

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología Celular y Molecular**

**Estudio de los peroxisomas y las peroxinas en el desarrollo
vegetativo y sexual de *Neurospora crassa***

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

Presenta:

Juan Ramos Pulido

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Juan Ramos Pulido

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora

Miembros del comité:

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dr. Leonardo Peraza Reyes

Dr. Víctor Ruiz Cortés



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Juan Ramos Pulido © 2020

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Juan Ramos Pulido** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

Estudio de los peroxisomas y las peroxinas en el desarrollo vegetativo y sexual de *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se han caracterizado los orgánulos involucrados en la vía secretora que contribuyen al crecimiento apical de *Neurospora crassa*. Éstos incluyen el retículo endoplásmico (RE), las cisternas de Golgi, las vacuolas y las vesículas secretoras. Este estudio se enfocó en las interacciones del RE con otros orgánulos, principalmente los peroxisomas, ya que hay evidencia de que el RE participa en la biogénesis de los peroxisomas. En los hongos filamentosos los peroxisomas tienen muchas funciones; por ejemplo, participan en el metabolismo primario y secundario, en el desarrollo vegetativo y sexual, así como en la protección contra el daño mecánico. En este proyecto se estudió el papel de tres peroxinas (PEX), proteínas de biogénesis peroxisomal, en el desarrollo sexual y en el crecimiento vegetativo de *N. crassa*. Se analizaron cepas mutantes que carecen de PEX-1, PEX-10 y PEX-14. Estas peroxinas son responsables de la importación de proteínas en los peroxisomas y, por lo tanto, en la maduración y el correcto funcionamiento de estos orgánulos. Para caracterizar las cepas Δpex , se midió la tasa de crecimiento radial, macroconidiación, ramificación, diámetro de hifas y producción de hifas aéreas. Con los resultados obtenidos, se determinó que la eliminación de los genes *pex-1*, *pex-10* y *pex-14* afecta la macroconidiación y en menor medida otros aspectos del desarrollo vegetativo. También se analizó el desarrollo sexual por medio de cruza sexuales y se determinó que PEX-14 es esencial para el desarrollo sexual, ya que su eliminación genera esterilidad femenina. Por otra parte, se ha determinado la localización subcelular de los peroxisomas mediante la fusión de una secuencia de orientación peroxisomal (PTS1) a la proteína fluorescente TagRFP. En el análisis por microscopía confocal de hifas co-expresando peroxisomas y otros orgánulos marcados con proteínas fluorescentes o teñidos con fluorocromos, se observó transporte a través de microtúbulos y co-transporte con endosomas tempranos y gotas lipídicas. Estos resultados permitieron la construcción de un modelo de transporte “pero-endo” en *N. crassa* en donde los peroxisomas se co-transportan junto con los endosomas tempranos y las gotas lipídicas de forma rápida y dirigida a través de los microtúbulos. Por último, ninguna de las cepas Δpex (-1, -10, -14) crecieron en medio con ácido oleico, sugiriendo que sus peroxisomas no son funcionales. Para comprobarlo, se analizó la capacidad de las cepas para importar la proteína TagRFP-PTS1 en los peroxisomas. Con el análisis microscópico se observó fluorescencia citosólica. Por lo tanto, los defectos en el desarrollo vegetativo y sexual de las cepas se deben probablemente a deficiencias en la importación de proteínas en los peroxisomas y en consecuencia a su correcto funcionamiento.

Palabras clave: peroxinas, peroxisomas, desarrollo vegetativo, desarrollo sexual, transporte endosomal y *Neurospora crassa*

Abstract of the thesis presented by **Juan Ramos Pulido** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in cellular and molecular microbiology.

Study of peroxisomes and peroxins in the vegetative and sexual development of *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Thesis Director

Previously, our lab has characterized organelles involved in the secretory pathway of cell wall synthesizing enzymes that contribute to polar growth in *Neurospora crassa*. Those included the endoplasmic reticulum (ER), Golgi cisternae, vacuoles, and vesicular carriers. In this study we are focusing our attention to interconnections of the ER with other organelles, principally the peroxisomes, because there is evidence that ER is important for peroxisomal biogenesis. Peroxisomes have many functions, including a role in primary and secondary metabolism, in sexual and asexual development, as well as in protection against mechanical damage. In this project, the role of three peroxins (PEX), peroxisomal biogenesis proteins, in the sexual development and vegetative growth of *N. crassa* was studied. Mutant strains of *N. crassa* lacking PEX-1, PEX-10 and PEX-14 were analyzed. These peroxins are responsible for the import of proteins into peroxisomes and, therefore, in the maturation and proper functioning of these organelles. To characterize the Δpex strains, the radial growth rate, the production of aerial hyphae, macroconidiation, branching, and hyphal diameter were measured. Deletion of the *pex-1*, *pex-10*, and *pex-14* genes was determined to affect macroconidia and other aspects of vegetative development. Sexual development was also analyzed through sexual crosses and it was determined that PEX-14 is essential for sexual development, since its elimination generates female sterility in both mating types. Furthermore, the subcellular localization of peroxisomes has been determined by fusion of a Peroxisomal Targeting Signal 1 (PTS1) to the TagRFP fluorescent protein. In confocal microscopy analysis of hyphae co-expressing peroxisomes and other organelles labeled with fluorescent proteins or stained with fluorochromes, the peroxisomes were partially co-located with microtubules and co-transported with early endosomes and lipid droplets. These results allowed the construction of a "pero-endo" transport model in *N. crassa* where peroxisomes are co-transported together with early endosomes and lipid droplets rapidly and directed through the microtubules. Finally, none of the Δpex (-1, -10, -14) strains grew in medium with oleic acid, suggesting that their peroxisomes are not functional. To verify this, the ability of the strains to import the TagRFP-PTS1 protein into the peroxisomes was analyzed. Fluorescent cytosol was observed in the microscopic analysis. Therefore, the defects in the sexual and asexual development of the strains are due to problems in the import of proteins into peroxisomes and consequently to their correct functioning.

Keywords: peroxins, peroxisomes, vegetative development, sexual development, endosomal transport and *Neurospora crassa*.

Dedicatoria

Todo el esfuerzo y la dedicación para mi familia y amigos...

Agradecimientos

A CONACYT por la beca de manutención otorgada

Al proyecto CONACYT-DFG Fondo de Cooperación Internacional en Ciencia y Tecnología UE-México, FONCICYT: “Crosstalk between peroxisomes, endoplasmic reticulum, and endosomes during polar growth and development in fungi”

Al personal de CICESE

Al personal académico y administrativo de la DBEA

Al LNMA especialmente al Dr. Delgado Álvarez

Al Departamento de Microbiología especialmente a la Dra. Callejas Negrete

A la directora de este trabajo, la Dra. Riquelme por su exigencia, enseñanzas, compromiso y apoyo

Al comité tutoría por su ayuda y consejos

A mis compañeros de laboratorio: Scarlett, Alfredo, Liz, Jazmín, Lolis, Yesenia, Lluvia y Lucía.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1. Transporte endosomal.....	2
1.1.2. Generalidades de los peroxisomas.....	5
1.1.3. Biogénesis de los peroxisomas.....	6
1.1.4. Función del retículo endoplásmico en la biogénesis de los peroxisomas.....	10
1.1.5. Funciones de los peroxisomas en los hongos filamentosos.....	11
1.1.6. La importancia de los peroxisomas en el desarrollo sexual de los hongos filamentosos.....	12
1.2 Justificación.....	14
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivos.....	15
1.4.1. Objetivo general	15
1.4.2. Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2. Metodología.....	17
2.1 Cepas.....	17
2.2 Vectores.....	17
2.3 Oligonucleótidos iniciadores.....	18
2.4 Medios de cultivo.....	19
2.4.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	19
2.4.2. Medios de cultivo para <i>N. crassa</i>	19
2.5 Condiciones de cultivo.....	20
2.6 Análisis fenotípico de las cepas Δpex	20

2.6.1.	Análisis del crecimiento radial	20
2.6.2.	Análisis de la producción de hifas aéreas	20
2.6.3.	Análisis de la macroconidiación	21
2.6.3.1	Recuperación de macroconidios.....	21
2.6.3.2	Cuantificación de macroconidios	21
2.6.4.	Análisis de las ramificaciones hifales.....	21
2.6.5.	Análisis del diámetro de las hifas.....	22
2.6.6.	Análisis de la producción de biomasa seca.....	22
2.7	Métodos para analizar el desarrollo sexual de las cepas Δpex	22
2.7.1.	Cruzas sexuales.....	22
2.7.2.	Determinación del tipo de apareamiento.....	23
2.7.3.	Recuperación de cepas homocariones.....	23
2.7.4.	Obtención de las cepas con tipo de apareamiento complementario.....	23
2.7.5.	Análisis del desarrollo sexual de las cepas Δpex : cruzas heterocigotas.....	23
2.7.6.	Análisis del desarrollo sexual de las cepas Δpex : cruzas homocigotas.....	24
2.8	Métodos genéticos y moleculares.....	25
2.8.1.	Extracción de ADN genómico de <i>N. crassa</i> con el <i>Dneasy Plant extraction kit (QIAGENTM)</i>	25
2.8.2.	Diseño de oligonucleótidos iniciadores para amplificar los genes <i>pex-1</i> , <i>pex-10</i> y <i>pex-14</i>	25
2.8.3.	Comprobación de las eliminaciones de los genes en las cepas Δpex	26
2.8.4.	Transformación de <i>E. coli</i> por medio de choque térmico.....	27
2.8.5.	Extracción de ADN plasmídico con el <i>QIAprep Miniprep kit (QIAGENTM)</i>	27
2.8.6.	Diseño del vector para el marcaje de los peroxisomas con la proteína fluorescente TagRFP.....	28
2.8.7.	Transformación de <i>N. crassa</i> por electroporación.....	30
2.8.8.	Comprobación molecular de la inserción del vector VMRP163 <i>3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'Δhis-3</i> en el locus <i>his-3</i> de <i>N. crassa</i>	30
2.9	Fusiones vegetativas.....	32
2.10	Tinciones de gotas lipídicas con rojo Nilo	32
2.11	Microscopía.....	32
2.12	Empleo de benomilo para la despolimerización de microtúbulos.....	33
2.13	Edición y análisis de imágenes y videos.....	33

2.10 Análisis estadístico.....	34
Capítulo 3. Resultados.....	35
3.1 Comprobación molecular de la eliminación de los genes en las cepas Δpex	35
3.2 Determinación del tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$ heterocarión del FGSC.....	36
3.3 Obtención de las cepas $\Delta pex-1$ (<i>mat a</i>) en su estado homocarión.....	37
3.4 Caracterización del desarrollo vegetativo de las cepas $\Delta pex-1$ (<i>mat a</i>), $\Delta pex-10$ (<i>mat a</i>) y $\Delta pex-14$ (<i>mat a</i>).....	38
3.5 Caracterización del desarrollo sexual las cepas $\Delta pex-1$ (<i>mat a</i>), $\Delta pex-10$ (<i>mat a</i>) y $\Delta pex-14$ (<i>mat a</i> y A).....	40
3.6 Construcción del vector para el marcaje de los peroxisomas con la proteína fluorescente TagRFP-PTS1.....	43
3.7 Transformación de <i>N. crassa</i> con el vector VMRP163 3' <i>his-3</i> Flank:: <i>Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'Δhis-3</i>	45
3.8 Marcaje de los peroxisomas de <i>N. crassa</i> y análisis microscópico.....	47
3.9 Interacción entre peroxisomas y microtúbulos.....	49
3.10 Interacción entre peroxisomas y endosomas tempranos	51
3.11 Interacción entre peroxisomas y gotas lipídicas.....	53
3.12 Interacción entre peroxisomas y retículo endoplásmico.....	55
3.13 Importación de proteínas con PTS1 en los peroxisomas de las cepas Δpex	57
Capítulo 4. Discusión.....	59
4.1 La ausencia de PEX-1, PEX-10 y PEX-14 genera defectos en la conidiogénesis y en el metabolismo del ácido oleico en <i>N. crassa</i>	59
4.2 La eliminación del gen <i>pex-14</i> de <i>N. crassa</i> genera esterilidad femenina a diferencia de lo observado con las eliminaciones de <i>pex-1</i> y <i>pex-10</i>	60
4.3 La importación de proteínas con PTS1 en los peroxisomas de las cepas $\Delta pex-10$ y $\Delta pex-14$ se ve afectada.....	62
4.4 Los desplazamientos rápidos y dirigidos de los peroxisomas de <i>N. crassa</i> ocurren a través de los microtúbulos y probablemente están mediados por los endosomas tempranos.....	63
4.5 Las gotas lipídicas y probablemente el retículo endoplásmico acompañan a los peroxisomas durante los movimientos rápidos y dirigidos.....	66
Capítulo 5. Conclusión.....	68
Literatura citada.....	69
Anexos.....	80

Lista de figuras

Figura	Página
1	Modelo del transporte endosomal en hongos filamentosos..... 4
2	Peroxisinas y otras PMPs..... 7
3	Modelo de la biogénesis de peroxisomas..... 8
4	Modelo de la importación de proteínas en el peroxisoma..... 9
5	Ciclo de vida de un ascomiceto heterotálico modelo..... 13
6	Estrategia seguida para el diseño de oligonucleótidos necesarios en la comprobación molecular de la eliminación génica en las cepas $\Delta pex-1$, $\Delta pex-10$, $\Delta pex-14$ 26
7	Estrategia seguida para construir el vector 163 $3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'\Delta his-3$ 29
8	Estrategia seguida para comprobar molecularmente la inserción del vector $3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'\Delta his-3$ en el locus $his-3$ de <i>N. crassa</i> 31
9	Comprobación molecular de las cepas Δpex del FGSC..... 35
10	Determinación del tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$ heterocarión del FGSC..... 36
11	Comprobación del estado homocarión y determinación del tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$ 37
12	Caracterización del desarrollo vegetativo de las cepas Δpex 40
13	Ensayos de fertilidad de las cepas Δpex 41
14	Mapa de calor generado con los datos cuantitativos de la caracterización del desarrollo vegetativo y sexual de las cepas Δpex 42
15	Construcción del vector VMRP163 $3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'\Delta his-3$ 44
16	Comprobación molecular de la inserción del vector VMRP163 $3'his-3Flank::Pccg-1::tag rfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'\Delta his-3$ en el locus $his-3$ de <i>N. crassa</i> 46
17	Localización subcelular de los peroxisomas de <i>N. crassa</i> 48
18	Dinámica celular entre los peroxisomas y microtúbulos en <i>N. crassa</i> 50
19	Dinámica celular entre los peroxisomas y endosomas tempranos en <i>N. crassa</i> 52
20	Dinámica celular entre los peroxisomas y gotas lipídicas en <i>N. crassa</i> 54

21	Dinámica celular entre los peroxisomas y el retículo endoplásmico en <i>N. crassa</i>	56
22	Análisis de la importación de la proteína TagRFP-PTS1 en los peroxisomas de las cepas SMRP493 ($\Delta pex-10::hph^+$; $\Delta mus-51::bar^+his-3+::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR$) y SMRP494 ($\Delta pex-14::hph^+$; $\Delta mus-51::bar^+his-3+::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR$).....	58
23	Comprobación molecular de las cepas SMRP493 y SMRP494.....	58
24	Modelo de transporte pero-endo propuesto para <i>N. crassa</i>	67

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Peroxinas en <i>P. anserina</i> y las etapas del desarrollo sexual en las que participan.....	14
2	Descripción de las cepas empleadas en este trabajo.....	17
3	Descripción de los vectores empleados en este trabajo.....	18
4	Descripción de los oligonucleótidos iniciadores empleados para la comprobación molecular de las cepas Δpex del <i>FGSC</i>	18
5	Descripción de los oligonucleótidos iniciadores empleados en la construcción del vector requerido para el marcaje de los peroxisomas de <i>N. crassa</i>	18
6	Descripción de los oligonucleótidos iniciadores empleados en la comprobación molecular de la cepa con los peroxisomas marcados.....	19
7	Cruzas heterocigotas realizadas para analizar la fertilidad femenina y masculina de las cepas Δpex	24
8	Datos cuantitativos de la caracterización del desarrollo vegetativo y sexual de las cepas Δpex	42
9	Las peroxinas de <i>N. crassa</i> y su categoría funcional.....	79

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

Los hongos filamentosos son organismos pluricelulares constituidos por células tubulares denominadas hifas, que se extienden mediante crecimiento polarizado. El crecimiento polarizado es un tema ampliamente estudiado en algunos hongos filamentosos y se define como la expansión de las hifas a partir de sus ápices (Riquelme, 2013).

El crecimiento polarizado implica una adición continua de los polímeros estructurales de la pared celular en el ápice de las hifas (Bartnicki-García y Lippman, 1969). Lo anterior se logra mediante un flujo continuo de vesículas secretoras, generado por la acción coordinada entre los microtúbulos (MTs) y los microfilamentos de actina con proteínas motoras y otras proteínas asociadas (Riquelme et al., 2018). Previo a la exocitosis, las vesículas secretoras se acumulan en un cuerpo apical denominado *Spitzenkörper* (Spk) que funciona como centro organizador de crecimiento y morfogénesis de las hifas (Girbart, 1957). Cálculos teóricos sobre la cantidad de membrana plasmática adicionada por exocitosis, indican que la acumulación de membrana plasmática supera los requerimientos necesarios para el crecimiento de las hifas (Bartnicki-García et al., 2018). De tal manera que se propone la existencia de un proceso de reciclaje de membrana vía endocitosis (Fischer-Parton et al., 2000).

La endocitosis es un proceso celular en el que sustancias extracelulares se incorporan al interior de la célula a través de vesículas endocíticas y posteriormente se fusionan con endosomas tempranos (ETs) u otros orgánulos de degradación para promover la digestión de dichas sustancias (Alberts et al., 2015). Los ETs también actúan como plataformas para el transporte de ARN mensajeros (mARNs), ribosomas, gotas lipídicas (GLs), retículo endoplásmico (RE), peroxisomas (POs) y otros orgánulos (Figura 1) (Becht et al., 2006; Konig et al., 2009; Bauman et al., 2014; Higuchi et al., 2014; Guimaraes et al., 2015, Salogiannis et al., 2016 y 2020). El transporte endosomal es un tema de investigación de gran interés, ya que se desconoce si es un mecanismo conservado en todos los organismos eucariotas. Tampoco se sabe si la función principal del transporte endosomal es la distribución espacio temporal de los componentes subcelulares o si durante el transporte ocurren interacciones funcionales entre orgánulos.

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación “Crosstalk between peroxisomes, endoplasmic reticulum, and endosomes during polar growth and development in fungi”, que es un proyecto de colaboración entre investigadores alemanes y mexicanos enfocado a estudiar ciertos aspectos

de la biología celular y molecular de *Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans*, *Podospora anserina* y el modelo de estudio en este trabajo *Neurospora crassa*.

N. crassa es un hongo ascomiceto que ha sido empleado como organismo modelo para estudiar diversos aspectos genéticos, bioquímicos, celulares y moleculares de los hongos filamentosos (Roche et al., 2014). Sin embargo, los conocimientos actuales sobre los POs de *N. crassa*, así como su asociación funcional con otros orgánulos son insuficientes para explicar su importancia en el crecimiento y desarrollo. Por ello, en este trabajo se combinaron enfoques biológicos celulares y moleculares, para aportar conocimientos sobre los POs de *N. crassa*. Además, estos nuevos conocimientos están siendo utilizados para hacer una comparación funcional de orgánulos en diferentes hongos modelo, que podrán ser empleados para descubrir procesos fisiológicos y evolutivos conservados, así como mecanismos específicos adaptados a los estilos de vida de los diferentes hongos. Por lo tanto, los resultados obtenidos serán de interés general para los biólogos celulares y podrán ser aplicados en mejorar la producción de metabolitos secundarios y en el desarrollo de nuevos fungicidas.

1.1.1 Transporte endosomal

El citoesqueleto es una red compleja de filamentos proteicos que se extienden en el interior de la célula y es responsable entre otras cosas de la forma celular, la polaridad, los movimientos intracelulares de orgánulos y la diferenciación celular (Seidel et al., 2013). Los componentes principales del citoesqueleto de hongos son los microfilamentos de actina, los MTs y las septinas (Silverman-Gavrila y Silverman-Gavrila, 2008). Los MTs son tubos huecos polarizados de aproximadamente 25 nm de diámetro compuestos por dímeros de una proteína globular, llamada tubulina (Alberts et al., 2015).

Los MTs tienen una polaridad intrínseca y su polimerización ocurre principalmente en el extremo positivo, mientras que el extremo negativo suele estar bloqueado por un sitio de nucleación (Cooper et al., 2000). Los MTs constituyen una red sofisticada que actúan como pistas para el movimiento polarizado de proteínas motoras como las dineínas y kinesinas. Estas proteínas se encargan de distribuir diferentes componentes celulares durante el crecimiento celular. Por ejemplo, las vesículas se asocian con proteínas motoras y luego son transportadas a lo largo de MTs. Existen al menos dos clases principales de vesículas, las vesículas secretoras y los ETs (Alberts et al., 2015).

En los hongos filamentosos, el transporte de los ETs es bidireccional y está mediado por la kinesina-3 y por la dineína citoplasmática (Figura 1). La kinesina-3 representa el principal motor anterógrado de estos

orgánulos hacia el ápice de las hifas (Wedlich-Söldner et al., 2002; Seidel et al., 2013). La dineína se acumula en los extremos positivos de los MTs, en donde se une con los ETs para su transporte retrógrado en las hifas (Lenz et al., 2006; Seidel et al., 2013). Las proteínas motoras a menudo interactúan con su carga a través de complejos adaptadores que controlan su afinidad. El transporte retrógrado mediado por la dineína citoplásmica está regulado por los complejos dinactina y FHF (FTS¹ / Hook / FHIP²) (Xiang et al., 2015). Mientras que el transporte anterógrado de la cinesina-3 depende de su dominio de homología con pleckstrina que predeciblemente permiten la unión a lípidos endosomales (Baumann et al., 2012).

Los ETs son vesículas derivadas de cisternas de Golgi que experimentan cambios progresivos en su pH y composición lumínica, debido a que se fusionan con vesículas endocíticas y vacuolas digestivas lo que resulta en la formación de endosomas tardíos (LEs del inglés *late endosomes*). En este proceso de maduración, los ETs aumentan de tamaño y parte de la membrana endosomal se invagina, dando como resultado orgánulos con una apariencia multivesicular característica con vesículas intraluminales. En hongos, estos cuerpos multivesiculares (CMVs) se fusionan con vacuolas degradativas, lo que permite la digestión de su contenido interno por enzimas hidrolíticas (Abenza et al., 2012). Adicionalmente la transición ETs a LEs, implica una conversión de proteínas Rab en la membrana endosomal (Figura 1). En dicha conversión ocurre el reemplazo de Rab5 en los ETs por Rab7 en los LEs (Zerial y McBride, 2001). Las proteínas Rab son GTPasas encargadas de reclutar proteínas efectoras. La ortóloga de Rab 5 en *N. crassa* es YPT-52 (Seidel et al., 2013).

En los hongos filamentosos, los ETs también participan en el reciclaje de membrana vía endocitosis (Shaw et al., 2011). En *A. nidulans* y *N. crassa* el reciclaje de membrana tiene lugar en una zona subapical denominada “Collar de endocitosis” (Araujo-Bazan et al. 2008; Delgado-Álvarez et al. 2010); dicho collar también actúa como una barrera que mantiene la maquinaria de polarización en el ápice de las hifas, impidiendo que los marcadores apicales se distribuyan en áreas distales a la punta de la hifa. Por tal motivo los ETs también tiene un papel importante en el crecimiento y la morfología de las hifas (Shaw et al., 2011).

Algunas investigaciones sobre proteínas de unión a ARN han proporcionado información adicional relacionada a la función de los ETs. Investigaciones en *U. maydis*, mostraron que la proteína de unión a ARN Rrm4 es transportada de forma bidireccional a través de los MTs y dicho transporte es mediado por ETs (Becht et al., 2006). Investigaciones posteriores en este mismo hongo mostraron que la proteína Rrm4

¹ FTS (Fused Toes), es un miembro de un pequeño grupo de proteínas que contienen un dominio de enzima conjugadora de ubiquitina E2.

² FHIP (FTS y Hook Interacting Protein), es una proteína de interacción con FTS y Hook.

se une a varios mARNs, incluidos los que codifican a la proteína de fusión ubiquitina Ubi1 y la proteína G Rho3 (König et al., 2009). Además, se mostró que los ETs transportan mARNs que codifican a las septinas Cdc3 y Cdc12, y que la traducción de esos mensajeros ocurre en la superficie de los ETs en movimiento (Baumann et al., 2014). Adicionalmente se ha sugerido que el ensamblaje de los filamentos de septinas tiene lugar sobre la superficie de estos orgánulos (Figura 1).

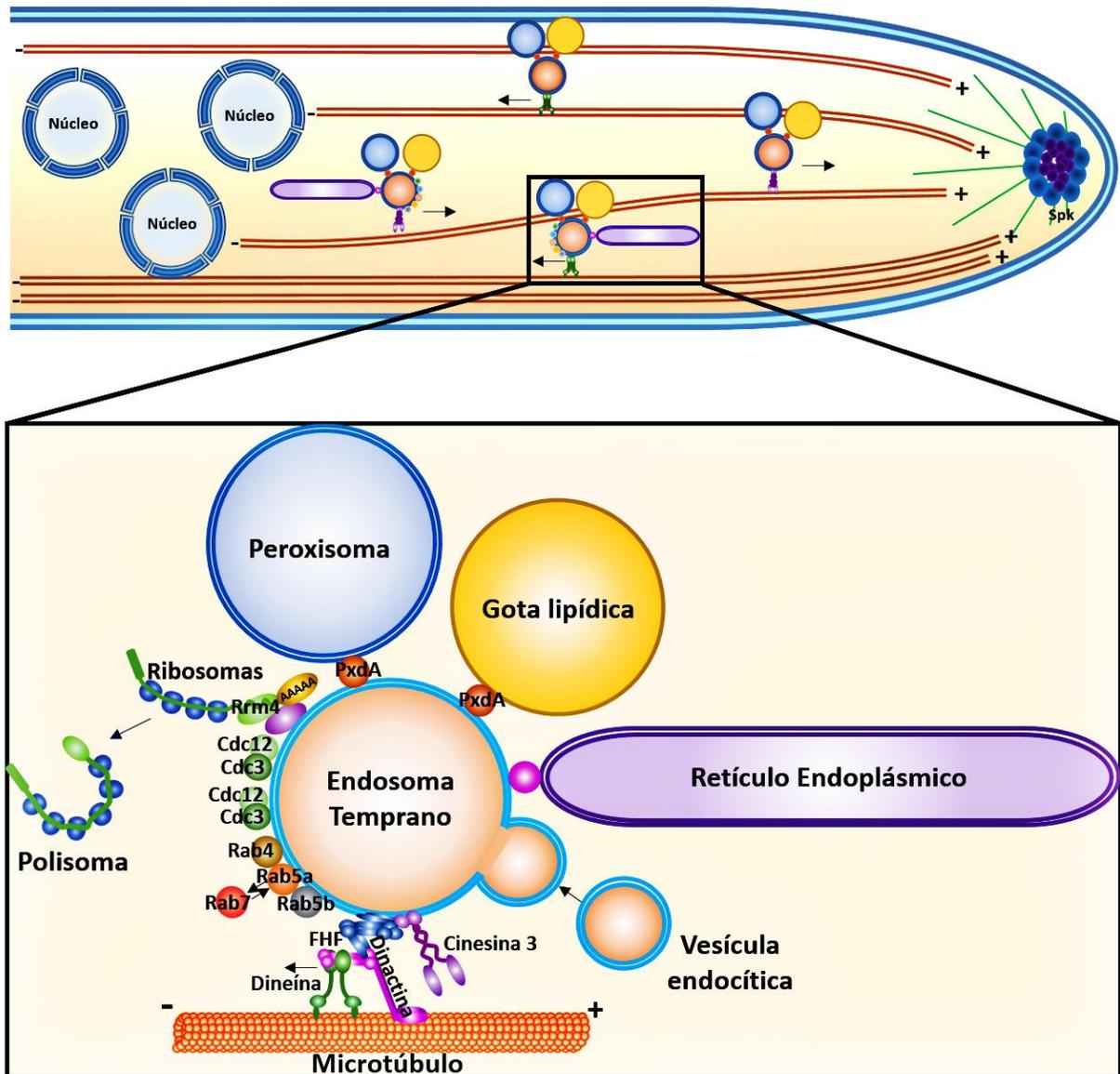


Figura 1. Modelo del transporte endosomal en hongos filamentosos. Los ETs son transportados mediante la acción coordinada entre MTs, proteínas motoras y otras proteínas asociadas. Los ETs no solo poseen funciones de degradación, sino que pueden actuar como vehículos para el transporte de proteínas, mARNs, ribosomas, GLs, POs, RE, etc. Este modelo representa un consenso de los datos reportados en *U. maydis* y *A. nidulans*. Modificado de Steinberg (2014). Guimaraes et al. (2015); Salogiannis et al (2016 y 2020); Riquelme et al. (2018).

Otros estudios en *U. maydis* han mostrado que los ETs pueden actuar como un medio de transporte para los ribosomas. Se ha propuesto que los ribosomas se unen a mARNs asociados a los ETs para sintetizar la proteína codificada en estos mensajeros (Higuchi et al. 2014). Los polisomas formados en este proceso posteriormente son liberados de los ETs durante su transporte bidireccional (Figura 1). Por lo tanto, el transporte endosomal promueve una distribución continua de la maquinaria de traducción en la célula fúngica. Esto representa una forma de transporte diferente de la difusión pasiva de los ribosomas en el citosol. Los ETs también participan en el transporte de orgánulos durante el crecimiento polarizado de las hifas (Figura 1). Algunos de los orgánulos transportados son las GLs, RE y POs (Guimaraes et al., 2015). En *A. nidulans*, se encontró que la proteína PxdA funciona como un enlazador de las GLs y los POs hacia los ETs (Salogiannis et al., 2016 y Salogiannis et al., 2020), y esta proteína posee homólogos en *N. crassa* y *P. anserina* (Riquelme et al., 2018). Dada la cercanía entre los diferentes elementos co-transportados por los ETs y las interacciones funcionales que suele ocurrir entre orgánulos, se puede suponer un vínculo funcional entre las cargas de los ETs.

1.1.2 Generalidades de los peroxisomas

Los POs son orgánulos membranosos rodeados por una bicapa lipídica. En su mayoría se trata de cuerpos esféricos de 0.1 μm a 1 μm de diámetro (Smith y Aitchison, 2013). Los POs contienen matrices densas con diferentes enzimas, sustratos y cofactores, que a veces pueden formar núcleos cristaloides electrodensos. Los POs generalmente son esféricos, pero pueden mostrar formas alargadas o incluso pueden formar retículos en algunos tipos de células y en ciertas condiciones ambientales (Grabenbauer et al., 2000). Fueron descritos por primera vez en los años cincuenta como microcuerpos esféricos y ovalados con una matriz finamente granular (Rhodin, 1954). Más tarde, fueron renombrados como POs por de Duve y Baudhuin (1966) debido a que contienen enzimas involucradas en la descomposición del peróxido de hidrógeno.

Actualmente, se considera a los POs como un conjunto de orgánulos relacionados estructural y funcionalmente que se encuentran en prácticamente todas las células eucariotas. Los POs contienen enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo de lípidos, carbohidratos, aminoácidos, purinas, etc. (Wanders y Waterham, 2006). Muchas de las reacciones bioquímicas que ocurren en el peroxisoma producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que son tóxicas para la célula. Sin embargo, los POs poseen varias enzimas antioxidantes que regulan la homeostasis de las ROS (Nordgren y Fransen 2014).

