

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada**



---

**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida  
con orientación en Microbiología**

---

**Visualización de la F-actina en *Trichoderma atroviride* durante  
el crecimiento y daño mecánico**

Tesis

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

Presenta

**Marisela Garduño Rosales**

Ensenada, Baja California, México  
2016

Tesis defendida por  
**Marisela Garduño Rosales**  
y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez**  
Director de tesis

Miembros del comité  
**Dr. Salomón Bartnicki García**

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**

**Dra. Olga Alicia Callejas Negrete**



---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Marisela Garduño Rosales © 2016*

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

Resumen de la tesis que presenta **Marisela Garduño Rosales** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en ciencias en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en microbiología.

### **Visualización de la F-actina en *Trichoderma atroviride* durante el crecimiento y daño mecánico**

Resumen aprobado por:

---

**Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez**  
**Director de Tesis**

El citoesqueleto de actina es esencial para muchos procesos importantes en las células eucarióticas. La actina está organizada en diferentes estructuras funcionales dependiendo de sus proteínas asociadas ABPs (del inglés, Actin Binding Proteins). En los hongos filamentosos, el citoesqueleto de actina está involucrado en el transporte de vesículas hacia zonas de crecimiento polarizado, en la formación de septos por anillos contráctiles y en la endocitosis por medio de parches. Adicionalmente, se ha demostrado que en diferentes organismos eucariotas la actina tiene un papel importante en la reparación de la membrana celular cuando ésta sufre daños. Para entender la organización de la actina en el hongo *Trichoderma atroviride* se utilizó el reportero Lifeact-GFP, y se analizó la dinámica y localización del citoesqueleto de actina durante el crecimiento y desarrollo, además de su reorganización después de daño mecánico a las hifas. Mediante microscopía confocal, se observó F-actina asociada al centro del Spitzenkörper. También encontramos un collar subapical de parches de actina, a una distancia constante del domo apical, así como, algunos parches de actina a lo largo de toda la región basal. Durante la formación de septos, una maraña de actina denominada SAT (del inglés, Septal Actomyosin Tangle), fue observada durante varios minutos antes de cualquier signo de crecimiento de la membrana, la maraña coalesce formando un anillo contráctil que se constriñe para dar lugar al septo. Después de dañar con un bisturí el micelio de *T. atroviride*, se observó que pequeños parches de actina se van acumulando en el septo más cercano al sitio de herida. Estos septos son inicialmente taponeados por los cuerpos de Woronin para evitar la pérdida de citoplasma y la muerte celular. Por aproximadamente una hora solo se observan parches en el sitio donde emerge una nueva hifa, que es más delgada. Antes de que se recupere el nuevo sitio de crecimiento, se desarrolla un septo muy cerca del que fue taponeado. Solo en las hifas donde ocurre este fenómeno hubo recuperación. Una vez que las hifas nuevas han crecido, se observaron cables de actina, principalmente alrededor del septo taponeado. Con lo anterior se puede decir que la actina en *T. atroviride* tiene dos formas estructurales, cables y parches. Que están localizados principalmente en el Spitzenkörper, collar endocítico y septo. La organización de la actina después del daño mecánico, sugiere que podría estar participando tal y como lo hace en el crecimiento normal, como andamiaje para la reorganización del aparato de crecimiento polarizado.

**Palabras clave:** F-actina, *Trichoderma atroviride*, daño mecánico

Abstract of the thesis presented by **Marisela Garduño Rosales** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Microbiology.

### **Visualization of F-actin during growth and mechanical injury in *Trichoderma atroviride***

Abstract approved by:

---

**Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez**  
**Thesis Director**

Actin cytoskeleton is essential for many important processes in all eukaryotic cells. Actin is organized in different functional structures depending on the associated Actin Binding Proteins (ABPs). In filamentous fungi, the actin cytoskeleton is involved in vesicles transport toward zones of polarized growth using actin cables, septal formation using contractile rings and endocytosis using patches. Also it has been shown that actin has an important role in cell membrane repair after injury in different eukaryotic organisms. In this work we visualized the organization and dynamics of the different actin structures and during mechanical injury recovery in mature hyphae of *Trichoderma atroviride* tagged with the reporter Lifeact-GFP. By confocal microscopy we observed F-actin associated to the core of Spitzenkörper. We also found a subapical collar of actin patches that is present after the apical dome. Some actin patches were present in older areas of the hyphae. During septal formation an actin tangle (SAT) was observed several minutes before any sign of plasma membrane invagination, the tangle coalesced forming a contractile ring that was constricted to form the septum after the mycelium of *T. atroviride* was injured with a scalpel and F-actin accumulated at the septum closest to the site of injury. Patches but not filaments were present in the apical dome until a new and thinner hypha grew from the septum. A few microns from the septum we observed the formation of a SAT and later on a CAR during the recovery process. Hyphae that did not produce these structures were not able to recover and grow. The recovery of the F-actin associated to the Spitzenkörper seems to take several hours. We conclude that all of the actin arrangements described in other organisms are present in *T. atroviride*. Actin seems to play an important role for the recovery of a new growth site after injury.

Keywords: F-actin, *Trichoderma atroviride*, mechanical injury

## Dedicatoria

A Elda, Chepe y Chelita, hasta allá arriba en el Cielo.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de éste proyecto de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad de ser parte de este gran equipo y cumplir mi sueño de realizar parte de mis estudios de posgrado.

A mi comité de tesis integrado por la Dra. Carmen Paniagua Chávez, Dr. Salomón Bartnicki García, Dra. Olga Alicia Callejas Negrete, muchas gracias por sus valiosas aportaciones y ésta invaluable segunda oportunidad.

A la mejor y más divertida directora de tesis del mundo, la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez por haber creído en mí cuando ni siquiera yo lo hice, impulsarme, aconsejarme y darme un lugar en su súper grupo de trabajo, donde he crecido no sólo académicamente sino personalmente. La quiero y admiro mucho.

Al Dr. Salomón Bartnicki García por todas las charlas e inspiración. Mi eterna admiración y cariño a usted doctor. Gracias por contribuir tanto a la ciencia.

A la Dra. Meritxell Riquelme Pérez por todas las enseñanzas y apoyo académico, la admiro mucho.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria por su apoyo.

A la Dra. Rufina Hernández Martínez por su apoyo durante mis comienzos en el CICESE.

Al Dr. Alfredo Herrera Estrella y la M.C. Elizabeth Medina Castellanos por habernos proporcionado las cepas con las que se realizó este proyecto y facilitarnos información acerca de su biología y metodologías pertinentes.

A Adriana Mejía Aguiar y Melissa Corral Sánchez por las amenas pláticas de pasillo, risas compartidas y su gran apoyo en los trámites y papeleo.

A Guillermo González por su amistad y apoyo técnico en el laboratorio de Microbiología.

Al Sr. Manuel Jiménez por su bonita amistad y compañía durante las jornadas extras en el laboratorio.

A toda la crew de los laboratorios de Microbiología y Fitopatología de CICESE. Olguita, ¿qué haría yo sin ti? Eres lo máximo. Al Mouriño's lab: Arianne, Fausto, Ivan, María José, Dr. Lara, gracias por tantos momentos dramáticos, de amarra navajas, pero sobretodo de miles de risas, los quiero chicos. Gracias a mi niña Ale por todo su apoyo con mis experimentos. A mis Meris adoradas: Leonora, Adria, Lluvia, Anayatzin, Pamela y Raquel, gracias por tantos momentos únicos amigas. Al único e inigualable Marcos Paolinelli, pibe sos lo más, el mejor de los amigos, te quiero de aquí a la Patagonia y de regreso. A los Tacuaches: Montana, Habib, Lupita Rachel, Sarita, Cande, Carla, Gaby Q., Gaby, Pako, Edel y Clau. Gracias por tantos momentos de alegría que aminoraban el estrés.

