

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN CIENCIAS DE LA VIDA**

**AMI-1 en la localización de microtúbulos y organización
nuclear en *Neurospora crassa***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Fausto Martín Villavicencio Aguilar

Ensenada, Baja California, México

2014

Tesis defendida por:

Fausto Martín Villavicencio Aguilar

y aprobada por el Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director del Comité

M.C. Olga Alicia Callejas Negrete
Miembro del comité

Dr. Miguel Ángel Del Río Portilla
Miembro del comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del Posgrado en
Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Noviembre, 2014

Resumen de la tesis de **Fausto Martín Villavicencio Aguilar**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

**AMI-1 en la localización de microtúbulos y organización nuclear en
*Neurospora crassa***

Resumen elaborado por:

Biol. Fausto Martín Villavicencio Aguilar

Resumen.

La organización de los microtúbulos (MTs) depende de diversas proteínas asociadas a ellos (MAPs), estas proteínas están relacionadas a la terminal positiva o negativa de MTs citoplasmáticos o mitóticos. En hongos filamentosos, el comportamiento de los MTs astrales y el movimiento del huso mitótico parecen estar regulados por la proteína ApsA (anucleate primary sterigmata) asociada a la terminal positiva, descrita por primera vez en *Aspergillus nidulans*. Se encontró el homólogo de ApsA en *Neurospora crassa* y la hemos llamado AMI-1. El gen *ami-1* tiene una alta identidad con ApsA y AMI1 de *Podospora anserina*. En este estudio se ha analizado el efecto de la pérdida de AMI-1 en una mutante por delección y observamos la dinámica nuclear y las características cinéticas de la mutante nula durante el crecimiento vegetativo, reproducción sexual y asexual en comparación con la cepa de tipo silvestre (WT). Mostramos datos sobre las características celulares de la cepa mutante por delección $\Delta ami-1$ comparada con la cepa WT. La mutante $\Delta ami-1$ mostró una disminución en la tasa de crecimiento del 34%, así como disminución en el número de ramas las cuales son hiperseptadas. Aunque la conidiación no es afectada, se ha observado un defecto en la reproducción sexual cuando la mutante nula es empleada como receptora. El gen *ami-1* de *N. crassa* no es esencial, pero afecta el crecimiento celular y la reproducción sexual, probablemente debido al efecto de las alteraciones en la distribución nuclear.

Palabras clave: **AMI-1, microtúbulos, distribución nuclear.**

Abstract of the thesis presented by **Fausto Martín Villavicencio Aguilar**, as a partial requirement to obtain the Master in Science Degree in Science of the Life with orientation in Microbiology.

**AMI-1 in the localization of microtubules and nuclear organization in
*Neurospora crassa***

Abstract elaborate by:

Biol. Fausto Martín Villavicencio Aguilar

Abstract.

Microtubule organization depends on several associated proteins (MAPs), these proteins are related to the plus or minus end of cytoplasmic or mitotic microtubules (MTs). In filamentous fungi, the behavior of astral MTs and the movement of the mitotic spindle seem to be regulated by a plus end protein ApsA (anucleate primary sterigmata), first described in *Aspergillus nidulans*. We found the homolog of ApsA in *Neurospora crassa* and we named it AMI-1. The *N. crassa ami-1* gene has a high identity with ApsA and AMI1 of *Podospora anserina*. In this study we analyzed the effect of the lack of AMI-1 in a deletion mutant and observed the nuclear dynamics and the kinetic features of the null mutant during vegetative growth, asexual and sexual reproduction in comparison with a wild type strain (WT). We are showing preliminary data about the cellular features of the $\Delta ami-1$ deletion mutant compared with the WT. The $\Delta ami-1$ mutant showed a decrease of the elongation rate of 34%. The mutant displays a lower number of branches and is hyperseptated. Although the conidiation in the mutant is not affected, we had observe a defect in the sexual reproduction when the knock-out mutant is used as receptor. So far, we can conclude that the *ami-1* gene of *N. crassa* is not essential but affects cell growth and sexual reproduction, probably due the effect of the alterations in nuclear distribution.

Key words: **AMI-1, microtubules, nuclear distribution.**

Dedicatoria.

*A “la señora” (mi mamá),
a “DIMACO” y a “la chabela”
por y para ustedes.*

Agradecimientos.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca de posgrado otorgada y al fondo **CONACYT-Ciencia Básica 133518** por el financiamiento del proyecto. Al **CICESE** y al **Departamento de Microbiología** por los espacios y la oportunidad que me dieron para realizar mi trabajo.

A la Dra. **Rosa Mouriño** mi directora de tesis, maestra, terapeuta, médico de cabecera y amiga. Por todo lo que me ha enseñado y lo que hemos vivido, por su infinita paciencia (aunque a veces no tanta), por todas las risas y reuniones para desayunar. Por todo el tiempo, esfuerzo y dedicación que invirtió en mi trabajo, pero sobre todo en mí. **Muchas gracias.**

Al **Dr. Miguel Ángel del Río** y a la **M.C. Olga Callejas** por la ayuda que me han brindado y el tiempo que le han dedicado a **nuestro** trabajo.

A **Soledad, Isabel** y toda su familia, que me adoptaron como a un miembro más de ella, por su infinito apoyo, preocupación y ánimo. Por su cariño y amistad, siempre los llevo conmigo. A **Isabel** en particular por todo el cariño y la ayuda que me ha brindado, por las cervezas que nos hemos tomado y por compartir su bonita familia conmigo, por todo lo que hemos vivido y lo que viviremos.

A mi **mamá** por todo lo que me ha enseñado directa o indirectamente. Porque si he logrado algo es gracias a ella y a su infinito amor y bondad. Todo este tiempo has creído que he luchado mucho por lograr mis metas, pero tú has luchado más que yo. Por ser un ejemplo de vida y superación, por darme lo mejor de ti cada día de tu vida y ayudarme a ser quien soy.

Al **Arq. Diego Martínez** por su apoyo incondicional, y es que me has apoyado en tantas formas que no terminaría de enlistarlas. Por las risas, los viajes, los dramas, las cervezas...por estar siempre ahí. A tu familia por apoyarme, sin ustedes, sin ti quizá no lo hubiese logrado.

A **Patricia Paredes** que me ha enseñado que las mejores personas llegan a tu vida pese a todo aun cuando se encuentran a medio planeta de distancia. Por el apoyo y todos los abrazos que me ha dado, por las risas y las anécdotas, por enseñarme que no se puede dejar de pensar en los que quieres. Por su cariño, su amistad y sus enseñanzas.

A la Ariana... Ariadne... Arian...Arianné... M.C. **Arianne**. Por la paciencia y la gran GRAN ayuda que me ha brindado durante todo este tiempo, por los "raites" y las revisiones. Por tu amistad que ha sido una de las mejores cosas que he descubierto durante el desarrollo de este trabajo.

Al "Doc." **Lara, Adriana** y al "**larita**", por uno de los mejores viajes de mi vida. Por los consejos y las enseñanzas. Pero sobre todo por las risas, fiestas, viajes y bailes de canciones de jeans que su amistad ha dejado.

A la **Dra. Cano** (“la nallelys”) por las innumerables preguntas que me ha respondido, la ayuda que me ha dado y las risas que ha provocado.

A **Olga Callejas** que además de ser parte de mi comité, también ha sido una maestra que me ha enseñado y ayudado mucho. Por las risas, los regaños y los esporádicos enojos que han pasado.

Saturnina Copetes por ser una persona fácil de querer y difícil de olvidar, por el frasco y las miles de risas que tu amistad ha provocado, porque sin ti no hubiese sido igual. A **Lluvia** por sus regaños y puestas en cintura, **Leonora** por su rudeza cursi que siempre termina en una sonrisa. A **Aldo** por las fiestas, las risas, por ser el amigo famoso que salió en periódicos nacionales, por sus consejos sobre la comida y los berrinches de gordo. A **Marisela** por sus consejos de belleza en plena crisis de escritura, por los buenos gustos compartidos (Laura Pausini) y los que no, por su amistad y porque también tuvo sus 5 minutos de fama. A **Fernando Alonso** por ser tan enfadoso, gruñón y un buen amigo.

A las “niñitas” del servicio social: **Estefany, Gaby y María José**, que con su ayuda facilitan muchas de las cosas que hacemos y con su amistad hacen gratas las largas estancias en el laboratorio (aunque se vayan a las 2). Y cómo olvidar a la inigualable e insuperable **Aleyka**, por tu amistad, sarcasmo y abrazos, te extrañamos.

Raquel... que entre tantas cosas vino a hacernos felices.

Por ultimo pero no menos importante, a todos los investigadores, compañeros y amigos del Departamento de Microbiología por las largas sesiones de seminarios y la colaboración.

A todos **MUCHAS GRACIAS.**

Tabla de contenido

	Página
Resumen.	ii
Abstract.	iii
Dedicatoria.	iv
Agradecimientos.	v
Lista de figuras.	ix
Lista de tablas.	x
Capítulo 1. Introducción.	2
1.1 Antecedentes.	4
1.1.1 Crecimiento polarizado <i>en hongos</i> filamentosos.....	4
1.1.2 Estructura y dinámica de los MTs.	5
1.1.3 Ciclos de reproducción de <i>N. crassa</i>	6
1.1.4 Migración y distribución nuclear.	8
1.1.5 Proteína AMI-1: homología y características.	9
1.2 Justificación.	12
1.3 Hipótesis.	12
1.4 Objetivos.	13
1.4.1 Objetivo general.	13
1.4.2 Objetivos específicos.	13
Capítulo 2. Materiales y métodos.	14
2.1 Cepas y medios de cultivo.	14
2.2 Análisis bioinformático.	15
2.3 Biología molecular	15
2.3.1 Diseño de oligonucleótidos.	15
2.3.2 Extracción de DNA genómico de <i>N. crassa</i>	15
2.4 Cepas transformantes.	16
2.4.1 Transformación de <i>N. crassa</i>	16
2.4.2 Selección de transformantes.	17
2.4.3 Obtención de homocariones.	17
2.5 Cruzas.....	18
2.5.1 Obtención de protoperitecios.	18
2.5.2 Producción de peritecios.	18
2.6 Caracterización de la cepa mutante $\Delta ami-1$	18
2.6.1 Tasa de elongación y micelio aéreo.....	18
2.6.2 Producción de biomasa.....	19
2.6.3 Tasa de conidiación.	20
2.6.4 Tasa de ramificación y diámetro de las hifas.	20
2.7 Observación de cepas etiquetadas con proteínas fluorescentes.	21
2.7.1 Colonias.	21
2.7.2 Conidios.	21
Capítulo 3. Resultados	23
3.1 Análisis bioinformático.	23
3.2 Caracterización de la mutante por delección de <i>ami-1</i>	24

Tabla de contenido (continuación)

	Página
3.2.1 Evaluación de la tasa de elongación, producción de micelio aéreo y biomasa en la mutante $\Delta ami-1$	24
3.2.2 Morfología de las hifas de las colonias de la mutante $\Delta ami-1$	26
3.2.3 Análisis de la reproducción asexual en la mutante $\Delta ami-1$	27
3.2.4 Formación de estructuras de reproducción sexual en la mutante $\Delta ami-1$	28
3.2.5 Dinámica de los núcleos en la mutante $\Delta ami-1$	30
Capítulo 4. Discusión	33
4.1 Análisis bioinformático.	33
4.2 Efecto de la falta de AMI-1 en <i>N. crassa</i>	33
4.2.1 Reproducción asexual en la mutante $\Delta ami-1$	33
4.2.2 Reproducción sexual en la mutante $\Delta ami-1$	34
4.2.3 Efectos de la eliminación de AMI-1 en el crecimiento vegetativo.	35
4.3 Dinámica de los núcleos en la cepa mutante $\Delta ami-1$	36
4.4 Dinámica de AMI-1 marcada con GFP.	36
Capítulo 5. Conclusión	37
Lista de referencias	38
Anexo	42

Lista de figuras.

Figura	Página
1	Crecimiento polarizado en hongos filamentosos.5
2	Estructura y dinámica de los MTs.....6
3	Ciclo vital de <i>N. crassa</i>8
4	Esquema que muestra los sitios de amplificación de los oligonucleótidos D1 y D2 en el DNA genómico de la cepa $\Delta ami-1$ y sustitución por recombinación homóloga.....16
5	Medición del crecimiento radial.....19
6	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas AMI-1 (<i>N. crassa</i>), ApsA (<i>A. nidulans</i>), AMI-1 (<i>P. anserina</i>) y MoAND1 (<i>M. oryzae</i>).23
7	Las secuencias correspondientes al dominio PH son muy conservadas en los cuatro organismos.24
8	Crecimiento radial y morfología de la colonia de las cepas WT y la mutante $\Delta ami-1$25
9	Producción de biomasa por peso seco por día en cepa WT y la mutante $\Delta ami-1$25
10	Micelio aéreo en las cepas WT y la mutante $\Delta ami-1$26
11	Diámetro de las hifas de la cepa de tipo silvestre y la mutante $\Delta ami-1$26
12	Frecuencia de ramas en las hifas principales. Abajo, magnificación de hifas de las cepas mutante y tipo silvestre.....27
13	Producción de conidios en la cepa WT y la mutante $\Delta ami-1$27
14	Observación de protoperitecios de las cepas WT y $\Delta ami-1$28
15	Formación de peritecios en las cruzas WT X WT, WT X $\Delta ami-1$ y $\Delta ami-1$ X WT.29
16	Frecuencia de peritecios observados en las cruzas. La cruzada WT x WT presentó en promedio 5.1 peritecios, mientras que en las cepas WT x $\Delta ami-1$ y $\Delta ami-1$ x WT fue 4.1 y 0.7 respectivamente.....29
17	Durante la formación de peritecios en la cepa $\Delta ami-1$ se observaron estructuras inusuales no reportadas con anterioridad y que no fueron vistas en la cepa WT.....30
18	En la gráfica se muestran datos que indican que en la cepa mutante $\Delta ami-1$ los núcleos se aproximan al ápice traspasando la zona de exclusión que claramente presenta la cepa WT.....30
19	Dinámica de los núcleos en las cepas WT y $\Delta ami-1$31
20	Frecuencia de núcleos por peritecio en las cepas $hH1::gfp$, $hH1::gfp/\Delta ami-1$ y $\Delta ami-1$32

Lista de tablas.

