GFP SEC63^{F546L}-mCHERRY. Se muestran tres hifas diferentes en las cuales se nota el aumento de RTN1-GFP en las puntas de las hifas (recuadro amarillo). Asimismo, se observa que la señal SEC63^{F546L}-mCHERRY se distribuye a lo largo de toda la hifa. En estas imágenes se midió los primeros ~90µm de la punta a la parte distal de la hifa. Tanto la hifa dos como la hifa tres presentan bifurcaciones en las cuales se midió el perfil para cada punta. La barra blanca indica la escala (10 µm).

Al mismo tiempo que se cuantificó la fluorescencia apical de RTN1-GFP, también se usó como control a la cepa SEC63^{A541T}-GFP y la cepa $\Delta rtn1$ ER-GFP (Ec) (Figura suplementaria 7).

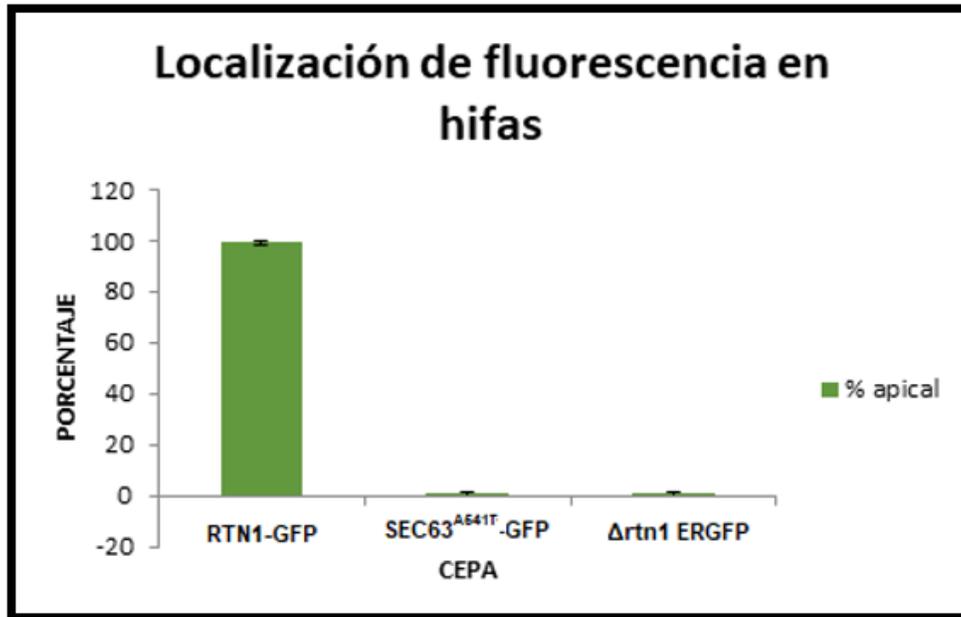


Figura suplementaria 7. Cuantificación y localización de la fluorescencia en hifas de la cepa con construcción endógena RTN1-GFP. En el eje de las abscisas se muestra la cepa RTN1-GFP y su control con la cepa SEC63^{A541T}-GFP y $\Delta rtn1$ ERGFP(Ec). Como resultado del conteo de 100 hifas, con una n=5 para cada cepa, se aprecia que el 99.25% de la localización de la fluorescencia para RTN1-GFP es apical. Se indican las barras de error.

Localización de ER-GFP y SEC63^{A541T}-GFP en la formación de esporas sexuales

Al igual que en la cepa RTN1-GFP, se analizó la localización de ER-GFP en diferentes cepas provenientes de diferentes eventos de integración de su transgen. En ellas se encontró que la fluorescencia no se expresa homogéneamente en todas las ascas y que en algunos casos se observa un fondo negro al interior de las ascas. Notablemente, en ninguna de las cepas analizadas se observó fluorescencia de ER-GFP durante el desarrollo meiótico (de la etapa dicariótica a la formación de las esporas) (Figura suplementaria 8).

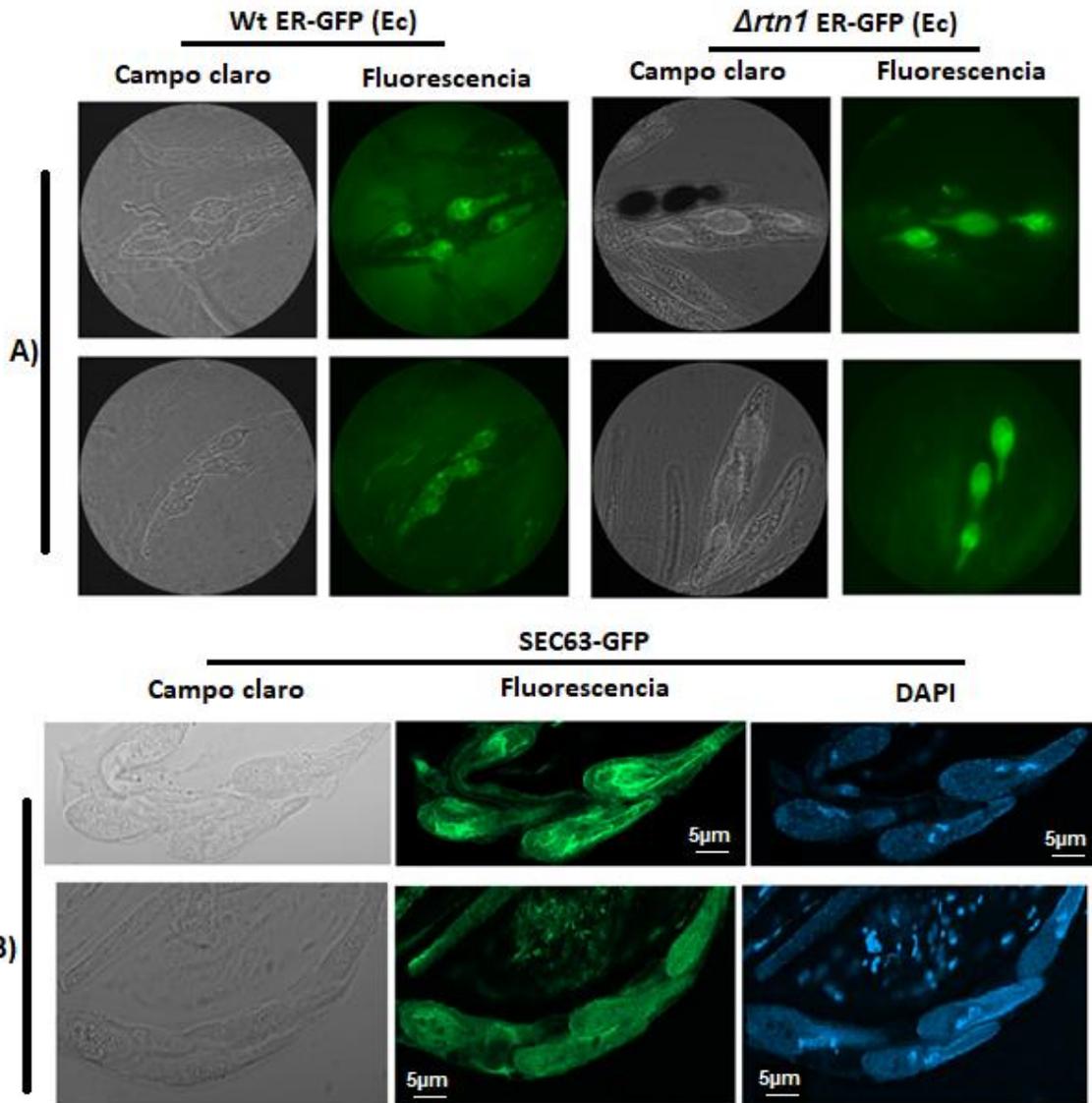
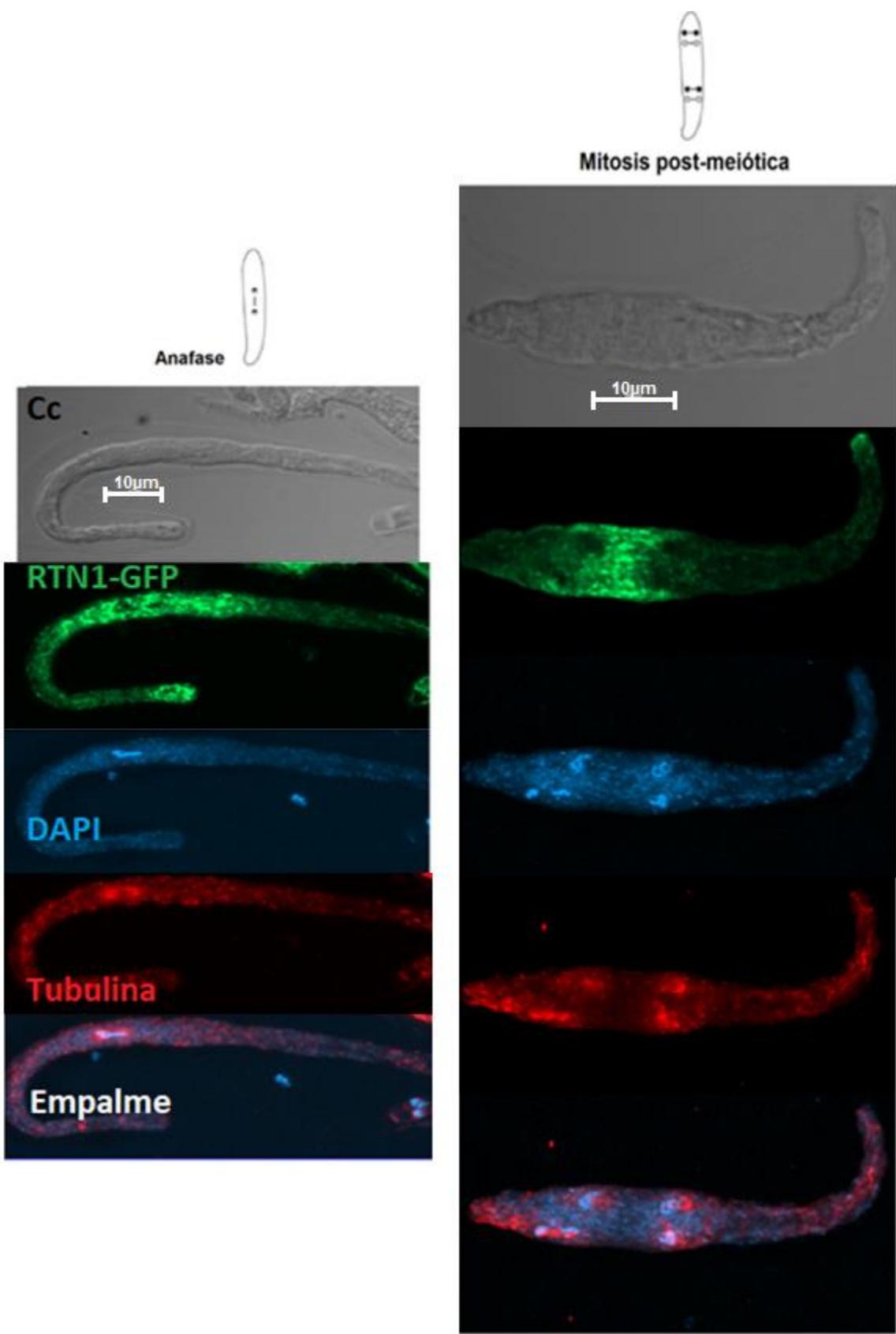