1.1.3 Biogénesis de los peroxisomas

La biogénesis de los POs está mediada por unas proteínas denominadas peroxinas, cuyo nombre se abrevia como PEX seguido de un número (Distel et al., 1996) (Figura 2). Los enfoques genéticos y bioquímicos han permitido la identificación de 37 peroxinas diferentes en los organismos eucariotas (Schlüter et al., 2006, Farré et al., 2017; Singh et al., 2020). Sin embargo, el número de peroxinas en cada especie es diferente. Por ejemplo, en el genoma de *N. crassa* se han identificado más de 20 genes *pex* (PeroxisomaDB 2.0: <http://www.peroxisomedb.org/>), de Eckert y Erdmann, 2003; Sichting et al., 2003; Klei et al., 2006; Managadze et al., 2010; Liu et al., 2011). Las peroxinas codificadas por estos genes se describen en la Tabla 9 en el Anexo 1.

La mayoría de las peroxinas son proteínas de la membrana del peroxisoma (PMPs) o receptores citoplasmáticos con afinidad a la secuencia de orientación peroxisomal (Figura 2). Una red compleja de interacciones entre peroxinas controlan diferentes procesos en la biogénesis de los POs como: el ensamblaje de proteínas de membrana (Pex3, Pex16, Pex19 y Pex36), el reconocimiento de proteínas peroxisomales a través de receptores específicos (Pex5, Pex7, Pex18, Pex20 y Pex21), el acoplamiento de receptores (Pex13, Pex14, Pex17, Pex14/17 o PEX-33), la translocación de proteínas a la matriz peroxisomal (Pex5, Pex14, Pex17, Pex18 y Pex21), el reciclaje de receptores y la importación de proteínas (Pex1, Pex2, Pex4, Pex6, Pex8, Pex10, Pex12, Pex22 y Pex26 o Pex15), así como la proliferación y división de los POs (Pex11, Pex23, Pex24, Pex25, Pex27, Pex28, Pex29, Pex30, Pex31, Pex32 y Pex37) (Schlüter et al., 2006; Kiel et al., 2006; Managadze et al., 2010; Farré et al., 2017; Singh et al., 2020).

El proceso de formación de los POs básicamente consiste en el ensamblaje de la membrana peroxisomal, la importación de proteínas a la matriz y la multiplicación de los orgánulos. Hasta hace algunas décadas se creía que los POs proliferaban por una de dos vías que se consideraban independientes. La primera implica la división de orgánulos preexistentes y la segunda consiste en la liberación y fusión de vesículas pre-peroxisomales derivadas del RE y las mitocondrias (Figura 3). En 1992 Heinemann y Just demostraron que las proteínas peroxisomales sintetizadas en el citosol se importan en los POs de densidad baja o media, en un proceso de maduración que implica un aumento de tamaño y densidad. Luego de dicho proceso de maduración se demostró que los POs eran capaces de dividirse para incrementar la población de POs de acuerdo con los requerimientos fisiológicos de la célula (Smith y Aitchison, 2009).

importación de PMPs directamente del citosol por la ruta PEX-3 – PEX-19 y/o PEX-16, la importación indirecta vía RE ya sea por el complejo GET (Tráfico de Golgi a RE) o SRP (Partícula de Reconocimiento de Señal) y la importación indirecta por medio de la fusión de vesículas pre-peroxisomales derivadas de RE y Mitochondrias (Figura 3) (Haimovich et al., 2016; Sugiura et al., 2017).

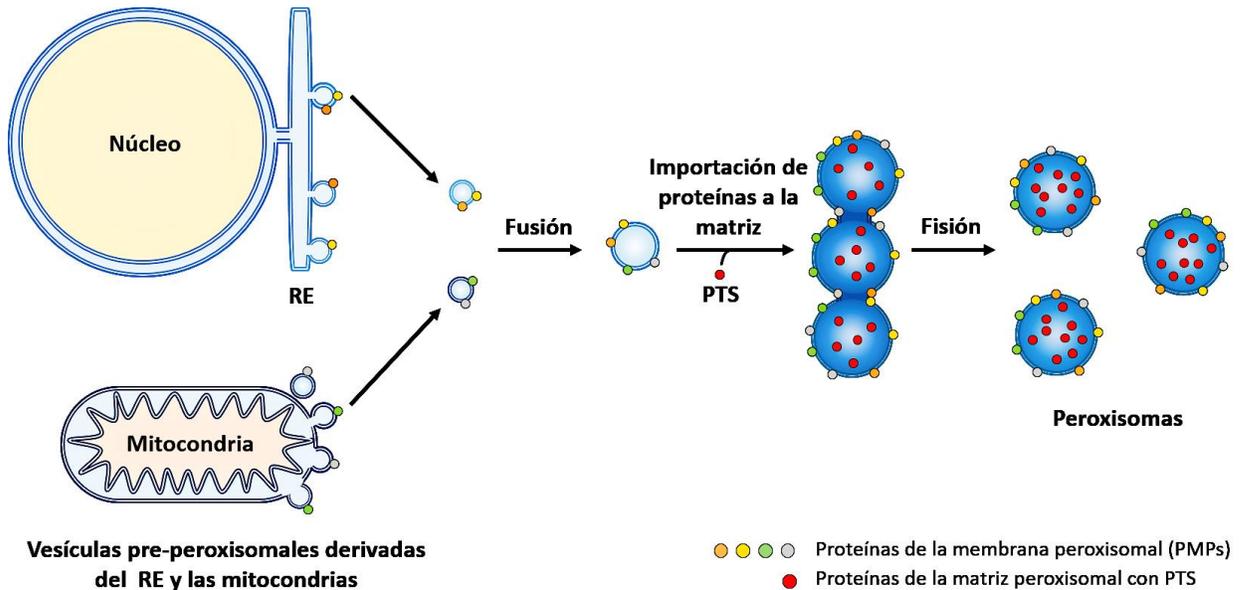


Figura 3. Modelo de la biogénesis de peroxisomas. Los POs pueden formarse por medio de dos vías: biogénesis de *novo* o crecimiento y fisión de POs pre-existentes. La biogénesis de *novo* requiere la fusión de vesículas pre-peroxisomales, derivadas del RE y las mitocondrias. Estas vesículas contienen PEXs que permiten la importación de otras PMPs en la membrana peroxisomal. En los POs tempranos se importan proteínas de la matriz y esto induce la formación de POs maduro. Los POs maduros pueden seguir adicionando PMPs o importando proteínas a la matriz, generando con ello un aumento de tamaño y eventos de división (Sugiura et al., 2017; Kim, 2017).

En cuanto a la importación de proteínas a la matriz peroxisomal, se han identificado algunas señales de orientación (básicamente PTS1, PTS2; del inglés *Peroxisomal Targeting Signal*), que dirigen a una proteína del citosol al peroxisoma. Las proteínas con la señal de orientación peroxisomal son reconocidas por los receptores citosólicos Pex5 y Pex7. La importación de proteínas a la matriz del peroxisoma se puede dividir en cinco pasos: (1) el reconocimiento de la proteína peroxisomal en el citosol por los receptores de carga solubles, (2) la asociación del complejo receptor-carga con la membrana peroxisomal, (3) la translocación de la carga en el peroxisoma, (4) liberación de la carga en la matriz peroxisomal y por último (5) la ubiquitinación y exportación de receptores (Figura 4). El receptor soluble Pex5 reconoce una PTS tipo 1 [PTS1; compuesto de un tripéptido similar a SRL en el C-terminal, (S/A/C)-(K/R/H)-(L/A)], mientras que Pex7, reconoce una PTS tipo 2 [PTS2; compuesto de un nonapéptido en el N-terminal (R/K)-(L/V/I)-XXXXX-

(H/Q)-(L/A/F)] (Kim y Hettema, 2015). En hongos existen peroxinas adicionales involucradas en la importación de las proteínas de la matriz del peroxisoma, tales como Pex18, Pex20 y Pex21 (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). Un dato interesante que conviene mencionar sobre el receptor Pex5 para la vía PTS1 y el co-receptor Pex18 para PTS2, es que también forman parte fundamental de los canales de importación peroxisomal (Meinecke et al., 2010; Montilla-Martinez et al., 2015). En *N. crassa* los receptores PEX-5 han sido implicados en la importación de proteínas dependientes de PTS1 y los receptores PEX-7 y el co-receptor PEX-20 para las proteínas dependientes de PTS2 (Sichting et al., 2003).

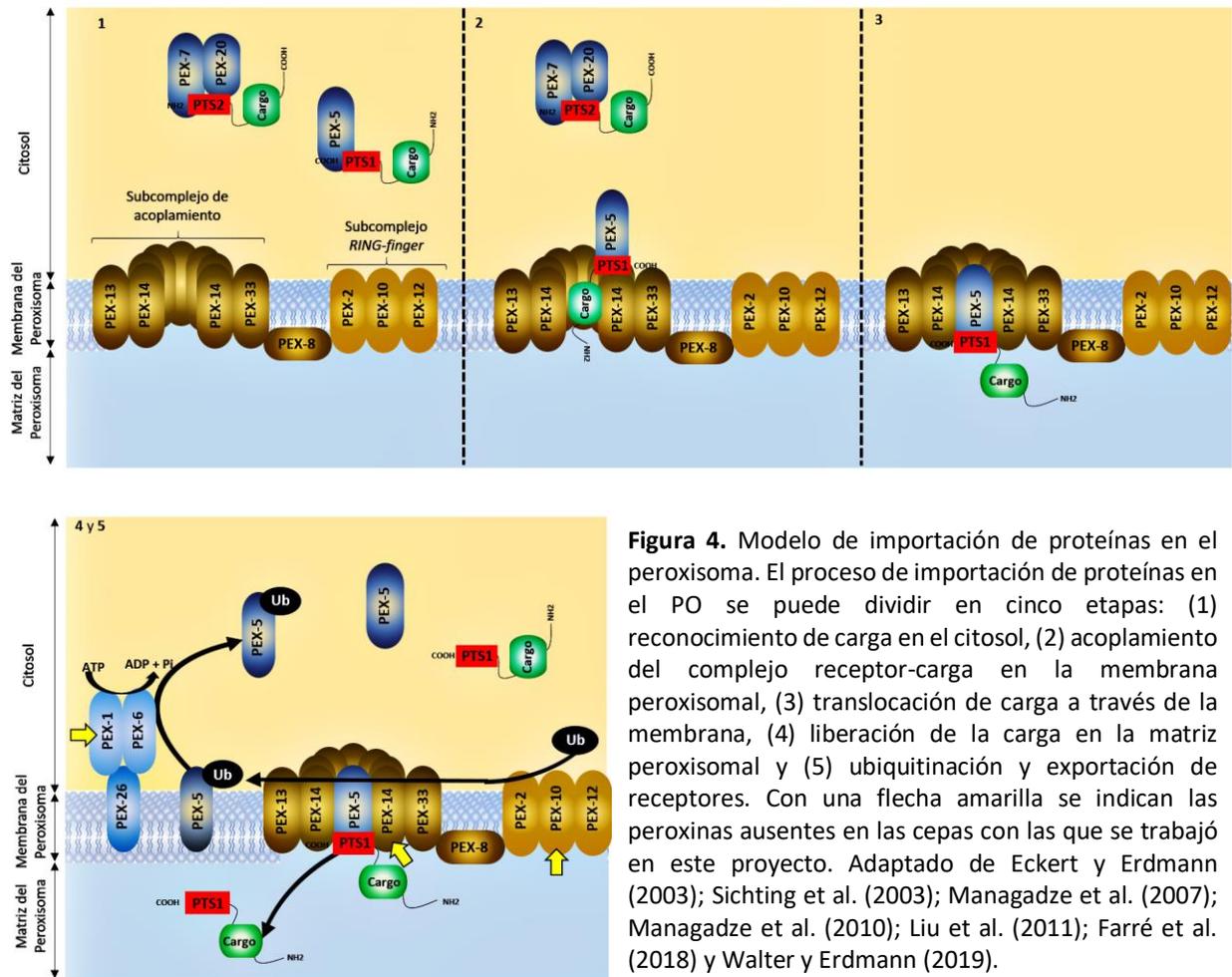


Figura 4. Modelo de importación de proteínas en el peroxisoma. El proceso de importación de proteínas en el PO se puede dividir en cinco etapas: (1) reconocimiento de carga en el citosol, (2) acoplamiento del complejo receptor-carga en la membrana peroxisomal, (3) translocación de carga a través de la membrana, (4) liberación de la carga en la matriz peroxisomal y (5) ubiquitinación y exportación de receptores. Con una flecha amarilla se indican las peroxinas ausentes en las cepas con las que se trabajó en este proyecto. Adaptado de Eckert y Erdmann (2003); Sichting et al. (2003); Managadze et al. (2007); Managadze et al. (2010); Liu et al. (2011); Farré et al. (2018) y Walter y Erdmann (2019).

Una vez que las proteínas de la matriz peroxisomal son reconocidas por los receptores citosólicos son translocadas junto a los receptores a través del complejo importómero hacia la matriz del peroxisoma. Durante la importación de proteínas participan el subcomplejo de acoplamiento, que contiene las PMPs Pex13, Pex14 y Pex14/17 (Kiel et al., 2006) o PEX-33 (Managadze et al., 2010), y el subcomplejo de RING-

finger (*Really Interesting New Genes*), que contiene las PMPs Pex2, Pex10 y Pex12 (Agne et al., 2003). Finalmente, los receptores liberan la carga en la matriz peroxisomal y ocurre el reciclado de receptores hacia el citosol. El complejo de *RING-finger*, junto con el complejo de enzimas de conjugación de ubiquitina E2, Pex4/Pex22, ubiquitinan al receptor para promover su liberación de la membrana por el complejo ATPasa AAA Pex1/Pex6 (Platta et al. 2014).

No todas las proteínas de la matriz peroxisomal poseen PTS conocidos y por ello se sabe poco sobre el mecanismo de incorporación de este tipo de proteínas. En 2012, Freitag y colaboradores mostraron que varias enzimas peroxisomales contienen motivos PTS1 crípticos que se activan mediante el empalme alternativo y la lectura de un motivo en *cis* presente inmediatamente después de un codón de parada UGA (UGACU). Lo anterior supone un mecanismo potencial para dirigir las enzimas peroxisomales hacia los POs en respuesta a condiciones fisiológicas y de esta manera regular las funciones peroxisomales en la célula (Freitag et al., 2012).

1.1.4 Función del retículo endoplásmico en la biogénesis de los peroxisomas

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la morfología y dinámica del RE durante el crecimiento polarizado de *N. crassa*. Ello despertó el interés en analizar las interconexiones funcionales del RE con otros orgánulos, sobre todo con los POs, debido a la importancia del RE en la biogénesis de los POs y por consiguiente las posibles interacciones entre ambos orgánulos. El RE aporta parte de los fosfolípidos constituyentes de la membrana peroxisomal (Lazarow y Fuijiki, 1985). La membrana del PO está constituida principalmente por fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y se caracteriza por poseer ácidos grasos de cadena más larga en comparación con las membranas de otros orgánulos (Schneiter et al., 1999).

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha observado que 16 proteínas de membrana peroxisomal (Pex1, Pex2, Pex3, Pex4, Pex6, Pex8, Pex10, Pex11, Pex12, Pex13, Pex14, Pex15, Pex19, Pex25, Pex27 y Ant1) ingresan al RE a través del complejo GET o Sec61, para lograr su topología correcta y luego viajar a los POs a través de un mecanismo mediado por Pex3 – Pex19 (van der Zand et al., 2010). Otra aportación del RE en la biogénesis del peroxisoma que ya se ha abordado pero que vale la pena recalcar, está relacionada con el ensamble de los complejos multiproteicos en la membrana del peroxisoma producto de la fusión de vesículas pre-peroxisomales, que entre otras cosas permiten la importación de proteínas tal como se muestra en la Figura 3 y 4 (Farré et al., 2018; Walter y Erdmann, 2019; Sugiura et al., 2017; Kim, 2017).

1.1.5 Funciones de los peroxisomas en los hongos filamentosos

Los POs son orgánulos esenciales para el desarrollo de la mayoría de los organismos eucariotas. En los hongos, los POs se caracterizan por su gran versatilidad y dinamismo funcional. Por ejemplo, se ha demostrado que los POs fúngicos poseen varias enzimas glucolíticas y otras que participan en la degradación del metanol y otros compuestos. También se han reportado algunas funciones anabólicas, tales como la biosíntesis de biotina, sideróforos, antibióticos β -lactámicos (Penicilinas, cefalosporinas), micotoxinas, glucolípidos extracelulares y otros metabolitos. Además, enzimas del ciclo del glioxilato, de la vía de pentosa fosfato y de la glucólisis se localizan en los POs. En hongos filamentosos, los POs no solo poseen funciones metabólicas también presentan actividades mecánicas como el taponamiento del poro septal u otras como la organización de los MTs. Adicionalmente, los POs tienen una función importante en algunas etapas del desarrollo de los hongos, como la formación de esporas sexuales y asexuales, la transición micelial en hongos dimórficos, la diferenciación de estructuras infecciosas como los apresorios o la formación de células especializadas (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013). En *N. crassa* se ha confirmado la importancia de los POs en la morfogénesis de la hifa, en la formación de cuerpos fructíferos y en la protección contra el daño mecánico (Managadze et al., 2007). En este hongo existen dos tipos de POs: glioxisomas (Kionka y Kunau, 1985) y cuerpos de Woronin (Jedd y Chua, 2000; Tenney et al., 2000).

Los glioxisomas de *N. crassa*, al igual que en otros organismos, contienen las enzimas necesarias para la β -oxidación de ácidos grasos y las enzimas del ciclo del glioxilato, una vía metabólica que permite la conversión de acetil-CoA en succinato para la producción de carbohidratos (Flavell y Woodward, 1971). A diferencia de lo que ocurre en levaduras la β -oxidación en los glioxisomas involucra una acil-CoA deshidrogenasa que lleva a cabo la deshidratación de los ácidos grasos a través de un mecanismo que no involucra la formación de peróxido de hidrógeno. Algo interesante de los glioxisomas de *N. crassa*, es que no contienen catalasa, la enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (Kionka y Kunau, 1985; Schliebs et al., 2006).

Por otra parte, los cuerpos de Woronin realizan una función no metabólica que es particular de los hongos filamentosos Ascomycota y que consiste en detener la pérdida de citoplasma por la lesión de las hifas al actuar como un tapón del poro septal (Jedd y Chua, 2000). Los cuerpos de Woronin se forman a partir de glioxisomas, una vez que la proteína Hexagonal 1 (HEX-1) se importa a los glioxisomas y forma un cristal. El cuerpo de Woronin, completo con el cristal HEX-1, se desprende del glioxisoma a través de fisión (Liu et al., 2008).

Debido a la importancia de las peroxinas en la biogénesis de los POs, Managadze et al. (2007) estudiaron el efecto de la mutación de PEX-14 en el funcionamiento de los POs en *N. crassa*. Los resultados de dicha investigación sugieren que la ausencia de esta peroxina evita la formación de glioxisomas funcionales y cuerpos de Woronin. La mutación de PEX-14 inhibió el crecimiento en medios de cultivo con ácido oleico como única fuente de carbono (Managadze et al., 2007), lo cual apoya la idea de que el sitio principal de degradación de los ácidos grasos en *N. crassa* pueden ser los glioxisomas (Kionka y Kunau, 1985), aunque no debe descartarse un sistema adicional de β -oxidación en las mitocondrias tal como lo reportado en *A. nidulans* (Maggio-Hall y Keller, 2004). La mutación de PEX-14 también provocó el derrame citoplásmico de las hifas por daño mecánico y los autores sugieren que esto se debe a la ausencia de cuerpos de Woronin, que normalmente sellarían los poros septales en caso de lesión (Managadze et al., 2007).

1.1.6 La importancia de los peroxisomas en el desarrollo sexual de los hongos filamentosos

En los hongos existen múltiples procesos que dependen de los POs y el desarrollo sexual es un claro ejemplo de ello. Los POs fúngicos están implicados directa o indirectamente en la mayoría de los eventos relacionados con la reproducción sexual (Figura 5), incluida la formación de moléculas de señalización, el apareamiento, la inducción y progresión meiótica, la diferenciación y el mantenimiento de las estructuras reproductivas, así como en dispersión y germinación de las esporas sexuales, etc. (Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013).

Los POs también participan en el desarrollo de las estructuras reproductivas en hongos filamentosos. El ciclo de reproducción sexual en los hongos ocurre principalmente cuando se agotan los nutrientes del medio exterior y por ello la energía necesaria para la progresión en las diferentes etapas del desarrollo sexual deriva de los compuestos de reserva (carbohidratos y lípidos). En los hongos, los lípidos se almacenan principalmente como triglicéridos en GLs que se derivan del RE (Murphy, 2012). Dada la importancia de los POs en la β oxidación de ácidos grasos, probablemente los POs participen en la canalización de nutrientes en las estructuras reproductivas permitiendo con ello su desarrollo (Goodrich-Tanrikulu, et al., 1998; Flavell y Fincham, 1968)

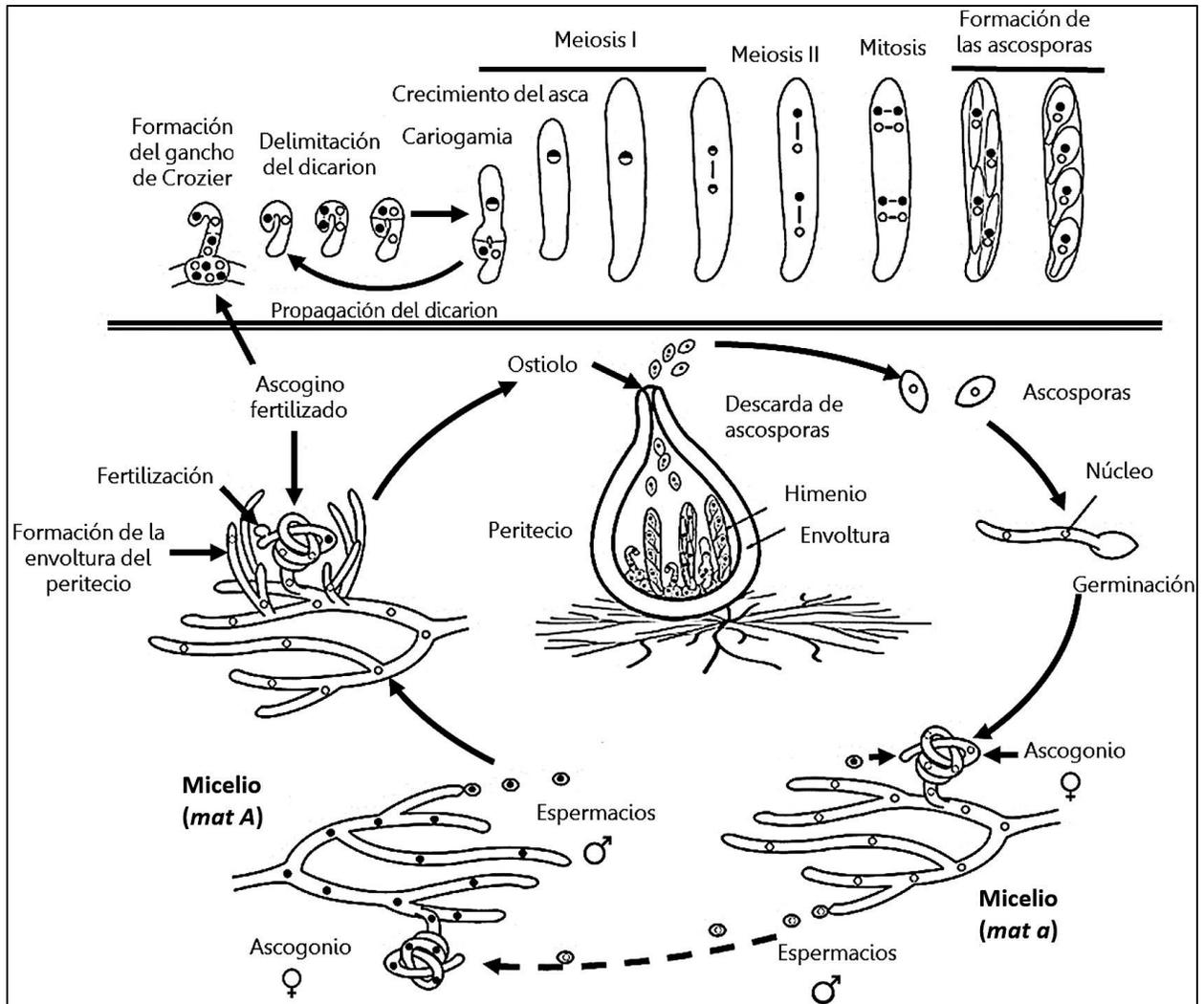


Figura 5. Ciclo de vida de un ascomiceto heterotálico modelo. Los hongos se caracterizan por poseer ciclos de reproducción sexual y asexual. De acuerdo con la reproducción sexual los hongos pueden clasificarse como homotálicos o heterotálicos. Una especie de hongo heterotálico, tal como *N. crassa* se caracterizan por presentar individuos con tipos de apareamiento *mat A* y *mat a*. Recuperado y modificado de Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier (2013) y Suaste-Olmos et al. (2018).

Los análisis de expresión génica en el desarrollo sexual de *Fusarium graminearum* durante el desarrollo sexual, realizado por Guenther et al. (2009), mostraron un incremento en los niveles de expresión de genes implicados en la β oxidación de ácidos grasos y de genes codificantes de peroxina. Así mismo en *P. anserina* se ha demostrado la importancia de las peroxinas durante el desarrollo meiótico (Tabla 1), y en general la importancia de los PO durante la maduración y germinación de las esporas sexuales (Berteaux-Lecellier et al., 1995; Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier, 2013 y Suaste-Olmos et al., 2018).

Tabla 1. Peroxinas de *P. anserina* y las etapas del desarrollo sexual en las que participan

Etapa	Peroxinas
Inducción de la meiosis	PEX1, PEX2, PEX3, PEX4, PEX8, PEX10, PEX12, PEX13, PEX20, PEX22 y PEX26
Meiosis	PEX5, PEX7

Los datos de la tabla corresponden al hongo filamentoso *P. anserina* y fueron recuperados de Peraza-Reyes y Berteaux-Lecellier (2013) y Suate-Olmos et al. (2018).

En *N. crassa* la composición de ácidos grasos de los tejidos sexuales difiere a la de los tejidos asexuales. La principal reserva de lípidos en las esporas asexuales son los fosfolípidos mientras que en las esporas sexuales abundan los triglicéridos. Los macroconidios también contienen niveles relativamente altos de 18:2 y 18:3, y niveles bajos de 18:1. Mientras que las ascosporas tienen niveles traza de 18:3 (Goodrich-Tanrikulu, et al., 1998). Además, se ha demostrado que los triglicéridos y la trehalosa son las principales fuentes de carbono y energía para la germinación de las esporas sexuales (Flavell y Fincham, 1968). Como se ha mencionado con anterioridad los glioxisomas de *N. crassa*, contienen enzimas para la β -oxidación de ácidos grasos y las enzimas del ciclo del glioxilato (Flavell y Woodward, 1971). Esto permite comprender la importancia de los POs en el desarrollo sexual de *N. crassa* y el porqué de la ausencia de la isocitrato liasa (enzima clave en el ciclo del glioxilato) afecta la germinación de las ascosporas (Flavell y Fincham, 1968).

A pesar de la importancia del peroxisoma en el ciclo sexual de los hongos filamentosos, las funciones peroxisomales durante el desarrollo sexual parecen no estar conservadas entre diferentes especies de hongos. Por ejemplo, en *N. crassa* las cepas mutantes deficientes en *pex-14* (gen que codifica a una peroxina implicada en el subcomplejo de acoplamiento) se ven afectadas en la producción de peritecios y ascosporas (Managadze et al., 2007). Sin embargo, este mismo genotipo en *P. anserina* no genera defectos en la formación de peritecios, en la cariogamia o en la meiosis, por lo tanto, la formación de ascosporas no se ve afectada (Peraza-Reyes et al., 2008).

1.2 Justificación

Estudios previos han mostrado la versatilidad y el dinamismo funcional de los peroxisomas en los organismos eucariotas. En los hongos filamentosos los peroxisomas participan activamente en el

metabolismo, el desarrollo sexual y poseen actividades mecánicas adicionales. Algunas de estas funciones parecen no estar conservadas entre diferentes especies de hongos, incluso entre los estrechamente relacionados. Sin embargo, el conocimiento actual sobre los peroxisomas de *N. crassa* es limitado. Analizar el papel de las proteínas peroxisomales PEX-1, PEX-10 y PEX-14 en el crecimiento vegetativo y el desarrollo sexual de *N. crassa* es importante debido a sus papeles en la importación de proteínas en la matriz del peroxisoma y en consecuencia en la maduración y correcto funcionamiento de estos orgánulos. Por otra parte, establecer si existe una relación entre los peroxisomas y los endosomas tempranos en *N. crassa*, similar a la reportada para *Aspergillus nidulans* y *Ustilago maydis*, permitirá realizar una comparación funcional e identificar procesos fisiológicos y evolutivos conservados, así como mecanismos específicos adaptados a los estilos de vida de *N. crassa*.

1.3 Hipótesis

Las cepas de *N. crassa* mutantes carentes de las peroxinas PEX-10 y PEX-14 (translocón del peroxisoma), así como de PEX-1 (complejo de dislocación de los receptores) tendrán deficiencias en la importación de proteínas con PTS1 y mostrarán defectos en el desarrollo vegetativo y sexual.

Existirá una interacción entre los peroxisomas y algunos componentes subcelulares, tales como: microtúbulos, endosomas tempranos, gotas lipídicas y retículo endoplásmico durante el crecimiento de hifas de *N. crassa*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Describir la dinámica celular de los peroxisomas en hifas de *N. crassa* y la importancia de PEX-1, PEX-10 y PEX-14 en el desarrollo vegetativo y sexual de este hongo.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la eliminación de los genes *pex-1*, *pex-10* y *pex-14* en el desarrollo vegetativo y sexual de *N. crassa*.
- Analizar la dinámica celular de los peroxisomas de *N. crassa* y su interacción con microtúbulos, endosomas tempranos, gotas lipídicas y retículo endoplásmico.
- Explorar el papel de PEX-10 y PEX-14 en la importación de proteínas con PTS1 en los peroxisomas de *N. crassa*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cepas

Para realizar este proyecto se utilizaron las cepas descritas en la Tabla 2. En esta tabla se muestra el nombre, origen y el genotipo de las cepas empleadas en la actividad experimental, así como de las cepas generadas en este proyecto.

Tabla 2. Descripción de las cepas empleadas en este trabajo

Organismo	Nombre	Origen	Genotipo		
<i>E. coli</i>	DH5 α TM	Invitrogen	<i>F⁻Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17r^{k-}, mk⁺ phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>		

Organismo	Nombre	Origen	# FGSC*	mat	Genotipo
<i>N. crassa</i>	N1	FGSC*	988	<i>a</i>	wt: Tipo silvestre
	N150	FGSC*	9013	<i>A</i>	wt: Tipo silvestre
	SMRP12	Freitag et al., 2004	9520	<i>A</i>	ridRIP4; his3+::Pccg-1::bml::sgfp
	SMRP17	Freitag et al., 2004	4347	<i>a</i>	<i>Fluffy</i>
	SMRP18	Freitag et al., 2004	4317	<i>A</i>	<i>Fluffy</i>
	SMRP24	FGSC*	9717	<i>A</i>	<i>his-3; Δmus-51::bar⁺</i>
	SMRP25	FGSC*	9718	<i>a</i>	<i>Δmus-51::bar⁺</i>
	SMRP320	Seidel et al., 2013	NA	<i>A</i>	<i>Δmus51::bar+ ; his-3+::Pccg-1::c-Gly::gfp::ypt-52</i>
	SMRP364	Rico-Ramírez et al., 2018	NA	<i>A</i>	<i>Δmus51::bar+ ; his-3+:: Pccg-1::cse-7::8xGly::gfp</i>
	SMRP463	FGSC*	13389	<i>a</i>	<i>Δpex-1::hph⁺;Δmus-51::bar⁺</i>
	SMRP491	Este proyecto	13389	<i>a</i>	<i>Δpex-1::hph⁺;Δmus-51::bar⁺</i>
	SMRP466	FGSC*	11333	<i>a</i>	<i>Δpex-10::hph⁺;Δmus-51::bar⁺</i>
	SMRP467	FGSC*	11304	<i>A</i>	<i>Δpex-14::hph⁺;Δmus-51::bar⁺</i>
	SMRP468	FGSC*	11305	<i>a</i>	<i>Δpex-14::hph⁺;Δmus-51::bar⁺</i>
	SMRP492	Este proyecto	NA	<i>A</i>	<i>Δmus-51::bar⁺ ; his-3+::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR</i>
	SMRP493	Este proyecto	NA	-	<i>Δpex-10::hph⁺;Δmus-51::bar⁺; his-3+::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR</i>
SMRP494	Este proyecto	NA	-	<i>Δpex-14::hph⁺;Δmus-51::bar⁺; his-3+::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR</i>	

*FGSC: Fungal Genetic Stock Center

2.2 Vectores

En la Tabla 3 se describen los vectores empleados en este proyecto. Estos vectores fueron empleados para hacer las construcciones génicas necesarias en el marcaje de los POs de *N. crassa*.

