

TESIS DEFENDIDA POR  
**CYNTHIA LIZZETH ARAUJO PALOMARES**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. Ernestina Castro Longoria  
*Director del Comité*

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Josué Álvarez Borrego  
*Miembro del Comité*

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez  
*Coordinador del programa en posgrado  
en Ciencias con Orientación en  
Biotecnología Marina*

---

Dr. Edgar Gerardo Pavía López  
*Director de Estudios de Posgrado*

08 de Agosto de 2007.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**LOCALIZACIÓN *IN VIVO* DE LA PROTEÍNA HOMÓLOGA DE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SPA2 MARCADA CON GFP EN *NEUROSPORA*  
*CRASSA***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

CYNTHIA LIZZETH ARAUJO PALOMARES

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2007.

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer primeramente a Dios, por permitir que concluyera esta nueva etapa en mi vida y por todo lo que me has dado en el transcurso de mis años. Esta nueva etapa en mi vida pudo ser posible también gracias a CONACYT, ya que me apoyo económicamente durante dos años y a quien le agradezco porque sin ese apoyo no hubiese existido tal logro. También quiero dar las gracias a los patrocinadores de este trabajo porque este trabajo fue apoyado por el proyecto SEP-CONACYT de Ciencia Básica (CB-2006-1-61524) y a CICESE por la oportunidad dada.*

*Quiero darle las gracias a la Dra. Ernestina por seguir creyendo en mí y por continuar apoyándome... porque esta sería la segunda vez que forma parte de algo importante en mi vida profesional y por haberme impulsado para que ingresara al posgrado.....que prácticamente este es el resultado de ello. Gracias también por seguir influyendo a que me siga preparándome profesionalmente...muchisisisisisimas gracias. Quiero también agradecerle por apoyarme con el artículo del Spk el cual me hizo sufrir bastante ya que llego un momento que lo odie y termine completamente fastidiada, pero al verlo plasmado sentí una satisfacción muy grata y eso me hizo seguir adelante en esta travesía porque casi tiraba la toalla... ya que hubo quienes no creyeron en ese trabajo, así que muchas gracias sinceramente que sin su apoyo no se hubiese logrado.*

*También quiero agradecerle a la Dra. Meritxell por “TODO”, por el apoyo que me brindaste para que se lograra la tesis...con material para todo lo de biología molecular, cepas, la compra de los oligos, etc., realmente muchas gracias. Gracias también por los consejos y asesorías que me brindaste y por ser parte de mi comité de tesis....Gracias por todo el apoyo que brindaste y creer en lo que he realizado y que saliera adelante el artículo del Spk que sin el apoyo tuyo y el de la Dra. Tina no hubiese sido posible.....Mil gracias a las dos.*

*Al Dr. Josué que sin conocernos acepto ser parte de mi comité, a sus comentarios durante los avances del trabajo, que no voy a mentir siempre le tuve miedo....no se si esa es su esencia...pero me asusta, pero aun así mil gracias.*

*A los investigadores del Departamento de Microbiología, la Dra. Rosa, Dra. Rufina y al Dr. Bartnicki por sus aportaciones durante las presentaciones que eso a nosotros como estudiantes nos hace ser mejores y prepararnos mejor...Gracias.*

*A todos los estudiantes del departamento que no los nombro porque si se me olvida alguno pues no se sientan, pero muchas gracias....por los comentarios en los seminarios, compartir momentos agradables durante los festejos de los cumpleaños, por sacar una que otra vez el material de la autoclave, por compartir uno que otro chiste u ocurrencia....gracias. Sin embargo quiero hacer menciones de algunos de los estudiantes que me han ayudado mucho en esta travesía. Quiero agradecer a Eddy por su apoyo durante las clases, el laboratorio porque siempre estabas ahí para sacarme de mi duda y*

*corregirme en mis errores, gracias que dios te bendiga. Alex, este Alex.....que siempre nos apoya, no solo a mí y al resto del grupo sino también a los investigadores que lamentablemente si no encuentran algo... luego, luego lo culpan pero yo te doy las gracias. Don Jorge como te dicen en el Lab. gracias por sacarme siempre de mis dudas tal vez un poco bobas pero al fin son dudas que yo desconozco....gracias. A Olga, porque me ayudo mucho cuando iniciaba en todo lo de Biología Molecular ya que gracias a ti pude plasmar la metodología en el anteproyecto de tesis, por los tips y consejos con respecto a las técnicas, sinceramente muchas gracias. Y no me olvido de ti...Aurora gracias por tus comentarios, consejos brindados, por darme la mano en el lab. ya que hubo momentos en que te lo pedí, muchas gracias. Aunque no eres estudiante si eres un pilar importante dentro del departamento y me refiero a ti Ruth que siempre andas viendo como arreglar, acomodar, etc., todos los asuntos tanto de los investigadores como de nosotros los estudiantes....que sin ti todo sería caos. A los que ya terminaron y se han marchado del departamento Lucky e Iván gracias por compartir momentos gratos durante la estancia en el departamento.*

*A mi familia que no podía faltar (ustedes saben que los menciono al último pero eso no deja de ser que no sean los primeros). Mamí este trabajo es dedicado para ti aunque no estemos juntas.....tu sabes por que.....pero quiero que sepas que todo lo que hago, mi esfuerzo, perseverancia y la lucha del día a día es para ustedes y créeme que no es fácil para mí.... pero que quede claro que es para ustedes..... tal vez no te lo diga pero creo que este es uno de esos momentos aunque eso me haga ser un mal hijo... quiero que cepas que siempre estas presentes en mí, y nunca los dejas... y no los dejas porque hemos luchado mucho para seguir adelante y demostrar que nosotros solitos podemos y callemos bocas.....Mamá heme aquí nuevamente diciéndote lo mucho que los quiero y lo mucho que a ti en particular te quiero y admiro, si esto que he logrado ha sido por esfuerzo y apoyo de muchos que están detrás.....créeme que esto ha sido también porque tú me lo has enseñado y quiero que te sientas orgullosa de ello y sobre todo feliz.....mamí nuevamente te doy las gracias por ser mi pa y mi ma a la vez.....que eso ha sido difícil tanto para ti como para nosotros..... A mis hermanos aunque no seamos los mejores hermanos del mundo creo que no somos los primeros ni los últimos.....así que los quiero mucho “a pesar que siempre estemos como perros y gatos...verdad” pero creo que esa es la esencia de los hermanos y que eso nos hará siempre recordarnos, así que los quiero aunque no se los diga, ni ustedes me lo digan.....pero así somos que vamos hacer.....*

*Por último a la persona más maravillosa y especial de este mundo, aunque muchos sepan a quien me refiero.....lo siento pero no podía faltar pase lo que pase. Pero quiero agradecerte por ser tan noble, paciente, amable, atento y cuidarme en los momentos difíciles que se muy bien que para ti también lo fue y tú sabes muy bien a que me refiero....”pese a que te quedaste dormido....jejejeje”, por eso es que estoy muy agradecida contigo como no tienes idea y sabes algo.....nunca sabría como pagártelo, es por ello que gracias por estar siempre ahí conmigo en las buenas y en las malas de forma incondicional. Se también que muchas de las veces te desespero y te he desesperado siempre.... aunque no me lo digas.... pero lo entiendo con solo un mínimo gesto y con eso me lo dices todo “recuerda...son cuatro años de conocernos y me atrevo a decirte que te*

conozco muy bien”, pero quiero que sepas que siempre te llevo conmigo y eso me hace amarte como no tienes idea, también se que muchas veces....mejor dicho siempre de las veces no te digo nada....”y te molesta” pero es porque simplemente no se como hacerlo y creo que eso en ninguna escuela te lo enseña mas que la vida, así que te pido una disculpa. Este trabajo y así como se lo dedico a mi familia también te lo dedico a ti porque formas parte de mi familia pese aquella ocasión “que lo sentiste como si no lo fueras” ...pero ya eres parte de ella, así que ahora solo depende de ti....también te lo dedico porque alguna vez te dije que no la iba a ser, pero siempre confiaste en mí y me comentaste “que todo saldría bien” ...pues bien aquí está la prueba de lo dicho y eso lo debo a ti porque cuando flaqueaba y desvanecía me levantabas por eso quiero que te sientas orgulloso de mí y de ti porque ha sido esfuerzo tuyo también.....,sabes secretamente yo también te admiro y me siento orgullosa de ti, porque tienes una forma muy diferente de ver el mundo, de querer y expresarte, tal ves eso nos hace estar juntos y nos haga superar las adversidades.....Te amo mi chiquinrrinrito, y eso no se lo digo al Lucas- peiquito, si no a ti amor.

**RESUMEN** de la tesis de **Cynthia Lizzeth Araujo Palomares**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Agosto de 2007.

**LOCALIZACIÓN *IN VIVO* DE LA PROTEÍNA HOMÓLOGA DE  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE SPA2 MARCADA CON GFP EN NEUROSPORA  
CRASSA**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Ernestina Castro Longoria  
*Director de Tesis*

*Neurospora crassa* es un hongo ascomiceto filamentoso que presenta un crecimiento polarizado o apical, un proceso fundamental para la formación de las unidades de crecimiento vegetativo o hifas. En los sitios de crecimiento apical se acumulan y coordinan múltiples complejos proteicos para asegurar que los componentes celulares se incorporen a la membrana plasmática para ir formando una nueva pared celular y así mantener un crecimiento polarizado. Uno de estos complejos proteicos es el polarisoma el cual está constituido por las proteínas Spa2p, Pea2p, Bud6p, Aip3p y Bni1p en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo en hongos filamentosos aún se desconocen en su totalidad los componentes del polarisoma. En este trabajo se marcó con la proteína fluorescente verde (GFP) la proteína homóloga Spa2 y mediante microscopía confocal se determinó su localización *in vivo* en el hongo filamentoso *N. crassa*. Se examinaron las células fúngicas desde la germinación hasta la formación de hifas maduras. Spa2-GFP se encontró localizada en los ápices celulares de germínulas en la etapa de elongación del tubo germinativo y en las hifas maduras. Se encontró que Spa2 no interviene en la formación de septos y se sugiere que se encuentra involucrada en la formación de ramificaciones laterales. Mediante el uso del colorante vital FM4-64 se observó que Spa2 colocaliza con el cuerpo apical o Spitzenkörper (Spk) tanto en germínulas como en las hifas maduras del hongo. Primeramente ocurre la acumulación de Spa2 en el ápice de las germínulas y conforme el tubo germinativo se elonga Spa2 aumenta su concentración de manera gradual, posteriormente aparece el Spk. Una vez que ambos colocalizan en el ápice celular la localización de Spa2-GFP y del Spk-FM4-64 es exactamente la misma. Esto sugiere fuertemente que el polarisoma es uno de los componentes necesarios para el ensamblaje del Spk y el crecimiento polarizado en *N. crassa*.

**Palabras clave:** Spa2, GFP, *Neurospora crassa*, Spitzenkörper, germínulas, crecimiento polarizado, FM4-64.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Cynthia Lizzeth Araujo Palomares** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México. August, 2007.

***IN VIVO LOCALIZATION OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE SPA2p  
HOMOLOGUE LABELED WITH GFP IN NEUROSPORA CRASSA***

*Neurospora crassa* is a filamentous fungus that presents apical or polarized growth, a fundamental process for the formation of vegetative units or hyphae. At sites of apical growth, multiple protein complexes assemble to ensure that cellular components get incorporated in to the plasma membrane for building new cell wall and maintain a polarized growth. One of this protein complexes is the polarisome, which in *Saccharomyces cerevisiae* contains Spa2p, Pea2p, Bud6p, Aip3p and Bni1p. In filamentous fungi there are few studies about the components of the polarisome. In this work, the *N. crassa* homologue protein Spa2 was labeled with the green fluorescent protein (GFP) and its localization was determined *in vivo* by laser scanning confocal microscopy in *N. crassa* growing hyphae. Cells were analyzed from the germination phase until mature hyphae were formed. Spa2-GFP was present at the cellular apex in germlings in the elongation phase and in mature hyphae. Also it was found that Spa2 is not required for septum formation, but it is involved in lateral branching formation. By using the vital dye FM4-64 it was observed that Spa2 colocalizes with the apical body or Spitzenkörper (Spk) at the tips of germlings and mature hyphae. Spa2 accumulates at the apex of the germlings and as the germ tube elongates, the concentration of Spa2 increases gradually, subsequently the Spk appears. From this point on, both Spa2-GFP and Spk-FM4-64 continued to colocalize in the cell apex. The evidence presented here strongly suggests that the polarisome is one of the early components needed for Spk assembly and polarized growth in *N. crassa*.

**Keywords:** Spa2, GFP, *Neurospora crassa*, Spitzenkörper, germlings, polarized growth, FM4-64.

## CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
<i>II.1 Crecimiento y desarrollo de hongos filamentosos.....</i>	7
<i>II.2 Descripción del polarisoma.....</i>	8
<i>II.3 El polarisoma en germínulas de hongos filamentosos.....</i>	11
<i>II.4 Descripción general del Spitzenkörper.....</i>	11
<i>II.5 Comportamiento del Spitzenkörper.....</i>	13
<i>II.6 Relación del Spitzenkörper con el Centro Suministrador de Vesículas.....</i>	14
<i>II.7 Ultraestructura del Spitzenkörper.....</i>	15
<i>II.8 El Spitzenkörper en germínulas de hongos filamentosos.....</i>	16
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>IV. HIPÓTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>20</b>
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>20</b>
<b>VII. METODOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
<i>VII.1 Organismos.....</i>	21
<i>VII.2 Medios de cultivo para hongos.....</i>	21
<i>VII.3 Medios de cultivo para bacterias.....</i>	22
<i>VII.4 Uso del colorante FM4-64.....</i>	23
<i>VII.5 Análisis bioinformático.....</i>	23
<i>VII.6 Diseño de oligonucleótidos.....</i>	24
<i>VII.7 Extracción de DNA genómico de Neurospora crassa.....</i>	25
<i>VII.8 Amplificación del gen spa2 en Neurospora crassa.....</i>	26
<i>VII.9 Fusión del gen spa2 de Neurospora crassa con el gen de la gfp.....</i>	28
<i>VII.10 Transformación en Escherichia coli.....</i>	30
<i>VII.11 Monitoreo de las clonas transformantes.....</i>	31
<i>VII.12 Secuenciación.....</i>	32
<i>VII.13 Transformación en Neurospora crassa.....</i>	33
<i>VII.14 Recuperación de transformantes de Neurospora crassa.....</i>	34
<i>VII.15 Cruza y determinación del tipo de apareamiento de la cepa transformada de Neurospora crassa spa2::gfp.....</i>	35
<i>VII.16 Comprobación de la integración de spa2 y de la gfp en el genoma de Neurospora crassa.....</i>	36



## CONTENIDO (continuación)

	Página
VII.17 Crecimiento de la cepa con <i>spa2::gfp</i> y recuperación de esporas....	37
VII.18 Microscopía confocal.....	38
VII.19 Determinación de la tasa de crecimiento de <i>Neurospora crassa</i> .....	40
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
VIII.1 Caracterización molecular de <i>spa2</i> en <i>Neurospora crassa</i> .....	41
VIII.2 Amplificación del gen <i>spa2</i> en <i>Neurospora crassa</i> .....	41
VIII.3 Análisis de restricción.....	44
VIII.4 Transformación en <i>Escherichia coli</i> por choque térmico.....	45
VIII.5 Secuenciación.....	48
VIII.6 Transformación por electroporación en conidias de <i>Neurospora crassa</i> .....	49
VIII.7 Comprobación de integración de <i>spa2::gfp</i> en el genoma de <i>Neurospora crassa</i> .....	50
VIII.8 Distribución intracelular de Spa2-GFP en germínulas de <i>Neurospora crassa</i> .....	52
VIII.9 Distribución intracelular de Spa2-GFP en hifas maduras de <i>Neurospora crassa</i> .....	54
VIII.10 Comportamiento y colocalización de Spa2-GFP con el Spitzenkörper en <i>Neurospora crassa</i> .....	55
VIII.11 Colocalización de Spa2-GFP con el Spitzenkörper utilizando FM4-64 en germínulas de <i>Neurospora crassa</i> .....	58
VIII.12 Colocalización de Spa2-GFP con el Spitzenkörper utilizando FM4-64 en hifas maduras de <i>Neurospora crassa</i> .....	60
VIII.13 Localización de Spa2-GFP durante la formación de ramificaciones laterales.....	63
VIII.14 Relación de Spa2-GFP con FM4-64 en la formación de septos en hifas maduras de <i>Neurospora crassa</i> .....	71
VIII.15 Determinación de la tasa de crecimiento de <i>Neurospora crassa</i> ....	73
<b>IX. DISCUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>82</b>
<b>XII. APÉNDICE A.....</b>	<b>94</b>
XII.1. Solución de sales de Vogel.....	94
XII.2. Solución de elementos traza.....	95
XII.3. Solución de biotina.....	95

## CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
<b>XIII. APÉNDICE B.....</b>	<b>96</b>
<i>XIII.1. Solución de sales para cruza 2X.....</i>	<i>96</i>
<b>XIV. APÉNDICE C.....</b>	<b>97</b>
<i>XIV.1. Solución FGS 10X.....</i>	<i>97</i>
<b>XV. GLOSARIO.....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i> . El ciclo asexual inicia con la formación de macroconidias a partir de hifas aéreas, las macroconidias germinan hasta formar un nuevo micelio. El ciclo sexual se origina con la formación de un protoperitecio el cual su tricógina es fertilizado por un espermacio que más tarde dará lugar a la formación de una asca, conteniendo ascosporas las cuales son liberadas al medio hasta formar una colonia micelial (Modificado de Davis, 2000).....	3
2	Representación esquemática de los complejos proteicos con sus componentes más importantes que permiten un crecimiento polarizado en células fúngicas. (a) Polarisoma, (b) complejo Arp2/3, (c) exocisto (Modificado de Virag y Harris, 2006a).....	5
3	Representación esquemática del vector de clonación pMF272 de 8,479 pb (Freitag <i>et al.</i> , 2004). Este vector de clonación muestra la ubicación del gen que codifica para la $\beta$ -lactamasa, el promotor <i>ccg-1</i> , el sitio de clonación múltiple, el gen de la proteína verde fluorescente <i>sgfp</i> , y el gen que codifica para proteína <i>his-3</i> .....	30
4	Representación esquemática de la técnica de bloque invertido (Modificado de Hickey <i>et al.</i> , 2004).....	38
5	Detección de los productos de PCR del ensayo de gradiente para el gen <i>spa2</i> . (carril 1) DNA del fago lambda ( $\lambda$ ) digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> utilizado como marcador de peso molecular, (carril 2) 57.0°C, (carril 3) 56.7°C, (carril 4) 56.1°C, (carril 5) 55.1°C, (carril 6) 53.8°C, (carril 7) 53.0°C, (carril 8) 52.4°C, (carril 9) 52.0°C. La flecha indica el fragmento correspondiente al gen de <i>spa2</i> .....	42
6	Detección del producto de PCR de alta fidelidad para el gen <i>spa2</i> . Gel de agarosa al 1%. (carril 1) Marcador de peso molecular del fago lambda en pares de bases (pb), (carril 2) gen de <i>N. crassa spa2</i> .....	43

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
7	Análisis de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para el vector de clonación pMF272 y para el gen <i>spa2</i> . (carril 1) Marcador de peso molecular del fago lambda (21,226–564pb), (carril 2) pMF272 digerido con <i>XbaI</i> y <i>PacI</i> , (carril 3) Producto de PCR ( <i>spa2</i> ) digerido con <i>XbaI</i> y <i>PacI</i> .....	44
8	Resultado de PCR de colonia. ( $\lambda$ ) DNA del fago lambda digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> utilizado como marcador de peso molecular, (carriles 1,2,8) productos de PCR inespecíficos, (carriles 3,5,10,12,13,14) no hubo amplificación, (carriles 4,6,7,9,11) clonas positivas. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	45
9	Resultado del análisis de restricción con las enzimas <i>XbaI</i> y <i>PacI</i> . ( $\lambda$ ) DNA del fago lambda digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> utilizado como marcador de peso molecular, (carriles 1-5) clonas que muestran la digestión de la integración del gen <i>spa2</i> en el vector pMF272.....	46
10	Representación esquemática del mapa genético del plásmido pCLAP6 de 11,126pb. La flecha rosa indica la región de la $\beta$ -lactamasa, la flecha azul corresponde a la región 3' <i>his-3</i> , la flecha roja corresponde al promotor <i>cgg-1</i> , la flecha amarilla señala la integración del gen <i>spa2</i> , la flecha verde muestra la región de la proteína verde fluorescente <i>sgfp</i> y la flecha lila a la región 5' $\Delta$ - <i>his-3</i> , así mismo alguno de los sitios de restricción.....	47
11	Análisis comparativo de la proteína Spa2 en <i>N. crassa</i> . La flecha señala el cambio del aminoácido alanina (A) por el aminoácido valina (V).. .....	48
12	Colonias de <i>N. crassa</i> transformadas por electroporación. El recuadro negro es un aumento de algunas de las colonias obtenidas por electroporación observándose las colonias blancas y de tamaño pequeño. ....	49

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
13	Comprobación de integración de <i>spa2::gfp</i> en el genoma de <i>N. crassa</i> mediante PCR. (carril 1) DNA del fago lambda digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> utilizado como marcador de peso molecular, (carril 2) región flanqueante río abajo del vector de clonación pMF272 ( <i>sgfp/His-3</i> ), (carril 3) región flanqueante río arriba del vector de clonación pMF272 ( <i>His-3/ccg-I</i> ), (carril 4) subunidad pequeña ribosomal 18S. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	51
14	Distribución de la proteína Spa2 marcada con GFP en germinulas de <i>N. crassa</i> en diferentes estadios de desarrollo. (a,c,e,g,i) imágenes obtenidas por canal de fluorescencia de diferentes germinulas de <i>N. crassa</i> , (b,d,f,h,j) imágenes obtenidas por el canal de luz transmitida por contraste de fase. Las flechas indican la localización de Spa2-GFP en el ápice celular de las germinulas. Escala, 5 $\mu$ m.....	52
15	Distribución intracelular de la proteína Spa2 marcada con GFP en una hifa madura de <i>N. crassa</i> . Imágenes obtenidas por microscopía confocal, (a) canal de fluorescencia, (b) canal de luz transmitida por contraste de fases, (c) imagen sobrepuesta del canal a y b. La cabeza de flecha indica la localización de la proteína Spa2-GFP y la flecha indica la posición del Spk. Escala, 10 $\mu$ m.....	54
16	Comportamiento del Spk y de la proteína Spa2-GFP en hifas maduras de <i>N. crassa</i> . (a-d) Canal de fluorescencia, (i-l) contraste de fases, (q-t) traslape del canal de fluorescencia y contraste de fases. Flecha blanca señala a la proteína Spa2-GFP, flecha negra al Spk. Tiempo en min:seg. Escala, 10 $\mu$ m.....	56

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
16	(Continuación). Comportamiento del Spk y de la proteína Spa2-GFP en hifas maduras de <i>N. crassa</i> . (e-h) Canal de fluorescencia, (m-p) contraste de fases, (u-x) traslape del canal de fluorescencia y contraste de fases. Flecha blanca señala a la proteína Spa2-GFP, flecha negra al Spk. Tiempo en min:seg. Escala, 10 $\mu$ m.....	57
17	Colocalización de Spa2-GFP y el Spk usando FM4-64 en germinulas de <i>N. crassa</i> . (a,e) FM4-64, (b,f) Spa2 marcada con GFP, (c,g) contraste de fases, (d,h) superposición de FM4-64, Spa2-GFP y contraste de fases. Las flechas señalan al Spk teñido con FM4-64, las cabezas de flechas indican la proteína Spa2 marcada con GFP. Escala, 5 $\mu$ m.....	59
18	Colocalización de Spa2-GFP y del Spk utilizando FM4-64 en hifas maduras de <i>N. crassa</i> . (a) Spk teñido con FM4-64, (b) Spa2 marcada con GFP, (c) contraste de fases, (d) superposición de a, b y c. La flecha blanca señala al Spk marcado con FM4-64, la cabeza de flecha indica a la proteína Spa2-GFP y la flecha negra señala al Spk por contraste de fases. Escala, 10 $\mu$ m.....	60
19	Colocalización de Spa2-GFP con el Spk utilizando FM4-64 en hifas maduras de <i>N. crassa</i> . (a-e) Spk teñido con FM4-64, (b-f) proteína Spa2 marcada con GFP, (c-g) contraste de fases, (d-h) imágenes superpuestas del canal de fluorescencia, (e-h) ampliación de la región apical de las imágenes del panel superior. La flecha blanca indica la posición del Spk marcado con FM4-64, las flechas negras la posición del Spk por contraste de fases y las cabezas de flechas la región central del Spk "Core"; núcleos señalados con asteriscos. Escala, 10 $\mu$ m.....	62
20	Formación de ramificaciones laterales en <i>N. crassa</i> . (a,b,c) Hifa teñida con FM4-64, (d,e,f) Spa2 marcada con GFP, (g,h,i) canales simultáneos de fluorescencia donde se muestra la colocalización del Spk y Spa2 en amarillo, (j,k,l) contraste de fases. Flechas blancas señalan al Spk marcado con FM4-64, flechas negras Spa2-GFP y cabezas de flecha blancas inicio de una ramificación lateral. Tiempo en min:seg. Escala, 20 $\mu$ m.....	64

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
20	(continuación). Formación de ramificaciones laterales en <i>N. crassa</i> . (m,n,o) Hifa teñida con FM4-64, (p,q,r) Spa2 marcada con GFP, (s,t,u) canales simultáneos de fluorescencia donde se muestra la colocalización del Spk y Spa2 en amarillo, (v,w,x) contraste de fases. Flechas blancas señalan al Spk marcado con FM4-64 (m) y colocalización de Spk-Spa2 (t,u), flechas negras Spa2-GFP (p), cabezas de flecha blancas inicio de una ramificación lateral (m,s), cabeza de flechas negras Spa2 (q,r). Tiempo en min:seg. Escala, 20 $\mu\text{m}$ .....	65
21	Amplificación de la imagen 20e donde se muestra el inicio de una ramificación lateral en <i>N. crassa</i> . Flecha blanca señala a la proteína Spa2-GFP en el ápice celular, flechas negras indican una acumulación de Spa2, recuadro blanco es una amplificación de la región apical donde la flecha negra muestra una pequeña acumulación de Spa2-GFP. Tiempo en min:seg. Escala, 20 $\mu\text{m}$ ..	66
22	Colocalización de Spa2-GFP y FM4-64 en la formación de ramificaciones en <i>N. crassa</i> . (a,b,f) Spk teñido con FM4-64, (c,g) proteína Spa2 marcada con GFP, (d,h) imágenes sobrepuestas de los canales de fluorescencia, (e,i) contraste de fases. Las flechas blancas señalan la localización del Spk con FM4-64; flechas negras, la localización de Spa2-GFP; círculo punteado, un pequeño acumulo de Spa2; cabeza de flecha blanca, un Spk en el inicio de la formación de una ramificación lateral; recuadro blanco, acercamiento de la región apical; cabeza de flecha negra, al Spk por contraste de fases. Tiempo en min:seg. Escala, 10 $\mu\text{m}$ .....	68
23	Localización de Spa2 en el sitio de ramificación lateral en el hongo <i>N. crassa</i> . Imágenes por canal de fluorescencia, flechas blancas señalan una ramificación lateral con acumulación de Spa2 y flecha negra indica la acumulación de Spa2 en el ápice celular de la hifa principal. Tiempo en min:seg. Escala 10, $\mu\text{m}$ .....	70

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
24	Serie de tiempo de una hifa madura de <i>N. crassa</i> por canales simultáneos de fluorescencia. Cabeza de flecha blanca (a) indica la colocalización de Spa2-GFP con FM4-64, cabezas de flechas negras (d-f) ramificaciones laterales, flechas blancas (g,i) el inicio de la formación de septos, flechas negras (l) los septos completos. Tiempo en min:seg. Escala, 20 $\mu$ m.....	72
25	Tasa de elongación de <i>N. crassa</i> . (A) Cepa 9717, (B) cepa 988, (C) cepa NCLAP-2. (■) media, (□) error estándar, (I) intervalo de confianza al 95%.....	73



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Cepas de <i>Neurospora crassa</i> usadas y generadas para este estudio.....	21
II	Oligonucleótidos utilizados en este estudio. Las enzimas de restricción están señalados en negritas y el codón de inicio de la transcripción se encuentra subrayado.....	25
III	Vectores de clonación usados y generados en este estudio.....	28
IV	Número de hifas analizadas de cada cepa de <i>N. crassa</i> .....	40

## ABREVIATURAS

La terminología científica dentro de las áreas de la biología molecular y la biología celular se han desarrollado en el idioma inglés y la traducción de la misma es difícil. Por lo tanto, en este trabajo se utilizaron abreviaciones en Inglés. A continuación se definen y/o traducen algunas de las abreviaciones utilizadas.

