

TESIS DEFENDIDA POR  
**Silvia Lucrecia Ramos García**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez  
*Director del Comité*

---

Dr. Robert W. Roberson  
*Miembro del Comité*

---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Jorge Adrián Rosales Casián  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
*Coordinador del programa de posgrado en  
Ciencias Acuicultura y Biotecnología  
Marina*

---

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

12 de Diciembre de 2006

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



---

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

---

**PAPEL DEL FLUJO CITOPLASMÁTICO Y LAS PROTEÍNAS MOTORAS  
ASOCIADAS A LOS MICROTUBULOS EN EL DESPLAZAMIENTO NUCLEAR  
EN HONGOS FILAMENTOSOS**

TESIS

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

Presenta:

**SILVIA LUCRECIA RAMOS GARCIA**

Ensenada, Baja California, México, Diciembre de 2006.

## AGRADECIMIENTOS

Una vez más heme aquí agradeciendo a medio mundo y principalmente a **Dios** por otro final en mi vida:

A **CONACYT** por ser buena onda y apoyarme económicamente antes, durante y después de mi ciclo de posgrado.

Al **DM** por abrirme las puertas y ser mi hogar desde Octubre de 2003 que pisé por primera vez mi casita de chocolate 7 cuando andaba en busca de mis prácticas profesionales y mi tesis de licenciatura.

Al **Dr. Bartnicki** por aceptar estudiantes en el DM y soportar mis risas y gritos por todo el Lab de Micro.

A mi asesora: **Dra. Rosa**, por creer en mí y arriesgarse a que fuera su primer estudiante de pre y posgrado. Mil gracias porque siempre estuvo atenta a resolver dudas y problemas cuando no andaba en las agotables juntas del CPP y “no sé que más”.. y porque sin usted, los “regaños” y su confianza el ‘pos’ tal vez no hubiera existido y ahora estaría en la calle primera haciendo macramé o vendiendo tacos de pescado..

A mi Comité de Tesis: **Dra. Elizabeth, Dr. Jorge**; por sus comentarios, sugerencias y ayuda en la elaboración de mi Proyecto. –**Professor Robby**, thank you for all of your comments, suggestions and help to make my Master Thesis.

Al **Dr. Freitag** por su colaboración en la transformación de cepas de *N. crassa* marcadas con proteínas fluorescentes. A *N. crassa* por ser mi honguito preferido y darme la oportunidad de observarlo una y otra en nuestro super Confocal Zeiss con el que hasta canas con GFP nos salieron, pero gracias **Confocal** pues sin tí no sé que hubiera sido de mis proyectos.

Al ex-técnico y webmaster: **Ricardo**, por toda la paciencia entre cables y aparatos, programas que se rehusaban a funcionar y correos-e que no llegaban para corregir a *dm.web*.

A las investigadoras del DM: **Tina** y **Txell**; por darme la confianza de acudir a ustedes en los momentos en que mi “jefa, dueña, ama y amá” no se encontraba disponible por las famosas reuniones que ya mencioné. A los estudiantes del DM: **Aurora, Alejandro, Eddy, Cynthia, Raúl, Mario, Roberto, Olga, Jorge, Paulo, Rossy, Diego** y **Leonardo** por ser tan obedientes cuando me ponía gruñona, delicada y a cantar por todo el lab.

Al personal de apoyo del DM: **Ruth, Dolores, Myriam** y **Eva**, que siempre estuvieron al pendiente de todo. Al personal de Servicios Escolares: **Citlali, Dolores** e **Ivon**, por su amabilidad y paciencia principalmente durante las reinscripciones.

Y a aquellos que casi siempre pasan desapercibidos (guardias, mensajeros, intendentes, jardineros, técnicos, carpinteros); que sin querer me escuchaban cantar rumbo a mi casita 7 o en el nuevo edificio. A mi casita 7 por la hermosa vista panorámica (a mi árbol, mi mecedora y mi roca por permitirme respirar en momentos abrumadores); y al nuevo edificio, por “darme mi espacio”..

*Nobody said it was easy. No one ever said it would be this hard. (C)*

A mi familia, una vez más, por su comprensión cuando tenía que salir de viaje o no me daba tiempo de visitar. **Pá**, gracias por el cariño siempre demostrado con un zapatazo; **Má**, gracias por no amarrarme a la pata de la cama para que no saliera de casa; **Mary**, sin tí mis alas hubieran tardado en extenderse; **Aix**, sin tu “compañía” mi casita no hubiera sido la misma (a nadie hubiera tenido que regañar por los vasos y platos regados -jjijji); **Antonio**, tus locuras por msn siempre sacaban la característica sonrisa de caballito; **Dianna**, gracias por aparecer en el camino pues gracias a ti mi hermanito también accedía a mis caprichitos; **Dianna** y **Toño**, por ayudarme a no olvidar que un niño siempre será niño y que no quiero nunca dejar de serlo. A **J**, por ser mi nuevo hermanito y cuidarme tanto cuando paseábamos juntos por las calles de Ens. A mi **Gorda**, por ser la gatita más linda del mundo y a la **Pancha**, por ser ese gato que portaba bien su título de gato; espero que ambos estén bien pues “los gatos también se van al cielo”.. y principalmente a mi **Punky**, por ser mi hermanito menor y el único que ha llegado a entender cada uno de mis sentimientos, pensamientos, secretos, lágrimas y sonrisas, por volverse loco cuando voy acercándome a la puerta de casa y por su carita de confusión cada que tengo que partir.. MIL GRACIAS..

Y no podía faltar mi otra familia:

“Los que pasaron” (que no mencionaré por obvias razones), porque de ustedes aprendí lo que tuve que aprender en el tiempo necesario para después decir ‘adios’ sin remordimiento.

“Los que llegaron”, por todo su cariño y su complicidad en los momentos ‘Lú’ que han tenido que soportar. **LKB**, por permitirme descargar mi estrés en mi tan amado costalito pues aunque corta, ha sido de las mejores etapas de mi vida. **Eduardo**, mil gracias por toooodas las cotizaciones y porque nunca me dijiste “le sigo mañana porque ya es hora de dormir”. **Gaby**, mi asistente de compras, por todos tus consejos y confidencias; **Auro**, por tu ayuda y psicología cuando me volvía más loca; **Ana**, la linda niña, tú fuiste mi gran amiga y mi consuelo cuando dí una de las más fuertes decisiones de mi vida; **Silvia**, por ser otra confidente y por tantas palabras lindas que siempre levantan el ánimo; **Olga**, por lo momentos agradables entre PCRs, hibridaciones y geles de electroforesis; **Ruth**, por apoyarme en una que otra locura y antojo; mi **Dra**, por tolerar todos mis malos chistes y gestos; y no podía faltar **R**, mi siempre técnico de lab –especialmente con mi maquinita– mil gracias pues de mis tres años en cicese, dos fueron geniales entre bromas, risas, juegos y los buenos escapes a nuestra mecedora al lado de nuestro árbol de nuestra casita 7 para contemplar nuestra bella vista panorámica...

“Los de cajón” por ser mi vida. **Carlos**, gracias por tu amistad pues aunque la comunicación no se logre con el ‘wireless’ tú sabes que siempre habrá un abrazo esperándote. **Polo**, aún lejos siempre estás cerca. **Alex**, mi siempre amado Alex, toda la buena vibra para ser un excelente biólogo-científico-investigador-doctor de gatitos o de lo que sea al igual que el buen **Chalito**, que siempre serás el niño lindo que todo mundo adoramos. **Richie**, gracias a tí muchas cosas pude superar pues me ayudaste a ver mi vida desde otro ángulo. **Amanda**, contigo se aprende qué tan diferentes pueden ser las personas. **Marlenne**, porque inspiras a continuar en la investigación cuando tan emocionada hablas de tus nuevas aventuras en las islas. Los quiero, los adoro.. muchísimas gracias...

*Some days don't come easy, some days don't come hard, some days don't come at all and these are the days that never end. (M)*

Pero aún no acabo: **Carol**, mi bombón de chocolate, mi crayola rosita, mi huesito de durazno, mi gotita de lluvia en la cara; millones y millones de gracias pues de todos tú eres quien mejor me ha entendido desde hace más de cinco años cuando aún en la carrera lloriqueábamos por nuestros corajes, problemas y temores; y ahora durante la MC supimos perfectamente qué sentíamos y creo ayudó mucho en los momentos de consuelo. Y una vez más, **R**, pues entre tantas travesuras me has enseñado miles de cosas desde técnicas hasta personales: por ser mi técnico de lab y seguirme ayudando con mi maquinita y mi piuter aún estando a 3000 Km de distancia, por tantos detallitos que me enseñaste de Photoshop, por hacerme tu asistente para la página del DM, por ayudarme en la edición de imágenes en todos mis proyectos y ayudarme con el super logo del DM, por heredarme a pamplona-CICESE, tus canciones, tus películas, soundtracks, viajes, por tantos caprichos ‘lú’ concedidos, por la paciencia de hacer “una guerrera más a golpes”, por enseñarme a sacar mounstros con ocho ojitos de mi changarro, por tu linda silla en casa donde siempre será rico tirarse a soñar y cantar, por ayudarme a ver la verdad detrás del silencio, por despertarme de mi largo sueño de bella durmiente y por seguir ahí después de tantas y tantas preguntas que nunca tendrán respuesta, ahí como solo un VERDADERO AMIGO puede estar; MIL, MIL GRACIAS.

Finalmente gracias a **SM, H<sup>3</sup>, J, JD, MM** y **MD** que siempre serán mi “talón de Aquiles”..

*Remember to fall in love several times in your life (ad).*

Y gracias también a quien se dé un poco de tiempo para leer esta Tesis de Maestría enfocada al desplazamiento nuclear y citoplasmático de la linda mascota del DM *Neurospora crassa*.

*Biol. Lú Ramos*

*When you are with me, I'm free, I'm careless, I' believe. Above all the others we'll fly. This brings tears to my eyes. (C)*

## DEDICATORIA

*todas las sonrisas y lágrimas, gritos y silencios, deseos y realidades, viajes y encierros, sueños y desvelos, lo negro y lo blanco.. toda la esencia que fluye; avanza, retrocede y se detiene (con o sin proteínas motoras).. todo lo que en algún momento ha sido parte de 'Lú'; todo lo que me permitió seguir sentada frente a mi maquinita y continuar midiendo núcleo a núcleo entre las ventanitas incesantes de msn..*

*todo eso que nunca se podrá sentir más allá de sentirse.. y todo esto que puede tocarse se lo dedico a la vida por ser una montaña rusa; a mis padres por aguantar las barbaridades de sus locos hijos; a mis hermanos (TODOS) por conceder tantos deseos de hermanita menor; a mis amigos por intentar siempre entender lo que por mis ideas pasaba; y al amor por ser la esencia de la vida pues sé que en algún momento se cruzará por mi camino (por ahí de los 40)..*

*Don't ever stop being who you are and don't ever ask anybody else how your match was. (SM, 2005)*

## CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	
1. Problema	9
2. Hipótesis	9
3. Objetivo general	10
4. Objetivos particulares	10
<b>III. METODOLOGÍA</b>	
1. Organismos y medios de cultivo	11
2. Medición del desplazamiento nuclear y el crecimiento de hifas de <i>N. crassa</i>	12
3. Efecto de la despolimerización de microtúbulos con benomilo en el desplazamiento nuclear	13
4. Efecto de la despolimerización de los microfilamentos de actina con Citocalasina A en el desplazamiento nuclear	14
5. Técnica de cruce para la obtención de mutantes sencillas ( <i>ropy-1</i> , <i>ropy-3</i> , $\Delta$ <i>nkin</i> ) y una doble mutante <i>ropy-1/\Delta</i> <i>nkin</i> con los núcleos marcados con GFP	15
6. Microscopía Confocal	17
7. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP)	18
8. Almacenamiento de datos y análisis estadístico	19
<b>IV. RESULTADOS</b>	
1. Curva de sensibilidad a MBC	20
2. Curva de sensibilidad a CA	21
3. Morfología de la hifa e índice de elongación del micelio	22
4. Distribución y desplazamiento nuclear	24
5. Zona de exclusión de los núcleos	32
6. Morfología de los núcleos	33
7. Tasa de elongación y de desplazamiento nuclear	35
8. Tasa global de elongación y desplazamiento nuclear	38
9. Análisis de regresión lineal de la elongación de la hifa y el desplazamiento nuclear	39
10. Dirección de los movimientos nucleares durante el crecimiento celular	42
11. Velocidad de desplazamiento de los núcleos	43
12. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP)	45

## CONTENIDO (continuación)

	Página
13. Organización del citoesqueleto microtubular de <i>N. crassa</i>	46
<b>V. DISCUSION</b>	47
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	53
<b>VII. REFERENCIAS</b>	54
<b>VII. ANEXOS</b>	
Anexo A	62
Anexo B	63



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de la estructura del complejo dineína-dinactina	6
2	Diagrama de flujo de la técnica de cruzas para inducir al ciclo sexual de <i>N. crassa</i> .	16
3	Curva de sensibilidad de <i>N. crassa</i> transformada con los núcleos marcados con GFP después de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de MBC. Se incubó a 28 °C. (▪) media; (□) error estándar; y (I) intervalo de confianza al 95 %.	20
4	Curva de sensibilidad de <i>N. crassa</i> transformada con los núcleos marcados con GFP después de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de CA. Se incubó a 28 °C. (▪) media; (□) error estándar; y (I) intervalo de confianza al 95 %.	21
5	Imágenes por contraste de fase de hifas de <i>N. crassa</i> . (a) Control; (b) <i>ropy-1</i> ; (c) <i>ropy-3</i> (d) $\Delta$ <i>ankin</i> ; (e) <i>ropy-1/\Delta</i> <i>ankin</i> . Las flechas indican el Spk; las cabezas de flecha a las mitocondrias y los asteriscos a los núcleos. Escala = 2 $\mu$ m.	23
6	Índice de crecimiento colonial de las cepas <i>N. crassa</i> con los núcleos marcados con GFP, a las 24 horas de incubación a temperatura ambiente. Se indica la media y el intervalo de confianza al 95 %.	24
7	Serie de tiempo por microscopia confocal de <i>N. crassa</i> transformada con núcleos marcados con GFP. Se muestran imágenes sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las flechas indican la localización del Spk y las cabezas de flecha señalan al primer núcleo. Tiempo en min:s. Escala = 10 $\mu$ m.	25
8	Serie de tiempo por microscopia confocal de <i>N. crassa</i> transformada con núcleos marcados con GFP con mutación en gen <i>ro-1</i> (a-e) y el gen <i>ro-3</i> (f-j). Se muestran imágenes sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las flechas indican la localización del Spk y las cabezas de flecha señalan al primer núcleo. Tiempo en min:s. Escala = 10 $\mu$ m.	27

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
9	Serie de tiempo por microscopía confocal de <i>N. crassa</i> transformada con núcleos marcados con GFP con mutación en gen <i>Ankin</i> (a-e) y la doble mutante <i>ropy-1/Ankin</i> (f-j). Se muestran imágenes sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las cabezas de flecha señalan al primer núcleo. Tiempo en min:s. Escala = 10 $\mu$ m.	28
10	Serie de tiempo por microscopía confocal de <i>N. crassa</i> transformada con núcleos marcados con GFP tratadas con MBC (a-e) y con CA (f-j). Se muestran imágenes sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las cabezas de flecha señalan al primer núcleo. Tiempo en min:s. Escala = 10 $\mu$ m.	29
11	Comparación de la distribución y morfología nuclear en la región apical y subapical de hifas <i>N. crassa</i> transformadas con núcleos marcados con GFP. (a) Control; (b) <i>ropy-1</i> ; (c) <i>ropy-3</i> ; (d) <i>ropy-1/Ankin</i> ; (e) <i>Ankin</i> ; (f) MBC; (g) CA. Imágenes de microscopía confocal sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las flechas indican la posición del Spk y las cabezas de flecha los núcleos. Escala = 10 $\mu$ m.	31
12	Tamaño de la zona de exclusión de los núcleos en hifas de <i>N. crassa</i> transformada con núcleos marcados con GFP, control, <i>ropy-1</i> , <i>ropy-3</i> , <i>Ankin</i> , <i>ropy-1/Ankin</i> , tratadas con MBC y CA. Todos los núcleos marcados con GFP. (▪) media; (□) error estándar; y (I) intervalo de confianza al 95 %.	33
13	Morfología de los núcleos en la región subapical de hifas de <i>N. crassa</i> transformadas con núcleos marcados con GFP. (a) Control; (b) <i>ropy-1</i> ; (c) <i>ropy-3</i> ; (d) <i>Ankin</i> ; (e) <i>ropy-1/Ankin</i> ; (f) MBC; (g) CA. Imágenes de microscopía confocal del canal de fluorescencia. Escala = 2 $\mu$ m	34
14A	Tasa de elongación de la hifa y tasa de desplazamiento nuclear en las cepas de <i>N. crassa</i> transformadas con núcleos marcados con GFP (a) Control; (b) <i>ropy-1</i> ; (c) <i>ropy-3</i> ; (d) <i>Ankin</i> . Los valores negativos muestran el movimiento retrógrado de algunos núcleos.	36

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
14B	Tasa de elongación de la hifa y tasa de desplazamiento nuclear en las cepas de <i>N. crassa</i> transformadas con núcleos marcados con GFP (a) <i>ropy-1/Δnkin</i> ; (b) MBC; (c) CA. Los valores negativos muestran el movimiento retrógrado de algunos núcleos.	37
15	Tasa global de elongación de la hifa ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) y de desplazamiento nuclear ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) en las cepas de <i>N. crassa</i> control, <i>ropy-1</i> , <i>ropy-3</i> , <i>Δnkin</i> , <i>ropy-1/Δnkin</i> , tratadas con MBC y CA. La columna indica la media y la barra el intervalo de confianza al 95 %.	39
16	Regresión lineal de la elongación de la hifa (eje <i>x</i> ) y el desplazamiento nuclear (eje <i>y</i> ) en <i>N. crassa</i> . (a) Control; (b) <i>ropy-1</i> ; (c) <i>ropy-3</i> ; (d) <i>Δnkin</i> ; (e) <i>ropy-1/Δnkin</i> ; (f) MBC; (g) CA.	40
17	Regresión lineal de la elongación de la hifa (eje <i>x</i> ) y el desplazamiento nuclear (eje <i>y</i> ) en <i>N. crassa</i> . (a) <i>Δnkin</i> ; (b) CA. La escala de los ejes ( <i>x</i> , <i>y</i> ) ha sido modificada de la figura 17 para tener un acercamiento.	41
18	Cambios que un núcleo puede tener en la dirección del movimiento durante un seguimiento de 5 min. Se muestra el porcentaje y el intervalo de confianza al 95 % en la barra de error.	43
19	Velocidad de desplazamiento retrógrado y anterógrado de los núcleos. (▪) media; (□) intervalo de confianza al 95%; y (I) valor máximo y mínimo.	44
20	Recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP) del área marcada con el recuadro de línea continua. La línea punteada muestra el crecimiento a través del tiempo. Microscopía de fluorescencia (a, c, e, g, i); contraste de fases (b, d, f, h, j). Tiempo en min:s. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	45
21	Citoesqueleto microtubular y de actina en <i>N. crassa</i> . (a) Cepa control con microtúbulos marcados con GFP; (b) <i>ropy-1</i> ; (c) <i>ropy-3</i> ; (d) <i>Δnkin</i> ; (e) MBC; (f) cepa control con los filamentos de actina marcados con RFP; (g) CA. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	46
22	Modelo de desplazamiento nuclear. (a) Hifa silvestre; (b) mutante sencilla; (c) doble mutante; (d) MBC; (e) CA.	52

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Genes que codifican para las subunidades de dineína, dinactina y cinesina convencional en hongos.	5
II	Cepas de <i>N. crassa</i> utilizadas.	11
III	Número de observaciones de hifas y núcleos de cada cepa de <i>N. crassa</i> .	13
IV	Concentraciones de MBC Y CA utilizadas para la curva de sensibilidad en <i>N. crassa</i> con los núcleos marcados con GFP.	14
V	Indice de correlación entre la elongación apical y el desplazamiento nuclear.	42
VI	Dirección de los movimientos de los núcleos.	43
VII	Velocidad máxima de desplazamiento anterógrado y retrógrado de los núcleos.	44

## LISTA DE PELICULAS

### **Película**

- 1 *N. crassa* con núcleos marcados con GFP.
- 2 *N. crassa* mutante sencilla *ropy-1*
- 3 *N. crassa* mutante sencilla *ropy-3*
- 4 *N. crassa* mutante sencilla *nkin*
- 5 *N. crassa* doble mutante *ropy-1/nkin*
- 6 *N. crassa* tratada con MBC
- 7 *N. crassa* tratada con CA

**RESUMEN** de la tesis de **Silvia Lucrecia Ramos García**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Octubre de 2006.