A mis amigos más fónix: Nadia, Ale, Ana y Fercho. Los quiero con todo mi corazón y atesoro mucho nuestro millón de anécdotas de licenciatura. Ya estamos oldies, pero sigamos haciendo anécdotas.

A Prisci, te adoro prietita, eres una luchona y un gran ejemplo a seguir. Eres de verdad la más ocurrente de las personas, contigo siempre las risas son interminables y el tiempo nunca es suficiente. Eres una verdadera estrella en mi camino y es un gran privilegio ser tu amiga. La vida es GOOGOLPLEX-veces mejor contigo en ella.

A mi yin, balance perfecto, comaye, sista from anotha mista, Leonor Rebeca, te amodoro con todo mi ser. Gracias por vivir conmigo mis interminables: POSGRADO, CASOS DE LA VIDA REAL. Gracias por estar, por creer en mí, por inspirarme, por ser un verdadero ángel en mi vida y hacerme conocer a Dios nuestro Señor. Gracias por el sinfín de desveladas escuchando mis monótonas presentaciones y regañarme por mis muletillas, siempre me amenizas el deber.

Al mejor padrino del mundo por siempre impulsarme y enseñarme que la vida ain't easy. Te admiro padrino y te quiero mucho mucho. A mi Oom por supuesto, por hacer a mi padrino tan feliz.

A mi abuelita Carmelita, la amo señora, es usted la mejor de las mujeres y el mejor de los ejemplos a seguir.

A mis padres y hermanos, los amo. Gracias por creer en mí, por desvelarse conmigo, llorar y reír conmigo,

apapacharme, quererme y aceptarme tal como soy. A ustedes todo mi amor, gratitud y admiración infinita, por siempre. No hay palabras que alcancen para expresarles cuan afortunada me sé de poderlos llamar FAMILIA. You're the best of the west.

A mi esposo, Carlos, te amo. Gracias por todo tu apoyo y por hacerme tan feliz. Gracias por amarme incluso en los peores momentos, en mis episodios de histeria nivel tesis y boda. Te agradezco por caminar de mi mano y enseñarme tanto en el andar.

Y por sobretodo y sobretodos, gracias a Dios por guiarme a completar este reto tan turbulento y por haber puesto a tan maravillosas personas en mí camino.



## Tabla de contenido

Resumen en español .....	ii
Resumen en inglés .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Antecedentes .....</b>	<b>3</b>
2.1 Crecimiento en los hongos filamentosos .....	3
2.2 El citoesqueleto .....	3
2.3 El citoesqueleto de actina .....	5
2.4 Daño mecánico.....	8
2.5 Trichoderma atroviride.....	10
<b>Capítulo 3. Justificación.....</b>	<b>12</b>
<b>Capítulo 4. Hipótesis.....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 5. Objetivos .....</b>	<b>14</b>
5.1 Objetivo general .....	14
5.2 Objetivos particulares .....	14
<b>Capítulo 6. Metodología.....</b>	<b>15</b>
6.1 Cepas .....	15
6.2 Tamizaje de transformantes .....	16
6.3 Obtención del homocarión.....	16
6.4 Microscopía confocal de hifas maduras .....	17
6.5 Microscopía confocal de hifas maduras dañadas mecánicamente .....	17
6.6 Procesamiento de videos e imágenes .....	18
<b>Capítulo 7. Resultados .....</b>	<b>19</b>
7.1 Tamizaje de transformantes y obtención del homocarión.....	19
7.2 Dinámica de la actina en hifas maduras en crecimiento.....	19
7.2.1 Región I.....	19
7.2.2 Región II.....	19
7.2.3 Región III.....	20
7.2.4 Formación de septos .....	24
7.3 Organización de la actina de hifas maduras dañadas mecánicamente.....	27
<b>Capítulo 8. Discusión .....</b>	<b>34</b>
8.1 Actina apical .....	34
8.2 Parches de actina en el collar endocítico subapical .....	35

8.3 Otras estructuras de actina en el subápice y región basal ..... 35

8.4 Actina durante la formación de septos ..... 35

8.5 La actina después del daño mecánico..... 36

**Capítulo 9. Conclusiones** ..... 39

**Literatura Citada** ..... 40

**Anexos**..... 40

## Lista de figuras

---

Figura		Página
1	Mapa del vector pEM13. La transformante de <i>T. atroviride</i> que tiene el etiquetamiento Lifeact-GFP utilizada en este trabajo contiene este vector.....	16
2	Microscopía confocal de una hifa madura de <i>T. atroviride</i> T1 que expresa Lifeact-GFP.....	21
3	Microscopía confocal y de contraste diferencial interferencial de una hifa madura de <i>T. atroviride</i> T1 que expresa Lifeact-GFP. ....	22
4	Microscopía confocal de sitios de septación de hifas maduras de <i>T. atroviride</i> T1 que expresa Lifeact-GFP. ....	23
5	Microscopía confocal de una sección de la región III de una hifa madura de <i>T. atroviride</i> T1 que expresa Lifeact-GFP, enfocada en la región más cercana a la membrana plasmática.....	24
6	Microscopía confocal de la transición de SAT a CAR en <i>T. atroviride</i> T1 Lifeact-GFP.....	26
7	Microscopía confocal de la formación de septos en <i>T. atroviride</i> T1 que expresa Lifeact-GFP. ....	27
8	Microscopía DIC del micelio después del corte con bisturí del bloque de agar con <i>T. atroviride</i> T1. ....	29
9	Microscopía confocal de micelio <i>T. atroviride</i> T1 que expresa Lifeact-GFP que ha sido dañado mecánicamente con un bisturí. ....	30
10	Microscopía confocal formación de septos en <i>T. atroviride</i> T1 dañado mecánicamente.....	31
11	Microscopía confocal de un septo en <i>T. atroviride</i> T1 dañado mecánicamente. E.....	32
12	Serie de tiempo de un acercamiento a una región de <i>T. atroviride</i> T1 dañada mecánicamente. ....	33
13	Hifas recuperadas de <i>T. atroviride</i> T1 después del daño mecánico.....	34

## Capítulo 1. Introducción

---

El micelio de los hongos filamentosos está compuesto de células tubulares llamadas hifas, cuyo crecimiento es altamente polarizado. El Spitzenkörper (SPK) en el ápice de las hifas tiene un papel esencial en el crecimiento apical como centro suministrador de vesículas y en la determinación de la dirección de crecimiento y morfología de las hifas. Las vesículas contienen materiales formadores de pared celular; las microvesículas acarrean diferentes clases de quitina sintasas y las macrovesículas glucano sintasas (Riquelme y Sánchez-León, 2014). Adicionalmente a las vesículas, el SPK contiene ribosomas, microfilamentos de actina y un material amorfo granular de naturaleza indefinida.

El citoesqueleto de las células eucariotas está compuesto por microtúbulos, filamentos intermedios, microfilamentos de actina y septinas; aunque en los hongos filamentosos no se han descrito filamentos intermedios. La actina es una proteína globular ampliamente distribuida y abundante en las células eucariotas. Su monómero es la G-actina y su polímero la F-actina. Los microfilamentos de actina forman hélices de dos hebras de actina que se concentran principalmente en la corteza a lo largo de la célula. Muchas de las funciones del citoesqueleto de actina dependen de su gran capacidad dinámica intrínseca para ensamblarse y desensamblarse. Por sí solos los microfilamentos son bastante inestables, sin embargo, existen muchas proteínas de unión a actina que le confieren estabilidad y organización. Existen diversas organizaciones de la actina que dan origen a estructuras con diferentes funciones.

El citoesqueleto de actina participa en distintos procesos celulares en los hongos, tales como la endocitosis, exocitosis, polaridad celular, citocinesis, selección del sitio de gemación y determinación de la forma de la célula. Los parches de actina están relacionados con la endocitosis, la actina en el núcleo del SPK con la exocitosis, los cables de actina con el transporte de parches y organelos, los anillos contráctiles de actomiosina con la formación de septos, entre otros (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010).