Aip3	Actin-interacting protein
ApE	A plasmid Editor
Arp2/3	Actin-Related Proteins 2 y 3
AVI	Audio/Video Interleave
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bni1	Bud neck involved
Bud6	BUD site selection
Cdc24	Cell division cycle 2
Cdc42	Cell division cycle
CSV	Centro Suministrador de Vesículas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
FGS	Aditivo preparado con fructosa, glucosa y sorbosa
FM4-64	N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-dietilamino)fenil)hexatrienil)piridinio dibromuro
GFP	Proteína verde fluorescente
HiFi	Alta fidelidad (High Fidelity)
LSM	Microscopio de escaneo con láser
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
Mkk1	Mitogen-activated protein kinase-kinase
Mkk2	Mitogen-activated kinase-kinase
MMV	Medio Mínimo de Vogel

MSC	Medio Sintético para Cruzas
NCBI	Nacional Center of Biotechnology Institute
OD	Densidad óptica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pea2	PEAnut shmoo mutant
SHD	Stands for Spa2p Homology Domain
Spa2	Spindle pole antigen 2
Spk	Spitzenkörper
Ste11	STERile
Ste7	STERile
TAE	Amortiguador Tris-acetato EDTA
TIFF	Tagged Image File Format
Tm	Temperatura de alineamiento
$\lambda$	Bacteriofago lamda

## I. INTRODUCCIÓN

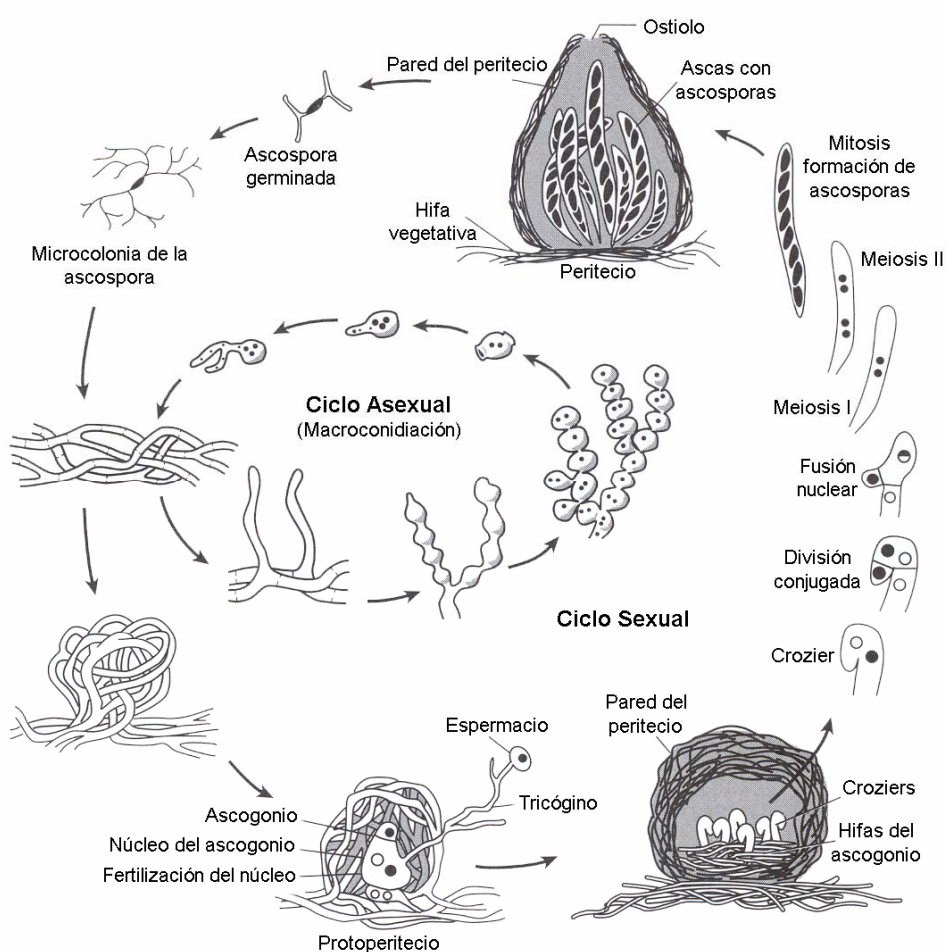
Los hongos son organismos eucarióticos que tienen un gran impacto en nuestra sociedad por ser considerados como los principales devastadores de plantas económicamente importantes en la agricultura (Agrios, 1997), debido a que anualmente se pierden más de un billón de dólares de cultivo (Wainright, 1992). En el área médica se ha visto un aumento en el número de pacientes con enfermedades provocadas por estos organismos (Walsh *et al.*, 2004). Pero su importancia no solo radica en su naturaleza perjudicial, sino que también un gran número de estos organismos son benéficos para el humano, puesto que sirven como alimento o bien para producir metabolitos secundarios que son utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica (Deacon, 1990).

Dentro de los hongos filamentosos, *Neurospora crassa* presenta características que lo hacen muy atractivo como organismo ideal para la experimentación (Deacon, 1990). *N. crassa* ha tenido gran auge dentro de las áreas de Genética, Bioquímica y Biología Celular y Molecular (Davis, 2000; Davis y Perkins, 2002), debido a que presenta propiedades que son ventajosas para su estudio. Este organismo crece en un medio relativamente simple, se cultiva fácilmente en el laboratorio y completa su ciclo de vida en un corto período de tiempo (Deacon, 1990).

El ciclo de vida de *N. crassa* comprende una fase sexual y una fase asexual (Figura 1) (Davis, 2000). Durante la fase sexual, la reproducción se realiza por medio de cepas sexualmente compatibles, ocurre por medio de la fusión de sus hifas vegetativas, comúnmente denominadas A y a, o por contacto gametangial de una espora masculina, denominada espermacio, con una hifa femenina llamada tricógina, dentro de un órgano

sexual femenino de nombre ascogonio (Deacon, 1990). En cambio, durante la fase asexual de *N. crassa* se producen tres tipos de esporas asexuales, macroconidias, microconidias y arthroconidias, las cuales son liberadas al medio y al germinar se desarrolla una nueva colonia con la subsecuente producción de esporas (Davis, 2000).

Las macroconidias son multinucleadas y se producen en forma de cadenas sobre conidióforos ramificados en hifas aéreas (Alexopoulos, 1977); en contraste, las microconidias son uninucleadas y son producidas solo en las hifas vegetativas como una sola espora (Davis, 2000) y las arthroconidias son multinucleadas y son producidas por septación holotalica y por desarticulación de las hifas (Maheshwari, 1991). La germinación de una espora, en condiciones adecuadas para el crecimiento, inicia por la fase de hidratación y la subsecuente extensión de un tubo germinativo (Trinci, 1971; Trinci, 1984). El tubo germinativo, se desarrolla mediante un crecimiento apical polarizado (Grove, 1978; Prosser y Trinci, 1979; Howard, 1981; Trinci, 1984), el cual es una característica fundamental que define a estos organismos (Virag y Harris, 2006) para formar una hifa, la cual continúa creciendo por extensión apical (Howard, 1981) y la formación de ramificaciones, que más adelante dará la forma de un micelio típico (Prosser y Trinci, 1979).

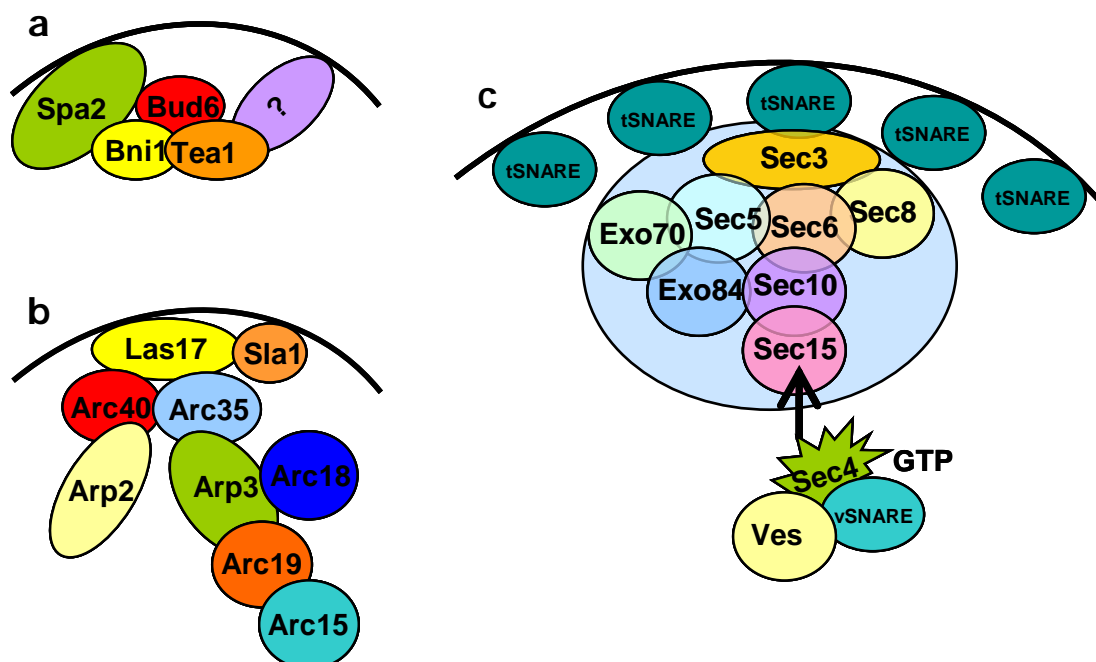


**Figura 1.** Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. El ciclo asexual inicia con la formación de macroconidias a partir de hifas aéreas, las macroconidias germinan hasta formar un nuevo micelio. El ciclo sexual se origina con la formación de un protoperitecio el cual su tricógina es fertilizado por un espermacio que más tarde dará lugar a la formación de una asca, conteniendo ascosporas las cuales son liberadas al medio hasta formar una colonia micelial (Modificado de Davis, 2000).

El crecimiento polarizado es un proceso que se da en una región discreta de las células, el cual es fundamental en el desarrollo de los hongos (Virag y Harris, 2006). Tanto los organismos unicelulares como pluricelulares utilizan mecanismos conservados para

generar la polaridad (Nelson, 2003), así que a través de los reinos, los organismos han evolucionado para formar células individuales que seleccionan un sitio de polarización que tiene como objetivo formar células alargadas y tubulares (Virag y Harris, 2006a). Algunos ejemplos de células con crecimiento polarizado son: neuronas en animales (Andersen y Bi, 2000), tubos de polen y raíces en plantas vasculares (Hepler *et al.*, 2001), rizoides en algas (Kropf, 1992) e hifas en hongos filamentosos (Heath, 1990; Gow, 1995).

En hongos, el crecimiento polarizado está dado por proteínas y por componentes selectos (Sheu y Snyder, 2001; Wiggin *et al.*, 2005) que mantienen la organización y el tráfico de organelos hacia los sitios de polarización en las células. Uno de los componentes selectos que mantienen la polarización en levaduras es el polarisoma (Figura 2a), que contiene las proteínas Spa2, Pea2 y Bud6/Aip3 que interactúan con Bni1 (Sheu *et al.*, 1998). El polarisoma controla la nucleación de la actina para el transporte de vesículas exocíticas. Otro componente selecto involucrado en el crecimiento polarizado es el complejo Arp2/3 (Figura 2b), el cual nuclea a los filamentos de actina para formar una red cortical de actina involucrada en la endocitosis; y el exocisto (Figura 2c), la cual es requerido para la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática (Virag y Harris, 2006) en las áreas de crecimiento activo. Algunos de los componentes de este complejo proteico como Spa2 y Bud6, han sido estudiadas en hongos filamentosos como *Ashbya gossypii* y *Aspergillus nidulans* y se ha determinado que se encuentran localizadas en el ápice de tubos germinativos e hifas maduras (Knechtle *et al.*, 2003; Virag y Harris, 2006a,b). La posición de Spa2 y Bud6 coincide de manera espacial y temporal con el Spk, un cuerpo apical que coincide con los componentes relacionados con el polarisoma en hifas maduras de *A. nidulans* (Virag y Harris, 2006a,b).



**Figura 2.** Representación esquemática de los complejos proteicos con sus componentes más importantes que permiten un crecimiento polarizado en células fúngicas. (a) Polarisoma, (b) complejo Arp2/3, (c) exocisto (Modificado de Virag y Harris, 2006a).

En germínulas de *N. crassa* Araujo-Palomares *et al.*, (2007) reportan que el Spk se encuentra presente en los ápices de los tubos germinativos cuando las células alcanzan una longitud y un grado de organización intracelular apropiada. En dicho trabajo se reporta que en estadios tempranos de desarrollo del hongo no es posible visualizar al Spk por medio de contraste de fases, pero es posible observar la expresión de un crecimiento polarizado, sugiriendo que probablemente exista una transición entre la expresión de ciertas proteínas o vesículas secretoras en etapas tempranas del desarrollo del hongo y la aparición del Spk durante el proceso de germinación. Por lo tanto en este trabajo se pretende determinar si la



proteína Spa2 componente del polarisoma se expresa en los estadios tempranos de desarrollo de *N. crassa*.

El estudio detallado de los componentes que intervienen en el proceso de polarización nos permitirá contribuir al conocimiento sobre la morfogénesis y el desarrollo de los hongos filamentosos. Mediante este estudio se espera encontrar una acumulación de la proteína Spa2 en la zona apical de las células del hongo filamentoso *N. crassa*. Por otro lado la acumulación de la proteína Spa2 en los ápices celulares de los estadios tempranos de la germinación nos permitirá elucidar uno de los componentes del polarisoma en *N. crassa*.

## II. ANTECEDENTES

### *II.1 Crecimiento y desarrollo de hongos filamentosos*

El crecimiento de hongos filamentosos inicia por la germinación de esporas. El proceso de germinación implica una fase de hinchamiento (Ekundayo y Carlile, 1964; Fletcher, 1969; Gull y Trinci, 1971), denominada por Bartnicki-García (1981) como fase de crecimiento esférico. Durante este período Van Etten *et al.*, (1977) señalaron que las esporas incrementan en biomasa así como en volumen. Esta fase usualmente dura un par de horas e inmediatamente después inicia el crecimiento de un tubo germinativo.

Seiler y Plamann (2003) realizaron un estudio sobre las bases genéticas de la morfología celular en el hongo filamentoso *N. crassa* utilizando esporas de diferentes mutantes de este hongo e incluyeron la cepa silvestre como control. Encontraron que al transferir las esporas de *N. crassa* tipo silvestre a un medio de cultivo apropiado, estas se hidrataban y comenzaban con un crecimiento isotrópico con una duración de aproximadamente 2 horas. Transcurrido este tiempo el crecimiento comienza a polarizarse y se genera un ápice; a este proceso se le conoce como emergencia del tubo germinativo (Schmit y Brody, 1976) y ocurre a las 3 horas (Seiler y Palman, 2003). Posteriormente, el crecimiento polarizado resulta continuo en extensión unidireccional, por lo que Schmit y Brody (1976) lo denominaron como elongación del tubo germinativo y ocurre de acuerdo con Seiler y Plamann (2003) a las 5 horas. Este proceso de crecimiento se convierte en un crecimiento altamente polarizado (Grove, 1978; Prosser y Trinci, 1979; Howard, 1981 y Trinci, 1984). Durante el proceso de polarización, el tubo germinativo se extiende apicalmente hasta convertirse en una hifa. Durante la etapa de extensión apical se van incorporando componentes a la membrana plasmática para formar una nueva pared

celular en el ápice (Gooday, 1995). Cuando el flujo de vesículas secretadas dentro del segmento apical de la hifa excede la proporción máxima de absorción de vesículas que puede absorber el ápice de la hifa empieza el proceso de ramificación para dar lugar a la formación del micelio (Katz *et al.*, 1972; Prosser y Trinci, 1979; Watters y Griffiths, 2001).

## ***II.2 Descripción del polarisoma***

Los componentes del polarisoma fueron identificados en la levadura *S. cerevisiae*, como un complejo multiproteico 12S que contiene las proteínas Spa2, Pea2 y Bud6/Aip3 que interactúan con Bni1 (Sheu *et al.*, 1998).

Spa2, es una proteína asociada a los cuerpos polares (Snyder, 1989), sin embargo se ha reportado que también interactúa con numerosas proteínas incluyendo las del polarisoma (Bni1, Bud6/Aip3 y Pea2), proteínas involucradas en la ruta de las cinasas (Ste11, Ste7, Mkk1, Mkk2 y Slr2; Sheu *et al.*, 1998; Van Drogen y Meter, 2002) y proteínas que interactúan con la actina (Myo2, Myo1 y Pan1; Shih *et al.*, 2005).

En levaduras, Spa2 es una proteína grande de 1,466 aminoácidos con diferentes dominios que son llamados SHD-I al V (Gehring y Snyder, 1990; Roemer, *et al.*, 1998), en estos organismos se ha descrito que la función de Spa2 es promover un crecimiento polarizado (Sheu *et al.*, 1998). En el hongo *Ashbya gossypii*, la proteína homóloga de Spa2 fue denominada AgSpa2p; dicha proteína presenta una longitud de 3,392 aminoácidos con cuatro dominios denominados SHD Ia, Ib, II y V, que son comunes a los dominios encontrados para Spa2 en *S. cerevisiae* y en *Candida albicans* (Roemer *et al.*, 1998). Knechtle *et al.*, (2003) sugieren que AgSpa2p en *A. gossypii* tiene varias funciones: 1) organizar la incorporación de vesículas secretoras en las puntas de las hifas, 2) es requerida

para un crecimiento radial de la colonia, y 3) está relacionada con la formación de septos por la ubicación transitoria de AgSpa2p en los sitios donde ocurre la formación de los septos. En *A. nidulans* el gen homólogo a *spa2* fue denominada *spaA*. *spaA* consta de 2,840 nucleótidos y contiene tres exones y dos intrones. El gen *spaA* codifica a una proteína de 906 aminoácidos con un peso molecular de 101.24 kDa (Virag y Harris, 2006b). Se ha determinado que la secuencia de *spaA* muestra cinco dominios conservados en los hongos: *N. crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Gibberella zeae*, *Ustilago maydis*, y *Cryptococcus neoformans*. Virag y Harris (2006b) determinaron que la función de SpaA en *A. nidulans* parece estar limitada sólo y exclusivamente a los eventos de polarización en los ápices de las hifas.

En levaduras, Pea2 es una proteína de 420 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 48.2 kDa (Valtz y Herskowitz, 1996). Pea2 se encuentra concentrada en las puntas de las yemas. Pea2 junto con Spa2 contribuyen a una polarización celular apropiada durante la formación de dichas yemas y el apareamiento, sugiriendo así que Pea2 y Spa2 forman un complejo. Este complejo es encargado de generar la polaridad de las células durante dos fases del ciclo celular de las levaduras, proponiendo diferentes modelos de la función del complejo Pea2/Spa2: primero, el complejo puede funcionar para restringir el área inicial donde ocurrirá la polarización; segundo, Pea2 y Spa2 pueden funcionar en la organización de la actina hacia el sitio donde se iniciará la polarización; tercero, tienen la posibilidad de que estas proteínas funcionen para mantener un sitio de polarización donde nuevas proteínas y nuevo material citoplasmático se fusiona a la pared celular (Valtz y Herskowitz, 1996).

El complejo Bud6/Aip3, fue identificado como un complejo que interactúa con la actina (Amberg *et al.*, 1995). Bud6 es una proteína pequeña de 788 aminoácidos que en levaduras se ha visto que interactúa recíprocamente con la actina, también participa en la selección de un sitio para la emergencia de una nueva yema, en la migración nuclear, en la citocinesis y en la morfogénesis celular (Amberg *et al.*, 1997). Evidencia genética sugiere que Bud6 tiene un papel importante en la polaridad celular y en la organización de los filamentos de actina (Amberg *et al.*, 1997; Glynn *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2002a). En el hongo filamentoso *A. nidulans*, el gen homólogo a *bud6* fue denominado *budA*; este gen contiene 3013 nucleótidos, contiene dos exones y un intrón, se traduce a una proteína de 981 aminoácidos con un peso molecular de 107.54 kDa y se sugiere que tiene un papel importante en la formación de septos (Virag y Harris, 2006b). Por otro lado Aip3, es una proteína de 788 aminoácidos, presenta un peso molecular aproximado de 89 kDa y en levaduras forma un anillo entre la célula madre y la célula hija formando un septo para después dar origen a la separación de las células (Amberg *et al.*, 1997).

Bni1, es una proteína tipo formina que presenta múltiples dominios que controlan el ensamble de los filamentos de actina (Evangelista *et al.*, 2003; Sagot *et al.*, 2002a; Sagot *et al.*, 2002b), y al unirse con otros componentes del polarisoma transfiere una señal al complejo Cdc42 (Evangelista *et al.*, 1997), el cual es requerido para el proceso de polarización.

### ***II.3 El polarisoma en germínulas de hongos filamentosos***

Muy pocos son los análisis que se han llevado a cabo para estudiar la función del polarisoma en germínulas de hongos filamentosos, de los cuales *A. nidulans* han sido el organismo modelo. En germínulas de *A. nidulans spaA* se encuentra presente dentro del ápice celular de los tubos germinativos (Virag y Harris, 2006b). En las germínulas de *Aspergillus* se ha determinado que la proteína SpaA a diferencia de Spa2 en *S. cerevisiae* no es requerida para llevar a cabo procesos de septación. También se determinó que Spa2 no es requerida para la localización de la proteína SepA (septina requerida para la formación de septos en *A. nidulans*) en los ápices de las células. Para definir la funcionalidad de AgSpa2 en *A. gossypii*, Knechtle *et al.*, (2003) realizaron un estudio detallado a partir de espora hasta la formación de la colonia del hongo, reportando que el crecimiento de *A. gossypii* inicia con una fase de crecimiento isotrópico seguido por la generación de un pequeño tubo germinativo, donde el crecimiento polarizado es presente, generando un tubo germinal, el cual se desarrolla de manera unipolar. Subsecuentemente un tubo germinal secundario emerge, generando así una germínula bipolar, después ramificaciones laterales se van desarrollando para formar un micelio joven. Durante todo el proceso de desarrollo del tubo germinal AgSpa2 se mantuvo presente dentro de los ápices celulares del hongo, sugiriendo que AgSpa2 es una proteína requerida para un rápido crecimiento radial de la colonia (Knechtle, *et al.*, 2003).

### ***II.4 Descripción general del Spitzenkörper***

El *Spitzenkörper* (Spk) o cuerpo apical, es una estructura dinámica que al ser observada bajo contraste de fases aparece como un cuerpo oscuro. El Spk fue descrito por

primera vez en 1924 por Herman Brunswik en hifas fijadas y teñidas con hierro-hematoxilina de *Coprinus sterquilinus* y *C. narcoticus* (Brunswik, 1924). Brunswik describió al Spk como un cuerpo de tamaño variable que aparece y desaparece de la parte apical de la hifa, también observó que el Spk estaba relacionado de alguna manera con el crecimiento de la hifa. En 1957, Girbardt describió al Spk en hifas vivas de *Polystictus versicolor* como un complejo de fase oscura, concluyendo que esta estructura estaba relacionada con el crecimiento apical, debido a que cuando el crecimiento de las hifas se detenía el Spk desaparecía y después que el crecimiento continuaba el Spk reaparecía. Girbardt, concluyó que el Spk tenía la capacidad de controlar la dirección de crecimiento de la hifa. Esta estructura puede ser observada en las puntas de las hifas de hongos verdaderos como los ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos.

Usando microscopía de contraste de fases y video-microscopía López-Franco y Bracker (1996) realizaron un estudio completo acerca de la diversidad morfológica del Spk en una gran variedad de hongos filamentosos maduros de los distintos grupos de ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos. En dicho trabajo, alrededor de 32 hongos fueron analizados, encontrando una diversidad morfológica de Spk. López-Franco y Bracker (1996) agruparon esta diversidad morfológica en 9 tipos de Spk, tomando en cuenta la apariencia del Spk por microscopía de contraste de fases y la organización subapical de los distintos hongos. De los diferentes Spk analizados, el noveno se describió previamente en 1993 por Vargas *et al.*, en *Allomyces macrogynus*.

El Spk en *N. crassa* fue descrito por López-Franco y Bracker (1996) como un agregado de vesículas denso y oscuro rodeado de otra nube de vesículas menos densa con una región central denominada “core” en inglés.

### ***II.5 Comportamiento del Spitzenkörper***

En hifas maduras, se ha demostrado que existe una relación entre el comportamiento y la posición del Spk así como en la trayectoria y dirección de crecimiento de las hifas. Experimentos hechos por Bracker *et al.*, (1997) apoyan la hipótesis de que el patrón de crecimiento apical es dirigido por la posición del Spk, debido a que realizaron una manipulación de la estructura con la ayuda de un láser, produciendo cambios en la dirección de crecimiento en hifas así como la producción de otras alteraciones morfológicas. Observaciones realizadas por Riquelme *et al.*, (1998) demostraron que la posición del Spk afecta la dirección y el crecimiento de las hifas causando cambios dramáticos en la morfología.

Riquelme *et al.*, (2000) señalan que en la cepa silvestre de *N. crassa* el Spk produjo movimientos dominantes, acompañado de frecuentes oscilaciones transversales, mientras que en hifas con morfologías alteradas como las “*ropy*” (cepa de *N. crassa* con mutación en el gen que codifica para la subunidad mayor de la dinactina, el cual es requerido para el transporte eficiente de vesículas a lo largo de los microtúbulos), el Spk mostró una trayectoria errática; en ambos casos, la trayectoria del cuerpo apical mostró una tendencia sobre el eje longitudinal de las células.

Otros estudios, proporcionan evidencia en la relación citoesqueleto-Spk, sugiriendo que el citoesqueleto probablemente puede propulsar y controlar el movimiento del Spk. Observaciones realizadas con respecto a contracciones citoplasmáticas por Reynaga-Peña y Bartnicki-García (1997) sugieren que el citoesqueleto participa en la dinámica del Spk. Howard y Aist (1977) mostraron que después de un tratamiento anti-tubulina, el Spk de *F. acuminatum* desaparecía. Grove y Swigard (1981); Roberson y Vargas (1994) y Srinivasan



*et al.*, (1996) demostraron que una interrupción en los microtúbulos o en los filamentos de actina, causa la desaparición y aparición del Spk en *Rhizoctonia solani* y *A. macrogynus*. McDaniel y Roberson (2000) sugieren que en *A. macrogynus*, el Spk funciona como un centro organizador de microtúbulos (MTOC). Mouriño-Pérez *et al.*, (2006) encontraron nucleación de los microtúbulos marcados con la proteína verde fluorescente en los ápices de hifas maduras de *N. crassa* sugiriendo que existe una relación cercana del Spk y los microtúbulos, reforzando así la idea de que el Spk funciona como un MTOC.

Estudios basados con el uso del benomilo y citocalasina proponen que los microtúbulos del citoesqueleto estuvieron directamente implicados en mantener la trayectoria del Spk (Riquelme *et al.*, 1998). Observaciones con dineína en mutantes “*roppy*” argumentan que los microtúbulos del citoesqueleto desempeñan un papel importante en la formación y comportamiento del Spk (Riquelme *et al.*, 2000). Un caso similar fue el de Wu *et al.*, (1998) donde muestran que la cinesina fue esencial para el posicionamiento normal del Spk en hifas de *Nectria haematococca*. Riquelme *et al.*, (2000) concluyeron que la asociación de microtúbulos a proteínas motoras, es esencial para mantener una alta velocidad de crecimiento, un Spk constante y una forma casi perfecta de la hifa.

## ***II.6 Relación del Spitzenkörper con el Centro Suministrador de Vesículas***

Existen diferentes modelos que explican la relación entre los componentes de regulación y los componentes del Spk durante la morfogénesis de las hifas. De acuerdo a Bartnicki-García *et al.*, (1989) el Spk es considerado como un centro de distribución de

vesículas citoplasmáticas para la construcción de la pared celular, además de contribuir en la morfogénesis de hongos.