Figura suplementaria 8. Distribución del RE en esporas sexuales de las cepas ER-GFP y SEC63^{A541T}-GFP. Arriba, microscopía de epifluorescencia donde se muestra ascas normales Wt ER-GFP (Ec) y ascas anormales Δrtn1 ER-GFP (Ec). Abajo, microscopía confocal donde se muestra ascas normales SEC63^{A541T}-GFP (los núcleos fueron teñidos con DAPI). En los tres casos se recuperaron ascas con esporas de peritecios con cuatro días post-fertilización, provenientes de cruza homocigas para cada cepa. Para cada construcción, se puede apreciar la señal de fluorescencia GFP, pero no se observa un arreglo óptimo de la estructura del RE, la cual no se distribuye por todo el interior de la espora y para el caso de las cepas ectópicas no se aprecia fluorescencia en todas las ascas. La barra roja mide 5 μm.

Formación de husos acromáticos en la cepa RTN1-GFP

A pesar del número bajo de muestras citológicas RTN1-GFP en las que se formaron husos acromáticos, la mayoría de ellas muestra una distribución de husos acromáticos normales (Figura suplementaria 9).





Mitosis post-meióticas

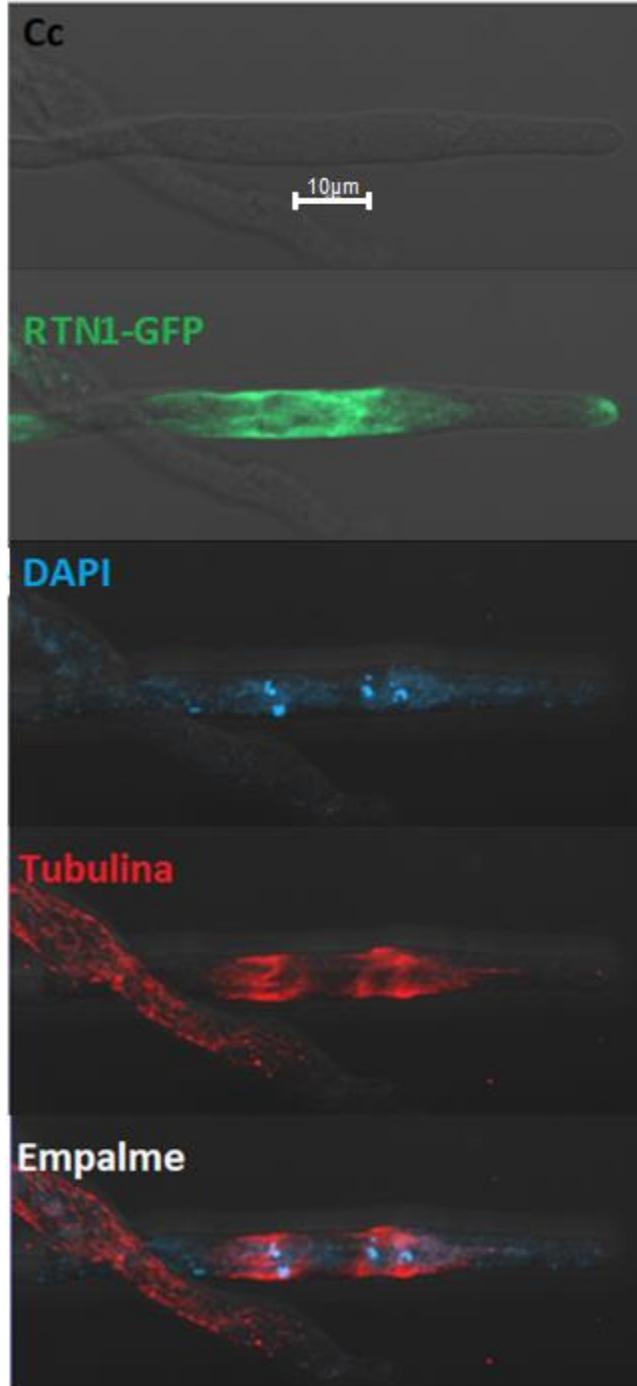


Figura suplementaria 9. Análisis por microscopía confocal de la citología de esporas RTN1-GFP. Se muestran los resultados obtenidos por microscopia confocal al analizar la citología de esporas provenientes de una cruce sexual homociga RTN1-GFP y de la que fueron recuperadas ascas con tres días post-fertilización. En ellas se puede apreciar una meiosis I y dos mitosis post-meióticas en distintas etapas. Para cada una se muestra el campo claro (Cc); la señal RTN1-GFP; la tinción de núcleos con DAPI, la tinción de husos acromáticos con tubulina en rojo y el empalme entre ambas. La barra blanca indica la escala (10 μm). Se anexan los esquemas correspondientes para cada fase. Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de series de imágenes adquiridas cada 0,34 μm a lo largo de todo el volumen de la célula (págs. 112 y 113).