**PAPEL DEL FLUJO CITOPLASMÁTICO Y LAS PROTEÍNAS MOTORAS ASOCIADAS A LOS MICROTUBULOS EN EL DESPLAZAMIENTO NUCLEAR EN HONGOS FILAMENTOSOS**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez  
*Director de Tesis*

El movimiento y localización de los núcleos son eventos multifactoriales que se han venido estudiando las últimas dos décadas sin llegar a un acuerdo de qué es lo que principalmente mueve a los núcleos dentro de las hifas. Con el propósito de proporcionar información sobre este tema, se realizó un estudio para describir el movimiento de los núcleos en la zona subapical y los factores que pueden estar asociados tales como el flujo citoplasmático, los microtúbulos, los microfilamentos de actina y las proteínas motoras (complejo dineína/dinactina y kinesina).

Se realizó Microscopía Confocal de cinco cepas de *Neurospora crassa* con los núcleos marcados con GFP, una sin mutaciones (control), tres con mutaciones simples *ropy-1*, *ropy-3* y  $\Delta$ *ankin* y una doble mutante *ropy-1/\Delta**ankin*. Adicionalmente se realizaron observaciones en la cepa control tratada con Benomilo (MBC) y Citocalasina A (CA) con la finalidad de determinar que elementos influyen más en el desplazamiento nuclear.

Se observó en todas las cepas que los núcleos se mueven en forma bidireccional o se estacionan, excepto en la doble mutante en donde el movimiento retrogrado estaba anulado. El desplazamiento de los núcleos fue muy cercano al índice de elongación de la hifa en el control ( $0.13 \pm 0.08$ ;  $0.14 \pm 0.13 \mu\text{m s}^{-1}$ ), *ropy-1* ( $0.02 \pm 0.04$ ;  $0.02 \pm 0.12 \mu\text{m s}^{-1}$ ), *ropy-3* ( $0.05 \pm 0.06$ ;  $0.06 \pm 0.10 \mu\text{m s}^{-1}$ ), *ropy-1/\Delta**ankin* ( $0.05 \pm 0.09$ ;  $0.04 \pm 0.10 \mu\text{m s}^{-1}$ ) y en las tratadas con MBC ( $0.05 \pm 0.09$ ;  $0.05 \pm 0.12 \mu\text{m s}^{-1}$ ), no así en la mutante  $\Delta$ *ankin* ( $0.03 \pm 0.08$ ;  $0.03 \pm 0.21 \mu\text{m s}^{-1}$ ) y en las tratadas con CA ( $0.005 \pm 0.03$ ;  $0.001 \pm 0.10 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Los núcleos mostraron diferencias en la morfología, en el control eran alargados mientras que en las otras cepas se observaron en forma esférica. La zona de exclusión de los núcleos se acorta en la ausencia de proteínas motoras o microtúbulos y se anula en ausencia de microfilamentos de actina.

En conclusión, el movimiento y distribución de los núcleos esta determinado por diferentes fuerzas, en hifas maduras el motor fundamental es el flujo citoplásmico. Sin embargo, las proteínas motoras son la unión de núcleos y microtúbulos y la actina es el armazón que une estos elementos para ser desplazados como una unidad por el citoplasma.

**Palabras clave:** Núcleos, desplazamiento, *Neurospora crassa*, *ropy-1*, *ropy-3*,  $\Delta$ *ankin*

## **I. INTRODUCCION**

En células eucariotas la migración de los organelos como vesículas, mitocondrias, cloroplastos y núcleos es de gran importancia para el desarrollo del ciclo celular (McConnell y Yaffee, 1992; Suelmann et al., 1997; Morris, 2000; Ma y Chisholm, 2002).

Unos de los movimientos más importantes dentro de la célula son la migración de los núcleos de la cual depende la mitosis, la fertilización, la cariogamia, el crecimiento vegetativo, la embriogénesis y el desarrollo cerebral, por mencionar algunos (Beckwith et al., 1998; Alberti-Segui et al., 2001; Starr et al., 2001).

Los hongos presentan sistemas y procesos muy complejos para el control de movimientos nucleares. En las levaduras que son unicelulares, los núcleos tienen movimientos cortos; mientras que en los hongos filamentosos, éstos llegan a desplazarse a largas distancias siguiendo el ápice de la célula, llamada hifa, que crece en forma polarizada (McConnell y Yaffee, 1992; Suelmann et al., 1997; Alberti-Segui et al., 2001; Suelmann y Fischer, 2000).

La maquinaria del transporte nuclear se ha estudiado desde hace décadas. Investigaciones iniciales demostraron que la migración nuclear durante el crecimiento vegetativo de diferentes especies de hongos es muy similar a la tasa de elongación celular, concluyendo que el flujo citoplasmático junto con los microtúbulos son los principales responsables del desplazamiento de los núcleos (Heath, 1982; Herr y Heath, 1982; McKerracher y Heath, 1985; McKerracher y Heath, 1986).

Las evidencias de estos estudios mostraron que al crecer una colonia de hongos, los núcleos migran hacia el ápice de la hifa en dirección al eje de crecimiento de la célula y

mantienen una distancia constante en relación a la punta. Los núcleos mantienen una distribución homogénea en la hifa debido a que se mueven, en términos generales, a velocidades uniformes asociadas a la tasa de crecimiento celular (Girbardt, 1955; Heath, 1982; Herr y Heath, 1982; McKerracher y Heath, 1985; McKerracher y Heath, 1986; Suelman et al., 1997; Inoue et al., 1998; Alberti-Segui et al., 2001).

En lo referente al citoesqueleto microtubular, se ha mostrado en diferentes organismos que los microtúbulos están asociados al movimiento nuclear (Oakley y Morris, 1980; Koonce y Shliwa, 1985; Allen et al., 1985). Oakley y Morris en 1980 demostraron que el desplazamiento de los núcleos es dependiente de los monómeros de  $\beta$ -tubulina que conforman el citoesqueleto microtubular.

Los factores que afectan la polimerización de los microtúbulos como pueden ser drogas (benomilo, griseofulvina) y fenómenos físicos como la irradiación con UV, también afectan la distribución de los núcleos. En ausencia de un citoesqueleto microtubular intacto, los núcleos no se desplazan en forma normal (Oakley y Rinehart, 1985; McKerracher y Heath, 1986; Barja et. al, 1992).

Sin embargo, hay otras evidencias donde se observa que los núcleos tienen movimiento con y sin microtúbulos. Estos estudios han sugerido que aunque se mueven juntos no tienen una interacción directa (McKerracher y Heath, 1986).

La actina es otro componente del citoesqueleto que se presenta principalmente en el ápice de las hifas y en la región de los septos, contribuyendo en el mantenimiento de la morfología tubular producto de la polarización y en la compartimentalización de la célula (Seiler y Plamann, 2003). Hay evidencias de que el papel principal de la actina en hongos



filamentosos es el transporte de vesículas dentro del Spitzenkörper (Spk) hacia la membrana citoplasmática y el control de la polaridad celular (Bartnicki-García, 2002).

No obstante, estudios genéticos de la mutación del gen *act1* (Virag y Griffiths, 2003) y con inhibidores como la citocalasina (Torralba et al., 1998) han mostrado que la ausencia de los microfilamentos de actina en la región apical y subapical producen una acumulación de los núcleos en estas regiones, que podría ser debido al flujo citoplasmático que los posiciona pasivamente.

Asimismo, se ha descrito una co-localización de parches de actina con los núcleos, debido a que esta transporta al RNA pre-ribosomal del nucleolo al citoplasma (Turian et al., 1992; Srinivasan et al., 1996; Virag y Griffiths, 2003).

Por otra parte, estudios genéticos han identificado muchas de las proteínas requeridas para la migración nuclear en hongos filamentosos (Morris 1976; Plamann et al., 1994; Xiang et al., 1994; Bruno et al., 1996; Inoue et al., 1998; Minke et al., 1999a). La obtención de mutantes con defectos en la distribución nuclear en *Aspergillus nidulans* en 1976 (Morris, 1976) y posteriormente en *Neurospora crassa* (Plamann et. al, 1994) permitió mostrar que entre otras proteínas el complejo dineína-dinactina está asociado a la migración de los núcleos a lo largo de las hifas.

Las mutantes de *A. nidulans* con defectos en los genes responsables del complejo dineína-dinactina se han denominado como *nud* (nuclear distribution) y en *N. crassa* como *ropy* (*ro*) (Tabla I).

Fenotípicamente, las mutantes *nud* y *ro* se caracterizan por tener una distribución heterogénea de los núcleos a lo largo de la colonia, un crecimiento micelial lento, una

mayor tasa de ramificación y una disminución en la esporulación (Morris, 1976; Plamann et al., 1994).

Los genes de las proteínas motoras (Tabla I) que se asocian a la migración nuclear son los que codifican para la proteína de la cadena pesada de la dineína (DHC), la proteína p150<sup>Glued</sup> y de la proteína asociada a la actina ARP1 (Actin related protein), los cuales son componentes de la dinactina (Xiang et al., 1994; Plamann et al., 1994; Robb et al., 1995; Xiang et al., 1994; Tinsley et al., 1996; Beckwith et al., 1998).

El complejo dineína-dinactina consiste en dos grupos de moléculas; 1) la dineína que está formada por dos cadenas pesadas de ~500 kilo Daltons (kDa), varias cadenas intermedias de ~74 kDa, cuatro cadenas intermedias ligeras de 50-60 kDa y cadenas ligeras de 6-22 kDa (Bowman et al., 1999). La cadena pesada es la que interactúa con los microtúbulos y tiene la función motora. 2) la dinactina que es un complejo de proteínas que incluye dos componentes estructurales distintos, un filamento parecido a la actina (Schafer et al., 1994; Eckley et al., 1999; Yamamoto y Hiraoka, 2003) que esta formado por la proteína Arp1 y varias proteínas que la unen a la dineína como la p62, p24 y el dímero p150<sup>Glued</sup>, que contienen sitios de unión a los microtúbulos, a la dineína y a la Arp1 (Figura 1) (Karki y Holzbaur, 1995).

La delección de la dineína en germinulas de hongos filamentosos tiene un efecto muy drástico en la migración nuclear, que se ha mostrado casi nula en ausencia de la DHC (Plamann et al., 1994; Xiang et al., 1994). Sin embargo, hay variaciones de especie a especie en los hongos filamentosos; en *Ashbia gossypii*, los núcleos se agregan cerca del

ápice de la hifa (Alberti-Segui et al., 2001), en cambio en otros hongos se acumulan en la región basal (Plamann et al., 1994; Xiang et al., 1994; Inoue et al., 1998).

**Tabla I.** Genes que codifican para las subunidades de dineína, dinactina y cinesina convencional en hongos.

Proteína	Descripción	<i>A. nidulans</i>	<i>N. crassa</i>
<b>Dineína</b>			
<i>DHC</i> <sup>(1,4)</sup>	Cadena pesada. Movimiento nuclear hacia el ápice celular	<i>nudA</i>	<i>ro-1</i>
<i>DIC</i> <sup>(4)</sup>	Cadena intermedia. Movimiento nuclear hacia el ápice celular	<i>nudI</i>	-
<i>DLC</i> <sup>(4)</sup>	Cadena ligera. Movimiento nuclear hacia el ápice celular	<i>nudG</i>	-
<i>DLIC</i>			
<b>Dinactina</b>			
<i>p150</i> <sup>Glued(4)</sup>	Contiene sitios de unión a microtúbulos	<i>nudM</i>	<i>ro-3</i>
<i>ArpI</i> <sup>(4)</sup>	Proteína relacionada con los filamentos de actina	<i>nudK</i>	<i>ro-4</i>
<i>p62</i> <sup>(4)</sup>	Proteínas de protección (PEBPs*)	-	<i>ro-2</i>
<i>p24</i> <sup>(4)</sup>	Proteínas de protección (PEBPs*)	-	<i>ro-12</i>
<i>Arp11</i> <sup>(4)</sup>	Proteínas de protección (PEBPs*)	-	<i>ro-7</i>
<b>Otras</b>			
<i>NUDC</i> <sup>(2,4)</sup>	Componente de la ruta de la dineína	<i>nudC</i>	-
<i>LISI</i> <sup>(2,3,4)</sup>	Distribución nuclear	<i>nudF</i>	<i>ro-10</i>
<i>MP43</i> <sup>(5)</sup>	Proteína fosfomitolítica 43	<i>nudE</i>	<i>ro-11</i>
<b>Cinesina</b> <sup>(5)</sup>	Desplazamiento nuclear hacia la terminal positiva	<i>kinA</i>	<i>nkin</i>

\* Pointed-end-binding proteins

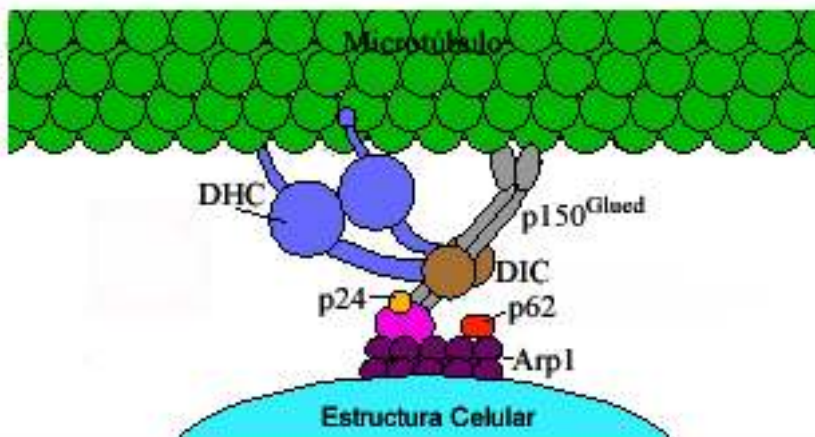
(1) Xiang et al., 1994

(2) Seiler et al., 1997

(3) Minke et al., 1999

(4) Yamamoto e Hiraoka, 2003

(5) Xiang y Fischer, 2004



**Figura 1.** Esquema de la estructura del complejo dineína-dinactina.

Hay otros genes *nud* y *ro* que no codifican para ningún componente del complejo dineína-dinactina pero que son requeridos para regular su actividad como el gen *ro-10* y *ro-11* para *N. crassa* (Minke et al., 1999) o el *nudF* de *A. nidulans*, el cual es homólogo de la proteína LIS1 en humanos (Xiang et al., 1994).

El complejo dineína-dinactina y sus reguladores en la migración nuclear también involucra a los microtúbulos, por lo que es difícil separar el efecto directo que este complejo puede tener sobre el posicionamiento nuclear, debido a que las mutaciones de la DHC y de la p150<sup>Glued</sup> producen una desestabilización y desorganización del citoesqueleto microtubular (Oakley y Morris, 1980; Huffaker et al., 1988; That et al., 1988; Willins et al., 1995; Palmer et al., 1992; Riquelme et al., 2000; Vorobjev et al., 2001; Malikov et al., 2004; Mouriño-Pérez et al., datos no publicados).

Otros factores que influyen en la funcionalidad de la dineína para el transporte de organelos, son los mencionados en estudios en animales (Niclas et al., 1996), donde

observaron que la dineína se encuentra regulada por el ciclo celular. Durante la interfase esta proteína motora desplaza su carga a lo largo de los microtúbulos, mientras que en metafase se encuentra implicada en el huso mitótico y la segregación de los cromosomas.

Algunos de los principales mecanismos de control de la dineína son la fosforilación y desfosforilación de las proteínas que cambia en cada estadio de ciclo celular (Niclas et al., 1996; Hirokawa, 1998).

Otro grupo de proteínas motoras asociado a los microtúbulos que está relacionado con el movimiento de organelos es el de las cinesinas, que aunque tiene más de 20 proteínas descritas, solo la cinesina convencional esta relacionada con el movimiento nuclear (Hirokawa, 1998; Seiler et. al, 1997).

La doble mutación de los genes de la dineína (*ro-1*) y cinesina ( $\Delta$ *nkin*) mostró que el transporte de núcleos esta casi eliminado en ausencia de las proteínas respectivas (Seiler et al., 1999).

Otros genes asociados a defectos en la distribución nuclear en hifas de *A. nidulans* son *apsA* y *apsB* (anucleate primary sterigmata) (Fischer y Timberlake, 1995). Veith y colaboradores (2005) señalaron que la proteína ApsB localizada en los cuerpos polares de los núcleos se encarga de la interacción de éstos y la terminal negativa de los microtúbulos influyendo en la migración de los núcleos como fuerza de empuje en *A. nidulans*; algo similar a lo que Tran y colaboradores (2001) propusieron para las levaduras de *Schizosaccharomyces pombe*.

Se ha establecido, que cada tipo de proteína motora transporta a los núcleos y organelos de acuerdo a la polaridad de los microtúbulos; la dineína se mueve hacia la

terminal negativa es decir, en sentido retrógrado al crecimiento de las hifas y la cinesina lo hace hacia la positiva en sentido anterógrado (Hirokawa, 1998).

Sin embargo, se ha mostrado que en el hongo filamentoso *Basidiobolus magnus* los núcleos migran hacia adelante a una tasa uniforme similar al ápice celular, pero cuando este organismo es sometido a irradiaciones UV, se produce un flujo hacia atrás (McKerracher y Heath, 1986).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1. Problema

A pesar de que se conocen algunas fuerzas y mecanismos que desplazan y mantienen en posición a los núcleos en la región apical y subapical en hifas maduras de *N. crassa*, no se ha establecido el papel que tienen cada uno de estos mecanismos sobre la migración, morfología y distribución nuclear.

### 2. Hipótesis

El flujo citoplasmático es la principal fuerza motora de los núcleos en hifas maduras de hongos filamentosos y las proteínas motoras (dineína-dinactina y kinesina) juegan un papel secundario en éste y son utilizadas por la célula como fuerza de desplazamiento en casos específicos. Sin embargo, el citoesqueleto celular junto con sus proteínas motoras mantiene a los núcleos en posición.

### 3. Objetivo General

- Determinar el papel del flujo citoplasmático y las proteínas motoras en el desplazamiento, distribución y morfología de los núcleos en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*.

### 4. Objetivos Particulares

- Describir el desplazamiento nuclear en hifas maduras de *Neurospora crassa* tipo silvestre.
- Comparar el desplazamiento nuclear en mutantes con defectos en proteínas motoras asociadas a los microtúbulos:
  - *ropy-1* con mutación en la cadena pesada de la dineína.
  - *ropy-3* con mutación en la fracción de la dinactina p150<sup>glued</sup>.
  - *Ankin* con mutación en la cinesina.
  - *ropy-1/Ankin* con doble mutación en la dineína y cinesina.
- Determinar la relación existente entre la despolimerización inducida de microtúbulos y la migración de los núcleos.
- Determinar si existe relación entre la despolimerización inducida de microfilamentos de actina y la migración de los núcleos.
- Determinar el papel del flujo citoplasmático en la migración de los núcleos durante la elongación celular.



### III. METODOLOGÍA

#### 1. Organismos y medios de cultivo

En la Tabla II se muestran todas las cepas de *N. crassa* utilizadas para la realización de este estudio.