Utilizando diferentes técnicas como la video-microscopía y el análisis de imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), Bartnicki-García *et al.*, (1989) crearon un modelo matemático computarizado basado en uno de los componentes principales del Spk, las vesículas apicales. Mediante este modelo cibernético se siguió el comportamiento del Spk durante el crecimiento de células vivas de *Fusarium acuminatum*, así como la posición del Spk en células fijas de *P. versicolor*; *Pythium aphanidermatum* y *Armillaria mellea*. Utilizando este modelo, se determinó que el Centro Suministrador de Vesículas CSV por sus siglas en inglés correspondía a la posición del Spk tanto en hifas vivas como en hifas fijas debido a la notable coincidencia entre el CSV y el Spk. Bartnicki-García (2002) concluye que la morfología de los hongos filamentosos está determinada por la interacción entre el movimiento del Spk y por la cantidad de vesículas que provienen del Spk para la construcción de la pared celular.

### ***II.7 Ultraestructura del Spitzenkörper***

La composición estructural del Spk fue descrita por primera vez en *A. niger*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* por McClure *et al.*, (1968) quienes encontraron que el complejo de fase oscura observado mediante microscopía óptica correspondió a una densa acumulación de vesículas cuando fue examinado bajo microscopía electrónica; también observaron que cerca de la región ocupada por el Spk había la presencia de mitocondrias y grupos de ribosomas. Posteriormente en 1969, Girbardt reportó que el Spk de diferentes especies fúngicas incluyendo a *N. crassa*, contiene vesículas apicales, microvesículas y

ribosomas. Subsecuentemente un estudio realizado por Grove y Bracker en 1970 corrobora la presencia de vesículas, microvesículas y ribosomas, en el Spk de hongos septados. Grove y Bracker (1970) hacen referencia que en el Spk aparece una pequeña zona especializada dentro del conglomerado de vesículas el cual contiene microvesículas, microtúbulos y algunos ribosomas. Esta zona según Grove y Bracker se encontraba rodeada por vesículas y carece de un límite o de una membrana. Once años más tarde, Howard en 1981 señaló que la ultraestructura del Spk de *F. acuminatum* incluye un conglomerado de vesículas apicales, ribosomas y microvesículas dentro de una red de microfilamentos y confirma el trabajo de Grove y Bracker (1970) de una región especializada dentro del conglomerado de vesículas. Por otro lado, en un estudio realizado por McDaniel y Roberson (2000) en *A. macrogynus*, encontraron otro componente celular por medio de inmunolocalización y el cual forma parte de la región central del Spk, la  $\gamma$ -tubulina.

### ***II.8 El Spitzenkörper en germínulas de hongos filamentosos***

El estudio del Spk en germínulas de hongos filamentosos es escaso y en dichos estudios pocos son los que reportan la longitud total de las germínulas. Caesar-Ton *et al.*, (1987) verificaron la presencia de vesículas en germínulas de *N. crassa* y de *Uromyces phaseoli* por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), reportando que en las germínulas de *N. crassa* en la región distal de 2 a 3  $\mu\text{m}$  del domo apical se encontraba un fuerte agregado de vesículas, justo donde se forma el Spk. En germínulas de *Uromyces vignae* y *Puccinia graminis* teñidas con FM4-64 y observadas con microscopía confocal de escaneo con láser, Dijksterhuis (2003) describe algunas características del Spk y reporta que estos son diferentes a los Spk descritos por López-Franco y Bracker (1996), ya que

carecen de una región central. Hoch y Staples (1983) utilizando MET y Kwon *et al.*, (1991) por otro lado usando microscopía de contraste de fases, microscopía confocal y MET reportan que en tubos germinativos de *Uromyces appendiculatus*, tampoco se ha observado dicha región central en el Spk. Fisher-Parton *et al.*, (2000) reportaron que con el uso del FM4-64 es posible observar la región central en el Spk en las hifas maduras de *N. crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma viridae*, *Botrytis cinerea*, y *Rhizoctonia solani*. Sin embargo Peñalva (2005) reportó que en germinulas de *A. nidulans* de aproximadamente 22  $\mu\text{m}$  de longitud y teñidas con FM4-64 no se observó una región central en el Spk. Por medio de microscopía de contraste de fases Araujo-Palomares *et al.*, (2007) reportaron que en el Spk de germinulas de *N. crassa* tampoco se observa una región central, proponiendo que esto puede deberse a que en estadios tempranos de desarrollo algunos de los componentes celulares, tales como microvesículas, microtúbulos y ribosomas, no alcanzan aún una densidad crítica para que la región central sea visualizada. Dentro del ápice del tubo germinativo de algunos hongos patógenos como *Cochliobolus sativus*, *U. vignae*, *U. appendiculatus*, *M. grisea* y *P. graminis*, la localización del Spk es asimétrica (Bourett y Howard, 1989; Clay *et al.*, 1994) y en *U. vignae* y *P. graminis* el comportamiento del Spk se ha reportado altamente dinámico durante tiempos cortos mientras se desarrollaba el tubo germinativo (Dijksterhuis, 2003). Araujo-Palomares *et al.*, (2007) realizaron un trabajo donde por primera vez se describen detalles citológicos de la organización apical y la ontogenia del Spk en germinulas de *N. crassa*. Por medio de microscopía de contraste de fases, sólo es posible visualizar un Spk dentro del ápice de los tubos germinativos en germinulas de una longitud mayor a 150  $\mu\text{m}$ . Estos autores señalan, que el Spk se observó como un cuerpo de color gris claro, al cual se le denominó como Spk inmaduro, indicando

que este hecho es debido a la baja concentración de los componentes del Spk. Por otra parte, el Spk inmaduro mostraba movimientos altamente irregulares causando cambios en la dirección de crecimiento. Así mismo, en dicho trabajo se reporta que en germínulas con longitudes menores a las 150  $\mu\text{m}$ , no se detecta un Spk, discutiendo que en estadios tempranos de la germinación de *N. crassa* el crecimiento polarizado es lento y desorganizado.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los hongos filamentosos tienen un gran impacto en nuestra sociedad, es por ello que en la actualidad el estudio de los mecanismos moleculares que dan origen a su morfogénesis se ha intensificado. Los hongos filamentosos son organismos que presentan un crecimiento polarizado, el cual se inicia desde el proceso de germinación de las esporas y está regulado por proteínas que conforman el polarisoma y por proteínas asociadas. Sin embargo, son pocos los estudios que se enfocan a la caracterización detallada de proteínas presentes en el polarisoma en hongos filamentosos. Se cree que el polarisoma organiza la incorporación de vesículas secretoras en la punta de las hifas de algunas especies de hongos filamentosos. En *N. crassa* no hay estudios sobre la función o localización de Spa2. En este estudio utilizando una fusión de la proteína Spa2 con la GFP y microscopía confocal se determinará si Spa2 se expresa en los estadios tempranos de desarrollo de *N. crassa* contribuyendo a un mejor conocimiento sobre los procesos que dan origen a la morfogénesis de los hongos filamentosos.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La proteína Spa2, constituyente del polarisoma, se localiza en los ápices celulares desde los estadios tempranos de la germinación en *N. crassa*.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la localización intracelular de la proteína Spa2 en los diferentes estadios de germinación en *N. crassa*.

#### **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Marcar molecularmente el gen de la proteína Spa2 de *N. crassa* con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP).
2. Determinar mediante microscopía confocal la distribución intracelular de la proteína Spa2 marcada con GFP en los diferentes estadios de germinación e hifas maduras de *N. crassa*.
3. Determinar si la distribución de la proteína Spa2 colocaliza con la posición del Spk de *N. crassa*.

## VII. METODOLOGÍA

### VII.1 Organismos

Las cepas fúngicas utilizadas para este trabajo se encuentran en la tabla I.

**Tabla I.** Cepas de *Neurospora crassa* usadas y generadas para este estudio.

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
6525	<i>mat a wt his-3</i>	*FGSC
988	<i>mat a wt</i>	*FGSC
4347	<i>mat a fluffy</i>	*FGSC
4317	<i>mat A fluffy</i>	*FGSC
9717	<i>mat A his-3 Δ mus-51::bar+</i>	*FGSC
NCLAP5-1	<i>mat A ΔspaNc::gfp t005</i>	En este estudio
NCLAP-2	<i>mat a ΔspaNc ::gfp</i>	En este estudio

\*Fungal Genetics Stock Center

Así mismo se utilizaron como células competentes la cepa *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen®).

### VII.2 Medios de cultivo para hongos

Todas las cepas utilizadas fueron mantenidas en medio mínimo de Vogel (MMV), el cual contiene sales de Vogel 1X (Apéndice A), sacarosa 2% (w/v) y agua destilada/desionizada (Vogel, 1956) solidificado con agar (DIFCO) al 1.5%. El medio se esterilizó en autoclave y una vez frío se le adicionó L-histidina (Calbiochem) cuando se requería. La L-Histidina es un aminoácido básico que permite crecer a las cepas 9717 y 6525 auxótrofas. Antes de añadirlo al medio de cultivo se esterilizó por filtración utilizando filtros con membrana de Polietersulfona con poros de 0.2μm (Whatman®) y se utilizó a una concentración final de 25mg mL<sup>-1</sup>.



Para la extracción de DNA se utilizaron las cepas 988 y NCLAP-2 las cuales se cultivaron en MMV líquido.

Se utilizó medio sintético para cruza (MSC) (Westergaard y Mitchell, 1947) que contiene sales para cruza 2X (Apéndice B), sacarosa al 2% (w/v), agar al 2% y agua destilada/desionizada para inducir a la reproducción sexual y así determinar el tipo de apareamiento (mat) de la cepa transformante. El MSC se utilizó también para aislar ascosporas para obtener homocariontes de la cepa transformada de *N. crassa*.

Para cultivar la cepa transformada de *N. crassa* se utilizó medio FGS (Fructosa, glucosa y Sorbosa) que contiene sales de Vogel 2X, agar al 1% y aditivo FGS 10X (Apéndice C). El aditivo FGS se preparó con sorbosa al 20%, fructosa al 0.5% y glucosa al 0.5%. Todos los componentes del aditivo FGS fueron esterilizados por filtración utilizando filtros de membrana de celulosa-acetato con poro de 0.45 $\mu$ m (PRO-X™).

### ***VII.3 Medios de cultivo para bacterias***

Para el crecimiento de bacterias se utilizó medio líquido y sólido utilizando medio Luria-Bertani (LB). El medio LB se preparó con triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5%, cloruro de sodio (NaCl) al 1%, ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup> y agua destilada/desionizada. Para la preparación de LB-sólido, se utilizó como agente solidificante agar bacteriológico al 1.5 % (Becton Dickinson, Co). Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (VWR® Accu Sterilizar AS12) a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión. La ampicilina se utilizó para seleccionar las cepas bacterianas transformadas, se esterilizó por medio de filtrado utilizando filtros de membrana de

Polietersulfona de poros de 0.2  $\mu\text{m}$  (Whatman<sup>®</sup>), posteriormente se añadió a sus respectivos medios ya esterilizados.

#### ***VII.4 Uso del colorante FM4-64***

El uso del colorante FM4-64 (Molecular probes, Invitrogen<sup>®</sup>) o N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-dietilamino)fenil)hexatrienil)piridio dibromuro, ha sido una herramienta clave en estudios con células *in vivo* que ha permitido en el campo de la biología celular analizar en detalle procesos tales como la endocitosis y el tráfico de vesículas secretoras. El FM4-64, es un colorante vital que se ha utilizado para teñir a un grupo de vesículas que se encuentran en el ápice celular donde se localiza el Spk. La solución stock de este colorante se preparó a una concentración de 0.25 mM en dimetilsulfóxido 100% (DMSO) y se usó a una concentración de trabajo de 25  $\mu\text{M}$ . Como agente diluyente se utilizó MMV líquido.

#### ***VII.5 Análisis bioinformático***

Para la búsqueda de la proteína homóloga Spa2 en *N. crassa* se tomó como referencia el gen descrito por Virag y Harris, (2006b) para *A. nidulans spaA* tomando el número de acceso AN3815.2. Este número de acceso se buscó en la página del NCBI (National Center of Biotechnology Institute) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se tomó la secuencia nucleotídica para realizar un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la página del EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk>) para buscar el gen homólogo en el genoma de *N. crassa*.

### ***VII.6 Diseño de oligonucleótidos***

Para el diseño de los oligonucleótidos, los cuales se utilizaron para la amplificación del gen *spa2* se tomó el marco de lectura abierto incluyendo la región promotora y la región río abajo del gen *spa2* de *N. crassa*. Primeramente, se localizó el codón ATG (codón de inicio de la transcripción) a partir del cual se diseñó el oligonucleótido sentido. Posteriormente se buscó el codón de paro (TAA, TAG o TGA). Este codón no se tuvo en cuenta pero se diseñó el oligonucleótido antisentido río arriba a partir del codón de paro. Para el caso del oligonucleótido sentido se utilizaron 16 nucleótidos incluyendo el codón de inicio, se introdujo la secuencia de la enzima de restricción *XbaI* (5'-TCT AGA-3') más 3 nucleótidos para hacer eficiente la enzima. Para el caso del oligonucleótido antisentido se utilizaron 17 bases de la secuencia final del gen sin incluir la secuencia de paro, también se añadió la secuencia de la enzima de restricción *PacI* (5'-TTA ATT AA-3') más 2 nucleótidos para la eficiencia de la enzima. Las secuencias de oligonucleótidos se analizaron con el programa FastPCR<sup>®</sup> versión 3.8.30 para identificar la formación de dímeros o estructuras secundarias y para obtener las temperaturas de fusión para cada oligonucleótido. De esta forma al momento de realizar la amplificación mediante este análisis se optimizó la amplificación del gen *spa2*. Las enzimas de restricción nos permitieron generar extremos cohesivos para poder introducir la secuencia del gen *spa2* al vector que contiene el gen de la *gfp*. Se utilizó el Software DNASTAR<sup>®</sup> versión 32.3.97 para verificar que la secuencia a clonar quedará dentro del sitio de clonación múltiple y se encontrará en fase con la secuencia del vector de clonación pMF272. El Software DNASTAR<sup>®</sup> se utilizó para verificar si en la secuencia de oligonucleótidos existían codones de paro o codones que perjudicarán la clonación y así evitar problemas durante la

traducción. En la tabla II, se encuentran enlistados los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

**Tabla II.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio. Las enzimas de restricción están señalados en negritas y el codón de inicio de la transcripción se encuentra subrayado.

Nombre	Secuencia 5'-3'	*T <sub>m</sub> (°C)		Referencia
		NaCl		
Spa2-Xba-F <sup>a</sup>	TGCTCTAGAATGATTGTTTCGCAATG	55.8		En este estudio
Spa2-Pac-R <sup>a</sup>	CCTTAATTAATGCAA AGTCATCAGCGC	57.0		En este estudio
pMF272F <sup>b</sup>	CAAATCAACACAACACTCAAACCA	54.5		Riquelme <i>et al.</i> , 2007
pMF272-R-2 <sup>b</sup>	AGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG	62.0		Riquelme <i>et al.</i> , 2007
MRp10F <sup>c</sup>	AGAGACAAGAAAATTACCCCTTCTT	62.0		Riquelme <i>et al.</i> , 2007
MRp11R <sup>c</sup>	AACTACAACAGCCACAACGTCTATATC	61.0		Riquelme <i>et al.</i> , 2007
MRp12F <sup>d</sup>	ATAATGAACGGAAGGTAGTTGTAGAAAG	61.0		Riquelme <i>et al.</i> , 2007
MRp13R <sup>d</sup>	ATGGATATAATGTGGCTGTTGAAAG	60.0		Riquelme <i>et al.</i> , 2007
RDS-478F <sup>e</sup>	GTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTA	51.5		Greene <i>et al.</i> , 2000
RDS-482R <sup>e</sup>	TAGCGCGCGTGC GGCCCA	69.6		Greene <i>et al.</i> , 2000

\*Temperatura de alineamiento.

<sup>a</sup>Amplifican 2,667 pb del gen *spa2*.

<sup>b</sup>Amplifican las áreas flanqueantes de la región río arriba y río abajo del sitio de clonación múltiple del vector de clonación pMF272.

<sup>c</sup>Amplifican 3,200 pb de la región flanqueante río abajo del vector de clonación pMF272 (*sgfp/His-3*).

<sup>d</sup>Amplifican 2,100 pb de la región flanqueante río arriba del vector de clonación pMF272 (*His-3/ccg-1*).

<sup>e</sup>Amplifican 600 pb de rDNA que codifica la subunidad pequeña 18S del ribosoma en hongos.

### VII.7 Extracción de DNA genómico de *Neurospora crassa*

Para la extracción de DNA genómico, se utilizó *N. crassa* cepa 988, la cual se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 25 mL de medio MMV líquido por 3 a 5 días a 28°C en completa oscuridad y así evitar la formación de conidias. El cultivo se filtró por medio de tela sintética tipo “Magitel” estéril para eliminar la presencia de líquido. Posteriormente se realizaron lavados con agua destilada/desionizada estéril para

eliminar la presencia de MMV. El micelio se secó utilizando papel filtro de 125 mm de diámetro (Whatman®) estéril y se guardó en un ultracongelador (Nuair®) a una temperatura de -86°C hasta su uso. Antes de la extracción de DNA el micelio se homogenizó en un mortero con nitrógeno líquido hasta que quedó completamente pulverizado. La extracción de DNA genómico de *N. crassa* se realizó utilizando el protocolo descrito por el fabricante del kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit (50) de QIAGEN.

### ***VII.8 Amplificación del gen spa2 en Neurospora crassa***

El DNA genómico que se obtuvo se utilizó como cadena patrón para realizar la amplificación del gen mediante la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados previamente. Para verificar la funcionalidad de los oligonucleótidos diseñados se realizó un PCR para un ensayo de gradiente. En este ensayo se amplificó la reacción de gradiente utilizando 8 alícuotas (una por cada una de las ocho temperaturas del gradiente utilizado) de un volumen final de 5 µL. En cada alícuota se mezclaron 11.85 µL de agua destilada/desionizada estéril, 1.5 µL de amortiguador *Taq* 10X (Termo Pol de BioLabs, New England), 0.6 µL de desoxinucleótidos (dNTP's) (adenina, timina, citosina, guanina) 2.5mM (BioRad® 10mM X 200µL), 0.3 µL de DNA genómico, 0.3 µL de oligonucleótido sentido 10µM, 0.3 µL de oligonucleótido antisentido 10µM y 0.15 µL de *Taq* DNA polimerasa (BioRad®, 5u•µL) con capacidad de amplificación de 2kb min<sup>-1</sup>. La amplificación de la reacción de gradiente se llevó a cabo en un termociclador (iCycler™, BioRad®) bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de una fase de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una fase de

alineamiento en cada temperatura del gradiente utilizado (57.0, 56.7, 56.1, 55.1, 53.8, 53.0, 52.4 y 52.0°C) por 30 segundos y una fase de extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos. Luego de completarse los 25 ciclos se programó una extensión final de 5 minutos a 72°C y finalmente la reacción se mantuvo a una temperatura de 4°C.

Los productos de PCR se mezclaron con un amortiguador de carga Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1% de agarosa grado analítico, Promega® y bromuro de etidio 0.1 µg mL<sup>-1</sup>, Invitrogen®) y se compararon con un marcador de peso molecular de DNA lambda *EcoRI* + *HindIII* (Promega®). El gel de agarosa se introdujo a una cámara electroforética (Mini-Sub, Cell GT, BioRad®) conteniendo amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM). Se aplicó un voltaje de 75 Volts por 35 minutos.

Una vez identificada la temperatura a la cual los oligonucleótidos funcionaban adecuadamente se realizó una segunda reacción de PCR de alta fidelidad para obtener los fragmentos requeridos para la clonación. El volumen total de la reacción de PCR de alta fidelidad fue de 50 µL utilizando 38.3 µL de agua destilada/desionizada estéril, 5 µL de amortiguador HiFi 10X (High Fidelity, Invitrogen®), 2 µL de dNTP's 2.5mM (BioRad®, 10mM X 200 µL), 1.5 µL de MgSO<sub>4</sub> 50mM (Invitrogen®), 1 µL de DNA genómico, 1 µL de oligonucleótido sentido 10µM, 1 µL de oligonucleótido antisentido 10µM y 0.2 µL de *Taq* DNA polimerasa de alta fidelidad (Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen®) con capacidad de amplificación de 1kb min<sup>-1</sup>. Los parámetros aplicados para realizar la amplificación de la reacción incluyeron lo siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de una fase de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una fase de alineamiento a 55°C por 30 segundos, y una fase de extensión a 72°C

por 1 minuto y 30 segundos. Una vez terminados los 25 ciclos, se programó una extensión final a 72°C por 5 minutos y finalmente la reacción se mantuvo a una temperatura de 4°C. Al producto de esta reacción se le realizó un análisis electroforético en un gel de agarosa al 1% para llevar a cabo la identificación del gen de interés. Posteriormente se realizó una incisión en el gel de agarosa para recuperar y purificar dicho fragmento. Para la purificación se utilizó y se siguió el protocolo descrito por el kit comercial QIAquick® Gel Extraction kit (50) de QIAGEN.

### ***VII.9 Fusión del gen *spa2* de *Neurospora crassa* con el gen de la *gfp****

Para la fusión del gen *spa2* con el gen de la *gfp* se utilizó el plásmido referido en la tabla III (figura 3), el cual contiene el gen que codifica para la *gfp* además de contar con un sitio recombinante con la secuencia que codifica para el gen de la histidina, necesaria para la cepa 9717. De tal forma que al existir recombinación genética se corrige la mutación de la cepa 9717 permitiéndole así sintetizar histidina sin necesidad de consumirla del medio, de ésta manera podemos dirigir la integración del vector con *spa2* y la secuencia de la *gfp* en el genoma de *N. crassa*.

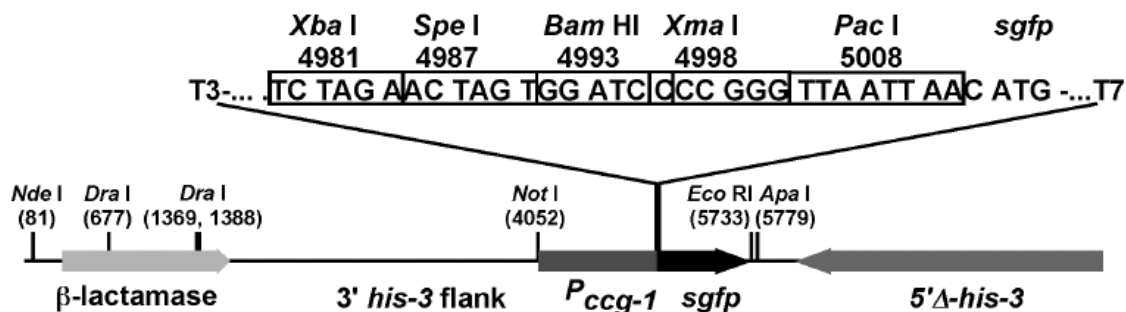
**Tabla III.** Vectores de clonación usados y generados en este estudio.

<b>Plásmido</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
pMF272	<i>Pccg-1::sgfp</i> <sup>+</sup>	Freitag <i>et al.</i> , 2004
pCLAP6	<i>Pccg-1::spa2::sgfp</i> <sup>+</sup>	En este estudio

Antes de realizar la fusión del gen *spa2* de *N. crassa* con el gen de la *gfp*, se digirió el vector pMF272 y el gen *spa2*. Para ello se utilizó un volumen final de 20 µL para cada

reacción. Para el vector pMF272 se preparó: 12  $\mu\text{L}$  de agua destilada/desionizada estéril, 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador NEB No.2 10X (BioLabs, NewEngland), 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador BSA 10X (BioLabs, New England), 3  $\mu\text{L}$  de vector pMF272 y 0.5  $\mu\text{L}$  de enzimas *XbaI* y *PacI* 10  $\mu\text{M}$  respectivamente. En cambio para *spa2* se preparó: 15 $\mu\text{L}$  de DNA Spa2, 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador NEB No.2 10X (BioLabs, NewEngland), 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador BSA 10X (BioLabs, New England) y 0.5  $\mu\text{L}$  de enzimas *XbaI* y *PacI* 10  $\mu\text{M}$  respectivamente. Ambas digestiones se incubaron a una temperatura de 37°C por 4 horas. Transcurrido ese tiempo, la digestión de *spa2* se resguardo a una temperatura de -20°C, mientras que la digestión de pMF272 se inactivó a 65°C por 20 minutos, después se añadió 1  $\mu\text{L}$  de fosfatasa alcalina de camarón (500u Promega®) incubándose a 37°C por 1 hora, finalizando con una inactivación de 65°C por 20 minutos. Las enzimas *XbaI* y *PacI* se utilizaron para que el fragmento del gen *spa2* entrara en fase con el vector de clonación al momento de realizar la ligación. Una vez finalizadas ambas restricciones, se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1% para recuperar los fragmentos correspondientes utilizando el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (50) de QIAGEN. Una vez recuperados ambos fragmentos se preparó una reacción de ligación conteniendo 4  $\mu\text{L}$  de agua destilada/desionizada estéril, 3  $\mu\text{L}$  de inserto *spa2*, 1  $\mu\text{L}$  de vector pMF272, 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador ligasa 2X (BioLabs, New England), 1  $\mu\text{L}$  de DNA T4 ligasa (100u, Promega®) y se incubó a 4°C durante toda la noche para posteriormente transformar en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .





**Figura 3.** Representación esquemática del vector de clonación pMF272 de 8,479 pb (Freitag *et al.*, 2004). Este vector de clonación muestra la ubicación del gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa, el promotor *ccg-1*, el sitio de clonación múltiple, el gen de la proteína verde fluorescente *sgfp*, y el gen que codifica para proteína *his-3*.

### VII.10 Transformación en *Escherichia coli*

Para producir células competentes se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , la cual se trató con una solución de CaCl<sub>2</sub> 50 mM (Sambrook *et al.*, 2001). Las suspensiones bacterianas fueron distribuidas en alícuotas de 100  $\mu$ L e incubadas en hielo por una hora. Estas células competentes fueron transformadas con 5  $\mu$ L de reacción de ligación. La mezcla de transformación se incubó en hielo por 30 minutos y se sometió a choque térmico a 37°C por 7 minutos. Se agregó un volumen de 900  $\mu$ L de medio LB en caldo a la reacción de transformación y se incubó a 37°C por una hora en agitación constante de 200 rpm (Environ Shaker, Modelo 3527). La mezcla de la reacción fue esparcida en placas de medio LB agar que contenían 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de ampicilina y se incubaron a 37°C por 24 horas.

### ***VII.11 Monitoreo de las clonas transformantes***

Después de la transformación, a las colonias de *E. coli* obtenidas en las placas de LB agar más ampicilina se les realizó un PCR de colonia con la finalidad de identificar las clonas transformantes. Para el PCR de colonia se tomaron 14 colonias completamente aisladas, tomando directamente de cada colonia una muestra con un palillo estéril y resuspendiendo cada una de las muestras en reacciones de PCR de un volumen de 15  $\mu\text{L}$  cada uno, conteniendo 9.6  $\mu\text{L}$  de agua destilada/desionizada estéril, 1.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador Taq 10X (Termo Pol, BioLabs, New England), 0.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM (Promega<sup>®</sup>), 0.75  $\mu\text{L}$  de dNTP's 2.5mM (BioRad<sup>®</sup>), 1.125  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido sentido 10 $\mu\text{M}$ , 1.125  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido antisentido 10 $\mu\text{M}$ , 0.15  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerasa (5u  $\mu\text{L}^{-1}$ , BioRad<sup>®</sup>), que amplifica 2 kb  $\text{min}^{-1}$ . Para realizar el PCR de colonia se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos de una fase de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, posteriormente una fase de alineamiento a 55 ° C por 30 segundos y finalmente una fase de extensión a 72 ° C por 3 minutos. Cuando se completaron los 25 ciclos se programó una extensión final a 72°C por 5 minutos y para finalizar la reacción se mantuvo a 4°C. El producto de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar los resultados de las clonaciones. Una vez que se verificó cuales fueron las clonas positivas, al plásmido se le denominó pCLAP6 y se procedió con la extracción de DNA plásmidico. Las colonias fueron inoculadas en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y luego fueron incubadas toda la noche a 37°C en agitación de 200 rpm. La extracción del plásmido se llevó a cabo con el kit comercial QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (50) de QIAGEN. La presencia del fragmento insertado en el plásmido pMF272 se determinó mediante reacciones de restricción con *XbaI*

(20,000 u mL<sup>-1</sup>, BioLabs, New England) y *PacI* (10,000 u mL<sup>-1</sup>, BioLabs, New England). El volumen de cada reacción de digestión fue de 20 µL (12 µL de agua destilada/desionizada, 2 µL de amortiguador NEB No.2 10X (BioLabs, New England), 2 µL de amortiguador BSA 10X (BioLabs, New England), 3 µL de plásmido pMF272 con inserto de Spa2, 0.5 µL de enzima *XbaI* y *PacI* 10 µM). Luego de ser incubado a 37°C por 4 horas, el resultado fue observado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente se utilizó el programa ApE<sup>®</sup> (A plasmid Editor) versión 1.10.4 para construir la representación esquemática del mapa del vector de clonación pCLAP6.