Tabla	Página
1 Lista de cepas empleadas.....	14
2 Nombre y secuencia de los oligonucleótidos empleados en la comprobación de la mutación.	15
3 Nomenclatura para designar una proteína o gen en los organismos mencionados en este trabajo.....	42

Capítulo 1. Introducción

El crecimiento y desarrollo celular en eucariotas dependen de la migración y posicionamiento de sus componentes celulares. Por ejemplo, los procesos de secreción son mediados por la liberación selectiva de vesículas que contienen enzimas, hormonas, precursores de la pared celular, entre otros metabolitos (Fischer and Timberlake, 1995). En la célula los movimientos de mayor relevancia son el desplazamiento nuclear y el movimiento del huso mitótico (Morris, 2000). En células animales la posición del huso mitótico define el plano de división celular, el cual es importante cuando la división es de tipo asimétrica (Gotta, Dong, Peterson, Lanier, and Ahringer, 2003).

En *Saccharomyces cerevisiae*, el movimiento es corto, ya que el núcleo sólo se mueve de la célula madre a la hija, mediante un proceso de acortamiento de los MTs provenientes del huso mitótico (Morris, 2000). En hongos filamentosos los núcleos recorren grandes distancias (Suelmann, Sievers, and Fischer, 1997; Suelmann and Fischer, 2000) debido a que las células son tubulares, generalmente con septos. La migración nuclear es también importante durante los procesos de cariogamia y cariocinesis (Dutcher and Hartwell, 1983), propios de la división celular durante el crecimiento vegetativo y reproducción tanto sexual como asexual.

Neurospora crassa es un hongo filamentoso multinucleado que se reproduce tanto sexual como asexualmente formando conidios y ascosporas respectivamente. Los conidios usualmente presentan dos núcleos, aunque el número de éstos puede ser variable. Lo que indica que no se requiere de una distribución nuclear precisa (Davis and Perkins, 2002; Davis, 2000). Por otra parte, la formación de ascosporas implica movimientos nucleares precisos desde la fertilización de estructuras llamadas protoperitecios, hasta la culminación del proceso de formación de las ascosporas contenidas en las ascas (Raju, 1992).

Los MTs así como las proteínas motoras cinesina y dineína y las proteínas vinculadas a la terminal positiva de los MTs, son componentes esenciales que participan en los procesos de migración y distribución nuclear (Oakley and Morris,

1980, 1981; Veith, Scherr, Efimov, and Fischer, 2005). En *Aspergillus nidulans* y *N. crassa* la polimerización de MTs ocurre en los cuerpos polares de los núcleos (SPB por sus siglas en inglés), desde este punto, los MTs son polimerizados en todas direcciones. En levaduras estos MTs se asocian a proteínas que se encuentran en el cuello de la gemación, permitiendo el anclaje de los mismos a la membrana.

Posteriormente los MTs se despolimerizan y se acortan dando lugar al movimiento del núcleo (Beach, Thibodeaux, Maddox, Yeh y Bloom, 2000). Los procesos de migración y distribución nuclear, pueden ser fácilmente estudiados en hongos filamentosos debido a su estructura multinucleada y la identificación de mutaciones no letales que alteran la distribución nuclear (Beckwith, Roghi, and Morris, 1995). El mecanismo por el cual se desplazan los núcleos en *N. crassa* durante el crecimiento vegetativo ha sido estudiado y se ha concluido que la fuerza más importante para este desplazamiento es el flujo citoplasmático (Ramos-García, Roberson, Freitag, Bartnicki-García, and Mouriño-Pérez, 2009), a pesar de ello el movimiento nuclear durante la mitosis es poco conocido en este hongo filamentosos. Se han identificado proteínas que podrían intervenir en el mecanismo de anclaje de los MTs astrales a la membrana y que podrían estar involucrados en el posicionamiento nuclear durante la mitosis y la meiosis.

Uno de los candidatos es la proteína ApsA de *A. nidulans* (Veith et al., 2005), como su homóloga AMI1 de *Podospora anserina* (Graña, Berteaux-Lecellier, Zickler, and Picard, 2000) y MoAND1 de *Magnaporthe oryzae* (Jeon, J., Rho, H., Kim, S., Kim, K. S., and Lee, Y. H., 2014) Estas proteínas están asociadas con la terminal positiva de los MTs, principalmente astrales y posiblemente están involucradas en el anclaje de los mismos a la membrana. Por lo que las mutantes por delección de estos genes presentan defectos en el movimiento de núcleos. Dichos defectos son evidentes al observar MTs curvos y alargados (Veith et al., 2005), así como en la incapacidad de autofecundación en *P. anserina* (Graña et al., 2000) y la falta de desarrollo del apresorio en *M. oryzae*.

En el presente estudio se ha identificado la proteína AMI-1 de *N. crassa* que es homóloga de ApsA de *A. nidulans*, AMI1 en *P. anserina* y MoAND1 en *M. oryzae*. Se

estudió la relación entre AMI-1 y los MTs del huso acromático durante la formación de ascas, conidios y crecimiento vegetativo en el hongo filamentoso *N. crassa*.

1.1 Antecedentes.

1.1.1 Crecimiento polarizado en hongos filamentosos.

El micelio de los hongos está compuesto por una red intrincada de estructuras microscópicas de forma cilíndrica llamadas hifas que presentan ramificaciones. Las hifas son multinucleadas y generalmente presentan septos. Estas crecen en un sólo punto, por eso forman células alargadas, a este tipo de crecimiento se le llama polarizado. El crecimiento polarizado se genera por el aporte continuo de componentes de la membrana y pared celular en la región apical (Bartnicki-Garcia and Lippman, 1969) y el reciclamiento de membrana en la región subapical (Read and Kalkman, 2003; Echauri-Espinoza, Callejas-Negrete, Roberson, Bartnicki-García and Mouriño-Pérez, 2012) (Fig. 1).

Un modelo que explica el crecimiento polarizado es el del Centro Suministrador de Vesículas (VSC, por sus siglas en inglés) (Bartnicki-Garcia, Bartnicki and Gierz, 1995; Gierz and Bartnicki-Garcia, 2001) que sugiere que el Spitzenkörper (Spk), una región en el ápice de las hifas, donde se concentran vesículas y diversos complejos proteicos, es el responsable de la polaridad de la célula (Bartnicki-Garcia and Lippman, 1969; Trinci, 1978; Harold, 1990, 1997; Riquelme, Gierz, and Bartnicki-Garcia, 2000; Bartnicki-Garcia, 2002). Los componentes que forman la pared celular son transportados a través del citoesqueleto a larga distancia hacia el Spk, donde, se concentran las vesículas secretoras y después son transportadas hacia la región apical. Se cree que estos movimientos se logran a través de los componentes principales del citoesqueleto: los filamentos de actina y los MTs.

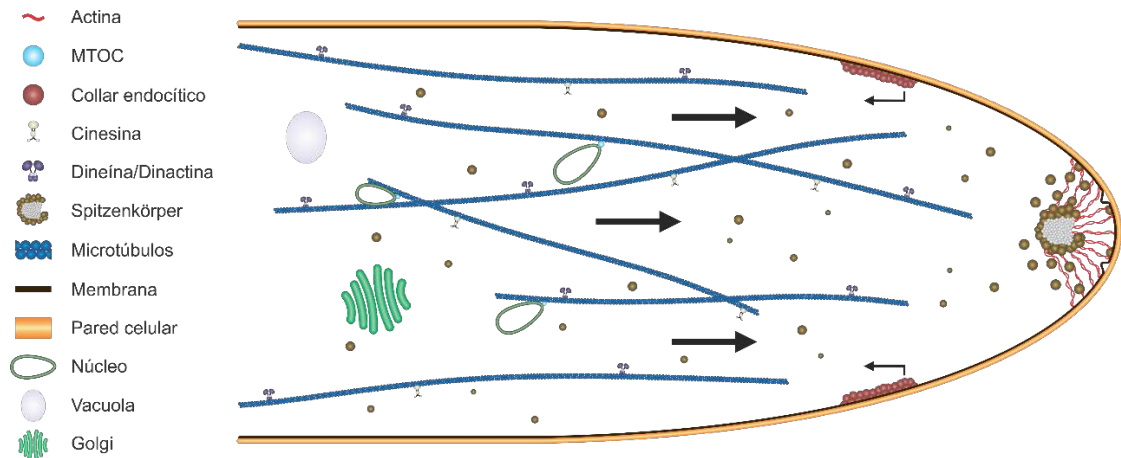


Figura 1. Crecimiento polarizado en hongos filamentosos. Diversos componentes celulares se desplazan a través de la hifa, tanto por el flujo citoplasmático como por el citoesqueleto. Modificado de Riquelme (2011).

1.1.2 Estructura y dinámica de los MTs.

El citoesqueleto microtubular participa en diversos procesos celulares como el mantenimiento de la forma, tráfico intracelular, así como también en la división nuclear. Los MTs por lo general están conformados de 13 protofilamentos en forma cilíndrica de aproximadamente 25 nm de diámetro. Dichos protofilamentos están compuestos por dímeros de proteínas globulares de 55 kDa que poseen sitios de unión al trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés) llamadas α y β -tubulina. La unión entre dímeros de tubulina es dependiente de la hidrólisis del ATP (en un proceso conocido como polimerización). La polimerización de los MTs se inicia a partir de un anillo de γ -tubulina localizado en los centros organizadores de MTs (MTOC, por sus siglas en inglés) (Conde and Cáceres, 2009).

La forma en la que se polimerizan los dímeros de tubulina establece y mantiene una polaridad en los MTs, dando lugar a un extremo negativo estable y un extremo positivo con una alta actividad de poli y despolimerización dependiente de la hidrólisis de ATP, este proceso es conocido como inestabilidad dinámica de los MTs (Desai and Mitchison, 1997). La inestabilidad dinámica de los MTs es caracterizada por el aumento y la disminución constante en la longitud de los MTs (catástrofe y rescate respectivamente), dichas variaciones son mediadas por la presencia de proteínas que facilitan la polimerización y despolimerización de dímeros de α - y β -tubulina.

La inestabilidad dinámica está involucrada en diversos procesos de desplazamiento intracelular de organelos y moléculas, tales como: la segregación de cromosomas y división nuclear. En la mayoría de las células en interfase la terminal negativa está asociada a los MTOC mientras que la terminal positiva es orientada a la periferia de la célula (en células animales) (Fig. 2).

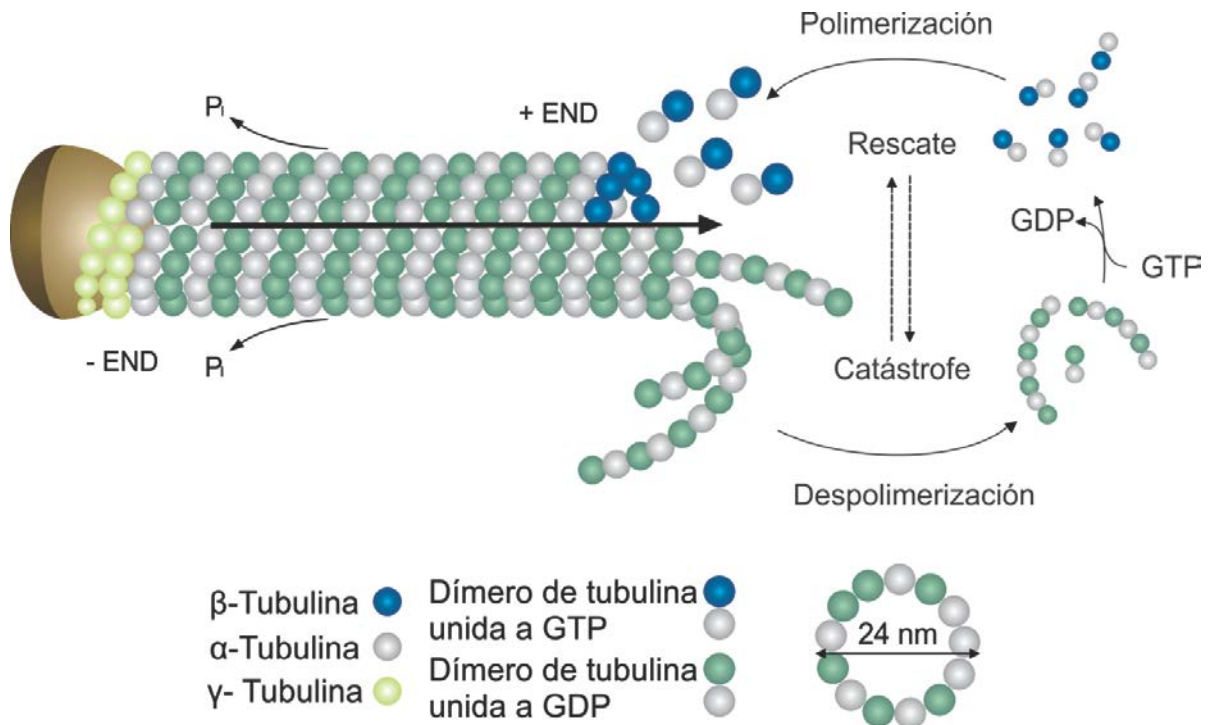


Figura 2. Estructura y dinámica de los MTs. El ensamble y desensamble de dímeros de tubulina genera un aumento y disminución constante en la longitud de los MTs. Esta inestabilidad está involucrada en diversos procesos de desplazamiento intracelular de organelos y moléculas. Modificado de Conde and Cáceres (2009).

1.1.3 Ciclos de reproducción de *N. crassa*.

Neurospora crassa es un hongo multinucleado que se reproduce tanto sexual como asexualmente formando estructuras de reproducción llamadas ascas en el primer caso y macroconidios en el segundo.

Durante la reproducción asexual, el ciclo circadiano promueve el desarrollo de hifas aéreas que en su parte distal se segmentan en estructuras llamadas conidióforos. Estos están formados por macroconidios (en *N. crassa* de color naranja intenso debido a los carotenoides, poco adherentes y muy hidrofóbicos) y microconidios

(Davis, 2000). Los macroconidios contienen uno o varios núcleos haploides cuya distribución es aleatoria, por lo que no se requiere una pérdida del estado sincitial. Los macroconidios de dos núcleos son los más abundantes (Davis, 2000). Los microconidios poseen un núcleo debido a que están involucrados en la fertilización durante la reproducción sexual, por lo que se requiere un control mayor en la distribución nuclear. Una vez que los macroconidios se han dispersado, estos germinan formando una estructura conocida como tubo germinal (a través del cual pueden desplazarse los componentes celulares) para continuar con su ciclo vital (Davis, 2000).