**Tabla II.** Cepas de *N. crassa* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Referencia
RL21SG1-50	<i>mat a</i>	FGSC
N2281-3A	<i>mat A his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-hHI<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	Freitag et al. (2004)
N2526	<i>rid<sup>RIP1</sup> mat A his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-Bml<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	Freitag et al. (2004)
614-1	<i>rid<sup>RIP1</sup> hhis-3<sup>+</sup>::tdimer2(12)RFP<sup>+</sup></i>	Freitag y Selker (2005)
XRM175-2	<i>mat A ro-1 his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-hHI<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	Este estudio
XRM177-9	<i>ro-1 his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-Bml<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	Este estudio
XRM176-4	<i>mat a ro-3 his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-hHI<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	Este estudio
XRM178-1	<i>ro-3 his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-Bml<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	Este estudio
	<i>mat a Δnkin</i>	Seiler et al. (1997)
XMF1025-8	<i>mat a Δnkin his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-hHI<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	M. Freitag (sin publicar)
XMF1134-3	<i>Δnkin his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-Bml<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	M. Freitag (sin publicar)
XRMC04-14	<i>mat A ro-1/Δnkin his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-hHI<sup>+</sup>-sgfp<sup>+</sup></i>	Este estudio

Los medios de cultivo utilizados para mantenimiento, cruas y observaciones en el microscopio fueron los siguientes:

- **Medio Mínimo de Vogel (VMM).** A 980 ml de agua destilada se agregaron 20 ml de sales de Vogel a 50×, 20 g de sacarosa, 1.5 g de agar y se esterilizó a 121 °C/18 psi durante 15 min (Vogel, 1964).

- **Medio Sintético para Cruzas (SCM).** 1.0 g de KNO<sub>3</sub>, 0.7 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1 g de NaCl, 0.1 g de CaCl<sub>2</sub>, 100 µl de elementos traza; 100 µl de Biotina y 20 g de agar en 1000 ml de agua destilada y se esterilizó a 121 °C/18 psi durante 15 min.
- **Agar-Agua (WA).** A 100 ml de agua destilada se agregaron 2 g de agar y se esterilizó a 121 °C/18 psi durante 15 min.

## 2. Medición del desplazamiento nuclear y el crecimiento de hifas de *N. crassa*.

De cada cepa se seleccionaron al azar diez hifas y los núcleos de los primeros 150 µm de la región subapical (Tabla III). En cada caso se midió la tasa de elongación de la hifa ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) y el desplazamiento de cada núcleo ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ).

La elongación de las hifas se calculó con la diferencia de la longitud ( $\mu\text{m}$ ) de la célula, medida cuadro por cuadro en las series de tiempo grabadas con microscopia confocal. Asimismo se midió el desplazamiento de cada núcleo visible en la región mencionada.

Las mediciones se realizaron con el programa LSM 5 Image Examiner Zeiss ® versión 3.2, que permite efectuar un seguimiento preciso de la elongación y el desplazamiento, aunque estos no sean en línea recta.

En el caso de los núcleos, además se evaluó la dirección de movimiento con respecto al ápice (anterógrado o retrógrado) y se calculó la velocidad de desplazamiento en ambos sentidos.

**Tabla III.** Número de observaciones de hifas y núcleos de cada cepa de *N. crassa*.

	Control	<i>ropy-1</i>	<i>ropy-3</i>	<i>nkin</i>	<i>ropy-1/nkin</i>	MBC	CA
<b>n</b>							
<b>Hifas</b>	718	1069	499	376	990	984	579
<b>Núcleos</b>	6844	4800	4068	1574	9300	4506	1772

Otra de las variables medidas fue la zona de exclusión de los núcleos ( $\mu\text{m}$ ), que es la distancia entre el ápice y el primer núcleo (n=100).

Finalmente se hizo una comparación de la morfología de los núcleos y de la célula en las siete cepas problema.

### **3. Efecto de la despolimerización de microtúbulos con benomilo en el desplazamiento nuclear.**

Se realizaron experimentos para evaluar el efecto de la despolimerización de los microtúbulos exponiendo a la cepa de *N. crassa* transformada con los núcleos marcados con GFP a Carbamato de metilo 1-[butilaminocarbonil] 2-benzimidazol (Benomilo) (MBC) diluido en etanol al 96 % (Solución de trabajo  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ).

Inicialmente se realizó una curva de sensibilidad para determinar la concentración necesaria de esta droga para inhibir en un 50 % la tasa de crecimiento de las células de *N. crassa*. Se inocularon por duplicado placas de WA con diferentes concentraciones de MBC (Tabla IV) y se midió el crecimiento radial de la colonia. Como controles se utilizaron placas solo con WA y de WA con la concentración de etanol más alta.

Una vez encontrada la concentración necesaria, se realizó el experimento de despolimerización de microtúbulos. Se inoculó con *N. crassa* transformada con los núcleos

marcados con GFP, placas de WA con  $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MBC y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas y se procedió a realizar observaciones con Microscopía Confocal de acuerdo al procedimiento descrito.

#### 4. Efecto de la despolimerización de los microfilamentos de actina con Citocalasina A en el desplazamiento nuclear.

Se obtuvo una curva de sensibilidad de *N. crassa* transformada con los núcleos marcados con GFP expuesta a Citocalasina A (CA) diluida en etanol al 96% (Solución de trabajo  $1.0 \text{ mg ml}^{-1}$ ).

Al igual que para MBC; se inocularon por duplicado placas de WA con diferentes concentraciones de CA (Tabla IV) y se midió el crecimiento radial de la colonia. Como controles se utilizaron placas solo con WA y de WA con la concentración de etanol más alta.

**Tabla IV.** Concentraciones de MBC y CA utilizadas para la curva de sensibilidad en *N. crassa* con los núcleos marcados con GFP.

<b>MBC (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>CA (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>
0.0	0.0
0.1	0.1
1.0	1.0
2.5	5.0
5.0	Etanol $20 \mu\text{l ml}^{-1}$
10.0	
Etanol $1 \mu\text{l ml}^{-1}$	

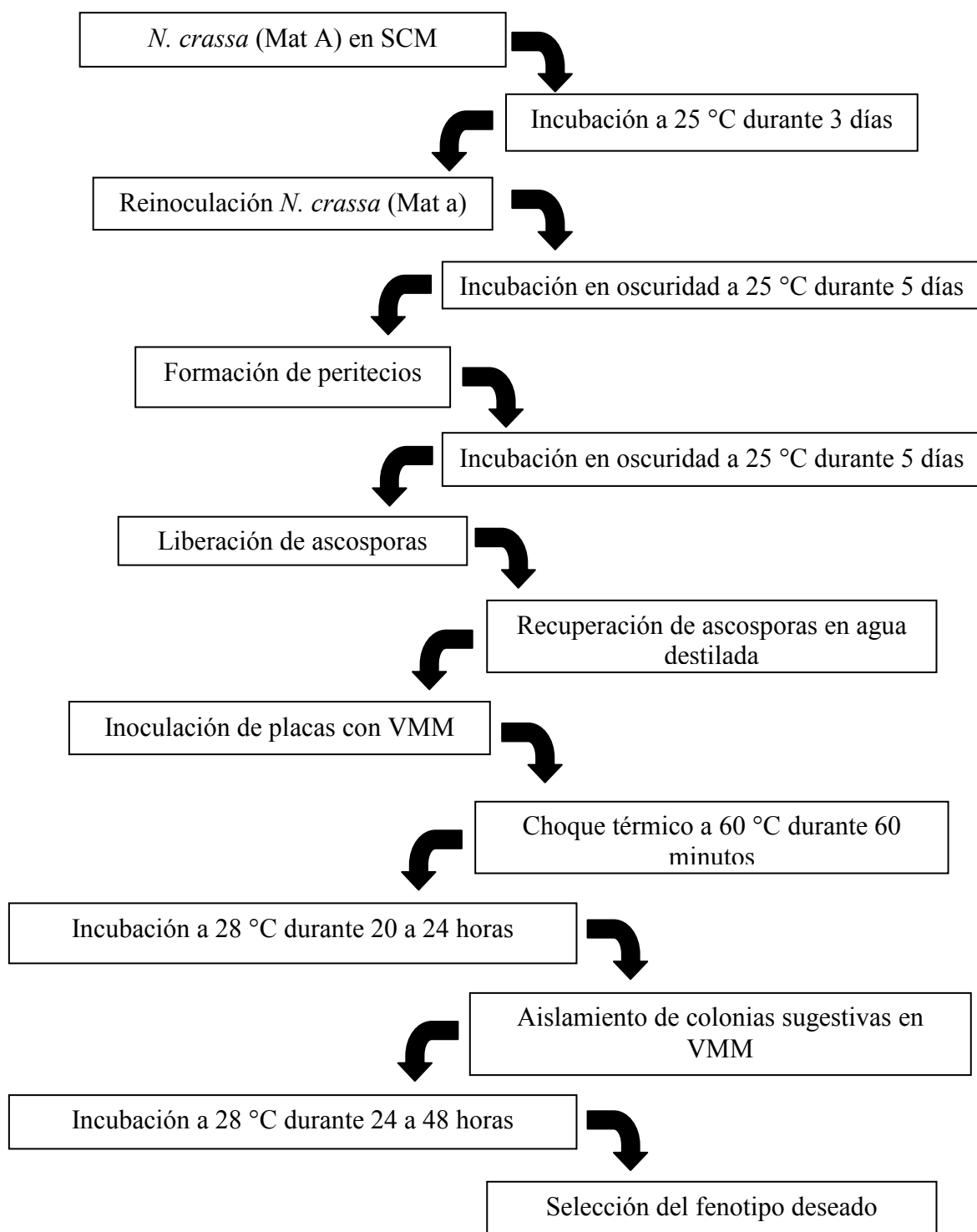
Para el experimento de despolimerización de microfilamentos de actina se inocularon placas de WA con  $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$  de CA con *N. crassa* transformada con los núcleos marcados con GFP y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas y se obtuvieron las observaciones con Microscopía Confocal de acuerdo al procedimiento descrito.

**5. Técnica de cruce para la obtención de mutantes sencillas (*ropy-1*, *ropy-3* y  $\Delta$ *ankin*) y una doble mutante *ropy-1/\Delta**ankin* con los núcleos marcados con GFP.**

Se inocularon por separado esporas de *N. crassa ropy-1* (Mat A), *ropy-3* (Mat A) y  $\Delta$ *ankin* (Mat A) en placas de agar con SCM y se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  hasta que el micelio cubrió toda la caja de Petri. Posteriormente se reinoculó con *N. crassa* transformada con los núcleos marcados con GFP (Mat a) y se incubó en oscuridad total a  $25^\circ\text{C}$  por siete días o hasta que se formaron los peritecios y se liberaron las ascosporas.

Se colectaron las ascosporas en agua destilada estéril y se inocularon alícuotas de 50 a  $100 \mu\text{l}$  en placas de VMM y se sometieron a choque térmico a  $60^\circ\text{C}$  durante una hora. Posteriormente, se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por aproximadamente 24 horas (Figura 2).

Se aislaron las colonias individuales que tuvieran el fenotipo de las mutantes utilizadas para cada cruce en tubos de 5 ml con VMM y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por 48 horas. Se observaron en el Microscopio Estereoscópico Olympus SZX12 iluminadas con la lámpara de mercurio, utilizando un filtro de 488 nm específico para la excitación de la GFP y se seleccionaron aquellas colonias que mostraran fluorescencia.



**Figura 2.** Diagrama de flujo de la técnica de cruces para inducir al ciclo sexual de *N. crassa*.

Se corroboró la presencia de núcleos con GFP en cada cepa, observando las hifas a alto aumento con un objetivo de inmersión en aceite Plan-Neofluar Ph3 100×/1.3 A. N. con un microscopio invertido Marca Carl Zeiss modelo Axiovert 200 (Gotingem, Alemania).

Para la obtención de la doble mutante *ropy-1/Δnkin*, se inocularon esporas de *N. crassa ropy-1* (Mat A) y *N. crassa Δnkin* (Mat a), siguiendo el procedimiento descrito (Figura 2). Como producto de la cruce se seleccionaron las colonias con menor crecimiento y fenotipo diferente a las cepas *ropy-1* y *Δnkin*.

Para corroborar que las colonias seleccionadas presentaban ambas mutaciones se cruzaron con *N. crassa* transformada con los núcleos marcados (Mat a) con la finalidad de obtener los fenotipos *ropy -1* y *Δnkin* por separado y la doble mutante con núcleos marcados.

Las cepas seleccionadas de cada mutante sencilla y la doble mutante se observaron por Microscopia Confocal.

## 6. Microscopía Confocal.

Con un Microscopio Confocal LSM Meta Marca Carl Zeiss (Gotingem, Alemania) utilizando la técnica de bloque invertido descrita por Hickey et al. (2002) se obtuvieron series de tiempo de las siguientes cepas con los núcleos marcados con GFP:

- *N. crassa* silvestre transformada
- *N. crassa ropy-1*
- *N. crassa ropy-3*
- *N. crassa Δnkin*

- *N. crassa rony-1/Ankin*
- *N. crassa* silvestre transformada expuesta a MBC
- *N. crassa* silvestre transformada expuesta a CA

Las imágenes se grabaron en dos canales: uno de luz fluorescente y otro de luz transmitida por contraste de fase. Para la iluminación se utilizó un láser de Argón a 1.5 % de intensidad, con una longitud de onda de 488 nm para la excitación de la GFP y se registró la emisión con un filtro pasa-banda de 505 a 530 nm. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apocromático PH3 100×/1.3 A. N.. Se ajustó el pinhole para obtener rebanadas ópticas con un grosor de 3.0 μm. Las series de tiempo se grabaron por 5 min con una velocidad de barrido por cuadro de 3 s aproximadamente.

Para observar el efecto de la CA sobre los microfilamentos de actina se tomaron imágenes de *N. crassa* con la tropomiosina marcada con proteína roja fluorescente (RFP). Se tomaron imágenes simples de las hifas de esta cepa después de la exposición a la droga. La iluminación se realizó con un láser de HeNe con una intensidad del 5 % de la potencia total, utilizando una longitud de onda de excitación 574 nm y se registró la emisión con un filtro de 691 nm. La rebanada óptica tuvo un grosor de 3.0 μm.

## **7. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP).**

Se utilizó la técnica de microscopia confocal de FRAP para observar si en la cepa transformada con los núcleos marcados con GFP la región fotoblanqueada era repoblada por núcleos fluorescentes que se desplazaran en forma retrógrada o a una velocidad mayor que el flujo citoplasmático. Se seleccionó un área rectangular de una hifa en la región



subapical y se iluminó con una longitud de onda de 488 nm con el láser de Argón con un 20 % de la intensidad durante 30 s. Antes y después del fotoblanqueamiento, se capturaron imágenes cada 3.5 s por 3 min. La rebanada óptica fue de 3.0  $\mu\text{m}$  (Mouriño-Pérez et al., 2006).

#### **8. Almacenamiento de datos y análisis estadístico.**

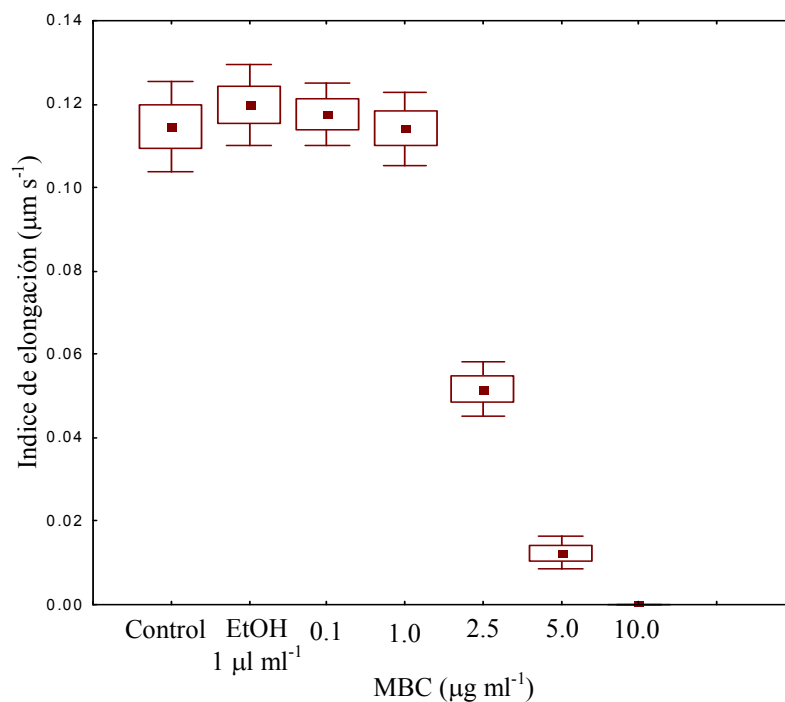
Para el almacenamiento, procesamiento y análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa STATISTICA versión 7.0 ® y para las gráficas el programa SigmaPlot 9.0 ®. Se calculó la media, el error estándar, el intervalo de confianza al 95 % y los valores máximos y mínimos de la elongación de la hifa ( $\mu\text{m}$ ), el desplazamiento de los núcleos ( $\mu\text{m}$ ), el tamaño de la zona de exclusión de los núcleos ( $\mu\text{m}$ ) y la tasa de crecimiento en ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ).

Se realizó un análisis de regresión lineal de la elongación de una hifa y el desplazamiento de cada uno de los núcleos (n=10) para cada cepa y tratamiento.

## IV. RESULTADOS

### 1. Curva de sensibilidad a MBC.

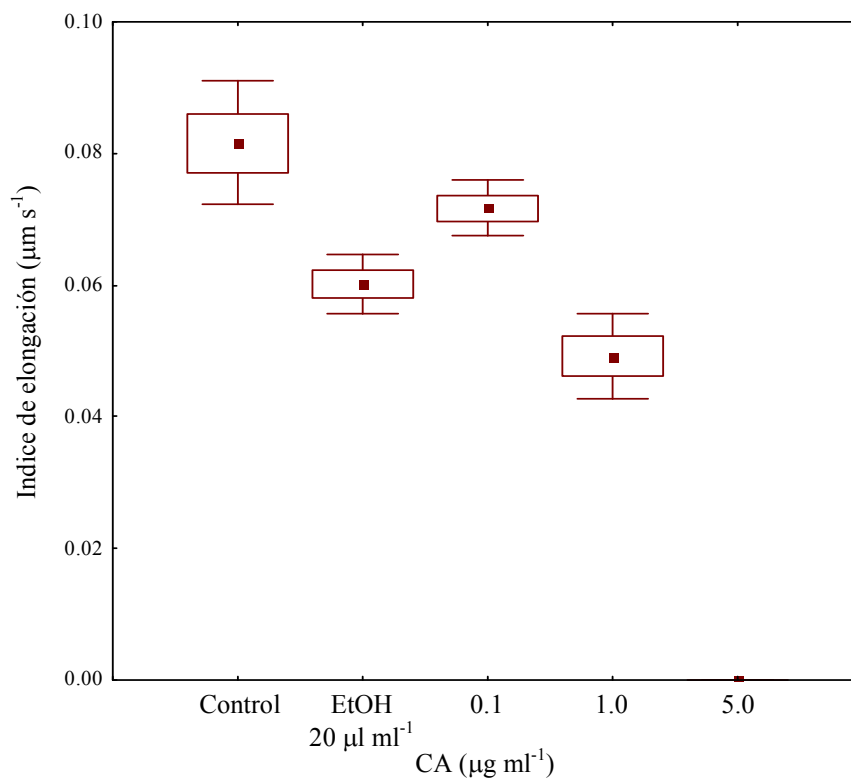
*N. crassa* presentó una reducción de aproximadamente el 50 % de la tasa de crecimiento con 2.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de MBC (Figura 3). A continuación de MBC *N. crassa* creció 0.05  $\mu\text{m s}^{-1}$  en comparación con el control que fue de 0.11  $\mu\text{m s}^{-1}$ .



**Figura 3.** Curva de sensibilidad de *N. crassa* transformada con los núcleos marcados con GFP después de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de MBC. Se incubó a 28 °C. (•) media; (□) error estándar; y (I) intervalo de confianza al 95 %.