### ***VII.12 Secuenciación***

Para realizar la secuenciación, se preparó el plásmido originado en este estudio (pCLAP6) a una concentración de 1000 ng µL<sup>-1</sup>. La secuenciación es realizada para comprobar que la integración del gen de la proteína Spa2 dentro del vector de clonación pMF272. El vector pCLAP6 se mandó a secuenciar al Core Instrumentation Facility del Instituto de Biología Genómica Integral de la Universidad de California Riverside en Estados Unidos. Para ello se mandaron analizar 2 alícuotas conteniendo cada una: 2.22 µL del vector pCLAP6, 1 µL de oligonucleótido sentido o antisentido de pMF272 10µM y 8.78 µL de agua desionizada estéril. Los oligonucleótidos utilizados para tal fin fueron diseñados para las áreas flanqueantes de la región río arriba y río abajo del sitio de clonación múltiple del vector de clonación pMF272 (tabla III). Para revisar la secuencia de pCLAP6 se utilizaron los programas FinchTV<sup>®</sup> versión 1.4.0, Clustal X versión 1.81 y GeneDoc<sup>®</sup> (Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility) versión 2.6.002.

### ***VII.13 Transformación en Neurospora crassa***

Para realizar la transformación de conidias de *N. crassa* se utilizó la cepa 9717 que permite una recombinación homóloga. La cepa 9717 tiene una mutación en el gen *mus51*, por lo que no permite recombinación ectópica, así que la cepa solo realizará recombinación homóloga. La cepa se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 200 mL de MMV sólido suplementado con histina ( $25\text{mg mL}^{-1}$ ) por 14 días a  $28^{\circ}\text{C}$ . Una vez que en el cultivo se formaron suficientes conidias, estas fueron resuspendidas en agua destilada/desionizada estéril. Las conidias fueron transferidas a tubos cónicos estériles y fríos de 50 mL (FALCON<sup>®</sup>). Se centrifugó en frío en una centrífuga MultiFuge 15-R Heraeus, por 5 minutos a 2500 rpm. Se realizaron lavados tanto en agua destilada/desionizada estéril como en sorbitol 1M estéril y frío. Para optimizar la transformación de las conidias se utilizó una suspensión con una concentración de  $2.5 \times 10^9$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  (M. Freitag comunicación personal) o una suspensión de conidias con una densidad óptica o  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  entre 0.2 a 1.0 utilizando un espectrofotómetro (Modelo 6505, JENWAY UV/VIS).

Mientras tanto se realizó la preparación del plásmido con el inserto (pCLAP6). El plásmido pCLAP6 fue digerido con la enzima *NdeI* ( $5 \text{ u } \mu\text{L}^{-1}$ , Invitrogen<sup>®</sup>) para que se linealizara (3  $\mu\text{L}$  de plásmido pCLAP6, 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador NEB No.2 10X (BioLabs, New England), 1  $\mu\text{L}$  de enzima *NdeI* y 14  $\mu\text{L}$  de agua destilada/desionizada estéril) por 4 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se precipitó con etanol añadiendo 2  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 44  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%, esta mezcla se incubó a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos en un ultracongelador (Nauier<sup>®</sup>). Se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415D) a máxima velocidad, se descarto el sobrenadante y se

añadió 200  $\mu$ L de etanol al 70% para lavar, se volvió a centrifugar a máxima velocidad, se descarto el sobrenadante y se seco la pastilla a 37°C por una hora y finalmente se resuspendió en agua destilada/desionizada estéril.

La transformación de *N. crassa* se realizó mediante la técnica de electroporación. En una celda para electroporación se colocaron 60  $\mu$ L de conidias y 10  $\mu$ L del plásmido pCLAP6 previamente linealizado y precipitado. Se aplicó un pulso eléctrico con un electroporador (Gen Pulser Xcell System modelo 165-2660 BIO-RAD) a un voltaje de 1500 volts (V), una capacitancia de 25 microfaradios ( $\mu$ F) y una resistencia de 600 Ohms ( $\Omega$ ) durante 14 milisegundos (ms). Inmediatamente después del pulso eléctrico, las conidias se resuspendieron en 100  $\mu$ L de sorbitol 1M, posteriormente la mezcla de conidios-sorbitol (160  $\mu$ L) se resuspendieron en 1 mL de solución de recuperación incubándose a 30°C con agitación suave por 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación las conidias se sembraron en 3 placas conteniendo medio agar FGS incubándose a 30°C por 5 días.

#### ***VII.14 Recuperación de transformantes de Neurospora crassa***

Las transformantes se recuperaron sembrándolas en tubos de borosilicato de 12 X 75 mm (PYREX<sup>®</sup>) conteniendo MMV solidificado en forma oblicua para obtener mayor superficie de cultivo. Se incubaron a 28°C hasta que el micelio se encontraba maduro y con abundante producción de conidias. Las conidias se revisaron bajo un microscopio invertido (Carl Zeiss Axiovert 200) equipado con una lámpara de fluorescencia que permitió seleccionar aquellas transformantes que expresaron fluorescencia.

***VII.15 Cruza y determinación del tipo de apareamiento de la cepa transformada de *Neurospora crassa spa2::gfp****

Para la obtención de cepas homocariontes se cruzó la cepa transformada heterocarionte NCLAP5-1 (Mat A) con la cepa 988 (Mat a) utilizando medio sintético para cruza (Westergaard y Mitchell, 1947); este medio contiene bajo contenido de nitrógeno, lo cual estimula la reproducción sexual. Primeramente se cultivó la cepa 988 a 28°C hasta que el micelio se encontró maduro con una producción abundante de conidias. Posteriormente se cultivó la cepa transformada (NCLAP5-1) en placas de Petri a 28°C por 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación, las conidias de la cepa 988 se lavaron con sorbitol 1M (lo cual mantendrá la auxotrofia de la cepa resultante de la cruza) y se resuspendieron en MMV líquido, se tomó 1 mL y se añadió a la caja de Petri conteniendo la cepa NCLAP5-1. Se incubó a 25°C durante 10 a 15 días en completa oscuridad hasta obtener la formación de peritecios. Una vez formados los peritecios se revisó el cultivo para observar la expulsión de las ascosporas (comúnmente las ascosporas expuladas se encuentran adheridas en la parte superior de la caja de Petri) mediante un microscopio estereoscópico SZX12 (Olympus). Las ascosporas se cosecharon y para inducir las a la germinación se les aplicó un choque térmico de 60°C por 1 hora, posteriormente se sembraron en placas de Petri conteniendo MMV sólido y se incubaron por 12 hrs. aproximadamente a 28°C hasta que se observaron ascosporas germinadas (homocariontes). Una vez que las ascosporas germinaron, estas fueron resembradas en tubos de borosilicado de 12 X 75 mm (PYREX<sup>®</sup>) conteniendo MMV solidificado en forma oblicua para una mayor superficie de cultivo. Posteriormente se llevó a cabo la selección de las homocariontes, realizándose bajo un microscopio invertido (Carl Zeiss, Axiovert 200) equipado con rayos ultravioleta (UV) que

permitió seleccionar aquellas homocariontes que expresaron fluorescencia. Para la determinación del tipo de apareamiento (Mat a o Mat A) de la cepa homocarionte (NCLAP-2) seleccionada se realizaron cruzas entre las cepas 4347 (Mat a), 4317 (Mat A) y NCLAP-2. Las cepas 4347 y 4317 se inocularon por separado y se incubaron a 28°C por 24 horas en placas de Petri conteniendo medio sintético para cruzas (Westergaard y Mitchell, 1947) y posteriormente se les añadió 1 mL de conidias de la cepa NCLAP-2 lavadas con sorbitol 1M y resuspendidas en MMV, incubándose a 25°C hasta observar la formación de peritecios.

#### ***VII.16 Comprobación de la integración de *spa2* y de la *gfp* en el genoma de *Neurospora crassa****

La integración de *spa2::gfp* en el lugar de la *his<sup>-3</sup>* en el genoma de *N. crassa* (NCLAP-2) se comprobó por medio de PCR. Para ello, se realizó una extracción de DNA de la cepa NCLAP-2 y se realizó un PCR utilizando los oligonucleótidos MRp10-11 y MRp12-13 (Tabla II). Se utilizaron como oligos universales los oligonucleótidos RDS-478F y RDS-482R (Tabla II). Para la PCR se realizaron 3 reacciones de 15  $\mu$ L. En cada reacción se mezclaron 8.8  $\mu$ L de agua destilada/desionizada estéril, 3  $\mu$ L de amortiguador GoTaq 5X (Promega<sup>®</sup>), 1.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega<sup>®</sup>), 0.6  $\mu$ L dNTP's 2.5mM (BioRad<sup>®</sup> 10 mM X 200 $\mu$ L), 0.3  $\mu$ L de DNA genómico, 0.3  $\mu$ L de oligonucleótido sentido 10 $\mu$ M, 0.3  $\mu$ L de oligonucleótido antisentido 10 $\mu$ M y 0.2  $\mu$ L de GoTaq DNA polimerasa (Promega<sup>®</sup>, 5u  $\mu$ L<sup>-1</sup>) con capacidad de amplificación de 2kb min<sup>-1</sup>. La amplificación de la reacción de PCR se realizó mediante los siguiente parámetros: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos seguido de 25 ciclos de una fase de desnaturalización a 95°C por 30

segundos, una fase de alineamiento a 55°C por 30 segundos, y una fase de extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos. Luego de completarse los 25 ciclos, se programó una extensión final de 5 minutos a 72°C y finalmente la reacción se mantuvo a una temperatura de 4°C. Posteriormente los resultados fueron analizados electroforéticamente.

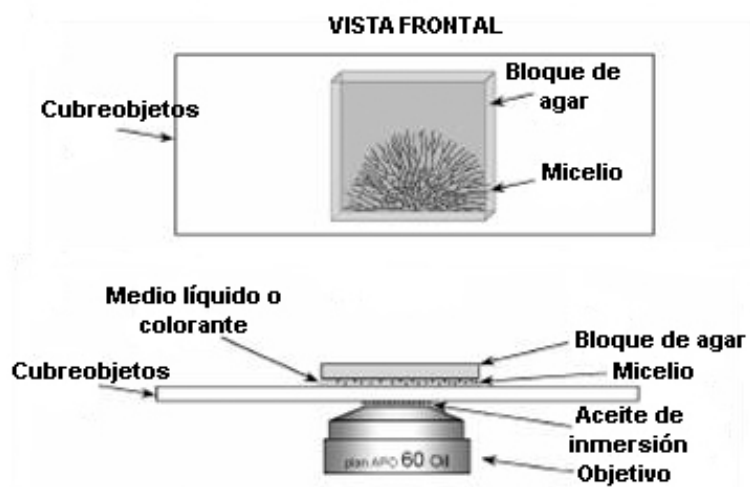
#### ***VII.17 Crecimiento de la cepa con *spa2::gfp* y recuperación de esporas***

Para cultivar la cepa de *N. crassa* NCLAP-2 (*spa2::gfp*) se utilizaron tubos de borosilicato de 20 X 150 mm con tapa (PYREX<sup>®</sup>) conteniendo MMV solidificado en forma oblicua para una mayor superficie de cultivo. La cepa se transfirió por la técnica de picadura. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 28°C hasta que el micelio se encontró maduro con una producción de abundantes esporas. La recuperación de esporas se llevó a cabo bajo condiciones estériles, colocando 5 mL de MMV líquido en un tubo cónico estéril de 15 mL (FALCON<sup>®</sup>). A ese volumen de MMV, se le agregó una masa de micelio conteniendo las esporas de cultivos maduros de *N. crassa spa2::gfp*; posteriormente se homogenizó con ayuda de un agitador tipo Vortex. El homogenizado se filtró mediante un embudo que contenía como filtro tela sintética tipo “Magitel” doble de un tamaño de aproximadamente 5 cm<sup>2</sup>, ambos estériles. Posteriormente se realizaron diluciones hasta obtener una concentración aproximada de  $2.7 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>; el conteo se realizó utilizando una cámara de Neubauer o hematocitómetro de 1/10 mm de profundidad. Las conidias se sembraron en placas de Petri conteniendo MMV e incubadas a 28°C.



### VII.18 Microscopia confocal

Para examinar las células de *N. crassa* con expresión de *spa2::gfp* se utilizó la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2002; Hickey y Read, 2003; Hickey *et al.*, 2004) (Figura 4). Para el caso de las germinulas se sembraron diluciones de conidias en MMV sólido incubándose a 28°C. Una vez que las células germinaron se realizó el corte de un bloque de agar en forma rectangular y se procedió al análisis bajo el microscopio confocal. En el caso de hifas maduras las células se cultivaron en MMV sólido incubándose a 28°C, cuando las células formaron un colonia de aproximadamente 5 cm de diámetro se realizó el corte de un bloque de agar en la periferia de la colonia en forma rectangular y después de un período de recuperación de 10 minutos se procedió al análisis bajo el microscopio (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de la técnica de bloque invertido (Modificado de Hickey *et al.*, 2004).

Se utilizó un microscopio confocal invertido de escaneo con láser LSM-510 META (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión 100X de contraste de fases (N.A. 1.3) (Plan Neofluar, Carl Zeiss). Para examinar la expresión de la GFP se utilizó un láser de Argón/2 Abs/Em 488/505-530 nm y un fotomultiplicador que permitió capturar imágenes tanto de fluorescencia como de contraste de fases. Para la obtención de imágenes y series de tiempo se utilizó el software LSM-510 (versión 3.2; Carl Zeiss) y se evaluaron con el LSM-510 Image Examiner (version 3.2).

Para determinar la colocalización de la proteína Spa2-GFP con el Spk se utilizó la técnica antes mencionada solo que antes de montar la muestra se aplicaron 10  $\mu$ L del colorante FM4-64 a 25  $\mu$ M sobre el cubreobjetos de 24 X 60 mm (VWR<sup>®</sup>). Para detectar fluorescencia del FM4-64 se utilizó un láser de Argón/2 Abs/Em 514/670 nm. Se realizaron capturas de imágenes individuales y series de tiempo de imágenes en 3 canales simultáneamente, el primero para observar la fluorescencia del colorante FM4-64, el segundo para observar la fluorescencia de Spa2-GFP y el tercero con un fotomultiplicador de luz transmitida para imágenes de contraste de fases y así observar la colocalización del Spk con Spa2.

Las imágenes individuales obtenidas se transformaron a formato TIFF (Tagged Image File Format). Las secuencias de imágenes obtenidas se transformaron a formato AVI (Audio/Video Interleave) utilizando el software de LSM Examiner versión 3.2. El procesamiento de las imágenes individuales y reconstrucciones se realizaron con el programa de computo Adobe Photoshop<sup>®</sup> 7.0.

### VII.19 Determinación de la tasa de crecimiento de *Neurospora crassa*

Para determinar la tasa de crecimiento de hifas individuales de la cepa *spa2::gfp* se realizaron cultivos por triplicado en placas de Petri conteniendo MMV. Los cultivos fueron incubados a 28°C por un período de 24 horas. También se determinó la tasa de crecimiento de la cepa tipo silvestre (988) y de la cepa 9717 de la cual proviene la cepa marcada con GFP. Después de 24h de incubación se realizaron capturas de imágenes en series de tiempo (1 cuadro/minuto por un período de 2:30hrs) bajo un microscopio estereoscópico Olympus SZX12 equipado con un lente adaptador de 0.097X para una cámara Olympus DP70. Las grabaciones obtenidas se transformaron a formato AVI (Audio/Video Interleave) utilizando el Software DP Controller Olympus compatible para Windows. De cada cultivo se determinó la tasa de crecimiento de las hifas capturadas (tabla IV). Las mediciones de crecimiento de las hifas se realizaron utilizando el programa de computo ImagePro® Plus versión 6.1 compatible para Windows. Para el almacenamiento, procesamiento y análisis de datos se utilizó el programa estadístico STATISTICA® versión 6.0.

**Tabla IV.** Número de hifas analizadas de cada cepa de *N. crassa*.

wt			9717			Spa2		
Número de hifas analizadas								
Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3
187	273	208	266	251	250	252	280	326

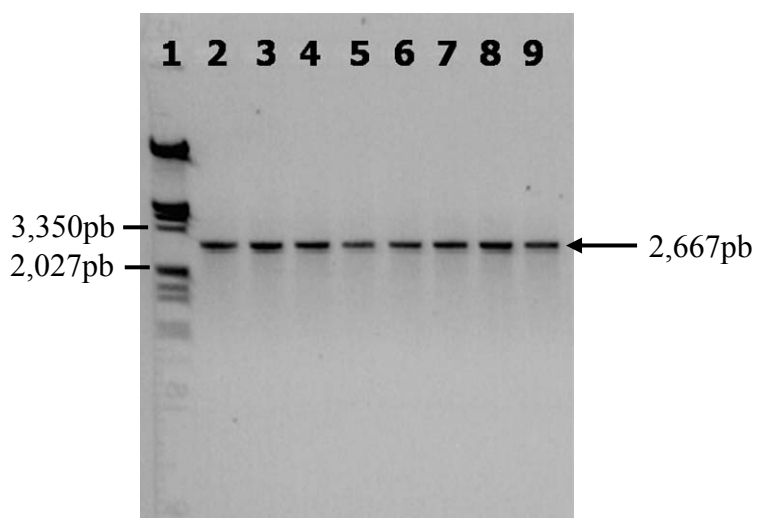
## VIII. RESULTADOS

### *VIII.1 Caracterización molecular de spa2 en Neurospora crassa*

Para el ascomiceto *N. crassa* se encontró el gen homólogo a *spa2* de *A. nidulans* después de haber realizado un BLAST en la página del EBI (European Bioinformatics Institute). El gen de la proteína se encontró referida como una proteína hipotética con clave de acceso para el NCBI (National Center of Biotechnology Institute) NCU03115.1. El gen *spa2* en *N. crassa* consta de 2,667 nucleótidos que se traduce en una proteína de 888 aminoácidos, presentando una masa molecular de 97.879 kDa con un porcentaje de identidad del 37% con *A. nidulans*.

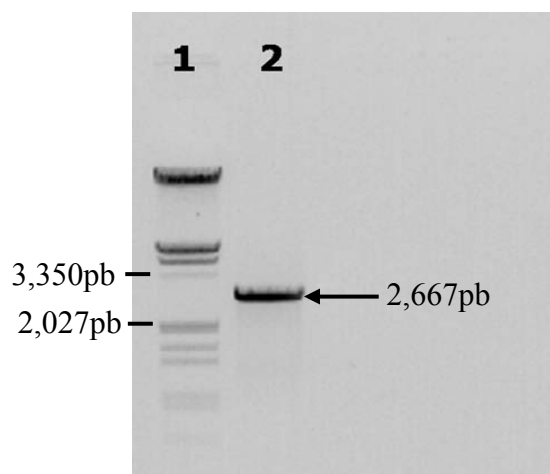
### *VIII.2 Amplificación del gen spa2 en Neurospora crassa*

Por medio de PCR y utilizando DNA genómico de *N. crassa* cepa 988 como templado, se realizó un ensayo de gradiente para detectar la temperatura adecuada en la que los oligonucleótidos se alinean de manera específica al DNA templado y se amplifique la secuencia de *spa2* de forma eficiente. La figura 5, nos muestra un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio ( $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) con el resultado de los productos de PCR para el ensayo de gradiente. En la imagen se observa que no hay presencia de amplificaciones inespecíficas puesto que todas las bandas se observan nítidas y sin bandas de otro peso molecular que puedan afectar el resultado de PCR, coincidiendo con el peso molecular de *spa2* que es de 2,667pb. También se observó que todas las temperaturas empleadas para el ensayo de gradiente fueron eficientes, sin embargo se tomó como temperatura estándar la temperatura de 55°C (por ser un valor cercano a la  $T^\circ$  de alineamiento de los oligonucleótidos sentido y antisentido) la cual se utilizó para realizar un segundo PCR.



**Figura 5.** Detección de los productos de PCR del ensayo de gradiente para el gen *spa2*. (carril 1) DNA del fago lambda ( $\lambda$ ) digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular, (carril 2) 57.0°C, (carril 3) 56.7°C, (carril 4) 56.1°C, (carril 5) 55.1°C, (carril 6) 53.8°C, (carril 7) 53.0°C, (carril 8) 52.4°C, (carril 9) 52.0°C. La flecha indica el fragmento correspondiente al gen de *spa2*.

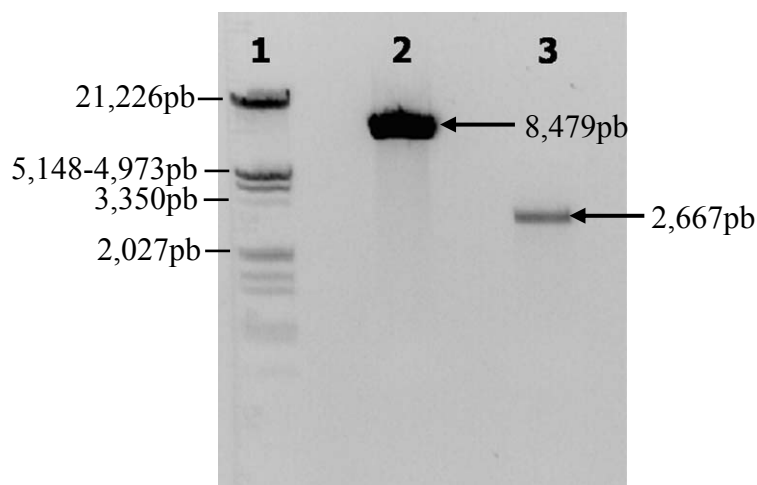
La realización de una segunda PCR se efectuó utilizando una *Taq* polimerasa de mayor fidelidad y eficiencia de amplificación por minuto ( $1 \text{ kb min}^{-1}$ ) corroborando por segunda ocasión el tamaño del fragmento correspondiente a *spa2*. La fotografía del producto de PCR (figura 6) no presenta amplificados inespecíficos, por lo que se purificó para realizar análisis de restricción



**Figura 6.** Detección del producto de PCR de alta fidelidad para el gen *spa2*. Gel de agarosa al 1%. (carril 1) Marcador de peso molecular del fago lambda en pares de bases (pb), (carril 2) gen de *N. crassa spa2*.

### VIII.3 Análisis de restricción

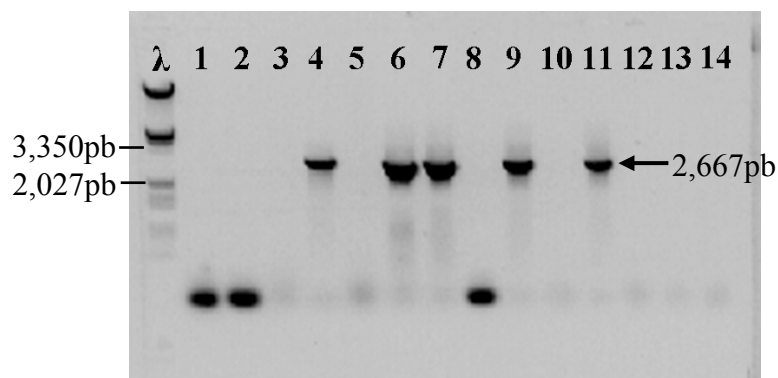
En el análisis de restricción para el vector de clonación pMF272 y *spa2* se realizó utilizando las enzimas *Xba*I y *Pac*I. El vector de clonación pMF272 mostró un fragmento de un peso molecular de 8,479pb que correspondió al fragmento esperado. Por otra parte *spa2* mostró un fragmento de un peso molecular de 2,667pb que correspondió al tamaño esperado (figura 7). El fragmento correspondiente al plásmido pMF272 mostró una banda muy intensa, mientras que el fragmento de *spa2* la banda fue muy tenue, lo cual correspondió a una concentración de 2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . En ambos fragmentos no se observaron residuos de digestión por lo que se utilizaron para realizar reacciones de ligación como se describe en la sección VII.



**Figura 7.** Análisis de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para el vector de clonación pMF272 y para el gen *spa2*. (carril 1) Marcador de peso molecular del fago lambda (21,226–564pb), (carril 2) pMF272 digerido con *Xba*I y *Pac*I, (carril 3) Producto de PCR (*spa2*) digerido con *Xba*I y *Pac*I.

#### VIII.4 Transformación en *Escherichia coli* por choque térmico

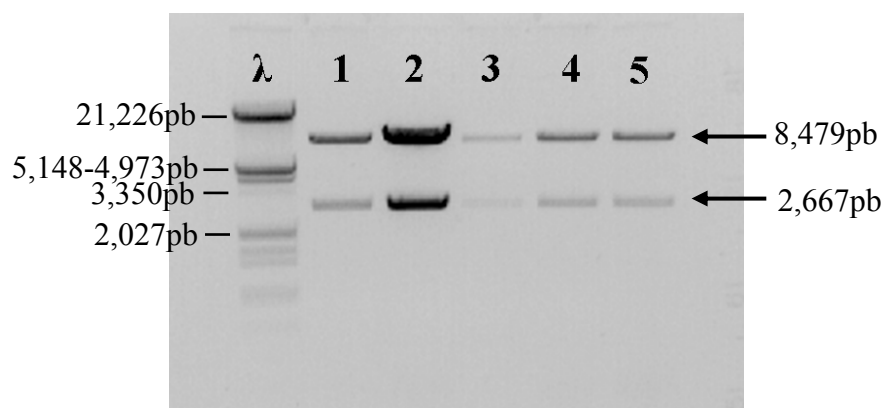
Después de la transformación en células de *E. coli* se seleccionaron 14 colonias para llevar a cabo una PCR de colonia con los oligonucleótidos diseñados previamente. El resultado de PCR (figura 8) mostró 8 amplificaciones, de las cuales 3 amplificaciones no correspondieron al peso molecular esperado, sin embargo 5 de las amplificaciones mostraron el tamaño de 2,667pb que corresponde al gen de *spa2*.



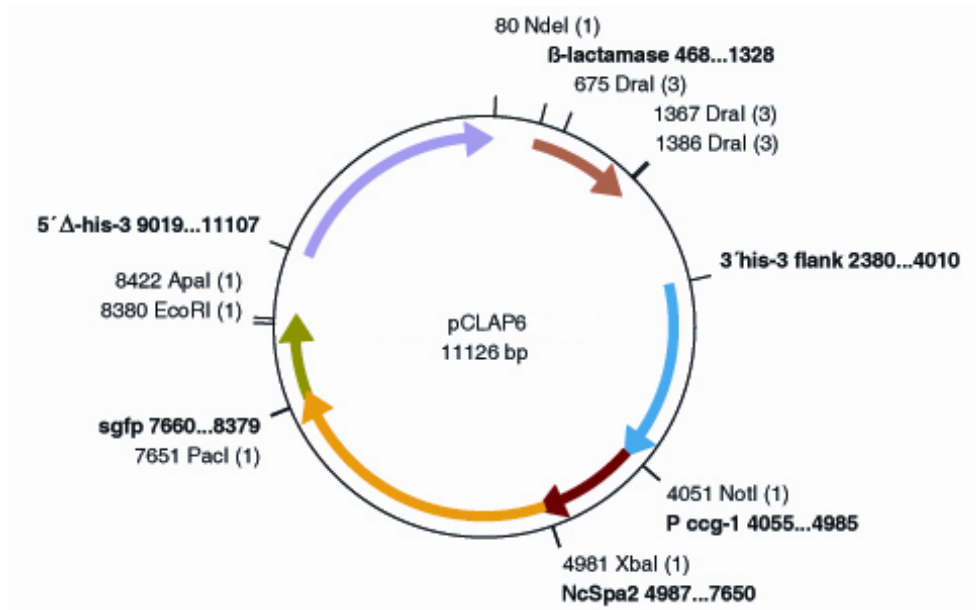
**Figura 8.** Resultado de PCR de colonia. ( $\lambda$ ) DNA del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular, (carriles 1,2,8) productos de PCR inespecíficos, (carriles 3,5,10,12,13,14) no hubo amplificación, (carriles 4,6,7,9,11) clonas positivas. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.