Obtención y confirmación de cepas de delección doble $\Delta\text{rtn1}\Delta\text{yop1}$, $\Delta\text{rtn1}\Delta\text{yop2}$ o triple delección $\Delta\text{rtn1}\Delta\text{yop1}\Delta\text{yop2}$

Un número de cepas de delección doble $\Delta\text{rtn1}\Delta\text{yop1}$ o $\Delta\text{rtn1}\Delta\text{yop2}$ y triples $\Delta\text{rtn1}\Delta\text{yop1}\Delta\text{yop2}$ fueron elaboradas previamente en el grupo de trabajo (Nachón Garduño, 2016). Sin embargo, al verificar estas cepas encontramos discrepancias entre el genotipo adscrito y su fenotipo. Por ello, nos dimos a la tarea de verificar las cepas disponibles y generar nuevamente las cepas cuestionables. Una vez generadas estas cepas se determinó su tipo sexual y de manera independiente se verificó por PCR la presencia de las delecciones completas Δrtn1 , Δyop1 y Δyop2 .

Para realizar cada verificación se hicieron reacciones de 25 μL donde se utilizó la DNA polimerasa *Acu-taq*, con los siguientes ciclos: paso uno, desnaturalización inicial de la hebra de DNA a 94°C por 3 minutos. Paso dos, 30 ciclos de la siguiente manera: 94°C por 30 segundos para desnaturalizar, 60°C por 30 segundos para alinear, 68°C por 4.5 minutos para polimerizar. Paso tres, una extensión final de 5 minutos a 68°C.

Los oligonucleótidos utilizados para revisar la delección Δrtn1 son *rtn1-5ch (forward)* y *rtn1-3ch (reverse)*; el tamaño del fragmento silvestre es 2.4 kb y con delección de 4.4 kb; para Δyop1 se usó a *yop1-5ch (forward)* y *yop1-3ch (reverse)* generando fragmentos silvestres de 2.1 kb y con delección de 2.8 kb; para Δyop2 se usó el *yop2-5ch (forward)* y *yop2-3ch (reverse)* generando fragmentos silvestres de 2.6 kb y con delección de 4.2 kb (Figura suplementaria 10). Posteriormente el porcentaje de esporas anormales presentes fue evaluado por cruces sexuales homocigas entre cada una.

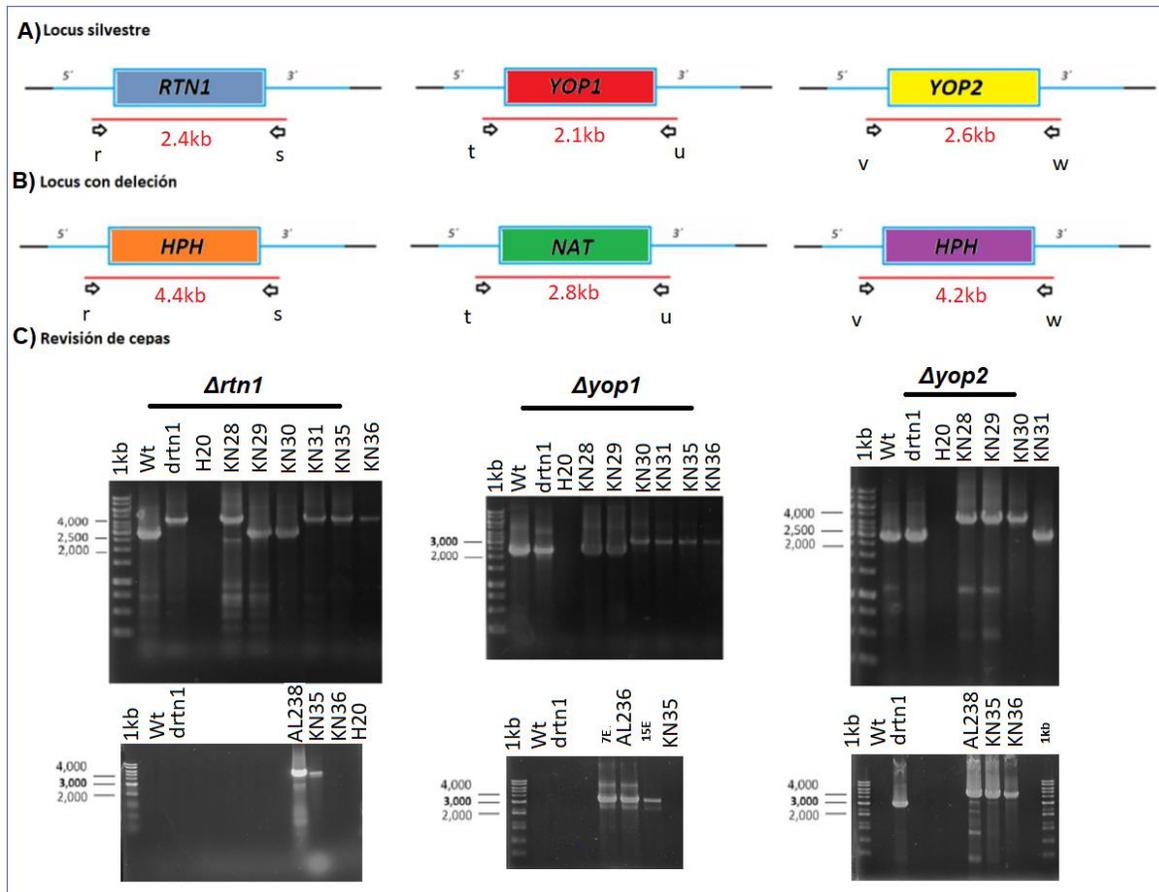


Figura suplementaria 10. Verificación por PCR de la ausencia *Artn1*, *Δyop1* y *Δyop2* en las cepas purificadas con deleciones dobles y triples. Arriba en A), se muestran los diagramas del locus esperado en presencia de RTN1 (2400 pb), YOP1 (2300 pb) o YOP2 (2600 pb). En medio en B), se muestra el diagrama esperado del locus con deleción *Δrtn1* (4400 pb), *Δyop1* (2800 pb) y *Δyop2* (4200 pb) tras el reemplazo de la fase codificante del gen por su respectivo marcador de resistencia. Abajo en C), se muestran cada uno de los resultados obtenidos en un gel de electroforesis donde fueron comparados como control positivo la cepa silvestre y la cepa *Δrtn1* (AL02); como control negativo fue H20; así como la revisión de las cepas dobles *Δrtn1Δyop1* (KN28, KN29, AL236, 7E y 15E), *Δrtn1Δyop2* (KN30, KN31 y AL238) y triples *Δrtn1Δyop1Δyop2* (KN35, KN36). Las letras r-w indican los oligonucleótidos utilizados en cada uno de los PCRs (Apéndice 1).

Nota: Las imágenes recuperadas de todos los gels de electroforesis de los PCR mostrados fueron tomadas con ayuda del fotodocumentador *AlphaDigiDocTM* y las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se aprecia en la Tabla 4 (Apéndice 1).

Prueba múltiple de T para verificación de diferencia significativa en la anormalidad de ascas de mutantes de delección sencillas, dobles y triples

Al igual que el análisis de ANOVA, la prueba múltiple de T independientes no mostró diferencias significativas entre las cepas carentes de diversas proteínas estructurales de RE (Tabla 3).

Tabla 3. Prueba múltiple de T independiente.