Las células se encuentran constantemente expuestas a daños químicos y mecánicos de su entorno que ocasionan efectos adversos en la membrana celular y las células fúngicas no son la excepción. Es imposible para las células continuar viviendo si no cuentan con un sistema efectivo de reparación de la membrana celular. Muchos experimentos con células *in vitro* dependen de la capacidad de estas para reparar su membrana. En el caso del daño mecánico, las células deben sellar los poros resultantes para evitar la pérdida de citoplasma y organelos, y por supuesto, con ello la muerte. En los hongos

filamentosos, los organelos encargados de taponear los poros septales de los compartimentos de las hifas dañados son los cuerpos de Woronin; gracias a éstos las hifas pueden reiniciar el crecimiento y la reconexión entre ellas. La célula fúngica es capaz de crecer desde una punta nueva detrás del compartimento dañado, o bien, una punta nueva puede crecer dentro de dicho compartimento (Deacon, 2006). Durante la reparación, la membrana y el citoesqueleto subcortical restauran sus funciones en el sitio de la herida.

Se ha observado el reclutamiento de actina en sitios de herida en diferentes células de organismos eucariotas y se cree que tiene una función en la reparación. Dicha función parece ser la de proveer soporte mecánico para prevenir que la herida se siga expandiendo; además, se cree que la acumulación de actina podría mejorar la actividad de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  para acelerar la recuperación del nivel basal y así asegurar la reparación (Yumura *et al.*, 2014).

El daño mecánico en hongos del género *Trichoderma* dispara la producción de conidióforos con esporas maduras a partir de las “nuevas” hifas resultantes de la regeneración de las células dañadas. Se ha demostrado mediante análisis transcriptómicos que *T. atroviride* expresa genes relacionados a la organización citoesquelética en condiciones de daño mecánico (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Hernández-Oñate y Herrera-Estrella (2015) proponen el uso de hongos filamentosos como modelos de estudio de daño mecánico para acelerar su entendimiento para comprender mejor la recuperación de heridas y los procesos de trasplante.

La rizósfera es un medio altamente competitivo, en el que los organismos se enfrentan constantemente con adversidades bióticas y abióticas. En el presente trabajo se utiliza como organismo modelo a *T. atroviride*, cuyo nicho común es la rizósfera. Se realizaron observaciones con microscopio confocal de hifas maduras de una cepa transformante de *T. atroviride* etiquetada con Lifeact-GFP y así describir la localización de la actina durante el crecimiento. También se sometió a daño mecánico el micelio de esta cepa y por microscopía confocal se observó el comportamiento de la actina ante tal estrés. Los cuerpos de Woronin taponean los poros septales del compartimento inmediatamente anterior al sitio de daño, la actina se acumula en el sitio de herida y en el poro taponeado, hay una gran movilidad de parches y el hongo forma anillos contráctiles para poder reestablecer el crecimiento.

## Capítulo 2. Antecedentes

---

### **2.1 Crecimiento en los hongos filamentosos**

La unidad estructural y funcional básica de los hongos filamentosos es una célula de forma tubular llamada hifa, cuyo crecimiento es altamente polarizado. La suma de hifas conforma el micelio del hongo. La morfogénesis en los hongos está gobernada por la construcción de pared celular (Bartnicki-García, 2002). El Spitzenkörper (SPK) es un centro suministrador de vesículas localizado en el ápice de la hifa, tiene un papel esencial en el crecimiento apical y en la determinación de la dirección de crecimiento y morfología de las hifas (Bartnicki-García *et al.*, 1995; Bracker *et al.*, 1997; Riquelme *et al.*, 1998), ya que es hacia éste a donde se transportan las vesículas secretoras desde la zona subapical (Bartnicki-García y Lippman, 1969; Trinci, 1978; Bartnicki-García *et al.*, 1989; Bartnicki-García, 2002). Las vesículas acarrean enzimas y/o materiales precursores de la pared celular, por ejemplo: los quitosomas que contienen quitina sintasas (Bartnicki-García, 1984), así como enzimas secretadas al espacio extracelular (Bartnicki-García, 2002). Las vesículas secretoras son transportadas hacia el SPK por el citoesqueleto (Horio y Oakley, 2005; Harris, 2010). Los microtúbulos pueden converger en el SPK y en algunos casos atravesarlo, actuando como pistas para la entrega de vesículas (Riquelme *et al.*, 2002; Mouriño-Pérez *et al.*, 2006). El SPK es de naturaleza vulnerable y cualquier método que perturbe el crecimiento de la hifa impactará su presencia y comportamiento (Riquelme y Sánchez-León, 2014). El SPK es capaz de sostener firmemente unidos todos sus componentes y moverse como una sola unidad dentro del domo apical (Riquelme y Sánchez-León, 2014). Además de vesículas, el SPK está conformado por ribosomas, microfilamentos de actina y un material amorfo granular de naturaleza indefinida (Girbardt, 1969; Grove y Bracker, 1970; Howard, 1981; Bourett y Howard, 1991; Roberson y Vargas, 1994; Riquelme y Sánchez-León, 2014).

### **2.2 El citoesqueleto**

El citoesqueleto es una red intrincada de filamentos proteicos que se extienden a través del citoplasma; aunque algunos componentes citoesqueléticos están presentes en bacterias, el citoesqueleto es más prominente en las células eucarióticas (Alberts *et al.*, 2009). Se han descrito cuatro componentes del citoesqueleto eucariota: los microtúbulos, los filamentos intermedios, los microfilamentos de actina y las septinas. Los microtúbulos (MTs) son filamentos cilíndricos largos y huecos conformados por dímeros de

$\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. Tienen un diámetro externo de 25 nm y son mucho más rígidos que los filamentos de actina. Los microtúbulos son largos y rectos, generalmente tienen un extremo unido a los centros organizadores de microtúbulos (MTOC por sus siglas en inglés Microtubules Organizing Center) llamado centrosoma en células animales y cuerpos polares de los núcleos en hongos (Alberts *et al.*, 2009; Mouriño-Pérez *et al.*, 2016).

Los filamentos intermedios son fibras parecidas a cuerdas con un diámetro de alrededor de 10 nm; están formados de proteínas de filamentos intermedios, que constituyen una familia extensa y heterogénea. Un tipo de filamentos intermedios forma una malla llamada lámina nuclear, situado justo por debajo de la membrana nuclear interna. Otros tipos de filamentos intermedios se extienden a través del citoplasma, confiriendo fuerza mecánica a las células. En hongos filamentosos no se han descrito filamentos intermedios (Alberts *et al.*, 2009).

Los microfilamentos o filamentos de actina son polímeros helicoidales de dos hebras de la proteína actina. Son estructuras flexibles, con un diámetro de 5-9 nm y se organizan en una variedad de haces lineales, redes bidimensionales y geles tridimensionales. Aunque los filamentos de actina están dispersos a lo largo de la célula, se concentran principalmente en la corteza, justo por debajo de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2009). Este trabajo se centrará en el estudio de este componente específico del citoesqueleto.

Las septinas son proteínas de unión a GTP que controlan procesos celulares polimerizándose en complejos proteicos hetero-oligoméricos que pueden formar filamentos. Las septinas se han reconocido como componentes del citoesqueleto por su apariencia filamentosa, así como su asociación a membranas celulares, filamentos de actina y microtúbulos. Además de formar filamentos y haces, pueden formar anillos, por lo que se las considera como componentes no convencionales del citoesqueleto. Al igual que los filamentos intermedios, las septinas no son polares, mientras que los filamentos de actina y microtúbulos tienen polaridad (Alberts *et al.*, 2009; Mostowy y Cossart, 2012).