Posteriormente se realizaron minipreparaciones de DNA plásmidico para las cinco colonias positivas y con las enzimas *Xba*I y *Pac*I se realizó un análisis de restricción. El análisis de restricción mostró que en las cinco clonas se integró el gen *spa2* dentro del vector de clonación pMF272 (figura 9) mostrando un patrón de restricción conservado. Sin embargo, de las cinco clonas se tomo la clona del carril número dos que corresponde a la muestra número 6 por observarse con una mayor intensidad de producto y a la cual se denominó pCLAP6, este plásmido consta de un tamaño aproximado de 11,126pb (figura 10).



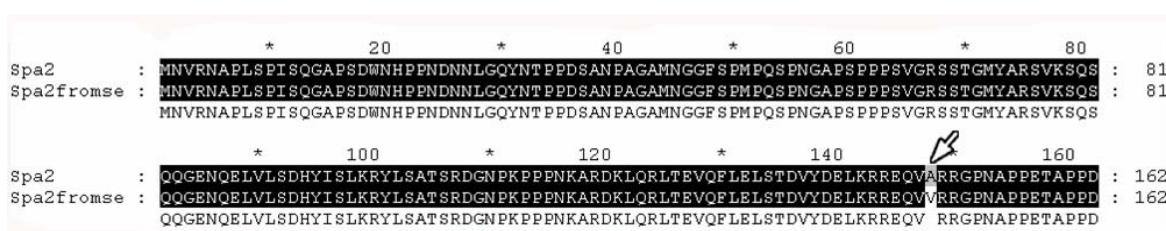
**Figura 9.** Resultado del análisis de restricción con las enzimas *Xba*I y *Pac*I. (λ) DNA del fago lambda digerido con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III utilizado como marcador de peso molecular, (carriles 1-5) clonas que muestran la digestión de la integración del gen *spa2* en el vector pMF272.



**Figura 10.** Representación esquemática del mapa genético del plásmido pCLAP6 de 11,126pb. La flecha rosa indica la región de la  $\beta$ -lactamasa, la flecha azul corresponde a la región 3' *his-3*, la flecha roja corresponde al promotor *ccg-1*, la flecha amarilla señala la integración del gen *spa2*, la flecha verde muestra la región de la proteína verde fluorescente *sgfp* y la flecha lila a la región 5'  $\Delta$ -*his-3*, así mismo alguno de los sitios de restricción.

### VIII.5 Secuenciación

El plásmido pCLAP6 fue secuenciado en el Core Instrumentation Facility del Instituto de Biología Genómica Integral de la Universidad de California en Riverside, E.U.A. para confirmar la fusión de *spa2* con la *gfp*. El resultado de la secuenciación fue comparado con la secuencia obtenida en el NCBI. Ambas secuencias de DNA fueron traducidas a proteína, así que se realizó un alineamiento de proteína-proteína (figura 11).

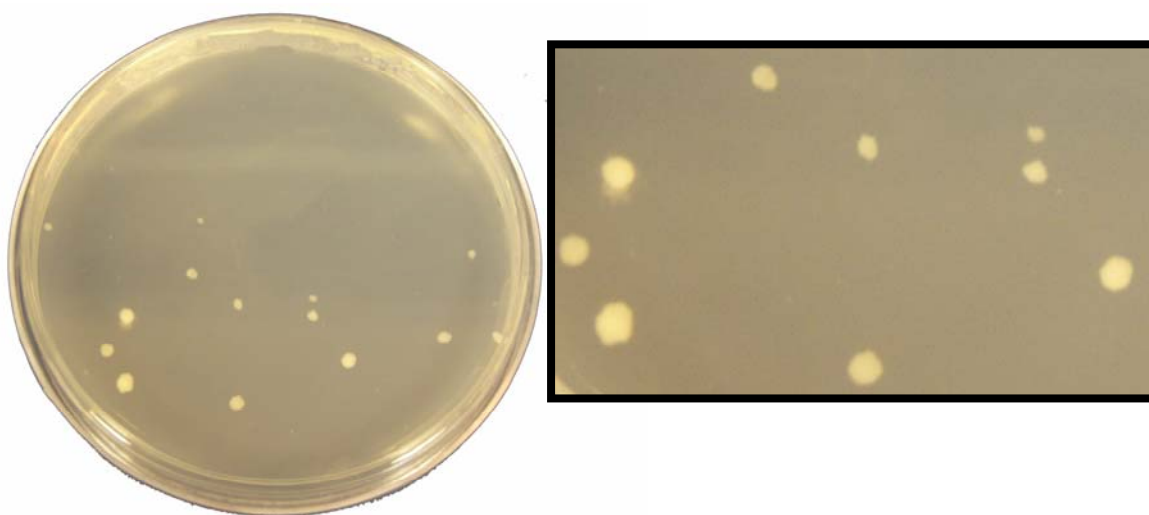


**Figura 11.** Análisis comparativo de la proteína Spa2 en *N. crassa*. La flecha señala el cambio del aminoácido alanina (A) por el aminoácido valina (V).

En el análisis de alineamiento de proteína-proteína de Spa2 de *N. crassa* se identificó una mutación de un aminoácido en la posición 148, la cual consistió en un cambio en el aminoácido alanina (A) por una valina (V). La alanina es un aminoácido que presenta 4 marcos de lectura, pero el que se identificó en la secuencia correcta correspondió para el triplete GCT y para la valina que también presenta 4 marcos de lectura se detectó el triplete GTT respectivamente. Se asume que este cambio pudo ser producido por la *taq* DNA polimerasa, la cual pudo causar el cambio en el nucleótido citosina por una timina al momento de la polimerización de *spa2*.

### ***VIII.6 Transformación por electroporación en conidias de *Neurospora crassa****

Se obtuvieron 122 colonias transformadas, de las cuales se escogieron 30 colonias para ser examinadas. Las colonias obtenidas fueron de tamaño reducido y de color blanco (figura 12). Las 30 colonias seleccionadas se recuperaron realizando trasposos a tubos con medio MMV y posteriormente se analizaron al microscopio para ver si expresaban fluorescencia. Las 30 colonias examinadas emitieron fluorescencia de manera que se seleccionó la transformante número 5 para realizar los análisis correspondientes.



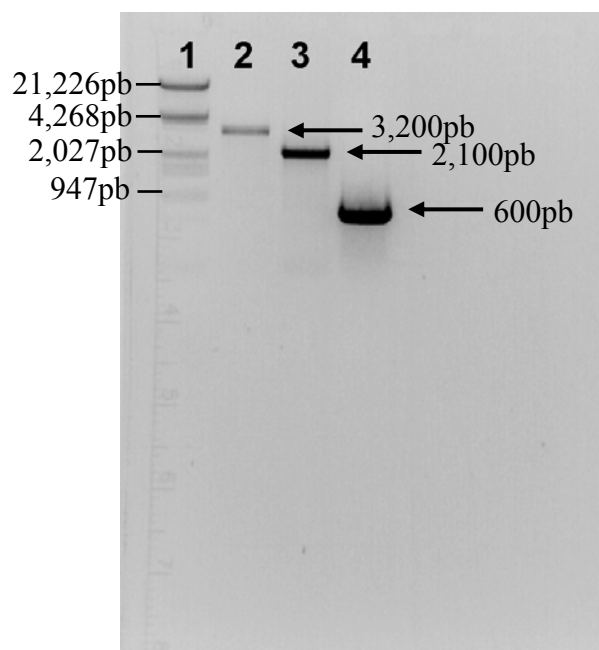
**Figura 12.** Colonias de *N. crassa* transformadas por electroporación. El recuadro negro es un aumento de algunas de las colonias obtenidas por electroporación observándose las colonias blancas y de tamaño pequeño.

### ***VIII.7 Comprobación de integración de *spa2::gfp* en el genoma de *Neurospora crassa****

Para comprobar la integración de *spa2::gfp* dentro del genoma de *N. crassa* se realizó una PCR utilizando DNA genómico de la cepa NCLAP-2 de *N. crassa* como templado, así como los oligonucleótidos (sentido-antisentido) MRp10-11, MRp12-13, RDS-478F y RDS-482R (Tabla II). Los oligonucleótidos RDS-478F y RDS-482R fueron utilizados como control.

Después de un análisis electroforético, en el resultado de PCR no se observaron amplificaciones inespecíficas, ya que todas las bandas que se obtuvieron fueron observadas de manera nítida, sin presencia de bandas de otro peso molecular y que puedan afectar en la interpretación del resultado de PCR.

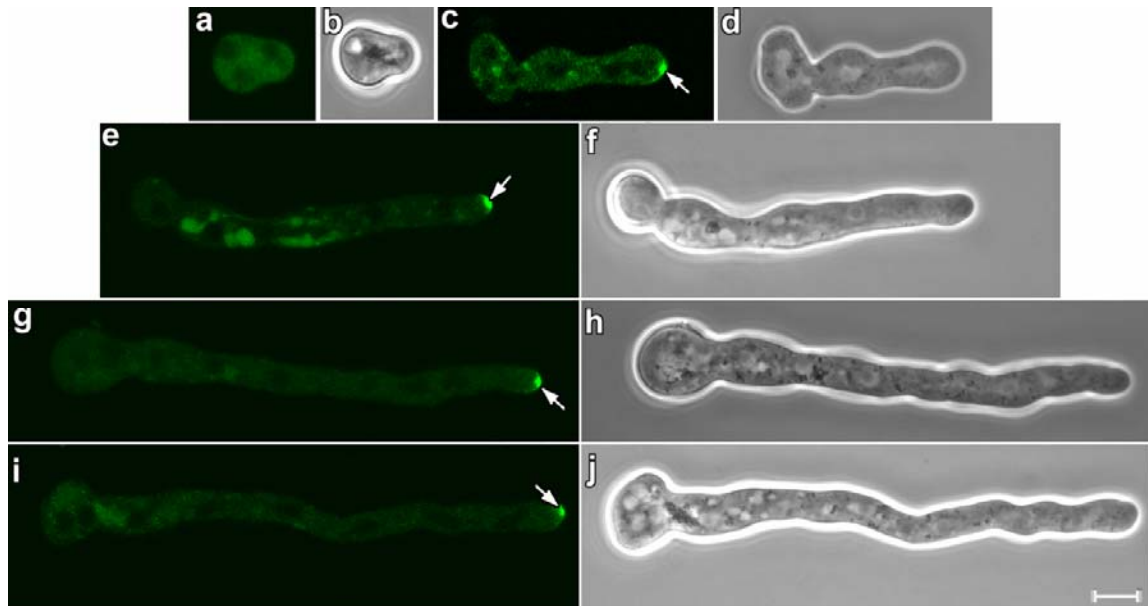
La figura 13 muestra 3 fragmentos de diferente tamaño molecular, en el cual, el primer fragmento fue amplificado con los oligonucleótidos MRp10-11; dicho fragmento correspondió a un tamaño de 3,200pb y que corresponde a la región flanqueante río abajo del vector de clonación pMF272 (*sgfp/His-3*). El segundo fragmento, se amplificó utilizando los oligonucleótidos MRp12-13, así que su amplificado correspondió a un peso molecular de 2,100pb, perteneciendo a la región flanqueante río arriba del vector de clonación pMF272 (*His-3/ccg-1*). El tercer fragmento fue amplificado utilizando los oligonucleótidos universales para hongos RDS-478F y RDS-482R, obteniendo un tamaño molecular de aproximadamente 600pb, el fragmento obtenido con estos oligonucleótidos corresponde a la subunidad pequeña ribosomal 18S.



**Figura 13.** Comprobación de integración de *spa2::gfp* en el genoma de *N. crassa* mediante PCR. (carril 1) DNA del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular, (carril 2) región flanqueante río abajo del vector de clonación pMF272 (*sgfp/His-3*), (carril 3) región flanqueante río arriba del vector de clonación pMF272 (*His-3/ccg-1*), (carril 4) subunidad pequeña ribosomal 18S. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### VIII.8 Distribución intracelular de Spa2-GFP en germínulas de *Neurospora crassa*

Se capturaron imágenes en canal de fluorescencia y por contraste de fases de germínulas de *N. crassa* con la proteína Spa2 marcada con GFP para observar la distribución intracelular de la proteína Spa2. La proteína Spa2-GFP en las germínulas de *N. crassa* con longitudes mayores a 12  $\mu\text{m}$  mostraron distribución de *spa2* en la región apical, aún cuando por contraste de fases no se observaba la presencia de un Spk en el ápice.



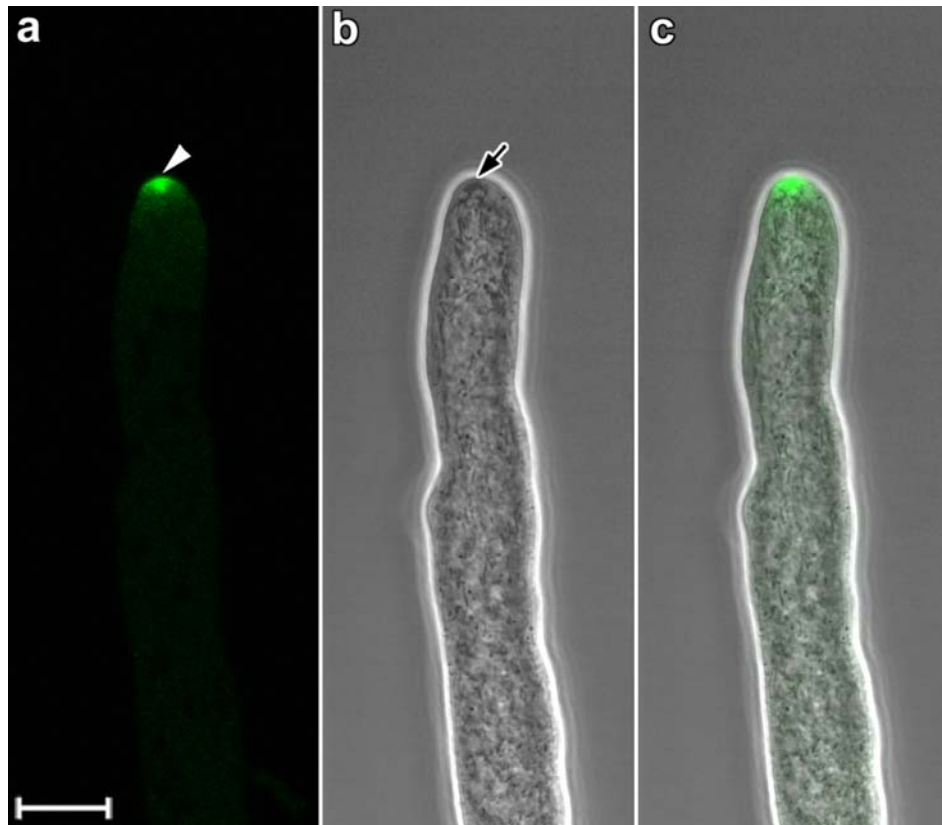
**Figura 14.** Distribución de la proteína Spa2 marcada con GFP en germínulas de *N. crassa* en diferentes estadios de desarrollo. (a,c,e,g,i) imágenes obtenidas por canal de fluorescencia de diferentes germínulas de *N. crassa*, (b,d,f,h,j) imágenes obtenidas por el canal de luz transmitida por contraste de fase. Las flechas indican la localización de Spa2-GFP en el ápice celular de las germínulas. Escala, 5  $\mu\text{m}$ .

En la figura 14a y b, podemos observar una germínula de 4:00 hrs. de incubación con una longitud de 8.37  $\mu\text{m}$  la cual se encuentra en el estadio de emergencia de un tubo germinativo. En este estadio de desarrollo no se apreció una acumulación de la proteína Spa2 en el ápice de la célula. Por otro lado la acumulación de la proteína Spa2 en el ápice celular se observó en germínulas que se encontraban en la etapa de elongación del tubo germinativo; en la figura 14c y d muestran una germínula con 4:00 hrs. de incubación y una longitud de 23.98  $\mu\text{m}$  en el estadio de desarrollo de elongación del tubo germinal en el cual se observa una acumulación de la proteína Spa2-GFP en el ápice celular. En la figura 14e y f, se observa una germínula de 6:25 hrs. de incubación con una longitud de 42.51  $\mu\text{m}$ , en la cual también se aprecia en el canal de fluorescencia la presencia de la proteína Spa2 en el área apical. Para el caso de las figuras 14g y h, la germínula es de 6:41 hrs de incubación y una longitud de 56.18  $\mu\text{m}$  y en la figura 12i y j se observa una germínula de 4:37 hrs. de incubación con una longitud de 60.33  $\mu\text{m}$ .



### VIII.9 Distribución intracelular de Spa2-GFP en hifas maduras de *Neurospora crassa*

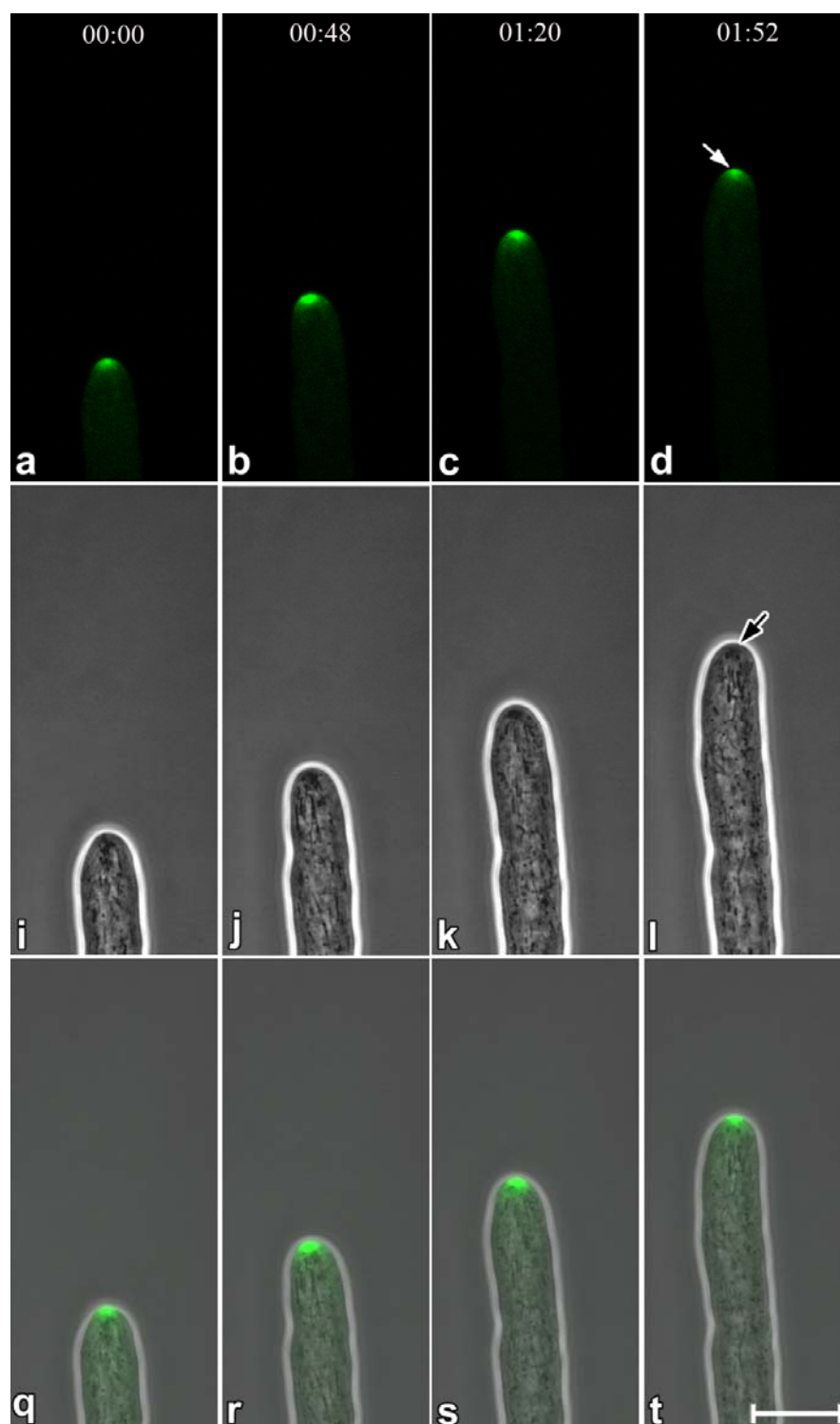
En hifas maduras de *N. crassa*, la proteína Spa2-GFP mostró una distribución apical (figura 15) como en la fase de elongación del tubo germinativo en las germinulas. La distribución de la proteína Spa2 dentro del ápice celular coincide con la posición del Spk, aunque la región marcada con Spa2-GFP ocupa una mayor área que la ocupada por el Spk por contraste de fases.



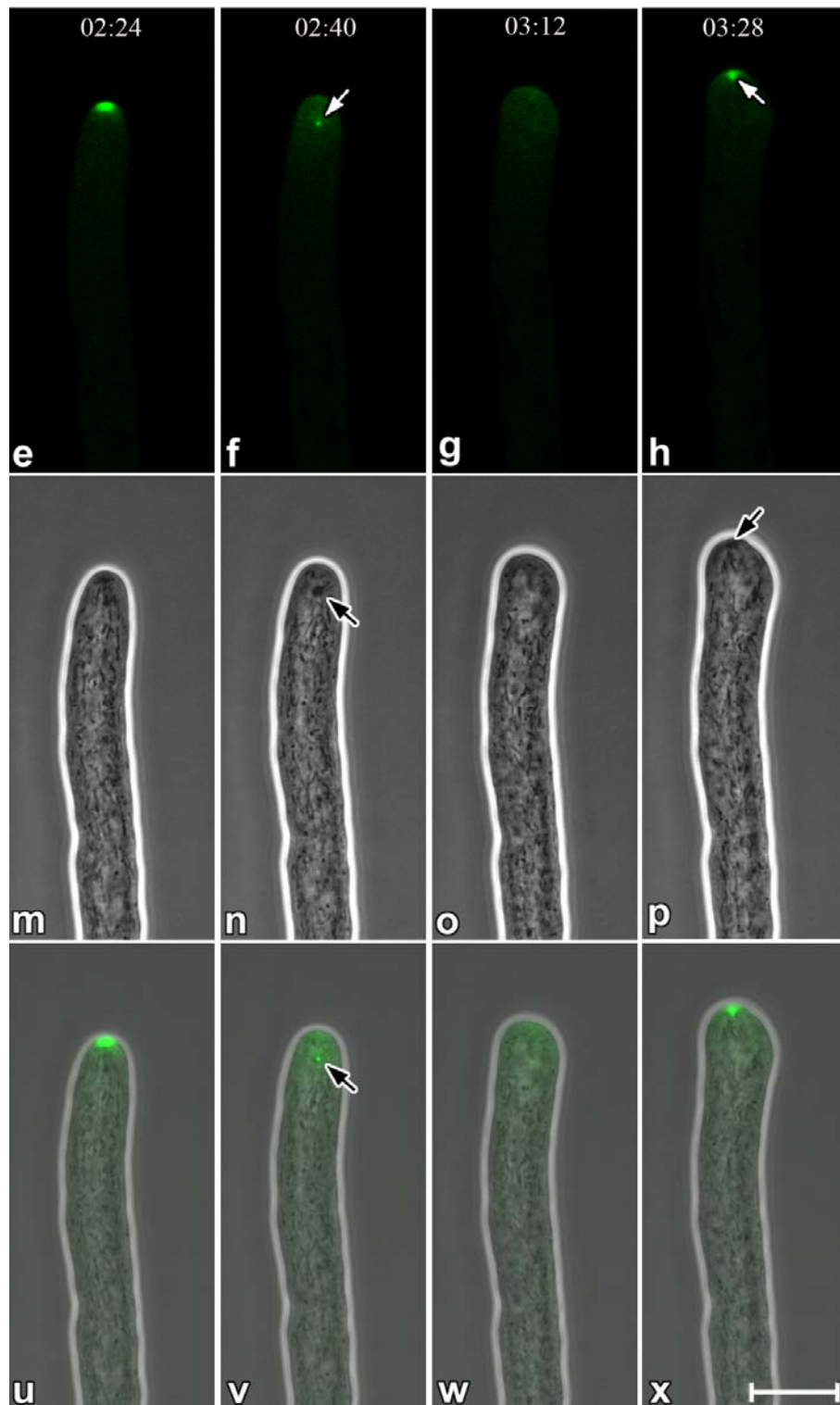
**Figura 15.** Distribución intracelular de la proteína Spa2 marcada con GFP en una hifa madura de *N. crassa*. Imágenes obtenidas por microscopía confocal, (a) canal de fluorescencia, (b) canal de luz transmitida por contraste de fases, (c) imagen sobrepuesta del canal a y b. La cabeza de flecha indica la localización de la proteína Spa2-GFP y la flecha indica la posición del Spk. Escala, 10  $\mu$ m.

### ***VIII.10 Comportamiento y colocación de Spa2-GFP con el Spitzenkörper en Neurospora crassa***

Durante el crecimiento polarizado de *N. crassa* Spa2-GFP en conjunto con el Spk se mantuvieron constantemente dentro del ápice celular (figura 16a-t). Lo que sugiere que *spa2* es parte del Spk. Esta relación fue más evidente del minuto 2:40 en adelante (figura 16 continuación f,n,v), cuando se observó que el Spk se retrajo 3  $\mu\text{m}$  del ápice celular y consigo Spa2-GFP. Es interesante notar que al retraerse el Spk y *spa2* se detiene el crecimiento apical (figura 16 cont. g,o,w). Después de este evento el Spk y *spa2* reaparecieron en la zona apical (figura 16 cont. h,p,x) restableciéndose el crecimiento. Sin embargo se produce un abultamiento en la zona apical de la célula (figuras 16 cont. h,p,x) causado por la desaparición del Spk y el desvanecimiento de la proteína Spa2.



**Figura 16.** Comportamiento del Spk y de la proteína Spa2-GFP en hifas maduras de *N. crassa*. (a-d) Canal de fluorescencia, (i-l) contraste de fases, (q-t) traslape del canal de fluorescencia y contraste de fases. Flecha blanca señala a la proteína Spa2-GFP, flecha negra al Spk. Tiempo en min:seg. Escala, 10  $\mu$ m.



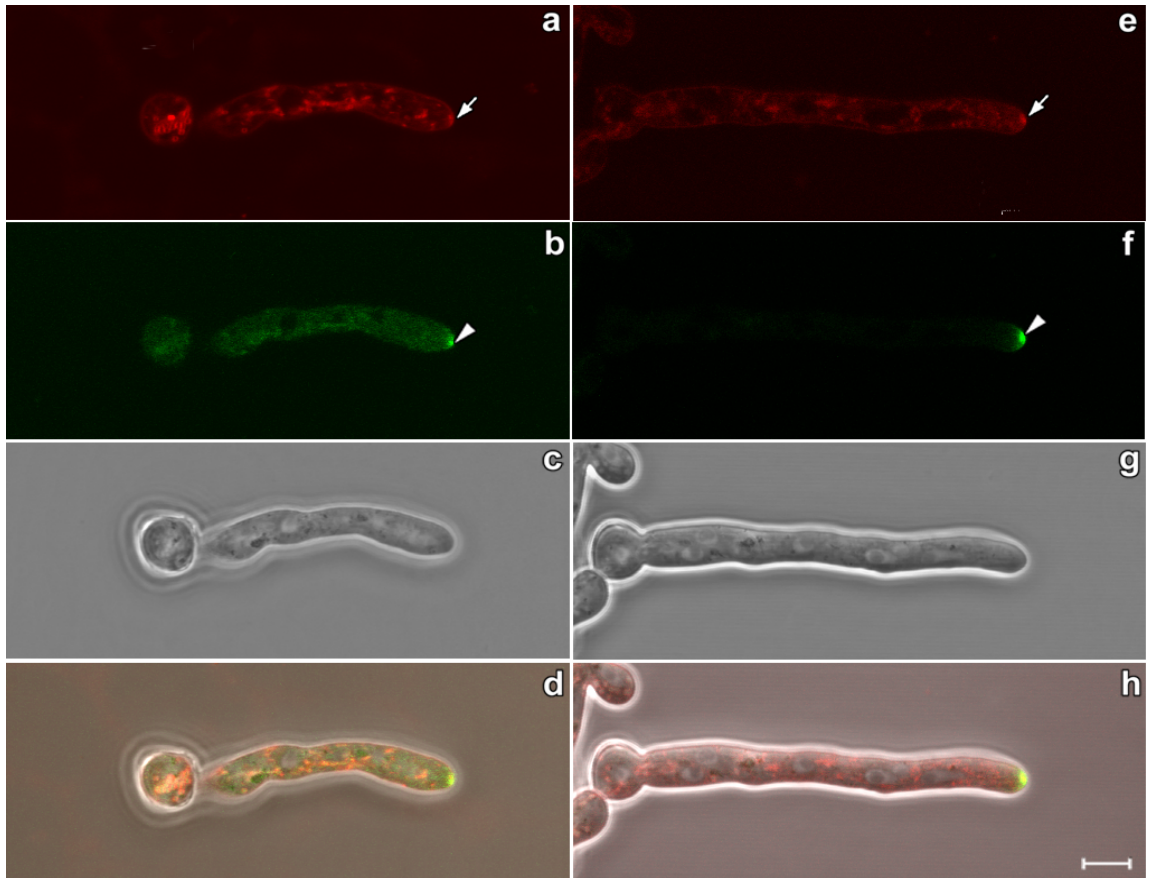
**Figura 16 (Continuación).** Comportamiento del Spk y de la proteína Spa2-GFP en hifas maduras de *N. crassa*. (e-h) Canal de fluorescencia, (m-p) contraste de fases, (u-x) traslape del canal de fluorescencia y contraste de fases. Flecha blanca señala a la proteína Spa2-GFP, flecha negra al Spk. Tiempo en min:seg. Escala, 10  $\mu$ m.