## 2. Curva de sensibilidad a CA.

La concentración necesaria de CA para inhibir el crecimiento de *N. crassa* aproximadamente al 50 % fue de  $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ . La tasa de crecimiento a esta concentración fue de  $0.05 \mu\text{m s}^{-1}$  (60 %) en comparación con el control que creció a un índice de  $0.08 \mu\text{m s}^{-1}$  (Figura 4).



**Figura 4.** Curva de sensibilidad de *N. crassa* transformada con los núcleos marcados con GFP después de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de CA. Se incubó a  $28^\circ\text{C}$ . (▪) media; (□) error estándar; y (I) intervalo de confianza al 95 %.

### 3. Morfología de la hifa e índice de elongación del micelio.

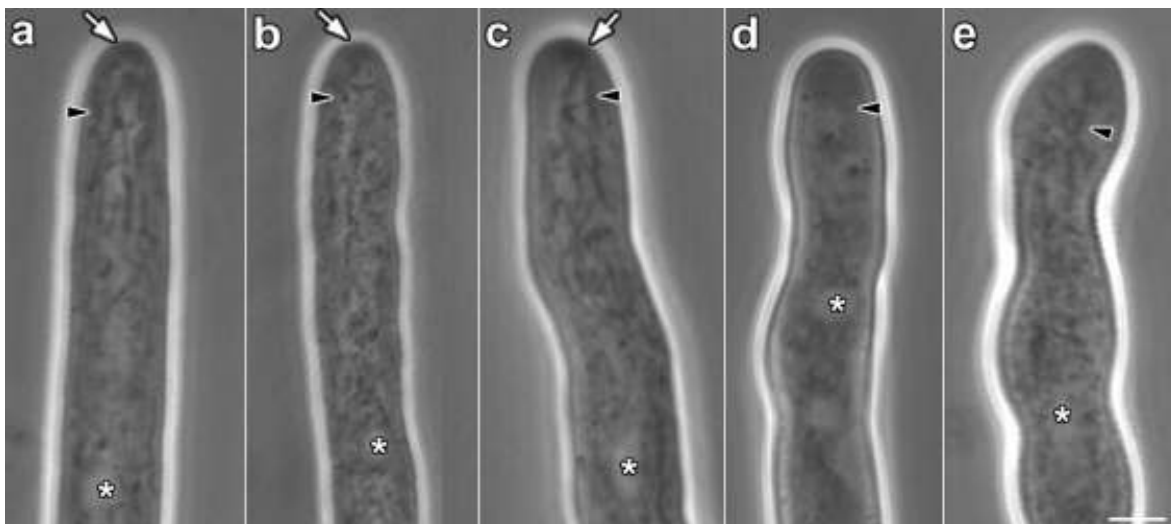
Se capturaron imágenes en contraste de fases de las regiones apical y subapical de las cepas de *N. crassa* con núcleos marcados con GFP, para comparar la morfología. La cepa utilizada como control (Figura 5a) mostró una morfología hifoide típica, donde en el ápice se observó una zona oscura que corresponde al Spitzenkörper (Spk) y en la región subapical las mitocondrias fueron de forma alargada, encontrándose orientadas en paralelo al eje de crecimiento.

La mutante *ropy-1* presentó también un Spk visible aunque más pequeño; en la región subapical las mitocondrias se observaron con una morfología similar al control pero algunas un poco más esféricas y con orientación en algunos casos perpendicular al eje de crecimiento. Las hifas *ropy-1* tuvieron un diámetro menor al observado en el resto de cepas (Figura 5b).

La mutante *ropy-3* presentó un Spk de mayor diámetro en comparación con la mutante *ropy-1*; sin embargo la morfología celular y la distribución de las mitocondrias fue muy similar al control (Figura 5c).

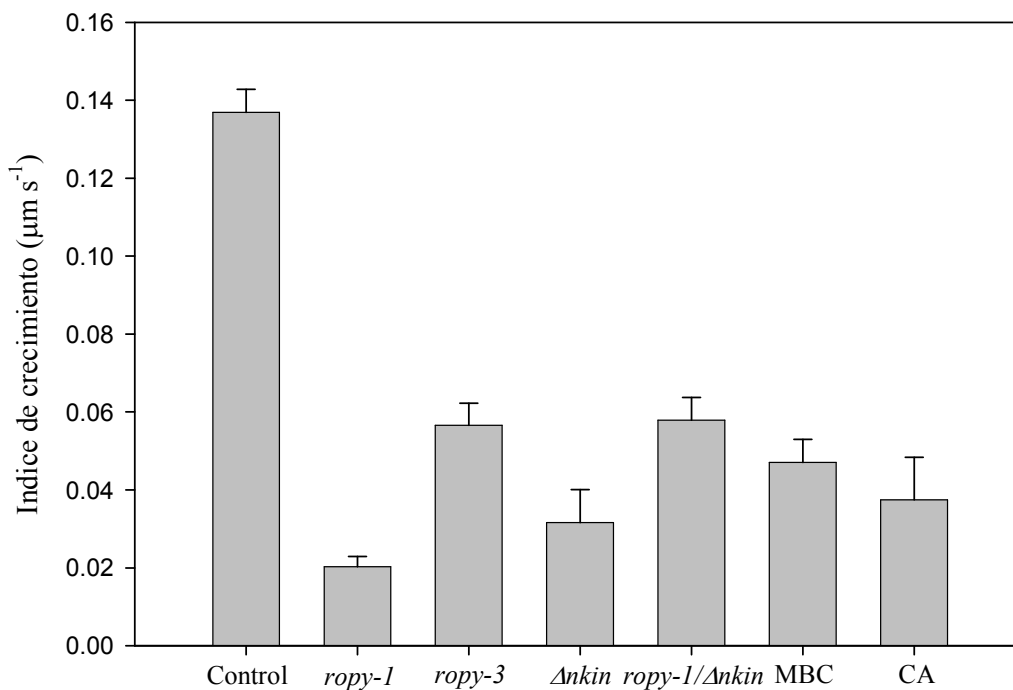
Las hifas de la mutante *Ankin* tuvieron un mayor diámetro y una morfología meándrica. El Spk no fue visible. Las mitocondrias mostraron una apariencia esférica y se encontraban alejadas del ápice (Figura 5d).

La doble mutante *ropy-1/Ankin* no presentó Spk y mostró una morfología irregular, las mitocondrias se encontraban desorganizadas en comparación con el control (Figura 5e).



**Figura 5.** Imágenes por contraste de fase de hifas de *N. crassa*. (a) Control; (b) *ropy-1*; (c) *ropy-3* (d)  $\Delta nkin$ ; (e) *ropy-1/\Delta nkin*. Las flechas indican el Spk; las cabezas de flecha a las mitocondrias y los asteriscos a los núcleos. Escala = 2  $\mu\text{m}$ .

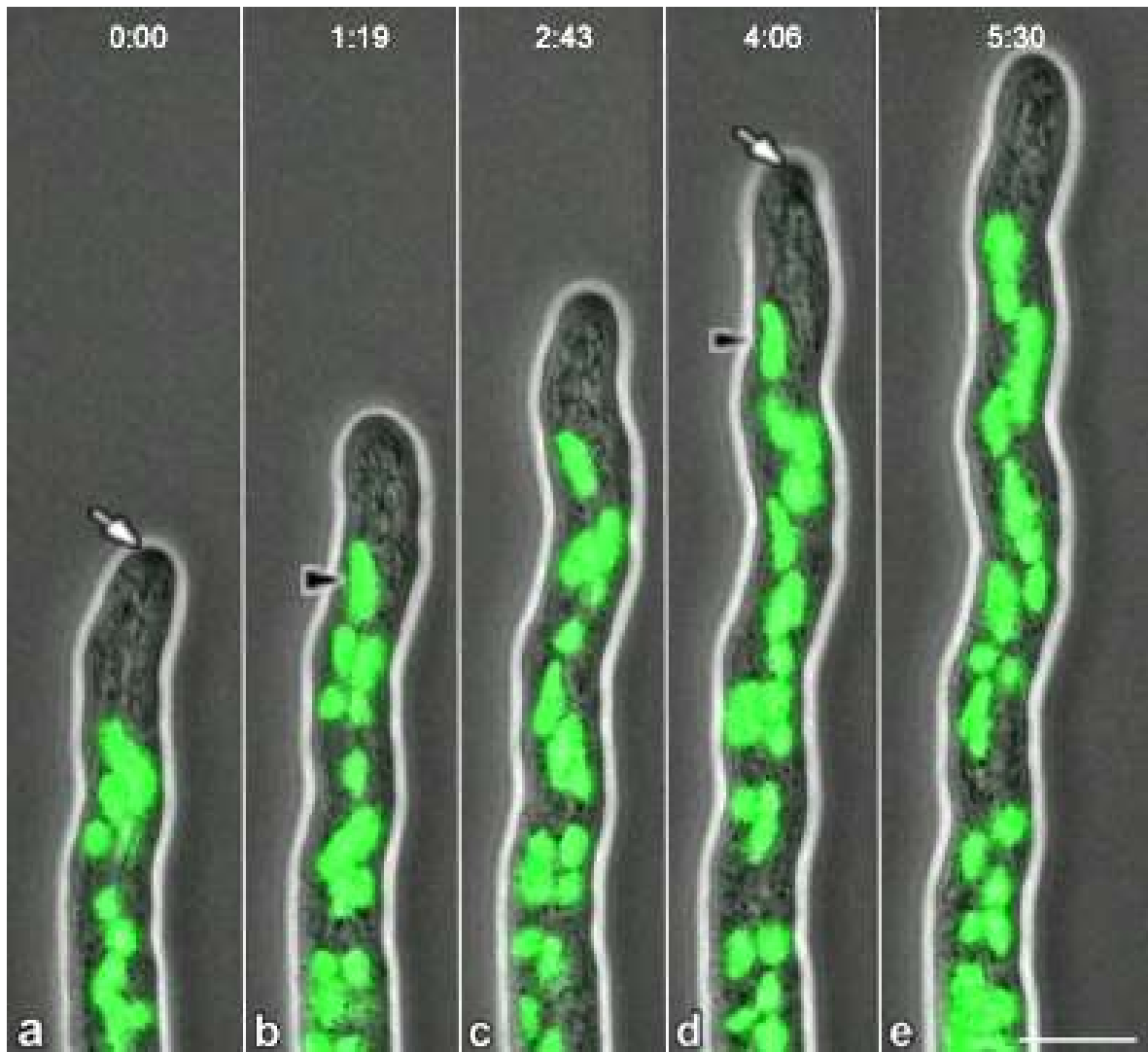
Se comparó el índice de crecimiento colonial de las cepas de *N. crassa* estudiadas (Figura 6). Las cepas más afectadas fueron la *ropy-1* ( $0.02 \pm 0.001 \mu\text{m s}^{-1}$ ) y  $\Delta nkin$  ( $0.03 \pm 0.004 \mu\text{m s}^{-1}$ ), seguidas de las hifas tratadas con CA ( $0.04 \pm 0.001 \mu\text{m s}^{-1}$ ), MBC ( $0.05 \pm 0.003 \mu\text{m s}^{-1}$ ), *ropy-1/\Delta nkin* ( $0.05 \pm 0.002 \mu\text{m s}^{-1}$ ) y *ropy-3* ( $0.05 \pm 0.003 \mu\text{m s}^{-1}$ ) en comparación con el control que presentó una tasa de crecimiento de  $0.13 \pm 0.002 \mu\text{m s}^{-1}$ . Todos los índices de crecimiento colonial fueron significativamente menores al control ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Índice de crecimiento colonial de las cepas de *N. crassa* con los núcleos marcados con GFP, a las 24 horas de incubación a temperatura ambiente. Se indica la media y el intervalo de confianza al 95 %.

#### 4. Distribución y desplazamiento nuclear.

En la cepa control (Figura 7), los núcleos estuvieron distribuidos en forma homogénea a lo largo de la región subapical, dejando una distancia constante entre el primer núcleo y el ápice. La mayor proporción de los núcleos presentaron una morfología alargada paralela al eje de crecimiento y algunos de ellos mostraron una forma característica de pera (Figura 13a). Esta conformación hace evidente su asociación espacial con lo que podrían ser los microtúbulos.



**Figura 7.** Serie de tiempo por microscopía confocal de *N. crassa* transformada con núcleos marcados con GFP. Se muestran imágenes sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las flechas indican la localización del Spk y las cabezas de flecha señalan al primer núcleo. Tiempo en min:s. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

En el caso de la mutante *ropy-1*, el número de núcleos en la región subapical fue menor y no estaban distribuidos de manera uniforme; mientras que la zona de exclusión se encontraba más reducida (Figura 8a-e). Los núcleos en esta cepa en su mayoría eran esféricos aunque habían ejemplos de algunos ligeramente alargados o en forma de pera (Figura 13b).

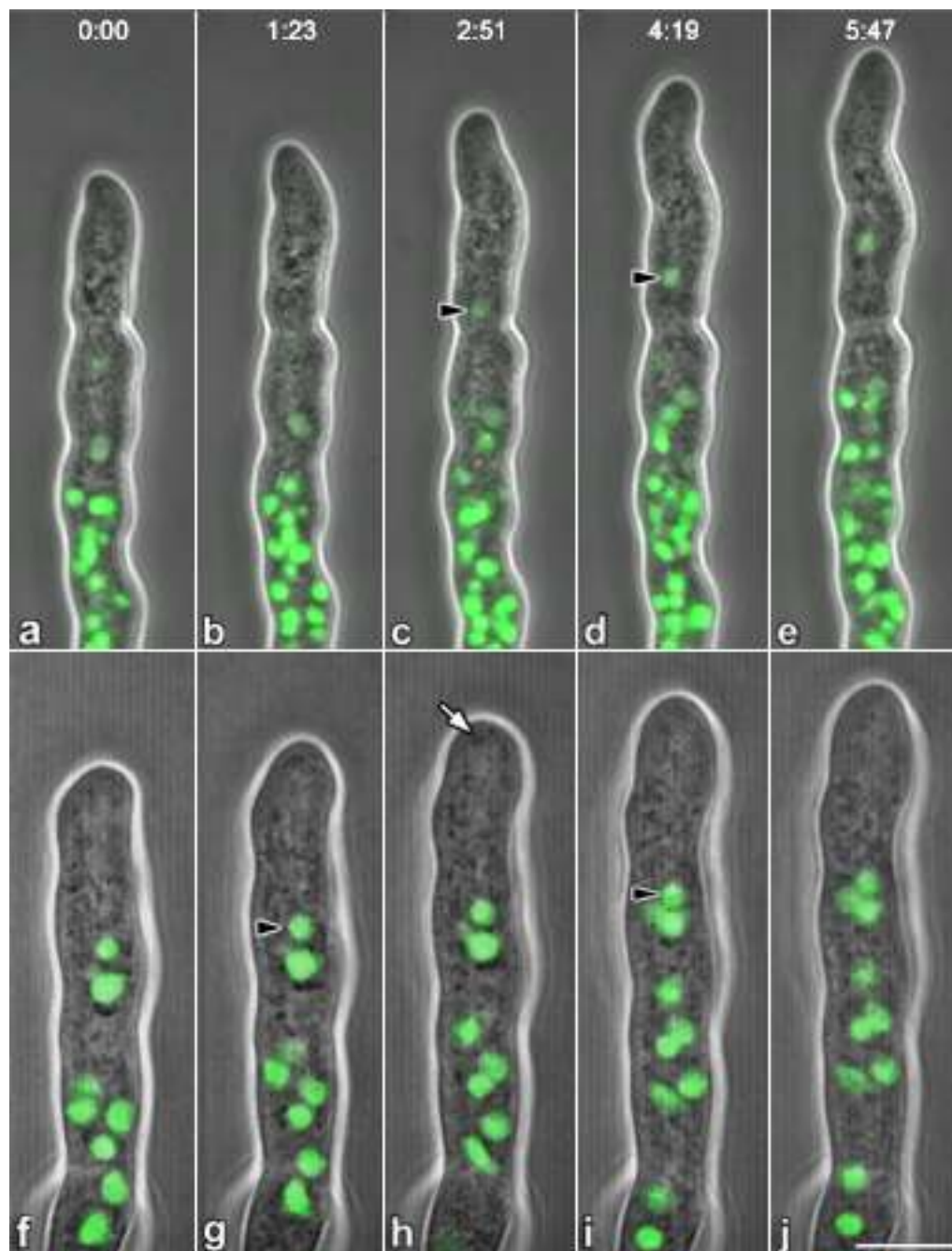
La mutante *ropy-3*, tuvo una distribución y morfología de los núcleos similar a la *ropy-1*; aunque en ésta se encontraban mucho más agrupados que en la anterior (Figura 8f-j).

La población de núcleos en la región subapical de hifas de la mutante  $\Delta nkin$  fue muy escasa a diferencia de las mutantes anteriores (Figura 9a-e). La forma de los núcleos también fue esférica en su mayoría (Figura 13d).

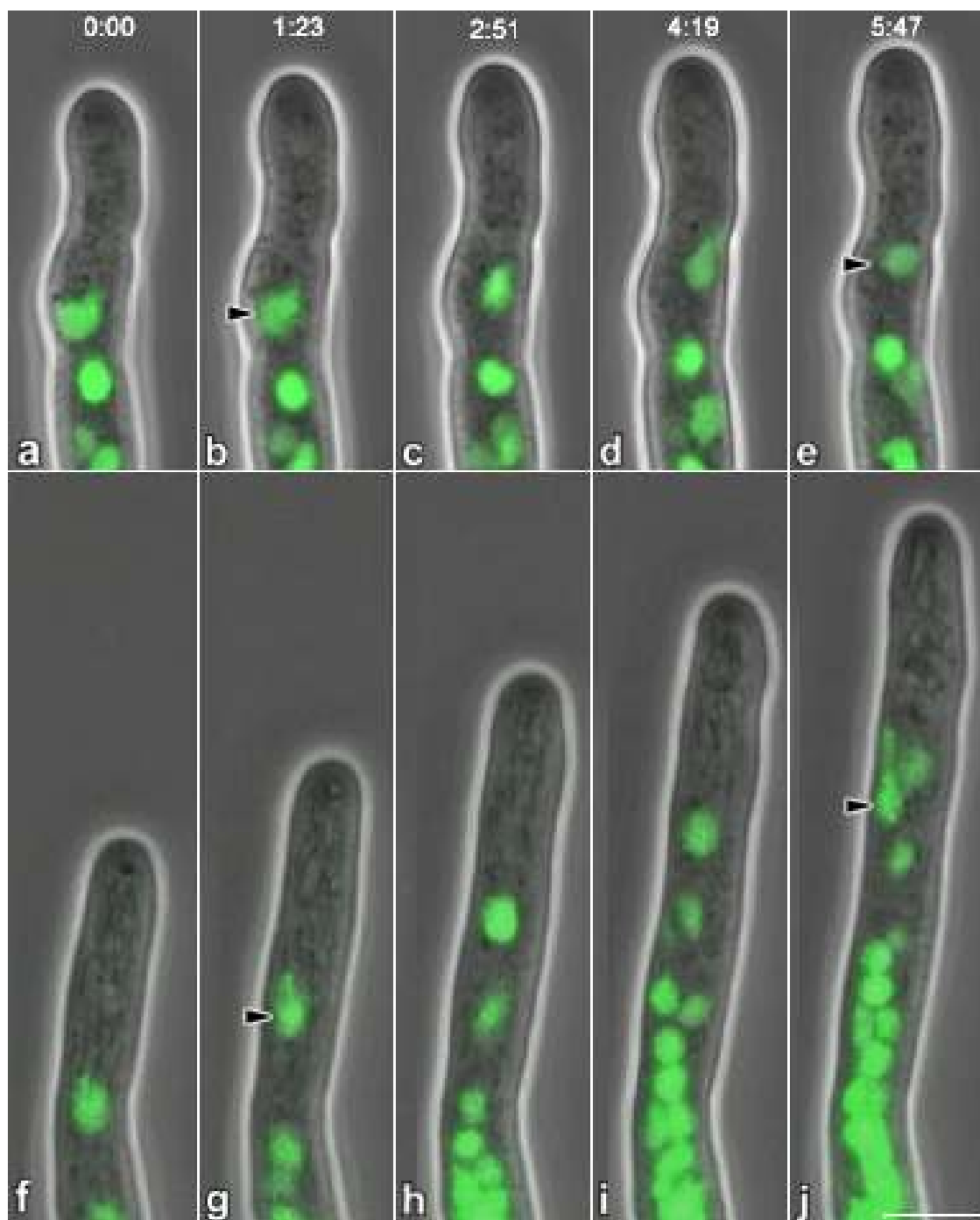
En la doble mutante *ropy-1/Ankin* los núcleos se encontraron conglomerados en el subápice, solo los más cercanos a la punta se encontraban separados (Figura 9f-j). En este caso todos los núcleos eran esféricos (Figura 13e).