Se cree que el citoesqueleto de actina controla la localización de las vesículas apicales en el SPK, además de ser el citoesqueleto estructural más ampliamente distribuido en células fúngicas (Howard, 1981; Bourett y Howard, 1991; Virag y Griffiths, 2004). La actina participa en exocitosis y endocitosis en la punta de la hifa y cables de esta proteína mantienen unido el aparato de crecimiento de la hifa (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). La actina y los microtúbulos tienen papeles diferentes pero complementarios en la extensión polarizada de las hifas (Harris *et al.*, 2005; Lichius *et al.*, 2011).

### **2.3 El citoesqueleto de actina**

La actina es una proteína globular de 43 kDa distribuida en todo el citoplasma, principalmente por debajo de la membrana plasmática en la corteza celular; es una proteína ampliamente distribuida y abundante en las células eucariotas (Domínguez y Holmes, 2011). Su monómero es la G-actina, una cadena polipeptídica sencilla con dos dominios principales que forman un surco profundo donde se une el ATP (Domínguez y Holmes, 2011). La G-actina al polimerizarse forma dos filamentos paralelos que constituyen una doble hélice llamada microfilamento o F-actina. Un microfilamento tiene un diámetro de 7 nm y el bucle de la hélice se repite cada 37 nm (Berepiki *et al.*, 2011).

Los microfilamentos de actina son esenciales para la movilidad y contracción de las células durante la división celular de todas las eucariotas. Adicionalmente, participan en la contracción muscular, motilidad celular, citocinesis, transporte de vesículas y organelos, señalización celular, establecimiento y mantenimiento de uniones celulares, forma de las células y reparación ante daño mecánico (Yumura *et al.*, 2014). Los microfilamentos de actina tienen estructuralmente un extremo negativo y uno positivo, lo cual es un atributo crucial para su función celular (Berepiki *et al.*, 2011). Muchas de sus funciones dependen de la capacidad dinámica intrínseca que tiene la actina para ensamblarse y desensamblarse; regulado por hidrólisis de ATP y una gran cantidad de proteínas de unión a actina ABPs (por sus siglas en inglés, Actin Binding Proteins), los filamentos individuales están continuamente creciendo y encogiéndose (Berepiki *et al.*, 2011). Por sí solos, los microfilamentos son inestables, pero al unirse a otras proteínas forman estructuras celulares estables (Lodish *et al.*, 2005; Alberts *et al.*, 2009). La polimerización de los microfilamentos puede ser inhibida por toxinas producidas por hongos y esponjas marinas, por ejemplo, las calasinas entre otras drogas (Torralba *et al.*, 1998).

Los microfilamentos de actina están organizados con la ayuda de ABPs, formando estructuras diferentes. Las ABPs catalizan una gama de eventos regulatorios, que incluyen: seccionamiento, taponado, nucleación y entrecruzamiento de la F-actina. Las proteínas ARP promueven la polimerización de los filamentos de actina, mientras que la familia de las miosinas comprende a las proteínas motoras asociadas a la actina.

El reordenamiento estructural de los filamentos de actina es desencadenado por la activación de proteínas receptoras de la membrana plasmática. La disposición de los filamentos es controlada por señales que convergen sobre un grupo de proteínas monoméricas unidas de GTP conocidas como RHO, que actúan como interruptores moleculares (Alberts *et al.*, 2009; Berepiki *et al.*, 2011). La capacidad de la



F-actina para ensamblarse y desensamblarse rápidamente, en estructuras de orden mayor con diferentes papeles funcionales, provee a la célula el medio de energía para la organización celular (Berepiki *et al.*, 2011).

En hongos, el citoesqueleto de actina se involucra en la polaridad celular, citocinesis, endocitosis, exocitosis, selección del sitio de gemación, remodelación de la pared celular y determinación de la forma de la célula (Dubrin *et al.*, 1988; Kübler y Riezman, 1993; Karpova *et al.*, 1998; Torralba *et al.*, 1998; Pruyne y Bretscher, 2000; Harris, 2006). Se han realizado experimentos para interrumpir la función de la F-actina con citocalasina y latrunculina, confirmándose que es necesario un citoesqueleto de actina polimerizada para el crecimiento apical normal, así como para la conservación de la forma de la punta de las hifas y la secreción polarizada de enzimas en diferentes organismos fúngicos. La F-actina se localiza en sitios de morfogénesis celular y de polarización en yemas de levadura y ápices de hifas en crecimiento y tubos germinativos (Yang y Pon, 2002; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay y Shaw, 2008; Berepiki *et al.*, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010; Wang y Shaw, 2016).

Gracias al uso de la faloidina y anticuerpos específicos para actina se observaron estructuras de orden mayor de F-actina en *Saccharomyces cerevisiae*: parches, cables y anillos (Adams y Pringle, 1984; Kilmartin y Adams, 1984); poco después se comprobó la presencia de estas estructuras en *Schizosaccharomyces pombe* (Marks *et al.*, 1986). Con tecnología similar, Hasek y Bartnicki-García (1994) describieron la distribución de parches y cables de actina en la germinación de esporangiosporas de *Mucor rouxii*. Parches, anillos contráctiles de actomiosina asociados a la formación de septos, cables e incluso F-actina asociada al SPK (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay y Shaw, 2008; Berepiki *et al.*, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010) también han sido observados en hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* y *Candida albicans* con el uso de microscopía electrónica, proteínas fluorescentes, microscopía de fluorescencia y microscopía de inmunofluorescencia (Howard, 1981; Yokoyama *et al.*, 1990; Torralba *et al.*, 1998; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay y Shaw, 2008; Berepiki *et al.*, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2014). Cada uno de estos arreglos de orden mayor, está relacionado con distintos procesos dependientes de actina (Berepiki *et al.*, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2014). Ha sido sugerido que el SPK es una estación de transferencia en la que las vesículas que transitan los MTs son cargadas y descargadas en un arreglo de microfilamentos de actina que emana del SPK, para finalmente ser depositadas en la membrana plasmática en expansión (Bartnicki-García, 2002).

En hongos filamentosos como *N. crassa* y *A. nidulans*, la F-actina asociada a parches se localiza

principalmente, sino es que exclusivamente, en la corteza celular (Upadhyay y Shaw, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010). Los parches son complejos de acumulación de F-actina con más de 60 proteínas, que están estrechamente relacionados con la endocitosis en hongos (Kübler y Riezman, 1993; Mulholland *et al.*, 1994; Munn *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 2009).

Los cables son haces de F-actina que sirven como pistas para el transporte de cargas variadas, por ejemplo: parches de actina, vesículas secretoras, equivalentes de Golgi, mitocondrias, peroxisomas, vacuolas y ARNm; el transporte puede ser dependiente o independiente de miosina de tipo V (Suelmann y Fischer, 2000; Yin *et al.*, 2000; Motegi *et al.*, 2001; Rossanese *et al.*, 2001; Schott *et al.*, 2002; Utsugi *et al.*, 2002; Bretscher, 2003; Fehrenbacher *et al.*, 2003; Fehrenbacher *et al.*, 2004; Pruyne *et al.*, 2004; Rida *et al.*, 2006; Upadhyay y Shaw 2008; Pantazopoulou y Peñalva, 2009; Berepiki *et al.*, 2010). Para dar lugar a los cables, la formina nuclea a la actina, mientras que la tropomiosina y la fimbrina la entrelazan (Evangelista *et al.*, 2002; Pruyne *et al.*, 2002; Moseley y Goode, 2006).