### ***VIII.11 Colocalización de Spa2-GFP con el Spitzenkörper utilizando FM4-64 en germínulas de Neurospora crassa***

En la figura 17 se muestran dos germínulas de *N. crassa* en etapa de elongación del tubo germinativo. Las imágenes 17a-d muestran una germínula tras 4:30 hrs. de incubación, presentando una longitud total de 36.67  $\mu\text{m}$ . En las imágenes 17e-h se muestra una germínula tras 5:00 hrs. de incubación con 50.07  $\mu\text{m}$  de longitud respectivamente.

Para realizar la colocalización de la proteína de interés con el Spk se utilizó el colorante FM4-64. El uso de este colorante permitió identificar al Spk en las germínulas de *N. crassa* ya que por contraste de fases no es posible identificar a la estructura apical en las germínulas de menos de 150  $\mu\text{m}$  de longitud (Araujo-Palomares *et al.*, 2007).

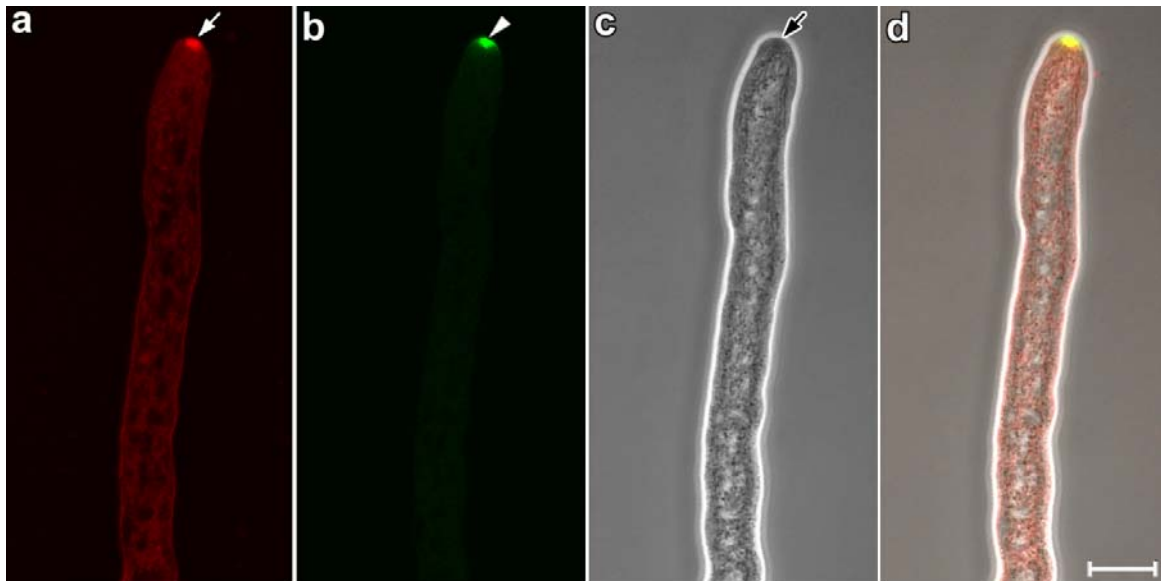
La distribución del FM4-64 se localizó en la región apical de las células (Figura 17a y e) como una acumulación pequeña. La distribución de la proteína Spa2 marcada con GFP también fue de manera apical (figuras 17b y f), coincidiendo con la posición que presenta el Spk. En el área ocupada por la proteína Spa2-GFP en el ápice es mayor que la ocupada por las endomembranas teñidas con FM4-64. Sin embargo en las figuras 17d y h se muestra un traslape de las imágenes de los tres canales (fluorescencia del FM4-64, la proteína Spa2-GFP y contraste de fases) observándose que hay coincidencia entre la posición del Spk y la proteína Spa2.



**Figura 17.** Colocalización de Spa2-GFP y el Spk usando FM4-64 en germinulas de *N. crassa*. (a,e) FM4-64, (b,f) Spa2 marcada con GFP, (c,g) contraste de fases, (d,h) superposición de FM4-64, Spa2-GFP y contraste de fases. Las flechas señalan al Spk teñido con FM4-64, las cabezas de flechas indican la proteína Spa2 marcada con GFP. Escala, 5  $\mu$ m.

**VIII.12 Colocalización de Spa2-GFP con el Spitzenkörper utilizando FM4-64 en hifas maduras de *Neurospora crassa***

En hifas maduras de *N. crassa* se analizó la colocalización del Spk con la proteína Spa2-GFP utilizando el colorante endocítico FM4-64 (figura 18). La distribución de la proteína Spa2-GFP en el área apical, muestra una distribución muy similar al que presenta el Spk teñido con el colorante FM4-64 y al que se observa por contraste de fases. Sin embargo en el traslape de las imágenes (figura 18d) se observa con claridad que hay coincidencia entre la posición del Spk y la proteína Spa2 dentro del domo apical.



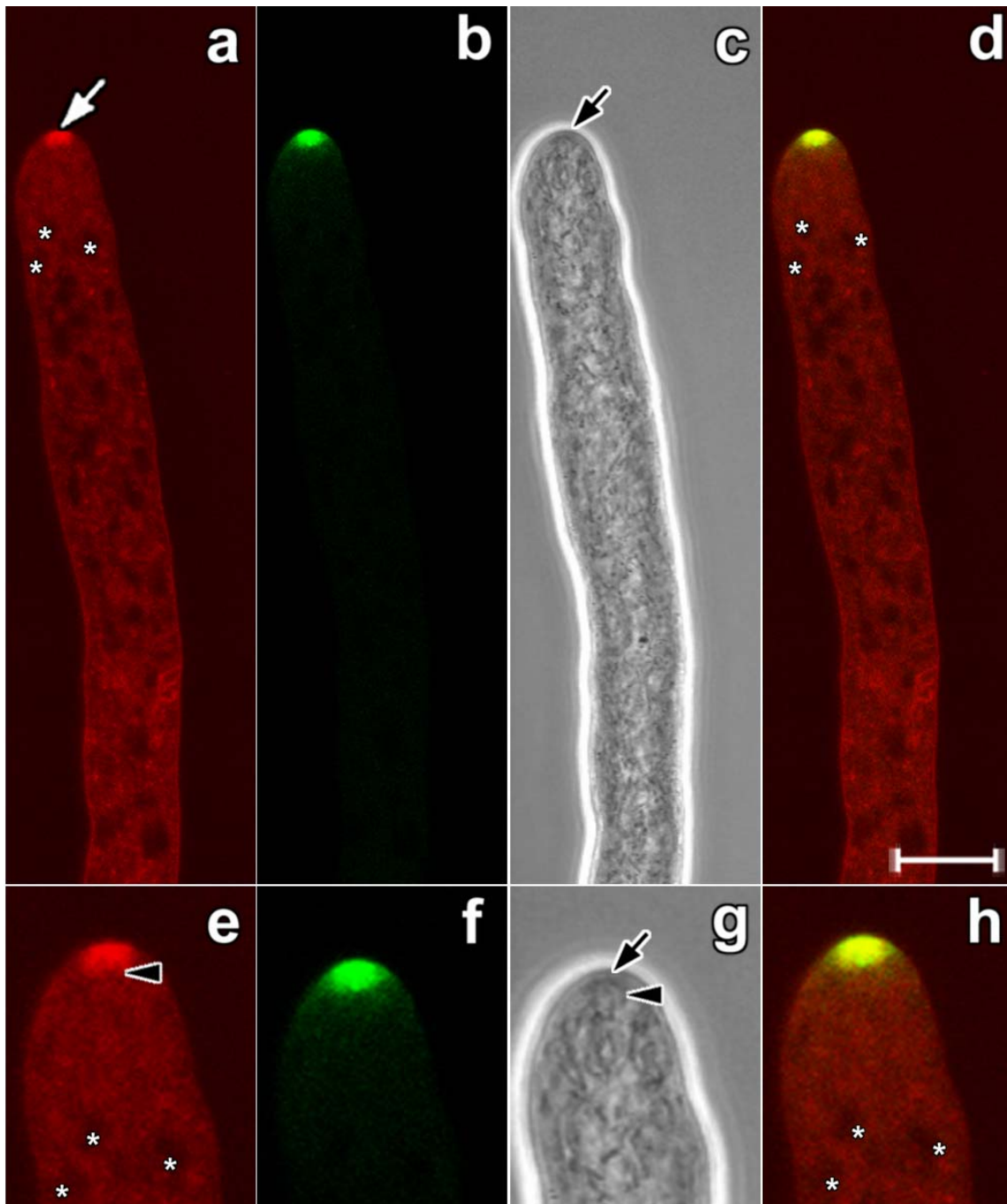
**Figura 18.** Colocalización de Spa2-GFP y del Spk utilizando FM4-64 en hifas maduras de *N. crassa*. (a) Spk teñido con FM4-64, (b) Spa2 marcada con GFP, (c) contraste de fases, (d) superposición de a, b y c. La flecha blanca señala al Spk marcado con FM4-64, la cabeza de flecha indica a la proteína Spa2-GFP y la flecha negra señala al Spk por contraste de fases. Escala, 10  $\mu$ m.

En la figura 19a-h se observa una hifa madura en diferentes canales donde se puede apreciar con más detalle la distribución de la estructura apical y de la proteína Spa2-GFP en el ápice celular de *N. crassa*.

La distribución del FM4-64 (figura 19a-e) se observa siempre en el área apical de la hifa, así mismo, es evidente la presencia de la región central o “core” al igual que por contraste de fases (figura 19g); sin embargo por contraste de fases, el Spk se observa más pequeño y de fase oscura que con el uso del colorante FM4-64 que se observa de mayor tamaño, pero siempre dentro de la región apical de la hifa.

Por otra parte, la distribución de Spa2-GFP se observa como una gran nube dentro del domo apical de la hifa (figura 19b-f) y en el cual no es posible observar a la región central del Spk. En la figura 18d-h se muestra la colocación del Spk teñido con FM4-64 y de Spa2-GFP, observándose que tanto el Spk como la proteína Spa2 coinciden de manera espacial dentro del ápice celular del hongo *N. crassa*.



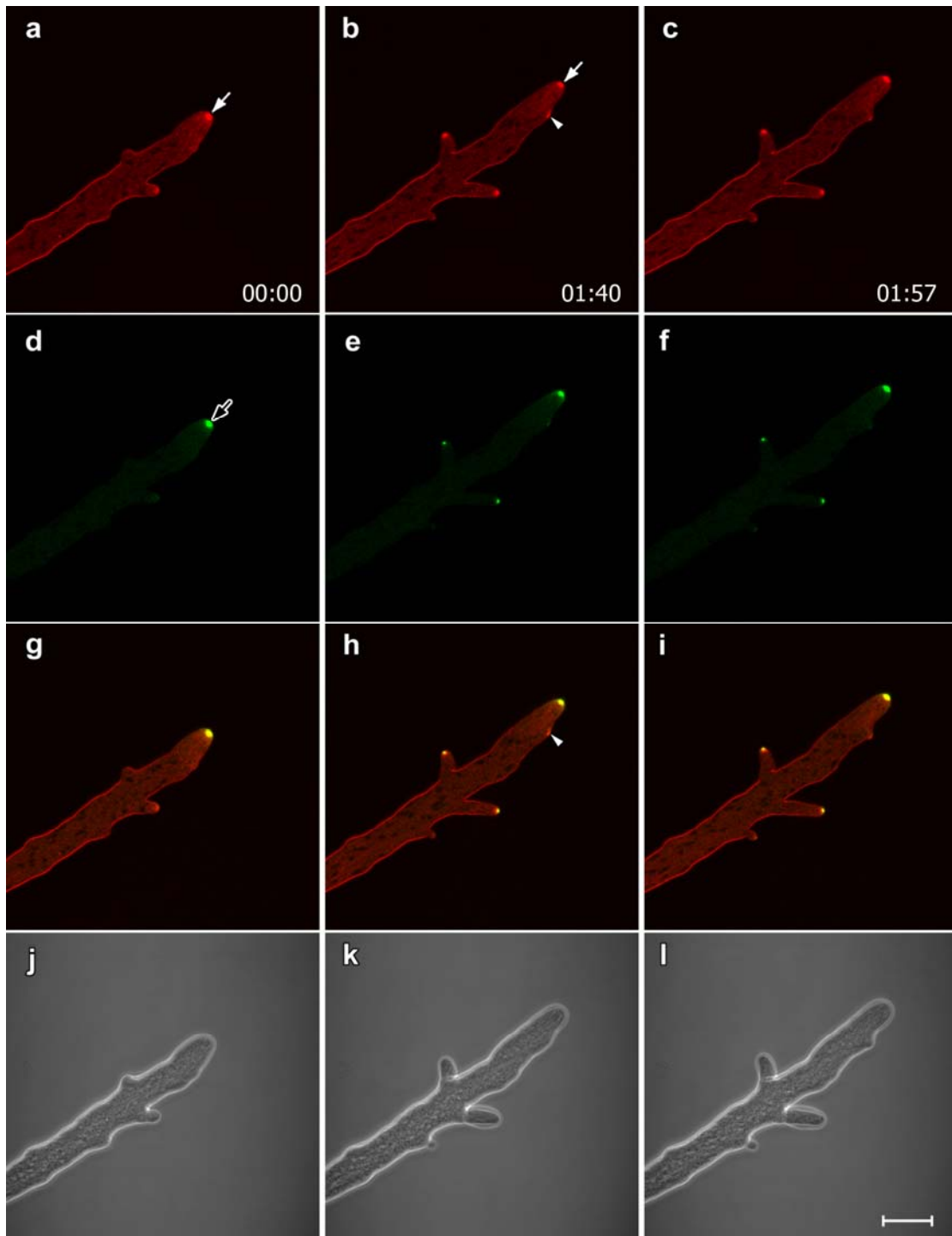


**Figura 19.** Colocalización de Spa2-GFP con el Spk utilizando FM4-64 en hifas maduras de *N. crassa*. (a-e) Spk teñido con FM4-64, (b-f) proteína Spa2 marcada con GFP, (c-g) contraste de fases, (d-h) imágenes sobrepuestas del canal de fluorescencia, (e-h) ampliación de la región apical de las imágenes del panel superior. La flecha blanca indica la posición del Spk marcado con FM4-64, las flechas negras la posición del Spk por contraste de fases y las cabezas de flechas la región central del Spk “Core”; núcleos señalados con asteriscos. Escala, 10  $\mu$ m.

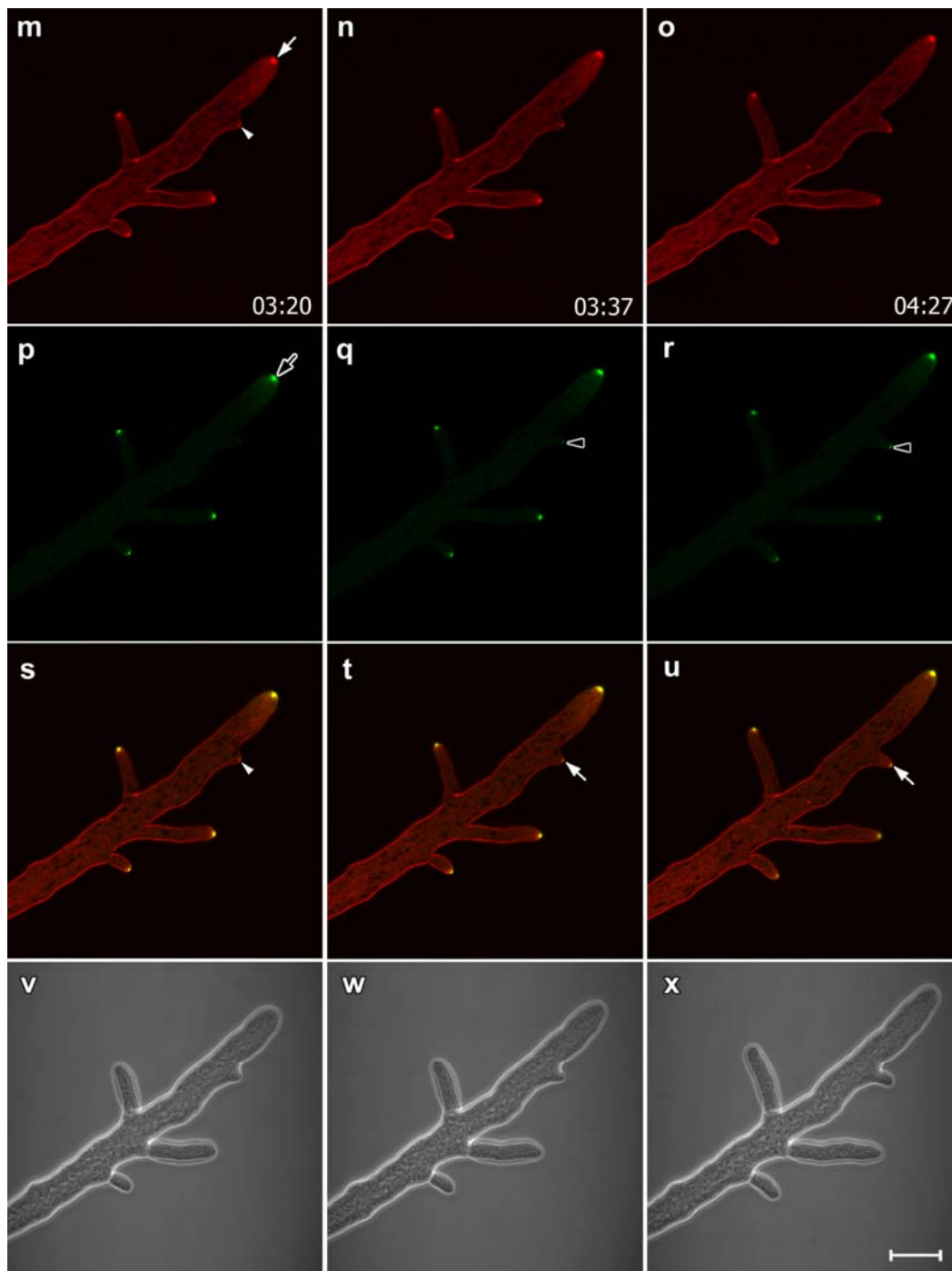
### ***VIII.13 Localización de Spa2-GFP durante la formación de ramificaciones laterales***

En este trabajo se determinó si la proteína Spa2 se encuentra involucrada en las primeras etapas de la formación de ramificaciones laterales en *N. crassa*. Para ello se tomaron imágenes en serie de tiempo donde se observan diferentes etapas del comienzo de una ramificación lateral (figuras 20, 21 y 22).

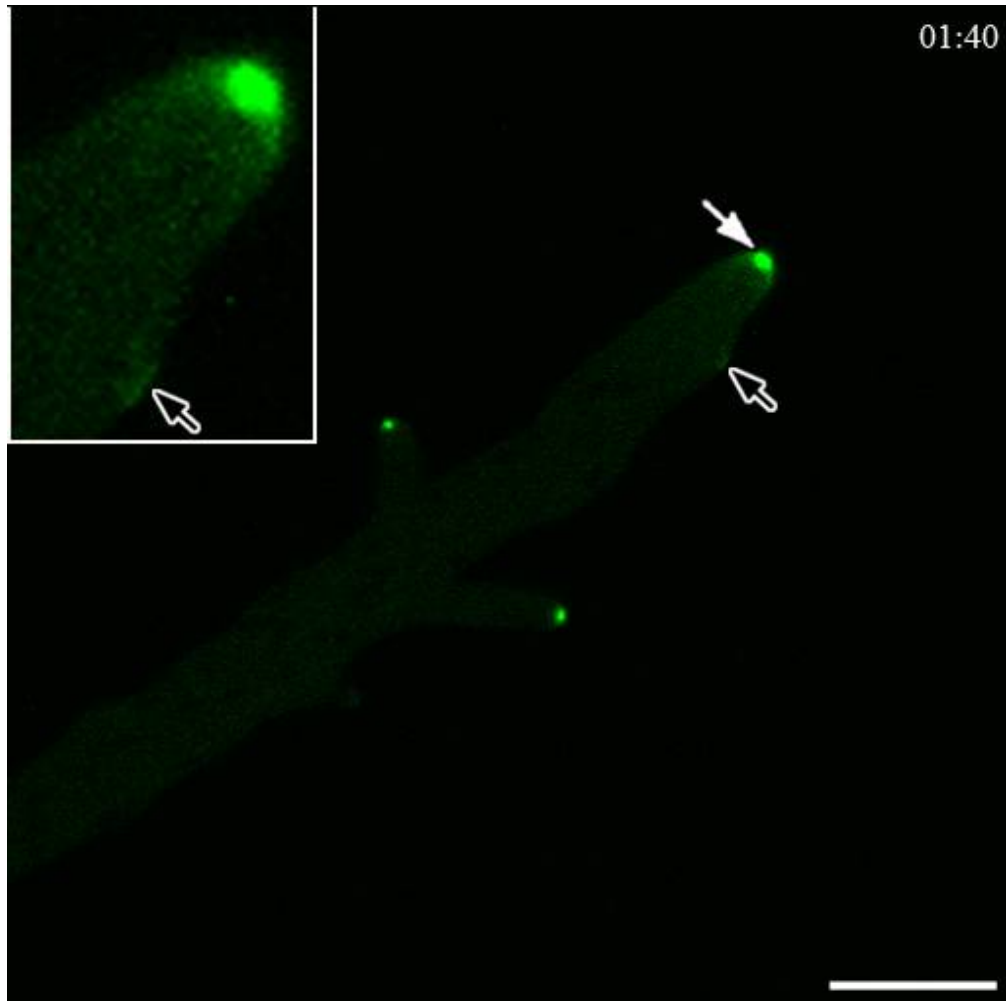
La figura 20, muestra una secuencia de una hifa madura en diferentes canales para observar el desarrollo de las ramificaciones laterales. En la imagen a, se observa un Spk en el ápice de la célula fúngica con dos pequeñas ramificaciones laterales. En la imagen d, se observa en la punta a la proteína Spa2-GFP. Por otra parte, siguiendo la secuencia, al tiempo de 1 minuto con 40 segundos (figura 20b) se observa en uno de los costados y señalado por la cabeza de flecha blanca a un Spk bien definido, lo cual indica la primera etapa en la formación de una ramificación. En la figura 20e donde solo se observa la señal de la proteína GFP se aprecia una pequeña acumulación de Spa2 en la parte inferior derecha (imagen ampliada en figura 21) y también se observa Spa2 acumulada en el ápice de la hifa principal y de las ramificaciones. Posteriormente, en la figura 20c al tiempo de 1:57 min. se observa la emergencia de la rama lateral. Así mismo, se sigue observando al Spk teñido con FM4-64 mientras se sigue observando la pequeña acumulación de la proteína Spa2-GFP (aunque con menos intensidad). La acumulación de la proteína Spa2 en esa ramificación pudo ser observada con mayor concentración hasta después que la emergencia de la rama lateral inició con el proceso de elongación (figura 20q,t) que correspondió al tiempo de 3 minutos con 37 segundos.



**Figura 20.** Formación de ramificaciones laterales en *N. crassa*. (a,b,c) Hifa teñida con FM4-64, (d,e,f) Spa2 marcada con GFP, (g,h,i) canales simultáneos de fluorescencia donde se muestra la colocalización del Spk y Spa2 en amarillo, (j,k,l) contraste de fases. Flechas blancas señalan al Spk marcado con FM4-64, flechas negras Spa2-GFP y cabezas de flecha blancas inicio de una ramificación lateral. Tiempo en min:seg. Escala, 20  $\mu$ m.

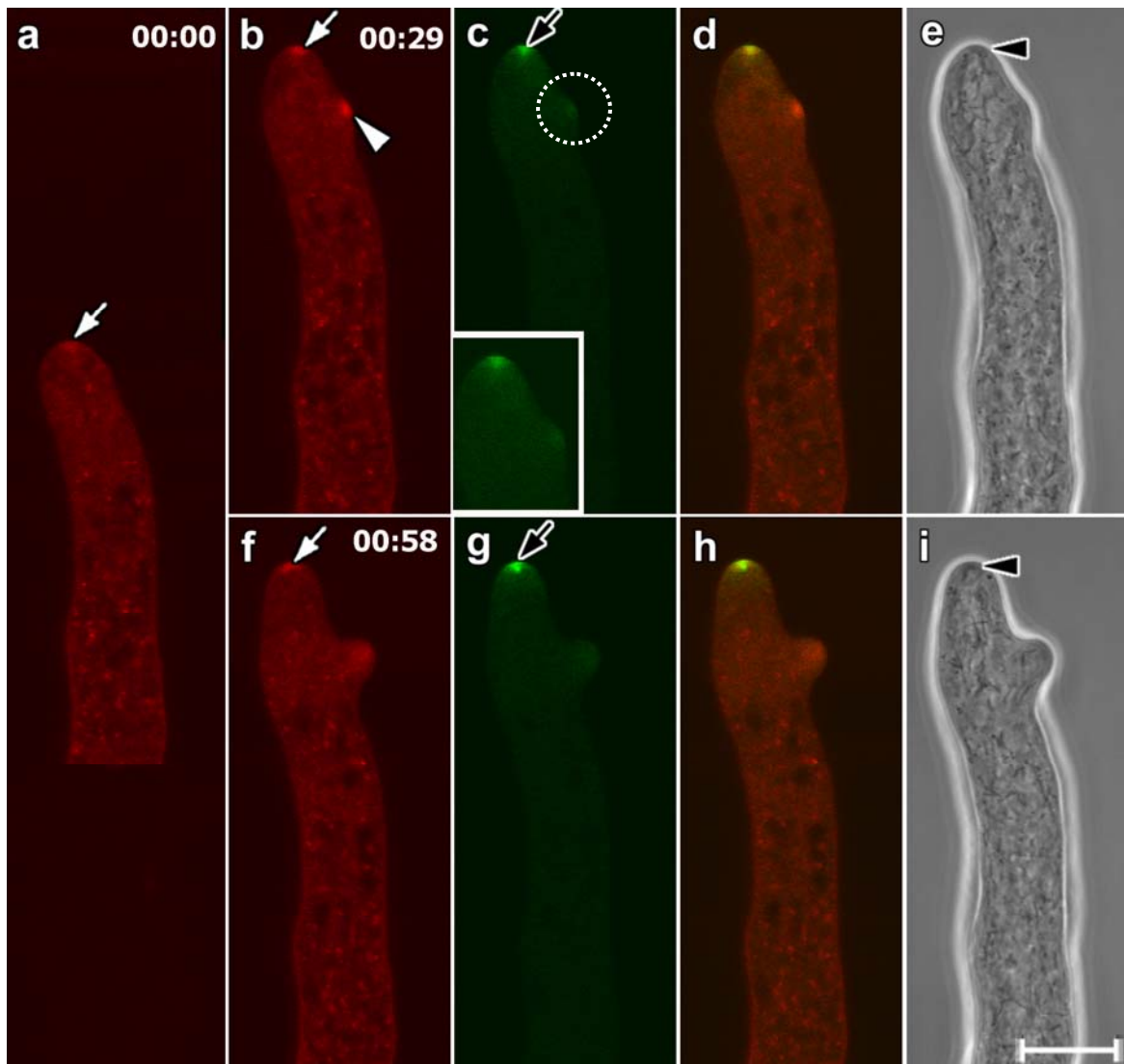


**Figura 20 (continuación).** Formación de ramificaciones laterales en *N. crassa*. (m,n,o) Hifa teñida con FM4-64, (p,q,r) Spa2 marcada con GFP, (s,t,u) canales simultáneos de fluorescencia donde se muestra la colocalización del Spk y Spa2 en amarillo, (v,w,x) contraste de fases. Flechas blancas señalan al Spk marcado con FM4-64 (m) y colocalización de Spk-Spa2 (t,u), flechas negras Spa2-GFP (p), cabezas de flecha blancas inicio de una ramificación lateral (m,s), cabeza de flechas negras Spa2 (q,r). Tiempo en min:seg. Escala, 20  $\mu$ m.