Tabla 3. Descripción de los vectores empleados en este trabajo

Nombre	Tamaño	Genotipo	Resistencia	Origen
VMRP13 pMF272	8479 pb	3' <i>his-3Flank::Pccg-1::sgfp+::5'Δhis-3</i>	Amp/His	Freitag et al., 2004
VMRP73 <i>Pccg_C_8Glygfp</i>	8503 pb	<i>Pccg-1::gfp::8Gly</i>	Amp/His	Honda y Selker 2009
VMRP81 pST14	8500 pb	<i>Pccg-1::6xHis:sf-gfp</i>	Amp/His	Starr et al., 2018
VMRP94 pEHN1 <i>nat</i>	5870 pb	<i>Ptrpc::natR::Pgpd::trpC terminator</i>	Amp/NCT	Kück y Hoff, 2006
VMRP162 pC- TagRFP	5519 pb	10xGly:: <i>tagrfp</i>	Hig/Kan	S. Honda. No publicado.
VMRP163 <i>tagrfp::PTS1::natR</i>	9460	3' <i>his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'Δhis-3</i>	Amp/His/NCT	Este Proyecto

Amp: ampilina; His: histidina; NCT: nourseotricina; Kan: kanamicina

2.3 Oligonucleótidos iniciadores

En las siguientes tablas se muestran los oligonucleótidos empleados en este proyecto.

Tabla 4. Descripción de los oligonucleótidos iniciadores empleados para la comprobación molecular de las cepas Δ *pex* del FGSC

Nombre	Secuencia 5'-3'	Longitud	% GC	Tm (°C)	Nota
OD UTR 5' <i>pex-1</i>	TTCGCTAGGTACGGTCAGGACC	22	59	58.6	Ninguna
OR ORF <i>pex-1</i>	AGCACCTGACCATCCGTGATAGG	23	57	58.8	Ninguna
OD UTR 5' <i>pex-10</i>	ATCCACTGCCACAGCTTCGACG	22	59	58.6	Ninguna
OR ORF <i>pex-10</i>	TCGTCTCACGTCTGCACAACGG	22	59	58.6	Ninguna
OD UTR 5' <i>pex-14</i>	CGTCTGCCAGTCTCAACAAGG	22	59	58.6	Ninguna
OR ORF <i>pex-14</i>	TCCGTTGCTGCTTGAGCCATCG	22	59	58.6	Ninguna

Tabla 5. Descripción de los oligonucleótidos iniciadores empleados en la construcción del vector requerido para el marcaje de los peroxisomas de *N. crassa*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Longitud	% GC	Tm (°C)	Nota
OR <i>natR_EcoR_I</i>	CCGGAATTCTCAGGGGCAGGGCATGCTCATG	31	65	62.4	Dímerización
OD Tag-RFP_ <i>Pac_I</i>	CCTTAATTAACATGGTGTCTAAGGGCG	27	42	56.4	<i>Harpin</i>
OR Tag-RFP_PTS1_ <i>Ptrp_C_natR</i>	TTAGAGGCGGGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCATT AAG	39	46	59.9	<i>Harpin</i> y dímerización
OD pTRP_c_ <i>natR</i> PTS1_ <i>Tag-RFP</i>	CGAGCTGTACAAGTCCCGCCTCTAAAGCATTTTTGG GCTTGGCTGGAGC	50	52	59.3	<i>Harpin</i> y auto- complementación

Tabla 6. Descripción de los oligonucleótidos iniciadores empleados en la comprobación molecular de la cepa con los peroxisomas marcados

Nombre	Secuencia 5´-3´	Longitud	Tm	Nota	Fuente
MRp10	AGAGACAAGAAAATTACCCCTTCTT	26	62	Ninguna	Riquelme et al., 2007
ORF TagRFP	GAATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACC	26	61	Ninguna	Este proyecto
MRp12	ATAATGAACGGAAGGTAGTTGTAGAAAG	28	61	Ninguna	Riquelme et al., 2007
MRp13	ATGGATATAATGTGGCTGTTGAAAG	25	60	Ninguna	Riquelme et al., 2007

2.4 Medios de cultivo

2.4.1 Medios de cultivo para *E. coli*

Para el cultivo de *E. coli*, se empleó el medio Luria-Bertani (LB), el cual se preparó disolviendo 1.0 g de peptona, 0.5 g de extracto de levadura, y 100 mg de NaCl en 100 mL de agua destilada. En el caso del medio sólido se adicionó 1.5 g de agar bacteriológico. A continuación, se esterilizó en autoclave, a 15 lb de presión durante 15 min. Después de la esterilización, el medio se distribuyó en placas de Petri de 100 x 15 mm adicionando 20 mL por placa. El medio LB empleado para seleccionar colonias transformantes fue suplementado con el respectivo antibiótico (ampicilina a 50 µg/mL o kanamicina a 50 µg/mL).

2.4.2 Medios de cultivo para *N. crassa*

Para el cultivo de *N. crassa*, se empleó medio mínimo de Vogel (MMV) y medio completo de Vogel (MCV). El MMV, se preparó con sales de Vogel 50X (Vogel, 1956; Anexo 2) y sacarosa al 1.5 % o ácido oleico al 0.25 % como fuente de carbono. En el caso del medio con ácido oleico se utilizó como emulsificante Tween 20 al 1 % (modificado de Managadze et al., 2007). Para preparar los medios sólidos, se empleó agar al 1.5 % o al 3.0 %. El MCV se preparó con sacarosa al 1.5 %, extracto de levadura 0.5 %, N-Z casaminoácidos al 0.5 % y sales de Vogel 50X (Vogel, 1956; Anexo 2). Los experimentos de cruza sexuales se realizaron en medio sintético de cruza (MSC), el cual se preparó haciendo una dilución 1:1 entre el agar del MSC (sacarosa al 4 % y agar al 4 %) y las sales del MSC 2x (Westergard, 1947; Anexo 2). La recuperación de colonias transformantes se realizó utilizando el medio FGS. Este medio se preparó disolviendo 2 mL de sales de Vogel 50X (Vogel, 1956; Anexo 2), 1.0 g de agar bacteriológico y 10 mL de solución FGS que contiene sorbosa al 20 %, fructosa al 0.5 % y glucosa al 0.5 % (esterilizada por filtración) en 100 mL de

agua destilada. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave, a 15 lb de presión durante 15 min. El medio esterilizado y atemperado se suplementó con L-Histidina (500 µg/mL, Sigma-Aldrich, esterilizada por filtración) para el cultivo de las cepas auxótrofas a histidina y en el caso de la selección de colonias transformantes el medio fue suplementado con sulfato de nourseotricina (NCT, 50 µg/mL) o higromicina (300 µg/mL). Por último, los medios sólidos se distribuyeron en placas de Petri de 100 x 15 mm (20 mL/placa) o de 60 x 15 mm (10 mL/placa); para los cultivos en tubo de ensayo se adicionó de 1-5 mL de medio por tubo y en el caso de los tubos para la recuperación de macroconidios se realizó una inclinación del medio para aumentar el área superficial.

2.5 Condiciones de cultivo

El hongo *N. crassa* se cultivó en placas de Petri, tubos con medio inclinado y tubos con medio sin inclinar. En las tres formas de cultivo, el hongo se inoculó al centro o a un extremo en el caso de las placas de Petri, con 1×10^5 macroconidios o un disco micelial (8 mm de diámetro) obtenido a partir de cultivos en placa de 24 h de las cepas deficientes en macroconidiación. La mayoría de los cultivos se incubaron en oscuridad a 30 °C, a excepción de las cruas sexuales las cuales se incubaron a 25 °C.

2.6 Análisis fenotípico de las cepas Δpex

2.6.1 Análisis de la tasa de crecimiento

Los cultivos de las cepas en placas de Petri fueron monitoreados a las 3, 6, 9, 12 h después de la inoculación. Para evaluar el crecimiento del micelio se evaluaron 3 cultivos por cepas y se midieron ocho diámetros por caja y tiempo de observación.

2.6.2 Análisis de la producción de hifas aéreas

Los cultivos de las cepas en tubos de ensayo con agar no inclinado fueron incubados durante cinco días en las condiciones previamente descritas. Para evaluar la producción de hifas aéreas se realizaron 3 cultivos por cepa y se midió la altura del micelio aéreo determinando un total de 8 alturas por cultivo.

2.6.3 Análisis de la macroconidiación

2.6.3.1 Recuperación de macroconidios

Los cultivos de las cepas en tubos de ensayo con agar inclinado fueron incubados en oscuridad a 30 °C durante cinco días y luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante cinco días más, bajo luz blanca para promover la conidiación. Se realizaron 3 cultivos por cepa y para recuperar los macroconidios se les adicionó 5 mL de agua destilada estéril y se raspó la superficie del medio con palillos de madera estériles. Luego se filtró el líquido en tubos de 50 mL estériles usando un filtro de tela (50 % rayón, 50 % poliéster). La solución obtenida se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 min. Luego de desechar el sobrenadante los conidios se resuspendieron en 1 mL de sorbitol 1 M estéril. Finalmente, se almacenaron a -20 °C.

2.6.3.2 Cuantificación de macroconidios

Cada *stock* de conidios se homogeneizó en Vortex por 10 s y luego 10 µL de cada *stock* se resuspendieron en 990 µL de agua destilada en un tubo de microcentrífuga. Para realizar el conteo se cargaron 10 µL de la dilución 10⁻² de conidios en una cámara de Neubauer. La cuantificación se realizó en un microscopio *Nikon Eclipse E100*, contando los conidios en 5 cuadros de 0.04 mm² de la cámara de Neubauer. Lo anterior se realizó por duplicado para cada *stock*. La concentración de conidios del *stock* se determinó mediante la ecuación 1, utilizando el promedio de los dos conteos.

$$\frac{\text{conidios}}{\text{mL}} = \frac{(\text{Número de conidios})(\text{Factor de dilución})(10000)}{0.2} \dots \dots \dots (1)$$

2.6.4 Análisis de las ramificaciones hifales

Para determinar la ramificación de las hifas se emplearon cultivos en placas de Petri inoculados a un extremo e incubados en obscuridad a 30 °C de 12 a 15 h (discos miceliales y conidios respectivamente). Para la cuantificación de la ramificación se determinó el número de ramas laterales presentes en los 500 µm desde el ápice hacia atrás de 30 hifas principales.

2.6.5 Análisis del diámetro de las hifas

Después de 12 a 15 h de incubación de las cepas (discos miceliales y conidios respectivamente) a 30 °C en cultivos en placas de Petri, se determinó el diámetro de las hifas. Para el análisis de este parámetro se consideró el diámetro de las hifas a una distancia de 100 μm de los ápices de 30 hifas principales. Las mediciones se realizaron a partir de 3 microfotografías provenientes de 3 cultivos por cepa. Las microfotografías se obtuvieron de un estereoscopio *Olympus SZX12* a una ampliación de 32X y utilizando el programa *Image J*.

2.6.6 Análisis de la producción de biomasa seca

Para analizar la producción de biomasa, se realizaron 3 cultivos de cada una de las cepas en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de MCV. Los matraces se inocularon con discos miceliales de las cepas y se incubaron a 30 °C durante 48 horas en agitación a 150 rpm. Después de la incubación, el micelio se recuperó por filtración y luego se sometió a secado en la incubadora de 37 °C por 48 h. Finalmente se realizó el pesado del micelio.

2.7 Métodos para analizar el desarrollo sexual de las cepas Δpex

2.7.1 Cruzas sexuales

Las cruas sexuales se realizaron en placas de 60 x 15 mm con 10 mL de MSC. En términos generales y para estandarizar el protocolo, primero se inoculó la cepa de tipo de apareamiento “*mat A*” con excepción de los ensayos de fertilidad que se describirán a continuación. Las placas inoculadas se protegieron de la luz con papel aluminio y luego se incubaron a 25 °C durante 24 h. Al cabo de este tiempo se inoculó la cepa de tipo de apareamiento complementario “*mat a*” (solución diluida de macroconidios o cuadros pequeños de agar con micelio) y posteriormente se incubaron durante 10 días a 25 °C en oscuridad hasta observar peritecios.

2.7.2 Determinación del tipo de apareamiento

Para determinar el tipo de apareamiento de una cepa, se realizaron cruzas sexuales con las cepas *Fluffy* (*mat a*) y *Fluffy* (*mat A*). Las cruzas en donde se observó la formación de peritecios fueron consideradas para establecer el tipo de apareamiento de la cepa en estudio, ya que es el contrario al de la cepa *Fluffy* empleada en la cruce.

2.7.3 Recuperación de cepas homocariones

Después de observar ascosporas en las tapas de los cultivos de las cruzas sexuales, éstas fueron recuperadas haciendo lavados de la tapa con agua destilada estéril. Las ascosporas recuperadas se sometieron a choque térmico (60 °C) durante 1 h. Luego se sembraron en placas con MMV conteniendo higromicina (300 µg/mL), L-histidina (500 µg/mL) y/o NCT (40 µg/mL) y posteriormente se incubaron a 25 °C por 18 h aproximadamente. Las ascosporas germinadas se transfirieron a tubos con 1 mL de MMV suplementado con el o los antifúngicos apropiados y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Los cultivos positivos a los medios de selección se almacenaron a 4 °C para su posterior caracterización microscópica, molecular, fenotípica o sexual.

2.7.4 Obtención de cepas con tipo de apareamiento complementario

Para caracterizar el desarrollo sexual de cualquier cepa es necesario contar con ambos tipos de apareamiento. En este caso solo se contaba con las cepas $\Delta pex-1$ y $\Delta pex-10$ de tipo de apareamiento "a". Para recuperar el tipo de apareamiento "A", las cepas $\Delta pex-1$ y $\Delta pex-10$ se cruzaron con la cepas parental #FGSC 9717 (*mat A; his-3; $\Delta mus-51::bar^+$*). Luego de realizar las cruzas sexuales, recuperar ascosporas y analizar la resistencia a higromicina de hasta 200 germinalas por caso, no se lograron obtener los tipos de apareamiento requeridos.

2.7.5. Análisis del desarrollo sexual de las cepas Δpex : cruzas heterocigotas

Para caracterizar el desarrollo sexual de las cepas Δpex en cruzas heterocigotas, se realizaron dos tipos de análisis: ensayos de fertilidad como hembra y ensayos de fertilidad como macho (Kim y Borkovich, 2006).

En los ensayos de fertilidad como hembra, primero se realizaron cultivos de 5 días de las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*), $\Delta pex-10$ (*mat a*), $\Delta pex-14$ (*mat a*) y $\Delta pex-14$ (*mat A*), después se añadieron a estos cultivos 25 μ L de una solución diluida de macroconidios de las cepas wt N1 (*mat a*) y wt N150 (*mat A*) según corresponde. En los ensayos de fertilidad como macho, primero se realizaron cultivos de 5 días de las cepas *Fluffy* (*mat a*) y *Fluffy* (*mat A*), después se inocularon cuadros pequeños de agar con micelio de las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*), $\Delta pex-10$ (*mat a*), $\Delta pex-14$ (*mat a*) y $\Delta pex-14$ (*mat A*) como corresponde. Las placas inoculadas se protegieron de la luz con papel aluminio y luego se incubaron a 25 °C durante 5 días o hasta observar la formación de peritecios.

Para caracterizar el desarrollo sexual de las cepas Δpex se realizaron las cruzas heterocigotas mostradas en la tabla 7:

Tabla 7. Cruzas heterocigotas realizadas para analizar la fertilidad femenina y masculina de las cepas Δpex

Cepa	Ensayos de fertilidad como hembra	Ensayos de fertilidad como macho
$\Delta pex-1$	$\Delta pex-1$ (<i>mat a</i>) x wt N150 (<i>mat A</i>)	<i>Fluffy</i> (<i>mat A</i>) x $\Delta pex-1$ (<i>mat a</i>)
$\Delta pex-10$	$\Delta pex-10$ (<i>mat a</i>) x wt N150 (<i>mat A</i>)	<i>Fluffy</i> (<i>mat A</i>) x $\Delta pex-10$ (<i>mat a</i>)
$\Delta pex-14$	$\Delta pex-14$ (<i>mat a</i>) x wt N150 (<i>mat A</i>)	<i>Fluffy</i> (<i>mat A</i>) x $\Delta pex-14$ (<i>mat a</i>)
	$\Delta pex-14$ (<i>mat A</i>) x wt N1 (<i>mat a</i>)	<i>Fluffy</i> (<i>mat a</i>) x $\Delta pex-14$ (<i>mat A</i>)

2.7.6. Análisis del desarrollo sexual de las cepas Δpex : cruzas homocigotas

La caracterización del desarrollo sexual de las cepas Δpex en cruzas homocigotas, se realizó por medio de cruzas entre las cepas del mismo genotipo, pero de diferente tipo de apareamiento. Las cruzas planeadas para este experimento fueron: $\Delta pex-1$ (*mat A*) x $\Delta pex-1$ (*mat a*), $\Delta pex-10$ (*mat A*) x $\Delta pex-10$ (*mat a*), $\Delta pex-14$ (*mat A*) x $\Delta pex-14$ (*mat a*). Sin embargo, dada la incapacidad de recuperar las cepas $\Delta pex-1$ (*mat A*) y $\Delta pex-10$ (*mat A*), solo se realizó la cruce $\Delta pex-14$ (*mat A*) x $\Delta pex-14$ (*mat a*).

2.8 Métodos genéticos y moleculares

2.8.1 Extracción de ADN genómico de *N. crassa* con *DNeasy plant extraction kit (QIAGEN™)*

Las cepas *Δpex* se inocularon en 50 mL de MCV contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL y luego se incubaron a 30 °C en oscuridad y con agitación a 150 rpm. Después de este tiempo, el micelio se recuperó por filtración y se lavó con agua destilada. El material colectado se rompió mecánicamente en un mortero utilizando nitrógeno líquido y luego se lisó con la adición de 400 µL de la solución de lisis (*buffer AP1*), 4 µL de *ARNasa A* (Qiagen, 100 mg/mL) y agitación en Vortex. Luego se incubó 10 min a 65 °C, agitando por inversión de 2 a 3 veces durante esta etapa. Después de la lisis, se agregaron 130 µL de la solución de precipitación de proteínas (*buffer P3*) y se centrifugó a 20.000 xg durante 5 min. El sobrenadante obtenido se hizo pasar a través de la *QIAshredder Mini Spin Columns* por centrifugación a 20.000 xg durante 2 min. Al fluido recolectado se agregaron 675 µL de la solución de unión (*buffer AW1*) y luego se hizo pasar a través de la *DNeasy Mini Spin Columns* por medio de una centrifugación a 6.000 xg durante 1 min (500 µL x 2). El ADN unido a la membrana fue lavado con 500 µL de solución de lavado (*buffer AW2*) en dos ocasiones. Para eluir el ADN de la membrana se adicionaron 50 µL de la solución de elución (*buffer AE*) y se conservó a -20 °C hasta su uso posterior. Las muestras de ADN genómico obtenidas se cuantificaron y se determinó su pureza mediante la relación A260/A280 en un *NanoDrop life Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)*. Finalmente, la integridad de las muestras se analizó por medio de una electroforesis de agarosa al 1 % en TAE 1X durante 1 h a 70 V.

2.8.2 Diseño de oligonucleótidos iniciadores para amplificar los genes *pex-1*, *pex-10* y *pex-14*

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento del marco de lectura abierto (ORF del inglés *Open Reading Frame*) de los genes *pex-1*, *pex-10* y *pex-14* de *N. crassa* (Tabla 4; Figura 6) por medio de PCR. Las secuencias de los ORFs de estos genes se identificaron en el genoma de *N. crassa*, consultando la base de datos de *FungiDB: Fungal and Oomycete Genomics Resources* (<http://fungidb.org/fungidb/>). Para el diseño de los oligonucleótidos se consideraron las siguientes características del Sambrook y Russell (2001): longitud de 18 – 25 nucleótidos (con una diferencia < 3 nucleótidos por par), un contenido G-C de entre 40 % - 60 %, una T_m de entre 50 °C - 60 °C (con una diferencia < 5 °C por par), el extremo 3' con una G o C y se aseguró que las secuencias no fueran autocomplementarias y tampoco formaran dímeros. Dichas características se evaluaron en *Oligo*

*evaluator*TM de *Sigma Aldrich* (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>) y *OligoCalc* de NCBI (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

2.8.3 Comprobación de las eliminaciones de los genes en las cepas Δpex

Para comprobar molecularmente la eliminación de los genes en las cepas Δpex , se realizaron reacciones estándar de reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés *Polymerase Chain Reaction*) y para ello se utilizó el ADN genómico de cada cepa y los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de un fragmento de los ORFs de cada gen *pex* (Tabla 4; Figura 6). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *Bio-Rad*, utilizando una enzima polimerasa casera. Los ciclos de amplificación de la PCR se programaron de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, T_m por 30 s (dependiendo de cada par de oligonucleótidos, Tabla 4) y 72 °C para la extensión dando 1 min por cada kb, y finalmente una extensión a 72 °C por 5 min.

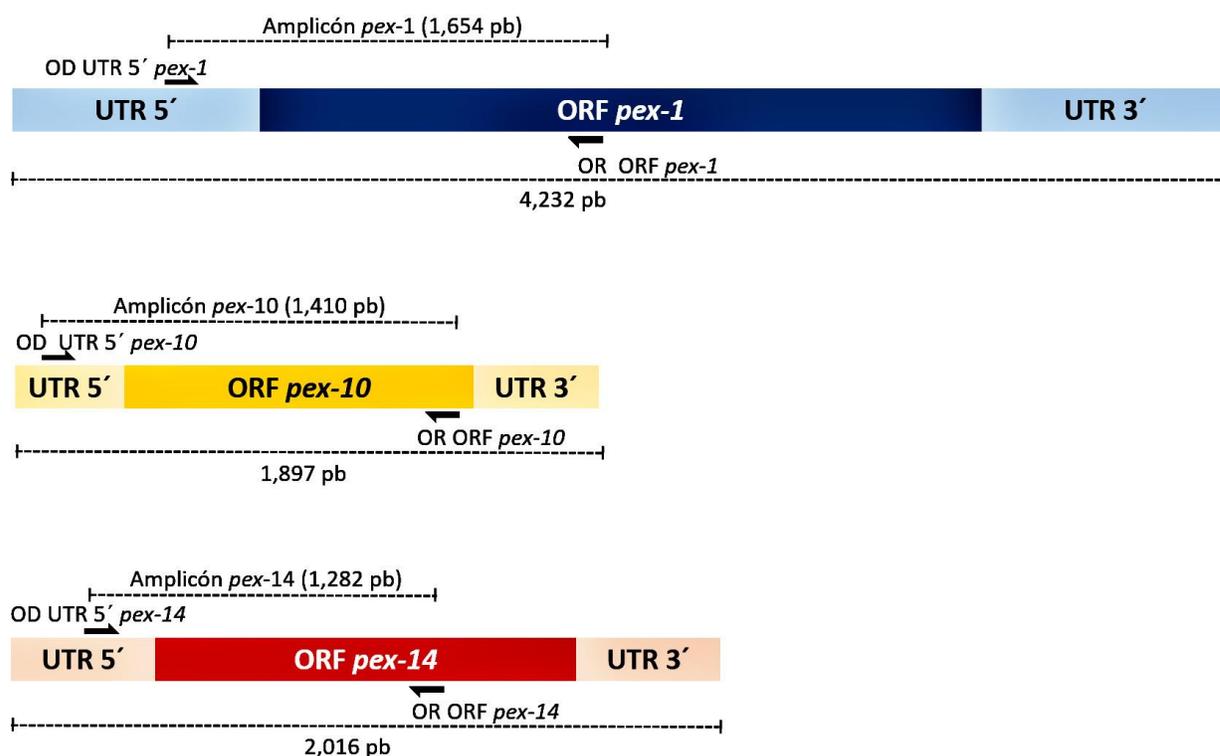


Figura 6. Estrategia seguida para el diseño de oligonucleótidos y para la comprobación molecular de la eliminación génica en las cepas mutantes $\Delta pex-1$, $\Delta pex-10$ y $\Delta pex-14$.

2.8.4 Transformación de *E. coli* por medio de choque térmico

Una alícuota de 50 μL de células quimiocompetentes (Callejas-Negrete, 2019) de las cepas DH5 α se mezclaron con 2 μL del vector purificado (aprox. 150 ng/mL) o 5 μL de la reacción de ligación, haciendo movimientos circulares con la punta de la micropipeta. Posteriormente dicha mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Luego se transfirió a un Termoblock a 42 °C por 2 min para inducir el choque térmico; inmediatamente después se transfirieron a hielo y se incubaron durante 2 min. Una vez transcurrido este tiempo se adicionaron 300 μL de medio LB (37 °C) y luego se incubaron en un Termoblock a 37 °C con 700 rpm durante 1 h. Finalmente, 100 μL de una dilución 1:10 de la mezcla de transformación con ADN plasmídico o toda la reacción concentrada en 100 μL para la transformación con reacción de ligación, se inocularon en placas de Petri con agar LB suplementado con antibiótico [ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)] y se extendieron en la superficie del agar empleando para ello una varilla vidrio. Las cajas inoculadas se incubaron a 37 °C de 15 a 18 h.

2.8.5 Extracción de ADN plasmídico con el QIAprep Miniprep Kits (QIAGEN™)

La extracción del ADN plasmídico se realizó a partir de la pastilla celular recuperada por centrifugación a 10.000 xg de un cultivo de 5 mL de células transformantes de *E. coli* en medio LB líquido suplementado con antibióticos e incubado de 12-15 h a 37 °C. A continuación, la pastilla celular se resuspendió en 250 μL de la solución de resuspensión (*buffer* AP1) conteniendo ARNasa A (0.1 mg/mL) utilizando el vortex. Después se añadieron 250 μL de la solución de lisis (*buffer* AP2) y se mezcló por inversión 5 veces. Posteriormente se agregaron 350 μL de solución de neutralización (*buffer* N3) y enseguida los tubos se mezclaron por inversión 5 veces. Para recuperar el sobrenadante con los plásmidos disueltos se realizó una centrifugación a 12.000 xg durante 10 min. El sobrenadante obtenido se depositó en la *QIAprep spin column* y luego se centrifugó a 12.000 xg 1 min. El siguiente paso consistió en lavar el ADN plasmídico unido a la matriz; para ello se agregaron 750 μL de solución de lavado (*buffer* PE) y se centrifugó a 12.000 xg durante 1 min. Luego se realizó una segunda centrifugación para secar el ADN plasmídico. La elución de los plásmidos de la matriz se logró al agregar 50 μL de solución de elución (*buffer* EB) y centrifugando a 12.000 xg durante 1 min. Las muestras de ADN plasmídico obtenidas se cuantificaron y se determinó su pureza mediante la relación A260/A280 en un *NanoDrop life Spectrophotometer* (Termo Fisher Scientific). Finalmente, la integridad de las muestras se analizó por medio de una electroforesis de agarosa al 1 % en TAE 1X de 1 h a 70 V.

2.8.6 Diseño del vector para el marcaje de los peroxisomas con la proteína fluorescente TagRFP

Primero se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen *tagrfp* y *natR* a partir de los vectores VMRP162 y VMRP94, respectivamente (Tabla 5). El oligonucleótido directo empleado para la amplificación del gen de la proteína fluorescente contiene la secuencia diana de la enzima *Pac* I (5' TTAATTAA 3'), más las bases extras necesarias para que la enzima pueda realizar la digestión enzimática (1-3 bases), así como, una porción complementaria con el gen de la proteína fluorescente. El oligonucleótido reverso contiene 25 nucleótidos de complementación con el gen de la proteína fluorescente y la secuencia nucleotídica correspondiente a PTS1 (SRL para *N. crassa* según Managadze et al. 2007) y algunos nucleótidos de complementación con el gen de resistencia a NCT (*natR*). Para la amplificación del gen *natR*, se diseñó un oligo directo que contiene una secuencia complementaria al gen de la TagRFP, la secuencia PTS1 y 25 nucleótidos de complementación con el gen *natR*. El oligo reverso contiene una secuencia de complementación con el gen *natR*, la secuencia diana de la enzima *EcoR* I (5' GAATTC 3') y hasta 2 bases extra para que la enzima pueda hacer la digestión (Tabla 5; Figura 7). Con los oligonucleótidos diseñados se amplificaron los fragmentos recombinantes *Pac_I::tagrfp::PTS1::STOP* y *tagrfp::PTS1::STOP::natR::EcoR_I*. Los fragmentos recombinantes se sometieron a PCR de fusión para generar la fusión: *Pac_I::tagrfp::PTS1::STOP::natR::EcoR_I*. La fusión anterior y el vector VMRP13 se sometieron a doble restricción con las enzimas *Pac* I y *EcoR* I (New England Biolabs). Seguidamente, los productos de la digestión fueron sometidos a ligación con T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Después del tiempo de incubación, 5 µL de la reacción de ligación se emplearon para la transformación de células quimiocompetentes (Callejas-Negrete, 2019) de *E. coli* DH5α. Las bacterias transformantes se seleccionaron por la resistencia a ampicilina, se comprobaron por PCR de colonia y posteriormente a partir de cultivos líquidos de estas bacterias se realizó extracción de ADN plasmídico. El vector obtenido fue nombrado VMRP163 *3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'Δhis-3* (Figura 7).

Para confirmar la ligación de la fusión en el vector, se realizó doble restricción con las enzimas *Pac* I y *EcoR* I (New England Biolabs) y secuenciación de la fusión en Eton BioScience Inc., para confirmar la integridad de la secuencia de orientación peroxisomal (PTS1).