Porcentajes de ascas normales y anormales

	Silvestre			$\Delta rtn1$			$\Delta rtn1\Delta yop1$			$\Delta rtn1\Delta yop2$			$\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$		
Normales	100	96.7	98.2	80.5	80.5	80.2	78.1	82.4	63.5	79.8	83.6	77.9	77.3	72.4	81.2
Anormales	0	3.3	1.8	19.5	19.5	19.8	21.9	17.6	36.5	20.2	16.4	22.1	22.7	27.6	18.8

Prueba múltiple de T

$\Delta rtn1$ vs Wt

	Significativo?	Valor p	Diferencia	Valor p ajustado
Normales	Si	0.000048534087134	-17.9	0.000097065818711
Anormales	Si	0.000048534087134	17.9	0.000097065818711

$\Delta rtn1$ vs $\Delta rtn1\Delta yop1$

	Significativo?	Valor p	Diferencia	Valor p ajustado
Normales	No	0.3729410278615	5.733	0.606797045460606
Anormales	No	0.372941027861498	-5.733	0.606797045460606

$\Delta rtn1$ vs $\Delta rtn1\Delta yop2$

	Significativo?	Valor p	Diferencia	Valor p ajustado
Normales	No	0.985108070774026	-0.03333	0.999778230443929
Anormales	No	0.985108070774026	0.03333	0.999778230443929

$\Delta rtn1$ vs $\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$

	Significativo?	Valor p	Diferencia	Valor p ajustado
Normales	No	0.249060242692377	3.433	0.436089480894766
Anormales	No	0.249060242692376	-3.433	0.436089480894766

Se comparó la condición de ascas normales y anormales de la cepa $\Delta rtn1$ contra la cepa Silvestre (Wt); la cepa $\Delta rtn1\Delta yop1$; la cepa $\Delta rtn1\Delta yop2$; y la cepa $\Delta rtn1\Delta yop1\Delta yop2$. El valor de alfa fue de 0.05. Se indica si es significativo o no; la diferencia promedio entre las muestras; el valor de p y el valor ajustado de p. (La prueba se realizó usando el programa *GraphPad Prism* 7.05).

Generación de las cepas $\Delta rtn1$ con integración ectópica del plásmido pNDC1

En el laboratorio, el Dr. Fernando Suaste generó un plásmido que confiere resistencia a la fleomicina y que porta una construcción que permite sobreexpresar el gen codificante para el factor de ensamblaje de los cuerpos

polares del huso conocido como NDC1. Esta construcción consiste en el gen NDC1 bajo el control del promotor de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), conserva su codón de paro y a su vez, le sigue el gen codificante para la resistencia a fleomicina, que también tiene su promotor y su codón de paro. Este plásmido fue utilizado para transformar protoplastos de la cepa *Δrtn1*. Tras lo cual fue posible obtener dos cepas independientes con el marcador de resistencia a fleomicina. Estas cepas fueron empleadas para determinar si la sobreexpresión de NDC1 corrige el fenotipo de ascas anormales mediante cruza sexuales por la cepa *Δrtn1*. Sin embargo, la cuantificación del porcentaje de ascas anormales producidas en estas cruza fue semejante al observado en una cruza homóciga de *Δrtn1*. Es de mencionarse, sin embargo, que en estas cepas no se ha verificado la sobreexpresión del gen NDC1. Asimismo, nuevos experimentos para incrementar el número de transformantes que potencialmente sobre expresen NDC1 serán realizados (Figura suplementaria 11).

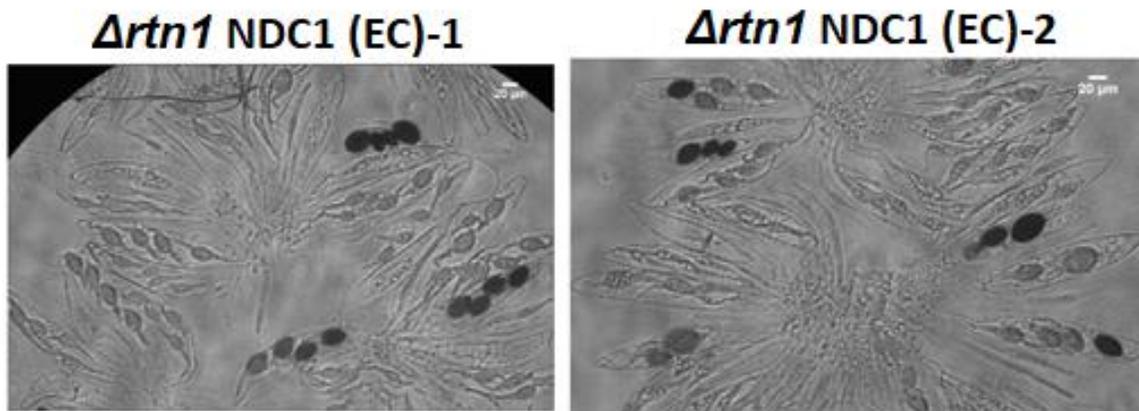
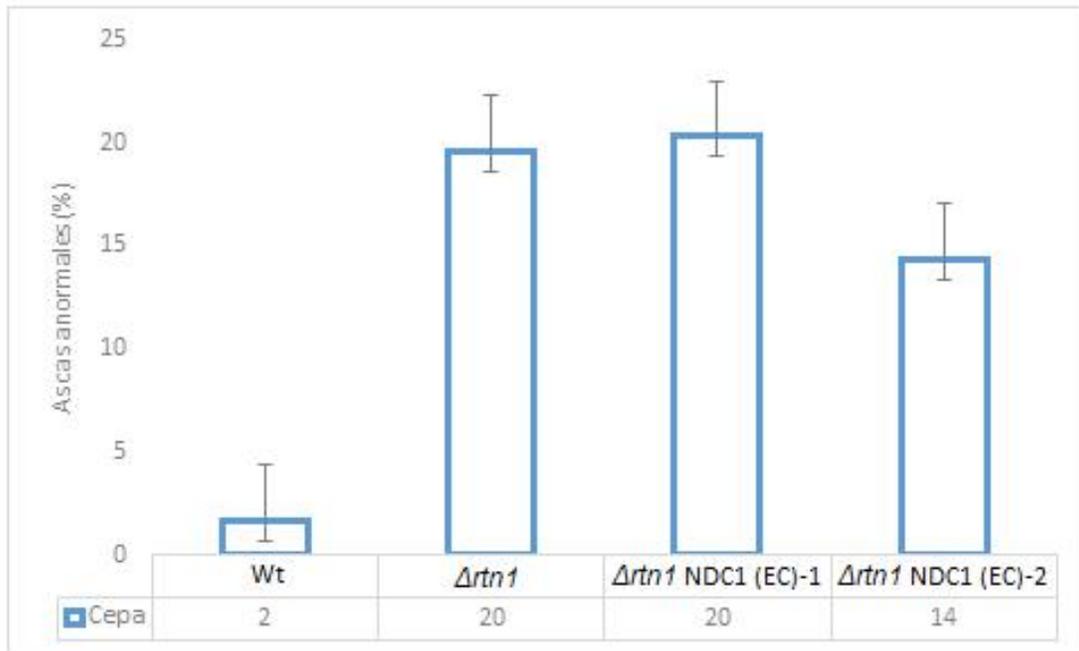


Figura suplementaria 11. Cuantificación de los defectos en la formación de ascas durante el desarrollo sexual en cruces homocigas de cepas que integraron ectópicamente el plásmido pNDC1.

El eje de las abscisas muestra el promedio de experimentos independientes para cada cruce donde se evaluaron ~ 100 ascas provenientes de peritecios con cuatro días post-fertilización. Se observa que las cepas que potencialmente sobreexpresan NDC1 (1) y (2) no disminuyeron el porcentaje de formación de ascas anormales $\Delta rtn1$. Se usó como controles las cruces homocigas silvestre (Wt) y $\Delta rtn1$. Se indican las barras de error y se anexan las imágenes recuperadas para cada cruce.