La distancia entre cada núcleo fue mayor en las hifas tratadas con la droga que despolimeriza a los microtúbulos (MBC) debido a que arresta los monómeros de  $\beta$ -tubulina impidiendo la unión de éstos a los de  $\alpha$ -tubulina para la polimerización de estos elementos. El primero núcleo de estas células tuvo la mayor distancia al ápice (Figura 10a-e). La forma de los núcleos fue alargada (Figura 13f).

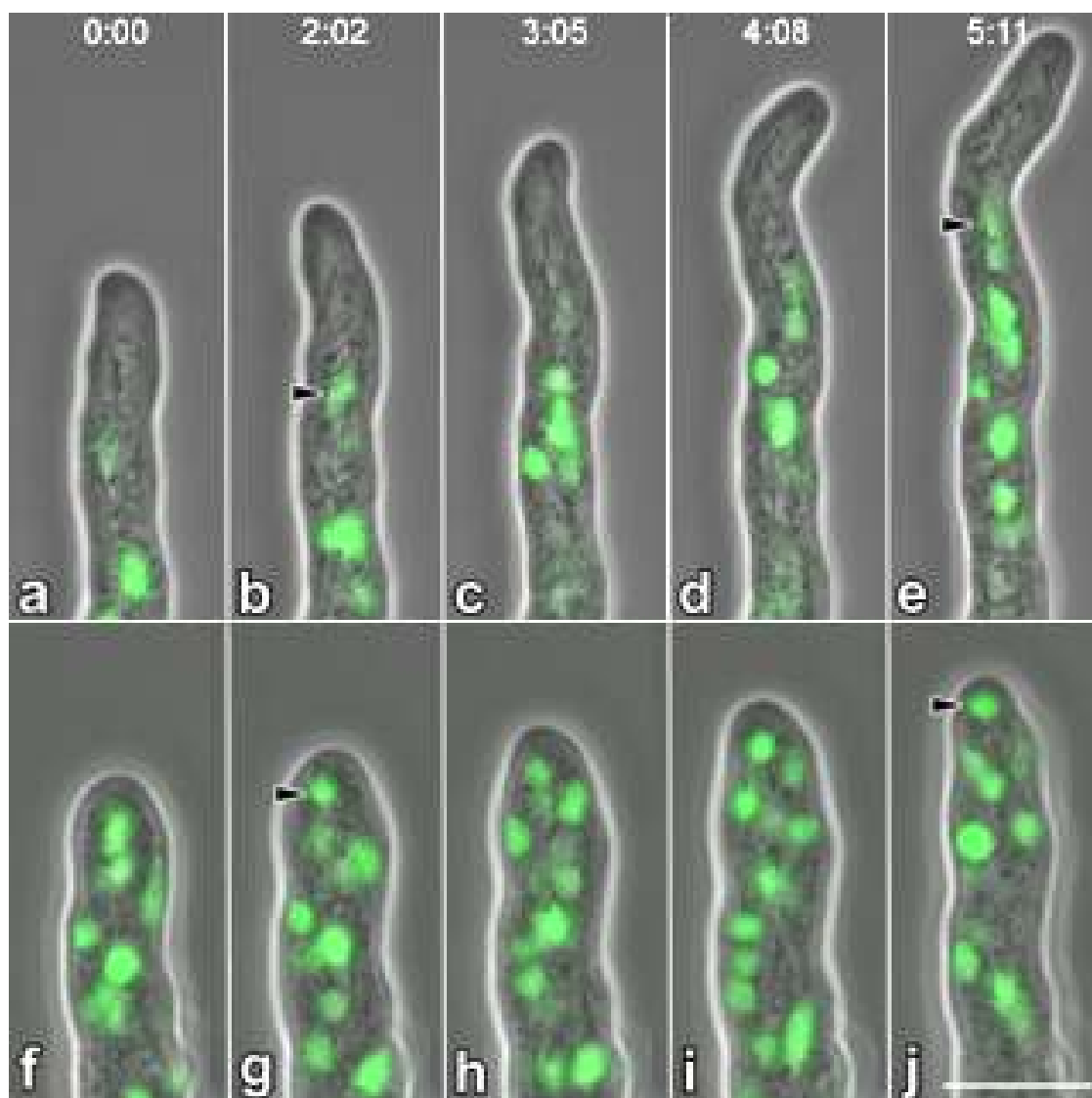




**Figura 8.** Serie de tiempo por microscopía confocal de *N. crassa* transformada con núcleos marcados con GFP con mutación en gen *ro-1* (a-e) y el gen *ro-3* (f-j). Se muestran imágenes sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las flechas indican la localización del Spk y las cabezas de flecha señalan al primer núcleo. Tiempo en min:s. Escala = 10  $\mu$ m.



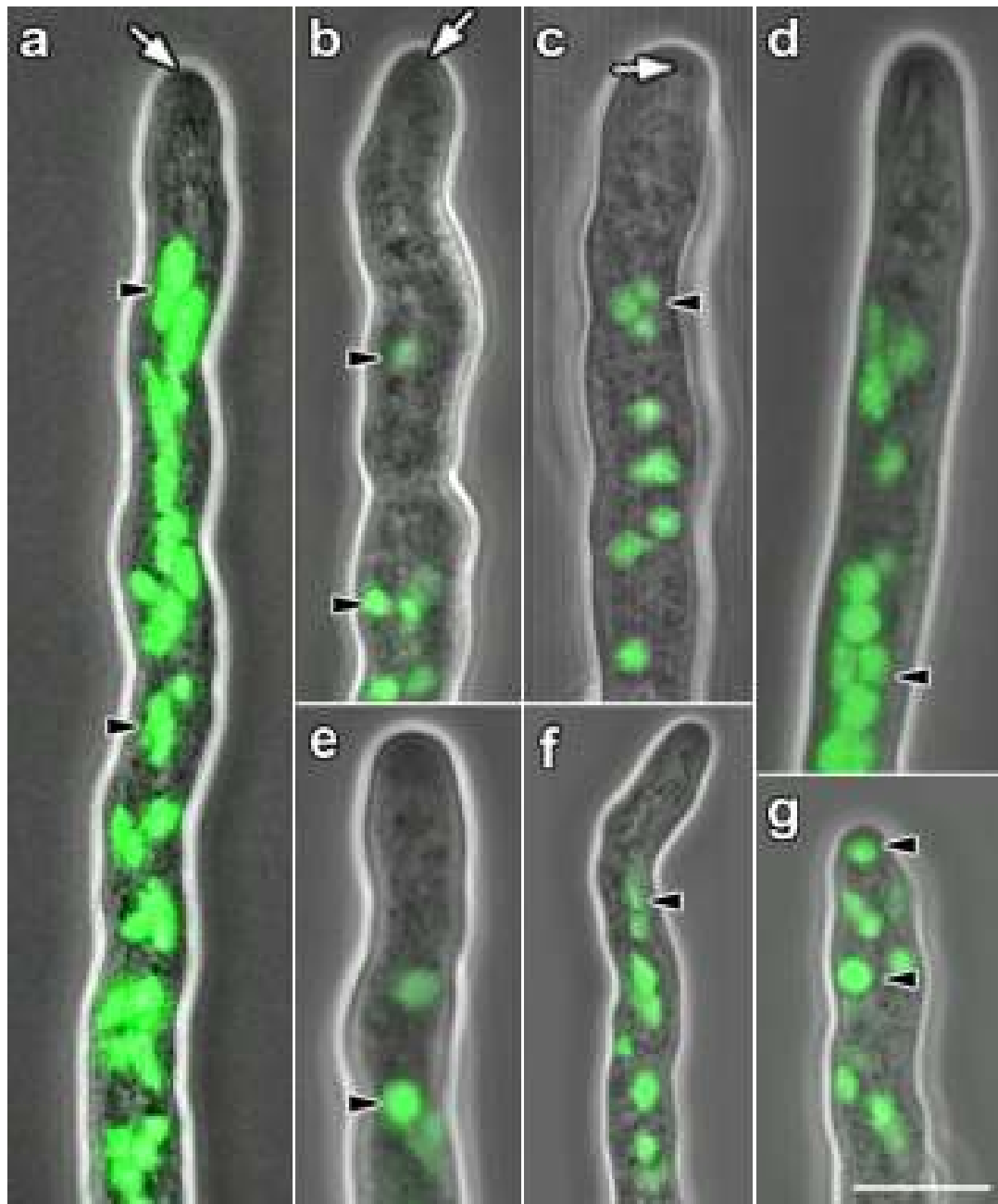
**Figura 9.** Serie de tiempo por microscopía confocal de *N. crassa* transformada con núcleos marcados con GFP con mutación en gen  $\Delta nkin$  (a-e) y la doble mutante *ropy-1/\Delta nkin* (f-j). Se muestran imágenes superpuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las cabezas de flecha señalan al primer núcleo. Tiempo en min:s. Escala = 10  $\mu$ m.



**Figura 10.** Serie de tiempo por microscopía confocal de *N. crassa* transformada con núcleos marcados con GFP tratadas con MBC (a-e) y con CA (f-j). Se muestran imágenes sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las cabezas de flecha señalan al primer núcleo. Tiempo en min:s. Escala = 10  $\mu$ m.

La CA es una droga que inhibe el transporte de monosacáridos a través de la membrana plasmática por competencia por la membrana receptora de hexosa. Las hifas tratadas con esta droga mostraron una reducción casi total de la zona de exclusión y los núcleos se distribuyeron homogéneamente a lo largo de la región apical y subapical, aunque en número menor con respecto al control (Figura 10f-g). Todos los núcleos eran esféricos (Figura 13 g).

Se observaron diferencias de la distribución de núcleos en ausencia de dineína (Figura 11b), dinactina (Figura 11c), cinesina (Figura 11e), dineína/cinesina (Figura 11d) y al despolimerizar los microtúbulos (Figura 11f) y los microfilamentos de actina (Figura 11g) con respecto al control (Figura 11a).



**Figura 11.** Comparación de la distribución y morfología nuclear en la región apical y subapical de hifas *N. crassa* transformadas con núcleos marcados con GFP. (a) Control; (b) *ropy-1*; (c) *ropy-3*; (d) *ropy-1/Δnkin*; (e)  $\Delta nkin$ ; (f) MBC; (g) CA. Imágenes de microscopía confocal sobrepuestas de los canales de luz transmitida por contraste de fase y de fluorescencia. Las flechas indican la posición del Spk y las cabezas de flecha los núcleos. Escala = 10  $\mu$ m.

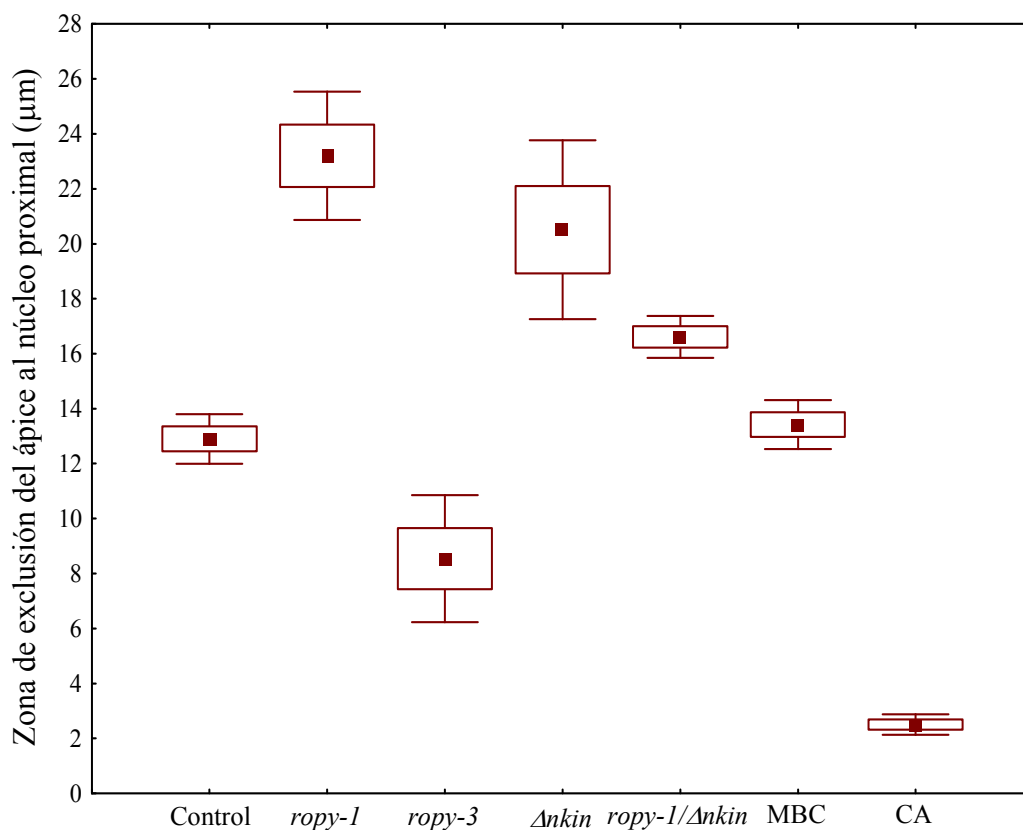
## 5. Zona de exclusión de los núcleos.

En la cepa de *N. crassa* que se utilizó como control, la distancia entre el ápice y el núcleo proximal fue de  $12.9 \pm 4.4 \mu\text{m}$ . La mutante *ropy-1* presentó una zona de exclusión significativamente mayor ( $23.2 \pm 6.2 \mu\text{m}$ ) que las demás cepas estudiadas ( $p < 0.05$ ), excepto la mutante  $\Delta nkin$  ( $20.5 \pm 8.7 \mu\text{m}$ ) (Figura 12).

Asímismo, la mutante  $\Delta nkin$  no tuvo diferencias con la doble mutante *ropy-1*/ $\Delta nkin$  ( $16.6 \pm 4.0 \mu\text{m}$ ) (Figura 12).

La mutante *ropy-3*, tuvo una diferencia significativa con todas las cepas, siendo el tamaño de la zona de exclusión de  $8.5 \pm 5.3 \mu\text{m}$  (Figura 12).

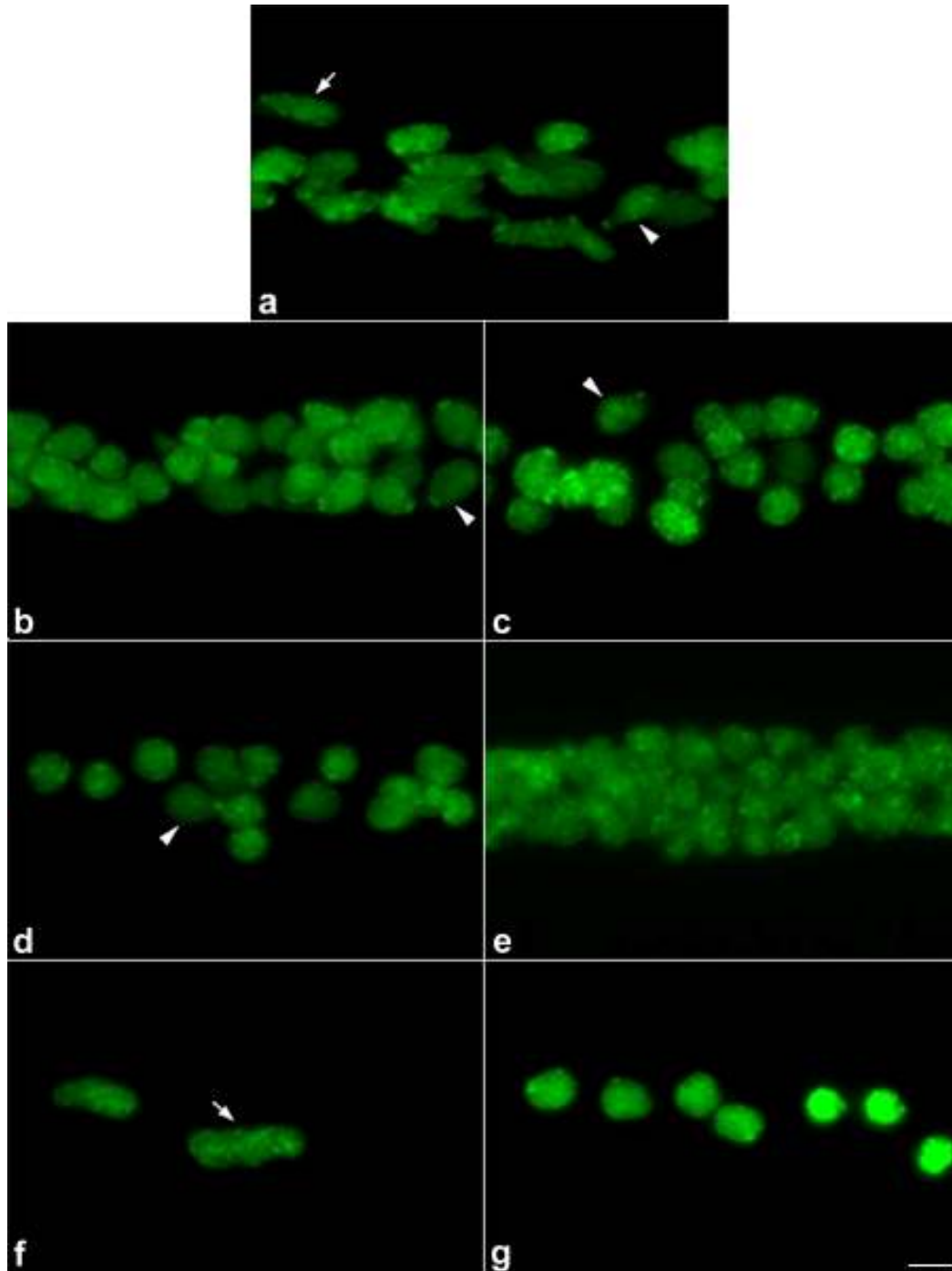
De los experimentos de inhibición las hifas tratadas con MBC mostraron una distancia entre la punta y el primer núcleo de  $13.4 \pm 4.6 \mu\text{m}$ ; muy similar al control. Las tratadas con CA fueron las que tuvieron una reducción drástica  $2.5 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , diferente al resto de cepas observadas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 12.** Tamaño de la zona de exclusión de los núcleos en hifas de *N. crassa* transformada con núcleos marcados con GFP, control, *ropy-1*, *ropy-3*,  $\Delta nkin$ , *ropy-1/\Delta nkin*, tratadas con MBC y CA. Todos los núcleos marcados con GFP. (■) media; (□) error estándar; y (I) intervalo de confianza al 95 %.

## 6. Morfología de los núcleos.

En el control, la forma de la mayoría de los núcleos fue alargada o como pera, con un punto de fluorescencia de mayor intensidad que podría corresponder al cuerpo polar del núcleo (Figura 13a).



**Figura 13.** Morfología de los núcleos en la región subapical de hifas de *N. crassa* transformadas con núcleos marcados con GFP. (a) Control; (b) *ropy-1*; (c) *ropy-3*; (d)  $\Delta nkin$ ; (e) *ropy-1/\Delta nkin*; (f) MBC; (g) CA. Imágenes de microscopía confocal del canal de fluorescencia. Escala = 2  $\mu\text{m}$ .