Por otra parte, la reproducción sexual en *N. crassa* requiere de dos tipos sexuales de apareamiento complementario, conocidos como *mat a* y *mat A* (determinados por formas alternativas del complejo genético de la región del tipo de apareamiento) (Davis, 2000). Estos tipos de apareamiento tienen la capacidad de comportarse como “hembra” al formar estructuras multicelulares llamadas protoperitecios (en condiciones de disminución de nitrógeno; Westergaard and Hirsch, 1954). Éstos se inician con la formación de un nudo de hifas muy denso que recubrirá células especializadas llamadas ascogonios (en los cuales el núcleo se divide diez o más veces sin aumentar el tamaño del peritecio generando hifas ascógenas; Raju, 1992). El ascogonio cumple la función de gameto femenino, del cual emergerán hifas que atravesarán la densa capa de micelio. Estas hifas especiales o tricóginos se fusionarán con los microconidios y permitirán el desplazamiento de los núcleos a través de ella hasta llegar al ascogonio, donde se fusionarán los núcleos de los dos tipos de apareamiento. Este proceso es la fertilización que dará lugar a la mezcla de material genético de los dos progenitores. Posterior a la cariogamia, se inicia la meiosis, en la que se requiere de una migración y distribución nuclear precisa (Davis, 2000). Se producen estructuras cilíndricas, llamadas ascas (200-400 ascas por peritecio) que en su interior darán lugar a las ascosporas. Las ascosporas son células uninucleadas de pared celular rígida y melanizada. Una vez que los peritecios alcanzan la madurez las ascosporas son lanzadas a través del ostiolo que es el orificio peritecial de salida (Fig. 3).

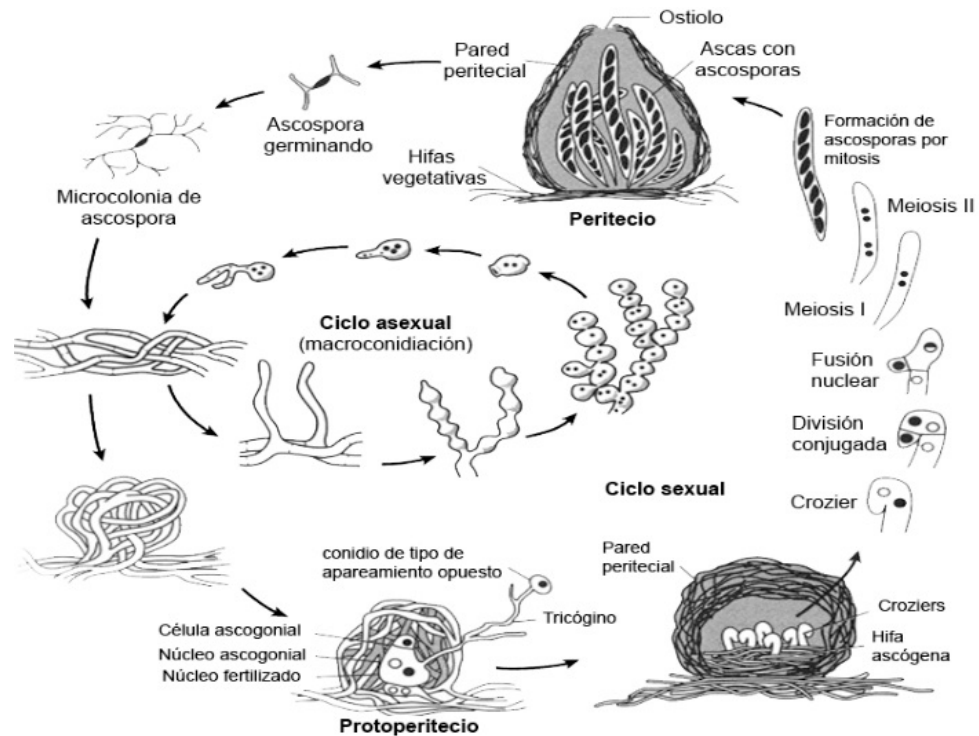


Figura 3. Ciclo vital de *N. crassa*. Durante el ciclo asexual se forman macroconidios en los cuales el número de núcleos puede ser variable, mientras que en el ciclo sexual la fertilización de un protoperitecio origina ascosporas las cuales son uninucleadas. Tomada y traducida de Davis, (2000).

1.1.4 Migración y distribución nuclear.

En hongos filamentosos, las proteínas asociadas a la terminal positiva de los MTs y proteínas motoras dependientes de éstos (como la dineína) participan en la migración y distribución nuclear (Oakland and Morris, 1980, 1981; Veith et al., 2005). Los núcleos migran largas distancias siguiendo el crecimiento apical, durante este proceso se dividen varias veces de manera asincrónica. Para que los procesos de migración y distribución nuclear ocurran, son necesarios elementos tales como, las proteínas motoras, los MTs y los sitios de anclaje de su terminal positiva y negativa.

En levaduras los MTs astrales provenientes de los SPB están en contacto transitoriamente con el córtex celular, el crecimiento continuo de los MTs causa el empuje del núcleo, mientras que la contracción de los filamentos tira del núcleo hacia el sitio de unión, dicha interacción es dependiente de la regulación del ciclo celular. En hongos filamentosos es un proceso más complejo por la cantidad de variables

involucradas, tales como, el número de núcleos, la presencia de diversos compartimentos, la regulación asincrónica de la división nuclear, entre otros.

Se conocen dos proteínas en *S. cerevisiae* involucradas en la migración y distribución nuclear, Num1p y Kar9p. Num1p permite el contacto de los MTs con el córtex, pero únicamente en la célula madre cuando ocurre el proceso de cariocinesis. Kar9p permite el anclaje de Num1p a la membrana plasmática y es independiente de los MTs, esta proteína está asociada al citoesqueleto de actina (Beach et al., 2000). ApsA de *A. nidulans* es una proteína homóloga a Num1p y fue localizada en la corteza celular. Aunque no hay evidencia directa de la asociación entre ApsA y la membrana plasmática, se ha sugerido que está involucrada con el anclaje de los MTs (Veith et al., 2005).

1.1.5 Proteína AMI-1: homología y características.

Mediante análisis bioinformáticos se ha encontrado en *N. crassa* un homólogo de la proteína ApsA de *A. nidulans*, AMI1 de *P. anserina* y MoAND1 de *M. oryzae* (Fischer and Timberlake, 1995; Graña et al., 2000; Jeon et al., 2014), que se ha denominado como AMI-1 por la cercanía filogenética de este organismo con *P. anserina*. Esta proteína tiene un dominio homólogo a la pleckstrina (PH), localizado en el extremo C-terminal. Este dominio regula la interacción del MT con la membrana. Es un dominio conservado en todos los ortólogos de la proteína ApsA (Gibson, Hyvönen, Musacchio, Saraste, and Birney, 1994; Fischer and Timberlake, 1995).

ApsA fue observada por inmunofluorescencia encontrándose en la corteza celular (Suelmann et al., 1997), su dinámica en vivo no se ha descrito. Se ha mostrado que ApsA tiene interacción con los MTs astrales uniéndolos a la corteza celular. Estos MTs son necesarios para la oscilación y el movimiento de husos mitóticos a lo largo de las hifas. En ausencia de ApsA, los husos mitóticos están inmóviles, sin embargo, los MTs no son necesarios para la migración posmitótica nuclear (Veith et al., 2005).

Se ha demostrado que defectos en la proteína ApsA resultan en MTs más largos y curvados, adicionalmente se ha observado letalidad sintética en combinación con

mutaciones convencionales de cinesina A ($\Delta kinA$) (Veith et al., 2005). Estos estudios indicaron que mutaciones en el gen *apsA* produce defectos en la distribución nuclear, ya que este gen está relacionado con la formación de conidios (esporulación asexual) en una etapa muy precisa del desarrollo del conidióforo, correspondiente a la transición entre los estados sincitial y celular (Clutterbuck, 1994), por lo que una distribución nuclear defectuosa durante los estadios de mitosis o meiosis podría derivar en organismos estériles. En *M. oryzae* se ha demostrado que defectos en la distribución nuclear genera conidióforos con un número irregular de núcleos por espora (Jeon et al., 2014).

En *A. nidulans*, la función de ApsA ha sido restringida a la migración nuclear durante la reproducción asexual, estudios sugieren que puede tener un papel durante la reproducción sexual, ya que defectos en el gen *apsA* producen esterilidad (Clutterbuck, 1994), aunque las implicaciones de ApsA en la reproducción sexual aún no han sido investigadas (Adams, Wieser, and Yu, 1998). Mientras que en *P. anserina* se han agrupado los efectos de la eliminación del gen *ami1* en tres clases: distribución anormal de núcleos en células multinucleadas, la falta de transmisión nuclear en la transición sincitial / celular, y la incapacidad de autofecundar. Los defectos en *M. oryzae* se han relacionado con la distribución nuclear durante la germinación, la formación de esporas, la formación de septos y la formación del apresorio (Jeon et al., 2014).

La eliminación del gen *apsA* mostró un efecto insignificante en el crecimiento polarizado (Fischer and Timberlake, 1995), genes bien caracterizados con un papel fundamental en la migración nuclear a nivel de crecimiento vegetativo son *nud* y *ro* en *A. nidulans* y *N. crassa* respectivamente (Xiang, Beckwith, and Morris, 1994). Acorde con lo visto en la cepa sin el gen *apsA*, la cepa con delección del gen *Moand1* no mostró efectos en el crecimiento polarizado. Jeon (2014) ha señalado que el defecto principal en esta cepa es la incapacidad de los núcleos de regresar a la espora (una vez que se ha formado el tubo germinal y varias rondas de mitosis han ocurrido) para desencadenar el proceso de autofagia, el cual se cree está involucrado con el proceso de formación del apresorio (Jeon et al., 2014).

En cepas con el gen *ami1* eliminado la distribución anormal de núcleos ocurre en los filamentos vegetativos (como en mutantes de *ApsA* en *A. nidulans*) aunque también en parte de las ascas impidiendo la formación correcta de ascosporas. En ascas WT, los núcleos que cooperan en la formación de ascosporas se colocan en estrecha proximidad por la disposición de los husos mitóticos postmeiosis; después de la división, cada par nuclear permanece vinculado por MTs astrales y deben migrar antes de la formación de ascosporas binucleadas (Thompson-Coffe and Zickler, 1992). Los MTs corticales, astrales y los husos mitóticos, así como los husos del cuerpo polar, parecen normales en cruces de cepas mutantes *ami1* con cepas de tipo silvestre. Los MTs y los filamentos de actina en conidióforos, también son normales en mutantes *apsA* de *A. nidulans* (Fischer and Timberlake, 1995). Por lo tanto, el papel de las proteínas *ApsA* y *AMI1* en el posicionamiento nuclear sigue siendo desconocido.

En la mutante por delección de *AMI1*, la falta de transmisión nuclear en la transición sincitial / celular se observa durante conidiación. Esta es también una característica en común con mutantes por delección de *apsA* (a pesar de que la formación de conidios es mucho más compleja en *A. nidulans* que en *P. anserina*). En mutantes *ami1* este tipo de defecto se encuentra también en otras dos etapas del ciclo de vida que implican una transición sincitial / celular: la formación del pico peritecial y de los croziers. El tercer tipo de defecto en mutantes de *ami1* es su incapacidad de autofecundar (Graia et al, 2000; Veith et al., 2005).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el citoesqueleto de MTs es importante en la división nuclear y/o celular, procesos esenciales de los cuales depende directamente la reproducción y el crecimiento de los organismos. En los hongos la reproducción parece estar estrechamente relacionada con los procesos de posicionamiento y migración nuclear.

1.2 Justificación.

Para el estudio de procesos celulares y moleculares se emplean organismos denominados modelo, el hongo filamentoso *N. crassa* es uno de estos organismos. Debido a que su genoma ha sido secuenciado completamente se facilita su manipulación genética, la velocidad de crecimiento es mayor que en otros hongos filamentosos, así como su tamaño lo que favorece la observación *in vivo* de la dinámica celular (Davis, 2000; 2002).

Adicionalmente, la migración y distribución nuclear son fácilmente estudiados en hongos filamentosos debido a su estructura multinuclear y la identificación de mutaciones no letales en *A. nidulans* y *N. crassa* que alteran la distribución nuclear (Beckwith et al., 1995), sin embargo, se conoce poco acerca de éstos, especialmente en el hongo filamentoso *N. crassa*. De la misma manera, aun cuando numerosas observaciones han demostrado que los movimientos nucleares son esenciales para el crecimiento y el desarrollo, tanto en eucariotas inferiores y superiores, ni la división, distribución y migración nuclear son claros durante el crecimiento vegetativo. Por ello es elemental el caracterizar la función y localización *in vivo* de proteínas asociadas a los MTs como AMI-1, para tratar de esclarecer la relación entre éstas durante los procesos de migración y distribución nuclear en la formación de ascas, conidios y crecimiento vegetativo en los hongo filamentosos, particularmente en *N. crassa*.

1.3 Hipótesis.

La proteína AMI-1 se localizará en la corteza celular interactuando con la membrana y los MTs astrales permitiendo el anclaje de éstos a la membrana, dando estabilidad a los núcleos durante su división en el crecimiento vegetativo. Igualmente estará vinculada a los procesos de mitosis y meiosis durante la reproducción sexual y asexual, permitiendo la migración y distribución de núcleos. Cepas con defectos en esta proteína generará hifas con distribución nuclear anormal y esterilidad.

1.4 Objetivos.

1.4.1 Objetivo general.

Determinar la localización y el papel de la proteína AMI-1 durante el crecimiento vegetativo, conidiación y reproducción sexual en *N. crassa*.

1.4.2 Objetivos específicos.

- Describir la distribución de la proteína AMI-1 durante el crecimiento vegetativo, la formación de conidios y de estructuras sexuales.
- Caracterizar fenotípicamente a la mutante por delección de *ami-1*.
- Describir la distribución de los núcleos y los MTs en la cepa mutante $\Delta ami-1$.

Capítulo 2. Materiales y métodos.

2.1 Cepas y medios de cultivo.

En la Tabla 1 se enlistan las cepas empleadas en este estudio. Las cepas se mantuvieron en medio mínimo de Vogel (MMV) (Vogel, 1956) sólido al 1.5%. Las cepas que contenían el gen de resistencia a la higromicina B (*hph*⁺) se crecieron en MMV adicionando higromicina B al medio de cultivo con una concentración final de 100 µg/ml, evitando el crecimiento de cepas de tipo silvestres.

Tabla 1. Lista de cepas empleadas. El número FGSC corresponde al número de inventario del Fungal Genetics Stock Center.