Aún se desconoce el mecanismo por el cual se mueve el SPK, sin embargo, se cree que involucra algún tipo de acción de los citoesqueletos de actina y MTs para mantener la integridad de éste en la punta en crecimiento (Steinberg, 2007). En el ápice de las hifas de hongos filamentosos se puede observar actina en el núcleo del SPK, así como un collar subapical de parches endocíticos asociados con la membrana plasmática (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay y Shaw, 2008; Berepiki *et al.*, 2010, Delgado-Álvarez *et al.*, 2010). Generalmente, no hay parches en la región anterior al collar subapical, pero se pueden observar a densidades más bajas posterior a éste (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Aparentemente, la población de F-actina en el SPK regula la entrega de vesículas y/o la fusión en el sitio de crecimiento, es decir, la exocitosis; se cree que podría regular también canales de calcio, actividad importante para el crecimiento de la punta (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010).

La formación de septos en hongos es un proceso dependiente de F-actina y se requiere una regulación de señalización mitótica, citocinesis y biosíntesis de pared celular (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010). El primer indicio de desarrollo del septo en *N. crassa* es el ensamble de una maraña conspicua de filamentos de actina, tropomiosina y miosina II (SAT por sus siglas en inglés, Septal Actomyosin Tangle), cerca del sitio donde se formará el nuevo septo. Los cables del SAT, que se localizan en la corteza celular, se comprimen longitudinalmente hacia un punto medio en la maraña y así dan origen al anillo contráctil (Delgado-Álvarez *et al.*, 2014). El anillo contráctil de actomiosina (CAR por sus siglas en inglés Contractile Actomyosin Ring) está compuesto por actina, miosina II, formina y tropomiosina (Delgado-Álvarez *et al.*, 2014); es parte elemental en la citocinesis fúngica. El CAR forma un anillo generador de fuerza vinculado

a la membrana plasmática; es un mecanismo ancestral presente en hongos, animales y protistas (Pollard y Wu, 2010), pero existen diferencias en la regulación del lugar y ensamble de esta estructura (Seiler y Justa-Schuch, 2010). El deslizamiento de filamentos provoca la contracción del anillo, ocasionando la invaginación de la membrana y la síntesis de pared celular (Berepiki *et al.*, 2011). Se ha observado que los cables de actina pre-existentes pueden moverse de un sitio de desarrollo de septo al siguiente (Delgado-Álvarez *et al.*, 2014; Wang y Shaw, 2015).

Estudios *in vitro* e *in planta* muestran que en el patógeno de maíz *Colletotrichum graminicola* se distinguen claramente cuatro estadios en la distribución de la F-actina (cables, parches y anillos) durante desarrollo de la estructura de penetración del hospedero: (A) diferenciación del apresorio, (S) septación, (L) periodo largo con nivel de F-actina bajo, y por último, (P) formación del poro de penetración. Los ensayos *in planta* sugieren que los cables de actina podrían tener un papel esencial en el desarrollo del gancho de penetración, ya que la actina se ensambla también en hifas invasivas, posterior a la penetración (Wang y Shaw, 2015). La actina también participa en la diferenciación del apresorio en *Uromyces appendiculatus* (Kwon *et al.*, 1991). En el hongo causante del tizón del arroz, *Magnaporthe oryzae*, la F-actina se ensambla en una red toroidal extensa y forma un anillo dinámico y oligomérico, por medio de cuatro septinas y otras proteínas en los apresorios, dando pauta a la formación de los poros de penetración (Dagdas *et al.*, 2012). La red rodea la base del apresorio de la célula infectiva. Esta región circular marca el punto en que el gancho de penetración emerge para romper la cutícula de la hoja, gracias a la presión por turgencia generada. Esto sugiere, que ocurre una reorientación específica del citoesqueleto de F-actina en la base del apresorio para facilitar la infección del hospedero (Bourett y Howard, 1990). El ensamble dependiente de septina de esta red de F-actina, es esencial para el desarrollo de la enfermedad (Dagdas *et al.*, 2012).

#### **2.4 Daño mecánico**

En términos generales, las células están siempre expuestas a daños químicos y mecánicos del ambiente, causando daños en la membrana celular. Es importante que las células cuenten con un sistema para reparar las heridas en la membrana celular y sobrevivir. Las plantas son capaces de tolerar el estrés por congelamiento gracias a que su membrana sufre un resellado dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Schapire *et al.*, 2009).

Hay evidencia de la habilidad de las células para resellar su membrana ante el daño en células de

mamíferos, óvulos de anfibios y equinodermos, moscas de la fruta, amebas y levaduras (Gingell, 1970; Szubinska, 1971; Togo *et al.*, 1990; Bi *et al.*, 1995; Abreu-Blanco *et al.*, 2011b; Kono *et al.*, 2012; Yumura *et al.*, 2014). Investigaciones acerca de la respuesta al daño mecánico tienen importantes aplicaciones médicas relacionadas a regeneración de tejidos y reparación (Hernández-Oñate y Herrera-Estrella, 2015).

La primera respuesta a lesiones es tapar los poros de la membrana celular para evitar la pérdida de citoplasma. En *N. crassa* y *Aspergillus* spp., los cuerpos de Woronin sellan los poros septales cuando las hifas sufren heridas, previniendo la pérdida excesiva de citoplasma y la muerte celular; una vez tapado el septo se reinicia el crecimiento y la reconexión de hifas (Jedd, 2011). La célula puede volver a crecer desde una punta nueva detrás del compartimiento dañado o en algunos casos una nueva punta puede crecer dentro de éste (Deacon, 2006). Durante la reparación, la membrana y el citoesqueleto subcortical restauran sus funciones en el sitio de la herida (Yumura *et al.*, 2014). La disferlina es una proteína relacionada con el resellado de la membrana celular. Se sabe que en músculo esquelético adulto, el reclutamiento de la disferlina es crítico para la reparación de la membrana y que éste depende del citoesqueleto de actina (McDade *et al.*, 2014). La inactivación de la disferlina puede causar distrofia muscular, ya que la membrana no es capaz de resellarse (Waddell *et al.*, 2011).

Al perforar ovocitos de *Xenopus*, la herida se constriñe circunferencialmente, coincidiendo con el reclutamiento de actina y miosina II en el borde de la herida (Bement *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la constricción del “cordón de bolsa” de actomiosina (contractile actomyosin purse-string model) ayuda a cerrar las heridas (Darenfed y Mandato, 2005). Este cordón generalmente aparece en el surco de segmentación de células en división, en la región apical de células epiteliales durante la morfogénesis embrionaria y en el borde de heridas en tejidos (Schroeder, 1973; Yumura *et al.*, 1984; Yumura y Uyeda, 2003; Sawyer *et al.*, 2010; Abreu-Blanco *et al.*, 2011b). Parece ser común a todos los organismos hasta el momento estudiados, incluyendo a *Trichoderma atroviride*, la entrada de  $Ca^{2+}$  en el sitio de la herida dispara la respuesta rápida de reparación (Reddy *et al.*, 2001; McNeil, 2002; McNeil *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2004; Idone *et al.*, 2008; Hernández-Oñate *et al.*, 2012; Medina-Castellanos *et al.*, 2014; Yumura *et al.*, 2014).

Abreu-Blanco *et al.* (2012a) proponen dos roles para la actina en la reparación de heridas: 1) soporte mecánico para prevenir que la herida se siga expandiendo, y 2) transporte de materiales como vesículas pequeñas que reparan o saturan los poros de herida. En la amiba *Dyctiostelium*, se cree que el segundo papel es muy improbable y se ha propuesto un modelo en el que se distinguen dos fases: una independiente de actina y una dependiente de ésta para un sellado apropiado de heridas (Yumura *et al.*,

2014). Los autores mencionan que la acumulación de actina podría estar mejorando la actividad de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  para una recuperación rápida del nivel basal, además de asegurar la reparación y prevenir que la herida se expanda como se mencionó anteriormente.