En las mutantes sencillas, *ropy-1*, *ropy-3* y *Ankin* (Figura 13b-d), algunos núcleos tuvieron forma de pera, sin embargo, la mayoría eran esféricos. En el caso de la doble mutante *ropy-1/Ankin* los núcleos eran esféricos en su totalidad (Figura 13e).

Los núcleos de las hifas tratadas con MBC fueron casi idénticos a los de la cepa control, en cuanto a la forma pero en una cantidad menor (Figura 13f). El tratamiento con CA produjo que todos los núcleos fueran esféricos (Figura 13g).

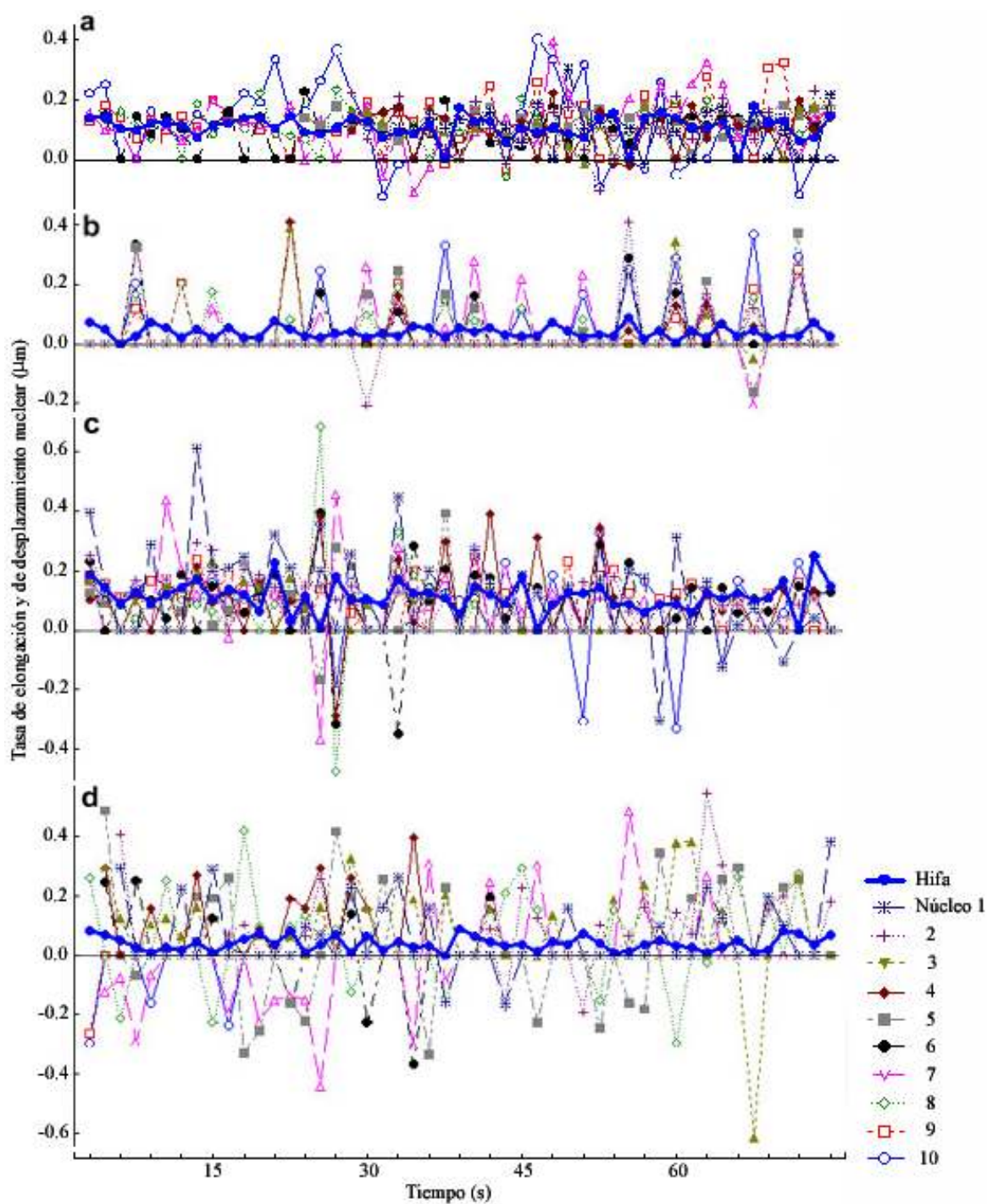
## 7. Tasa de elongación y de desplazamiento nuclear.

Se observó una relación entre la tasa de elongación de una hifa presentada con la línea azul gruesa y con la tasa de desplazamiento de cada uno de los diez núcleos más cercanos al ápice representados por líneas finas de diferentes colores (cada color representa un núcleo diferente) (Figura 14A y 14B).

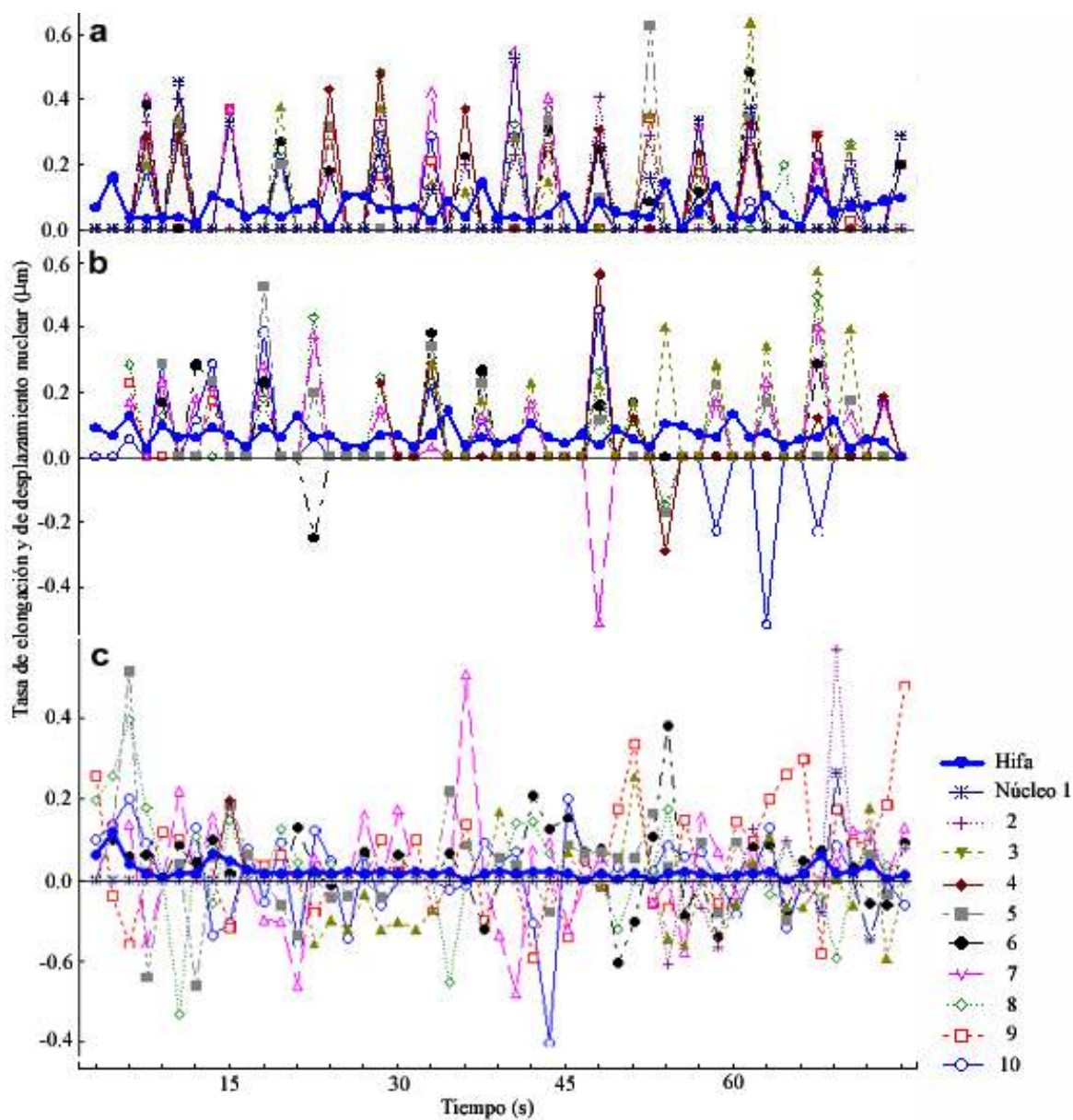
En el control se observó que la tasa de elongación tenía fluctuaciones constantes con un intervalo de valores cercanos a 0 y  $0.2 \mu\text{m s}^{-1}$ . El desplazamiento de la mayoría de los núcleos se mantuvo muy cercano a la tasa de elongación, mostrando esporádicamente movimientos acelerados anterógrados y retrógrados (Figura 14Aa).

En la mutante *ropy-1* la tasa de elongación presentó variaciones al igual que el control, pero con un intervalo menor ( $0$  a  $0.1 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Los núcleos mostraron desplazamientos principalmente hacia el ápice y solo en casos aislados hacia la región basal de la hifa (Figura 14Ab).

La mutante *ropy-3* mostró mayor variación en la tasa de desplazamiento nuclear. Se observaron movimientos anterógrados y retrógrados más acelerados (Figura 14Ac).



**Figura 14A.** Tasa de elongación de la hifa y tasa de desplazamiento nuclear en las cepas de *N. crassa* transformadas con núcleos marcados con GFP (a) Control; (b) *ropy-1*; (c) *ropy-3*; (d)  $\Delta nkin$ . Los valores negativos muestran el movimiento retrógrado de algunos núcleos.



**Figura 14B.** Tasa de elongación de la hifa y tasa de desplazamiento nuclear en las cepas de *N. crassa* transformadas con núcleos marcados con GFP (a) *ropy-1/Δnkin*; (b) MBC; (c) CA. Los valores negativos muestran el movimiento retrógrado de algunos núcleos.

La elongación de las hifas de la mutante *Δnkin* fue similar a la *ropy-1*, pero los núcleos presentaron movimientos saltatorios muy variables como si no tuvieran control (Figura 14Ad).

En el caso de la doble mutante *ropy-1/Δnkin*, la elongación apical tuvo un intervalo de 0.1 a 0.2  $\mu\text{m s}^{-1}$ . La mayoría de los núcleos presentaron movimientos anterógrados acelerados, sin embargo, ninguno se movió hacia atrás (Figura 14Ba).

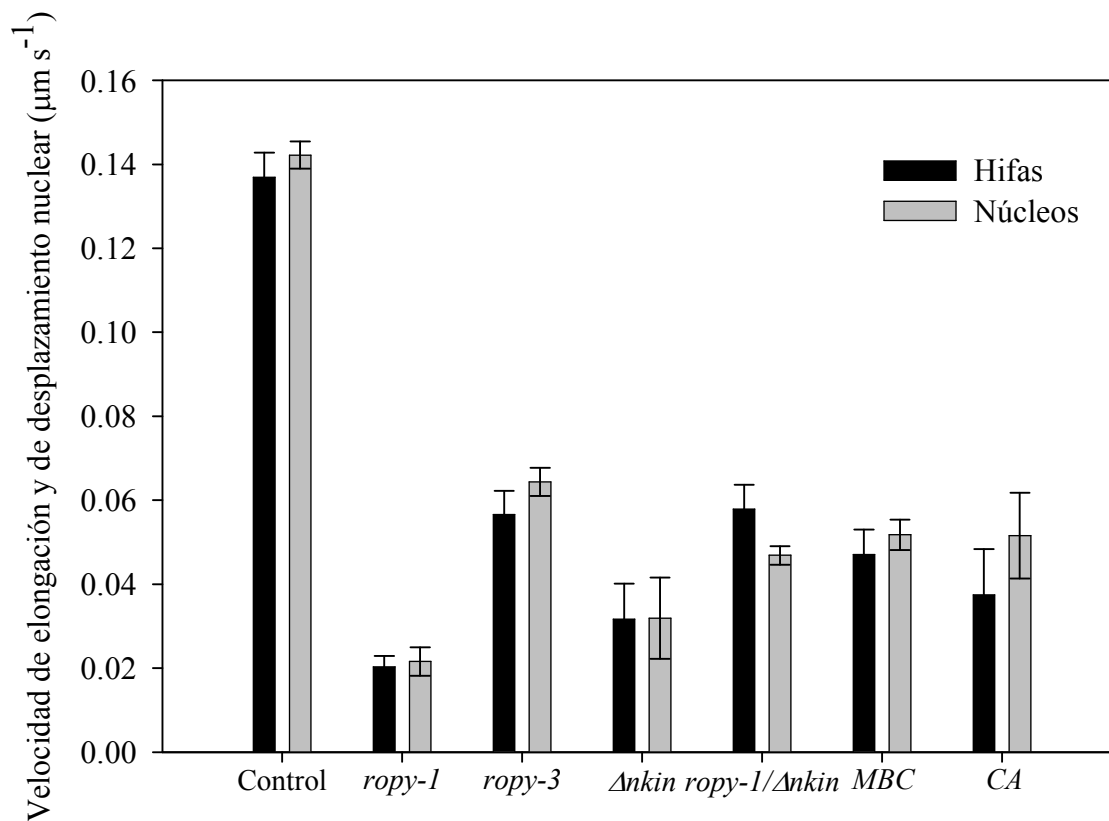
Las hifas tratadas con 2.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de MBC mostraron un comportamiento similar al de la mutante *ropy-1* (Figura 14Bb).

Las hifas tratadas con 1.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de CA tuvieron la tasa de elongación más baja. Así como la de desplazamiento de los núcleos que parecían tener un movimiento pasivo browniano (Figura 14Bc).

## **8. Tasa global de elongación y desplazamiento nuclear.**

Para comparar la tasa de elongación y de desplazamiento nuclear en forma global, se calcularon los promedios de todas las observaciones realizadas en conjunto de cada cepa (ver *n* en tabla III). La figura 15 muestra el promedio y el intervalo de confianza al 95% de estos dos indicadores.

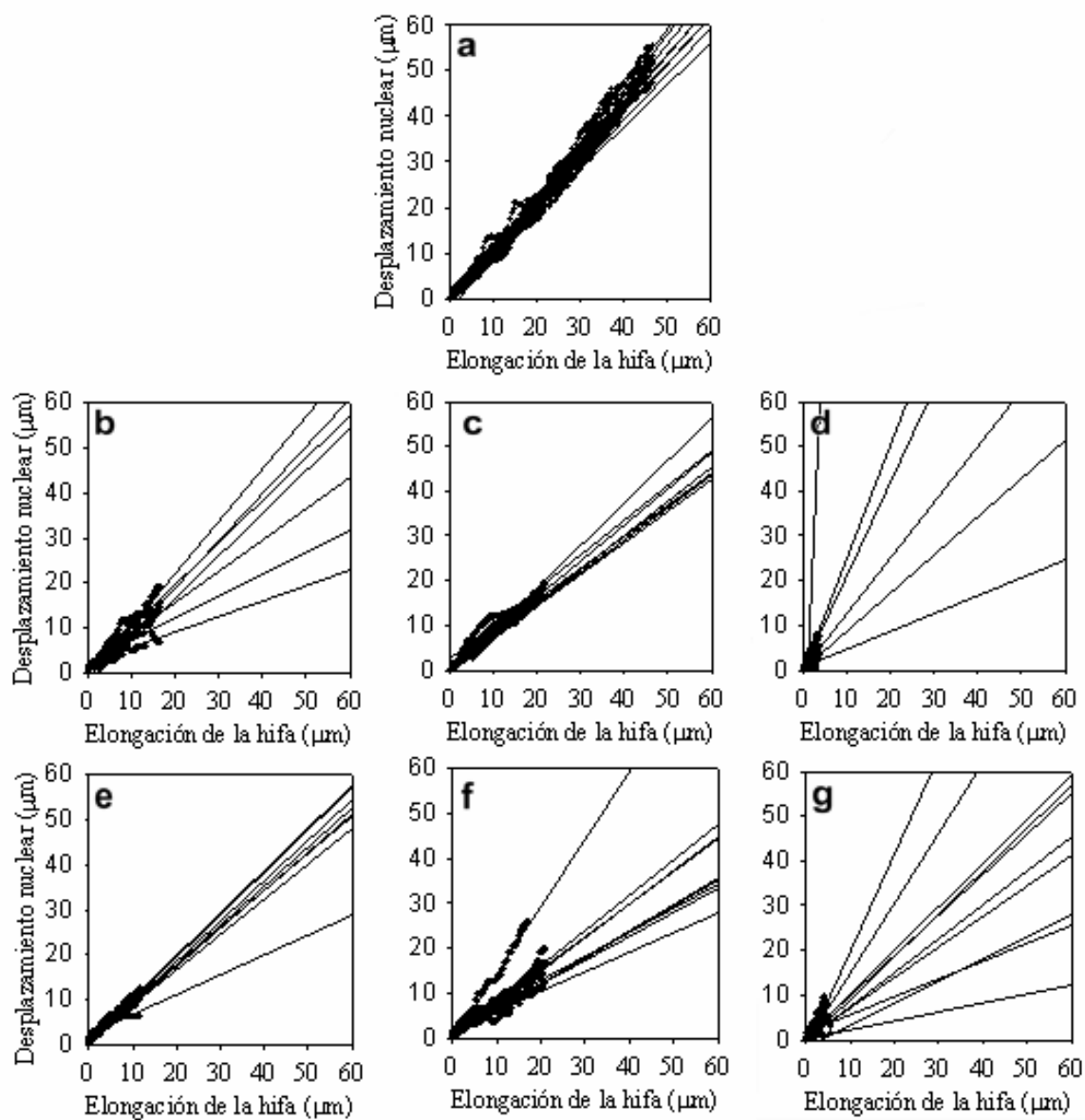
En ninguna de las condiciones estudiadas se encontraron diferencias entre la tasa global de elongación y la de desplazamiento de los núcleos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, entre las diferentes condiciones ambas tasas sí fueron diferentes ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15.** Tasa global de elongación de la hifa ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) y de desplazamiento nuclear ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) en las cepas de *N. crassa* control, *ropy-1*, *ropy-3*,  $\Delta kin$ , *ropy-1/\Delta kin*, tratadas con MBC y CA. La columna indica la media y la barra, el intervalo de confianza al 95 %.

### 9. Análisis de regresión lineal de la elongación de la hifa y el desplazamiento nuclear.

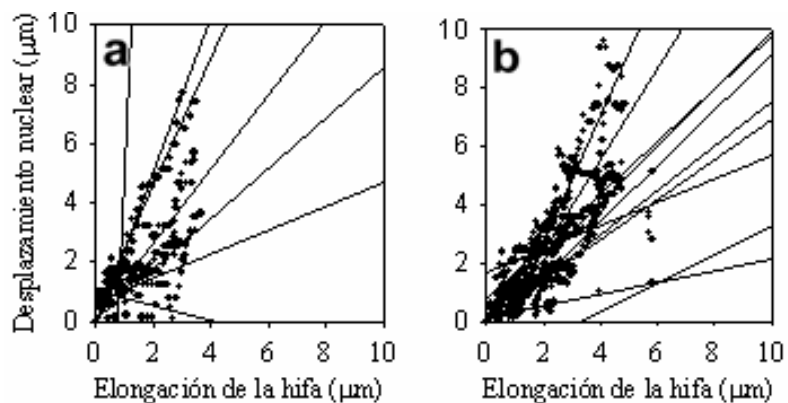
Las líneas de regresión de cada núcleo en la cepa control (Figura 16a) tienen pendientes muy similares, al igual que la mutante *ropy-3* (Figura 16c) y la doble mutante *ropy-1/\Delta kin* (Figura 16e). La *ropy-1* (Figura 16b) y la cepa tratada con MBC (Figura 16f) mostraron variaciones mínimas en las diferentes pendientes.