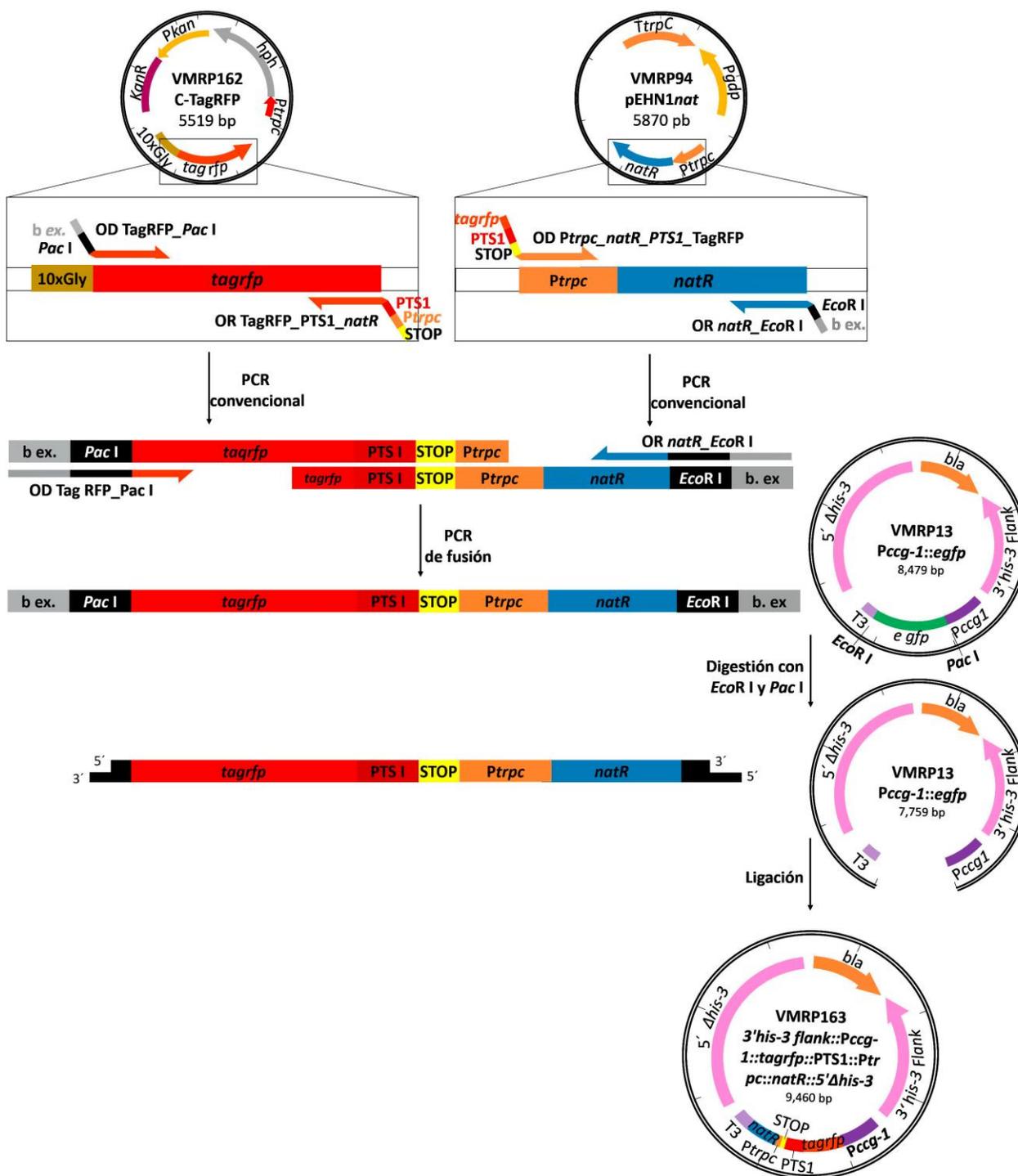


Figura 7. Estrategia seguida para construir el vector VMRP163 *3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'Δhis-3*. Dicho vector fue empleado para marcar los POs de la cepa #FGSC 9717 con la proteína TagRFP-PTS1. En este esquema se muestra las diferentes etapas que se siguieron para la construcción de dicho vector.

2.8.7 Transformación de *N. crassa* por electroporación

Previo a la electroporación, alícuotas con 1.25×10^8 conidios con menos de un mes de recolección, se lavaron dos veces con 1 mL de sorbitol 1 M estéril centrifugando a 7.500 xg. Para comenzar, los conidios lavados se resuspendieron en 50 μ L de sorbitol 1 M y se mezclaron con 10 μ L del vector VMRP163 (0.5-1 μ g) linealizado con la enzima *Ssp I* (*New England BioLabs*) y tratados con fosfatasa alcalina de camarón (SAP, *Thermo Fisher Scientific*). La mezcla anterior se transfirió a una celda de electroporación fría y luego se mantuvo en hielo hasta dar el pulso eléctrico en el electroporador *Gene Pulser Xcell* (*BioRad*) programado de la siguiente manera: resistencia 600 Ω , capacitancia 25 μ F y voltaje de 1.5 kV (Margolin et al., 1997). Inmediatamente después del pulso eléctrico, se adicionó 1 mL de sorbitol 1 M y 1 mL de la solución de recuperación (Anexo 2) y luego se incubó a 30 °C durante 3 h con una agitación mínima en un *hibridizador HL-2000 HybriLinker*. Posteriormente, los conidios se precipitaron por centrifugación a 1.875 xg durante 2 minutos y se eliminó 1.8 mL del sobrenadante. Con el volumen restante se resuspendieron los conidios y 100 μ L de este volumen se inocularon en placas con medio FGS (fructosa-glucosa-sorbosa). La selección de transformante se realizó mediante la prototrofia a histidina debido a que la cepa parental fue #FGSC 9717 (*his-3*; Δ *mus-51::bar*). Las placas inoculadas se incubaron a 30 °C por 3 días o hasta observar colonias transformantes. Las colonias obtenidas se recuperaron en tubos con 1 mL de MMV y se incubaron hasta recuperar conidios. Finalmente, los conidios de las cepas transformantes fueron inoculados en placas de Petri para el tamizaje del micelio mediante microscopía confocal de escaneo láser.

2.8.8 Comprobación molecular de la inserción del vector VMRP163 3'*his-3*Flank::*Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5' Δ his-3* en el locus *his-3* de *N. crassa*

Para comprobar molecularmente la inserción del vector VMRP163 en el genoma de *N. crassa*, se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la Tabla 6 (MRp10, ORF TgRFP, MRp12 y MRp13). Los oligonucleótidos MRp10 y MRp12 tienen secuencia complementaria con el genoma de la cepa parental, mientras que los oligos ORF TagRFP y MRp13 tienen secuencia complementaria al vector. De tal manera que al emplear los oligos MRp10 y ORF TagRFP, así como, MRp12 y MRp13 en reacciones de PCR diferentes, se pudo comprobar la inserción del vector en el locus *his-3* mediante la amplificación de dos fragmentos de 3.9 y 2.1 Kb (Figura 8).

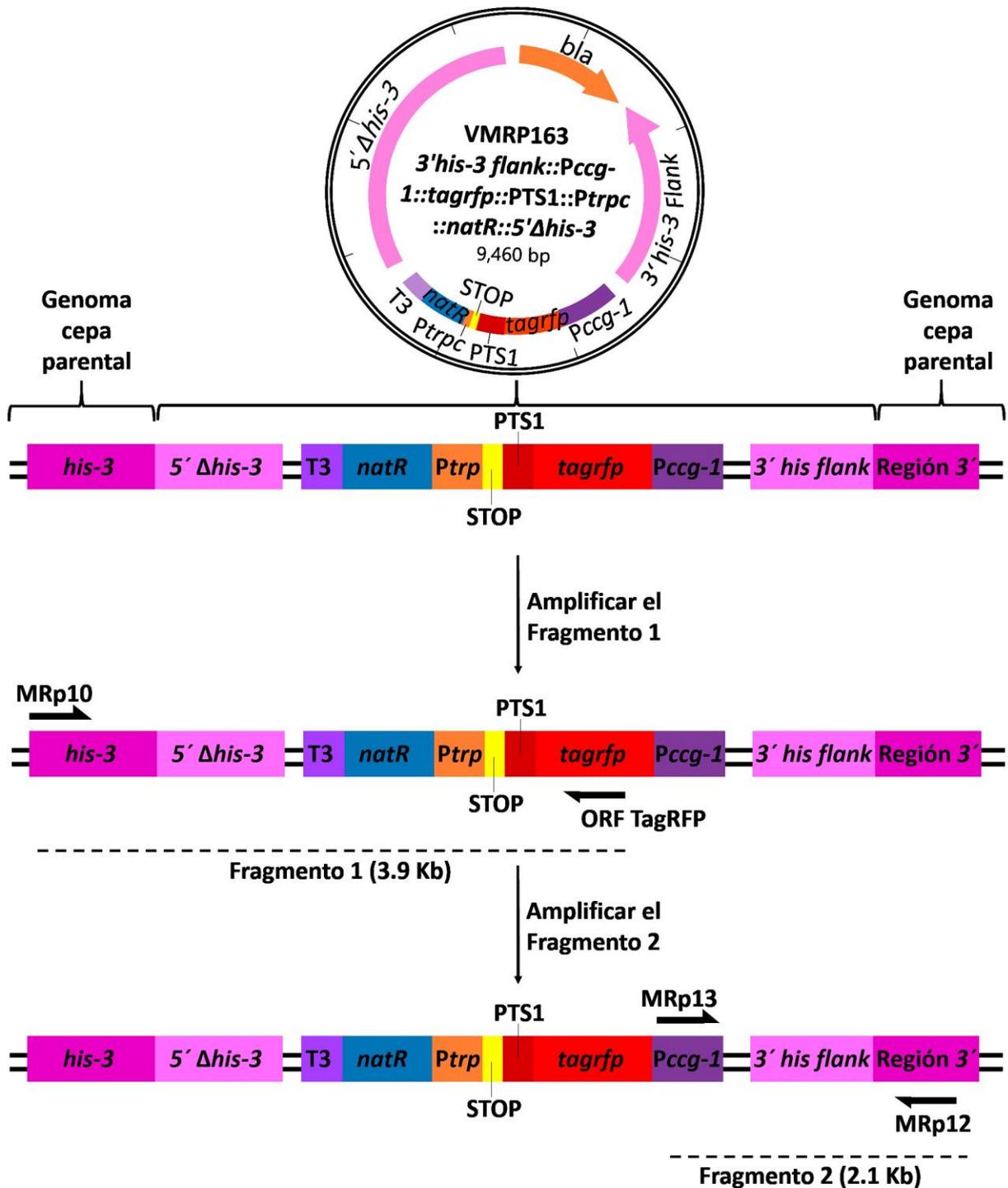


Figura 8. Estrategia seguida para comprobar molecularmente la inserción del vector VMRP163 *3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'Δhis-3* en el locus *his-3* de *N. crassa*. El vector de expresión empleado para el marcaje de los POs, contiene secuencias homólogas al locus *his-3* que permiten su recombinación en este sitio del genoma. Para comprobar la inserción del vector se emplearon dos pares de oligonucleótidos iniciadores: MRp10 y ODTaGRFP, así como MRp13 y MRp12. En cada par de oligonucleótidos existe uno que se alinea fuera de la secuencia del vector, de tal manera que se logran amplificar dos fragmentos de 3.9 y 2.1 Kb.

2.9 Fusiones vegetativas

Para analizar la dinámica de los POs con los MTs, ETs y RE, se realizaron fusiones vegetativas entre la cepa que contiene los POs marcados con la proteína TagRFP-PTS1 (SMRP492) y las cepas que contienen los MTs (SMRP12), ETs (SMRP320) y RE (SMRP361) marcados con la proteína fluorescente GFP y del mismo tipo de apareamiento. Para ello 1×10^6 conidios de cada una de las cepas se mezclaron en un tubo para PCR y después se inocularon en una placa de Petri con MMV-sacarosa al 3.0 % de agar. Las placas se incubaron en obscuridad durante 18 horas a 25 °C.

2.10 Tinción de gotas lipídicas con rojo Nilo

El colorante rojo Nilo (9-diethylamino-5*H*-benzo[α]phenoxazine-5-one; 450-500; 500 nm Sigma-Aldrich) tiñe lípidos neutros intracelulares (Greenspan et al., 1985) y por ello se utilizó para visualizar GLs en *N. crassa*. La tinción con rojo Nilo, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Thines et al. (2000). Se preparó una solución 50 mM Tris/malato buffer (pH 7.5) con 20 mg/mL polivinilpirrolidona y 2.5 μ g/mL de rojo Nilo. El rojo Nilo se disolvió inicialmente en acetona a una concentración 10 mg/mL y luego se diluyó para obtener la concentración deseada. Para hacer la visualización microscópica, 15 μ L de la solución anterior se colocaron sobre un cubreobjetos, después se prosiguió a hacer el “método de bloque invertido” (Hickey et al., 2004) y finalmente se incubó durante 5 min antes de observar al microscopio.

2.11 Microscopía

Para el tamizaje de las cepas transformantes y los análisis de co-localización de los POs con MTs, ETs, rojo Nilo (GLs) y RE, se empleó un microscopio invertido *Olympus FluoviewTM FV1000* equipado con un láser de argón (GFP: excitación 488 nm; emisión 505-525 nm; Rojo Nilo: excitación 450-500; emisión: 528) y un láser de estado sólido bombeado por diodos (DPSS, Melles Griot, Carlsbad, CA; RFP: excitación 543 nm; emisión, 560-660 nm). Para la visualización de las muestras se utilizaron el objetivo de 20x y el objetivo de aceite de inmersión (NA 1.42) 60x Plan Apo N (*Olympus*). Por otra parte, el análisis de la dinámica celular de los POs con MTs, ETs, rojo Nilo (GLs) y RE, se realizó en un microscopio confocal invertido *Nikon Eclipse Ti-E Ti-E/B* con un sistema de disco giratorio, una unidad de escaneo láser *CSU-X1 Yokogawa* y una cámara *Andro iXon Ultra*. Para analizar el micelio en ambos microscopios, las cepas se crecieron en MMV al 3.0 %

de agar y luego fueron preparadas para su visualización por medio del “método de bloque invertido” (Hickey et al., 2004).

Adicionalmente, se utilizó un estereoscopio SZX15 OLYMPUS equipado con oculares WHS10X-H/22, un objetivo Olympus DF PLAPO 1X PF (Japón) y una cámara *Olympus DR controller 2002* (Olympus optical CO., Ltd), para capturar las imágenes de la morfología colonial, estructuras sexuales, diámetro de las hifas y ramificación de las cepas Δpex .

2.12 Empleo de benomilo para la despolimerización de microtúbulos

El benomilo es un compuesto que despolimeriza los MTs, en este trabajo se aplicó a la fusión vegetativa entre las cepas SMRP492 (POs marcados con la TagRFP-PTS1) y la cepa SMRP12 (MTs carcados con GFP). Para ello 15 μ L de benomilo a una concentración de 5 μ g/mL, se colocaron sobre el cubreobjetos previo a la técnica de “método bloque invertido” (Hickey et al., 2004). Tres minutos después del contacto entre el micelio y el compuesto, se realizó la visualización microscópica.

2.13 Edición y análisis de imágenes y videos

Las imágenes obtenidas a partir del microscopio invertido *Olympus FluoviewTM FV1000* se capturaron con el *software FV10-ASW* (versión 4.0.2.9, *Olympus*) y los videos conseguidos en el microscopio confocal invertido Nikon Eclipse Ti-E Ti-E/B, se recuperaron con el software “NIS-Elements AR” (versión 4.5101). Tanto imágenes como videos fueron editaron en *Adobe Photoshop CS6*.

El análisis de las imágenes y videos, se realizó en *FIJI ImageJ* utilizando los *plugin* y las herramientas descritas a continuación. Los análisis de co-localización (coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de Mansers) se realizaron utilizando el *plugin JaCoP* y la herramienta de análisis *Co-localization Threshold*. Por otra parte, los cálculos de velocidad de desplazamiento se realizaron con el *plugin Tracking*, los kimogramas con el *plugin Kimograph* y las mediciones de altura del micelio aéreo, diámetro de hifas y POs con la herramienta de análisis *Measure*.

2.14 Análisis estadísticos

Los experimentos para determinar la tasa de crecimiento, macroconidiación, producción de hifas aéreas y producción de biomasa se realizaron por triplicado, es decir tres cultivos por cepa. Mientras que, en la determinación del diámetro de las hifas y la ramificación, se realizaron mediciones en 30 hifas principales. En el caso de la medición del micelio aéreo se determinaron 8 alturas por cultivo. Para el análisis estadístico de estos datos, primero se realizó el contraste de normalidad por medio de la prueba de Shapiro Wilks. Los datos con distribución normal se sometieron a un análisis de varianza paramétrico de una vía, con un nivel de significancia $p < 0.05$. En caso de encontrar diferencias entre las medias, a continuación, se realizó una prueba de Tukey ($p < 0.05$). Mientras tanto, los datos que mostraron una distribución diferente a la normal se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) y en caso de encontrar diferencias entre las medianas, los datos se sometieron a la prueba U de Mann Whitney. Todos estos análisis se realizaron en el programa *RStudio*.

En el programa *RStudio* también se realizó el mapa de calor para comparar los datos cuantitativos de la caracterización fenotípica de las cepas Δpex .

Capítulo 3. Resultados

3.1 Comprobación de las eliminaciones génicas en las cepas Δpex

Antes de caracterizar el fenotipo y el desarrollo sexual de las cepas $\Delta pex-1$, $\Delta pex-10$ y $\Delta pex-14$ obtenidas del *FGSC*, se confirmó la eliminación de los genes *pex* en las cepas mediante PCR. A continuación, se presentan fotografías de los geles de electroforesis donde fueron separadas las muestras de ADN genómico de las cepas Δpex (Figura 9 A) y los productos de PCR que confirmaron el estado heterocarión de las cepas $\Delta pex-1$, ya que en la fotografía del gel de electroforesis se observó una banda de 1,654 pb que coincide con la banda amplificada a partir del ADN genómico de la cepa wt y que corresponde al gen *pex-1* (Figura 9 B, carril 2 y 3).

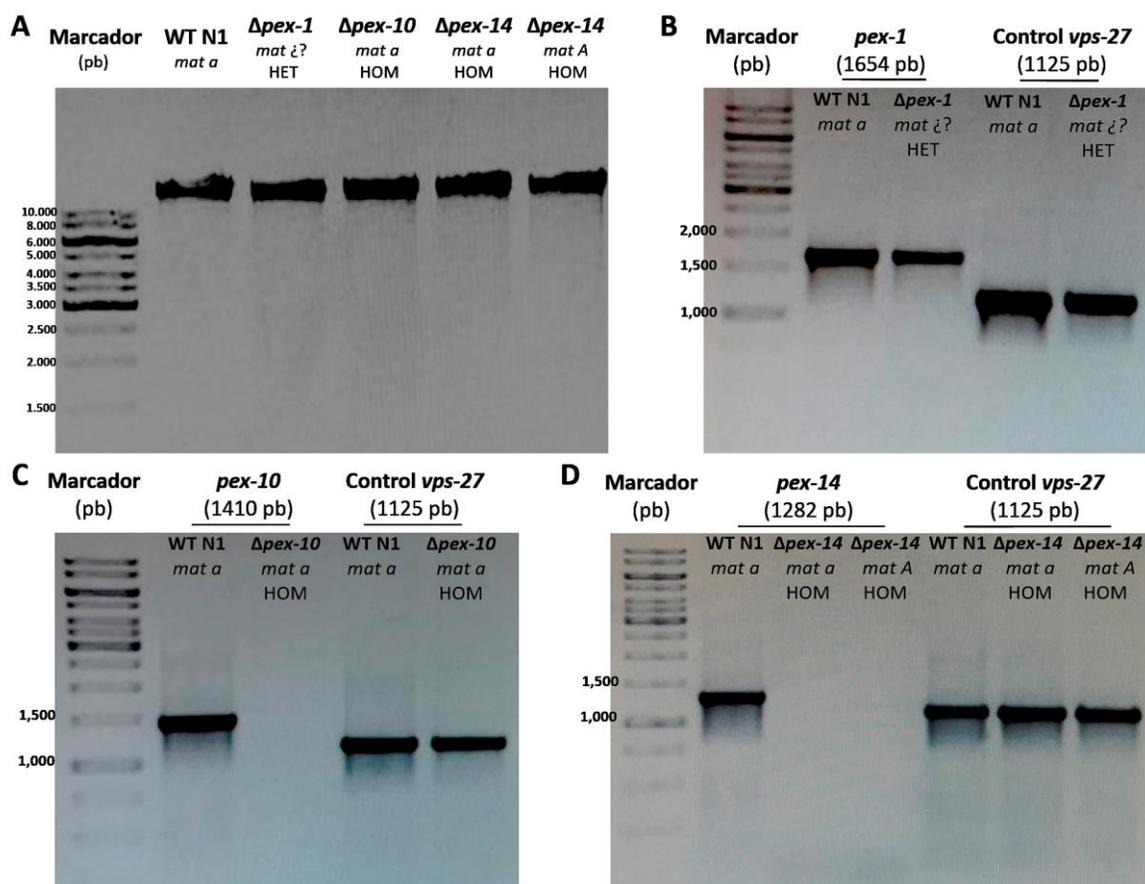


Figura 9. Comprobación molecular de las cepas Δpex del *FGSC*. (A) Fotografía del gel de electroforesis que muestra la integridad del ADN genómico extraído de las cepas Δpex . (B) Fotografía del gel de electroforesis que confirma el estado heterocarión de la cepa $\Delta pex-1$. (C) Fotografía del gel de electroforesis que confirma el estado homocarión de la cepa $\Delta pex-10$. (D) Fotografía del gel de electroforesis que confirma el estado homocarión de las cepas $\Delta pex-14$ (*mat a* y *A*). Control positivo cepa wt N1 (*mat a*) y como control de carga se amplificó un fragmento del gen *vps-27*.

Por otra parte, se confirmó el estado homocarión de las cepas $\Delta pex-10$ (*mat a*), $\Delta pex-14$ (*mat a*) y $\Delta pex-14$ (*mat A*), ya que en ninguno de estos casos se logró amplificar el fragmento correspondiente a los genes *pex-10* (Figura 9 C, carril 3) y *pex-14* (Figura 9 D, carril 3 y 4), respectivamente. Como control experimental se realizó la amplificación de un fragmento de 1125 pb del gen *vps-27* de *N. crassa* (Figura 9 B carriles 4 y 5, C carril 4 y 5, D carriles 5-7).

3.2 Determinación del tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$ heterocarión del FGSC

El FGSC no tenía información relacionada con el tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$, por tal motivo se realizaron cruza sexuales con las cepas *Fluffy* (*mat a* y *A*) para poder determinar su tipo de apareamiento. Según los resultados obtenidos, se determinó que el tipo de apareamiento es “*a*”, puesto que únicamente hubo formación de peritecios en la cruce con la cepa *Fluffy* (*mat A*) (Figura 10, segunda cruce). Como control experimental se realizó la cruce entre la cepa *Fluffy* (*mat A*) x *Fluffy* (*mat a*) (Figura 10, tercera cruce).

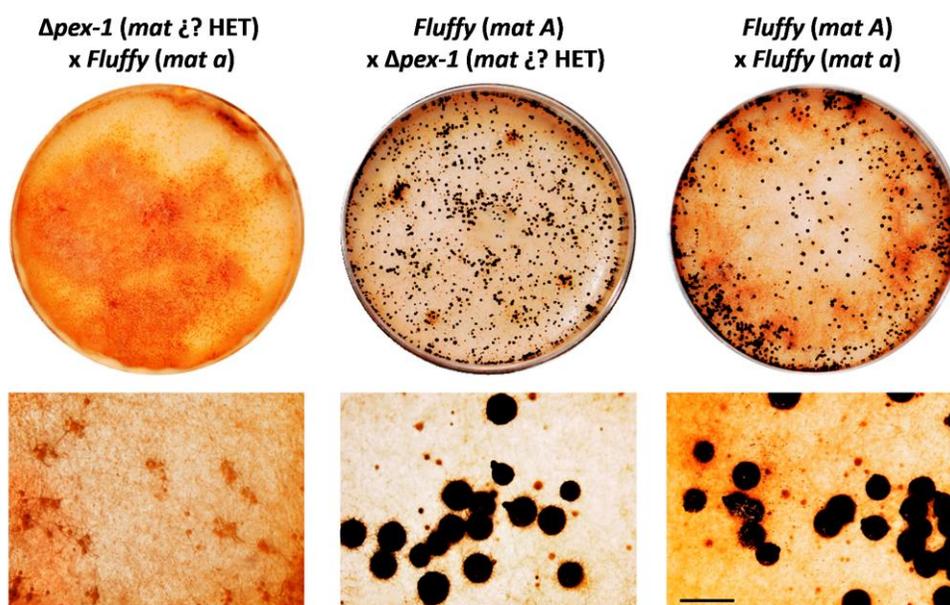


Figura 10. Determinación del tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$ heterocarión del FGSC. Fotografías de las cruza sexuales realizadas para determinar el tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$ heterocarión. Debido a que, solo hubo formación de peritecios en la cruce con la cepa *Fluffy* (*mat A*), se establece que el tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$ es “*mat a*”. Como control experimental se muestra la cruce *Fluffy* (*mat A*) x *Fluffy* (*mat a*). Las imágenes en la parte inferior, corresponden a un acercamiento de las cruza que permiten apreciar protoperitecios en la cruce con la cepa *Fluffy* (*mat a*) y peritecios en el resto de las cruza. (estereomicroscopía, aumento 7x, barra de escala 1 mm).

3.3 Obtención de las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*) en estado homocarión.

El estado heterocarión de la cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*), impedía estudiar el efecto de la eliminación génica de *pex-1*, debido a la presencia de núcleos wt en las hifas. Por tal motivo, se recuperó la cepa en su estado homocarión. La estrategia seguida, implicó la realización de la cruce entre la cepa #FGSC 9717 (*mat A*) y la cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*, HET), seguida de la recuperación de ascosporas y la selección por resistencia a higromicina. Una vez recuperada la cepa en su estado homocarión, se realizó la extracción de ADN genómico, la comprobación molecular de la eliminación génica por PCR y la determinación del tipo de apareamiento de la cepa (Figura 11 A, B y C respectivamente). Los resultados obtenidos confirman la ausencia del gen *pex-1* y en consecuencia el estado homocarión de la cepa (Figura 11 B, carril 4). Así mismo, se determinó que la cepa recuperada tiene un tipo de apareamiento “a” (Figura 11 C).

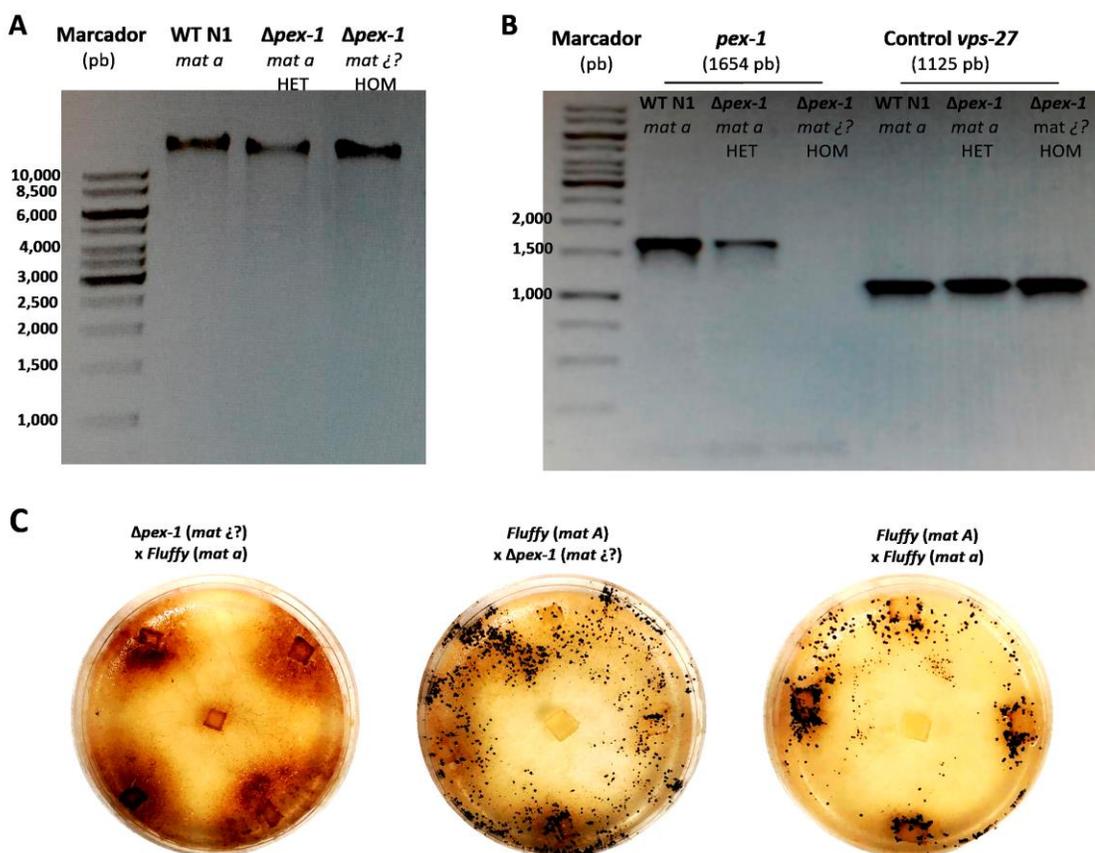


Figura 11. Comprobación del estado homocarión y determinación del tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$. (A) Fotografía del gel de electroforesis que muestra la integridad del ADN genómico extraído de las cepas wt, $\Delta pex-1$ HET. y $\Delta pex-1$ HOM. (B) Fotografía del gel de electroforesis que confirma el estado homocarión de la cepa $\Delta pex-1$. Control positivo cepa wt N1 (*mat a*) y como control de carga se amplificó un fragmento del gen *vps-27*. (C) Fotografía de las cruces realizadas para determinar el tipo de apareamiento de la cepa $\Delta pex-1$ HOM. Según estos resultados, la cepa $\Delta pex-1$ HOM. posee un tipo de apareamiento “*mat a*”. Cruza control *Fluffy* (*mat A*) x *Fluffy* (*mat a*)

3.4 Caracterización del desarrollo vegetativo de las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*), $\Delta pex-10$ (*mat a*) y $\Delta pex-14$ (*mat a*)

Los parámetros que se consideraron en la evaluación fenotípica de las cepas Δpex fueron los siguientes: tasa de crecimiento radial en MMV-sacarosa, crecimiento en MMV-ácido oleico como única fuente de carbono, macroconidiación, diámetro de las hifas, ramificación, producción de hifas aéreas, y producción de biomasa (Figuras 12 y 14; Tabla 8).

En cuanto al crecimiento de las cepas en MMV con sacarosa como única fuente de carbono, se determinó una tasa de crecimiento a las 3, 6, 9 y 12 h después de la inoculación y posteriormente se promediaron para obtener la tasa de crecimiento reportada en este proyecto (Tabla 8). La tasa de crecimiento de la cepa parental #FGSC 9718 en placa corresponde a 2.251 ± 0.388 mm/h; este valor fue considerado para comparar la tasa de crecimiento de las cepas Δpex . En el caso de la cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*) la tasa de crecimiento fue de 1.561 ± 0.269 mm/h, lo que representan una reducción del 30.7 ± 2 % en comparación con la cepa parental. La cepa $\Delta pex-10$ (*mat a*) mostró una tasa de crecimiento que corresponde a 1.783 ± 0.146 mm/h, es decir, una reducción del 19.8 ± 9 % en comparación con la cepa parental. Finalmente, la cepa $\Delta pex-14$ (*mat a*) presentó una tasa de crecimiento de 1.695 ± 0.357 mm/h, que corresponde a una disminución del 25 ± 5 %. Independientemente de los datos reportados previamente, únicamente la cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*) mostró diferencias significativas con la cepa parental; el resto tuvieron un comportamiento similar en términos estadísticos (Figuras 12 A y 14; Tabla 8).

A diferencia de lo que ocurre en el medio con sacarosa, las cepas Δpex no crecieron en MMV con ácido oleico como única fuente de carbono. Estas cepas fueron incapaces de metabolizar el ácido oleico incluso después de las 72 horas de inoculación, tiempo suficiente en el que la cepa parental abarcó la totalidad del medio en una placa de Petri de 100 x 15 mm (Figuras 12 B y 14; Tabla 8).

Otro de los principales defectos en el fenotipo de las cepas Δpex tiene que ver con la macroconidiación. Las cepas Δpex muestran una reducción ≥ 99 % en la producción de macroconidios en comparación con la cepa parental (Figuras 12 C y 14; Tabla 8). El ejemplo más drástico corresponde a la cepa $\Delta pex-10$ (*mat a*), en donde no se identificaron macroconidios, en ninguna de las tres replicas técnicas realizadas para este propósito. Otra de las cepas con defectos importantes en macroconidiación es la cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*). En este caso, los datos obtenidos en la cuantificación de macroconidios mostraron una amplia variabilidad; en algunos casos se lograron encontrar unos cuantos macroconidios, pero en la mayoría de las veces no fue posible identificarlos. Esta situación es evidente al observar la desviación estándar del dato de

macroconidiación reportado para la cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*) (Tabla 8). El caso de la cepa $\Delta pex-14$ (*mat a*) resulta particular, no solo por los defectos evidentes en la macroconidiación, sino porque este genotipo induce la microconidiación, una característica que está ausente en las primeras dos cepas (Figuras 12 C y 14).