XII. APÉNDICE 1: OLIGONUCLEÓTIDOS

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para este estudio

Nombre	Secuencia 5´->3´	Descripción
n-rtn1-f	cccgactcccaga attgtctctcg	Oligonucleótido <i>forward</i> para amplificar extremo 5´ para la construcción del casete RTN1-GFP y secuenciación (a).
lkt-rtn1-r	taaaccagcaccg tcaccagcagcga tcaaaggctc	Oligonucleótido <i>reverse</i> para amplificar extremo 5´ para la construcción del casete RTN1-GFP (b).
n-rtn1-3r	aagtgcacaaaa agttcgtcgtcg	Oligonucleótido <i>forward</i> para amplificar extremo 3´ para la construcción del casete RTN1-GFP (c).
hph-rtn1-3f	ccttcttttagcta gaggagcaaggc ttccttcgac	Oligonucleótido <i>reverse</i> para amplificar extremo 3´ para la construcción del casete RTN1-GFP (d).
rtn1-lkt-f	gagcctttgatcgc tgctggtgacggt gctggttta	Oligonucleótido <i>forward</i> para amplificar el gen <i>hph</i> para la construcción del casete RTN1-GFP (e).
rtn1-hph-ru	gaaggaagccttg ctcacttattccttt gccctcgga	Oligonucleótido <i>reverse</i> para amplificar el gen <i>hph</i> para la construcción del casete RTN1-GFP (f).
nrtn1-fch	cctaccgacttct cagc	Oligonucleótido <i>forward</i> para confirmar la delección completa o en el extremo 5´ de las mutantes RTN1-GFP y secuenciación (g).
nrtn1-3ch	ggcctcaaggagt actact	Oligonucleótido <i>reverse</i> para confirmar la delección completa o en el extremo 3´ de las mutantes RTN1-GFP (h).
hph-fc	cgccgatagtgga aaccg	Oligonucleótido <i>forward</i> para confirmar la delección en el extremo 3´ de las mutantes RTN1-GFP, SEC63-mCHERRY o SEC63-GFP (i).
hph-rc	gcggtgagttcag gcttt	Oligonucleótido <i>reverse</i> para confirmar la delección en el extremo 5´ de las mutantes RTN1-GFP, SEC63-mCHERRY o SEC63-GFP y secuenciación (j).

sec63-orf-f	cagattggcaagg acgagaaggga	Oligonucleótido <i>forward</i> para amplificar extremo 5' para la construcción del casete SEC63-mCHERRY y secuenciación (k).
lkt-sec63-3r	taaaccagcaccg tcaccattatcctcc tcctccgtg	Oligonucleótido <i>reverse</i> para amplificar extremo 5' para la construcción del casete SEC63-mCHERRY (l).
sec63-3r	tgatgccttggtt ggttggcgaa	Oligonucleótido <i>forward</i> para amplificar extremo 3' para la construcción del casete SEC63-mCHERRY (m).
hph-sec63-f	tccgagggcaaa ggaataggtttctg atcctcttgcg	Oligonucleótido <i>reverse</i> para amplificar extremo 3' para la construcción del casete SEC63-mCHERRY (n).
sec63-lkt-f	cacggaggagga ggataatggtgac ggtgctggtta	Oligonucleótido <i>forward</i> para amplificar el gen <i>hph</i> para la construcción del casete SEC63-mCHERRY (ñ).
sec63-hph-r	cgcaagaggatc agaaacctattct ttgccctcgga	Oligonucleótido <i>reverse</i> para amplificar el gen <i>hph</i> para la construcción del casete SEC63-mCHERRY (o).
sec63-orf-fa	aaaacgtgcccga gattg	Oligonucleótido <i>forward</i> para confirmar la delección completa o en el extremo 5' de las mutantes SEC63-mCHERRY y secuenciación (p).
Sec63-3rc	ctgggatagatgg cggag	Oligonucleótido <i>reverse</i> para confirmar la delección completa o en el extremo 3' de las mutantes SEC63-mCHERRY (q).
rtn-5ch	gagagagagcca aggcac	Oligonucleótido <i>forward</i> para confirmar la delección Δ rtn1 (r).
rtn-3ch	cacgtatctcggtc agcc	Oligonucleótido <i>reverse</i> para confirmar la delección Δ rtn1 (s).
yop1-5ch	gactgaaccaga aatgcc	Oligonucleótido <i>forward</i> para confirmar la delección Δ yop1 (t).
yop1-3ch	tgagggagaaga aatcgc	Oligonucleótido <i>reverse</i> para confirmar la delección Δ yop1 (u).
yop2-5ch	aaggcgatgaca ggaacg	Oligonucleótido <i>forward</i> para confirmar la delección Δ yop2 (v).

yop2-3ch	tcgtggtaggcga aaagg	Oligonucleótido <i>reverse</i> para confirmar la delección $\Delta yop2$ (w).
rtn-3r	gctgtctgagctcg tcctttcgta	Oligonucleótido <i>forward</i> para secuenciar RTN1-GFP.
3-rtn	tgaccagaccgag cagat	Oligonucleótido <i>forward</i> para secuenciar RTN1-GFP.
rtn1-fch	gcctacctcacaat cgtct	Oligonucleótido <i>forward</i> para secuenciar RTN1-GFP.
t-trpc- r+ SacI	ccagagctcgtga cggaattttcatag	Oligonucleótido <i>reverse</i> para secuenciar RTN1-GFP.
gfp-5-ru	cttgtggccgttta cgtc	Oligonucleótido <i>reverse</i> para secuenciar RTN1-GFP o SEC63-GFP.
n-sec63- orf-f	ggcgttctcatgg agagcgccaacc	Oligonucleótido <i>forward</i> para secuenciar SEC63mCHERRY o SEC63-GFP.
cherry-rc	ccatgtgcaccttg aagc	Oligonucleótido <i>reverse</i> para secuenciar SEC63mCHERRY.
t-trpc-rc	cggagcctgaag gcgttact	Oligonucleótido <i>reverse</i> para secuenciar SEC63mCHERRY o SEC63-GFP.

Nota: Las letras (a)-(w) indican los oligonucleótidos utilizados en los PCRs realizados y se aprecian en las Figuras 4-5 y en las figuras suplementarias 1, 2 y 10.

XIII. APÉNDICE 2: SOLUCIONES MADRE

Extracción de DNA

Acetato de potasio 5M (30 mL).....14.71 g

EDTA (0.5 M, 500 mL, pH 8).....73.05 g

EDTA + SDS 0.2% (30 mL)

EDTA (50 mM).....3 mL

SDS (10%).....0.6 mL
Fenol cloroformo.....1:1 (v/v)

Preparación de Medios

Antibióticos (Solución madre).

Ampicilina.....10 mg/mL
Geneticina.....100 mg/mL
Higromicina.....250 mg/mL
Fleomicina.....20 mg/mL
Nourseotricina.....100 mg/mL

Solución 1:

KH_2PO_450 g (m/v)

Solución 2:

K_2HPO_460 g (m/v)

Solución 3:

MgSO_450 g (m/v)

Solución 4:

Urea.....100 g (m/v)

Solución A:

Na_2HPO_4 (0.5 M).....89 g (m/v)

Solución B:

KH_2PO_4 (0.5 M).....68 g (m/v)

Oligoelementos (elementos traza).

Ácido Cítrico, 1H ₂ O.....	5 g
Sulfato de Zinc (ZnSO ₄ , 7H ₂ O).....	5 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6H ₂ O.....	1 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	250 mg
MnSO ₄ , 1H ₂ O.....	50 mg
Ácido bórico (H ₃ BO ₃ , anhidro).....	50 mg
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O).....	50 mg

Vitaminas.

Biotina + Tiamina.....	200 mg/L(c/u)
Sorbitol (0.8 M 200 mL).....	29.1 g
Tris-base (1 M, pH 8, 500 mL).....	60.55 g (m/v)

Citología

Paraformaldehido (PAF) (10 mL)

PAF.....	0.74 g
EGTA (0.44 M).....	0.23 mL
MgCl ₂ (0.5 M).....	0.2 mL
PIPES (pH 6.9).....	1.8 mL

Disolver a baño María a 60°C x 1 Hora.

PEM (10 mL).

PIPES (0.5 M).....	1.8 mL
--------------------	--------

EGTA (0.44 M).....	0.227 mL
MgCl ₂ (0.5 M).....	0.2 mL
H ₂ O.....	7.7 mL

PBS 10X (100 mL).

Na ₂ HPO ₄ (1.6 M).....	50 mL
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O (0.4 M).....	50 mL
NaN ₃	0.5 g

Poli-L-lisina

Disolver 1 mg de poli-L-lisina en 1 mL de tritón 0.05%

SDS 10% (100 mL).....	10 g
-----------------------	------

Tritón 100x al 10%.