**Figura 16.** Regresión lineal de la elongación de la hifa (eje  $x$ ) y el desplazamiento nuclear (eje  $y$ ) en *N. crassa*. (a) Control; (b) *ropy-1*; (c) *ropy-3*; (d)  $\Delta nkin$ ; (e) *ropy-1/\Delta nkin*; (f) MBC; (g) CA.

En el caso de la mutante *Δnkin* y la cepa tratada con CA, las líneas de regresión tuvieron pendientes con diferente ángulo para cada núcleo (Figura 16d y g).

Estas diferencias se observan claramente en la figura 17 que muestra con mayor detalle las líneas de regresión, porque la escala de los ejes ( $x, y$ ) se redujo debido a que la mutante *Δnkin* y la cepa tratada con CA tuvieron los valores más bajos de elongación y desplazamiento.



**Figura 17.** Regresión lineal de la elongación de la hifa (eje  $x$ ) y el desplazamiento nuclear (eje  $y$ ) en *N. crassa*. (a) *Δnkin*, (b) CA. La escala de los ejes ( $x, y$ ) ha sido modificada de la figura 17 para tener un acercamiento.

Para confirmar si la tendencia del crecimiento celular se correlacionaba con el movimiento nuclear, se realizó un análisis de regresión lineal entre los valores de elongación y desplazamiento de una hifa y cada uno de los diez núcleos cercanos al ápice.

Los índices de correlación promedio ( $n=10$ ) se muestran en la Tabla V, así como la desviación estándar y los valores mínimos y máximos.

**Tabla V.** Índice de correlación entre la elongación apical y el desplazamiento nuclear.

	<b>Media</b>	<b>D. estándar</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
<b>Control</b>	0.99	0.002	0.99	0.99
<i>ropy-1</i>	0.89	0.109	0.65	0.98
<i>ropy-3</i>	0.99	0.009	0.96	0.99
<i>Δnkin</i>	0.62	0.351	0.02	0.98
<i>ropy-1/Δnkin</i>	0.98	0.040	0.86	0.99
<b>MBC</b>	0.94	0.063	0.80	0.99
<b>CA</b>	0.68	0.221	0.30	0.94

La correlación más alta fue en la cepa control con un índice de casi 1.0. La *ropy-1*, *ropy-3*, la doble mutante *ropy-1/Δnkin* y la cepa tratada con MBC tuvieron índices superiores a 0.8. La mutante *Δnkin* y la cepa tratada con CA mostraron los índices más bajos (<0.68).

#### **10. Dirección de los movimientos nucleares durante el crecimiento celular.**

Como se ha venido describiendo los núcleos tienen la capacidad de avanzar, retroceder o permanecer en un lugar, se describió el porcentaje de los movimientos en cada dirección, considerando el desplazamiento instantáneo registrando a través de los cambios de posición de cada núcleo observado cuadro por cuadro en las series de tiempo.

Del total de observaciones de cada cepa se calculó el porcentaje de movimientos anterógrados, retrógrados y sin cambio en la posición, estos valores son mostrados en la Tabla VI.



**Tabla VI.** Dirección de los movimientos de los núcleos.

<i>N. crassa</i>	Movimientos					
	Anterógrado		Retrógrado		Sin movimiento	
	No. Obs.	%	No. Obs.	%	No. Obs.	%
Control	5161	75.4	258	3.7	1425	20.8
<i>ropy-1</i>	1122	23.3	176	3.6	3502	72.9
<i>ropy-3</i>	1824	44.8	138	3.3	2106	51.7
<i>Δnkin</i>	333	21.1	104	6.6	1137	72.2
<i>ropy-1/Δnkin</i>	1779	19.1	0	0.0	7521	80.8
MBC	1141	23.1	122	2.7	3243	74.1
CA	236	13.3	216	12.1	1320	74.4

En la cepa control los núcleos se desplazaron hacia el ápice con mayor frecuencia (75.4% del tiempo), y solo en el 3.7 % de las observaciones se movieron hacia atrás (Tabla VI).

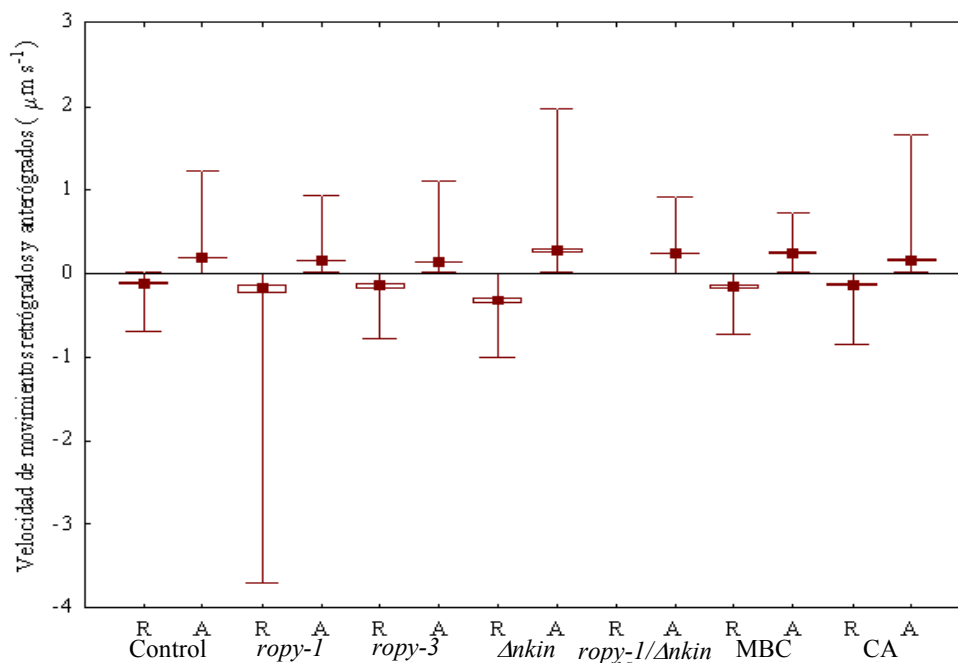
En todas las condiciones estudiadas se presentó una reducción significativa de la proporción de movimientos anterógrados ( $p < 0.05$ ), en virtud de que permanecían por más tiempo en el mismo lugar. El movimiento retrógrado, en la doble mutante *ropy-1/Δnkin* fue nulo y en la *Δnkin* y la cepa tratada con CA se incrementó este porcentaje en forma significativa ( $p < 0.05$ ).

## 11. Velocidad de desplazamiento de los núcleos.

Por separado se calculó la velocidad de desplazamiento de los núcleos en sentido anterógrado y retrógrado mostrando que casi en todas las condiciones los núcleos tienen la capacidad de avanzar o retroceder largas distancias durante el crecimiento apical (Tabla VII) (Figura 19).

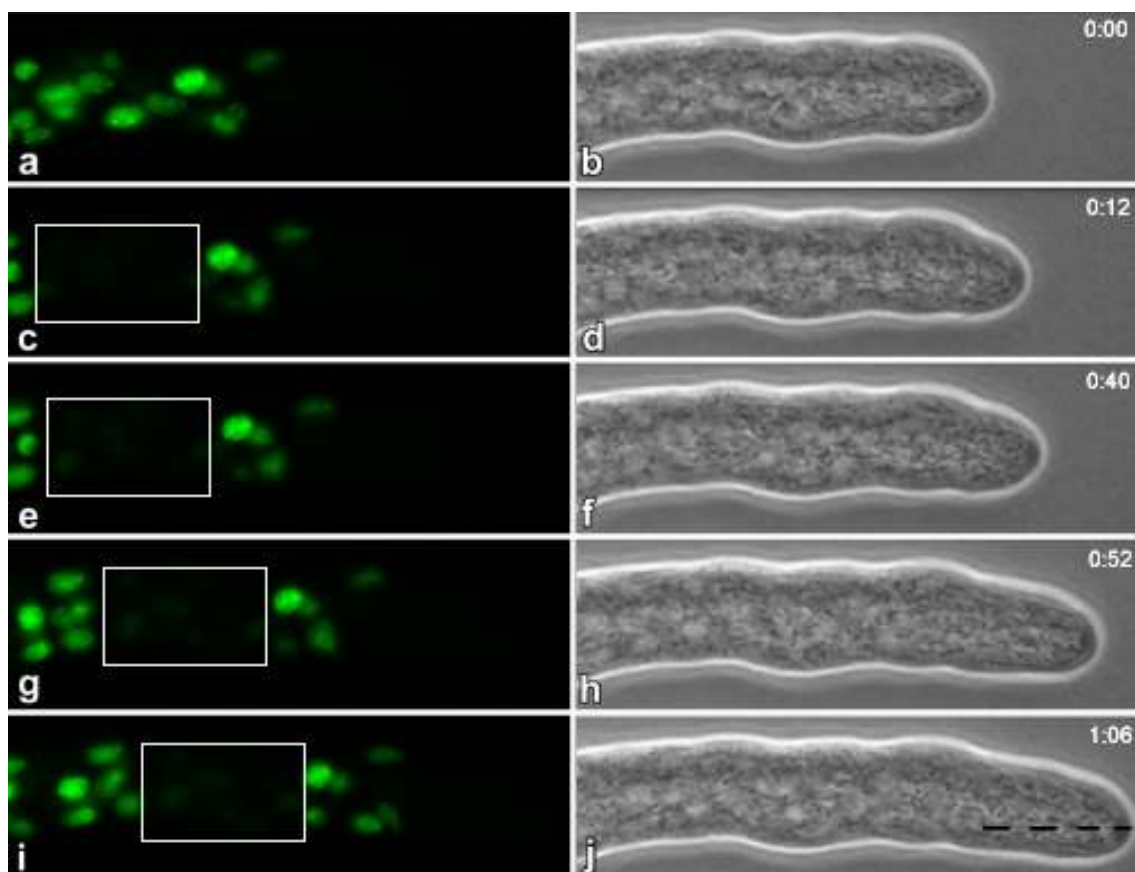
**Tabla VII.** Velocidad máxima de desplazamiento anterógrado y retrógrado de los núcleos.

<i>N. crassa</i>	Velocidad máxima de movimiento	
	Anterógrado	Retrógrado
<b>Control</b>	1.2	0.7
<i>ropy-1</i>	0.9	3.7
<i>ropy-3</i>	1.1	0.8
$\Delta kin$	2.0	1.0
<i>ropy-1/\Delta kin</i>	0.9	0.0
MBC	0.7	0.7
CA	1.0	1.3

**Figura 19.** Velocidad de desplazamiento retrógrado y anterógrado de los núcleos. (▪)media; (□) intervalo de confianza al 95%; y (I) valor máximo y mínimo.

## 12. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP).

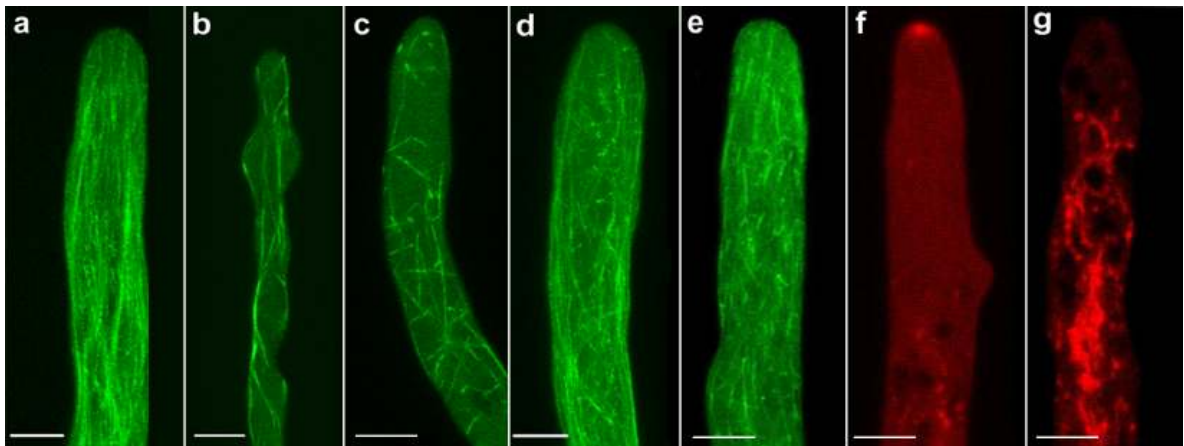
En el control el área fotoblanqueada de la región subapical de hifas de *N. crassa*, no se presentó repoblación de núcleos fluorescentes después de 5 minutos de secuencia. (Figura 20).



**Figura 20.** Recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP) del área marcada con el recuadro de línea continua. La línea punteada muestra el crecimiento a través del tiempo. Microscopía de fluorescencia (a, c, e, g, i); contraste de fases (b, d, f, h, j). Tiempo en min:s. Escala = 10  $\mu$ m.

### 13. Organización del citoesqueleto microtubular de *N. crassa*.

La integridad del citoesqueleto microtubular es otra característica que se describió para las cepas en estudio. La figura 21 muestra las diferencias en la organización de los microtúbulos. Se observó que las cepas con mutaciones sencillas mostraron diferentes grados de desorganización.



**Figura 21.** Citoesqueleto microtubular y de actina en *N. crassa*. (a) Cepa control con microtúbulos marcados con GFP; (b) *ropy-1*; (c) *ropy-3*; (d)  $\Delta nkin$ ; (e) MBC; (f) cepa control con los filamentos de actina marcados con RFP; (g) CA. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

## V. DISCUSION

Los procesos de elongación apical y desplazamiento nuclear en células fúngicas han sido punto de discusión durante décadas; en diferentes momentos estos fenómenos se han atribuido a diferentes causas.

La tasa de elongación celular y el desplazamiento de núcleos son muy similares debido a que ambos son consecuencia de la fuerza que el flujo citoplasmático ejerce durante el crecimiento polarizado de hifas maduras, de tal manera que las células tienen un menor gasto de energía que si utilizaran las proteínas motoras como transporte principal de los núcleos u otros organelos.

Dentro de la tasa de elongación y de desplazamiento nuclear se puede mencionar que el mal funcionamiento en proteínas motoras afecta la tasa de crecimiento y de desplazamiento al comparar diferentes cepas, pero estos efectos no influyen en una diferencia significativa entre la elongación apical y el desplazamiento de los núcleos. Esto puede ser a causa de que al disminuir el flujo citoplasmático que es la principal fuerza de empuje en la elongación de la hifa, los núcleos por consecuencia se desplazan con dicho movimiento; que también puede observarse con el análisis de regresión lineal, donde en la mayoría de los casos, a excepción de la mutante *Ankin* y el tratamiento con CA, los núcleos parecían llevar cierta correlación con el crecimiento apical.

Los movimientos de los núcleos fueron, en la mayoría de los casos en ambos sentidos; incluso en las mutantes del complejo de dineína-dinactina se dieron movimientos retrógrados y anterógrados más largos que la misma elongación de la hifa. La realidad puede ser muy diferente a la descrita por Yamamoto e Hiraoka (2003), quienes mencionan

que los movimientos retrógrados se deben solo a las proteínas involucradas con el complejo dineína-dinactina y que los movimientos anterógrados lo son a la cinesina convencional. Es probable que las proteínas motoras, como se mencionó, tengan cierta libertad de movimiento en ambas direcciones o incluso que al mutar una de ellas la otra restituya el problema inmediatamente; pues en la doble mutante *ropy-1/Ankin* tal como lo mencionaron Seiler y colaboradores (1999), no se presentaron movimientos retrógrados, debido a la ausencia de ambos motores.

Respecto al elevado índice de crecimiento que la doble mutante *ropy-1/Ankin* tuvo en comparación con ambas cepas parentales, siendo mayor a lo que Seiler y colaboradores (1999) mencionan en sus investigaciones, pudo deberse al tipo de cepas utilizadas o incluso a que el apareamiento de ambas mutantes pudo restituir alguna función en el desarrollo lo que le permitiera elevar su crecimiento. Otra posible razón podría ser la alta producción de material genético debido a la acumulación de núcleos en todo lo largo de la hifa lo que permita una mayor tasa de elongación celular.

La morfología esférica de los núcleos en las mutantes de proteínas motoras, como también Seiler y colaboradores (1999) los describen, pueden ser por la disfuncionalidad de las proteínas motoras, que mantienen unidos los núcleos a los microtúbulos; ésta tal vez sea la razón del por qué en el tratamiento con MBC los núcleos también presentan una morfología alargada. En mutantes sencillas, la razón de los movimientos retrógrados puede ser causa de que las proteínas motoras tienen la capacidad de viajar en ambos sentidos en un mismo microtúbulo, lo que sustituiría el movimiento de núcleos cuando un motor tiene

funciones nulas o interrumpidas; pues el movimiento retrógrado no puede observarse en la doble mutante *ropy-1/Δnkin*.

Como ya se mencionó, la morfología nuclear en las hifas de *N. crassa* transformada puede ser cuestión de la unión entre las proteínas motoras que tiran de los núcleos a través de su movimiento sobre los microtúbulos, ya que en la doble mutante *ropy-1/Δnkin* la forma de pera descrita en resultados no es observada en los núcleos de esta mutante.

La organización del citoesqueleto microtubular varió entre las mutantes sencillas con respecto al control; dicha organización puede ser dependiente en cierta forma de las proteínas motoras, principalmente del complejo dineína-dinactina; tal vez debido a lo que Malikov y colaboradores (2004) mencionaron sobre la función de nucleación de microtúbulos que la dineína presentaba en sus resultados.

Las observaciones del desplazamiento nuclear en *N. crassa* coinciden con lo que Torralba y colaboradores (1998) mencionaron sobre *A. nidulans* al inhibir el citoesqueleto de actina con CA, con Karpova y colaboradores (2000) y Virag y Griffiths (2004) que con la primer mutante de actina en *N. crassa* encontraron una agregación de núcleos esféricos y una distribución anormal llegando hasta el ápice hinchado de la hifa. Esto sugiere que el citoesqueleto de actina es de gran importancia para mantener posicionados a los núcleos a cierta distancia de la punta.

Xiang y Fischer (2004) se preguntaban de que manera los organelos internos pueden tener sentido de las distancias a las cuales deben encontrarse, principalmente entre el ápice y el núcleos proximal. Una parte de la respuesta se encuentra en el citoesqueleto de actina, pues al ser desorganizados los núcleos no tienen control en cuestión de distribución

y es posible que lleguen a distancias muy cortas del ápice celular teniendo como consecuencia una menor elongación apical.

El método FRAP fue de utilidad para el análisis de que las proteínas motoras son las principales fuerzas de movimiento de los núcleos, pues al no observar núcleos dentro de la zona fotoblanqueada se puede sugerir con mayor certeza que las proteínas son necesarias en mecanismos específicos de movimiento.

En las cepas utilizadas para este trabajo, que fueron transformadas genéticamente se utilizaron concentraciones de MBC de  $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , esta concentración es un orden de magnitud mayor que la utilizada en otros estudios como es de Barja y colaboradores (1992) que utilizaron  $0.29 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MBC en germínulas de *N. crassa*, y el de That y colaboradores (1988) donde se observaron efectos con  $0.49 \mu\text{g ml}^{-1}$  de esta misma droga. Aunque en estas dos investigaciones se utilizaron células de *N. crassa* en otro estudio del desarrollo como son las germínulas, muy probablemente la transformación genética de este organismo produjo en cierta medida una ligera resistencia al Benomilo.