El siguiente criterio que se consideró en la caracterización del desarrollo vegetativo de las cepas Δpex , fue el diámetro de las hifas. El diámetro promedio de las hifas de la cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*) fue de 11.293 ± 1.522 μm , en la cepa $\Delta pex-10$ (*mat a*) 11.008 ± 1.656 μm y en la cepa $\Delta pex-14$ (*mat a*) 9.902 ± 1.047 μm . Estas diferencias representaron una reducción del 10.2 %, 12.5 % y 21.3 %, para $\Delta pex-1$, $\Delta pex-10$, $\Delta pex-14$, (Figuras 12 D y 14; Tabla 8). Los datos correspondientes a las cepas $\Delta pex-1$ y $\Delta pex-10$ no fueron estadísticamente diferentes entre ellos, pero si al compararlos con la cepa $\Delta pex-14$, ya que el análisis estadístico de los datos indicó diferencias significativas, lo que indica que esta cepa forma las hifas más delgadas de las tres cepas analizadas.

En cuanto a su ramificación, las hifas de las cepas Δpex , no mostraron defectos aparentes. El análisis estadístico de los datos no indicó diferencias entre las cepas Δpex ni con la cepa parental (Figuras 12 D y 14; Tabla 8).

La producción de hifas aéreas es otro parámetro analizado que mostró diferencias significativas entre las cepas Δpex . Al comparar estos datos se pudo determinar que el efecto de la mutación génica en las tres cepas no es el mismo (Figuras 12 E y 14). En la cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*) se presentó una reducción en la altura del micelio del 64.4 ± 9 %, en la cepa $\Delta pex-10$ (*mat a*) la reducción fue del 37.8 ± 11.3 %, mientras que en la cepa $\Delta pex-14$ (*mat a*) hubo una reducción del 76.8 ± 5 % (Tabla 8).

El último parámetro evaluado en el desarrollo vegetativo de las cepas Δpex fue la producción de biomasa. En este caso, sólo las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*) y $\Delta pex-10$ (*mat a*) produjeron significativamente menor biomasa que la cepa parental, según la prueba U de Mann Whitney (Figura 14; Tabla 8). La cepa $\Delta pex-1$ (*mat a*) generó en promedio 0.027 mg de biomasa seca por día, lo que representa una reducción del 31.8 ± 18.3 % en contraposición a lo mostrado por la cepa parental (Tabla 8). La otra cepa que mostró diferencias con la parental es la cepa $\Delta pex-10$ (*mat a*); en este caso hubo una disminución del 39 ± 16.4 %, puesto que la cepa produjo en promedio 0.024 mg de biomasa seca por día. En cuanto a la cepa $\Delta pex-14$ (*mat a*) no mostró diferencias con la cepa parental en cuanto a producción de biomasa.

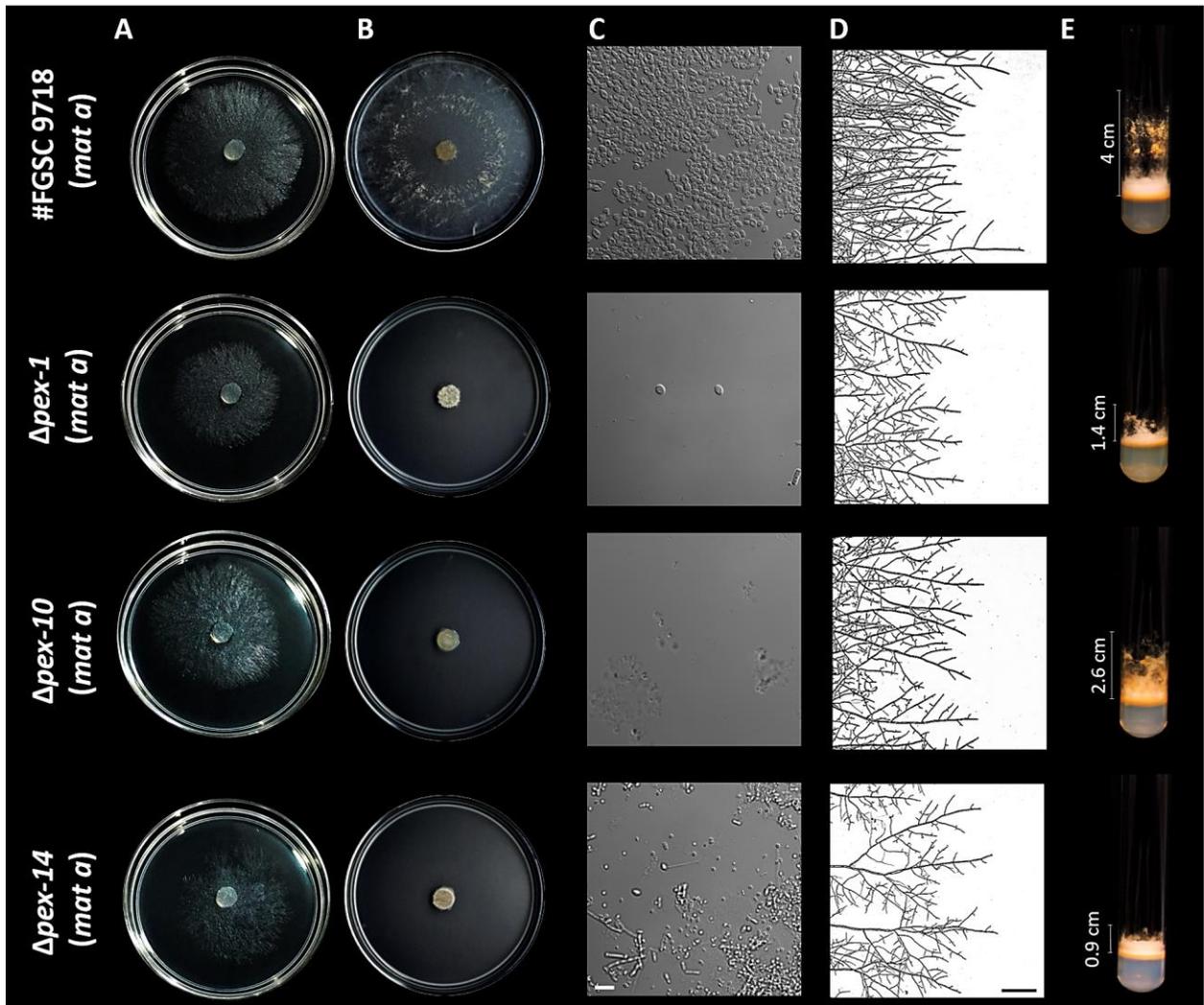


Figura 12. Caracterización del desarrollo vegetativo de las cepas Δpex . (A) Crecimiento colonial de las cepas Δpex en MMV-sacarosa a las 12 h. (B) Crecimiento colonial de las cepas Δpex en MMV-ácido oleico a las 72 h. (C) Microfotografías DIC de los macroconidios de las cepas Δpex (barra de escala 10 μm). (D) Estereomicrofotografías del micelio de las cepas Δpex (aumento 32x, barra de escala 500 μm). (E) Cultivo de las cepas Δpex para el análisis de producción de micelio aéreo.

3.5 Caracterización del desarrollo sexual de las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*), $\Delta pex-10$ (*mat a*) y $\Delta pex-14$ (*mat a* y *A*)

Para caracterizar el desarrollo sexual de las cepas Δpex , se realizaron cruza sexuales heterocigotas con la finalidad de evaluar la fertilidad como hembra y como macho. Las cuatro cepas mostraron ser fértiles como macho al fertilizar los protoperitecios de las cepas *Fluffy* (Figura 13, A i, ii, iii y iv). Los principales defectos en el desarrollo sexual de las cepas Δpex estuvieron relacionados con la fertilidad como hembra.

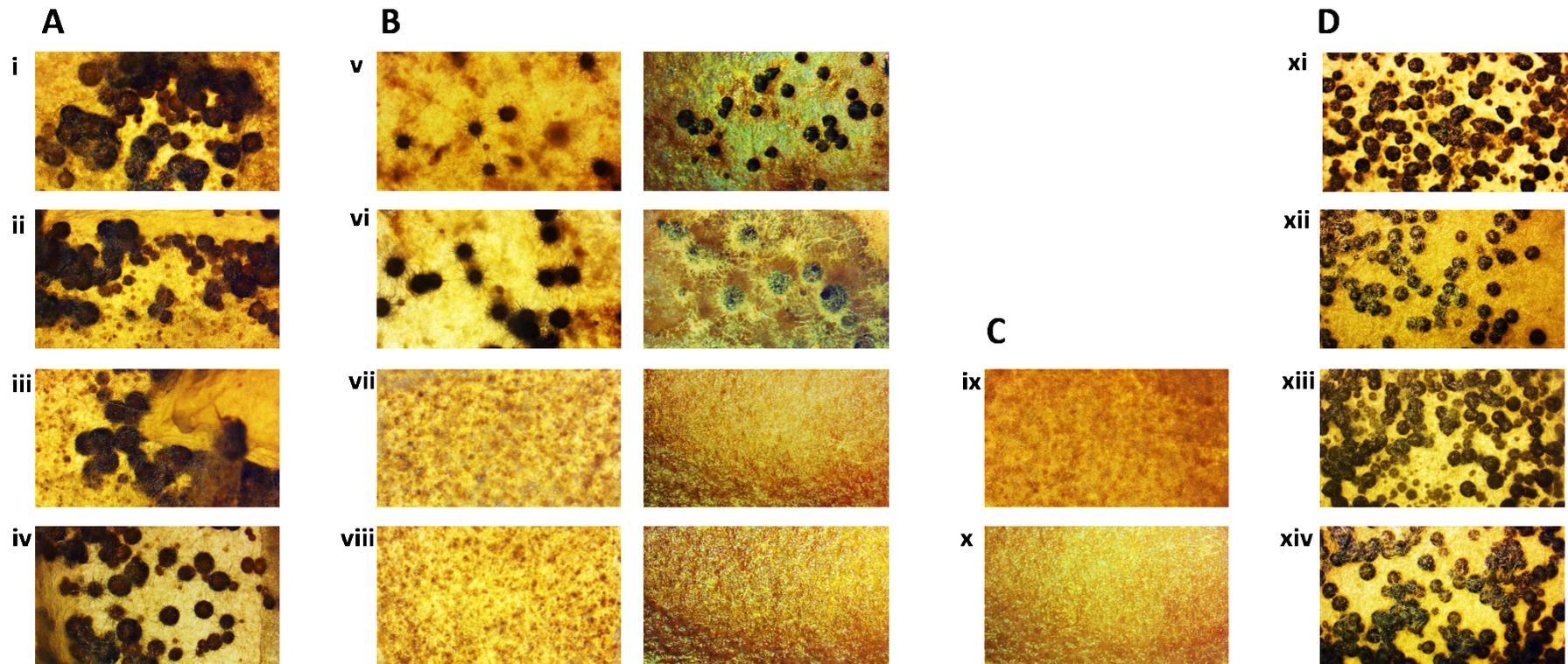


Figura 13. Caracterización del desarrollo sexual de las cepas Δpex . (A) Ensayos de fertilidad de las cepas Δpex como macho, 5 días después de la fertilización. (i) *Fluffy* (*Mat A*) x $\Delta pex-1$ (*mat a*), (ii) *Fluffy* (*mat A*) x $\Delta pex-10$ (*mat a*), (iii) *Fluffy* (*mat A*) x $\Delta pex-14$ (*mat a*) y (iv) *Fluffy* (*mat a*) x $\Delta pex-14$ (*mat A*). (B) Ensayos de fertilidad de las cepas Δpex como hembra, columna izquierda 5 días después de la fertilización, columna derecha 20 días después de la fertilización. (v) $\Delta pex-1$ (*mat a*) x wt N150 (*mat A*), (vi) $\Delta pex-10$ (*mat a*) x wt N150 (*mat A*), (vii) $\Delta pex-14$ (*mat a*) x wt N150 (*mat A*) y (viii) $\Delta pex-14$ (*mat A*) x wt N1 (*mat a*). (C) Cruzas sexuales homocigotas entre las cepas $\Delta pex-14$ (*mat A*) x $\Delta pex-14$ (*mat a*) (ix) 5 días después de la fertilización y (x) 20 días después de la fertilización. (D) Controles experimentales, 5 días después de la fertilización. (xi) *Fluffy* (*mat A*) x *Fluffy* (*mat a*), (xii) wt N150 (*mat A*) x wt N1 (*mat a*), (xiii) *Fluffy* (*mat A*) x wt N1 (*mat a*) y (xiv) *Fluffy* (*mat a*) x wt N150 (*mat A*).

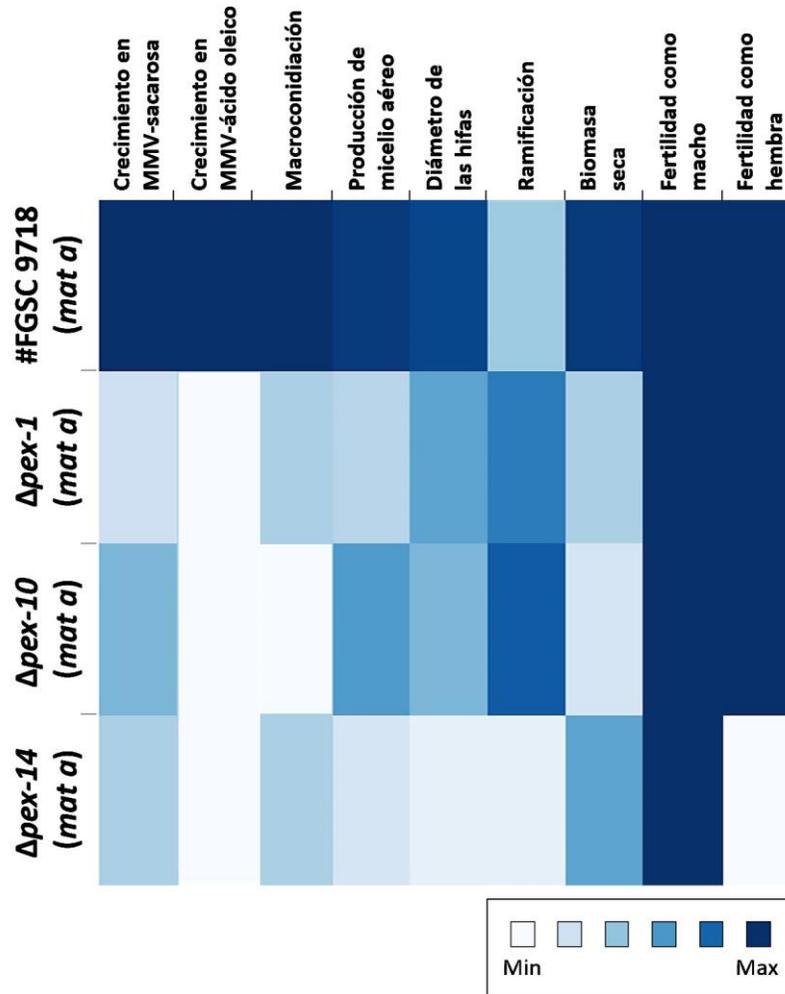


Figura 14. Mapa de calor generado con los datos cuantitativos de la caracterización del desarrollo vegetativo y sexual de las cepas Δpex . Este mapa se realizó utilizando el programa *RStudio*.

Tabla 8. Datos cuantitativos de la caracterización del desarrollo vegetativo y sexual de las cepas Δpex

	# FGSC 9718 (mat a)	$\Delta pex-1$ (mat a)	$\Delta pex-10$ (mat a)	$\Delta pex-14$ (mat a)
Tasa de crecimiento en MMV-sacarosa*	2.251 ± 0.388 mm/h ^(a)	1.561 ± 0.269 mm/h ^(b)	1.783 ± 0.146 mm/h ^(a)	1.695 ± 0.357 mm/h ^(a)
Crecimiento en MMV-ácido oleico	+	-	-	-
Macroconidiación*	$2.8 \times 10^8 \pm 6.2 \times 10^7$ conidios/mL ^(a)	$8.3 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^4$ conidios/mL	-	$2.6 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^6$ conidios/mL ^(b)
Altura del micelio*	4.064 ± 0.456 cm ^(a)	1.444 ± 0.351 cm ^(c)	2.586 ± 0.465 cm ^(b)	0.921 ± 0.209 cm ^(d)
Diámetro de las hifas a 100 μm de la punta**	12.579 ± 1.481 μm ^(a)	11.294 ± 1.522 μm ^(b)	11.008 ± 1.656 μm ^(b)	9.902 ± 1.047 μm ^(c)
Cantidad de ramas en los 500 μm apicales de la hifa**	4.9 ± 1.4 ramas ^(a)	5.3 ± 1.5 ramas ^(a)	5.5 ± 2.7 ramas ^(a)	4.6 ± 1.5 ramas ^(a)
Cantidad de biomasa seca producida por día**	0.04 ± 0.005 mg/día ^(a)	0.027 ± 0.006 mg/día ^(c)	0.024 ± 0.006 mg/día ^(cd)	0.032 ± 0.001 mg/día ^(ab)
Fertilidad como macho	+	+	+	+
Fertilidad como hembra	+	+	+	-

Superíndices diferentes por fila representan diferencias estadísticas según la comparación de medias o medianas en las pruebas de *Tukey* y *T* de *Student* para los datos con distribución normal (*) o en la prueba *U* de *Mann-Whitney* para datos con distribución diferente a la normal (**). En estas pruebas y en los análisis de varianza se utilizó un valor de significancia $p < 0.05$.

En las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*) y $\Delta pex-10$ (*mat a*) la formación de peritecios se vio retardada (Figura 13 B, v y vi,) en comparación con las cruzas control. Independientemente de los retrasos en la formación de peritecios en ambos casos hubo formación de ascas y ascosporas. Los mayores defectos en el desarrollo sexual como hembras se presentaron en las cepas $\Delta pex-14$ (*mat a*) y $\Delta pex-14$ (*mat A*), ya que no hubo formación de peritecios en las cruzas sexuales con las cepas wt N150 (*mat A*) y wt N1 (*mat a*), respectivamente (Figura 13 C vii y viii). Además, en la craza homocigota $\Delta pex-14$ (*mat A*) x $\Delta pex-14$ (*mat a*) tampoco se desarrollaron peritecios (Figura 13 D, ix y x) en contraste a lo observado en las cruzas control (Figura 13 E, xi, xii, xiii y xiv).

3.6 Construcción del vector para el marcaje de los peroxisomas con la proteína fluorescente TagRFP-PTS1

La estrategia que se siguió para la construcción del vector necesario en el marcaje de los POs de *N. crassa* (Figura 7 A), consistió en amplificar los fragmentos recombinantes *Pac_I::tagrfp::PTS1::STOP* y *Ptrpc::natR::EcoR_I* (Figura 15 A, carril 2 y 3). Posteriormente, dichos fragmentos se sometieron a PCR de fusión para generar el inserto *Pac_I::tagrfp::PTS1::STOP::Ptrpc::natR::EcoR_I* (Figura 15 A, carril 4). La fusión anterior y el vector VMRP13 se digirieron con las enzimas *Pac I* y *EcoR I* (Figura 15 B, carril 3). Finalmente, los productos de la digestión fueron sometidos a ligación con T4 DNA ligasa, transformación en células quimiocompetentes (Callejas-Negrete, 2019) de *E. coli* DH5 α , comprobación por PCR de colonia y purificación. El vector obtenido se sometió a doble restricción con las enzimas *Pac I* y *EcoR I* (Figura 15 C, carril 6) para comprobar la ligación de la fusión *Pac_I::tagrfp::PTS1::STOP::Ptrpc::natR::EcoR_I* en el vector VMRP13. Como producto de la digestión enzimática se generaron dos bandas una de aprox. 8,000 pb y otra de aprox. 1,600 pb que concuerda en tamaño con la fusión *Pac_I::tagrfp::PTS1::STOP::Ptrpc::natR::EcoR_I* purificada (Figura 15 C, carril 2 y 6). Finalmente es importante señalar que la integridad de la secuencia correspondiente al PTS1 fue determinada por secuenciación en la compañía *Eton Bioscience Inc.* A partir de la comprobación molecular del vector se le asignó el nombre “VMRP163”.

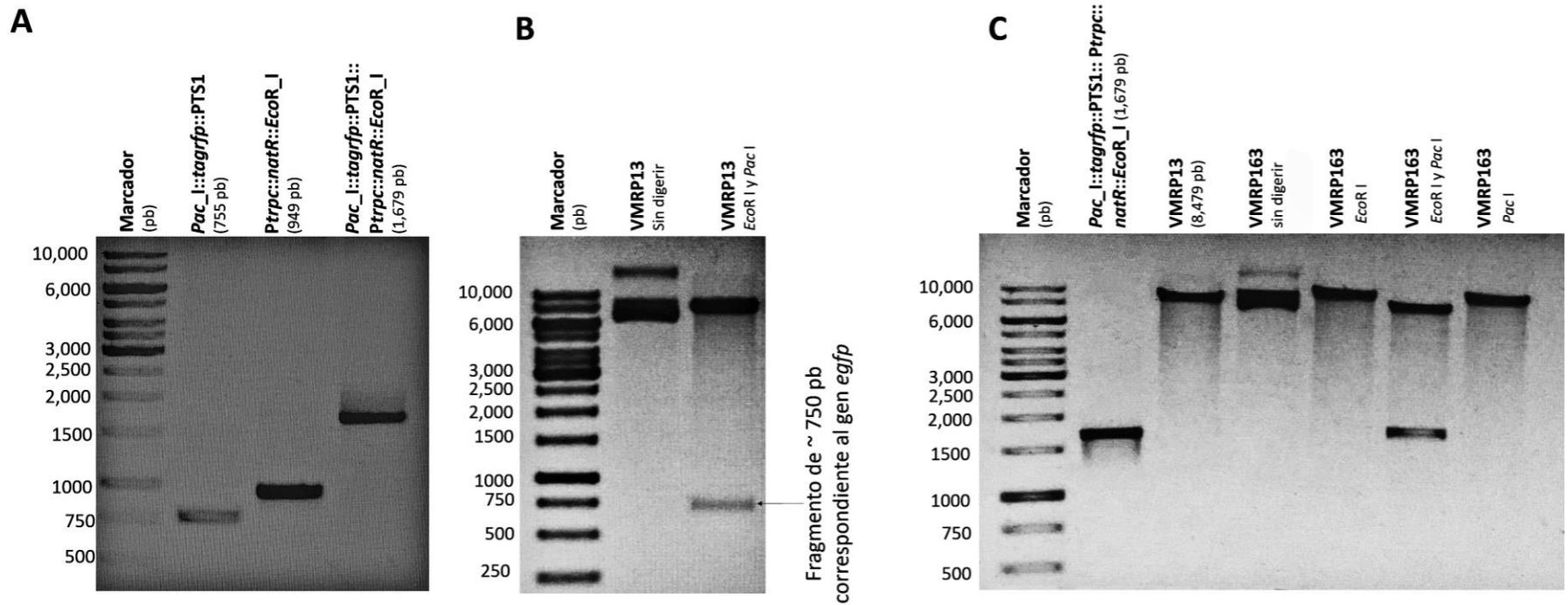


Figura 15. Construcción del vector VMRP163 $3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'\Delta his-3$. (A) Fotografía del gel de electroforesis que muestra los fragmentos recombinantes *Pac*_I::tagrfp::PTS1 y *Ptrpc*::natR::EcoR_I, así como la fusión *Pac*_I::tagrfp::PTS1::STOP::*Ptrpc*::natR::EcoR_I. (B) Fotografía del gel de electroforesis que muestra la liberación de un fragmento de 750 pb a partir de la doble restricción del vector VMRP13 con las enzimas *Pac* I y *Eco*R I. (C) Fotografía del gel de electroforesis que comprueba de la clonación de la fusión *Pac*_I::tagrfp::PTS1::STOP::*Ptrpc*::natR::EcoR_I en el vector VMRP13, resultado de la doble restricción del vector VMRP163.

3.7 Transformación de *N. crassa* con el vector VMRP163 3'*his-3*Flank::*Pccg-1*::*tagrfp*::*PTS1*::*Ptrpc*::*natR*::5' Δ *his-3*

De los ensayos de transformación de *N. crassa* con el vector VMRP163, se obtuvieron 15 cepas protótrofas a histidina para el fondo genético #FGSC 9717 y ninguna cepa resistente a NCT para el fondo genético #FGSC 9718. Todas las cepas transformantes, se sometieron a tamizaje por medio de microscopía confocal de escaneo láser para seleccionar aquella que mostrara una mejor señal fluorescente. A continuación, la cepa seleccionada se obtuvo en su estado homocarión por medio de cruza sexual y después se realizó su comprobación molecular. De aquí en adelante se referirá a esta cepa como "SMRP492".

La comprobación de la inserción del vector VMRP163 en el locus *his-3* de la cepa SMRP492, se realizó por medio de dos reacciones de PCR. En estas reacciones se amplificaron dos fragmentos de nucleótidos que confirmaron la inserción del vector en el sitio de interés, ya que fueron utilizados dos pares de oligonucleótidos que flanquean dentro de la secuencia de vector VMRP163 y en la región íntegra del locus *his-3* en el genoma de la cepa parental #FGSC 9717 (esquema en la Figura 16). Los fragmentos amplificados tenían un tamaño de 3.9 Kb (Figura 16, gel de electroforesis carril 3) y 2.1 Kb (Figura 16, gel de electroforesis carril 5). Al realizar la amplificación de estos fragmentos a partir del genoma de la cepa parental no se obtuvo ninguna banda (Figura 16, gel de electroforesis carriles 2 y 4). Esto representó un control experimental en la comprobación molecular de la cepa SMRP492. Considerando que la comprobación se realizó con base a la presencia o ausencia de los fragmentos de interés, otro control adicional fue la amplificación de un fragmento de 1.6 Kb del gen *pex-1*, que confirma la integridad del ADN genómico en ambas cepas (Figura 16, gel de electroforesis carriles 8 y 9).

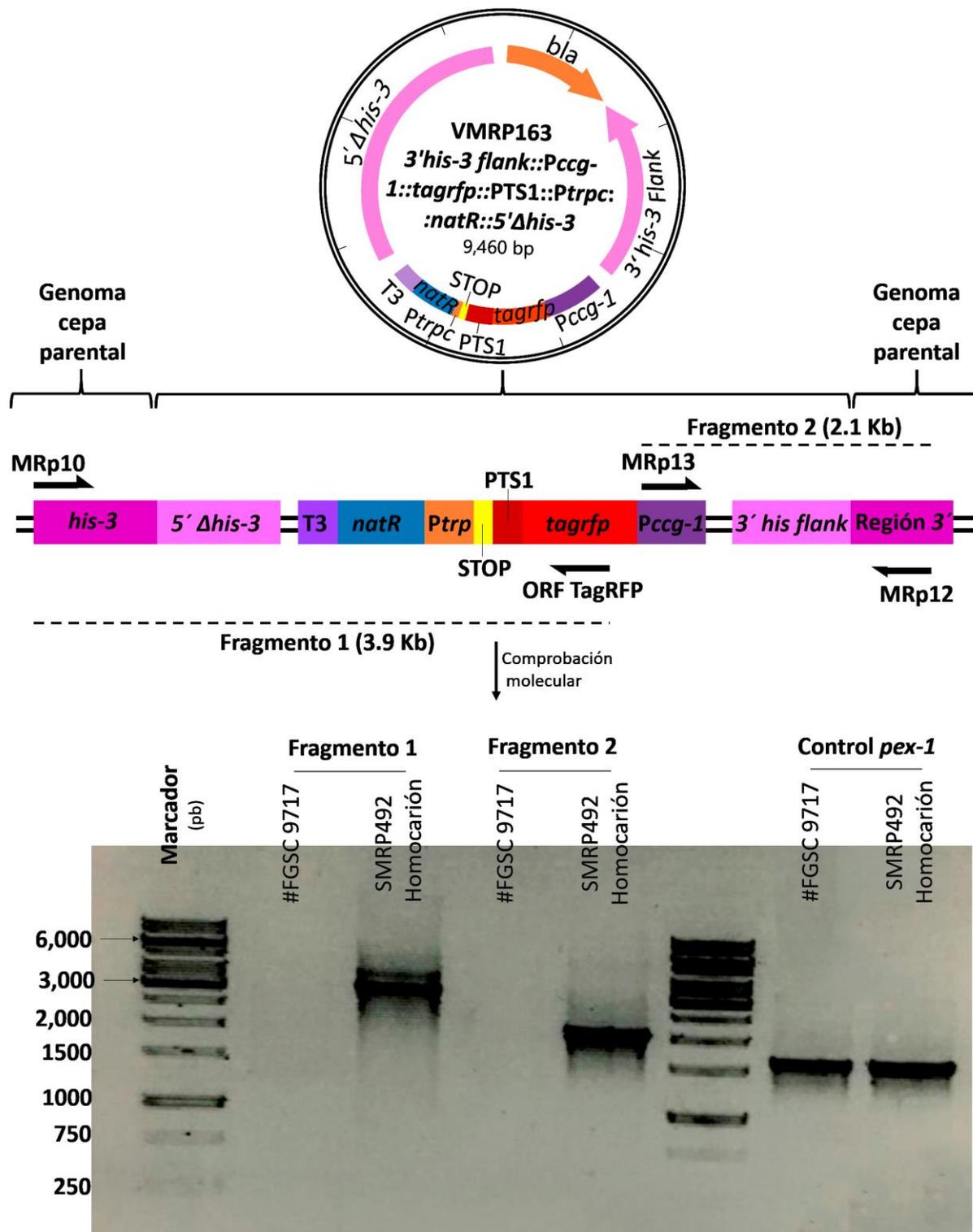


Figura 16. Comprobación molecular de la inserción del vector VMRP163 *3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR::5'Δhis-3*, en el locus *his-3* de *N. crassa*. En la parte superior de la figura se presenta un esquema que resume la estrategia seguida para comprobar la inserción del vector de interés en el locus *his-3* de la cepa SMRP492. Mientras que en la parte inferior se presenta una fotografía del gel de electroforesis donde se corrieron los productos de PCR que confirman la integración del vector en el sitio de interés. Control negativo cepa #FGSC 9717 y como control de carga se amplificó un fragmento de 1,654 pb del gen *pex-1*.

3.8 Marcaje de los peroxisomas de *N. crassa* y análisis microscópico

La adición de la secuencia de orientación peroxisomal (PTS1) a la proteína fluorescente TagRFP, supone el direccionamiento de esta proteína hacia la matriz de los POs y por lo tanto representa una estrategia adecuada para el marcaje de estos orgánulos. El marcaje de los POs con la proteína TagRFP-PTS1 en la cepa SMRP492, permitió observar bajo microscopía confocal de escaneo láser, estructuras cercanamente circulares con un diámetro promedio de $0.96 \pm 0.28 \mu\text{m}$ ($n = 30$ POs) para los peroxisomas presentes en las hifas, aunque también se observaron en ascosporas y conidios (Figura 17, A y C-E). Los POs se distribuyen de forma homogénea al largo de la hifa, pero su presencia disminuye hacia el ápice (Figura 17, A y E).

El análisis microscópico de las hifas de la cepa SMRP492 mediante microscopía confocal de disco giratorio, permitió identificar que los POs de *N. crassa* poseen dos tipos de desplazamientos: movimientos lentos, vibratoriales y no dirigidos (MND) con una velocidad promedio de $0.534 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$ ($n = 86$ POs en 15 hifas) (Figura 17 B, F; Video 1) y movimientos rápidos y dirigidos (MD) con una velocidad promedio de $3.4 \pm 0.6 \mu\text{m/s}$ ($n = 54$ POs en 15 hifas) (Figura 17 B y G; Video 1).

Otro aspecto interesante resultado de evaluar los movimientos de los POs, es que éstos parecen alternarse; es decir, un MD está precedido y seguido por un MND. Además, un PO con MD suele trasladarse hacia los POs con MND (Figura 17 A; Video 1). Lo anterior se evidencia al analizar los kimogramas generados a partir de los videos de las hifas. Un kimograma es una representación gráfica que muestra el seguimiento de partículas móviles en distancia y tiempo. Con el análisis de estos kimogramas se estableció que la mayoría de los POs en la región apical de hifas principales, concretamente el $85.6 \pm 6.8 \%$ ($n = 15$ hifas) mostraron MND y solo el $14.4 \pm 6.8 \%$ ($n = 15$ hifas) de los POs tienen MD.