Nombre Interno	No. FGSC	Genotipo
WT	4200	Tipo silvestre
MTB-6	13375	<i>Mat A; Δami-1</i>
RMP22	---	<i>Mat a; hH1::gfp</i>
RMP23	---	<i>Mat a; bml::gfp</i>
RMP24	Este estudio	<i>hH1::gfp/ Δami-1</i>
RMP25	Este estudio	<i>bml::gfp/ Δami-1</i>

Las cepas transformantes de *N. crassa* se seleccionaron en medio MMV-FGS (2% Sales de Vogel, 1% agar, 10% solución FGS). La solución FGS se preparó con 20% de sorbosa, 0.5% de fructosa y 0.5% de glucosa (esterilizados por filtración usando un filtro para jeringa de 0.2 µm de poro).

Para los protoperitecios se emplearon placas con agar agua al 2%, colocando discos de 1 cm de diámetro de medio sintético de cruzas (MSC) bajo en nitrógeno (Westergaard and Mitchell, 1947). De la misma manera se utilizaron cajas Petri con MSC para dar seguimiento a la formación de peritecios entre la cepa de tipo silvestre y la mutante *Δami-1*. Los medios de cultivo fueron esterilizados bajo condiciones estándar (120°C a 18 lb de presión por 15 minutos).

2.2 Análisis bioinformático.

La proteína predictiva denominada AMI-1 fue identificada haciendo un BLAST (blastn; Nucleotide query/Nucleotide database) de la secuencia nucleotídica de la proteína ApsA de *A. nidulans* en la base de datos del Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>).

Posteriormente la secuencia fue analizada mediante Swiss Institute of Bioinformatics, denominado ExPasy en busca de dominios de interés que proporcionaron información acerca de la función y localización de la proteína AMI-1.

2.3 Biología molecular

2.3.1 Diseño de oligonucleótidos.

Las secuencias de los oligonucleótidos D1 y D2 (Tabla 2) se localizan 1 kb río arriba y río abajo de la señal de paro e inicio del marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) respectivamente. Éstos fueron diseñados con la finalidad de comprobar la delección del gen *ami-1* (Fig.6), así como para corroborar el estado homocarión de la cepa $\Delta ami-1$.

Tabla 2. Nombre y secuencia de los oligonucleótidos empleados en la comprobación de la mutación.

Nombre	Secuencia
D1	TGTGACAGCCAGCAAGCCGAA
D2	GTGGTGAACGACCTCATCCATCA

2.3.2 Extracción de DNA genómico de *N. crassa*.

El DNA genómico se extrajo de la cepa de tipo silvestre 4200 a partir de micelio crecido en medio líquido durante 72 h bajo condiciones de oscuridad. El micelio fue liofilizado en un liofilizador LABCONCO FreeZone 2.5 y macerado en un mortero de porcelana para posteriormente emplear el kit de extracción DNA *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen®), siguiendo el protocolo del fabricante. Finalizado el proceso de extracción, se realizó una electroforesis del DNA purificado en un gel de agarosa al 1%. El DNA que se obtuvo se almaceno a -20°C y se empleó posteriormente en amplificaciones por PCR.

2.3.3 Amplificación del casete de delección.

Los oligonucleótidos D1 y D2 (Tabla II) se diseñaron para amplificar por PCR desde 1000 pb río arriba y abajo del ORF respectivamente, en el caso de la cepa RMP21 amplifica el gen de resistencia a la higromicina unido a los flancos 5' y 3' (Fig. 4). La reacción de PCR se realizó con los amortiguadores de la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase con 2µL de DMSO 100% (New England BioLabs®). Las condiciones de la reacción fueron 94°C de temperatura inicial por 3 min, 30 ciclos de: 98°C para desnaturalización por 30 seg, 50°C de alineamiento por 30 seg y 72°C de elongación por 3 min; posterior a los 30 ciclos se dejó un paso de 5 min a 72°C y uno final de 16°C por tiempo indefinido.

El casete de delección se empleó para transformar las cepas *hH1::gfp* y *mbl::gfp* con la finalidad de obtener el marcaje de los núcleos y microtúbulos con GFP, en un fondo mutante $\Delta ami-1$.

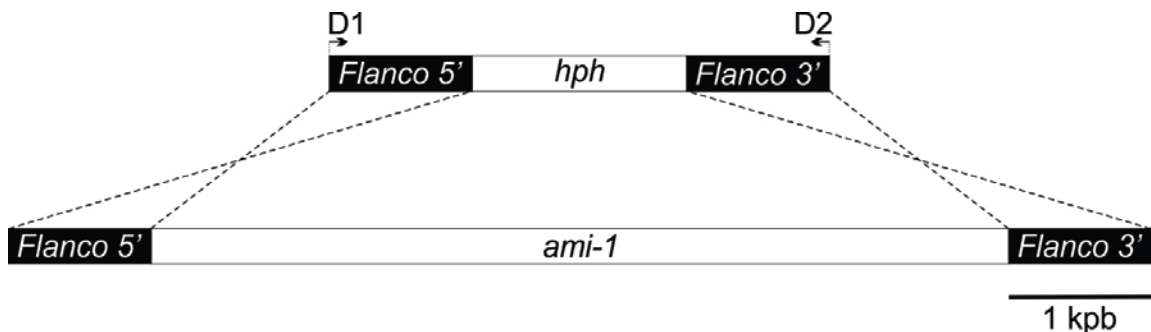


Figura 4. Esquema que muestra los sitios de amplificación de los oligonucleótidos D1 y D2 en el DNA genómico de la cepa $\Delta ami-1$ y sustitución por recombinación homóloga.

2.4 Cepas transformantes.

2.4.1 Transformación de *N. crassa*.

Una vez obtenido el casete de delección por PCR, se mezclaron de 5-10 µl de producto de PCR purificado a una concentración de 72 ng µL⁻¹ con 90 µl de la suspensión de conidios 2.5 x 10⁹ células ml⁻¹ de las cepas Mat a; *hH1::gfp* y Mat a; *bml::gfp* en un tubo estéril de 1.5 ml respectivamente, y se transfirieron en una celda de electroporación estéril de 0.2 cm (Precision Electroporation Cuvettes, Daigger®) y se incubó en hielo 10-15 minutos. Se utilizó un electroporador Gene Pulser Xcell

(Biorad®) usando el siguiente protocolo: 600 Ohms, 25 μ FD y 1.5 kV para obtener un tiempo constante entre 12 y 14 milisegundos. Inmediatamente después del pulso se añadieron 900 μ l de sorbitol (1M) y se sembraron en cinco cajas Petri (por cepa) con medio MMV-FGS adicionado con higromicina B como marcador de selección. Las placas se incubaron a 30°C hasta observar colonias.

2.4.2 Selección de transformantes.

Se aislaron colonias de las placas con MMV-FGS e higromicina B pasándolas a tubos de borosilicato conteniendo 1.5 ml de MMV sólido inclinal. Las cepas se observaron con el microscopio confocal láser de barrido Olympus (Olympus LX81 con un escáner Fluoview FV1000) con filtro de excitación de 488 nm y 507 nm de emisión y un objetivo de 60X de 1.4. A.N. Se utilizó la técnica de bloque de agar invertido para realizar las observaciones (Hickey et al. 2004).

2.4.3 Obtención de homocariones.

La obtención de homocariones se llevó a cabo inoculando las cepas RMP24 y RMP25 en tubos de borosilicato con un medio inclinado que induce la formación de microconidios compuesto por una solución de sacarosa/agar (sacarosa 0.55%, agar 2%) al 90%, MSC al 10% y ácido yodoacético (IAA) al 1%. Los tubos inoculados se incubaron a 25°C durante 10 d con fotoperiodo (luz/obscuridad) de 12 h. Pasado el periodo de incubación, los microconidios fueron recuperados añadiendo 5-10 ml de agua destilada estéril a los tubos con conidios y se agitaron vigorosamente. El líquido se pasó por un embudo de vidrio con un filtro de poro de 2 μ m. El producto resultante se pasó a un tubo de polipropileno de 50 ml que posteriormente se centrifugó durante 5 min a 5,000 rpm a 4°C. Se eliminó volumen del sobrenadante dejando de 2-3 ml como volumen final. En cajas petri con MMV-FGS se inocularon mediante la técnica de plaqueo con 50 μ l de una solución de conidios (0.5×10^8).

2.5 Cruzas

2.5.1 Obtención de protoperitecios.

Para observar la morfología de los protoperitecios, éstos se obtuvieron inoculando las cepas 4200 y $\Delta ami-1$ en placas de petri con 25 ml de medio Agar/Agua (agar 2%) incubadas a 30°C por 2 d. Una vez que las cepas colonizaron, en las cajas se colocaron 5 discos de 1 cm de diámetro de MSC para inducir la formación de protoperitecios. El medio Agar/Agua pobre en nutrientes permite el desarrollo del hongo disminuyendo la conidiación, lo que facilita la observación de los protoperitecios empleando el microscopio Olympus VANOX-S usando el objetivo de 4x. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Olympus DP70.

2.5.2 Producción de peritecios.

Las cepas 4200 y $\Delta ami-1$ fueron inoculadas (1×10^6 conidios ml^{-1}) en placas de Petri con 25 ml de MSC y se incubaron a 25°C por 3 d con la finalidad de promover la formación de protoperitecios. Las cepas fueron revisadas con el estereoscopio Olympus SZX12 a diferentes aumentos para corroborar la presencia de protoperitecios en ambas cepas. Posterior a la confirmación de la presencia de protoperitecios, las cajas fueron inundadas con 2 ml de dos soluciones de conidios a la misma concentración (2.63×10^8 células ml^{-1}) de manera cruzada, es decir que las cajas con la cepa 4200 fueron inundadas con conidios (1×10^6 conidios ml^{-1}) de la cepa $\Delta ami-1$ y las cajas con la cepa $\Delta ami-1$ fue inundada con conidios (1×10^6 conidios ml^{-1}) de la cepa 4200. En este experimento las cepas inoculadas en las cajas (micelio) fueron llamadas receptoras, mientras que las empleadas para inundar (conidios) se nombraron como donadoras. Las imágenes fueron tomadas en el estereoscopio Olympus SZX12 usando una cámara Olympus DP70.

2.6 Caracterización de la cepa mutante $\Delta ami-1$.

2.6.1 Tasa de elongación y micelio aéreo.

La tasa de elongación fue medida inoculando la misma cantidad de conidios (2×10^8 conidios ml^{-1}) tanto de la cepa de tipo silvestre como de la mutante en cajas Petri con MMV. La primera medición se realizó pasadas las primeras 12 h de haber sido inoculada y se marcó el borde de la colonia con un plumón permanente, el proceso

se repitió cada 4 h hasta que la cepa silvestre llenó la caja. Durante todo el proceso las cajas fueron incubadas a 30°C en oscuridad. Posteriormente se midió el crecimiento desde un extremo de la caja hasta cada una de las marcas del borde de la colonia (Fig. 5).

Para el micelio aéreo las cepas WT y $\Delta ami-1$ fueron inoculadas en tubos de borosilicato con 1 ml de MMV (sin inclinar). Se dejaron crecer a 30°C durante 72 h en condiciones de oscuridad.

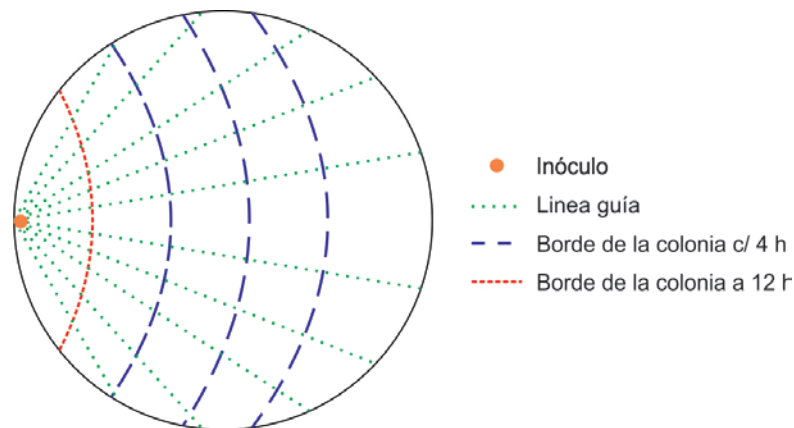


Figura 5. Medición del crecimiento radial. El esquema muestra el marcado del borde de la colonia durante su crecimiento, así como la plantilla con la cual se trazaron líneas perpendiculares al borde de la colonia para formar intersecciones usadas como referencia para tomar las medidas de crecimiento.

2.6.2 Producción de biomasa.

Para la obtención de biomasa tanto de la cepa de tipo silvestre como de la cepa $\Delta ami-1$, se inocularon 10 μl de una concentración de conidios igual (2×10^8 conidios ml^{-1}) de cada una de las cepas en matraces con 100 ml de MMV líquido. Los matraces se incubaron a 30°C en agitación constante a 150 rpm en condiciones de oscuridad por 72 h. En ambos casos se hicieron tres réplicas.

El micelio se recuperó en condiciones asépticas, filtrando en un embudo Buchner en un matraz Kitasato usando una bomba de vacío para retirar el exceso de líquido. Las muestras se colocaron en un tubo de 50 ml y se liofilizaron. Adicionalmente se introdujeron tubos vacíos al liofilizador que se emplearon como referencia para determinar el peso por diferencia.

2.6.3 Tasa de conidiación.

En el caso de la cuantificación de conidios, ésta se realizó inoculando 25 μl de 2×10^8 conidios ml^{-1} de las cepas WT y $\Delta\text{ami-1}$ en matraces con 50 ml de MMV que se incubaron a 30°C durante tres d en obscuridad para después mantenerlos expuestos a la luz a temperatura ambiente durante dos d.

Los conidios se recuperaron agregando 50 ml de agua destilada estéril, agitando vigorosamente el matraz para desprender los conidios. El sobrenadante se filtró con tela estéril en un tubo de 50 ml y se centrifugó por 5 min a 5,000 rpm. El concentrado de conidios se lavó tres veces con sorbitol 1 M estéril y se resuspendió en 80 μl de la misma solución de sorbitol.

Del concentrado de conidios de cada cepa se hizo una dilución 1:1000 bajo condición estéril, se tomaron 10 μl y se colocaron en una cámara de Neubauer (0.1000 mm x 0.0025 mm) para realizar el conteo en los cuadrantes y determinar la concentración empleando la fórmula:

$$[c] = \frac{\text{Total de células contadas (10,000)}}{\text{Número de cuadrados}} \quad (1)$$

Después del conteo se prepararon soluciones igualando las concentraciones empleando la fórmula:

$$[c]_i \cdot [v]_i = [c]_f \cdot [v]_f \quad (2)$$

En donde c_i es la concentración inicial, v_i es el volumen inicial, c_f y v_f corresponden a la concentración y el volumen final respectivamente.