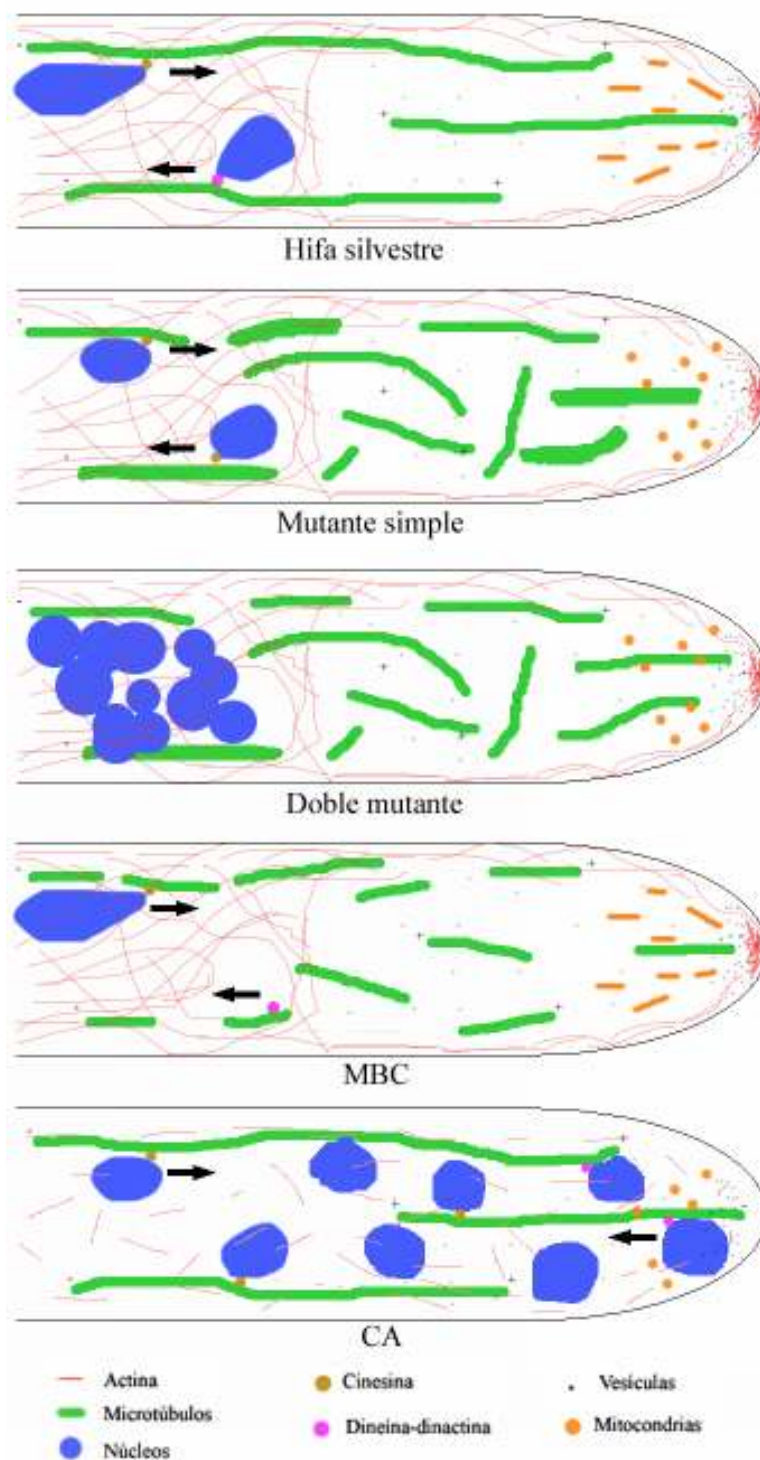
Esta misma cepa transformada con los núcleos marcados con GFP se expuso a concentraciones de CA de  $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ , siendo mucho menor a la utilizada por Allen y colaboradores (2005) quienes utilizaron  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  de esta misma droga para inhibir el crecimiento; esto tal vez se debe a que ellos buscaban la concentración a la cual se inhibiera totalmente el crecimiento de las hifas y no solo al 50 % como se buscaba en esta ocasión.

Por tal manera se propone el siguiente modelo (Figura 22) en el cual se interrelacionan todos los elementos celulares tanto del citoesqueleto como motores; donde



en el caso de hifas silvestres los núcleos se encuentran unidos a los microtúbulos mediante las proteínas motoras pero la estructura de los microfilamentos de actina mantienen la zona de exclusión relativamente constante (Figura 22a). Para el caso de las mutantes sencillas se propone que la disfuncionalidad de una proteína puede enviar una señal a la célula para restituir dicha mutación, permitiendo que otras proteínas motoras realicen la función dañada (Figura 22b); al eliminar la funcionalidad de dos proteínas motoras esenciales la célula no tiene la capacidad de sustituir la mutación y por tal motivo los núcleos permanecen más agrupados y es más notorio su movimiento junto con el citoplasma (Figura 22c).

Se propone también que a pesar de la irregularidad y tamaño de los microtúbulos, los núcleos continúan siendo jalados en dirección de cada proteína motora (Figura 22d); mientras que en ausencia de los filamentos de actina el control estructural se rompe, la zona de exclusión es interrumpida y los núcleos pueden alcanzar el ápice sin dificultad, además que la tasa de elongación se reduce. (Figura 22e).



**Figura 22.** Modelo de desplazamiento nuclear. (a) Hifa silvestre; (b) mutante sencilla; (c) doble mutante; (d) MBC; (e) CA.

## VI. CONCLUSIONES

- *N. crassa* es un organismo resistente a ciertas drogas del citoesqueleto, pero no a aquellas que actúen sobre de los filamentos de actina, que son de esencial importancia para un crecimiento polarizado y una distribución regular de los organelos.
- Las mutantes de proteínas motoras no muestran efectos en el movimiento total de los núcleos; es decir, la mayoría de los núcleos son desplazados por acción del flujo citoplasmático, al ritmo de la tasa de elongación.
- Se puede concluir que debido a que los movimientos retrógrados y anterógrados se observaban en la mayoría de las situaciones a excepción de la doble mutante *ropy-1/ $\Delta$ ankin*: 1) la función de las proteínas motoras en hifas maduras se utiliza solo para dar grandes movimientos a los organelos o para ir contra-corriente a la dirección del flujo citoplasmático; 2) el citoesqueleto microtubular tiene una organización bidireccional lo que permite que en las mutantes *ropy* haya retrocesos en el sentido del ápice celular; 3) las proteínas motoras tienen la capacidad de transportar organelos en ambos sentidos; 4) de funcionar alternativamente dentro de la célula al momento en que una de ellas se encuentra defectuosa, llevando a cabo su función bidireccional; y 5) los microfilamentos de actina son los principales elementos del citoesqueleto que mantienen la organización y dinámica en relaciones normales dentro de la célula.

## VII. REFERENCIAS

- Alberti-Segui C., Dietrich F., Altmann-Jöhl R., Hoepfner D. y Philippsen P. (2001)** Cytoplasmic dynein is required to oppose the force that moves nuclei towards the hyphal tip in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *J. Cell Sci.* 114:975-986.
- Allen E.D., Aiuto R. y Sussman A.S. (2005)** Effects of cytochalasins on *Neurospora crassa*. *Protoplasma*. 102:1615-6102.
- Allen R.D., Weiss D.G., Hayden J.H., Brown D.T., Fujiwake H. y Simpson M. (1985)** Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* 100:1736-1752.
- Barja F., Jaramillo-Maranon M., Dossier C. y Turian G. (1992)** Differential effects of griseofulvin and benomyl on morphology and nuclear distribution during the germination of *Neurospora crassa* macroconidia. *Mycol. Res.* 96:147-150.
- Bartnicki-Garcia S. (2002)** Hyphal growth. Outstanding questions. *Mol Biol. Fung. Dev.* 29-58 pp.
- Beckwith S.M., Roghi C.H., Liu B. y Morris R. (1998)** The "8-kD" cytoplasmic dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization in *Aspergillus nidulans*. *Cell Biol.* 143:1239-1247.
- Bowman A.B., Patel-King R.S., Benanshki, S.E., McCaffery J.M., Goldstein L.S.B. y King S.M. (1999)** *Drosophila* roadblock and *Chlamydomonas* LC7: A conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility and mitosis. *J. Cell Biol.* 146:165-180.
- Bruno K.S., Tinsley J.H., Minke P.F. y Plamann M. (1996)** Genetic interactions among cytoplasmic dynein, dynactin, and nuclear distribution mutants of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:4775-4780.

- Eckley D.M., Gill S.R. Melkonian K.A., Bingham J.B., Goodson H.V., Heuser E. y Schroer T.A. (1999)** Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the Arp1 minifilament pointed end. *147:307-320.*
- Fischer R. y Timberlake W.E. (1995)** *Aspergillus nidulans* apsA (Anucleate Primary Sterigmata) Encodes a Coiled-Coil Protein Required for Nuclear Positioning and Completion of Asexual Development. *Cell Biol. 128:485-498.*
- Freitag M., Hickey P.C., Raju N.B., Selker E.U. y Read N.D. (2004)** GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fung. Gen. Biol. 41:897-910.*
- Freitag M. y Selker E.U. (2005)** Controlling DNA methylation: many roads to one modification. *Curr. Op. Gen. Dev. 15:191-199.*
- Girbardt M. (1955)** Lebendbeobachtungen an *Polystictus versicolor*. *Flora. 142: 540-563.*
- Heath I.B. (1982)** The effect of nocodazole on the growth and ultrastructure of the fungus *Saprolegnia ferax*: Evidence against a simple mode of action. En Cappucinelli O., Morris N.R.. *Microtubules in Microorganisms*. New York. Marcel Dekker, Inc. pp. 275-311.
- Herr F.B. y Heath M.C. (1982)** The effect of antimicrotubule agents on organelle positioning in the cowpea rust fungus, *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *Exp. Mycol. 6: 15-24.*
- Hirokawa N. (1998)** Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Sci. 279: 519-526.*
- Hickey P.C., Swift S.R., Roca G. y Read N.D. (2002)** Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology. 34:63-87.*
- Huffaker T.C., Thomas J.H. y Botstein D. (1988)** Diverse effects of beta-tubulin mutations on microtubule formation and function. *J. Cell Biol. 106:1997-2010.*

- Inoue S., Turgeon B.G., Yoder O.C. y Aist J.R. (1998)** Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration. *J. Cell Sci.* 111:1555-1566.
- Karki S. y Holzbaur L.F. (1995)** Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. *J. Biol. Chem.* 270:28806-28811.
- Karpova T.S., Reck-Peterson S.L., Elkind N.B., Mooseker M.S., Novick P.J. y Cooper J.A. (2000)** Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol.* 11:1727-1737.
- Koonce M.P. y Schliwa M. (1985)** Bidirectional organelle transport can occur in cell processes that contain single microtubules. *J. Cell Biol.* 100:322-326.
- Ma S. y Chisholm R.L. (2002)** Cytoplasmic dynein-associated structures move bidirectionally in vivo. *Cell Sci.* 115:1453-1460.
- Malikov V., Kashina A. y Rodionov V. (2004)** Cytoplasmic dynein nucleates microtubules to organize them into radial arrays *in vivo*. *Mol. Biol. Cell.* 15:2742-2749.
- McConnell S.J. y Yaffe M.P. (1992)** Nuclear and mitochondrial inheritance in yeast depends on novel cytoplasmic structures defined by the MDM1 protein. *Cell Biol.* 118:385-395.
- McKerracher L.J. y Heath I.B. (1985)** Microtubules around migrating nuclei in conventionally-fixed and freeze-substituted cells. *Protoplasma.* 125:162-172.
- McKerracher L.J. y Heath I.B. (1986)** Fungal nuclear behavior analysed by ultraviolet microbeam irradiation. *Cell Mot. Cyt.* 6:35-47.
- Minke P.F., Lee I.H., Tinsley J.H., Bruno K.S. y Plamann M. (1999)** *Neurospora crassa ro-10* and *ro-11* genes encode novel proteins requires for nuclear distribution. *Mol. Microbiol.* 32:1065-1076.

- Morris N.R. (1976)** Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. Gen. Res. Camb. 26:237-254.
- Morris N.R. (2000)** Nuclear migration: From fungi to the mammalian brain. Cell Biol. 148:1097-1101.
- Mouriño-Pérez R.R., Roberson R.W. y Bartnicki-García S. (2006)** Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. Fung. Gen. Biol. 43:389-400.
- Niclas J., Allan V.J. y Vale R.D. (1996)** Cell cycle regulation of dynein association with membranes modulates microtubules-based organelle transport. Cell Biol. 133:585-593.
- Oakley B.R. y Morris N.R. (1980)** Nuclear movement is  $\beta$ -tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. Cell. 19:255-262.
- Oakley B.R. y Rinehart J.E. (1985)** Mitochondria and nuclei move by different mechanisms in *Aspergillus nidulans*. Cell Biol. 101:2392-2397.
- Palmer R.E., Sullivan D.S., Huffaker T. y Koshland D. (1992)** Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. 119:583-593.
- Plamann M., Minke P.F., Tinsley J.H. y Bruno K.S. (1994)** Cytoplasmic dynein and actin-related protein Arp1 are required for normal nuclear distribution in filamentous fungi. Cell Biol. 127:139-149.
- Riquelme M., Gierz G. y Bartnicki-García S. (2000)** Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. Microbiol. 146:1743-1752.
- Robb M.J., Wilson M.A. y Vierula P.J. (1995)** A fungal actin-related protein involved in nuclear migration. Mol. Gen. Genet. 247:583-590.

- Schafer D.A., Gill S.R., Cooper J.A., Heuser J.E. y Schroer T.A. (1994)** Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament resembles F-actin. *J. Cell Biol.* 126:403-412.
- Seiler S., Nargang F.E., Steinberg G. y Schliwa M. (1997)** Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO Journal*. 16:3025-3034.
- Seiler S. y Plamann M. (2003)** The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell*. 14:4352-4364.
- Seiler S., Plamann M. y Schliwa M. (1999)** Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicles traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Curr. Biol*. 9:779-785.
- Srinivasan S., Vargas M.M. y Roberson R.W. (1996)** Functional, organizational and biochemical analysis of actin in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Mycol.* 88:57-70.
- Starr D.A., Hermann G.J., Malone C.J., Fixsen W., Priess J.R., Horvitz H.R. y Han M. (2001)** unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. *Develop.* 128:5039-5050.
- Suelmann R., Sievers N. y Fischer R. (1997)** Nuclear traffic in fungal hyphae: *in vivo* study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 25:757-769.
- Suelmann R. y Fischer R. (2000)** Nuclear migration in fungi – different motors at work. *Microbiol. Res.* 151:247-254.
- That T.C., Rossier C., Barja F., Turian G. y Roos U.P. (1988)** Induction of multiple germ tubes in *Neurospora crassa* by antitubulin agents. *Cell Biol.* 46:68-79.



- Tinsley J.H., Minke P.F., Bruno K.S. y Plamann M. (1996)** p150<sup>Glued</sup>, the largest subunit of the dynactin complex, is nonessential in *Neurospora* but required for nuclear distribution. *Mol. Biol. Cell.* 7:731-742.
- Torralba S., Raudaskoski M., Pedregosa A.M. y Laborda F. (1998)** Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol.* 144: 45-53.
- Tran P.T., Marsh L., Doye V., Inoué S. y Chang F. (2001)** A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *Cell Biol.* 153:397-411.
- Turian G., Barja F. y That C. (1992)** Nucleolar dense granules in cytochalasin-treated conidia of *Neurospora crassa*. *Cell Biol. Int. Rep.* 16:1265-1266.
- Veith D., Scherr N., Efimov V.P. y Fischer R. (2005)** Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Cell Sci.* 118:3705-3716.
- Virag A. y Griffiths A.J.F. (2003)** A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fung. Gen. Biol.* 41:213-225.
- Vogel H.J. (1964)** Distribution of the lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Naturalist.* 98: 435-446. En: Davis RH(2000) *Neurospora: Contributions of a Model Organism*. Oxford University Press, Inc. Nueva York. Pag 282-283.
- Vorobjev I., Malikov V. y Rodionov V. (2001)** Self-organization of a radial microtubule array by dynein-dependent nucleation of microtubules. *PNAS.* 98:10160-10165.
- Willins D.A., Xiang X. y Morris R. (1995)** An alpha tubulin mutation suppresses nuclear migration mutation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 141:1287 – 1298.
- Xiang X., Beckwith S.M. y Morris N.R. (1994)** Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:2100-2104.

**Xiang X. y Fischer R. (2004)** Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fung. Gen. Biol.* 41:411-419.

**Yamamoto A. y Hiraoka Y. (2003)** Cytoplasm dynein in fungi: insights from nuclear migration. *Cell Sci.* 116:4501-4512.

## VIII. ANEXOS

**Anexo A.** Reactivos para medios de cultivo (Vogel, 1964):

<b>Sales de Vogel:</b>	<b>Cantidad</b>
Citrato $\text{Na}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	150 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (anhidro)	250 g
$\text{KH}_4\text{NO}_3$	100 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 g
Biotina	5 ml
Elementos traza	5 ml
$\text{dH}_2\text{O}$	750 ml

El volumen total es aproximadamente 1 L a una concentración de 50x con un pH de 5.8. Se le agregan 2 ml de cloroformo como conservador para ser almacenado a temperatura ambiente. Para su utilización es necesario diluirlo 50 veces con agua destilada.

<b>Elementos traza:</b>	<b>Cantidad</b>
Acido cítrico $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$	5.00 g
$\text{ZnSO}_4$	5.00 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.00 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.05 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{dH}_2\text{O}$	95 ml

Llevar el volumen a 100 ml con agua destilada. Agregar 1 ml de cloroformo como conservador y almacenar en oscuridad a temperatura ambiente.

<b>Solución Biotina:</b>	<b>Cantidad</b>
Biotina (Merck)	5 mg
dH <sub>2</sub> O	50 ml

**Anexo B.** Reactivos para despolimerización del citoesqueleto

<b>MBC 10 mg ml<sup>-1</sup>:</b>	<b>Cantidad</b>	<b>CA 1 mg ml<sup>-1</sup>:</b>	<b>Cantidad</b>
MBC	10 mg	Citocalasina A	1 mg
Etanol 96 %	1 ml	Etanol 96 %	1 ml

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Silvia Lucrecia Ramos García** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. October, 2006.

## **ROLE OF CYTOPLASMIC FLOW AND MOTOR PROTEINS ASSOCIATED TO MICROTUBULES ON THE NUCLEAR DISPLACEMENT IN FILAMENTOUS FUNGI**

Nuclei movement and localization are multifactorial events that have been studied by the last two decades without any agreement. With the purpose of provide information about it we carry out an study to describe subapical nuclei movement and factors that could be related like cytoplasmic flow, microtubules, actin microfilaments and motor proteins (dinein-dinactin complex and kinesin).

We used Confocal Microscopy of five *Neurospora crassa* strains with nuclei labeled with GFP. One strain mutation free (blank), three simple mutants *ropy-1*, *ropy-3*, *Δnkin* and one double mutant *ropy-1/Δnkin*. Additionally we made observations in blank treated with Benomyl (MBC) and Citochalasin A (CA).

We observed that nuclei have moved on a bidirectional way or have stopped, except on double mutant where retrograde movement was null. Nuclei displacement was very close to the hypha elongation rate on blank ( $0.13 \pm 0.08$ ;  $0.14 \pm 0.13 \mu\text{m s}^{-1}$ ), *ropy-1* ( $0.02 \pm 0.04$ ;  $0.02 \pm 0.12 \mu\text{m s}^{-1}$ ), *ropy-3* ( $0.05 \pm 0.06$ ;  $0.06 \pm 0.10 \mu\text{m s}^{-1}$ ), *ropy-1/Δnkin* ( $0.05 \pm 0.09$ ;  $0.04 \pm 0.10 \mu\text{m s}^{-1}$ ) and MBC treated ( $0.05 \pm 0.09$ ;  $0.05 \pm 0.12 \mu\text{m s}^{-1}$ ), but not on *Δnkin* ( $0.03 \pm 0.08$ ;  $0.03 \pm 0.21 \mu\text{m s}^{-1}$ ), neither CA treated ( $0.005 \pm 0.03$ ;  $0.001 \pm 0.10 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Nuclei showed morphology differences: on blank were large whereas other strains were spherical form. Nuclei exclusion zone was shorter in the absence of motor proteins and null in the absence of actin microfilaments.

In conclusion, nuclear movement and distribution are determined by different forces; on mature hyphae fundamental motor is cytoplasmic flow. Although, motor proteins are nuclei union to microtubules and actin is the shell that merge this elements to be displaced like a unit by the flow-through.

**Keywords:** Nuclei, displacement, *Neurospora crassa*, *ropy-1*, *ropy-3*, *Δnkin*.