El daño mecánico puede alterar aspectos fisiológicos del crecimiento, desarrollo y reproducción (Hernández-Oñate y Herrera-Estrella, 2015). Los hongos están expuestos constantemente a daño mecánico. En los basidiomicetos *Sclerotium rolfii* y *Schizophyllum commune*, el daño mecánico provoca la producción de esclerocios y cuerpos fructíferos respectivamente (Henis *et al.*, 1965; Leonard y Dick, 1973). Se sabe que el daño mecánico en *T. atroviride* causa la producción de conidióforos con esporas maduras, formados exclusivamente a partir de las “nuevas” hifas que resultan de la regeneración de las células dañadas (Casas-Flores *et al.*, 2004; Hernández-Oñate *et al.*, 2012). *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma virens* también producen conidios como respuesta a heridas (Hernández-Oñate *et al.*, sin publicar). El análisis transcriptómico de micelio dañado mecánicamente de *T. atroviride* hecho por Hernández-Oñate *et al.* (2012), demostró la regulación de al menos 25 genes relacionados a la organización citoesquelética, replicación de ADN y ciclo celular, incluyendo un gen homólogo al de despolimerización severa de actina 1 (*sda1*) de *S. cerevisiae*, cuyo papel es crítico en el paso de las células arrestadas de la fase  $G_0$  a la  $G_1$ , es decir, la reiniciación del ciclo celular, sugiriendo que estos genes podrían tener un papel importante en la regeneración de hifas dañadas.

## **2.5 *Trichoderma atroviride***

Para la realización de este trabajo se usó como organismo modelo a *Trichoderma atroviride*, que pertenece al género *Trichoderma* (teleomorfo: *Hypocrea*), es un hongo ascomiceto rizocompetente de la familia Hypocreaceae. Es un componente prevalente de diversos ecosistemas en un amplio rango de zonas climáticas (Kubicek *et al.*, 2008). En teoría, *Trichoderma* puede ser aislada de casi todos los tipos de campos de agricultura y de suelos forestales a cualquier latitud (Brotman *et al.*, 2010; Kredics *et al.*, 2014). Estos hongos son fácilmente cultivados *in vitro*, la mayoría presenta una esporulación verde típica y algunas especies producen un olor dulce característico (coco) por el compuesto bioactivo volátil 6-pentil- $\alpha$ -pirona (Brotman *et al.*, 2010).

Aunque la mayoría de especies de *Trichoderma* son consideradas propias de suelos, también se ha observado que existen algunas abundantes en diferentes ecosistemas acuáticos, incluyendo marinos y de

agua dulce, así como aguas contaminadas con material de construcción (Kedrics *et al.*, 2014). Se ha reportado la presencia de las siguientes especies de *Trichoderma* en cuadros infecciosos en humanos: *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *H. orientalis*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei*, *T. viride* e *Hypocreaceae* sp. (Kredics *et al.*, 2014). Por otro lado, *T. reesei* es un hongo importante en la industria para la producción de enzimas celulolíticas (Brotman *et al.*, 2010).

La rizósfera es nicho común de *Trichoderma*, ya que los atrae la presencia de hongos “presa” en el suelo y la riqueza de nutrientes derivada de raíces de plantas (Druzhinina *et al.*, 2011). Algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de colonizar el sistema radicular de plantas y formar una relación simbiótica oportunista con éstas (Brotman *et al.*, 2010; Kredics *et al.*, 2014). Se sabe que el género *Trichoderma* ejerce una variedad de efectos positivos en las plantas, incluyendo el control biológico de enfermedades, la inducción de resistencia sistémica por medio de elicitores, el aumento de la disponibilidad y toma de nutrientes, la promoción del crecimiento de plantas y su sistema radicular, el mejoramiento en el rendimiento de cultivos y la degradación de pesticidas xenobióticos (Harman, 2006; Vinale *et al.*, 2008). Por ello, ha sido ampliamente estudiado y comercializado como biofungicidas, biofertilizantes y mejoradores del suelo (Vinale *et al.*, 2008).

Varias especies de *Trichoderma* tienen potentes habilidades micoparásitas necrotróficas (Benítez *et al.*, 2004). Se distinguen cuatro etapas durante el ataque micoparasítico: 1) la detección del hongo presa, 2) la unión de *Trichoderma* a las hifas de la presa, 3) la degradación de la pared celular de la presa y por último, 4) la muerte de la presa (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). La degradación de la pared celular de la presa es por medio de quitinasas,  $\beta$ -(1,4)-,  $\beta$ -(1,3)- y  $\beta$ -(1,6)-glucanasas y proteasas (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). *Trichoderma* es atraído por su hospedero (fitopatógeno), creciendo hacia éste, probablemente por quimiotropismo (Brotman *et al.*, 2010).

*T. atroviride* habita suelos y funciona como un agente biocontrol para un amplio rango de fitopatógenos económicamente importantes, tanto aéreos como de suelo (Chet, 1987; Papavizas, 1985). Este hongo no supone un riesgo de salud para humanos y animales. En pruebas en invernadero y campo, bajo condiciones controladas, se observó la habilidad de *T. harzianum* T22 y *T. atroviride* P1 para mejorar el crecimiento de cultivos de lechuga, tomate y pimientos; la productividad de los cultivos aumentó hasta un 300% en plantas tratadas con el agente de biocontrol con respecto a los controles no tratados (Vinale *et al.*, 2004). Su forma de aplicación en el campo es por medio de esporas asexuales o conidios.

## Capítulo 3. Justificación

---

La actina no sólo es la proteína más abundante en los organismos eucariotas, es esencial en numerosos procesos celulares de gran importancia, como endocitosis, exocitosis, citocinesis, transporte de organelos y vesículas, motilidad, y por supuesto, crecimiento polarizado en hongos filamentosos.

*T. atroviride* es un buen modelo celular, ya que sus requisitos de cultivo son bastante simples, crece a una buena velocidad y, en términos generales, no supone daños a la salud humana. Adicionalmente, tiene la particularidad de ser organismo con interés industrial y agrícola.

No hay trabajos que describan el citoesqueleto de actina en hongos del género *Trichoderma* y que además caractericen la dinámica de este citoesqueleto en la reparación del daño mecánico, que se ha estudiado en este hongo a nivel de expresión génica.

Existe evidencia transcriptómica de la expresión de genes relacionados con la organización del citoesqueleto en micelio dañado mecánicamente de *T. atroviride*, sin embargo, hacen falta estudios a nivel celular para conocer los efectos en la reorganización de la actina posterior al daño mecánico y el restablecimiento de sitios de crecimiento polarizado.

## Capítulo 4. Hipótesis

---

*Trichoderma atroviride* presenta F-actina asociada al Spk, así como anillos, parches y cables que conforman el citoesqueleto de actina.

Existe una reorganización del citoesqueleto de actina de *T. atroviride* durante el daño mecánico y posteriormente para organizar un nuevo sitio de crecimiento polarizado.



## Capítulo 5. Objetivos

---

### **5.1 Objetivo general**

- Caracterizar el citoesqueleto de actina en el hongo filamentoso biocontrolador *Trichoderma atroviride* durante el crecimiento polarizado y el daño mecánico.