2.6.4 Tasa de ramificación y diámetro de las hifas.

En este caso, las cepas WT y $\Delta\text{ami-1}$ se inocularon en el extremo de una caja Petri con MMV y se dejaron crecer por 16-18 h. Los bordes de las cepas se observaron y se contaron ramificaciones existentes entre el ápice y 500 μm hacia la región posterior en hifas principales. Este proceso se realizó contando 50 hifas en 3 cajas Petri por cada cepa usando un estereoscopio Olympus SZX12 con una cámara Olympus DP70 con un aumento de 32x.

El diámetro de las hifas se midió creciendo las cepas anteriormente mencionadas en cajas Petri (por triplicado) con MMV durante 16 h a 30°C. Las cepas se colocaron en porta objetos mediante la técnica del bloque invertido y se observaron en el microscopio confocal de barrido láser LSM510 META Carl Zeiss; usando microscopía de contraste de fases. De cada una de las muestras se contaron 100 hifas maduras a las cuales se les midió el diámetro en la zona subapical usando el programa LSM Image®.

2.7 Observación de cepas etiquetadas con proteínas fluorescentes.

2.7.1 Colonias.

Para la observación de las cepas en el microscopio confocal láser de barrido Olympus (Olympus LX81 con un escáner Fluoview FV1000) con filtro de excitación de 488 nm y 507 nm de emisión y un objetivo de 60X con 1.4 A. N.. Las cepas etiquetadas con proteínas fluorescentes fueron inoculadas en el extremo de una placa con MMV 1.5% sólido y incubaron de 14-16 h a 30°C. Una vez que las cepas crecieron, se cortó un bloque de agar y se colocó en un cubre objetos en el cual se dejaron recuperar durante 20 min a 30°C.

2.7.2 Conidios.

Al igual que las colonias, los conidios se observaron en el microscopio confocal láser de barrido Olympus igual a lo descrito anteriormente. Los conidios fueron observados con la finalidad de hacer un conteo de núcleos en cada espora. Se inocularon 100 µl de las cepas *hH1::gfp* y *hH1::gfp/Δami-1* a una concentración de 1.5×10^8 conidios ml⁻¹ en placas con MMV. Adicionalmente se tiñeron los núcleos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) en la cepa mutante *Δami-1*. Se tomaron 200 µl de conidios se fijaron con una solución de etanol (70%)-ácido acético (3:1) durante 15 min. Posteriormente se centrifugaron por 1 min a 3,000 rpm a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Después de desechar el sobrenadante del último lavado, se agregaron 50 µl de DAPI a 0.5 µM y se incubaron por 15 min en oscuridad. Se centrifugó, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en agua destilada estéril, este lavado se repitió

dos veces más y finalmente se resuspendieron los conidios en 200 μ l de agua destilada estéril.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Análisis bioinformático.

La secuencia peptídica de AMI-1 muestra identidad con la de las proteínas ApsA (42%), AMI1 (41%) y MoAND1 (40%) de *A. nidulans*, *P. anserina* y *M. oryzae* respectivamente (Fig. 6). Estas proteínas poseen un dominio PH altamente conservado (Fig. 7) en la región C-terminal.

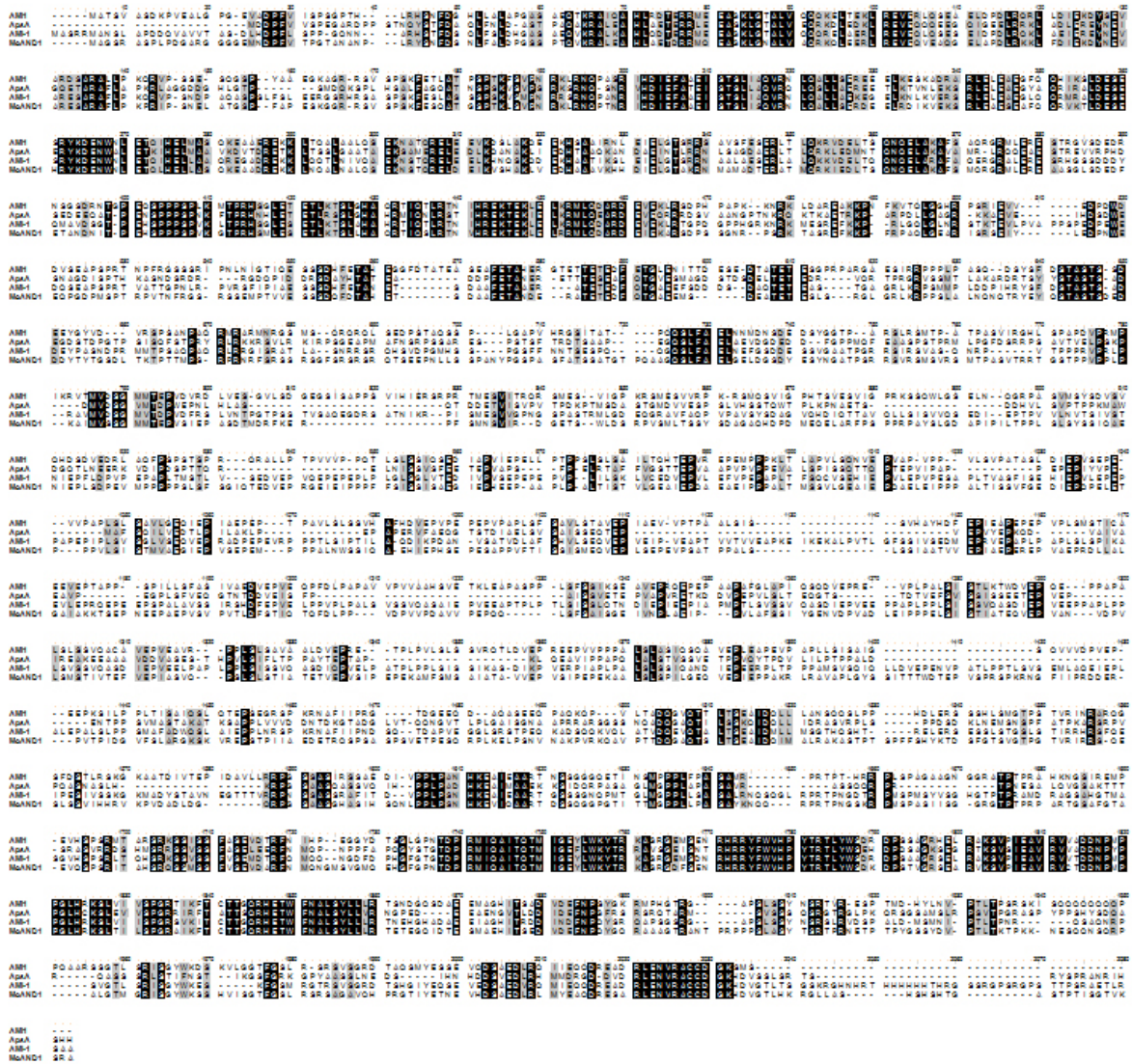


Figura 6. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas AMI-1 (*N. crassa*), ApsA (*A. nidulans*), AMI-1 (*P. anserina*) y MoAND1 (*M. oryzae*). La secuencia de las proteínas muestra regiones conservadas.

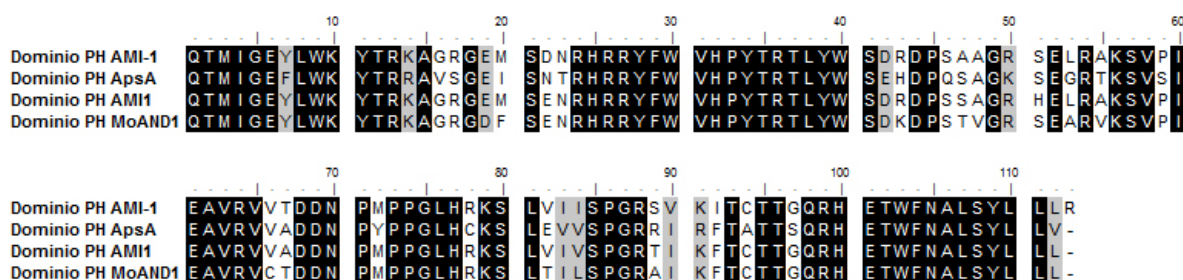


Figura 7. Las secuencias correspondientes al dominio PH son muy conservadas en los cuatro organismos.

3.2 Caracterización de la mutante por delección de *ami-1*.

3.2.1 Evaluación de la tasa de elongación, producción de micelio aéreo y biomasa en la mutante $\Delta ami-1$.

Con el fin de determinar si la ausencia del gen *ami-1* producía anomalías en el crecimiento, se evaluó la tasa de elongación, producción de micelio aéreo y biomasa. Se observó que la cepa mutante $\Delta ami-1$ presentó una tasa de elongación de las hifas vegetativas 34.72% menor a la cepa WT. Esta mutante mostró una velocidad de elongación promedio de 29.89 $\mu\text{m min}^{-1}$ comparado con la velocidad de la cepa WT que fue de 40.3 $\mu\text{m min}^{-1}$ (Fig. 6). Adicional al crecimiento vegetativo, se midió la producción total de biomasa por d, encontrándose que la mutante $\Delta ami-1$ tenía una reducción de masa producida de 76.92% comparado con la cepa WT (Fig. 7). En lo referente a la producción de micelio aéreo, no se observó diferencia en ambas cepas (Fig. 8), sin embargo, en la mutante $\Delta ami-1$ se ve una coloración más anaranjada de los conidios.

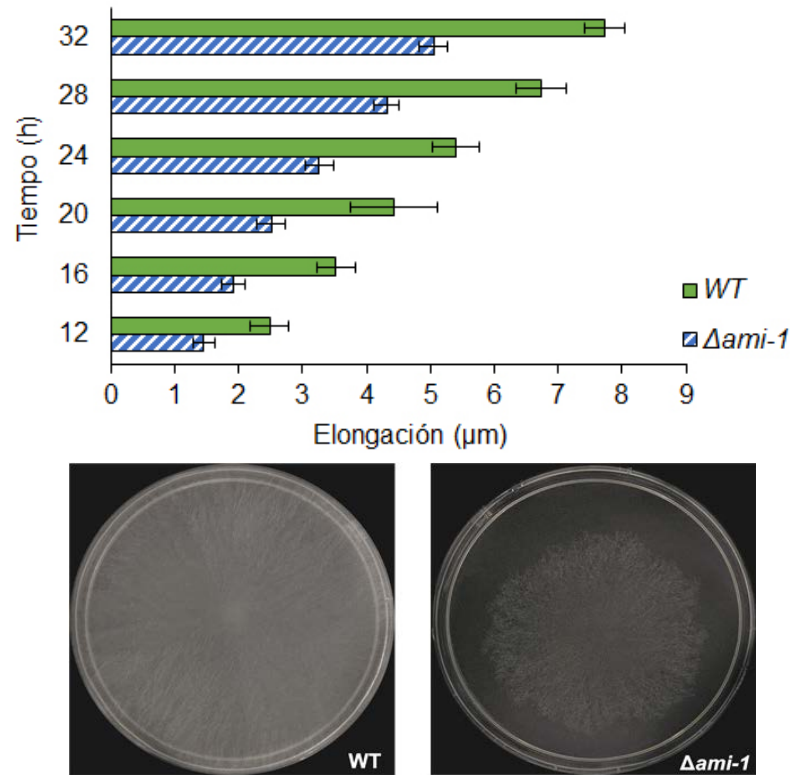


Figura 8. Crecimiento radial y morfología de la colonia de las cepas WT y la mutante $\Delta ami-1$. La velocidad de crecimiento radial en la cepa mutante $\Delta ami-1$ fue un 34.7% menor. Cepas con 24 h de incubación. La barra de error corresponde al intervalo de confianza 95% (n= 6).

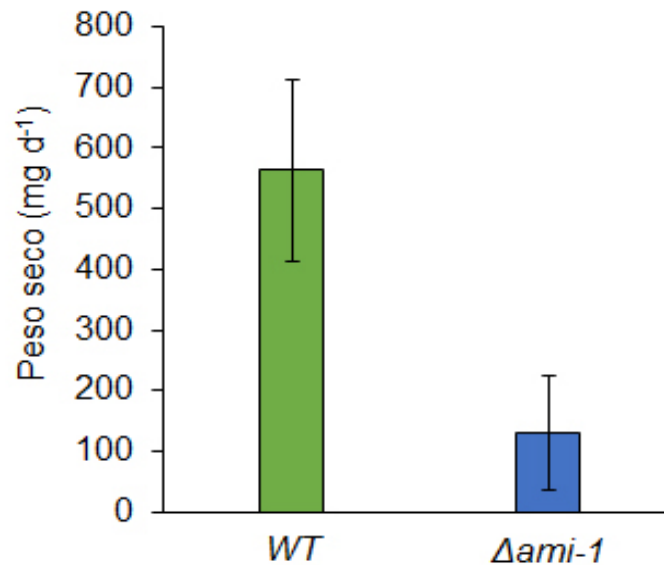


Figura 9. Producción de biomasa por peso seco por día en cepa WT y la mutante $\Delta ami-1$. La barra de error corresponde al intervalo de confianza 95% (n=6).

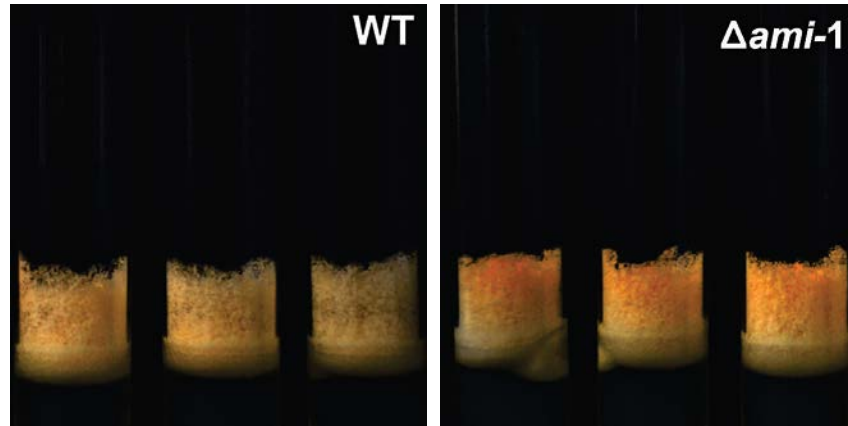


Figura 10. Micelio aéreo en las cepas *WT* y la mutante $\Delta ami-1$. Cepas a 72 h de incubación.