Diluir la solución Triton100X de Merck, 10 veces para obtener una solución de tritón 10X, se debe agitar vigorosamente para obtener una solución transparente que se conserva a temperatura ambiente.

[Reactivos para microscopía](#)

FM464.....	1 mM/mL
------------	---------

DAPI.....	1 mg/mL
-----------	---------

[Soluciones para protoplastos](#)

TPS1 (1000 mL)

Sacarosa.....	200 g
---------------	-------

Na ₂ HPO ₄ (5 mM).....	10 mL
--	-------

KH ₂ PO ₄ (45 mM).....	90 mL
--	-------

TPC (1000 mL)

Sacarosa (0.6 M).....	205.38 g
-----------------------	----------

CaCl ₂ (10 mM).....	10 mL
Tris (10 mM, pH 7.5).....	10 mL

Otros

Gel de agarosa 1% con TBE 1X (500 mL).

Agarosa.....	5 g
--------------	-----

Se preparan 500 mL de agarosa y en cada uso se calienta, colocando en la cámara de electroforesis la cantidad necesaria una vez que su temperatura baja y antes de que gelifique.

TBE (Solución madre 5X) (1000 mL)

Tris base.....	54 g
Ácido bórico.....	27.5 g
EDTA (pH 8.0) 0.5 M.....	20 mL

TEⁱ (10X) (100 mL)

Tris-Cl (100 mM).....	10 mL
EDTA (10 mM, pH 8.0).....	2 mL

XIV. APÉNDICE 3: MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Medios para *E. coli*

Luria Bertuni (LB) ⁱ

LB Agar <i>Ultrapure</i> , sólido (US Biological).....	35 gm/L
--	---------

Se esteriliza en autoclave y de ser el caso, se añaden los antibióticos necesarios para volverlo selectivo una vez que la temperatura del medio baje a 60°C y se vacía 30 mL en cajas Petri.

ⁱ La solución se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 120°C y 1.5 atm.

LB Broth Ultrapure, líquido (US Biological).....20 gm/L

Se esteriliza en autoclave y, de ser el caso, se añaden los antibióticos necesarios para volverlo selectivo una vez que la temperatura del medio baje a 60°C.

Adición de antibióticos para medios selectivos:

Ampicilina.....25 µg/mL

Medios para *P. anserina*

M2 (1000 mL)ⁱ

Solución 1.....5 mL

Solución 2.....5 mL

Solución 3.....5 mL

Solución 4.....5 mL

Vitaminas (Biotina +Tiamina).....0.5 mL

Oligoelementos.....1 mL

Dextrina.....22 g

Agar.....12.5 g

Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, la dextrina se disuelve en un poco de agua caliente (descontar del volumen final), se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se añaden las vitaminas y, de ser el caso, los antibióticos una vez que la temperatura del medio baje a 60°C y se vacía 30 mL en cajas de Petri.

ⁱ La solución se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 120°C y 1.5 atm.

Adición de antibióticos para medios selectivos:

Fleomicina.....	25 µg/mL
Nourseotricina.....	40 µg/mL
Geneticina.....	100 µg/mL
Higromicina.....	75 µg/mL
Higromicina.....	30 µg/mL

Nota: Las concentraciones de trabajo de cada uno de los antibióticos también se usaron para la elaboración del medio RG.

Medio de germinación GYEⁱ (1000 mL).

Acetato de amonio (440 g/L).....	10 mL
BactoPeptona.....	15 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agar.....	13 g

Esterilizar y agitar bien después de la esterilización, vaciando 25 mL por caja Petri.

Tapas de agar (MA)ⁱ (1000 mL).

Agar.....	20 g
Cloruro de sodio (NaCl).....	10 g

Se esteriliza en autoclave y se vacía inmediatamente de 10-15 mL por caja de Petri.

ⁱ La solución se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 120°C y 1.5 atm.

Medio para microscopía MM (200 mL)ⁱ

Solución 1.....	1 mL
Solución 2.....	1 mL
Solución 3.....	1 mL
Solución 4.....	1 mL
Vitaminas (Biotina +Tiamina).....	0.1 mL
Oligoelementos.....	0.2 mL
Dextrina.....	1.1 g
Agarosa.....	4 g

Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, la dextrina se disuelve en un poco de agua caliente (descontar del volumen final), se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se añaden las vitaminas y, de ser el caso, los antibióticos una vez que la temperatura del medio baje a 60°C y se vacía 15 mL en cajas de Petri.

Medio líquido para protoplastos "*Fiolex roux*" (1000 mL).ⁱ

Solución 1.....	5 mL
Solución 2.....	5 mL
Solución 3.....	5 mL
Solución 4.....	5 mL
Vitaminas (Biotina +Tiamina).....	0.5 mL
Oligoelementos.....	1 mL
Extracto de levadura.....	5 g
Dextrina.....	22 g

ⁱ La solución se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 120°C y 1.5 atm.

Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, la dextrina se disuelve en un poco de agua caliente (descontar del volumen final), se ajusta el pH a 7.0, se reparte en matraces Fernbach (250 mL c/u) y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se añaden las vitaminas una vez que la temperatura del medio baje a 60°C.

Medios de regeneración para transformación de protoplastos

RG (1000 mL)ⁱ

Solución 1.....	5 mL
Solución 2.....	5 mL
Solución 3.....	5 mL
Solución 4.....	5 mL
Vitaminas (Biotina +Tiamina).....	0.5 mL
Oligoelementos.....	1 mL
Dextrina.....	22 g
Sacarosa (0.58M).....	200 g
Agar.....	10 g

Se adicionan los componentes en el orden de la receta, salvo la biotina y la tiamina, la dextrina se disuelve en un poco de agua caliente (descontar del volumen final), se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se añaden las vitaminas y, de ser el caso, los antibióticos una vez que la temperatura del medio baje a 60°C y se vacía 30 mL en cajas de Petri. Si se desea preparar RG líquido únicamente no se agrega agar.

Polietilen glicol (PEG)ⁱ (50 mL).

Polietilen glicol 4000 60% (m/v).....	30 g
10 mM CaCl ₂	5 mL (Solución madre 100 mM)

10 mM Tris pH 7.5.....1 mL (Solución madre 0.5 M)

Top agar (1000 mL).

Medio RG.....75% (v/v)

Sorbitol 0.8 M.....25% (v/v)

El medio RG se calienta en baño María para poderse mezclar con el sorbitol cuando ambos son líquidos. Posteriormente se vierten juntos de 10-15 mL en la caja de Petri con medio RG sólido.

ⁱ La solución se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 120°C y 1.5 atm.

XV. BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(11), 2430-2437.
- Agrawal, G., Joshi, S., y Subramani, S. (2011). Cell-free sorting of peroxisomal membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(22), 9113-9118. doi: 10.1073/pnas.1018749108.
- Agrawal, G., y Subramani, S. (2016). De novo peroxisome biogenesis: Evolving concepts and conundrums. *Biochim Biophys Acta*, 1863(5), 892-901. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.014
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition*. Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition, 1-1342.
- Armesto, R. A., Díaz, J. L. D., Peromingo, J. D., González, A. R., Mao, M. C., & Martínez, F. D.-L. (2011). Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicia Clínica*, 72(1), 7-17.
- Audhya, A., Desai, A., y Oegema, K. (2007). A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 178(1), 43-56. doi: 10.1083/jcb.200701139.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., . . . Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 77(6), 895-907.
- Bartnicki-Garcia S, Hergert F, Gierz G: Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* 1989, 153:46-57.
- Bishop, W. R., & Bell, R. M. (1988). Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annual review of cell biology*, 4(1), 579-606.
- Boldogh, I. R., & Pon, L. A. (2007). Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol*, 17(10), 502-510. doi: 10.1016/j.tcb.2007.07.008
- Bonnet, C., Espagne, E., Zickler, D., Boisnard, S., Bourdais, A., y Berteaux-Lecellier, V. (2006). The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Mol Microbiol*, 62(1), 157-169. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05353.x
- Borkovich, K. A., y Ebole, D. J. (2010). *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. Washington, DC: ASM Press.
- Brady JP, Claridge JK, Smith PG, Schnell JR (2015) A conserved amphipathic helix is required for membrane tubule formation by Yop1p. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(7): E639–E648.
- Breeze, E., Dzimitrowicz, N., Kriechbaumer, V., Brooks, R., Botchway, S. W., Brady, J. P., . . . Fricker, M. D. (2016). A C-terminal amphipathic helix is necessary for the in vivo tubule-shaping function of a plant reticulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), 10902-10907.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B. G., y Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, 21(16), 3422-3423.
- Casey, A. K., Dawson, T. R., Chen, J., Friederichs, J. M., Jaspersen, S. L., y Wentte, S. R. (2012). Integrity and function of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body depends on connections between the membrane proteins Ndc1, Rtn1, and Yop1. *Genetics*, 192(2), 441-455. doi: 10.1534/genetics.112.141465