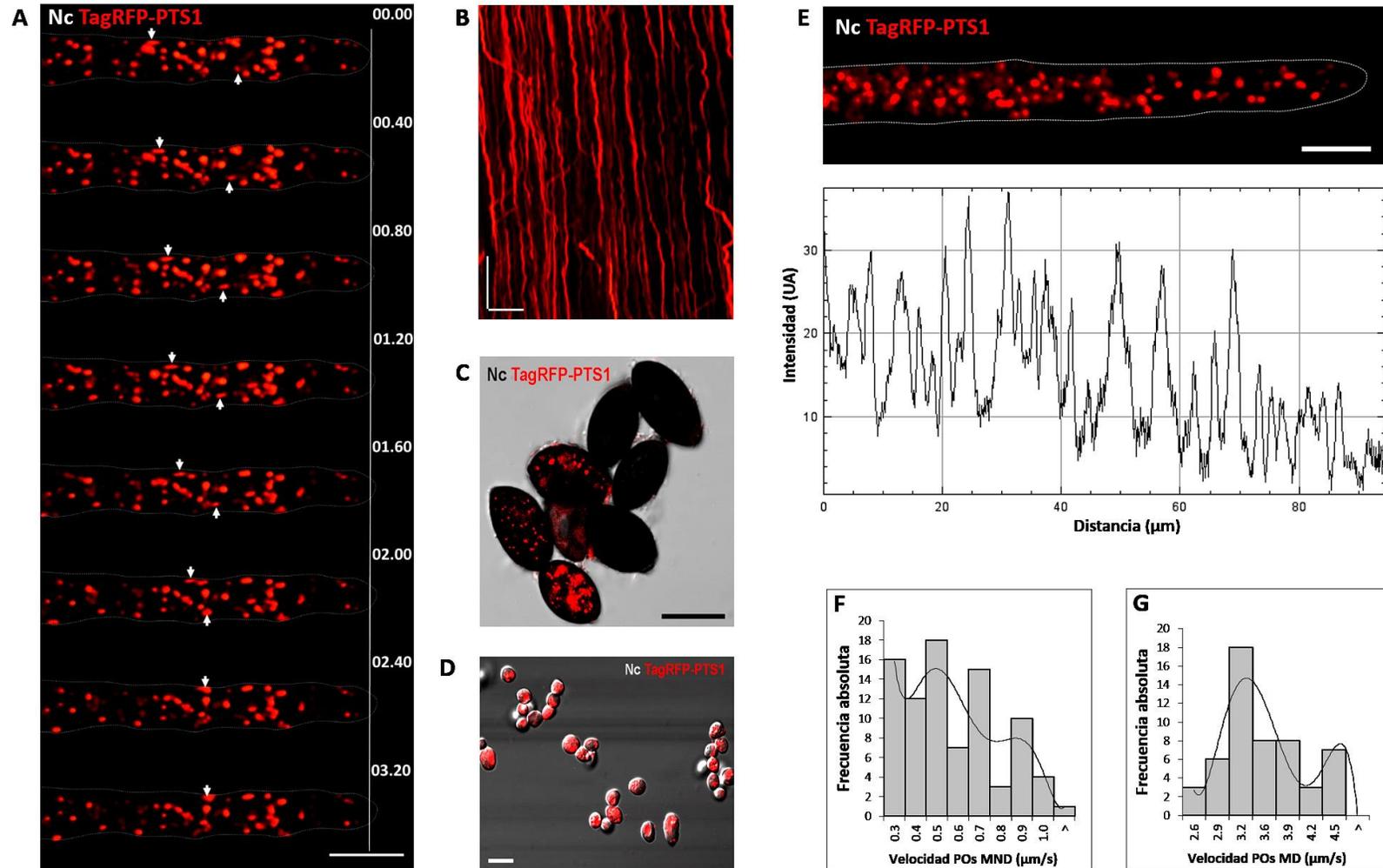


Figura 17. Localización subcelular de los peroxisomas de *N. crassa*. (A) Serie de tiempo que muestra la movilidad de los POs (TagRFP-PTS1); la línea vertical indica el punto de inicio del desplazamiento de la hifa y las flechas señalan POs con MD (microscopía confocal de disco giratorio, objetivo 60x y barra de escala 10 μm). (B) Kimograma que muestra los tipos de movimientos de los POs (escala vertical 10 s y escala horizontal 10 μm). Producto del análisis de kimogramas se determinó que el $14.4 \pm 6.8\%$ de los POs tienen MD y el $85.6 \pm 6.8\%$ poseen MND ($n = 15$ hifas). (C), (D) y (E) Distribución de los POs en las ascosporas, conidios e hifas (microscopía confocal de escaneo láser, objetivo 20x y 60x, barra de escala 20 μm para las ascosporas y 10 μm para conidios e hifa). En (E) también se muestra un perfil de distribución de la fluorescencia correspondiente a los POs en las hifas de *N. crassa*. (F) y (G) Histogramas de la velocidad de los POs con MND (Promedio: $0.534 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$, $n = 86$ POs en 15 hifas) y con MD, respectivamente (promedio: $3.4 \pm 0.6 \mu\text{m/s}$, $n = 54$ POs en 15 hifas).

3.9 Interacción entre peroxisomas y microtúbulos

El análisis por microscopía confocal de disco giratorio de hifas con POs marcados con TagRFP-PTS1 y MTs marcados con GFP (fusión vegetativa entre las cepas SMRP492 y SMRP12), permitió identificar que el desplazamiento de los POs con MD ocurre a través de los MTs (Figura 18 A; Video 2). Para confirmar lo anterior se comparó la movilidad de los POs en hifas con MTs íntegros e hifas con MTs despolimerizados por efecto del benomilo. Los kimogramas correspondientes a los videos de las hifas con los MTs íntegros, mostraron la presencia de los dos movimientos característicos de los POs (Figura 18 B), siendo la media de la velocidad de los POs asociados a los MTs de $2.3 \pm 0.52 \mu\text{m/s}$ ($n = 55$ POs MD-MTs en 18 hifas) (Figura 18 C). En contraste, los POs en las hifas con MTs despolimerizados por efecto del benomilo mostraron un desplazamiento anormal, lo cual se evidenció en los kimogramas, en donde dejaron de apreciarse las vibraciones características de los POs con MND y las aceleraciones de los POs con MD (Figura 18 D; Video 3). Además, al determinar el promedio de la velocidad de desplazamiento de los POs en las hifas con MTs despolimerizados se obtuvo un valor de $0.378 \pm 0.150 \mu\text{m/s}$ ($n = 102$ POs en 5 hifas) (Figura 18 E).

Otro de los datos analizados en las hifas resultantes de la fusión vegetativa entre la cepa SMRP492 y SMRP12, fue el grado de co-localización entre las señales correspondientes a los POs y los MTs (Figura 18 F). Este indicador se obtuvo a partir del coeficiente de correlación de Pearson (CCP; -1 a +1). Se calculó un CCP de 0.431 ± 0.188 ($n = 12$ hifas) entre POs y MTs (Figura 18 G), dato que representa un grado de co-localización bajo. Otro de los principales coeficientes para cuantificar la co-localización de objetos en una imagen de color dual, es el coeficiente de Manders (M1 y M2). El valor de M1 para POs y MTs fue de 0.694 ± 0.175 ($n = 12$ hifas) y este valor representa una fracción alta de POs que se superponen con los MTs (Figura 18 F; Video 2); el valor de M2 fue de 0.229 ± 0.091 ($n = 12$ hifas) y representa una fracción baja de MTs que se sobrelapan con los POs.

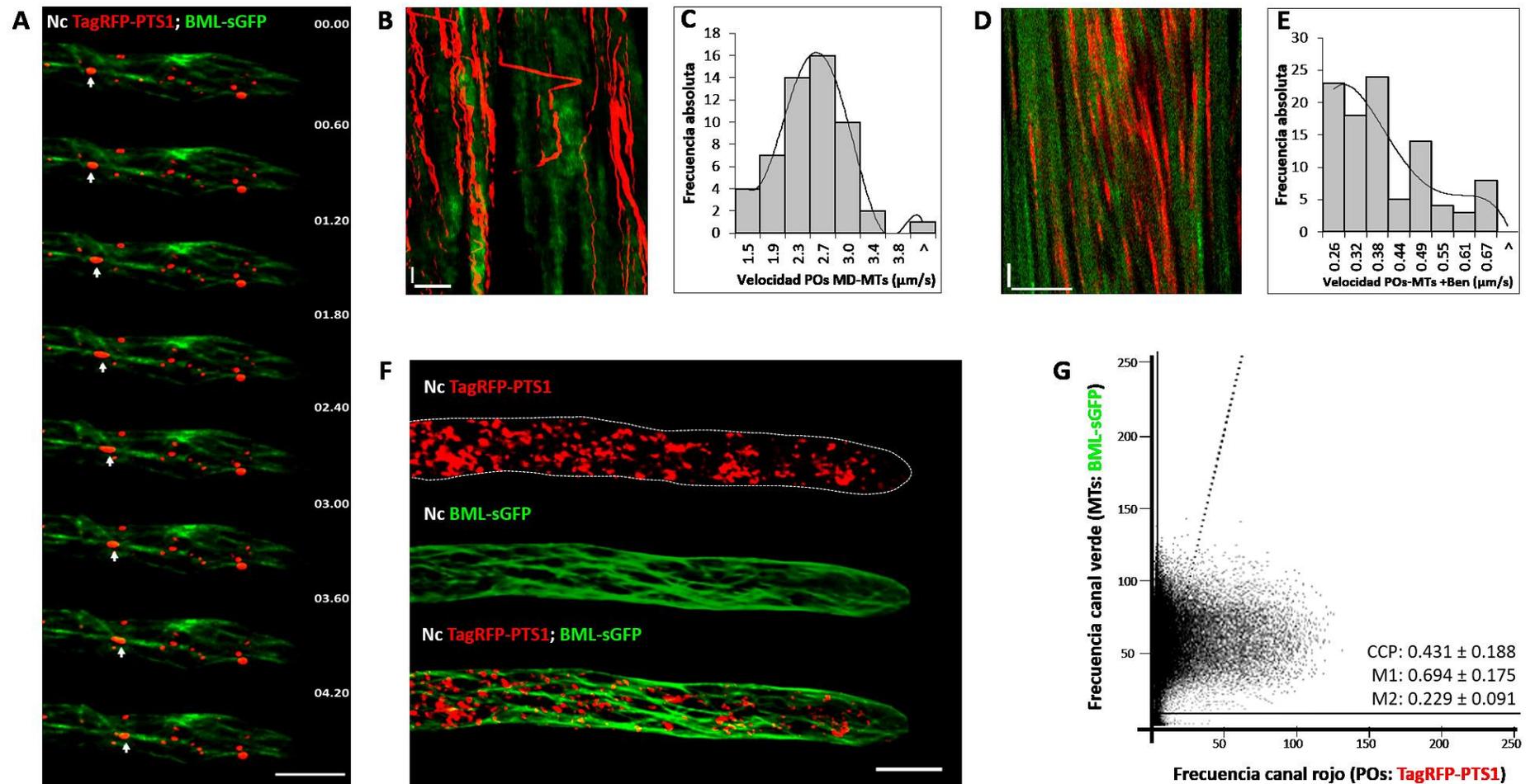


Figura 18. Dinámica celular entre peroxisomas y microtúbulos en *N. crassa*. (A) Serie de tiempo que muestra la movilidad de los POs (TagRFP-PTS1) a través de los MTs (BML-sGFP). La punta de flecha señala a un PO desplazándose a través de los MTs (Microscopía confocal de disco giratorio, objetivo 60x y barra de escala 10 μm). (B) Kimograma que representa los movimientos de los POs en hifas con MTs íntegros (escala vertical 10 s y escala horizontal 10 μm). (C) Histograma de la velocidad de los POs a través de los MTs (Promedio: $2.3 \pm 0.52 \mu\text{m/s}$, $n = 55$ POs MD-MT en 18 hifas). (D) Kimograma que representa la movilidad de los POs en hifas con MTs despolimerizados por efecto de benomilo (escala vertical 10 s y escala horizontal 10 μm). (E) Histograma de la velocidad de los POs en hifas con MTs despolimerizados (promedio: $0.378 \pm 0.150 \mu\text{m/s}$, $n = 102$ POs en 5 hifas). (F) Microfotografías de hifas que muestran la co-localización entre POs y MTs (microscopía confocal de escaneo láser, objetivo 60x, barra de escala 10 μm). (G) Citofluorograma de la distribución de los píxeles del canal rojo (POs) y el canal verde (MTs) ($n = 12$ hifas).

3.10 Interacción entre peroxisomas y endosomas tempranos

La fusión vegetativa entre las cepas SMRP492 y SMRP320 se realizó con la finalidad de confirmar el transporte endosomal de los POs en las hifas de *N. crassa*, de forma similar a lo reportado para *A. nidulans* y *U. maydis*. La cepa SMRP320 contiene la proteína YPT-52 una Rab GTPasa etiquetada con GFP. Esta proteína es ortóloga de Rab5, una proteína marcadora de ETs (Seidel et al., 2013)

El análisis de 20 hifas heterocariones con POs y ETs marcados con proteínas fluorescentes bajo microscopía confocal de disco giratorio, permitió identificar seis eventos de co-transporte. En dichos eventos se observó un movimiento rápido, dirigido y simultáneo de ambos orgánulos. Estos eventos de co-transporte se inician cuando los ETs en movimiento se aproximan a los POs. Seguido a esto ocurre el desplazamiento de ambos orgánulos, y por último tiene lugar la descarga de los POs mientras que los ETs continúan su desplazamiento (Figura 19 A y B; Video 4). El promedio de velocidad de estos seis eventos de co-transporte fue de $1.9 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ ($n = 6$ POs MD-ETs en 20 hifas) (Figura 19 B y C).

Otro aspecto interesante que conviene resaltar es la interacción que se establece entre los POs con MND y los ETs; lo anterior puede observarse en los kimogramas que ilustran la sincronización de movimiento y co-localización parcial entre los dos orgánulos (Figura 19 B y C). En términos cuantitativos el grado de co-localización entre los POs y los ETs corresponde a un CCP de 0.546 ± 0.074 ($n = 12$ hifas), dato que se encuentra en el intervalo de confianza del CCP (Figura 19 D y E). El otro coeficiente de co-localización determinado fue el coeficiente de Manders, el cual estableció una amplia fracción de POs que se sobrelapan con los ETs ($M1: 0.782 \pm 0.181$; $n = 12$ hifas), pero una fracción reducida de ETs que se superponen con los POs ($M2: 0.310 \pm 0.119$; $n = 12$ hifas).

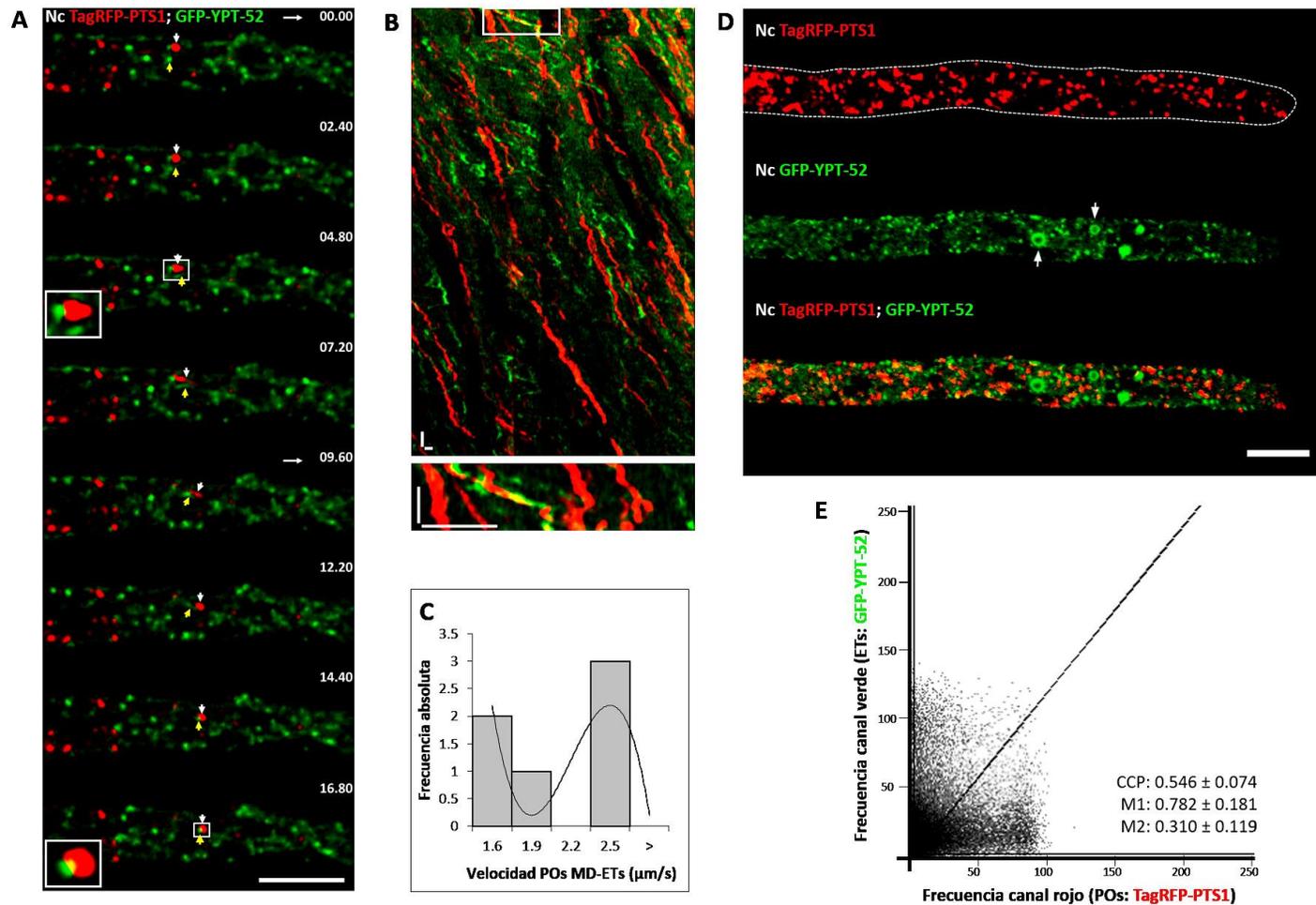


Figura 19. Dinámica celular entre peroxisomas y endosomas tempranos en *N. crassa*. (A) Serie de tiempo que muestra el co-transporte de un PO con MD (TagRFP-PTS1) y ETs (GFP-YPT-52). Los cuadros blancos enmarcan un evento de asociación PO-ET, así como su amplificación. La flecha blanca señala un PO, la flecha amarilla a un ET y la flecha horizontal indica la dirección del crecimiento (microscopía confocal de disco giratorio, objetivo 60x y barra de escala 10 μm). (B) Kimograma que representa el movimiento de POs y ETs, en el recuadro blanco se indica un evento de co-transporte y en la parte inferior la amplificación de dicho evento (escala vertical 10 s y escala horizontal 10 μm). (C) Histograma de la velocidad de los eventos de co-transporte POs MD-ETs (promedio: $1.9 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$, $n = 6$ POs-ET, en 20 hifas). (D) Microfotografías de hifas que muestran la co-localización entre POs y ETs. Las flechas blancas señalan posibles CMVs, LEs o compartimentos prevacuolares (PVCs) (microscopía confocal de escaneo láser, objetivo 60x, barra de escala 10 μm). (E) Citofluorograma de la distribución de los píxeles del canal rojo (POs: TagRFP-PTS1) y el canal verde (ETs: GFP-YPT-52) ($n = 12$ hifas).

3.11 Interacción entre peroxisomas y gotas lipídicas

Con la finalidad de encontrar más evidencias para construir el modelo de transporte endosomal en *N. crassa*, se evaluó la asociación entre POs y GLs. Los POs son orgánulos que poseen un papel importante en la β oxidación de ácidos grasos y por ello se espera una relación íntima con las reservas intracelulares de lípidos. Para comprobar la interacción entre ambos orgánulos, se realizó una tinción con rojo Nilo para visualizar GLs en las hifas de la cepa SMRP492. El rojo Nilo es un compuesto fluorescente que tiñe lípidos neutros y que emite luz en una longitud de onda de 528 nm cuando es excitado a 450-500 nm.

El análisis por microscopía confocal de disco giratorio de la tinción de GLs en el micelio de la cepa SMRP492, indicó una asociación estrecha entre ambos orgánulos, como pudo inferirse a partir del movimiento rápido y dirigido de la señal amarilla, producto de la co-migración entre POs y GLs, con una velocidad promedio de $1.77 \pm 0.63 \mu\text{m/s}$ ($n = 20$ POs MD-GLs en 20 hifas) (Figura 20 A-C; Video 5). Además de asociaciones entre GLs y POs con MD, también se observaron asociaciones de GLs y POs con MND (Figura 20 B).

Los análisis cuantitativos de co-localización entre POs y GLs (Figura 20 D), aportan más evidencia sobre la interacción entre estos orgánulos, ya que se determinó un CCP de 0.796 ± 0.039 ($n=24$), un grado de co-localización alto y confiable (Figura 20 E). Mientras tanto, el coeficiente de Manders establece que la fracción de POs que se sobrelapan con las GLs (M1) es prácticamente igual a la fracción de GLs que se solapan con los POs (M2), estos valores equivalen a 0.623 ± 0.184 ($n = 24$ hifas) y 0.639 ± 0.127 ($n = 24$ hifas), respectivamente.

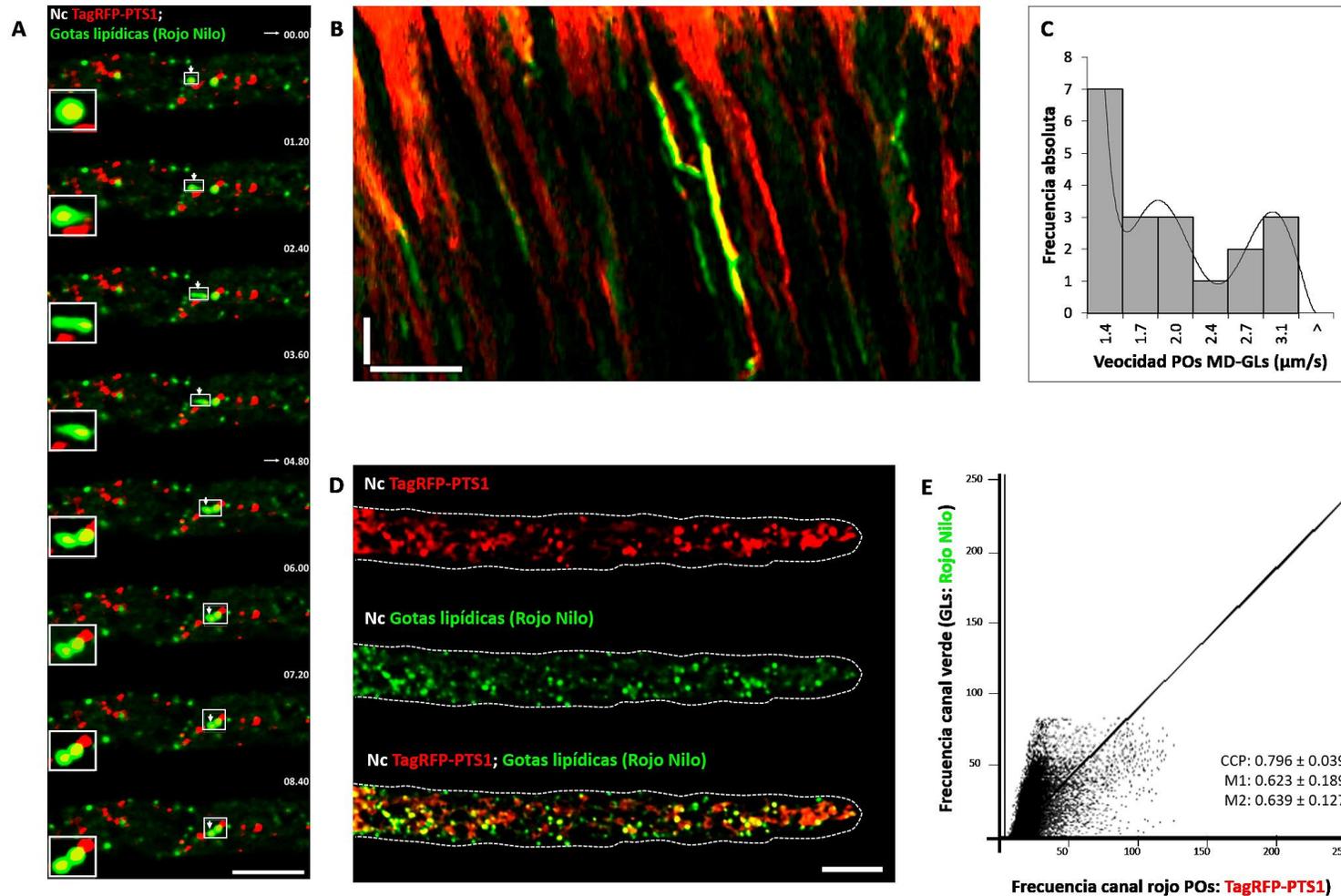


Figura 20. Dinámica celular entre peroxisomas y gotas lipídicas en *N. crassa*. (A) Serie de tiempo que muestra el co-transporte de POs con MD (TagRFP-PTS1) y GLs (Rojo Nilo). Los cuadros blancos enmarcan un evento de co-transporte PO MD-GL, así como la ampliación de dicho evento. La flecha vertical señala el evento de co-migración y la flecha horizontal indica la dirección del crecimiento (microscopía confocal de disco giratorio, objetivo 60x y barra de escala 10 μm). (B) Kimograma que representa los movimientos de POs y GLs (barra de escala vertical 10 s y horizontal 10 μm). (C) Histograma de la velocidad de los eventos de co-transporte POs MD-GLs (promedio: $1.77 \pm 0.63 \mu\text{m/s}$, $n = 20$ POs-GL, en 20 hifas). (D) Microfotografías de hifas que muestran la co-localización entre POs y GLs (microscopía confocal de escaneo láser, objetivo 60x, barra de escala 10 μm). (E) Citofluorograma de la distribución de los píxeles del canal rojo (POs: TagRFP-PTS1) y el canal verde (GLs: Rojo Nilo) ($n = 24$ hifas).

3.12 Interacción entre peroxisomas y retículo endoplásmico

El RE es otro orgánulo con reportes de ser transportado sobre los ETs en *U. maydis* (Guimaraes et al., 2012). Con la finalidad de conocer si existe co-migración entre los POs y el RE, y en consecuencia un posible co-transporte sobre los ETs, se realizó microscopía confocal de disco giratorio de hifas heterocariones de *N. crassa* resultado de la fusión vegetativa entre las cepas SMRP492 (TagRFP-PTS1) y SMRP361 (CSE-7-GFP, proteína con residencia parcial en el RE). Después de analizar microscópicamente 20 hifas de la fusión vegetativa en cuestión, se observaron algunos eventos de co-localización entre el RE y los POs con MND con una velocidad promedio de $0.448 \pm 0.63 \mu\text{m/s}$ ($n = 20$ POs MND-RE) (Figura 21 A-C; Video 6). Los eventos de co-migración entre el RE y los POs con MD, parecieron ser menos frecuentes o no tan perceptibles, ya que solamente se observó un co-transporte entre una reticulación y un POs con MD ($1.824 \mu\text{m/s}$) en veinte hifas analizadas (Figura 21 D y E; Video 7).

Para obtener más evidencia sobre la asociación entre POs y RE, se determinó el grado de co-localización entre ambos orgánulos con el CCP que corresponde a 0.445 ± 0.067 ($n = 16$ hifas), un grado de co-localización bajo y en consecuencia de baja confiabilidad (Figura 21 F y G). En cuanto al coeficiente de Manders, M1 corresponde a 0.634 ± 0.176 ($n = 16$ hifas) y M2 a 0.160 ± 0.051 ($n = 16$ hifas), lo que representa una mayor fracción de POs que se sobrelapan con el RE.

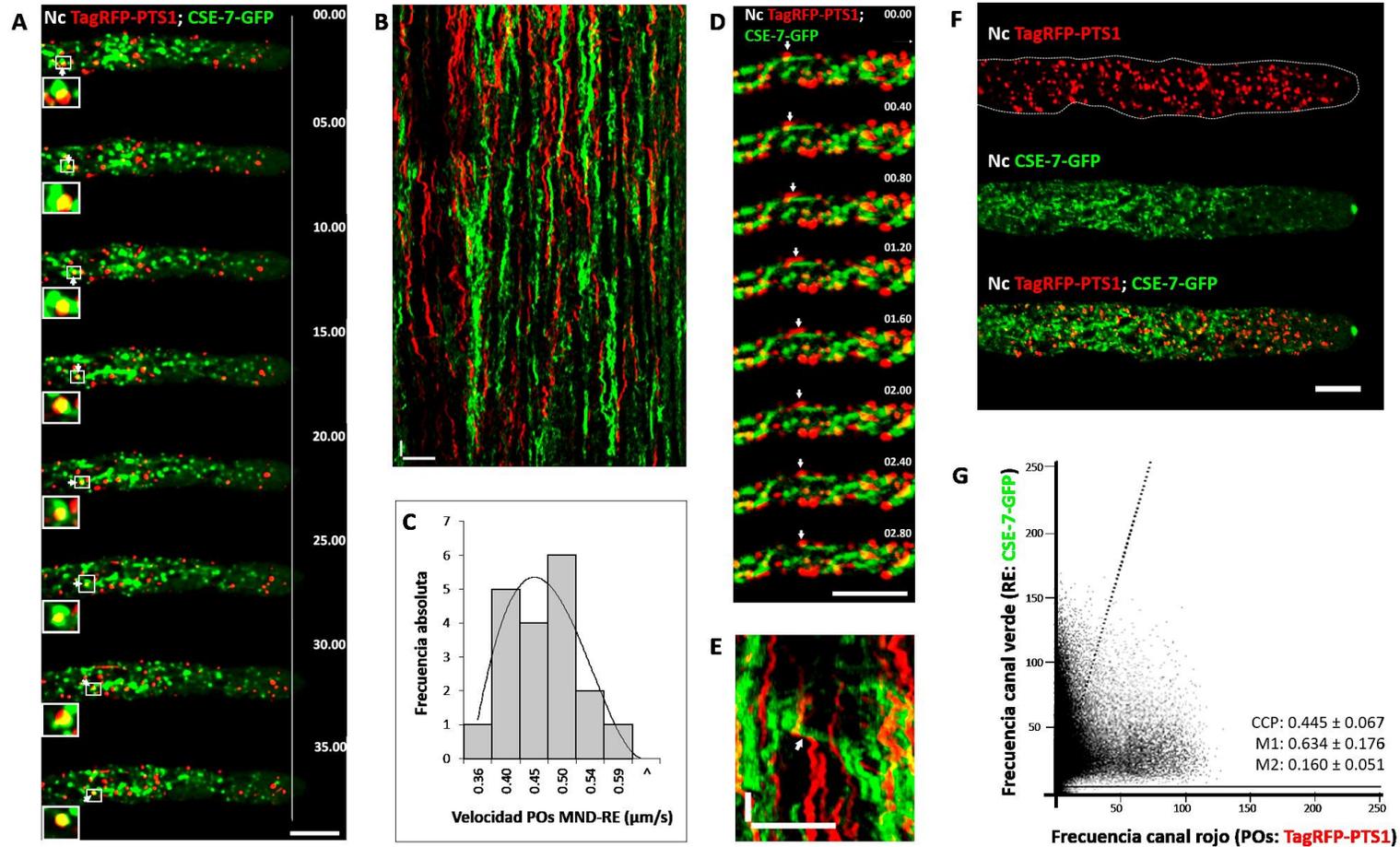


Figura 21. Dinámica celular entre peroxisomas y retículo endoplásmico en *N. crassa*. (A) Serie de tiempo que muestra la interacción entre POs con MND (TagRFP-PTS1) y RE (CSE-7-GFP). Los cuadros blancos enmarcan un evento de asociación entre PO MND-RE, así como la amplificación de dicho evento. La línea blanca vertical indica el punto de inicio del desplazamiento de la hifa. (microscopía confocal de disco giratorio, objetivo 60x y barra de escala 10 μm). (B) Kimograma que representa los movimientos de POs y RE (escala vertical 10 s y escala horizontal 10 μm). (C) Histograma de la velocidad de los eventos de interacción entre POs MND-RE (promedio: $0.448 \pm 0.63 \mu\text{m/s}$, $n = 20$ POs MND-RE, en 4 hifas). (D) Serie de tiempo que muestra un evento de co-transporte entre un PO con MD (TagRFP-PTS1) y un túbulo deslizante de RE, la flecha blanca indica la co-migración (microscopía confocal de disco giratorio, objetivo 60x y barra de escala 10 μm). (E) Kimograma que representa el co-transporte entre un PO con MD y RE ($1.824 \mu\text{m/s}$, un solo evento de co-transporte en 20 hifas analizadas), la flecha blanca señala la aceleración del movimiento (escala vertical 10 s y escala horizontal 10 μm). (F) Microfotografías de hifas que muestran la co-localización entre POs y RE (microscopía confocal de escaneo láser, objetivo 60x, barra de escala 10 μm). (G) Citofluorograma de la distribución de los píxeles del canal rojo (POs: TagRFP-PTS1) y el canal verde (RE: CSE-7-GFP) ($n = 15$ hifas).