3.2.2 Morfología de las hifas de las colonias de la mutante $\Delta ami-1$.

Se midió el diámetro de las hifas de la mutante $\Delta ami-1$ y la cepa *WT*. Las hifas en la mutante $\Delta ami-1$ tuvieron un diámetro promedio de $6.06 \pm 0.2 \mu\text{m}$ y cepa *WT* de $8.31 \pm 0.25 \mu\text{m}$, lo cual representa una reducción del 27.07% (Fig. 9). En cuanto al número de ramificaciones se observó una disminución en la mutante $\Delta ami-1$. El número promedio de ramas en las hifas de la mutante fue de una a dos, mientras que en la cepa silvestre fue de tres ramificaciones, lo cual corresponde a una disminución del 31.42% en la cepa $\Delta ami-1$ (Fig. 10).

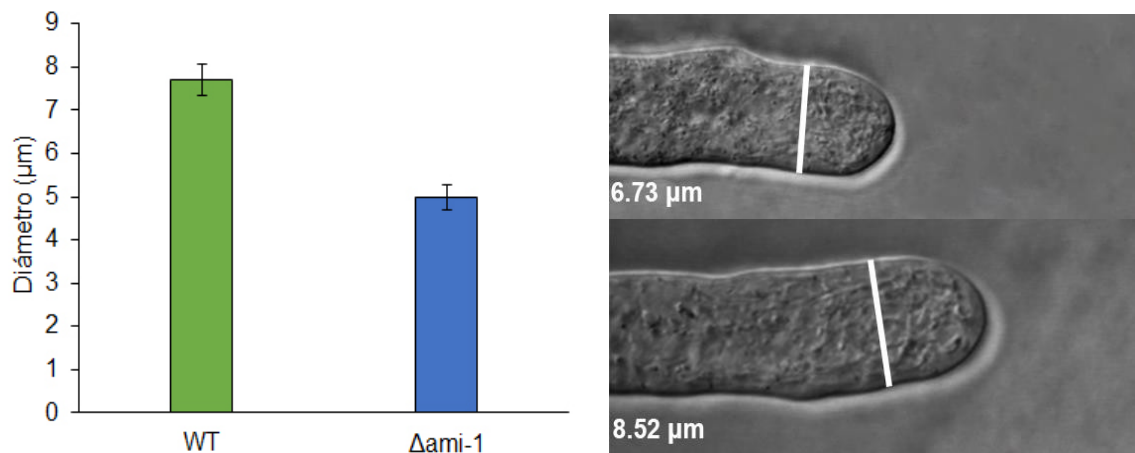


Figura 11. Diámetro de las hifas de la cepa de tipo silvestre y la mutante $\Delta ami-1$. A la derecha imágenes por microscopía de contraste de fases. La barra de error corresponde al intervalo de confianza 95% ($n=30$).

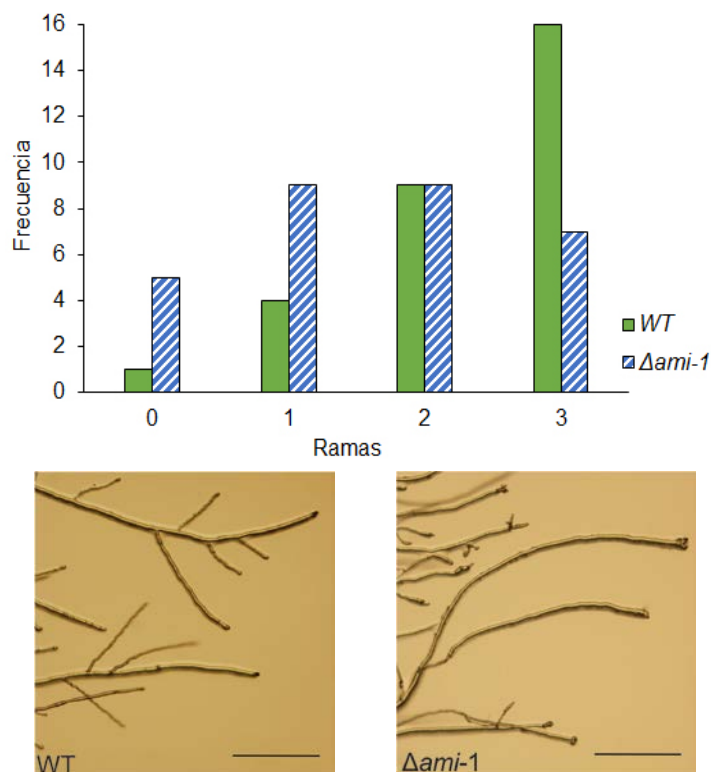


Figura 12. Frecuencia de ramas en las hifas principales. Abajo, magnificación de hifas de las cepas mutante y tipo silvestre. Escala 500 μm .

3.2.3 Análisis de la reproducción asexual en la mutante $\Delta ami-1$.

Con el fin de determinar si la delección del gen $\Delta ami-1$ afectaba a la reproducción asexual, se analizó, la producción, morfología y distribución de los núcleos en los conidios. La concentración de conidios en la mutante $\Delta ami-1$ fue de 2.37×10^8 conidios ml^{-1} , lo que corresponde a una disminución del 21.7% con respecto a la cepa WT (3.03×10^8 conidios ml^{-1}) (Fig. 11).

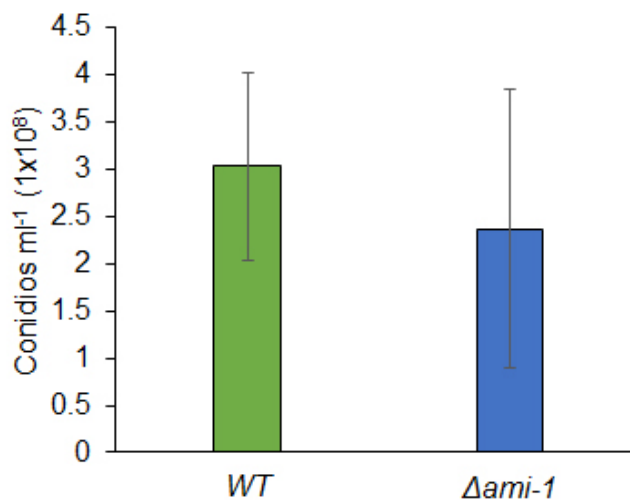


Figura 13. Producción de conidios en la cepa WT y la mutante $\Delta ami-1$. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza 95% (n=3).

3.2.4 Formación de estructuras de reproducción sexual en la mutante $\Delta ami-1$.

El seguimiento de la formación y crecimiento de estructuras de reproducción sexual se realizó para determinar anomalías durante el ciclo sexual. Este estudio se dividió en dos etapas: formación de protoperitecios y formación de peritecios.

Durante la formación de protoperitecios, no se observaron diferencias morfológicas entre la cepa mutante $\Delta ami-1$ y los de la cepa WT (Fig. 12).

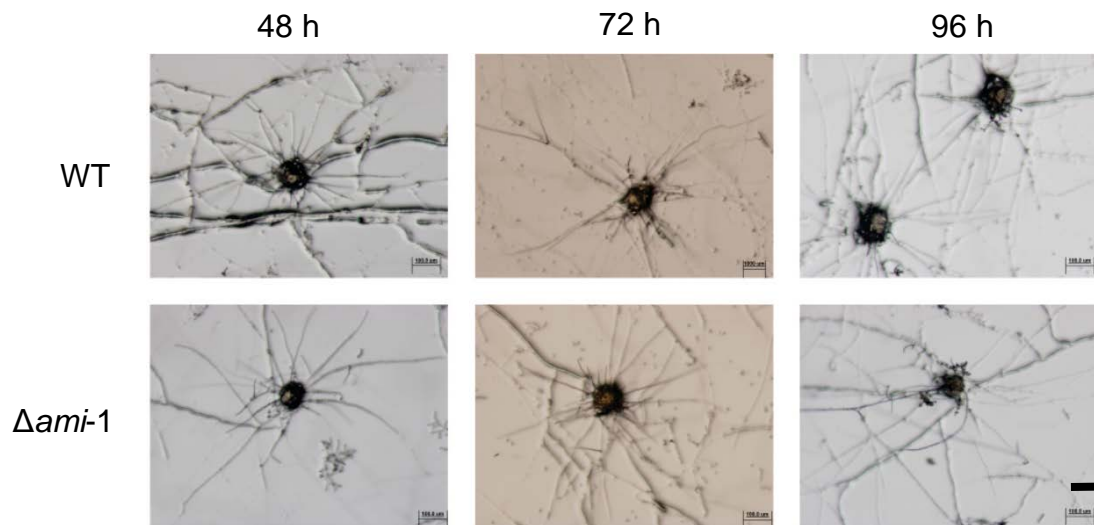


Figura 14. Observación de protoperitecios de las cepas WT y $\Delta ami-1$. Durante 96 horas de observación no se encontraron diferencias morfológicas entre los protoperitecios de la cepa mutante y la de tipo silvestre. Escala 100 μ m.

Con respecto a la formación de peritecios, los resultantes de la cruce entre las cepas WT y $\Delta ami-1$ (WT x $\Delta ami-1$; cuando la cepa de WT es empleada como receptora y la mutante $\Delta ami-1$ es empleada como donadora) mostraron una diferencia del 19.1% con respecto a los obtenidos de la cruce entre cepas de tipo silvestre (WT x WT) (Fig. 13). La cruce entre las cepas $\Delta ami-1$ y WT ($\Delta ami-1$ x WT; cuando la cepa $\Delta ami-1$ es empleada como receptora y WT es empleada como donadora) produjo peritecios que carecían de hifas periteciales, así como se observaron en menor abundancia (84.5%) que los producidos por las cruces WT x WT (Fig. 14). Sin embargo en la cepa $\Delta ami-1$ se encontraron estructuras anormales no identificadas que no fueron registradas en la cepa de tipo silvestre (Fig. 15).

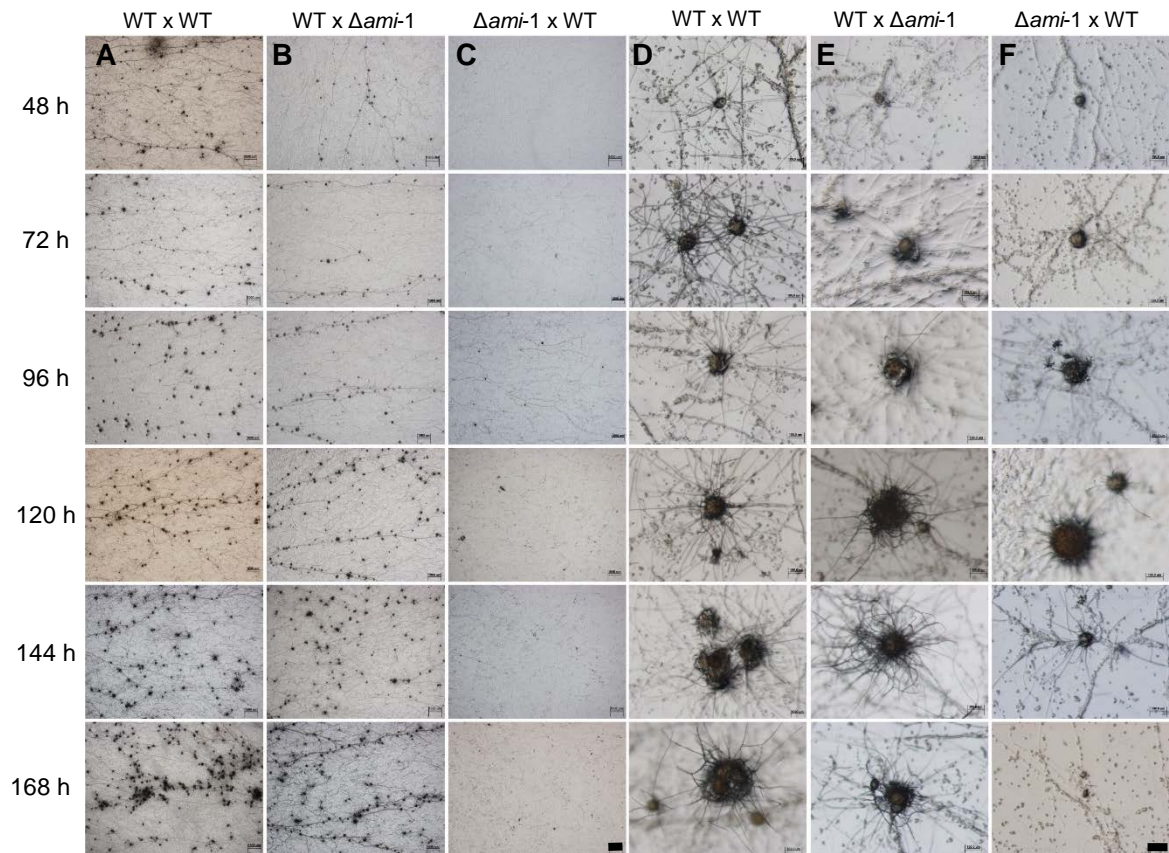


Figura 15. Formación de peritecios en las cruces WT X WT, WT X $\Delta ami-1$ y $\Delta ami-1$ X WT. Línea de tiempo muestra la disminución en la formación de peritecios en la cruz $\Delta ami-1$ X WT (A-C). (D-F) Muestra la magnificación de peritecios de las mismas cruces. Barra (A-C) 1000 μ m, (D-F) 100 μ m.