- Casey, A. K., Chen, S., Novick, P., Ferro-Novick, S., y Wentse, S. R. (2015). Nuclear pore complex integrity requires Lnp1, a regulator of cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 26(15), 2833-2844. doi: 10.1091/mbc.E15-01-0053
- Casey, A. K., Dawson, T. R., Chen, J., Friederichs, J. M., Jaspersen, S. L., y Wentse, S. R. (2012). Integrity and function of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body depends on connections between the membrane proteins Ndc1, Rtn1, and Yop1. *Genetics*, 192(2), 441-455. doi: 10.1534/genetics.112.141465
- Casselton, L. A. (2002). Mate recognition in fungi. *Heredity*, 88(2), 142.
- Chen, S., Novick, P., y Ferro-Novick, S. (2012). ER network formation requires a balance of the dynamin-like GTPase Sey1p and the *Lunapark* family member Lnp1p. *Nat Cell Biol*, 14(7), 707-716. doi: 10.1038/ncb2523
- Chen, S., Novick, P., y Ferro-Novick, S. (2013). ER structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 25(4), 428-433. doi: 10.1016/j.ceb.2013.02.006
- Cherepanova, N., Shrimal, S., & Gilmore, R. (2016). N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 41, 57-65.
- Christodoulou, A., Santarella-Mellwig, R., Santama, N., y Mattaj, I. W. (2016). Transmembrane protein TMEM170A is a newly discovered regulator of ER and nuclear envelope morphogenesis in human cells. *J Cell Sci*, 129(8), 1552-1565. doi: 10.1242/jcs.175273
- Coppin-Raynal, E., Picard, M., y Arnaise, S. (1989). Transformation by integration in *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics MGG*, 219(1-2), 270-276.
- D'Arcangelo, J. G., Stahmer, K. R., & Miller, E. A. (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(11), 2464-2472.
- Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*, 44(2), 233-242.
- David, C., Koch, J., Oeljeklaus, S., Laernsack, A., Melchior, S., Wiese, S., . . . Brocard, C. (2013). A combined approach of quantitative interaction proteomics and live-cell imaging reveals a regulatory role for endoplasmic reticulum (ER) reticulon homology proteins in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Proteomics*, 12(9), 2408-2425. doi: 10.1074/mcp.M112.017830
- Dawson, T. R., Lazarus, M. D., Hetzer, M. W., y Wentse, S. R. (2009). ER membrane-bending proteins are necessary for de novo nuclear pore formation. *J Cell Biol*, 184(5), 659-675. doi: 10.1083/jcb.200806174
- De Craene, J. O., Coleman, J., Estrada de Martin, P., Pypaert, M., Anderson, S., Yates, J. R., 3rd, . . . Novick, P. (2006). Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 17(7), 3009-3020. doi: 10.1091/mbc.E06-01-0080
- Dirkx, R., Vanhorebeek, I., Martens, K., Schad, A., Grabenbauer, M., Fahimi, D., . . . Baes, M. (2005). Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology*, 41(4), 868-878. doi: 10.1002/hep.20628
- El-Khoury, R., Sellem, C. H., Coppin, E., Boivin, A., Maas, M. F., Debuchy, R., y Sainsard-Chanet, A. (2008). Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Curr Genet*, 53(4), 249-258. doi: 10.1007/s00294-008-0180-3
- English, A. R., y Voeltz, G. K. (2013). Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a013227. doi: 10.1101/cshperspect.a013227
- Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B. M., . . . Silar, P. (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol*, 9(5), R77. doi: 10.1186/gb-2008-9-5-r77
- Fribley, A., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2009). Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol*, 559, 191-204. doi: 10.1007/978-1-60327-017-5_14
- Fischer-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA, Read ND: Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* 2000, 198:246-259.
- Friedman, J. R., y Voeltz, G. K. (2011). The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol*, 21(12), 709-717. doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.004
- Geydan, T. D., Debets, A. J., Verkley, G. J., y van Diepeningen, A. D. (2012). Correlated evolution of senescence and ephemeral substrate use in the Sordariomycetes. *Mol Ecol*, 21(11), 2816-2828. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05569.x
- Gidalevitz, T., Stevens, F., y Argon, Y. (2013). Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(11), 2410-2424
- Glick, B. S., y Nakano, A. (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 113-132. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175421
- Goyal, U., y Blackstone, C. (2013). Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochim Biophys Acta*, 1833(11), 2492-2498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.009
- Hall, T. (2005). BioEdit 7.0. 5. *North Carolina State University, Department of Microbiology*. Available via <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Hanada, K. (2010). Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86(4), 426-437.

- Harms, H., Schlosser, D., y Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*, 9(3), 177-192. doi: 10.1038/nrmicro2519
- Johnson, A. E., & van Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), 799-842.
- Johnson, N., Powis, K., & High, S. (2013). Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(11), 2403-2409.
- Joshi, A. S., Zhang, H., y Prinz, W. A. (2017). Organelle biogenesis in the endoplasmic reticulum. *Nature cell biology*, 19(8), 876.
- Kim, P. K., Mullen, R. T., Schumann, U., y Lippincott-Schwartz, J. (2006). The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol*, 173(4), 521-532. doi: 10.1083/jcb.200601036
- Knoblach, B., y Rachubinski, R. A. (2013). Doing the math: How yeast cells maintain their peroxisome populations. *Commun Integr Biol*, 6(6), e26901. doi: 10.4161/cib.26901
- Kornmann, B., y Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci*, 123(Pt 9), 1389-1393. doi: 10.1242/jcs.058636
- Ladinsky, M. S., Mastronarde, D. N., McIntosh, J. R., Howell, K. E., & Staehelin, L. A. (1999). Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol*, 144(6), 1135-1149.
- Lam, S. K., Yoda, N., y Schekman, R. (2010). A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50), 21523-21528. doi: 10.1073/pnas.1013397107
- López Fuentes, A. de J. (2016). *La proteína de reticulón RTN1 del hongo filamentoso Podospora anserina y su papel en el desarrollo sexual (tesis de licenciatura)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lu, L., Ladinsky, M. S., y Kirchhausen, T. (2011). Formation of the postmitotic nuclear envelope from extended ER cisternae precedes nuclear pore assembly. *The Journal of cell biology*, 194(3), 425-440.
- Malagnac, F., Klapholz, B., y Silar, P. (2007). PaTrx1 and PaTrx3, two cytosolic thioredoxins of the filamentous ascomycete *Podospora anserina* involved in sexual development and cell degeneration. *Eukaryot Cell*, 6(12), 2323-2331. doi: 10.1128/EC.00083-07
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J. C., & Rothman, J. E. (1989). Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*, 58(2), 329-336.
- Maruyama, J. I., Kikuchi, S., y Kitamoto, K. (2006). Differential distribution of the endoplasmic reticulum network as visualized by the BipA-EGFP fusion protein in hyphal compartments across the septum of the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(9), 642-654.
- Mast, F. D., Jamakhandi, A., Saleem, R. A., Dilworth, D. J., Rogers, R. S., Rachubinski, R. A., y Aitchison, J. D. (2016). Peroxins Pex30 and Pex29 Dynamically Associate with Reticulons to Regulate Peroxisome Biogenesis from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*, 291(30), 15408-15427. doi: 10.1074/jbc.M116.728154
- Meldolesi, J., y Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(1), 10-14.
- Nachón Garduño, K. N. (2016). *Las proteínas de la familia YOP1/DP1 y su papel en el desarrollo sexual del hongo filamentoso Podospora anserina (tesis de licenciatura)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nakase, Y., Nakamura-Kubo, M., Ye, Y., Hirata, A., Shimoda, C., y Nakamura, T. (2008). Meiotic spindle pole bodies acquire the ability to assemble the spore plasma membrane by sequential recruitment of sporulation-specific components in fission yeast. *Mol Biol Cell*, 19(6), 2476-2487.
- Neiman, A. M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 189(3), 737-765. doi: 10.1534/genetics.111.127126
- Nixon-Abell, J., Obara, C. J., Weigel, A. V., Li, D., Legant, W. R., Xu, C. S., . . . Betzig, E. (2016). Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER. *Science*, 354(6311), aaf3928.
- Oertle, T., Klinger, M., Stuermer, C. A., y Schwab, M. E. (2003). A reticular rhapsody: phylogenic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *FASEB J*, 17(10), 1238-1247. doi: 10.1096/fj.02-1166hyp
- Oertle, T., y Schwab, M. E. (2003). Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol*, 13(4), 187-194.
- Peraza-Reyes, L., y Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Front Physiol*, 4, 244. doi: 10.3389/fphys.2013.00244
- Peraza, R. L. Y Malagnac Fabienne. (2016). Sexual Development in Fungi. En J. Wendland. (Ed. Springer), *The Mycota: Growth, differentiation and sexuality*. (pp 407-443). Kopenhagen, Denmark.
- Phillips, M. J., y Voeltz, G. K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(2), 69-82. doi: 10.1038/nrm.2015.8
- Puhka, M., Joensuu, M., Vihinen, H., Belevich, I., y Jokitalo, E. (2012). Progressive sheet-to-tubule transformation is a general mechanism for endoplasmic reticulum partitioning in dividing mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 23(13), 2424-2432. doi: 10.1091/mbc.E10-12-0950
- Raju, N. B., & Newmeyer, D. (1977). Giant ascospores and abnormal croziers in a mutant of *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology*, 1(2), 152-165.