3.13 Importación de proteínas con PTS1 en los peroxisomas de las cepas Δpex

Conociendo los defectos fenotípicos causados por la eliminación de los genes *pex-1*, *pex-10* y *pex-14*, así como la importancia de PEX-1, PEX-10 y PEX-14 en la biogénesis de los POs reportada en la literatura, el tercer objetivo de este trabajo fue analizar la importación de proteínas con PTS1 en los POs de las cepas $\Delta pex-1$, -10 y -14 . La estrategia consistió en marcar la matriz de los POs con la proteína TagRFP-PTS1 en las cepas Δpex y para ello, se realizaron cruza sexuales entre las cepas mutantes ($\Delta pex-1$, 10 o $14::hph^+$; $\Delta mus-51::bar^+$) y la cepa SMRP492 con los POs marcados ($\Delta mus-51::bar^+$; *his-3+*::*Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR*), luego se recuperaron ascosporas y después se seleccionaron por resistentes a higromicina y NCT. Solamente se lograron recuperar cepas con fondo genético $\Delta pex-10$ y $\Delta pex-14$. Las cepas recuperadas mostraron defectos en la producción de macroconidios e incapacidad para crecer en MMV suplementado con ácido oleico como fuente de carbono (Figura 22 A), de forma similar a lo mostrado por las cepas $\Delta pex-10$ y $\Delta pex-14$ parentales. Por tal motivo el micelio de las hifas se sometió a tamizaje por microscopía confocal de escaneo láser. El análisis microscópico de las cepas mostró la señal fluorescente de la proteína TagRFP-PTS1 de forma homogénea en el citosol muy similar a lo mostrado por la cepa SMRP368, que produce una proteína mCherry citosólica. Este patrón de fluorescencia mostrado por las cepas recuperadas difiere considerablemente al marcaje de los POs en la cepa SMRP492 (Figura 22 B).

La siguiente etapa en la confirmación de las cepas fue la comprobación molecular. De acuerdo al fenotipo observado, las cepas deberían ser mutantes de los genes *pex* y tener la construcción *3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::STOP::Ptrpc::natR::5'Δhis-3* inserta en el locus *his-3*. Para confirmar este genotipo se realizó extracción de ADN genómico y luego reacciones de PCR para amplificar los fragmentos correspondientes a los genes *pex*, la secuencia *3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::STOP::Ptrpc::natR::5'Δhis-3* y el gen *hph* que confiere la resistencia a higromicina (antifúngico asociado con la mutación de los genes *pex*). Los productos de PCR confirmaron la presencia de la construcción *3'his-3Flank::Pccg-1::tagrfp::PTS1::STOP::Ptrpc::natR::5'Δhis-3* en el locus *his-3* (Figura 23 A, carriles 4, 5, 9 y 10), el gen *hph* (Figura 23 B, carriles 4 y 6) y de una banda poco perceptible del tamaño esperado para los fragmentos correspondientes a los genes *pex-10* y *pex-14* (Figura 23 C, carriles 4 y 8). Estas cepas se asignaron con los nombres SMRP493 ($\Delta pex-10::hph^+$; $\Delta mus-51::bar^+his-3+$::*Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR*) y SMRP494 ($\Delta pex-14::hph^+$; $\Delta mus-51::bar^+his-3+$::*Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR*).

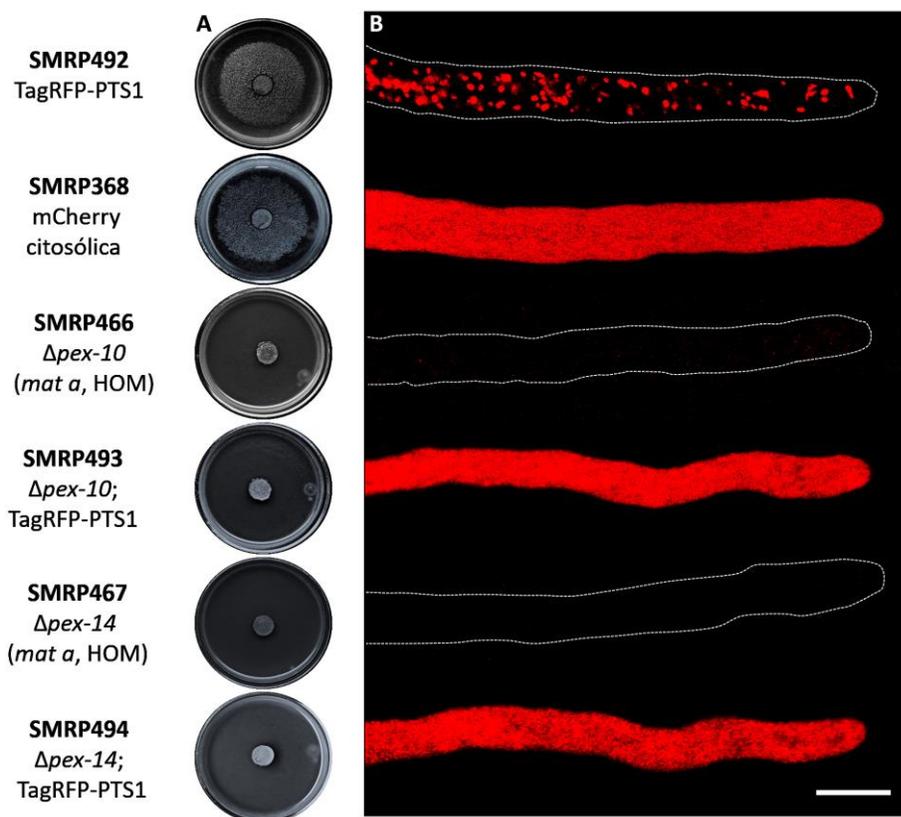


Figura 22. Análisis de la importación de la proteína TagRFP-PTS1 en los peroxisomas de las cepas SMRP493 ($\Delta pex-10::hph^+$; $\Delta mus-51::bar^+his-3+::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR$) y SMRP494 ($\Delta pex-14::hph^+$; $\Delta mus-51::bar^+his-3+::Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR$). (A) Cultivos de las cepas SMRP493 y SMRP494 en MMV-ácido oleico. Controles positivos SMRP492 (TagRFP-PTS1) y SMRP368 (mCherry citosólica) y controles negativos SMRP466 ($\Delta pex-10$) y SMRP467 ($\Delta pex-14$). (B) Microscopía confocal de las hifas de las cepas SMRP493 y SMRP494. Control positivo SMRP492, control negativo SMRP368 y parentales SMRP466 y SMRP467 (barra de escala 10 μ m).

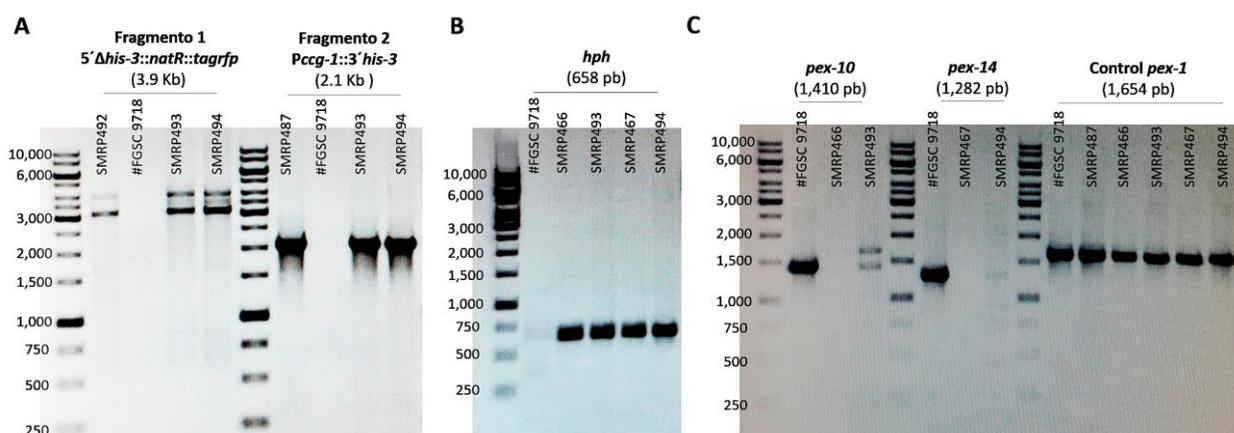


Figura 23. Comprobación molecular de las cepas SMRP493 y SMRP494. (A) Amplificación de los fragmentos 5' $\Delta his-3::natR::tagrfp$ y $Pccg-1::his-3$. Control positivo SMRP492 ($Pccg-1::tagrfp::PTS1::Ptrpc::natR$) y control negativo # FGSC 9718. (B) Amplificación de un fragmento de 658 pb del gen *hph*. Controles positivos SMRP466 ($\Delta pex-10$) y SMRP467 ($\Delta pex-14$), control negativo # FGSC 9718. (C) Amplificación de los fragmentos correspondientes a los genes *pex-10*, *pex-14*. Control positivo # FGSC 9718, controles negativos SMRP466 ($\Delta pex-10$) y SMRP467 ($\Delta pex-14$) y como control de carga se amplificó un fragmento del gen *pex-1*.

Capítulo 4. Discusión

4.1 La ausencia de PEX-1, PEX-10 y PEX-14 genera defectos en la conidiogénesis y en el metabolismo del ácido oleico en *N. crassa*

Los POs son orgánulos implicados en el metabolismo primario y secundario, en el desarrollo, diferenciación y morfogénesis de los hongos filamentosos (Peraza-Reyes y Berteaux-becellier, 2013). Su biogénesis de *novo* está mediada por unas proteínas denominadas peroxinas que se abrevian como PEX (Distel et al., 1996). En este trabajo se analizó el papel de PEX-1, PEX-10 y PEX-14 en el desarrollo vegetativo y sexual de *N. crassa*. Según lo reportado en *S. cerevisiae* y otros hongos, las tres peroxinas de interés forman parte de la maquinaria proteica presente en la membrana de los POs y permiten la importación de proteínas del citosol a la matriz peroxisomal. PEX-1 es una ATPasa AAA que forma parte del complejo de dislocación (PEX-1, PEX-6), encargado del reciclaje de los receptores citoplásmicos (Patta et al., 2005). La PEX-10 y PEX-14 forman parte del importómero peroxisomal; concretamente PEX-10 es una proteína del subcomplejo de *RING-finger* (PEX-2, PEX-10 y PEX-12), cuya función es ubiquitinar al receptor de las proteínas peroxisomales evento importante para el reciclaje de receptores (Williams et al., 2008). En cuanto a la PEX-14 forma parte del subcomplejo proteico en donde tiene lugar el acoplamiento del receptor-carga (PEX-13, PEX-14, PEX-33), así como de los translocones que median la importación de proteínas peroxisomales (Agne et al., 2003; Managadze et al., 2010; Meinecke et al., 2010; Montilla-Martinez et al., 2015).

Para analizar la importancia de estas peroxinas en el desarrollo vegetativo y sexual de *N. crassa*, se obtuvieron del FGSC las cepas mutantes que carecen de los genes codificantes de dichas proteínas. Después de comprobar molecularmente la eliminación génica, se realizó el análisis del desarrollo vegetativo de las mutantes homocariones y se reconoció la importancia de las tres proteínas en la conidiogénesis y en la capacidad de crecer en MMV con ácido oleico como única fuente de carbono. Con los datos obtenidos se determinó una reducción \geq al 99 % en la producción de macroconidios, así como, en la incapacidad de las cepas para utilizar el ácido oleico como fuente de carbono.

Los defectos fenotípicos en la cepa $\Delta pex-14$ de *N. crassa* ya se había descrito previamente (Managadze et al., 2007). Sin embargo, no había reportes previos para las cepas $\Delta pex-1$ y $\Delta pex-10$. Estos defectos fenotípicos concuerdan con lo reportado para muchos otros hongos, incluidos los sordariomycetes *Fusarium graminearum* (Li et al., 2019) y *P. anserina* (Peraza-Reyes et al., 2008; Suaste-Olmos et al., 2018). De la misma manera, el eurotiomycete *A. nidulans* presenta los mismos defectos con la eliminación del

gen *pexA* (Hynes et al., 2008) el ortólogo de *pex-1* en *N. crassa*, y en la cepa carente de *pexB* (Hynes et al., 2010). En *U. maydis*, un hongo del filo Basidiomycota, la falta de la proteína Pex6, también genera defectos en el metabolismo del ácido oleico como fuente de carbono (Freitag et al., 2012).

En este trabajo también se evaluaron otras características fenotípicas como la tasa de crecimiento, el diámetro de las hifas, la producción de micelio aéreo y la cantidad de biomasa seca generada por día. Los datos recolectados sugieren diferencias en comparación con la cepa parental. Sin embargo, estos resultados deben de ser interpretados con precaución, ya que no hubo reproducibilidad de los datos entre experimentos. Lo cual se atribuye entre otras cosas, a uno de los principales defectos fenotípicos de las cepas “la macroconidiación”. Generalmente los experimentos de comparaciones fenotípicas entre cepas de *N. crassa*, se estandarizan inoculando una cantidad similar de macroconidios (esporas asexuales) con la misma viabilidad. Las comparaciones fenotípicas de las cepas Δpex en este trabajo, se realizaron inoculando discos de agar con micelio de cultivos de 24 h incluyendo la cepa parental. No obstante, este tipo de estandarización dejó de lado aspectos importantes como la cantidad de biomasa fresca inoculada, la producción de microconidios de la cepa $\Delta pex-14$ y la capacidad de recuperación de las cepas. En la literatura existen múltiples reportes de cepas mutantes en genes *pex*, con defectos en la biogénesis de los cuerpos de Woronin. En *N. crassa* se ha reportado que la PEX-14 es esencial para la biogénesis de cuerpos de Woronin, de tal manera que su ausencia en la cepa $\Delta pex-14$ conduce al derrame del citoplasma por lesiones mecánicas de las hifas (Managadze et al., 2007).

4.2 La eliminación del gen *pex-14* de *N. crassa* genera esterilidad femenina a diferencia de lo observado con las eliminaciones de *pex-1* y *pex-10*

N. crassa es un hongo sordariomycete heterotálico o auto-estéril que posee dos tipos de apareamientos, *a* y *A* (Staben y Yanofsky, 1990; Glass et al., 1990). En condiciones deficientes de nitrógeno, ambos tipos de apareamiento suelen actuar como hembra, generando cuerpos fructíferos inmaduros denominados *protoperitecios*. La reproducción sexual comienza con la fertilización de los protoperitecios, por las células masculinas de una cepa con tipo de apareamiento complementario. Esta fertilización ocurre cuando el *trícógeno*, una hifa especializada proveniente del protoperitecio, se fusiona con una célula masculina. En *N. crassa*, no hay una célula masculina exclusiva, los macroconidios, microconidios o fragmentos de hifas pueden fertilizar a los protoperitecios. Después de la fertilización, los protoperitecios crecen y se

desarrollan en peritecios (cuerpos fructíferos maduros) con ascas y ascosporas en su interior (Pöggeler et al., 2006; Hammon, 2017).

De acuerdo con lo descrito en el párrafo anterior, cualquier cepa puede actuar como macho (fertilizador) y como hembra (productor de protoperitecios). Por tal motivo y debido a la incapacidad de recuperar mediante cruza sexuales las cepas $\Delta pex-1$ y $\Delta pex-10$ en tipo de apareamiento A, se realizaron cruza heterocigotas para evaluar la fertilidad como hembra y macho de las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*), $\Delta pex-10$ (*mat a*) y $\Delta pex-14$ (*mat a* y A). Los resultados confirmaron la fertilidad masculina en las cuatro cepas. Mientras que, las cepas $\Delta pex-14$ carecen de fertilidad femenina tal como se había reportado previamente (Managadze et al., 2007). En cuanto a las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*) y $\Delta pex-10$ (*mat a*) mantienen la fertilidad como hembras, ya que hubo formación de peritecios, ascas y ascosporas. El efecto en el desarrollo sexual de las cepas $\Delta pex-1$ y $\Delta pex-10$, concuerda con los análisis realizados en *P. anserina* (Peraza-Reyes et al., 2008; Suaste-Olmos et al., 2018) y con los resultados de la eliminación de la peroxina *RING-finger* PexB en *A. nidulans* (Hynes et al., 2010). A pesar del mantenimiento de la fertilidad femenina de las cepas $\Delta pex-1$ (*mat a*) y $\Delta pex-10$ (*mat a*) de *N. crassa*, se observó una reducción y un retraso en la formación de peritecios de forma similar a lo mostrado en el sordariomycete homotálico *F. graminearum* (Li et al., 2019).

En la literatura también existen reportes sobre cepas mutantes de *N. crassa* con esterilidad masculina y femenina. Generalmente las cepas estériles como macho son aquellas con defectos en la síntesis de feromonas, compuestos importantes para el direccionamiento del tricógeno hacia la célula fertilizadora (Kim y Borkovich, 2006). Sin embargo, las cepas con esterilidad femenina, tales como las cepas $\Delta pex-14$, son más frecuentes que las cepas con esterilidad masculina. Algunos reportes asocian la esterilidad femenina con la incapacidad de las cepas para producir protoperitecios (Hammon, 2007), es decir, con problemas en diferenciación y morfogénesis.

Otro de los análisis realizados para la caracterización del desarrollo sexual de las cepas Δpex , fue la cruce homocigota entre las cepas $\Delta pex-14$. En esta cruce no hubo formación de peritecios, seguramente a causa de los defectos en la fertilidad femenina de las cepas, tal y como se describió previamente (Managadze et al., 2007). Estos resultados son particularmente interesantes, ya que en *P. anserina* otro sordariomycete heterotálico, la mutación de PEX-14 no genera defectos en el desarrollo sexual (Peraza-Reyes et al., 2011). Estas diferencias probablemente pueden explicarse en términos de las características particulares de los glioxisomas de *N. crassa*, ya que los reportes hasta la actualidad los definen como el sitio exclusivo de β -oxidación de ácidos grasos (aunque este es tema amerita estudios más profundos), poseen una enzima acil-CoA deshidrogenasa en vez de una acil-CoA oxigenasa, y además no contienen catalasa debido a un

mecanismo de β -oxidación que no involucra la formación de peróxido de hidrogeno (Kionka y Kunau, 1985; Schliebs et al., 2006).

4.3 La importación de proteínas con PTS1 en los peroxisomas de las cepas $\Delta pex-10$ y $\Delta pex-14$ se ve afectada

En *N. crassa* existen dos tipos de POs, los glioxisomas (Kionka y Kunau, 1985) y sus derivados los *cuerpos de Woronin* (Jedd y Chua, 2000; Tenney et al., 2000). Los glioxisomas de *N. crassa*, contienen las enzimas necesarias para la β -oxidación de ácidos grasos (Kionka y Kunau, 1985) y el ciclo del glioxilato (Flavell y Woodward, 1971). Sin embargo, las enzimas que participan en estas rutas metabólicas son sintetizadas en el citosol y luego son reconocidas por receptores vía una secuencia de aminoácidos conocida como PTS (del inglés *Peroxisome Targeting Signal*). Existen predominantemente dos clases de secuencias de direccionamiento peroxisomal: un tripéptido C-terminal (PTS1) (Brocard y Harting, 2006) y un nonapéptido N-terminal (PTS2) (Petriv et al., 2004). Una vez que los receptores interactúan con el PTS de las proteínas peroxisomales, las direccionan hacia la membrana de los peroxisomas en donde interactúan con los complejos multiproteicos: el subcomplejo de acoplamiento (PEX-13, PEX-14, PEX-33), el subcomplejo de *RING-finger* (PEX-2, PEX-10 y PEX-12), la ATPasa AAA (PEX-1, PEX-6), etc., que facilitan la translocación de las proteínas peroxisomales a la matriz del orgánulo (Agne et al., 2003; Patta et al., 2005; Williams et al., 2008; Managadze et al., 2010).

Parte de los objetivos del proyecto están relacionados con el análisis de la importación de proteínas con PTS1 en las cepas $\Delta pex-1$, $\Delta pex-10$ y $\Delta pex-14$. La estrategia general consistió en adicionar la secuencia PTS1 de *N. crassa* a la proteína fluorescente TagRFP y asegurar su traducción en las cepas Δpex . Sin embargo, solamente fue posible analizar este fenómeno en las cepas $\Delta pex-10$ y $\Delta pex-14$, ya que no se logró en el fondo genético $\Delta pex-1$. Los resultados obtenidos, permiten reconocer la importancia de PEX-10 (subcomplejo de *RING-finger*) y PEX-14 (subcomplejo de acoplamiento) en la importación de proteínas con PTS1 en los peroxisomas, ya que la señal fluorescente de TagRFP-PTS1 se distribuye de forma homogénea en el citosol de las cepas. Un fenómeno similar se ha reportado para las mutaciones de estas proteínas en otros hongos (Managadze et al., 2007; Peraza-Reyes et al., 2008 y 2011; Hynes et al., 2010; Freitag et al., 2012; Suaste-Olmos et al., 2018; Li et al., 2019).

Los problemas en la importación de proteínas con PTS1 en los peroxisomas de las cepas Δpex de *N. crassa*, probablemente explican los defectos de estas cepas en el desarrollo vegetativo y sexual descritos anteriormente. Puesto que las proteínas peroxisomales sintetizadas en el citosol deben alcanzar la matriz peroxisomal para llevar a cabo sus actividades metabólicas. De tal manera que el metabolismo de los peroxisomas debe estar afectado en las cepas. Probablemente, se reduce el suministro de energía y de los metabolitos intermediarios necesarios para el desarrollo y la diferenciación celular. Por ejemplo, en *F. graminearum* la eliminación de PEX-1 y PEX-10 provocó defectos en la macroconidiación y una disminución intracelular de acetil CoA, e interesantemente la adición de acetil CoA en el medio de cultivo aumentó la producción de macroconidios de las cepas mutantes (Li et al., 2019). Otro caso interesante es el reporte de las oxilipinas fúngicas (con naturaleza lipídica), que actúan como moduladores del desarrollo de esporas asexuales y sexual (Tsitsigiannis y Keller, 2007).

4.4 Los desplazamientos rápidos y dirigidos de los peroxisomas de *N. crassa* ocurren a través de los microtúbulos y probablemente están mediados por los endosomas tempranos

En cualquier célula, la distribución espacio-temporal de sus componentes es esencial para su mantenimiento, desarrollo y crecimiento. Este fenómeno es especialmente crítico en células altamente polarizadas como las hifas de los hongos filamentosos, en donde se requiere un continuo aporte de los polímeros estructurales de la pared celular en el ápice (Barntnicki-Garcia y Lippman, 1995). Lo anterior se logra mediante un flujo continuo de vesículas generado por la acción coordinada entre MTs, microfilamentos de actina y proteínas motoras (Riquelme et al., 2018). Las proteínas motoras transportan una diversidad de cargas y sus interacciones pueden estar mediadas por proteínas adaptadoras o por orgánulos como los ETs (Salogianni et al., 2017). En *A. nidulans* y *U. maydis* se ha descrito que los ETs actúan como vehículos de transporte para mARNs, proteínas, ribosomas y algunos orgánulos como las GLs, el RE y los POs (Becht et al., 2006; Konig et al., 2009; Bauman et al., 2014; Higuchi et al., 2014; Guimaraes et al., 2015, Salogiannis et al., 2016 y 2020).

Para identificar si los POs de *N. crassa* se distribuyen en la hifa por medio de transporte endosomal, primero se llevó a cabo el marcaje de los POs con la proteína TagRFP-PTS1 y se obtuvo la cepa SMRP492. El análisis microscópico en hifas de esta cepa permitió identificar estructuras circulares con un diámetro

promedio de $0.96 \pm 0.28 \mu\text{m}$. Esto concuerda con los diámetros reportados para los POs que van de 0.1 a $1.0 \mu\text{m}$ (Smith y Aitchison, 2013).

Los POs de *N. crassa* al igual que en *U. maydis* (Guimaraes et al., 2015) y *A. nidulans* (Salogiannis et al., 2016), se caracterizan por tener dos tipos de desplazamientos: movimientos lentos, vibratoriales y no dirigidos (MND, $0.534 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$) y movimientos rápidos y dirigidos (MD, $3.4 \pm 0.6 \mu\text{m/s}$). A partir de kimogramas realizados de videos de 3 min de duración, se determinó que los POs con MD únicamente representan el $14.4 \pm 6.8 \%$ del total de los POs, mientras que los POs con MND corresponden al $85.6 \pm 6.8 \%$; de forma similar a lo reportado en *U. maydis* (5-10 % : 90-95%) y *A. nidulans* (12 % :88 %). En *N. crassa* usualmente un PO con MD suele pasar a un estado con MND para interactuar con otro PO. En estas asociaciones suelen ocurrir conexiones transitorias entre los POs. Este hecho no parece ser único, puesto que en *U. maydis* se ha descrito algo similar y además se ha propuesto que en dichas interacciones probablemente ocurre un intercambio de lípidos y metabolitos (Guimaraes et al., 2015; Lin et al, 2016).

La dinámica de los POs de *N. crassa*, también se ha descrito en otros hongos como movimientos de largo y corto alcance, considerando la distancia recorrida por los POs. En *U. maydis* el promedio de la distancia recorrida por los POs con movimientos de largo alcance ronda los $5 \mu\text{m}$, mientras que en *A. nidulans* son mayores a $3 \mu\text{m}$ (Guimaraes et al., 2015; Salogiannis et al., 2016). En *N. crassa* la distancia es más variable y va de los 3 a $30 \mu\text{m}$. Algo a considerar en este aspecto es la rápida tasa de crecimiento que muestra *N. crassa* (en placa: $2.251 \pm 0.388 \text{ mm/h}$, $37.521 \pm 6.468 \mu\text{m/min}$ o $0.625 \pm 0.108 \mu\text{m/s}$), en comparación con lo reportado para *A. nidulans* (en placa: 0.3 mm/h , $5 \mu\text{m/min}$ o $0.083 \mu\text{m/s}$) y *U. maydis* (en placa: 0.09 mm/h , $1.5 \mu\text{m/min}$ o $0.025 \mu\text{m/s}$) (Riquelme et al., 2016).

El siguiente paso en la construcción del modelo de transporte endosomal de los POs de *N. crassa*, fue determinar si el desplazamiento de estos orgánulos ocurre a través de los MTs. Los MTs son estructuras altamente polares y dinámicas, que están constituidos por dímeros de α y β -tubulina (Alberts et al., 2015). Para confirmar este evento de transporte, se realizaron fusiones vegetativas entre la cepa SMRP12 que contiene la β tubulina (BML en *N. crassa*) etiquetada con GFP en el extremo carboxilo terminal (Freitag et al., 2004) y la cepa con los peroxisomas marcados por la proteína TagRFP-PTS1. El análisis por medio de microscopía confocal de disco giratorio, permitió identificar POs desplazándose a través de los MTs de forma rápida ($2.3 \pm 0.52 \mu\text{m/s}$) y dirigida.

Otro resultado que confirma lo anterior, se obtuvo al tratar hifas con MTs y POs marcados con el compuesto benomilo, un Inhibidor de la polimerización de los MTs. Bajo estas condiciones se anularon los

MD de los POs y en su mayoría fue posible observar movimientos lentos ($0.378 \pm 0.150 \mu\text{m/s}$) de forma similar a los MND ($0.534 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$), solo con la diferencia de que carecían de las vibraciones características observadas en los kimogramas. La despolimerización de los MTs, no permitió observar la acumulación de los POs en la punta de las hifas como se ha descrito en otros hongos. En cambio, se observó una pérdida drástica de la polaridad celular, seguramente a causa del robusto y rápido crecimiento de *N. crassa* (en microscopía: $0.1 \pm 0.053 \mu\text{m/s}$ o $0.36 \pm 0.193 \text{ mm/h}$, $n = 22$ hifas).

El último dato que aporta evidencia sobre el transporte de los POs vía MTs, es el análisis de co-localización entre la señal correspondiente a los POs y a los MTs. Para hacer este análisis se determinó el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP). El CCP es una medida de correlación lineal, que se emplea para establecer el grado de co-localización en imágenes de color dual. Los valores de CCP varían de -1 a +1, siendo los valores superiores a 0.5 los que representan valores de mayor confiabilidad. Otro de los coeficientes determinados para analizar la co-localización fue el coeficiente de Manders (M1 y M2), este coeficiente varía de 0 a 1. M1 corresponde a la fracción de píxeles en verdes que se superponen con los píxeles en rojo y M2 se define de manera inversa (Manders et al., 1993). Después de determinar ambos coeficientes, se obtuvo un CCP de 0.431 ± 0.188 ($n = 12$ hifas), un M1 de 0.694 ± 0.175 ($n = 12$ hifas) y M2 de 0.229 ± 0.091 ($n = 12$ hifas); estos valores son congruentes con los resultados descritos en los párrafos anteriores, ya que sólo los POs con MD parecen desplazarse sobre los MTs, es decir sólo el $14.4 \pm 6.8 \%$ de los POs de *N. crassa*. Por otra parte, conviene aclarar que el valor de M1, es considerablemente alto y probablemente no solo refleje el transporte de los POs con MD a través de los MTs, sino también la cercanía o asociación de los POs con MND. Todos los datos anteriores apoyan la idea de que el transporte rápido y dirigido de los POs de *N. crassa*, ocurre a través de los MTs (Figura 24) de forma similar a lo observado en *U. maydis* y *A. nidulans* (Guimaraes et al., 2015; Salogiannis et al., 2016), pero contrario a lo que ocurre en levaduras y plantas, en donde el movimiento depende de los microfilamentos de actina (Hoepfner et al., 2001; Mathur et al., 2002).

Otro elemento indispensable para confirmar el transporte endosomal de los POs de *N. crassa*, tiene que ver con el co-transporte entre los POs y ETs. Para confirmar lo anterior, se realizó microscopía confocal de disco giratorio de hifas con POs, marcados con TagRFP-PTS1, y ETs, usando como marcador la proteína YPT-52 etiquetada con GFP en el extremo amino terminal. La proteína YPT-52 es una Rab GTPasa que ha sido empleada previamente para el marcaje de los ETs de *N. crassa* (Seidel et al., 2013). El análisis microscópico realizado, permitió identificar seis eventos de co-transporte en 20 hifas. Curiosamente el co-transporte POs-ETs en *N. crassa* (Figura 24) ocurre de forma similar a lo descrito en *U. maydis* (Guimaraes et al., 2015), ya que en estos eventos los POs comienzan su desplazamiento al interactuar con un ET móvil,

luego ocurre la co-migración de ambos orgánulos con una velocidad promedio de $1.9 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ y finalmente el PO se liberan del ET quien continúa su desplazamiento. Quizás la cantidad reducida de eventos de co-transporte observados en *N. crassa*, puede explicarse por el hecho de que la proteína YPT-52 parece ser un marcador no exclusivo de ETs, puesto que en la microscopía realizada en este trabajo, se observó la presencia de GFP-YPT-52 en otros orgánulos que podrían ser endosomas tardíos (LEs), cuerpos multivesiculares (CMV) o compartimentos prevacuolares (PVCs) (Bowmann et al., 2015), orgánulos que no están involucrados en la movilidad de los POs por lo menos en *U. maydis* (Guimaraes et al., 2015). Probablemente GFP-YPT-52 marque a los endosomas en la etapa final de ET y en los comienzos de LE, ya que Seidel et al. (2013) describen que esta estrategia de marcaje no incluye a todos los endosomas. Quizás esta etapa del desarrollo de los ETs hacia los LEs tenga menor afinidad hacia el transporte endosomal y por ello se ven menos eventos de co-transporte POs-ETs.