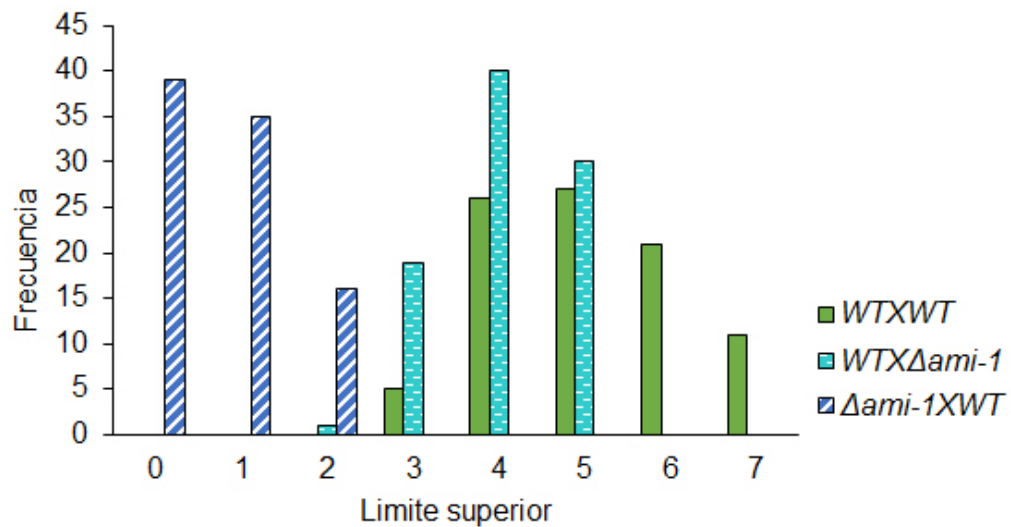


Figura 16. Frecuencia de peritecios observados en las cruces. La cruz WT x WT presentó en promedio 5.1 peritecios, mientras que en las cepas WT x $\Delta ami-1$ y $\Delta ami-1$ x WT fue 4.1 y 0.7 respectivamente.

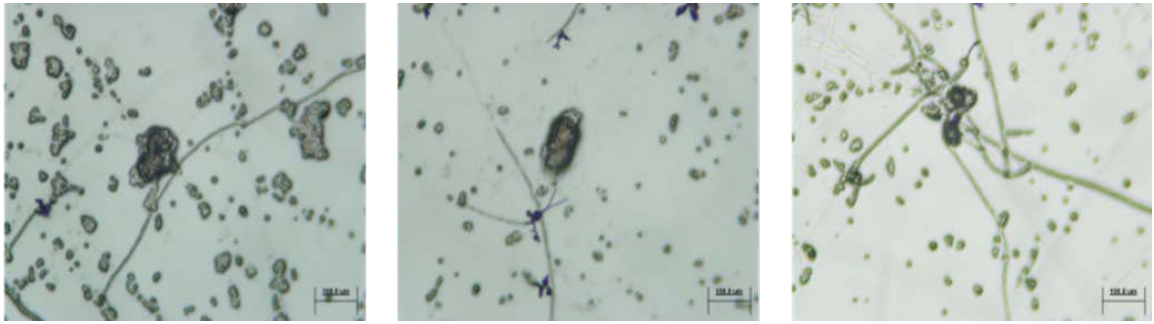


Figura 17. Durante la formación de peritecios en la cepa $\Delta ami-1$ se observaron estructuras inusuales no reportadas con anterioridad y que no fueron vistas en la cepa WT. Escala 100 μm .

3.2.5 Dinámica de los núcleos en la mutante $\Delta ami-1$.

Se realizaron observaciones en el microscopio confocal, de hifas de la cepa mutante $\Delta ami-1$ que tenía los núcleos etiquetados con GFP ($hH1::gfp/\Delta ami-1$) para conocer si la proteína AMI-1 estaba involucrada en la organización de los núcleos en *N. crassa*. En las regiones cercanas a la punta de la hifa se observó que el desplazamiento de los núcleos estaba ligeramente afectado (Fig. 16).

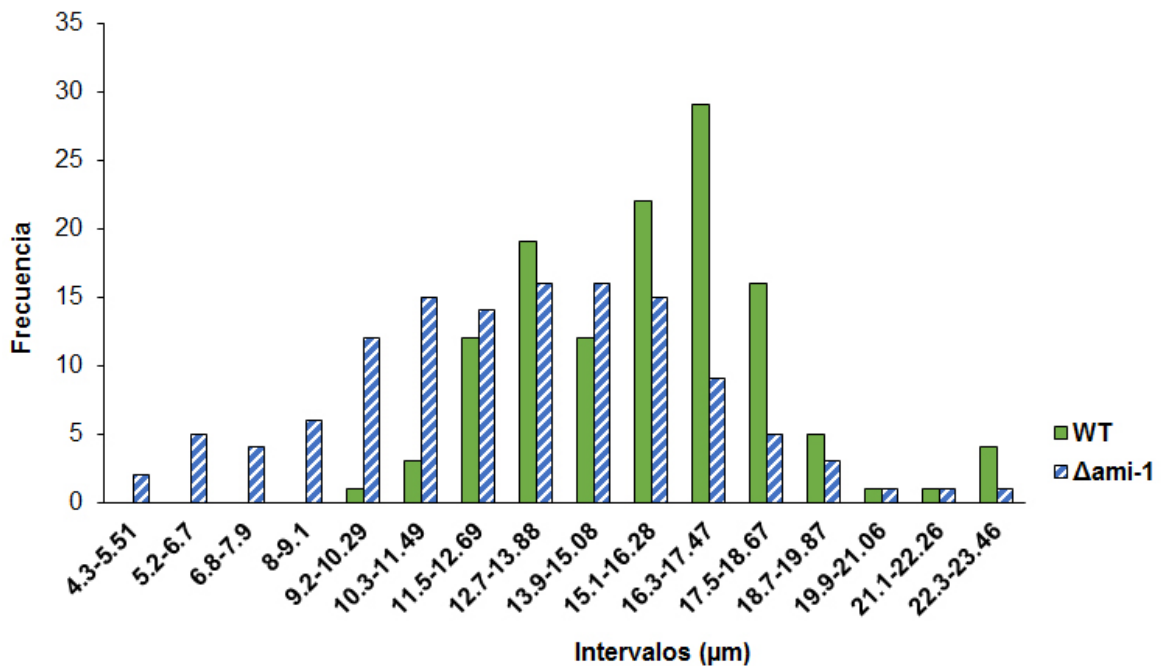


Figura 18. En la gráfica se muestran datos que indican que en la cepa mutante $\Delta ami-1$ los núcleos se aproximan al ápice traspasando la zona de exclusión que claramente presenta la cepa WT.

En la cepa silvestre con los núcleos marcados con GFP se observó una zona de exclusión (distancia desde el ápice hasta el primer núcleo) de $15.72 \pm 1.3 \mu\text{m}$, mientras que en la mutante $\Delta ami-1$ fue de $12.86 \pm 1.81 \mu\text{m}$. Además, en la mutante $\Delta ami-1$ se observaron núcleos que se mueven cercanamente al ápice por periodos cortos (Fig. 17 B, flechas rojas).

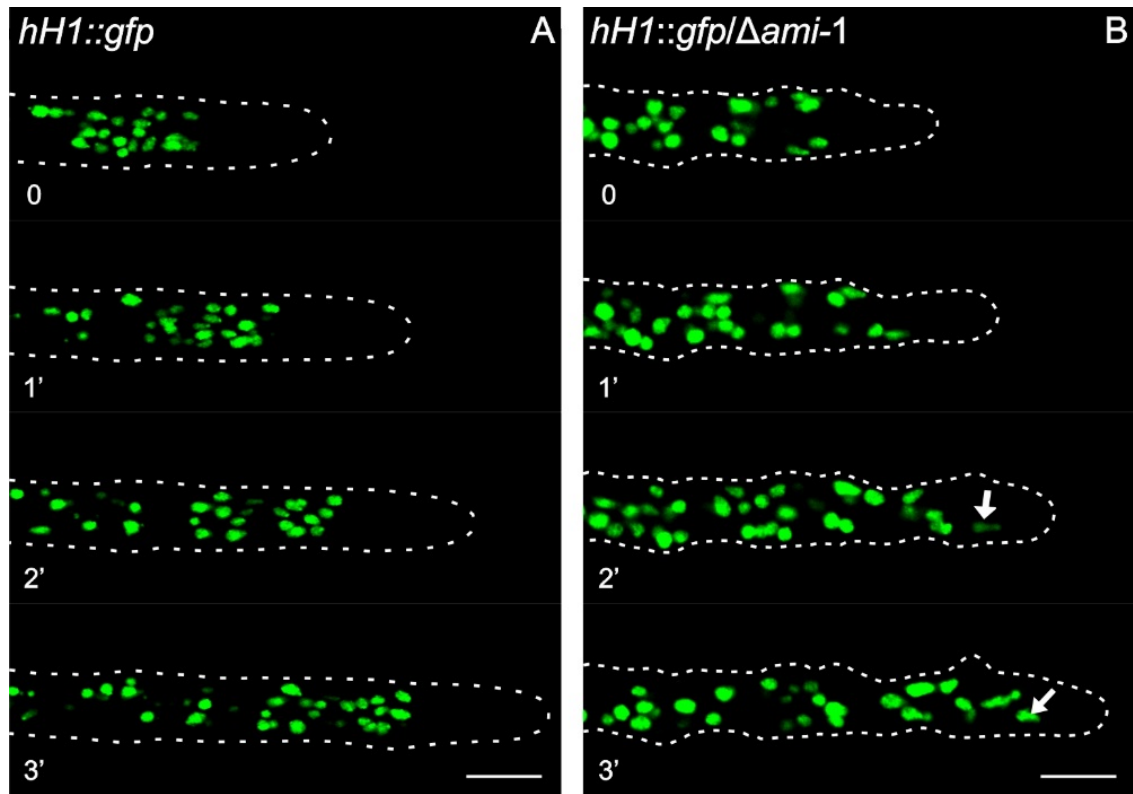


Figura 19. Dinámica de los núcleos en las cepas WT y $\Delta ami-1$. La zona de exclusión en la cepa silvestre (*hH1::gfp*) se mantiene constante mientras que en la cepa *hH1::gfp/Δami-1* se observan periodos en los que núcleos irrumpen en la zona de exclusión (B, Flechas).

Para observar la distribución de núcleos en los conidióforos, se realizó un conteo del número de núcleos por conidio. La mutante $\Delta ami-1$ presentó un 20.6% de conidios anucleados mientras la cepa WT solo tuvo el 3%. Al igual que en la cepa WT, la mutante $\Delta ami-1$ tuvo una mayor frecuencia de conidios con dos núcleos. Estos datos fueron corroborados al realizar la tinción de los núcleos con DAPI (Fig. 18).

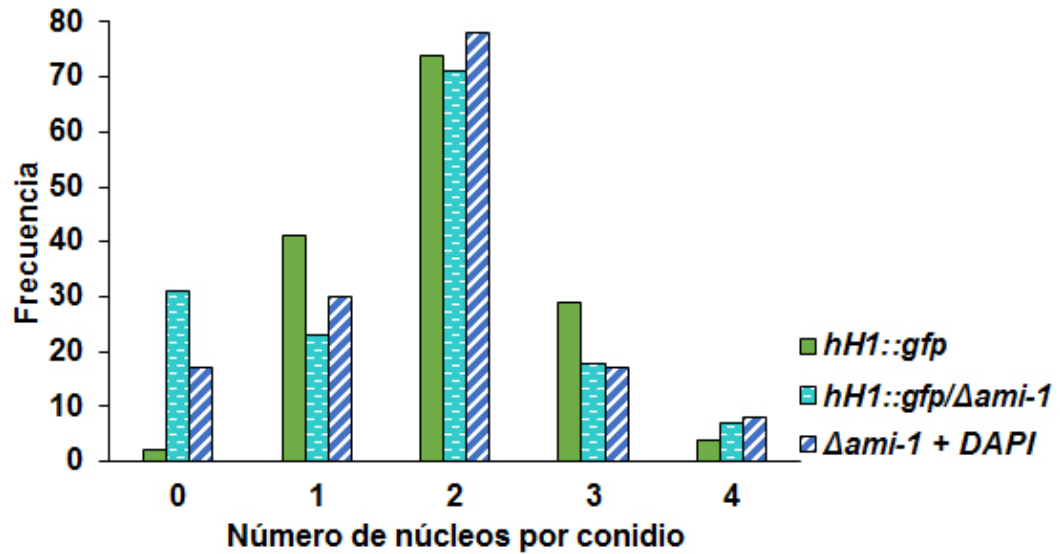


Figura 20. Frecuencia de núcleos por peritecio en la cepas *hH1::gfp*, *hH1::gfp/Δami-1* y *Δami-1*. En el conteo de núcleos realizado a una muestra de 150 conidios de cada una de las cepas, se observaron 2 núcleos con mayor frecuencia, sin embargo las cepas con la delección de la proteína AMI-1 presentaron un 20.6% (*hH1::gfp/Δami-1*) y 11.3% (*Δami-1*) de conidios sin núcleo.

Capítulo 4. Discusión

La organización de los MTs durante la división nuclear ha sido un tema poco estudiado, sobre todo en lo referente a proteínas asociadas a los MTs astrales que sirven de anclaje a los husos acromáticos, para promover la segregación de los cromosomas. Al respecto, se han tenido evidencias tanto en *A. nidulans*, *P. anserina* como en *M. oryzae* que las proteínas homologas ApsA, AMI1 y MoAND1 están involucradas en la terminal positiva de los MTs del huso acromático. En *N. crassa*, son varias las proteínas de la terminal positiva de los MTs que se han estudiado (Mouriño-Pérez, Linacre, Roman, Lew, Callejas-Negrete, Freitag, 2013; comunicación personal), pero ninguna de ellas se ha asociado a la organización de los MTs mitóticos. En este trabajo se estudió la proteína AMI-1 que tuvo una alta identidad tanto con ApsA como con AMI1 de *A. nidulans* y *P. anserina* respectivamente.

4.1 Análisis bioinformático.

La secuencia peptídica de la proteína designada como AMI-1 de *N. crassa* mostró una alta similitud con las proteínas ApsA de *A. nidulans*, AMI1 de *P. anserina* y MoAND1 de *M. oryzae* al comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína completa (Fig. 19, Anexo). Como se mencionó anteriormente se ha demostrado que están involucradas en la migración y distribución nuclear. La estructura de estas proteínas es altamente conservada (Fig. 20, Anexo), todas tienen un dominio C-terminal PH que es de unión a la membrana plasmática, esta región tuvo también una alta identidad con AMI-1 de *N. crassa*. Además en estas proteínas se ha descrito la existencia de un dominio coiled-coil en el N-terminal pero en *N. crassa* no se identificó (Fisher and Timberlake, 1995; Veith et al., 2005; Jeon et al., 2014).