**Figura 21.** Amplificación de la imagen 20e donde se muestra el inicio de una ramificación lateral en *N. crassa*. Flecha blanca señala a la proteína Spa2-GFP en el ápice celular, flechas negras indican una acumulación de Spa2, recuadro blanco es una amplificación de la región apical donde la flecha negra muestra una pequeña acumulación de Spa2-GFP. Tiempo en min:seg. Escala, 20  $\mu\text{m}$ .

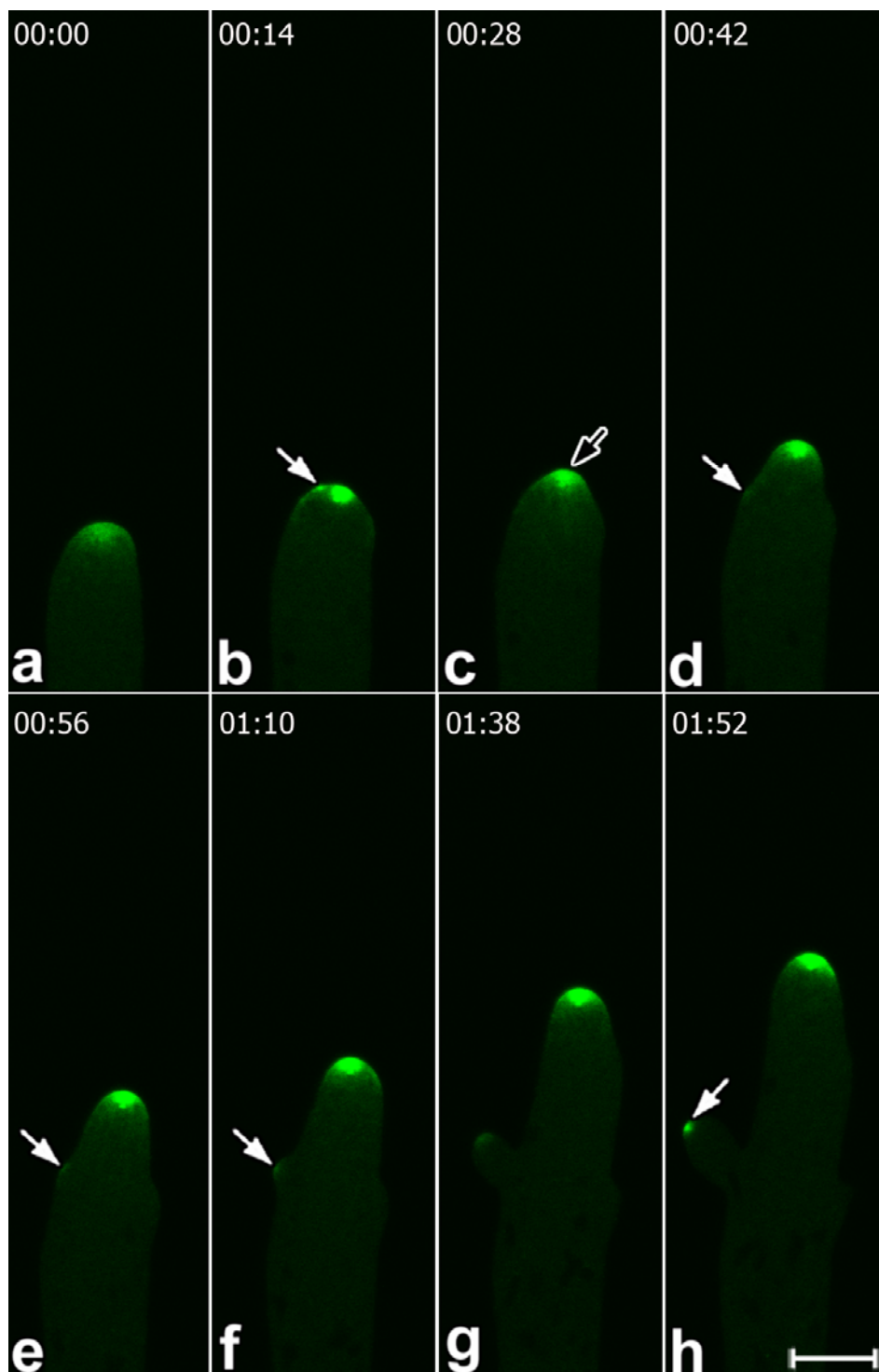
En la figura 22 se muestra un acercamiento de una hifa madura en donde se observa la primera etapa del inicio de una ramificación lateral. Durante la primera etapa de la formación de ramificaciones en la hifa principal se observaron 2 Spk uno en la parte apical y uno en la parte lateral derecha (figura 22b). En la figura 22c al realizar el análisis por el canal de fluorescencia donde se observa la proteína Spa2 marcada con GFP ésta pudo ser identificada en el ápice (figura 22c) y en la parte subapical derecha (aunque en baja concentración). Este hecho puede observarse mas claro en la figura 22d, ya que se observa de manera simultánea ambos canales de fluorescencia (FM4-64 y GFP) en donde se aprecia la colocalización del Spk-Spa2. Tanto en el ápice de la célula como en la región lateral el Spk y Spa2 coinciden en su posición apical solo que en la parte lateral existe una baja concentración de Spa2.



**Figura 22.** Colocalización de Spa2-GFP y FM4-64 en la formación de ramificaciones en *N. crassa*. (a,b,f) Spk teñido con FM4-64, (c,g) proteína Spa2 marcada con GFP, (d,h) imágenes sobrepuestas de los canales de fluorescencia, (e,i) contraste de fases. Las flechas blancas señalan la localización del Spk con FM4-64; flechas negras, la localización de Spa2-GFP; círculo punteado, un pequeño acumulo de Spa2; cabeza de flecha blanca, un Spk en el inicio de la formación de una ramificación lateral; recuadro blanco, acercamiento de la región apical; cabeza de flecha negra, al Spk por contraste de fases. Tiempo en min:seg. Escala, 10  $\mu$ m.

La figura 23 muestra una serie de tiempo donde la proteína Spa2-GFP posiblemente se encuentra involucrada en la formación de ramificaciones laterales en el hongo *N. crassa*. Al tiempo de 14 segundos la proteína Spa2 se encuentra distribuida en el ápice celular del hongo, pero al mismo tiempo en el costado izquierdo del Spk se observa una pequeña acumulación de la proteína Spa2 (figura 23b). Esta pequeña acumulación desapareció (figura 23c) al tiempo de 28 segundos. Sin embargo al tiempo de 42 segundos la proteína Spa2-GFP reapareció nuevamente en el mismo sitio como un acumulo difuso que permaneció constantemente hasta observarse el inicio de la emergencia de una ramificación lateral al tiempo de 1 minuto con 10 segundos (figura 23f). El acúmulo de Spa2-GFP se observó de mayor concentración en la ramificación lateral cuando la rama se encontraba en etapa de elongación (figura 23h). Este hallazgo sugiere que Spa2 además de estar involucrada en el mantenimiento de la polarización celular también se encuentra involucrada en el inicio de ramificaciones.





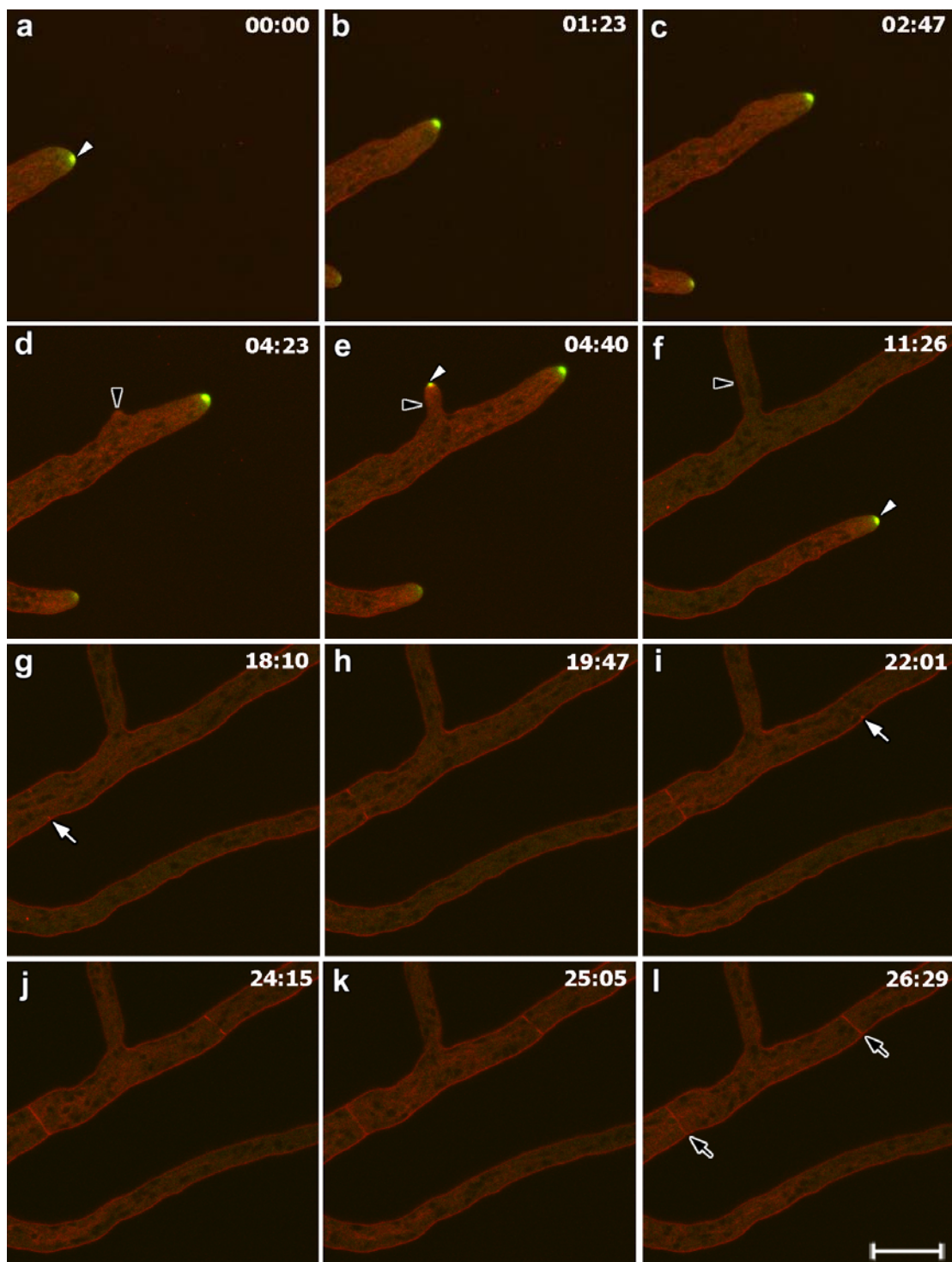
**Figura 23.** Localización de Spa2 en el sitio de ramificación lateral en el hongo *N. crassa*. Imágenes por canal de fluorescencia, flechas blancas señalan una ramificación lateral con acumulación de Spa2 y flecha negra indica la acumulación de Spa2 en el ápice celular de la hifa principal. Tiempo en min:seg. Escala 10,  $\mu\text{m}$ .

#### ***VIII.14 Relación de Spa2-GFP con FM4-64 en la formación de septos en hifas maduras de *Neurospora crassa****

Una vez visualizada la colocalización de Spa2-GFP con FM4-64 en el ápice celular de hifas maduras de *N. crassa*, se realizó la captura de series de tiempo por canal de fluorescencia para determinar si la proteína Spa2 estaba involucrada con la formación de septos.

En la figura 24, podemos observar imágenes de una serie de tiempo del crecimiento apical de una hifa madura de *N. crassa*, la cual se dejó crecer hasta ver la formación de septos en dicha hifa. Durante el proceso de crecimiento apical se observaron diferentes eventos, tales como la formación de ramificaciones laterales así como la formación de septos.

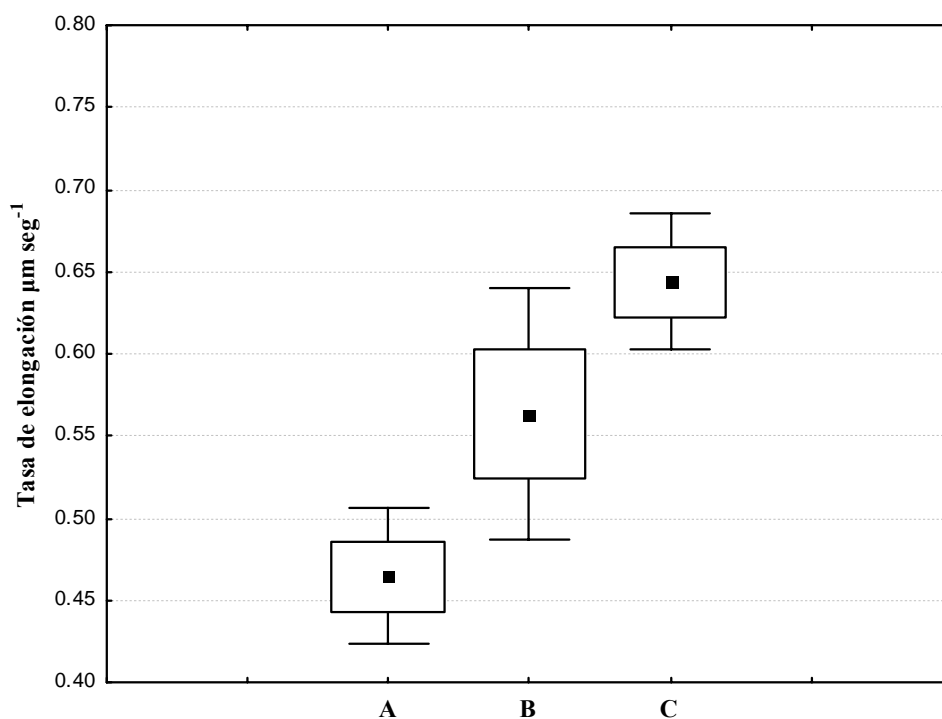
Para el caso de la formación de ramificaciones laterales, se pudo apreciar que durante la primera etapa de dicho proceso se observó una pequeña acumulación del colorante FM4-64 (figura 24d). No obstante, en la figura 24e, se observa que la ramificación lateral continuó con un crecimiento apical polarizado aumentando en longitud y haciendo evidente la expresión de la proteína Spa2 en los ápices de las ramificaciones. Por otra parte, al tiempo de 18 minutos de grabación se inició la formación de un primer septo (figura 24g), 4 minutos después, un segundo septo comenzó con su primera etapa de desarrollo (figura 24i). En ambos septos se mostró una coloración roja que indica la presencia del colorante FM4-64 internalizado en la pared celular, durante este proceso no se observó la presencia de Spa2, lo cual hace evidente que Spa2 no interviene en el proceso de septación y demostrando nuevamente que Spa2 es exclusivo a procesos de polarización en *N. crassa*.



**Figura 24.** Serie de tiempo de una hifa madura de *N. crassa* por canales simultáneos de fluorescencia. Cabeza de flecha blanca (a) indica la colocación de Spa2-GFP con FM4-64, cabezas de flechas negras (d-f) ramificaciones laterales, flechas blancas (g,i) el inicio de la formación de septos, flechas negras (l) los septos completos. Tiempo en min:seg. Escala, 20  $\mu$ m.

### VIII.15 Determinación de la tasa de crecimiento de *Neurospora crassa*

Se calculó la tasa de elongación de *N. crassa* de la cepa NCLAP-2 la cual tiene marcada la proteína Spa2 con GFP. También se analizaron dos cepas como controles (988 y 9717). La cepa 988 es una cepa silvestre que no posee mutación alguna, en cambio la cepa 9717 es una cepa con una mutación que requiere en su medio del aminoácido histidina para desarrollarse y de la cual se origino la cepa NCLAP-2. La tasa de elongación de las cepas analizadas fueron muy cercanas, para la cepa 9717 fue de  $0.46 \pm 0.02$  ES  $\mu\text{m seg}^{-1}$  y la tasa de elongación de 988 fue de  $0.56 \pm 0.03$  ES  $\mu\text{m seg}^{-1}$ , en cambio la tasa de elongación para NCLAP-2 fue de  $0.64 \pm 0.02$  ES  $\mu\text{m seg}^{-1}$ . Al 95% de intervalo de confianza podemos observar que no hay diferencias entre las cepas A-B y B-C, sin embargo la tasa de elongación entre las cepas 9717 y NCLAP-2 fueron significativamente diferentes.



**Figura 25.** Tasa de elongación de *N. crassa*. (A) Cepa 9717, (B) cepa 988, (C) cepa NCLAP-2. (■) media, (□) error estándar, (I) intervalo de confianza al 95%.

## IX. DISCUSIONES

Spa2 es una proteína que ha sido identificada como uno de los componentes del polarisoma en varias especies de hongos, incluyendo algunos hongos filamentosos (Knechtle *et al.*, 2003; Virag y Harris 2006b). Gehrung y Snyder (1990) reportaron en la levadura *S. cerevisiae* que Spa2p se localiza en los ápices de las yemas de las células y Zheng *et al.*, (2003) y Crampin *et al.*, (2005) señalaron que en el hongo patógeno *C. albicans* Spa2 (CaSPA2) también se localiza en las puntas de hifas verdaderas. En los hongos filamentosos *A. gossypii* y *A. nidulans* Knechtle *et al.*, (2003) y Virag y Harris (2006b) reportaron que Spa2 se distribuye en las puntas de las hifas. En este trabajo se determinó que la distribución de Spa2 en *N. crassa* estuvo siempre localizada en los ápices celulares. En las regiones subapicales no se encontró la presencia de Spa2-GFP, esto sugiere que en *N. crassa* Spa2 viaja por la célula como RNAm y es en el ápice donde la proteína se sintetiza. En el ápice celular existen una gran cantidad de organelos celulares, entre ellos se encuentran los ribosomas, los cuales forman parte del Spk como lo han reportado Girbardt (1969) y Howard y Aist (1979). Steinberg (2007) sugiere que debido a la presencia de esos ribosomas en la zona apical la traducción de RNAm y la síntesis de proteínas se llevan a cabo en la punta de las células.

La localización de Spa2 en germinulas de *N. crassa* también se mostró en la parte apical de las células, sin embargo sólo en aquellas células que se encontraban en la fase de elongación como lo muestra Knechtle *et al.*, (2003) en *A. gossypii*. Estos autores mencionan en su trabajo que AgSpa2 fue esencial para un rápido crecimiento de la colonia puesto que AgSpa2 siempre se mantuvo en la punta. En cambio, Virag y Harris (2006b) solo

mencionan que SpaA siempre estuvo presente en el ápice celular de los tubos germinativos de *A. nidulans*. Sin embargo en ninguno de estos trabajos se reporta la localización de Spa2 en las primeras fases del desarrollo de estos hongos.

Durante las etapas tempranas de desarrollo de *N. crassa*, como es el caso de las germínulas en fase de emergencia del tubo germinal, Spa2 no se observó acumulada en la zona apical. Esto sugiere que Spa2 es exclusivo para mantener el proceso de polarización y no de establecerlo en el hongo. Es muy posible que otras proteínas sean las responsables del establecimiento de la polaridad celular en *N. crassa* y que se produzcan en las etapas tempranas de desarrollo en el hongo *N. crassa*. En levaduras se ha reportado que se requiere de proteínas como la Rsr1p, Bud5p y Bud2p para que se lleve a cabo la selección del sitio en donde el proceso de polarización se llevará a cabo (Irazoqui y Lew, 2004). También se ha descrito que las proteínas tipo Rho GTPasas funcionan en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular (Bender y Pringle, 1989; Jonson y Pringle, 1990; Matsui y Toh-e, 1992; Drgonová *et al.*, 1996; Imai *et al.*, 1996; Kamada *et al.*, 1996 y Robinson *et al.*, 1999). Una de estas proteínas es la Cdc42 (Adams *et al.*, 1990 y Ayscough *et al.*, 1997), la cual es un factor crucial en la activación del crecimiento isotrópico al crecimiento polarizado, y para que se lleve a cabo la activación de Cdc42, se requiere la proteína Cdc24 (Zheng *et al.*, 1994). En hongos filamentosos filamentosos los marcadores que intervienen en el sitio de selección del proceso de polarización están pobremente conservados o completamente ausentes (Harris y Momany, 2004). Por lo que es necesario realizar más estudios para elucidar que mecanismos son los responsables de la selección del sitio de polarización en estos organismos.

En hifas maduras de *N. crassa* se ha demostrado que la trayectoria y dirección de crecimiento están relacionados con el Spk (Brunswik, 1924; Girbardt, 1957; Bracker *et al.*, 1997; López-Franco y Bracker, 1996; Riquelme *et al.*, 1998; Riquelme *et al.*, 2000; Bartnicki-García, 2002). Por lo que se analizó la relación de esta estructura con Spa2. En hifas maduras de *N. crassa* se encontró que Spa2-GFP y el Spk siempre se mantuvieron en el ápice de las células. Cuando el Spk desaparecía del ápice celular Spa2-GFP también desaparecía, o bien ambos se desplazaban en la misma dirección. Estos resultados difieren de lo reportado para *A. nidulans* por Virag y Harris (2006b) quienes señalaron que cuando el Spk desaparecía SpaA seguía observándose en el ápice.

En las germínulas de *N. crassa* el Spk no se observó por contraste de fases, como reportaron Araujo-Palomares *et al.*, (2007). Por lo tanto se utilizó el colorante FM4-64 y se encontró una colocalización con Spa2-GFP. Se observó que cuando el Spk y Spa2-GFP cambiaban de posición, la dirección de crecimiento también cambiaba tal como se ha reportado para hifas maduras (Brunswik, 1924; Girbardt, 1957; Bracker *et al.*, 1997; López-Franco y Bracker, 1996; Riquelme *et al.*, 1998; Riquelme *et al.*, 2000; Bartnicki-García, 2002) y para germínulas de *N. crassa* (Araujo-Palomares *et al.*, 2007).

Es interesante observar que Spa2-GFP se dirige en la misma dirección en la que se dirige el Spk, de tal manera que es posible que el polarisoma forme parte del Spk como sugieren Harris *et al.*, (2005), o bien que Spa2 intervenga en la integridad del Spk como lo ha mencionado Crampin *et al.*, (2005) para *C. albicans*. Estos autores han mencionado que la integridad del Spk depende de las proteínas que conforman el polarisoma, debido a que el

Spk es una estructura constituida por la acumulación de microvesículas y macrovesículas (McClure *et al.*, 1968; Girbardt, 1969; Grove y Bracker, 1970 y Howard, 1981). Estas microvesículas y macrovesículas de acuerdo con Harris *et al.*, (2005) y Howard (1981) rodean al núcleo o “core”, que corresponde a la región central del Spk, el cual es rico en F-actina. Por lo tanto, el Spk es una estructura rica en F-actina así como de otros componentes como son las forminas (Crampin *et al.*, 2005; Sharpless y Harris, 2002). Las forminas tienen la capacidad de nuclear a la F-actina y además de formar parte del complejo proteico llamado polarisoma, el cual polariza a la actina (Kovar, 2006) y la cual, de acuerdo con Akashi *et al.*, (1994) y Fuchs *et al.*, (2005) es esencial para el crecimiento apical.

López-Franco *et al.*, (1996) mediante microscopía con contraste de fases describen al núcleo del Spk en hifas maduras de *N. crassa* como una región central que se encuentra detrás del Spk. Uchida y Roberson (resultados no publicados) también mediante microscopía con contraste de fases muestran en *N. crassa* que el núcleo se encuentra detrás de lo que corresponde al Spk. Sin embargo en germinulas de *N. crassa* mediante microscopía confocal y utilizando el fluorocromo FM4-64 se ha reportado al núcleo en la parte central del Spk (Araujo-Palomares *et al.*, 2007). Por otra parte, en hifas maduras de *N. crassa* y mediante microscopía confocal de escaneo con láser Riquelme *et al.*, (2007) marcaron con GFP a la quitina sintetasa (CHS-GFP) y al Spk con el colorante vital FM4-64, reportando que la CHS-GFP se localiza en el ápice de forma concéntrica con el Spk, sugiriendo que la CHS-GFP se encuentra en el núcleo del Spk. En este trabajo las observaciones por contraste de fases y mediante el uso del FM4-64, sugieren que el núcleo del Spk en las hifas maduras del hongo *N. crassa* se localiza en la región central, pero justo



detrás del agregado de vesículas que corresponde al Spk. Esto sugiere que las diferencias reportadas en cuanto a la posición del núcleo del Spk puedan deberse a observaciones realizadas en diferentes planos focales. Por medio de microscopía electrónica de transmisión se ha determinado que el núcleo del Spk se encuentra localizado en la región central del cuerpo apical (Riquelme *et al.*, 2002).

La acumulación de Spa2 en regiones subapicales de las hifas de hongos filamentosos se ha relacionado con el proceso de ramificación. Bauer *et al.*, (2004) reportaron una acumulación de AgSpa2-GFP en sitios subapicales de las hifas de *A. gossypii*, determinando que esta acumulación correspondió a la iniciación de una ramificación lateral. En *N. crassa* se observó un evento muy interesante; muy cerca de la acumulación de Spa2-GFP en el ápice celular, se encontró una pequeña acumulación de Spa2-GFP proveniente de la acumulación principal. Posteriormente en este sitio se inició una ramificación lateral. Esto sugiere que posiblemente Spa2 en *N. crassa* interviene en los procesos de ramificación, sin descartar la posibilidad de que otro tipo de proteínas intervengan en el proceso inicial de la ramificación. Es posible que la función principal de Spa2 sea el mantenimiento de la polarización celular de *N. crassa* tanto de las hifas principales como en las hifas secundarias ya que en células en fase de emergencia del tubo germinal no se observa acumulación de Spa2 y una vez que las células se encuentran en fase de elongación del tubo es cuando la expresión de Spa2 es más fuerte.

Por otra parte, reportes previos en *S. cerevisiae* señalan que Spa2p está involucrada en el área de formación del septo entre la célula madre y la célula hija (Gehring y Snyder,

1990). Sin embargo Zheng *et al.*, (2003) señalaron que en *C. albicans* la distribución de Spa2 en los sitios de septación fue rara. Para el caso de los hongos filamentosos como es el caso de *A. gossypii* Knechtle *et al.*, (2003) mostraron que Spa2 (AgSpa2) se distribuye en sitios donde ocurrirá la formación de septos. Sin embargo en *N. crassa* al igual que en *A. nidulans* (Virag y Harris, 2006b), Spa2-GFP no se encontró involucrada en la formación de septos.

Con fines comparativos se determinó la tasa de elongación celular de las cepas de *N. crassa* que se utilizaron en este trabajo. Se determinó que la cepa marcada con GFP tiene un comportamiento similar a la cepa silvestre. Se presentaron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las cepas 9717 y la cepa NCLAP-2. Esto puede deberse a procesos fisiológicos como la mitosis y la formación de septos (Robinow, 1963); el ciclo celular (Fiddy y Trinci, 1976 y Trinci, 1978) y ramificaciones dicotómicas (Trinci, 1970 y Lysek, 1972). El hecho de que el valor de elongación celular que mostró la cepa 9717 haya sido menor que la tasa de crecimiento de 988 y NCLAP-2 pudo deberse a que esta cepa necesita que al medio de cultivo se le añada el aminoácido histidina para poder crecer, ya que la cepa por si sola no lo puede sintetizar debido a que tiene mutado el gen que codifica para tal aminoácido. Con respecto al valor de elongación celular que presenta la cepa NCLAP-2, este puede deberse al tipo de cepa que se utilizó al momento de llevar a cabo la transformación genética o bien, que al realizarse la cruce para obtener homocariontes, la cepa recuperó alguna función relacionada al desarrollo lo que le permitiera elevar su tasa de crecimiento. López-Franco *et al.*, (1994) reportan para *N. crassa* tipo silvestre una tasa de elongación celular de  $0.70\mu\text{m seg}^{-1}$  en observaciones mediante microscopía por contraste de

fases. Sin embargo, Winfree (1980) reporta una tasa de elongación celular de  $0.27\mu\text{m seg}^{-1}$ , Steele y Trinci (1975) reportaron para *N. crassa* una tasa de elongación de 0.36 y  $0.21\mu\text{m seg}^{-1}$  y Trinci (1974) reporta 0.19 y  $0.24\mu\text{m seg}^{-1}$ , en todos estos trabajos las mediciones se realizaron mediante imágenes fotográficas. Riquelme y Bartnicki-García (2004) reportaron una tasa de elongación de  $0.21\mu\text{m seg}^{-1}$  mediante microscopía por contraste de fases y mediante microscopía confocal de escaneo con láser la tasa de crecimiento reportada fue de 0.14 y  $0.16\mu\text{m seg}^{-1}$  (Riquelme *et al.*, 2007). López-Franco *et al.*, (1994) señalan que las diferencias en las tasas de elongación reportadas para *N. crassa* puede deberse a las diferencias en metodología por lo cual no es posible hacer comparaciones directas. En este trabajo las condiciones de cultivo para todas las cepas fueron las mismas, de manera que se pudo determinar de manera general que la cepa marcada con GFP tiene una tasa de crecimiento similar a la cepa silvestre. Es importante mencionar que la dirección de crecimiento de las hifas se mostró estable, lo que sugiere que el marcaje de Spa2 no afecta de manera significativa el desarrollo y comportamiento de *N. crassa*.