- Raychaudhuri, S., Im, Y. J., Hurley, J. H., y Prinz, W. A. (2006). Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *Journal of Cell Biology*, 173(1), 107-119. doi: 10.1083/jcb.200510084
- Riquelme, M. (2013). Tip Growth in Filamentous Fungi: A Road Trip to the Apex. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 587-609. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155652>.
- Riquelme, M., y Sánchez-León, E. (2014). The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current opinion in microbiology*, 20, 27-33.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., . . . Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*, 280(5370), 1763-1766.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., . . . Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol*, 185(7), 1209-1225. doi: 10.1083/jcb.200811005
- Rowland, A. A., Chitwood, P. J., Phillips, M. J., y Voeltz, G. K. (2014). ER contact sites define the position and timing of endosome fission. *Cell*, 159(5), 1027-1041. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.023
- Rowland, A. A., Chitwood, P. J., Phillips, M. J., & Voeltz, G. K. (2014). ER contact sites define the position and timing of endosome fission. *Cell*, 159(5), 1027-1041.
- Sanders, S. L., & Schekman, R. (1992). Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (20), 13791-13794.
- Silar, P., Dairou, J., Coccagn, A., Busi, F., Rodrigues-Lima, F., y Dupret, J. M. (2011). Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with aromatic amines, a major class of pollutants. *Nat Rev Microbiol*, 9(6), 477. doi: 10.1038/nrmicro2519-c1.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... y Tinevez, J. Y. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676.
- Scheckhuber, C. Q., y Osiewacz, H. D. (2008). *Podospora anserina*: a model organism to study mechanisms of healthy ageing. *Mol Genet Genomics*, 280(5), 365-374. doi: 10.1007/s00438-008-0378-6
- Scheckhuber, C. Q., Rodel, E., y Wustehube, J. (2008). Regulation of mitochondrial dynamics--characterization of fusion and fission genes in the ascomycete *Podospora anserina*. *Biotechnol J*, 3(6), 781-790. doi: 10.1002/biot.200800010
- Shemesh, T., Klemm, R. W., Romano, F. B., Wang, S., Vaughan, J., Zhuang, X., . . . Rapoport, T. A. (2014). A model for the generation and interconversion of ER morphologies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(49), E5243-5251. doi: 10.1073/pnas.1419997111
- Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M. M., y Rapoport, T. A. (2009). Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 329-354. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113324
- Shibata, Y., Voeltz, G. K., y Rapoport, T. A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, 126(3), 435-439. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.019
- Shibata, Y., Voss, C., Rist, J. M., Hu, J., Rapoport, T. A., Prinz, W. A., y Voeltz, G. K. (2008). The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 283(27), 18892-18904. doi: 10.1074/jbc.M800986200
- Silar, P. (2013). *Podospora anserina*: From Laboratory to Biotechnology. 36, 283-309. doi: 10.1007/978-3-642-39339-6_12
- Srivastava, P., Alessi, W. D.M., García, R.L.J., Higuchi, S.R., Pon, L.A. (2016). Organelle Inheritance in Yeast and Other Fungi. En J. Wendland. (Ed. Springer). *The Mycota: Growth, differentiation and sexuality* (pp. 3-19). Copenhagen, Denmark.
- Suaste-Olmos, F., Zirion-Martinez, C., Takano-Rojas, H., y Peraza-Reyes, L. (2018). Meiotic development initiation in the fungus *Podospora anserina* requires the peroxisome receptor export machinery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(4), 572-586.
- Takano-Rojas, H., Zickler, D., y Peraza-Reyes, L. (2016). Peroxisome dynamics during development of the fungus *Podospora anserina*. *Mycologia*, 108(3), 590-602.
- Takano Rojas, A.H. (2018). El papel de la proteína de fisión FIS1 en la dinámica peroxisomal y el desarrollo del hongo filamentoso *Podospora anserina* (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Thompson-Coffe, C., y Zickler, D. (1994). How the cytoskeleton recognizes and sorts nuclei of opposite mating type during the sexual cycle in filamentous ascomycetes. *Developmental biology*, 165(1), 257-271.
- Tolley, N., Sparkes, I., Craddock, C. P., Eastmond, P. J., Runions, J., Hawes, C., y Frigerio, L. (2010). Transmembrane domain length is responsible for the ability of a plant reticulon to shape endoplasmic reticulum tubules in vivo. *Plant J*, 64(3), 411-418. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04337.x
- Tolley, N., Sparkes, I. A., Hunter, P. R., Craddock, C. P., Nuttall, J., Roberts, L. M., . . . Frigerio, L. (2008). Overexpression of a plant reticulon remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport. *Traffic*, 9(1), 94-102. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00670.x
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., y Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*, 35(suppl 2), W71-W74.

- Urade, T., Yamamoto, Y., Zhang, X., Ku, Y., y Sakisaka, T. (2014). Identification and characterization of TMEM33 as a reticulon-binding protein. *Kobe J Med Sci*, 60(3), E57-65.
- van der Zand, A., Gent, J., Braakman, I., y Tabak, H. F. (2012). Biochemically Distinct Vesicles from the Endoplasmic Reticulum Fuse to Form Peroxisomes. *Cell*, 149(2), 397-409. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.054
- Vance, J. E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*, 265(13), 7248-7256.
- Voeltz, G. K., y Barr, F. A. (2013). Cell organelles. *Curr Opin Cell Biol*, 25(4), 403-405. doi: 10.1016/j.ceb.2013.06.001
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M., y Rapoport, T. A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*, 124(3), 573-586. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.047
- Voss, C., Lahiri, S., Young, B. P., Loewen, C. J., y Prinz, W. A. (2012). ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci*, 125(Pt 20), 4791-4799. doi: 10.1242/jcs.105635
- Wang, Y., Mattson, M. P., & Furukawa, K. (2002). Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J Neurochem*, 82(4), 945-952.
- Wendland, J. (Ed.). (2016). *Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer Ed. Third Edition ed. Vol. I). Kopenhagen, Denmark
- Westrate, L. M., Lee, J. E., Prinz, W. A., y Voeltz, G. K. (2015). Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu Rev Biochem*, 84, 791-811. doi: 10.1146/annurev-biochem-072711-163501