4.2 Efecto de la falta de AMI-1 en *N. crassa*.

4.2.1 Reproducción asexual en la mutante $\Delta ami-1$.

La primera mutante estudiada de proteínas homólogas a AMI-1 fue la mutante por delección de *apsA* de *A. nidulans*, en la cual se observó la ausencia de la formación de conidios (Fisher and Timberlake, 1995). En *A. nidulans*, la función de ApsA ha

sido restringida a la migración nuclear durante la reproducción asexual, debido a que el fallo ocurre cuando los núcleos no entran en las métulas y el desarrollo cesa en la etapa inicial de formación de la fiálide (Clutterbuck, 1994), así mismo se ha reportado que la eliminación de *ApsA* genera la malformación de conidióforos (Fisher and Timberlake, 1995). Estos datos sugieren que en *A. nidulans* *apsA* juega un papel de suma importancia en el desarrollo de estructuras de reproducción asexual. En *N. crassa* la mutante por delección de *ami-1* no hubo una diferencia entre la producción de conidios comparada con la cepa de tipo silvestre. La información obtenida indica que AMI-1 no está asociada al proceso de formación de conidióforos. Sin embargo, los conidióforos que se analizaron mostraron una cantidad variable de núcleos siendo los más comunes los de dos núcleos concordando con lo reportado para la cepa de WT (Davis, 2000), pero a diferencia de la cepa WT en la mutante de AMI-1 se observaron conidios sin núcleo (Fig. 18). Al igual que en *N. crassa*, en *M. oryzae* hay una ligera disminución en la formación de conidios y hay una distribución anormal de núcleos durante la reproducción generando esporas con un número variado de núcleos por compartimento cuando debería haber sólo uno (Jeon et al., 2014), mientras que en *P. anserina* la conidiación no fue afectada, pero la eliminación de AMI1 produce microconidios sin núcleo. Los datos sugieren que AMI-1 está estrechamente relacionada con la dinámica nuclear durante la formación de conidios, cuestionando lo postulado por Davis (2000) que propone que durante la conidiación en *N. crassa* no se requiere de un movimiento de núcleos preciso y que por esto hay un número variable de núcleos en cada conidio.

4.2.2 Reproducción sexual en la mutante Δ *ami-1*.

En *P. anserina*, los núcleos son distribuidos al azar en las ascas después de la meiosis y la mitosis postmeiótica, lo que lleva a la delimitación y/o formación de ascosporas anormales. Adicionalmente en la falta de *ami1* genera incapacidad de autofecundar por defectos en la cepa receptora (Graña et al., 2000).

En *N. crassa* la delección de *ami-1* no produjo defectos en cantidad o apariencia de protoperitecios. Sin embargo, la formación de peritecios se vio afectada cuando la cepa mutante fue empleada como receptora. Uno de los defectos de los peritecios en la mutante Δ *ami-1* fue la pérdida de hifas periteciales, este mismo defecto están

presentes en la mutante de *P. anserina*. Los resultados indican que el fallo en la formación de ascosporas ocurre después de la fecundación, durante las etapas de división meiótica y postmeiótica. Sugiriendo que se requiere de una distribución nuclear precisa en estas etapas, interrumpiendo el desarrollo del peritecio. Algo similar fue descrito en *P. anserina* en la mutante $\Delta ami1$ donde mostraron que la reproducción sexual se detiene cuando hay un fallo en las divisiones meióticas (Johnson, 1978; Graia et al., 2000).

4.2.3 Efectos de la eliminación de AMI-1 en el crecimiento vegetativo.

La eliminación la proteína MoAND1 en *M. oryzae* no produce una alteración en la tasa de elongación, no obstante en hifas se observó una distribución desigual de los núcleos, la distancia entre los núcleos fue menor y la posición de los septos fue alterada. También se registraron eventos de citocinesis sin eventos de mitosis y viceversa, en donde ambos eventos deberían ser sincrónicos (Jeon et al., 2014). En el hongo filamentoso *A. nidulans*, la delección de *apsA* genera un retraso en la mitosis duplicando el tiempo de división nuclear (Veith et al., 2005). La formación del primer septo y la diferenciación de tubo germinal a hifa se producen después de la tercera división nuclear (Harris, Morrell and Hamer, 1994). La ausencia de proteínas que intervienen en la migración y distribución nuclear produce el retraso en la mitosis y con ello en la formación del primer septo arrojando el crecimiento el tubo germinal (Harris, Morrell and Hamer, 1994).

La mutante $\Delta ami-1$ mostró una disminución en la tasa de elongación con respecto a la cepa WT, aunque los análisis bioinformáticos no sugieren que la proteína AMI-1 intervenga en el crecimiento polarizado. Sin embargo, la diferencia en la distribución de los núcleos a través de la hifa, sugiere que defectos en la distribución y división nuclear pueden afectar el crecimiento vegetativo de los hongos filamentosos. La disminución en la producción de biomasa mostrada, puede ser originada por la acumulación de defectos como la reducción en la elongación, la disminución en la ramificación y el diámetro de las hifas. Ya que en todos los casos el volumen-área se ve comprometido.

4.3 Dinámica de los núcleos en la cepa mutante $\Delta ami-1$.

La pérdida del movimiento de los SPBs a lo largo de las hifas de *A. nidulans* puede ser observada cuando se elimina la proteína ApsA (Veith., 2005), en las mutantes de *apsA* los MTs son curvos y delgados en comparación con los de la cepa WT por lo que se ha sugerido que ApsA interactúa con la terminal positiva de los MTs anclándola a la dineína cortical (Veith, 2005). Al activarse la dineína cortical los MTs se contraen ejerciendo tracción sobre los MTs. Por lo que si ApsA está ausente, los MTs no se anclan a la corteza celular lo que explica la pérdida de movimiento de los SPBs (Veith et al., 2005). La dinámica y la posición nuclear en *N. crassa*, estuvo afectada en la cepa mutante $\Delta ami-1$, se observó que la zona de exclusión de núcleos (distancia del ápice al primer núcleo) fue ligeramente menor, además de presentar por momentos núcleos muy cercanos al ápice, por lo que se podría pensar que proteína AMI-1 participa en el posicionamiento de los núcleos durante el crecimiento vegetativo, sin embargo dado que la deslocalización de los núcleos no es constante, se podría sugerir que AMI-1 forma parte de un mecanismo auxiliar para el movimiento y distribución de núcleos en hifas.

4.4 Dinámica de AMI-1 marcada con GFP.

Se trató de marcar la proteína AMI-1 con GFP a través de diversas estrategias, sin embargo, fue imposible tener una construcción funcional de esta proteína fusionada a la GFP. Este problema no es exclusivo de *N. crassa*, los marcajes de los homólogos en *A. nidulans* y *P. anserina* tampoco han sido exitosos (Graña et al., 2000; Veith et al., 2005). Al igual que en este trabajo, se ha tratado de fusionar la GFP en el carboxilo terminal, lo cual al parecer impide que el dominio de pleckstrina pueda asociarse a la corteza celular.

Capítulo 5. Conclusión

- El marcaje de AMI-1 con GFP en el C-terminal interfiere con el funcionamiento de la proteína.
- AMI-1 interviene en el proceso de distribución nuclear en los conidióforos.
- La delección de *ami-1* participa en la formación y desarrollo de peritecios en procesos posteriores a la fecundación.
- La falta de AMI-1 afecta el crecimiento y morfología de las hifas de *N. crassa*.
- La proteína AMI-1 participa en la distribución nuclear en hifas maduras de *N. crassa*.

Lista de referencias

- Adams, T. H., Wieser, J. K., and Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 35-54.
- Bartnicki-Garcia, S. (2002). Hyphal tip growth: outstanding questions. *Mycology Series*, 15, 29–58.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., and Gierz, G. (1995). Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center. *Canadian Journal of Botany*. doi:10.1139/b95-271
- Bartnicki-Garcia, S., and Lippman, E. (1969). Fungal Morphogenesis: Cell Wall Construction in *Mucor rouxi*. *Science*, 165 (3890), 302–304. doi:10.1126/science.165.3890.302
- Beach, D. L., Thibodeaux, J., Maddox, P., Yeh, E., and Bloom, K. (2000). The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *Current Biology*, 10(23), 1497-1506.
- Beckwith, S. M., Roghi, C. H., and Morris, N. R. (1995). The genetics of nuclear migration in fungi. *Genetic Engineering*, 17, 165.
- Clutterbuck, A. J. (1994). Mutants of *Aspergillus nidulans* deficient in nuclear migration during hyphal growth and conidiation. *Microbiology*, 140(5), 1169-1174.
- Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(5), 319–332. doi:10.1038/nrn2631
- Davis, R. H. (2000). *Neurospora: contributions of a model organism* (p. xii). New York: Oxford University Press.
- Davis, R. H., and Perkins, D. D. (2002). Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Reviews. Genetics*, 3(5), 397–403. doi:10.1038/nrg797
- Desai, A., and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and Developmental Biology*, 13, 83–117. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.83

- Dutcher, S. K., and Hartwell, L. H. (1983). Genes that act before conjugation to prepare the *Saccharomyces cerevisiae* nucleus for caryogamy. *Cell*, 33(1), 203–210. doi:10.1016/0092-8674(83)90349-5
- Echauri-Espinosa, R. O., Callejas-Negrete, O. A., Roberson, R. W., Bartnicki-García, S., and Mouriño-Pérez, R. R. (2012). Coronin is a component of the endocytic collar of hyphae of *Neurospora crassa* and is necessary for normal growth and morphogenesis. *PLoS One*, 7(5), e38237.
- Fischer, R., and Timberlake, W. E. (1995). *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *Neurospora crassa The Journal of Cell Biology*, 128(4), 485–498.
- Gibson, T. J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M., and Birney, E. (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(9), 349–353.
- Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (2001). A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *Journal of Theoretical Biology*, 208(2), 151–64. doi:10.1006/jtbi.2000.2209
- Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y. K., Lanier, S. M., and Ahringer, J. (2003). Asymmetrically Distributed *C. elegans* Homologs of AGS3/PINS Control Spindle Position in the Early Embryo. *Current Biology*, 13(12), 1029–1037. doi:10.1016/S0960-9822(03)00371-3
- Graia, F., Berteaux-Lecellier, V., Zickler, D., and Picard, M. (2000). *ami1*, an orthologue of the *Aspergillus nidulans* *apsA* gene, is involved in nuclear migration events throughout the life cycle of *Podospora anserina*. *Genetics*, 155(2), 633–646.
- Harold, F. M. (1990). To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms. *Microbiological reviews*, 54(4), 381.
- Harold, F. M. (1997). How hyphae grow: morphogenesis explained?. *Protoplasma*, 197(3-4), 137-147.
- Harris, S. D., Morrell, J. L., and Hamer, J. E. (1994). Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics*, 136(2), 517.
- Jeon, J., Rho, H., Kim, S., Kim, K. S., and Lee, Y. H. (2014). Role of MoAND1-mediated nuclear positioning in morphogenesis and pathogenicity in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*.

- Johnson, T. E. (1978). Isolation and characterization of perithecial development mutants in *Neurospora*. *Genetics*, 88(1), 27-47.
- Morris, N. R. (2000). Nuclear Migration: From Fungi to the Mammalian Brain. *The Journal of Cell Biology*, 148(6), 1097–1102. doi:10.1083/jcb.148.6.1097
- Oakley, B. R., and Morris, N. R. (1980). Nuclear movement is β -tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 19(1), 255–262. doi:10.1016/0092-8674(80)90407-9
- Oakley, B. R., and Morris, N. R. (1981). A β -tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell*, 24(3), 837–845. doi:10.1016/0092-8674(81)90109-4
- Raju, N. B. (1992). Genetic control of the sexual cycle in *Neurospora*. *Mycological Research*, 96(4), 241–262. doi:10.1016/S0953-7562(09)80934-9
- Ramos-García, S. L., Roberson, R. W., Freitag, M., Bartnicki-García, S., and Mouriño-Pérez, R. R. (2009). Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 8(12), 1880–90. doi:10.1128/EC.00062-09
- Read, N. D., and Kalkman, E. R. (2003). Does endocytosis occur in fungal hyphae?. *Fungal Genetics and Biology*, 39(3), 199-203.
- Riquelme, M., Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 146(7), 1743–1752.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., ... and Watters, M. K. (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha—a model cell for polarized growth. *Fungal biology*, 115(6), 446-474
- Schoch, C. L., Sung, G.-H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., ... Spatafora, J. W. (2009). The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2), 224–39. doi:10.1093/sysbio/syp020
- Suelmann, R., and Fischer, R. (2000). Nuclear migration in fungi – different motors at work. *Research in Microbiology*, 151(4), 247–254. doi:10.1016/S0923-2508(00)00151-0

- Suelmann, R., Sievers, N., and Fischer, R. (1997). Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 25(4), 757–769.
- Thompson-Coffe, C., y Zickler, D. (1992). Three microtubule-organizing centers are required for ascus growth and sporulation in the fungus *Sordaria macrospora*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 22(4), 257–273. doi:10.1002/cm.970220406
- Trinci, A. (1978). Wall and hyphal growth. *Bulletin of the British Mycological Society*, 12(2), 116–122. doi:10.1016/S0007-1528(78)80031-5
- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V. P., and Fischer, R. (2005). Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 16), 3705–3716. doi:10.1242/jcs.02501
- Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microb. Genet. Bull*, 13(4), 2-43.
- Westergaard, M., and Hirsch, H. (1954). Environmental and genetic control of differentiation in *Neurospora*. In *Proc. Symp. Colson Res* (Vol. 7, pp. 171–183).
- Westergaard, M., & Mitchell, H. K. (1947). *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 573-577.
- Xiang, X., Beckwith, S. M., and Morris, N. R. (1994). Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), 2100–2104. doi:10.1073/pnas.91.6.2100

Anexo

Tabla 3. Nomenclatura para designar una proteína o gen en los organismos mencionados en este trabajo.

Organismo	Gen	Proteína	Regla
<i>N. crassa</i>	<i>ami-1</i>	AMI-1	Gen: se escriben tres letras en minúscula cursivas seguidas de un guion y un número. Proteína: Se escribe en mayúsculas seguidas de un guion y un número.
<i>A. nidulans</i>	<i>apsA</i>	ApsA	Gen: se escriben tres letras en minúscula cursivas seguidas una letra en mayúscula también cursiva. Proteína: Se escriben la primera y la última letra en mayúscula.
<i>P. anserina</i>	<i>ami1</i>	AMI1	Gen: se escriben tres letras en minúscula cursivas seguidas de un número. Proteína: Se escribe en mayúsculas seguidas de un número.
<i>M. oryzae</i>	<i>Moand1</i>	MoAND1	Gen: se escribe la primera letra mayúscula seguida de tres letras en minúscula y un número en letra cursiva. Proteína: La segunda letra se escribe en minúscula y las demás en mayúsculas.