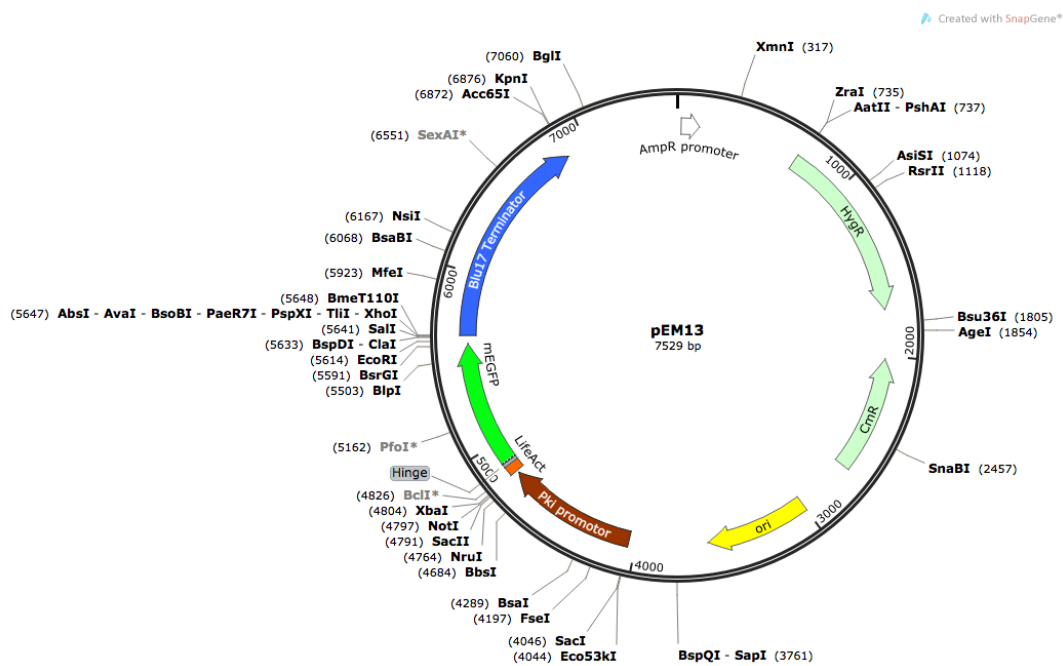
### **5.2 Objetivos particulares**

- Describir la localización y dinámica de parches, cables y anillos de actina en hifas maduras en *T. atroviride*.
- Identificar la dinámica del citoesqueleto de actina durante y después del daño mecánico para el establecimiento de nuevos sitios de polaridad en *T. atroviride*.

## Capítulo 6. Metodología

### 6.1 Cepas

Se utilizó la cepa silvestre IMI 206040 de *T. atroviride* y una transformante que contiene el reportero de actina Lifeact etiquetado con la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés Green Fluorescent Protein) proporcionada por el Dr. Alfredo Herrera Estrella (LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato, México). La Lifeact-GFP se clonó en un vector integrativo que contiene el promotor constitutivo de la piruvato cinasa PKI de *Trichoderma reesei* y un terminador del gen Blu17 de *T. atroviride*, dando como resultado el vector pEM13; el plásmido contiene el cassette de resistencia al antibiótico higromicina, que actúa como marcador de selección (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa del vector pEM13. La transformante de *T. atroviride* que tiene el etiquetamiento Lifeact-GFP utilizada en este trabajo contiene este vector.

Lifect es un péptido pequeño conformado por los primeros 17 aminoácidos (MGVADLIKKFESISKEE) de la proteína Abp140 de *S. cerevisiae*; Abp140 se conserva en muchas especies fúngicas. Lifect es hasta ahora el mejor reportero de F-actina en eucariotas superiores (Riedl *et al.*, 2008; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010).

## **6.2 Tamizaje de transformantes**

A partir de cuatro posibles transformantes de *T. atroviride*, se sembraron 10  $\mu$ l de sus respectivas suspensiones de conidios en Medio Mínimo de Vogel Agar al 1.5% (MMV), y se incubaron por 48 h a 25°C. Se hicieron bloques de agar invertidos (Hickey *et al.*, 2002) y se observaron en un microscopio confocal invertido (FluoView™ FV1000, Olympus Corp., Tokio, Japón) de acuerdo a lo descrito en el apartado correspondiente para corroborar que expresaran la fluorescencia. Se seleccionaron las cepas que crecían igual que la silvestre y que expresaban la GFP.

## **6.3 Obtención del homocarión**

Como las transformantes estaban en condición de heterocarión, se hicieron cultivos monospóricos de la cepa T1 en MMV adicionado con higromicina B (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) y se incubaron por 24 h a 25°C para obtener el homocarión de la transformante. A partir de los cultivos monospóricos aislados se repitió el proceso de cultivo de esporas, repitiéndolo 2 veces. Después de 48 h se observaron las colonias en el microscopio confocal y se seleccionaron las cepas donde había expresión de fluorescencia por la GFP.

Para hacer un stock de conidios de la cepa T1 homocarión se sembraron placas de MMV (sin higromicina) con discos miceliales de 8mm de diámetro, las cajas no se sellaron y se incubaron por 48 h a 25°C en completa oscuridad, después se dañó el micelio con un cortador de galletas y se incubaron a 25°C con fotoperiodos de 12 h luz y 12 h oscuridad por 10 días.

Para recuperar los conidios se enfrió agua destilada estéril en tubos cónicos de 50 ml en hielo, después se vertió el agua en las placas conidiadas y con una varilla de vidrio se raspó el micelio con mucho cuidado para desprender los conidios y arrastrar la menor cantidad de micelio posible. Se filtró con embudos y tella secante estéril en los mismos tubos cónicos el contenido de las placas, se centrifugaron los tubos a

5,000 rpm por 8 min y se desecharon los sobrenadantes. Se vertieron 25 ml de sorbitol 1M previamente enfriado en hielo en cada tubo y se mezclaron delicadamente, se centrifugaron a 5,000 rpm por 8 min y se descartaron los sobrenadantes. Se agregaron 900 µl de sorbitol 1M previamente enfriado en hielo en cada tubo, se mezclaron y se hicieron alícuotas en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml según el volumen conveniente. Los tubos se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

#### **6.4 Microscopía confocal de hifas maduras**

Todas las observaciones se realizaron en placas de MMV agar al 1.5% ó 3% sembradas con la cepa T1, incubadas a 25°C, de 2-4 días de crecimiento. Se utilizó la técnica del bloque de agar invertido para montar la muestra en el cubreobjetos (Hickey *et al.*, 2002). En algunos casos se utilizó el colorante vital lipofílico FM4-64 que se asocia a membranas.

Para la descripción de la localización de la fluorescencia, se tomaron imágenes y videos utilizando dos canales simultáneamente: uno de luz fluorescente usando el láser de argón/2 con filtros EGFP (excitación a 488 nm; emisión a 510 nm) y otro de luz transmitida para obtener imágenes en contraste de interferencia diferencial (DIC- por sus siglas en inglés Differential Interference Contrast). Se usó el objetivo de 60X Plan-Apocromático de inmersión en aceite (1.42 A.N.).

Se distinguen tres regiones en las hifas: la región I contiene al SPK, la región II se extiende desde el lado posterior del SPK hasta el lado anterior del primer núcleo y la región III se extiende sobre una distancia variable desde el lado anterior del primer núcleo hasta una zona caracterizada por la presencia de vacuolas de gran tamaño (McDaniel y Roberson, 2000; Ramos-García *et al.*, 2009; Delgado-Álvarez *et al.*, 2010).

#### **6.5 Microscopía confocal de hifas maduras dañadas mecánicamente**

Todas las observaciones se realizaron en placas con medio de Sales de Voguel (SV) con agar al 1.5% sembradas con T1, incubadas a 25 °C, de 2-4 días de crecimiento. Se utilizó la técnica del bloque de agar invertido (Hickey *et al.*, 2002). Una vez enfocada la muestra en campo claro se cortó el bloque con un bisturí tratando de mover lo menos posible el agar y se volvió a enfocar la muestra para comprobar que

había daño y dar seguimiento al comportamiento de la F-actina en el compartimento de la hifas inmediatamente anterior al sitio de daño.

### ***6.6 Procesamiento de videos e imágenes***

Se utilizó el software del microscopio confocal FluoView™ FV1000 (Olympus Corp.) para obtener los videos e imágenes. Después las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Systems Inc.) y los videos con Camtasia Studio 8.3 (TechSmith Corp.).

## Capítulo 7. Resultados

---

### **7.1 Tamizaje de transformantes y obtención del homocarión**

Por microscopía confocal se comprobó que la cepa denominada T1 tenía señal de fluorescencia. Posteriormente se obtuvo la cepa homocarión de T1 a partir de los cultivos monospóricos. En la cepa T1 de *T. atroviride*, se observó fluorescencia estable indicando la presencia de *T. atroviride* fluorescencia en diversas estructuras a lo largo de las hifas, por lo que se decidió continuar trabajando con esta cepa para los experimentos posteriores.