4.5 Las gotas lipídicas y probablemente el retículo endoplásmico acompañan a los peroxisomas durante los movimientos rápidos y dirigidos

En *U. maydis* y *A. nidulans* los ETs median la movilidad de POs, GLs (Salogiannis et al., 2016 y 2020) y RE (Guimaraes et al., 2015). Este proceso probablemente es importante para su distribución espacio-temporal y en consecuencia para hacer frente a los requisitos locales de metabolitos intermedios y la degradación de ácidos grasos (Schrader et al., 2013).

Con la finalidad de analizar las asociaciones entre los POs-GLs y POs-RE, se realizaron análisis microscópicos. Primero se analizaron hifas con POs y GLs marcadas. Las GLs son orgánulos esféricos de hasta un micrómetro de diámetro, que están constituidas únicamente por una monocapa de fosfolípidos que rodea a un núcleo de lípidos neutros, generalmente triglicéridos y esterol ésteres (Kohlweinn et al., 2013). Para visualizar las GLs en el micelio de la cepa SMRP492, se realizó una tinción de lípidos neutros con el fluorocromo Rojo Nilo, tal como se ha reportado en *F. graminearum* (Lin et al., 2019) y *N. crassa* (Managadze et al., 2016). Estos análisis permitieron identificar un alto grado de co-localización entre ambas señales con un CCP de 0.796 ± 0.039 ($n = 24$ hifas), un M1 de 0.623 ± 0.184 ($n = 24$ hifas) y un M2 de 0.639 ± 0.127 ($n = 24$ hifas). Estos datos de co-localización confirman lo observado en microscopía confocal de disco giratorio, en donde se reconoce la asociación de las GLs y POs con MD, así como con los POs con MND. Sorpresivamente la co-migración de estos dos orgánulos no se encontró en *U. maydis* en donde solo se han reportado conexiones físicas transitorias entre ellos (Guimaraes et al. 2015). El co-

transporte de POs y GLs en *A. nidulans*, tampoco se ha descrito. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la proteína adaptadora PxdA con ortólogo en *N. crassa* (PXD-1), está implicada en el transporte endosomal de POs y GLs (Salogiannis et al., 2016 y 2020). De confirmarse esto en *N. crassa* y con los resultados obtenidos en este trabajo podría corroborarse el co-transporte de ambos orgánulos sobre los ETs (Figura 24).

El transporte simultáneo de orgánulos no es un fenómeno exclusivo de hongos. En las células de mamíferos se ha observado que la distribución de las redes membranas del RE está mediada por ETs vía MTs y que las asociaciones mitocondria-RE suelen tener movilidad (Friedman, 2010 y 2013). En esta última parte del proyecto se decidió analizar el co-transporte entre POs y RE. De acuerdo con los resultados obtenidos parece haber una asociación reducida entre ambos orgánulos, ya que el grado de co-localización es bajo, con un CCP de 0.445 ± 0.067 ($n = 16$ hifas). Aun así, la mayor asociación con el RE ocurre con los POs con MND lo que explica el valor del coeficiente de Manders M1 igual a 0.634 ± 0.176 ($n = 16$ hifas). En toda la microscopía realizada para analizar la interacción entre POs y RE, solo se observó un evento de co-transporte, aunque quizás no convenga pasarlo por alto, ya que en este análisis se marcó el RE con la proteína CSE-7-GFP. Esta proteína es una chaperona transmembranal con residencia parcial en el RE, encargada de regular el correcto plegamiento de ciertas proteínas (Rico-Ramírez et al., 2018). Quizás dadas estas circunstancias convenga repetir este análisis, pero procurando marcar los túbulos deslizantes o reticulaciones móviles del RE.

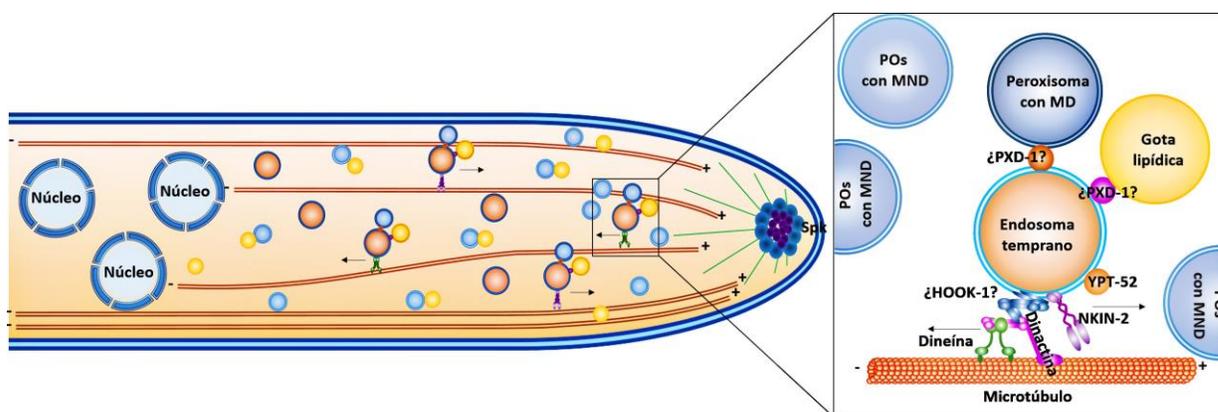


Figura 24. Modelo de transporte peroxisoma-endosoma propuesto para *N. crassa*. Los datos obtenidos en este trabajo aportan evidencias para suponer que los POs son transportados de forma rápida y dirigida sobre los ETs junto con las GLs vía MTs. Mientras que la movilidad de los ETs está mediada por las proteínas motoras NKIN-2 y la dineína citoplasmática (Seidel et al., 2013)

Capítulo 5. Conclusiones

Las peroxinas PEX-1, PEX-10 y PEX-14 son importantes para el desarrollo vegetativo de *N. crassa*, dado que su carencia trae consigo defectos en la conidiogénesis y en el metabolismo del ácido oleico.

La peroxina PEX-14 tiene un papel importante en el desarrollo sexual de *N. crassa*, ya que su ausencia causa esterilidad femenina en ambos tipos de apareamiento.

Los defectos en el desarrollo vegetativo y sexual de *N. crassa*, generados por la eliminación de las peroxinas PEX-10 y PEX-14, probablemente se deben a los problemas en la importación de proteínas con PTS1 en los peroxisomas.

La mayoría de los peroxisomas de *N. crassa* muestran movimientos lentos y no dirigidos, y solo la minoría posee desplazamientos rápidos y dirigidos. Los peroxisomas con movimientos rápidos y dirigidos se mueven a través de microtúbulos y probablemente sobre los endosomas tempranos.

Las gotas lipídicas y probablemente el retículo endoplásmico acompañan a los peroxisomas durante los movimientos rápidos y dirigidos.

Literatura citada

- Abenza, J.F., Galindo, A., Pinar, M., Pantazopoulou, A., de los Ríos, V., Peñalva, M.A., 2012. Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement. *Molecular Biology of the Cell*, 23(10), 1889-1901.
- Agne, B., Meindl, N.M., Niederhoff, K., Einwächter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Kunau, W.H., 2003. Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Molecular Cell*, 11(3), 635-646.
- Alberts, B., Roberts, K., Lewis, J., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A.D., Raff, M., 2015. *Essential Cell Biology*. Garland Science, EUA. pp 503-507.
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M.A., Espeso, E.A., 2008. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 67(4), 891-905.
- Bartnicki Garcia, S., Lippman, E., 1969. Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science*, 165(3890), 302-304.
- Bartnicki García, S., Garduño Rosales, M., Delgado Alvarez, D.L., Mouriño-Pérez, R.R., 2018. Experimental measurement of endocytosis in fungal hyphae. *Fungal Genetics and Biology*, 118, 32-36.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., Feldbrügge, M., 2012. Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *The Journal of Cell Science*, 125(11), 2740-2752.
- Baumann, S., König, J., Koepke, J., Feldbrügge, M., 2014. Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *European Molecular Biology Organization Reports*, 15(1), 94-102.
- Becht, P., König, J., Feldbrügge, M., 2006. The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *Journal of Cell Science*, 119(23), 4964-4973.
- Berteaux Lecellier, V., Picard, M., Thompson Coffe, C., Zickler, D., Panvier Adoutte, A., Simonet, J.M., 1995. A nonmammalian homolog of the PAF7 gene (Zellweger syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell*, 81(7), 1043-1051.
- Bianchi, D.E., Turian, G., 1967. Lipid content of conidia of *Neurospora crassa*. *Nature*, 214(5095), 1344-1345.

- Bowman, B.J., Draskovic, M., Schnittker, R.R., El-Mellouki, T., Plamann, M.D., Sánchez-León, E., Riquelme, M., Bowman, E.J., 2015. Characterization of a novel prevacuolar compartment in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 14(12), 1253-1263.
- Brocard, C., Hartig, A., 2006. Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 1565–1573.
- Buxbaum, A.R., Haimovich, G., Singer, R.H., 2015. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(2), 95-109.
- Callejas-Negrete, O.A., 2019. Preparación de células químicamente competentes [Material de curso]. *Técnicas de microbiología*, CICESE, Baja California, México.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E., Hausman, R.E., 2000. *The cell: a molecular approach* (Vol. 10). Washington, DC: ASM press.
- De Duve, C.A.B.P., Baudhuin, P., 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews*, 46(2), 323-357.
- Delgado Álvarez, D.L., Callejas Negrete, O.A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R.W., Smith, L.G., Mouriño Pérez, R.R., 2010. Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(7), 573-586.
- Distel, B., Erdmann, R., Gould, S.J., Blobel, G., Crane, D.I., Cregg, J.M., Dodt, G., Fujiki, Y., Goodman, J.M., Just, W.W., Kiel, J.A.K.W., Kunau, W.H., Lazarow, P.B., Mannaerts, G.P., Moser, H.W., Osumi, T., Rachubinski, R.A., Roscher, A., Subramani, S., Tabak, H.F., Tsukamoto, T., Valle, D., van der Klei, I., van Veldhoven, P.P., Veenhuis, M., 1996. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *Journal of Cell Biology*, 135, 1–3.
- Eckert, J.H., Erdmann, R., 2003. Peroxisome biogenesis. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 75-121
- Farré, J.C., Carolino, K., Stasyk, V., Stasyk, O.G., Hodzic, Z., Agrawal, G., Subramani, S., 2017. A new yeast peroxin, Pex36, a functional homolog of mammalian PEX16, functions in the ER-to-peroxisome traffic of peroxisomal membrane proteins. *Journal of Molecular Biology*, 429(23), 3743-3762.
- Farré, J.C., Mahalingam, S.S., Proietto, M., Subramani, S., 2019. Peroxisome biogenesis, membrane contact sites, and quality control. *European Molecular Biology Organization Reports*, 20(1), e46864.

- Fischer Parton, S., Parton, R.M., Hickey, P.C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H.A., Read, N.D., 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analyzing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*, 198(Pt 3), 246–259.
- Flavell, R.B., Fincham, J.R.S., 1968. Acetate-nonutilizing mutants of *Neurospora crassa* I. Mutant Isolation, Complementation Studies, and Linkage Relationships. *Journal of Bacteriology*, 95(3), 1056-1062.
- Flavell R.B., Woodward, D.O., 1971. Metabolic role, regulation of synthesis, cellular localization, and genetic control of the glyoxylate cycle enzymes in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 105, 200–210.
- Freitag, J., Ast, J., Bölker, M., 2012. Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature*, 485(7399), 522–525.
- Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., Voeltz, G.K., 2010. ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *Journal of Cell Biology*, 190(3), 363-375.
- Friedman, J.R., DiBenedetto, J.R., West, M., Rowland, A.A., Voeltz, G.K., 2013. Endoplasmic reticulum–endosome contact increases as endosomes traffic and mature. *Molecular Biology of the Cell*, 24(7), 1030-1040.
- Gabalón, T., Snel, B., Van Zimmeren, F., Hemrika, W., Tabak, H., Huynen, M.A., 2006. Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biology Direct*, 1(1), 8-22.
- Girbardt, M., 1957. Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). *Planta*, 50(1), 47-59.
- Glass, N.L., Grotelueschen, J., Metzberg, R.L., 1990. *Neurospora crassa* A mating-type region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 4912-4916.
- Goodrich Tanrikulu, M., Howe, K., Stafford, A., Nelson, M.A., 1998. Changes in fatty acid composition of *Neurospora crassa* accompany sexual development and ascospore germination. *Microbiology*, 144(7), 1713-1720.
- Grabenbauer, M., Sätzler, K., Baumgart, E., Fahimi, H.D., 2000. Three-dimensional ultrastructural analysis of peroxisomes in HepG2 cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 32(1-3), 37-49.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, 100(3), 965-973.

- Guenther, J.C., Hallen Adams, H.E., Bücking, H., Shachar Hill, Y., Trail, F., 2009. Triacylglyceride metabolism by *Fusarium graminearum* during colonization and sexual development on wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(12), 1492-1503.
- Guimaraes, S.C., Schuster, M., Bielska, E., Dagdas, G., Kilaru, S., Meadows, B.R., Steinberg, G., 2015. Peroxisomes, lipid droplets, and endoplasmic reticulum “hitchhike” on motile early endosomes. *The Journal of Cell Biology*, 211(5), 945-954.
- Haimovich, G., Cohen Zontag, O., Gerst, J.E., 2016. A role for mRNA trafficking and localized translation in peroxisome biogenesis and function? *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 1863(5), 911-921.
- Hammond, T. M. (2017). Sixteen years of meiotic silencing by unpaired DNA. In Friedmann T., Dunlap, J.C., Goodwin, S.F., (Eds.) *Advances in genetics*, Academic Press. pp. 1-42
- Heinemann, P., Just, W.W., 1992. Peroxisomal protein import In vivo evidence for a novel translocation competent compartment. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 300(2), 179-182.
- Hickey, P.C., Swift, S.R., Roca, M.G., Read, N.D., 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods Microbiology*, 34, 63-87.
- Higuchi, Y., Ashwin, P., Roger, Y., Steinberg, G., 2014. Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *Journal of Cell Biology*, 204(3), 343-357.
- Hoepfner, D., Van Den Berg, M., Philippsen, P., Tabak, H.F., Hettema, E.H., 2001. A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 155(6), 979-990.
- Hynes, M.J., Murray, S.L., Khew, G.S., Davis, M.A., 2008. Genetic Analysis of the Role of Peroxisomes in the Utilization of Acetate and Fatty Acids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 178(3), 1355–1369.
- Hynes, M.J., Murray, S.L., Kahn, F.K., 2010. Deletion of the RING-finger peroxin 2 gene in *Aspergillus nidulans* does not affect meiotic development. *Federation of European Biochemical Societies Microbiology Letters*, 306(1), 67-71.
- Jedd, G., Chua, N.H., 2000. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature Cell Biology*, 2(4), 226–231.
- Kiel, J. A., Veenhuis, M., van der Klei, I. J., 2006. PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic*, 7(10), 1291-1303.

- Kim, H., Borkovich, K.A., 2006. Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 5(3), 544-554.
- Kim, P., 2017. Peroxisome biogenesis: a union between two organelles. *Current Biology*, 27(7), R271-R274.
- Kim, P.K., Hettema, E.H., 2015. Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. *Journal of Molecular Biology*, 427(6), 1176-1190.
- Kionka, C., Kunau, W.H., 1985. Inducible beta-oxidation pathway in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 161(1), 153-157.
- Kong, X., Zhang, H., Wang, X., Lee, T.V.D., Waalwijk, C., Van Diepeningen, A., Feng, J., 2019. FgPex3, a peroxisome biogenesis factor, is involved in regulating vegetative growth, conidiation, sexual development, and virulence in *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2088.
- König, J., Baumann, S., Koepke, J., Pohlmann, T., Zarnack, K., Feldbrügge, M., 2009. The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 28(13), 1855-1866.
- Lazarow, P.B., Fujiki, Y., 1985. Biogenesis of Peroxisomes. *Annual Review of Cell Biology*, 1(1), 489–530.
- Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A., Steinberg, G., 2006. A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 25(11), 2275-2286.
- Lin, X., Alspaugh, J.A., Liu, H., Harris, S., 2015. Fungal morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(2), a019679-26.
- Liu, F., Ng, S.K., Lu, Y., Low, W., Lai, J., Jedd, G., 2008. Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. *Journal of Cell Biology*, 180(2), 325-339.
- Liu, F., Lu, Y., Pieuchot, L., Dhavale, T., Jedd, G., 2011. Import oligomers induce positive feedback to promote peroxisome differentiation and control organelle abundance. *Developmental Cell*, 21(3), 457-468.
- Maggio Hall, L.A., Keller, N.P., 2004. Mitochondrial β -oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 54(5), 1173-1185.
- Managadze, D., Würtz, C., Sichtung, M., Niehaus, G., Veenhuis, M., Rottensteiner, H., 2007. The peroxin PEX14 of *Neurospora crassa* is essential for the biogenesis of both glyoxysomes and Woronin bodies. *Traffic*, 8(6), 687-701.

- Managadze, D., Würtz, C., Wiese, S., Schneider, M., Girzalsky, W., Meyer, H.E., Rottensteiner, H., 2010. Identification of PEX33, a novel component of the peroxisomal docking complex in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *European Journal of Cell Biology*, 89(12), 955-964.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A., 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*, 169(3), 375-382.
- Margolin, B.S., Freitag, M., Selker, E.U., 1997. Improved plasmids for gene targeting at the his-3 locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 34-36.
- Mathur, J., Mathur, N., Hülkamp, M., 2002. Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiology*, 128(3), 1031-1045.
- McClure, W.K., Park, D., Robinson, P.M., 1968. Apical organization in the somatic hyphae of fungi. *Journal of General Microbiology*, 50(2), 177-182.
- Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Krüger, V., Beck, S., Wagner, R., Erdmann, R., 2010. The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nature Cell Biology*, 12(3), 273-277.
- Montilla-Martinez, M., Beck, S., Klümper, J., Meinecke, M., Schliebs, W., Wagner, R., Erdmann, R., 2015. Distinct pores for peroxisomal import of PTS1 and PTS2 proteins. *Cell Reports*, 13(10), 2126-2134.
- Murphy, D.J., 2012. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, 249(3), 541-585.
- Nordgren, M., Fransen, M., 2014. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie Journal*, 98, 56-62.
- Passreiter, M., Anton, M., Lay, D., Frank, R., Harter, C., Wieland, F.T., Just, W.W., 1998. Peroxisome biogenesis: involvement of ARF and coatomer. *The Journal of Cell Biology*, 141(2), 373-383.
- Peraza Reyes, L., Zickler, D., Berteaux Lecellier, V., 2008. The peroxisome RING-finger complex is required for meicyte formation in the fungus *Podospora anserina*. *Traffic*, 9(11), 1998-2009.
- Peraza Reyes, L., Arnaise, S., Zickler, D., Coppin, E., Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V., 2011. The importomer peroxins are differentially required for peroxisome assembly and meiotic development in *Podospora anserina*: insights into a new peroxisome import pathway. *Molecular Microbiology*, 82(2), 365-377.

- Peraza Reyes, L., Berteaux Lecellier, V., 2013. Peroxisomes and sexual development in fungi. *Frontiers in Physiology*, 4, 244-260.
- Petriv, O.I., Tang, L., Titorenko, V.I., Rachubinski, R.A., 2004. A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *Journal of Molecular Biology*, 341, 119–134.
- Platta, H.W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W., and Erdmann, R., 2005. Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Natural Cell Biology*, 7, 817–822.
- Platta, H.W., Hagen, S., Reidick, C., Erdmann, R., 2014. The peroxisomal receptor dislocation pathway: to the exportomer and beyond. *Biochimie Journal*, 98, 16-28.
- Pöggeler, S., Nowrousian, M., Kück, U., 2006. Fruiting-body development in Ascomycetes, p. 325-355. In U. Kües and R. Fischer (ed.), *Growth, differentiation and sexuality*, 2nd ed., vol. I. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Prats, G., 2006. *Microbiología clínica. Médica Panamericana*, Buenos Aires, Argentina. pp 93-99.
- Rhodin, J., 1954. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Tesis doctoral, Karolinska Institutet, Stockholm, Aktiebolaget Godvil, 1.
- Rico-Ramírez, A.M., Roberson, R.W., Riquelme, M., 2018. Imaging the secretory compartments involved in the intracellular traffic of CHS-4, a class IV chitin synthase, in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 117, 30-42.
- Riquelme, M., 2013. Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annual Review of Microbiology*, 67, 587-609.
- Riquelme, M., Roberson, R. W., Sánchez León, E., 2016. Hyphal tip growth in filamentous fungi. En: Esser K. (Ed), *Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer, Cham. pp. 47-66.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki García, S., Braus, G.H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U, Mouriño Pérez, R.R., Takeshita, N., Fischer, R., 2018. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(2), e00068-17.
- Roche, C.M., Loros, J.J., McCluskey, K., Glass, N.L., 2014. *Neurospora crassa*: looking back and looking forward at a model microbe. *American Journal of Botany*, 101(12), 2022-2035.

- Salogiannis, J., Egan, M.J., Reck Peterson, S.L., 2016. Peroxisomes move by hitchhiking on early endosomes using the novel linker protein PxdA. *The Journal of Cell Biology*, 212(3), 289-296.
- Salogiannis, J., Reck Peterson, S.L., 2017. Hitchhiking: A Non-Canonical Mode of Microtubule-Based Transport. *Trends in Cell Biology*, 27(2), 141–150.
- Salogiannis, J., Christensen, J.R., Aguilar Maldonado, A., Shukla, N., Reck Peterson, S.L., 2020. Regulation of peroxisome and lipid droplet hitchhiking by PxdA and the DipA phosphatase. preprint copy – BioRxiv.
- Sambrook, J., Russel D.W., 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Ed. Vol 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schliebs, W., Würtz, C., Kunau, W. H., Veenhuis, M., Rottensteiner, H., 2006. A eukaryote without catalase-containing microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. *Eukaryotic Cell*, 5(9), 1490-1502.
- Schlüter, A., Fourcade, S., Ripp, R., Mandel, J.L., Poch, O., Pujol, A., 2006. The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Molecular Biology and Evolution*, 23(4), 838-845.
- Schneider, R., Brügger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Paltauf, F., 1999. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 146(4), 741-754.
- Schrader, M., Grille, S., Fahimi, H.D., Islinger, M., 2013. Peroxisome interactions and cross-talk with other subcellular compartments in animal cells. *Sub-cellular Biochemistry*, 69, 1–22.
- Seidel, C., Moreno Velásquez, S.D., Riquelme, M., Fischer, R., 2013. *Neurospora crassa* NKIN2, a kinesin-3 motor, transports early endosomes and is required for polarized growth. *Eukaryotic Cell*, 12(7), 1020-1032.
- Shaw, B.D., Chung, D.W., Wang, C.L., Quintanilla, L.A., Upadhyay, S., 2011. A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biology*, 115(6), 541–546.
- Sichting, M., Schell-Steven, A., Prokisch, H., Erdmann, R., Rottensteiner, H., 2003. Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* function together in PTS2-dependent protein import into peroxisomes. *Molecular Biology of the Cell*, 14(2), 810-821.

- Silverman Gavril, R., Silverman Gavril, L., 2008. Septins: new microtubule interacting partners. *The Scientific World Journal*, 8, 611-620.
- Singh, R., Manivannan, S., Krikken, A.M., de Boer, R., Bordin, N., Devos, D.P., van der Klei, I.J., 2020. *Hansenula polymorpha* Pex37 is a peroxisomal membrane protein required for organelle fission and segregation. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 287(9), 1742-1757.
- Smith, J.J., Aitchison, J.D., 2009. Regulation of peroxisome dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(1), 119-126.
- South, S.T., Gould, S.J., 1999. Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *The Journal of Cell Biology*, 144(2), 255-266.
- Staben, C., Yanofsky, C., 1990. *Neurospora crassa* a mating-type region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 4917-4921.
- Steinberg, G., 2014. Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 20, 10-18.
- Suaste Olmos, F., Ziri3n Mart3nez, C., Takano Rojas, H., Peraza-Reyes, L., 2018. Meiotic development initiation in the fungus *Podospora anserina* requires the peroxisome receptor export machinery. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 1865(4), 572-586.
- Sugiura, A., Mattie, S., Prudent, J., McBride, H.M., 2017. Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature*, 542(7640), 251-254.
- Tenney K., Hunt I., Sweigard J., Pounder J.I., McClain C., Bowman E.J., Bowman B.J., 2000. Hex1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 205–217.
- Thines, E., Weber, R.W., Talbot, N.J., 2000. MAP kinase and protein kinase A–dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 12(9), 1703-1718.
- Tsitsigiannis D.I., Keller N.P., 2007. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol*, 15, 109–118.
- van der Zand, A., Braakman, I., Tabak, H.F., 2010. Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, 21(12), 2057-2065.
- Vogel, H.J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genet Bull*, 13, 2-43.

- Voorn Brouwer, T., Kragt, A., Tabak, H.F., Distel, B., 2001. Peroxisomal membrane proteins are properly targeted to peroxisomes in the absence of COPI-and COPII-mediated vesicular transport. *Journal of Cell Science*, 114(11), 2199-2204.
- Walter, T., Erdmann, R., 2019. Current Advances in Protein Import into Peroxisomes. *The Protein Journal*, 38, 351–362.
- Wanders, R.J., Waterham, H.R., 2006. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 295-332.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M.W., Steinberg, G., 2002. A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 21(12), 2946-2957.
- Wei, W., Zhu, W., Cheng, J., Xie, J., Li, B., Jiang, D., Fu, Y., 2013. CmPEX6, a gene involved in peroxisome biogenesis, is essential for parasitism and conidiation by the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3658-3666.
- Westergaard M., K., M.H., 1947. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 34, 573-577.
- Williams C., van den Berg M., Geers E., and Distel B., 2008. Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374, 620–624.
- Xiang, X., Qiu, R., Yao, X., Arst, H.N., Peñalva, M.A., Zhang, J., 2015. Cytoplasmic dynein and early endosome transport. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(17), 3267-3280.
- Zerial, M., McBride, H., 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 107-117.
- Zhang, L., Liu, C., Wang, L., Sun, S., Liu, A., Liang, Y., Dong, H., 2019. FgPEX1 and FgPEX10 are required for the maintenance of Woronin bodies and full virulence of *Fusarium graminearum*. *Current Genetics*, 65(6), 1383-1396.

Anexos 1. Descripción de las peroxinas presentes en *N. crassa*

Tabla 9. Las peroxinas de *N. crassa* y su categoría funcional

No.	Gen	Peroxina	Categoría funcional de la proteína
1	NCU08118	PEX-1	ATPasa AAA peroxisomal, involucrada en la biogénesis del PO y en la importación de proteínas a la matriz.
2	NCU02070	PEX-2	Proteínas ZN RING, involucrada en la importación de proteínas a la matriz del PO y en el reciclaje de receptores.
3	NCU06175	PEX-3	Proteína de anclaje de PEX-19, involucrada en la biogénesis del PO y en el ensamble de membrana peroxisomal.
4	NCU02636	PEX-4	Ubiquitina conjugasa, involucrada en la biogénesis del PO y en la importación de proteína a la matriz.
5	NCU02960	PEX-5	Receptor de importación, se une a la secuencia de orientación PTS1 y forma parte del canal de importación.
6	NCU08373	PEX-6	ATPases AAA peroxisomal, involucrada en la biogénesis del PO y en la importación de proteínas a la matriz.
7	NCU07662	PEX-7	Receptor de importación, se une a la secuencia de orientación PTS2 y forma parte del canal de importación.
8	NCU00032.1	PEX-8	Proteína integral de la membrana, organiza el complejo importómero del PO, se asocia con la biogénesis peroxisomal y se une al receptor PEX-5.
9	NCU03277	PEX-10	Proteínas ZN RING, involucrada en la importación de proteínas a la matriz del PO y en el reciclaje de receptores.
10	NCU04802 EAA31192 EAA28424 EAA33643	Familia PEX-11	Proteínas integrales de la membrana, implicada en la biogénesis, división proliferación del PO y del metabolismo lipídico.
11	NCU05245	PEX-12	Proteínas ZN RING, involucrada en la importación de proteínas a la matriz del PO y en el reciclaje de receptores.
12	NCU02618	PEX-13	Proteína del complejo de anclaje de los receptores de importación, participa en la biogénesis del PO.
13	NCU03901	PEX-14	Proteína del complejo de anclaje de los receptores de importación, participa en la biogénesis del PO.
14	NCU01850	PEX-16	Proteína integral de la membrana, participa en la biogénesis del PO y ensamble de membrana peroxisomal.
15	NCU04301	PEX-19	Chaperona y receptor de importación de PMPs, participa en la biogénesis del PO y ensamble de membrana peroxisomal.
16	NCU04062	PEX-20	Co-receptor de PEX-7, involucrado en la importación de proteínas con PTS2.
17	NCU05564	PEX-23	Proteína integral de la membrana, implicada en la biogénesis, división y proliferación del PO.
18	NCU06637	PEX-24	Proteínas integrales de la membrana, implicada en la biogénesis división y proliferación del PO, importación de proteínas a la matriz y ensamble de membrana peroxisomal.
19	NCU00347	PEX-26	Proteína de la membrana del PO que actúa como anclaje de PEX-1 y PEX-6, así como en el ensamble del PO.
20	NCU01535	PEX-33	Proteína del complejo de anclaje de los receptores de importación, participa en la biogénesis del PO.

La información presentada en esta tabla fue obtenida de la base de datos de POs (PeroxisomaDB 2.0: <http://www.peroxisomedb.org/>), Eckert y Erdmann (2003), Sichting et al. (2003); Klei et al. (2006); Managadze et al. (2010); Liu et al. (2011).

Anexo 2. Medios de cultivo y suplementos

Sales de Vogel 50x 100 mL

Reactivo	Cantidad
Citrato de sodio hidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5.5 \text{H}_2\text{O}$).....	15 g
Fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4).....	25 g
Nitrato de amonio anhidro ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$).....	10 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	1.0 g
Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	0.5 g
Elementos traza.....	500 μL
Biotina (0.1mg/ml).....	250 μL
Agua destilada.....	Aforar a 100 mL
Cloroformo.....	2 mL

Mantener a 4 °C protegido de la luz con papel aluminio

Elementos traza 100 mL

Reactivo	Cantidad
Ácido cítrico hidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....	5.00 g
Sulfato de Zinc heptahidratado($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	5.00 g
Amonio y hierro (II) sulfato hexahidratado [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$].....	1.00 g
Sulfato de cobre hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....	0.25 g
Sulfato de Manganeso hidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....	0.05 g
ácido trioxobórico (III) anhidro (H_3BO_3).....	0.05 g
Molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	0.05 g
Agua destilada.....	Aforara a 100 mL
Cloroformo	1 mL

Mantener a 4 °C protegido de la luz con papel aluminio

Sales del medio sintético de cruz 2x 100 mL

Reactivo	Cantidad
Nitrato de potasio (KNO_3).....	0.50 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4).....	0.35 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	0.50 g
Cloruro de sodio (NaCl).....	0.05 g
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl_2).....	0.05 g
Biotina.....	2.50 mg
Elementos traza.....	50 μL
Agua destilada.....	Aforar a 100 mL
Cloroformo.....	1 mL*

Mantener a 4 °C protegido de la luz con papel aluminio

Solución de recuperación con 2 % de extracto de levadura 50 mL**Reactivos**

50x sales de Vogel

1 mL

Extracto de levadura

1 g

Agua destilada

49 mL

Esterilización por autoclave