## X. CONCLUSIONES

1. Se establece que en el hongo *N. crassa* la proteína Spa2 se localiza exclusivamente en los ápices celulares.
2. Se sugiere que la proteína Spa2 interviene en el mantenimiento de la polaridad celular en el hongo *N. crassa*.
3. Se determinó que la proteína Spa2 colocaliza con el Spk en germínulas e hifas maduras de *N. crassa*, lo que sugiere fuertemente que el polarisoma es uno de los componentes necesarios para el ensamblaje del Spk y el crecimiento polarizado.
4. Se observó que la proteína Spa2 interviene en la formación de ramificaciones laterales en *N. crassa*.
5. Se encontró que la proteína Spa2 no interviene en la formación de septos en *N. crassa*.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A.E.M., D.I. Johnson, R.M. Longnecker, B.F. Sloat y J.R. Pringle. 1990.** *CDC42* y *CDC43*, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 111:131-142.
- Agrios, G.N. 1997.** *Plant Pathology*. 4th ed. Academia Press. London, United Kingdom. 635 p.
- Akashi, T., T. Kanbe y K. Tanaka. 1994.** The role of the cytoskeleton in the polarized growth of the germ tube in *Candida albicans*. *Microbiol.* 140:271-280.
- Alexopoulos, C.J. 1977.** *Introducción a la micología*. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 615 p.
- Amberg, D.C., E. Basart y D. Botstein. 1995.** Defining protein interactions with yeast actin *in vivo*. *Nat. Struct. Biol.* 2:28-35.
- Amberg, D.C., J.E. Zahner, J.W. Mulholland, J.R. Pringle y D. Botstein. 1997.** Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites. *Mol. Biol. Cell.* 8:729-753.
- Andersen, S.S. y G.Q. Bi. 2000.** Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays.* 22:172-179.
- Araujo-Palomares, C.L., E. Castro-Longoria y M. Riquelme. 2007.** Ontogeny of the Spitzenkörper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 44:492-503.
- Ayscough, K.R., J. Stryker, N Pokala, M. Sanders, P. Crews y D.G. Drubin. 1997.** High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J. Cell Biol.* 137:399-416.
- Bartnicki-García, S. 1981.** Cell wall construction during spore germination in Phycomycetes. En: Turian, G., and H.R. Hohl (eds.). *The Fungal Spore*. Academic Press. London, UK. 533-556 p.

- Bartnicki-García, S., F. Hergert y G. Gierz. 1989.** Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*. 153:46-57.
- Bartnicki-García, S., D.D.G. Gierz., R. López-Franco y C.E. Bracker. 1995.** Evidence that the Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp. Mycol.* 19:153-159.
- Bartnicki-García, S. 2002.** Hyphal tip growth: Outstanding question. *Molecular Biology of Fungal Development*. En: Osiewacz, H.D. (ed.). *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker. New York. 1-25 p.
- Bauer, Y., P. Knechtle, J. Wendland, H. Helfer y P. Philippsen. 2004.** A Ras-like GTPase is involved in hyphal growth guidance in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Biol. Cell.* 15:4622-4632.
- Bender, A. y J.R. Pringle. 1989.** 1989. Multicopy suppression of the *cdc42* budding defect in yeast by *CDC42* and three newly identified genes including the ras-related gene *RSR1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:9976-9980.
- Bourett, T.M. y R.J. Howard. 1989.** *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can. J. Bot.* 68:329-342.
- Bracker, C.E., D.J. Murphy y R. López-Franco. 1997.** Laser microbeam manipulation of cell morphogenesis in growing fungal hyphae. En: D.L. Farkas, B.J. Tromberg, (eds). *Functional Imaging and Optical Manipulation of Living Cells*. Bellingham, W.A: SPIE The International Society for Optical Engineering (Proceedings of SPIE Vol. 2983). 67-80 p.
- Brunswik, H. 1924.** Untersuchungen über die geschlechts und kernverhältnisse bei der hymenomyzetengattung *Coprinus*. En: Goebel, K. (ed.). *Botanische Abhandlung*. Gustav Fisher Verlag, Jena. 1-152 p.
- Caesar-Ton, C., K. Hoang-Van, G. Turian y H.C. Hoch. 1987.** Isolation and characterization of coated vesicles from filamentous fungi. *European J. of Cell Biol.* 43:189-194.

- Clay, R.P., J. Enkerli y M.S. Fuller. 1994.** Induction and formation of *Cochliobolus sativus* appressoria. *Protoplasma*. 178:34-47.
- Crampin, H., K. Finley, M. Gerami-Nejad, H. Court, C. Gale, J. Berman y P. Sudbery. 2005.** *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from polarisoma found in yeast and pseudohyphae. *J. Cell Biol.* 118:2935-2947.
- Davis, R.H. 2000.** *Neurospora*. Contributions of a model organism. Oxford. University press. 333 p.
- Davis, R.H. y D.D. Perkins. 2002.** *Neurospora*: a model of model microbes. *Nat. Rev. Genet.* 3:7-13.
- Deacon, J.W. 1990.** Introducción a la Micología Moderna. Ed. LIMUSA. México, D.F. 350 p.
- Dijksterhuis, J. 2003.** Confocal microscopy of Spitzenkörper dynamics during growth and differentiation of rust fungi. *Protoplasma*. 222:53-59.
- Drgonová, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollár, G.C. Chen, R.A. Ford, C.S.M. Chan, Y. Takai y E. Cabib. 1996.** Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*. 272:277-279.
- Ekundayo, J.A. y M.J. Carlile. 1964.** The germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*: spore swelling and germ-tube emergence. *J. Gen. Microbiol.* 35:261-269.
- Evangelista, M., K. Blundell, M.S. Longtine, C.J. Chow, N. Adames, J.R. Pringle, M. Peter y C. Boone. 1997.** Bni1, a yeast cytoskeleton forming linking Cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*. 276:118-121.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone y A. Bretscher. 2002.** Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* 4:32-34.
- Evangelista, M., S. Zigmund y C. Boone. 2003.** Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci.* 116:2603-2611.

- Fiddy, C. y A.P.J. Trinci. 1976.** Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 97:169-184.
- Fisher-Parton, S., R.M. Parton, P.C. Hickey, J. Dijksterhuis, H.A. Atkinson y N.D. Read, 2000.** Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analyzing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. J. Microsc. 198:246-259.
- Fletcher, J. 1969.** Morphological and nuclear behaviour of germinating conidia of *Penicillium griseofulvum*. Transactions of the British Mycological Society. 53:425-432.
- Freitag, M., P.C. Hickey, N.B. Raju, E.U. Selker y N.D. Read. 2004.** GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. Fung. Genet. Biol. 41:897-910.
- Fuchs, U., I. Manns y G. Stainberg. 2005.** Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. Mol. Biol. Cell. 16:2746-2758.
- Gehring, S. y M. Snyder. 1990.** The *SPA2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is important for pheromone-induced morphogenesis and efficient mating. J. Cell Biol. 111:1451-1464.
- Girbardt, M. 1957.** Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor*. Planta. 50:47-59.
- Girbardt, M. 1969.** Die ultrastruktur der apikalregion von pilzhyphen. Protoplasma. 67:413-441.
- Glynn, J.M., R.J. Lustig, A. Berlin y F. Chang. 2001.** Role of Bud6p and tea1p in the interaction between actin and microtubules for the establishment of cell polarity in fission yeast. Curr. Biol. 11:836-845.
- Gooday, G.W. 1995.** The dynamics of the growth. Mycol. Resear. 99:385-394.
- Greene, D.R., G. Koenig., M.C. Fisher y J.W. Taylor. 2000.** Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. Mycologia. 92:406-410.



- Grove, S.N. y C.E. Bracker. 1970.** Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and spitzenkörper. *J. Bact.* 104:989-1009.
- Grove, S.N. 1978.** The cytology of hyphal tip growth. En: *The Filamentous Fungi* (Smith J.E., Berry D.R. Eds.). Arnold, London. 28-50 p.
- Grove, S.N. y J.A. Sweigard. 1981.** The Spitzenkörper persists after tip growth is arrested by cytochalasins. *Mycol. Soc. Am. Newsl.* 32:33.
- Gow, N.A.R. 1995.** Tip growth and polarity. En: Gow N.A.R., G.M. Gadd (eds), *The growing fungus*. Chapman & Hall, London. 277-299 p.
- Gull, K. y A.P.J. Trinci. 1971.** Fine structure of spore germination in *Botrytis cinerea*. *J. General Microbiol.* 68:207-220.
- Harris, S.D. y M. Momany. 2004.** Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fung. Genet. Biol.* 41:391-400.
- Harris, S.D., N.D. Read, R. W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann y M. Momany. 2005.** Spitzenkörper meets polarisoma: microscopy, genetics, and genomics coverage. *Eukaryot. Cell.* 4:225-229.
- Heath, I.B. 1990.** Tip growth in plant and fungal cells. Academic Press. San Diego. 211-232 p.
- Hepler, P.K., L. Vidali y A.Y. Cheung. 2001.** Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 17:159-187.
- Hickey, P.C., D.J. Jacobson, N.D. Read y N.L. Glass. 2002.** Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 37:109-119.
- Hickey, P.C. y N.D. Read. 2003.** Biology of living fungi. CD-ROM. British Mycological Society, Stevenage, U.K.

- Hickey, P.C., S.R. Swift, M.G. Roca y N.D. Read. 2004.** Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology*. 34:63-87.
- Hoch, H.C. y R.C. Staples. 1983.** Ultrastructural organization of the non-differentiated urediospore germling of *Uromyces phaseoli* variety *typical*. *Mycol.* 75:795-824.
- Howard, R.J. y J.R. Aist. 1979.** Effects of MBC on hyphal tip organization, growth, and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D<sub>2</sub>O. *Protoplasma*. 92:195-210.
- Howard, R.J. 1981.** Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J. Cell Science*. 48:89-103.
- Imai, J., A. Toh-e y Y. Matsui. 1996.** Genetics analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RHO3 gene, encoding a Rho-type small GTPase, provides evidence for role in bud formation. *Genetics*. 142:359-369.
- Irazaqui, J.E. y D.J. Lew. 2004.** Polarity establishment in yeast. *J. Cell Science*. 117:2169-2171.
- Jhonson, D.I. y J.R. Pringle. 1990.** Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J. Cell. Biol.* 111:143-152.
- Kamada, Y., H. Qadota, C.P. Python, Y. Anraku, Y. Ohya y D.E. Levin. 1996.** Activation of protein kinase C by Rho1 GTPase. *J. Cell Chem*. 271:9193-9196.
- Katz, D., D. Goldstein y R.F. Rosenberger. 1972.** Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *J. Bacteriol.* 109:1097-1100.
- Knechtle, P., F. Dietrich y P. Philippsen. 2003.** Maximal polar growth potential depends on the polarisoma component AgSpa2 in filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Biol. Cell*. 14:4140-4154.

- Kovar, D.R. 2006.** Molecular details of forming-mediated actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:11-17.
- Kropf, D.L. 1992.** Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes. *Microbiol. Rev.* 56:316-339.
- Kwon, Y.H., H.C. Hoch y J.R. Aist. 1991.** Initiation of appressorium formation in *Uromyces appendiculatus*: organization of the apex, and the responses involving microtubules and apical vesicles. *Can. J. Bot.* 69:2560-2573.
- López-Franco, R., S. Bartnicki-García y C.E. Bracker. 1994.** Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:12228-12232.
- López-Franco, R. y C.E. Bracker. 1996.** Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma.* 195:90-111.
- Lysek, G., 1972.** Rhythmic micelial growth in *Podospora anserine*. *Arch. Microbiol.* 87:129-137.
- Maheshwari, R. 1991.** Microcycle conidiation and its genetic basis in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 137:2103-2115.
- Matsui, Y. y A. Toh-e. 1992.** Yeast *RHO3* and *RHO4* ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes *CDC42* and *BEMI*. *Mol. Cell Biol.* 12:5690-5699.
- McClure, W.K., D. Park y P.M. Roberson. 1968.** Apical organization in the somatic hyphae of fungi. *J. Microbiol.* 50:177-182.
- McDaniel, D.P. y R.W. Roberson. 2000.** Microtubules are required for vesicles and mitochondria movility and positioning in hyphal tip cells of *Allomyces nacrogyne*. *Fung. Genet. Biol.* 31:233-244.
- Mouriño-Pérez, R.R., R.W. Roberson y S. Bartnicki-García. 2006.** Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 43:389-400.

- Nelson, W.J. 2003.** Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature*. 422:766-774.
- Peñalva, M.A. 2005.** Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fung. Genet. Biol.* 42:963-975.
- Prosser, J.I. y P.J. Trinci. 1979.** A model for hyphal growth and branching. *J. Gen. Microbiol.* 111:153-164.
- Reynaga-Peña, C., G. Gierz y S. Bartnicki-García. 1997.** Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. *Cell Biol.* 94:9096-9101.
- Riquelme, M., C.G. Reynaga-Peña., G. Gires y S. Bartnicki-García. 1998.** What determines growth direction in fungal hyphae? *Fung. Genet. Biol.* 24:101-109.
- Riquelme, M., G. Gierz. y S. Bartnicki-García. 2000.** Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiol.* 146:1743-1752.
- Riquelme, M., R.W. Roberson, D.P. McDaniel y S. Bartnicki-García. 2002.** The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 37:171-179.
- Riquelme, M., y S. Bartnicki-García. 2004.** Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 41:842-851.
- Riquelme, M., S. Bartnicki-García, J.M. González-Prieto, E. Sánchez-León, J.A. Verdín-Ramos, A. Beltrán-Aguilar y M. Freitag. 2007.** Spitzenkörper localization and intracellular traffic of GFP-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Euk. Cell.* Aceptado.
- Roberson, R.W. y M.M. Vargas. 1994.** The tubulin cytoskeleton and its sites of nucleation in hyphal tips of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma.* 182:19-31.

- Robinson, N.G.G., L. Guo, J. Imai, A. Toh-e, Y. Matsui y F. Tamanai. 1999.** Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol. Cell. Biol.* 19:3580-3587.
- Robinow, C.F. 1963.** Observation on cell growth, mitosis and division in the fungus *Basidiobolus ranarum*. *J. Cell Biol.* 17:123-152.
- Roemer, T., L. Vallier, Y. J. Sheu y M. Snyder. 1998.** The Spa2-related protein, Sph1p, is important for polarized growth in yeast. *J. Cell Sci.* 111:479-494.
- Sagot, I., S.K. Klee y D. Pellman. 2002a.** Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4:42-50.
- Sagot, I., A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode y D. Pellman. 2002b.** An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profiling. *Nat Cell Biol.* 4:626-631.
- Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001.** Molecular cloning, a laboratory manual. Third edition. Press Cold Spring Harbor. New York.
- Schmit, J.C. y S. Brody. 1976.** Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol. Rev.* 40:1-41.
- Seiler, S. y M. Plamann. 2003.** The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell.* 14:4352-4364.
- Sharplessn, K.E. y S.D. Harris. 2002.** Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* forming SEPA. *Mol. Biol. Cell.* 13:469-479.
- Sheu, Y.J., B. Santos, N. Fortín, C. Costigan y M. Zinder. 1998.** Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* 18:4053-4069.
- Sheu, Y.J. y M. Snyder. 2001.** Control of cell polarity and shape. En: Howard, R.J., N.A.R. Gow (eds.). *The mycota. Biol. Fungal Cell.* Vol. VIII. Springer-Verlag, Berlin. 19-53 p.

- Shih, J.L., S.L. Reck-Peterson, R. Newitt, M.S. Mooseker, R. Aebersold e I. Herskowitz. 2005.** Cell polarity protein Spa2p associates with proteins involved in actin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 16:4595-4608.
- Snyder, M. 1989.** The *SPA2* protein of yeast localizes to sites of cell growth. *J. Cell Biol.* 108:1419-1429.
- Srinivasan, S., M.M. Vargas y R.W. Roberson. 1996.** Functional, organizacional, and biochemical análisis of actin in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Mycologia.* 88:57-70.
- Steele, G. y A.P.J. Trinci. 1975.** Morphology and growth kinetics of differentiated and undifferentiated mycelia of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 91:362-368.
- Steinberg, G. 2007.** Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryotic Cell.* 6:351-360.
- Trinci, A.P.J. 1971.** Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies. *J. Gen. Microbiol.* 67:325-344.
- Trinci, A.P.J. 1974.** A study of the kineticks of hyphal extension and branch initiation of fungal micelia. *J. Gen. Microbiol.* 81:225-236.
- Trinci, A.P.J. 1978.** The duplication cycle and vegetative development in moulds. En: *The filamentous fungi.* Vol. 3 (Shmith, J.E. y D.R., Berry Eds.) Halsted Press Book. New York. 132-163 p.
- Trinci, A.P.J. 1984.** Regulation of hyphal branching and hypal orientation. The ecology and physiology of the fungal mycelium. En: *Symposium of British Mycological Society.* (H. H. Jennings and A. D. M. Ranger Eds). 23-52 p.
- Valtz, N. e I. Herskowitz. 1996.** Pea2 protein of yeast is localized to sites of polarized growth and is required for efficient mating and bipolar budding. *J. Cell Biol.* 135:725-739.

- Van Drogen y F., M. Peter. 2002.** Spa2 functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr. Biol.* 12:1698-1703.
- Van Etten, J.L., L.D. Dunkle y S.N. Freer. 1977.** Germination of *Rhizopus stolonifer* sporangiospores. En: *Eukaryotic microbes as model developmental systems.* (D.M.O. Day y P.A. Horgen Eds). Marcel Dekker. New York. U.S.A. 372-374 p.
- Vargas, M., J.M. Aronson y R.W. Roberson. 1993.** Cytological organization of hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma.* 176:43-52.
- Virag, A. y S. D. Harris. 2006a.** The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycol. Res.* 110:4-13.
- Virag, A. y S. D. Harris. 2006b.** Functional characterization of *Aspergillus nidulans* homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spa2 and Bud6. *Eukaryot. Cell.* 5:881-895.
- Vogel, H.J. 1956.** A convenient growth medium for *Neurospora*. *Microbial Genet. Bull.* 13:42-43.
- Wainright, J. 1992.** An introduction to fungal biotechnology. John Wiley, New York, N.Y. 202 p.
- Walsh, T.J., A. Groll, J. Hiemenz, R. Fleming, E. Roilides y E. Anaissie. 2004.** Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:48-66.
- Watters, M.K. y A.J.F. Griffiths. 2001.** Tests of a cellular model for constant branch distribution in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67:1788-1792.
- Westergaard, M. y H.K. Mitchell. 1947.** *Neurospora* V: a synthetic medium favoring sexual production. *Am. J. Bot.* 34:573-574.
- Wiggin, G.R., J.P. Fawcett y T. Pawson. 2005.** Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis. *Develop. Cell.* 8:803-816.

**Winfree, A.T. 1980.** The geometry of biological time. Springer-Verlag, New York. 777 p.

**Wu, Q., T.M. Sandroock., B.G. Turgeon., O.C. Yoder., S.G. Wirsal y J.R. Aist. 1998.** A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 9:89-101.

**Zheng, Y., R. Cerione y A. Bender. 1994.** Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and simulation of GTPase activity by Bem3. *J. Biol. Chem.* 269:2369-2372.

**Zheng, X.D., Y.M. Wang y Y. Wang. 2003.** *CASP2* is important for polarity establishment and maintenance in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 49:1391-1405.



## XII. APÉNDICE A

### *XII.1 Solución de sales de Vogel*

**Cuadro I.** Solución madre para preparar medio de Vogel (Vogel, 1956).

<b>Constituyentes:</b>	<b>Formula:</b>	<b>Cantidad:</b>
1. Sales de Vogel (50X)		g/750 mL de agua destilada
1.1 Citrato de Sodio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	150 g
1.2 Fosfato de Potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{anhidro}$	250 g
1.3 Nitrato de Amonio	$\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{anhidro}$	100 g
1.4 Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 g
1.5 Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5 g
Añadir con agitación:		
1.6 Solución de elementos traza		5 mL
1.7 Solución de Biotina		2.5 mL

**NOTA:** Al resultado total que equivale a 1 L se le añade 2mL de cloroformo como agente preservador.

### *XII.2 Solución de elementos traza.*

**Cuadro II.** Fórmula para preparar solución de elementos traza (Vogel, 1956).

<b>Constituyentes:</b>	<b>Formula:</b>	<b>Cantidad:</b>
2. Solución de elementos traza		g/95ml de agua destilada
2.1 Ácido cítrico	$C_6H_8O_7 \cdot 1 H_2O$	5 g
2.2 Sulfato de Zinc	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	5 g
2.3 Sulfato de Amonio Ferroso	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	1 g
2.4 Sulfato de Cobre	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.25 g
2.5 Sulfato de Manganeso	$MnSO_4 \cdot 1 H_2O$	0.05 g
2.6 Ácido Bórico	$H_3BO_3 \cdot \text{anhidro}$	0.05 g
2.7 Molibdato de Sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0.05 g

**NOTA:** El resultado total que equivale a 100 mL se le añade 1mL de cloroformo como agente preservador.

### *XII.3 Solución de biotina*

**Cuadro III.** Fórmula para preparar solución de Biotina (Vogel, 1956).

<b>Constituyentes:</b>	<b>Formula:</b>	<b>Cantidad:</b>
3. Solución de Biotina	Biotina	5 mg/50 mL de agua destilada

### XIII. APÉNDICE B

#### *XIII.1 Solución de sales para cruza 2X*

**Cuadro I.** Solución madre para preparar medio sintético para cruza (Westergaard y Mitchell, 1947).

<b>Constituyentes:</b>	<b>Formula:</b>	<b>Cantidad:</b>
1. Nitrato de potasio	$\text{KNO}_3$	2.0 g
1.1 Fosfato de potasio dibásico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.4 g
1.2 Fosfato de potasio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.0 g
1.3 Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.0 g
1.4 Cloruro de sodio	$\text{NaCl}$	0.2 g
1.5 Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2$	0.2 g
1.6 Biotina		10 mg
1.7 Solución de elementos traza		0.2 mL
1.8 Agua destilada	$\text{H}_2\text{O}$	1000 mL
1.9 Cloroformo	$\text{CHCl}_3$	2 mL

**NOTA:** Al resultado total que equivale a 1 L se le añade 2mL de cloroformo como agente preservador.

**XIV. APÉNDICE C*****XIV.1 Solución FGS 10X*****Cuadro I.** Solución madre para preparar medio agar FGS.

<b>Constituyentes:</b>	<b>Formula:</b>	<b>Cantidad:</b>
1. Fructosa	$C_6H_{12}O_6$	5 g
1.2 Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	5 g
1.3 Sorbosa	$C_6H_{12}O_6$	200 g
1.4 Agua destilada	$H_2O$	1000 mL

**NOTA:** Al resultado total equivale a 1 L; se esteriliza por filtración.

## XV. GLOSARIO

**ARP2/3:** Complejo proteico el cual es altamente conservado en la nucleación de actina requerido para la motilidad y la integridad de los parches de actina; así mismo se encuentra involucrada en la endocitosis, crecimiento de la membrana celular y polaridad celular.

**Artrosporas:** Esporas que resultan de la fragmentación de una hifa.

**Ascogonio:** Gameto femenino de los ascomicetos.

**BNII:** Proteína tipo formina que nuclea la formación lineal de los filamentos de actina. También se encuentra involucrada en procesos celulares tales como la gemación y orientación del cuerpo polar en la mitosis el cual requiere de la formación de filamentos de actina polarizadas.

**BUD6:** Componente del polarisoma, involucrada en la nucleación de los filamentos de actina y crecimiento celular polarizado; potencial substrato de Cdc28.

**CDC24:** Factor de intercambio del nucleótido guanina (GEF o nGDP) para Cdc42; requerida para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular; las mutantes deficientes de esta proteína tienen defectos morfológicos en la formación de la yema y el shmoo.

**CDC42:** Pequeña rho GTPasa esencial para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular; las mutantes presentan defectos en la organización de la actina y de las septinas.

**DNA:** (ácido desoxirribonucleico). Polímero largo lineal, compuesto de cuatro tipos de nucleótidos de desoxirribosa, que es el portador de la información genética. En su estado nativo, el DNA es una doble hélice de dos hebras antiparalelas mantenidas juntas mediante enlaces de hidrógeno entre bases de purinas y pirimidinas complementarias.

**DNA ligasa:** Enzima que une el extremo 3' de un fragmento de DNA con el extremo 5' de otro y forma una hebra continua.

**DNA polimerasa:** Enzima que copia una hebra de DNA (hebra molde) para formar la hebra complementaria, que compone una nueva molécula de DNA de doble hebra. Todas la DNA polimerasas añaden desoxirribonucleótidos de a uno por vez en la dirección 5'-3' al extremo 3' de un cebador corto preexistente de DNA o RNA.

**Electroforesis:** Cualquiera de diversas técnicas para la separación de macromoléculas basada en su migración en un gel u otro medio sometido a un fuerte campo eléctrico.

**Enzima de restricción:** Enzima que reconoce y rompe DNA de doble cadena en sitios específicos de la secuencia de DNA.

**Espermacio:** Estructuras parecidas a esporas, aflageladas, inmóviles, uninucleadas, masculinas, que durante la plasmogamia vacían su contenido dentro de hifas receptoras femeninas.

**Gen:** Unidad física y funcional de herencia que transporta información de una generación a la siguiente. En términos moleculares, es la secuencia completa de DNA incluidos exones e intrones y regiones no codificantes de control de transcripción necesaria para la producción de una proteína funcional o RNA.

**Genotipo:** Constitución génica precisa de un organismo, en la que generalmente se destacan alelos particulares en uno o más locus específicos.

**Marco de lectura abierta:** Secuencia de DNA que al ser transcrita origina una proteína de composición definida.

**MKK1:** Proteína involucrada en la señalización de la proteína cinasa C que controla la integridad celular.

**Oligonucleótido:** Secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'-hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y que actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

**PCR:** (reacción en cadena de la polimerasa). Técnica para amplificación de un segmento específico de DNA en una mezcla compleja mediante múltiples ciclos de síntesis de DNA a partir de oligonucleótidos o cebadores cortos, seguidos por un breve tratamiento con calor para separar las hebras complementarias.

**PEA2:** Proteína requerida para la morfogénesis polarizada, fusión celular y baja afinidad a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ); forma parte del complejo proteico polarisoma y se

localiza en los sitios de crecimiento polarizado.

**Plásmido:** Elemento genético extracromosomal que no tiene forma extracelular.

**Polarización:** Proceso de crecimiento localizado en una región discreta de la célula, el cual es fundamental para numerosas funciones celulares incluyendo la diferenciación, proliferación y morfogénesis.

**Proteína:** Polipéptido o grupo de polipéptidos que forman una molécula con una función biológica específica.

**SPA2:** Componente del polarisoma, el cual funciona en la organización del citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado; actúa como un andamio para las proteínas Mkk1 y Mpk en los componentes de señalización de la integridad de la pared celular; potencial sustrato de la proteína Cdc28.

**Transformación:** Alteración permanente hereditaria en una célula que resulta de la captación e incorporación de un DNA foráneo dentro del genoma de la célula huésped.

**Tricógina o tricógino:** Hifa receptiva, o cuello del ascogonio en forma de filamento, que se encarga de captar los espermacios durante la reproducción sexual de algunos ascomicetos.

**Vector de clonación:** Elemento genético de replicación autónoma utilizado para transportar un fragmento de DNA a una célula huésped con el propósito de la clonación de genes.