### **7.2 Dinámica de la actina en hifas maduras en crecimiento**

Como se mencionó anteriormente, se describió la distribución de actina de acuerdo a las diferentes regiones de la hifa.

#### **7.2.1 Región I**

En esta región se observó una estructura conspicua y circular de F-actina que co-localiza con el núcleo del SPK (Figura 2 y 3), como se puede notar en el traslape de los canales verde y rojo (Figura 3). En rojo se observa el colorante lipofílico vital FM4-64 que tiñe membranas y organelos membranosos en las hifas, En amarillo se observa la co-localización de la F-actina y las membranas teñidas con FM4-64. A medida que la hifa va creciendo, la F-actina asociada al SPK se va desplazando constantemente en el sentido de la polaridad. No se observan cables de actina en el ápice.

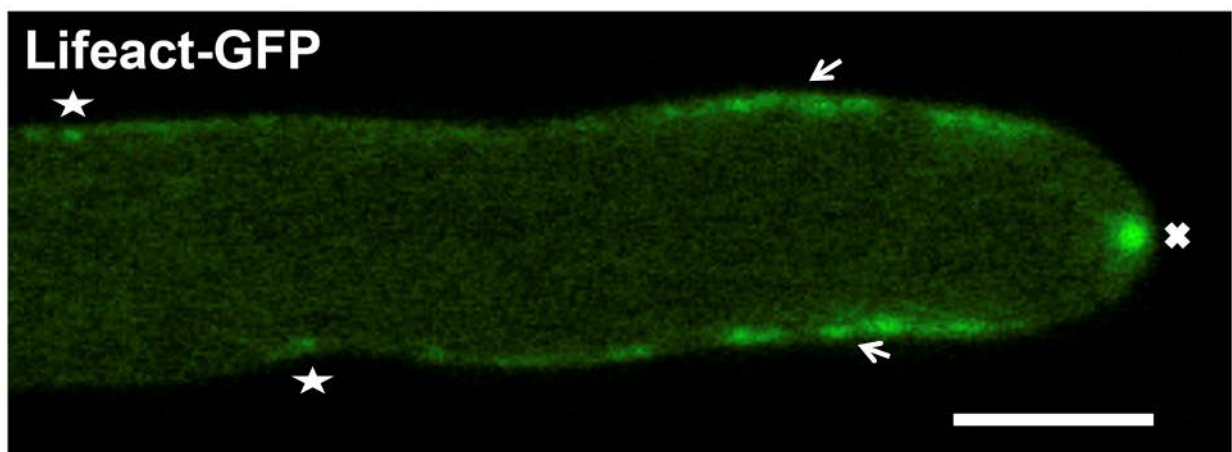
#### **7.2.2 Región II**

En esta región se localiza el anillo o collar subapical, involucrado con el proceso de endocitosis (Figura 2 y 3). La F-actina se observa como un agrupamiento de parches puntiformes fluorescentes extendidos a lo largo de la membrana celular en la región II. Aparentemente, los parches son acarreados por cables o

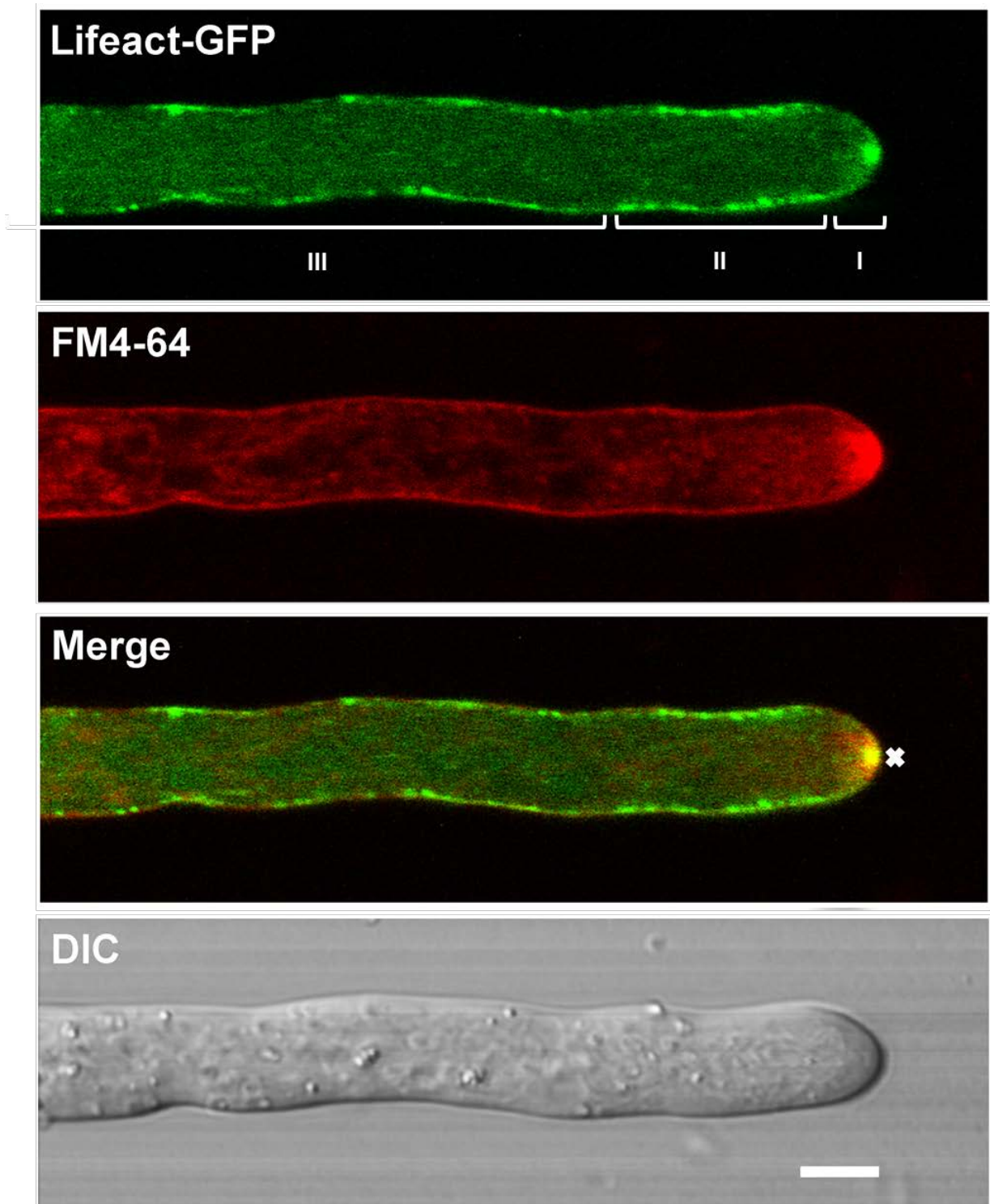
filamentos de actina (Figura 5). La F-actina asociada al SPK siempre guarda una distancia constante con el anillo subapical, de modo que al crecer la hifa ambas estructuras aparentemente se desplazan en el sentido de la polaridad guardando su distancia.

### 7.2.3 Región III

En esta región aparecen los sitios de septación, donde surge una fuerte señal de fluorescencia en forma de marañas de cables que se ha denominado como SAT, que posteriormente se convierte en un anillo de constricción CAR, que al constreñirse da origen al septo propiamente dicho (Figura 4 y 5). Adicionalmente, se pueden observar parches dispersos en esta región. Al observar la zona más cercana a la membrana plasmática en esta región, se observan cables de actina y parches claramente asociados, lo que al parecer muestra que estos parches son transportados via cables de actina (Figura 5).

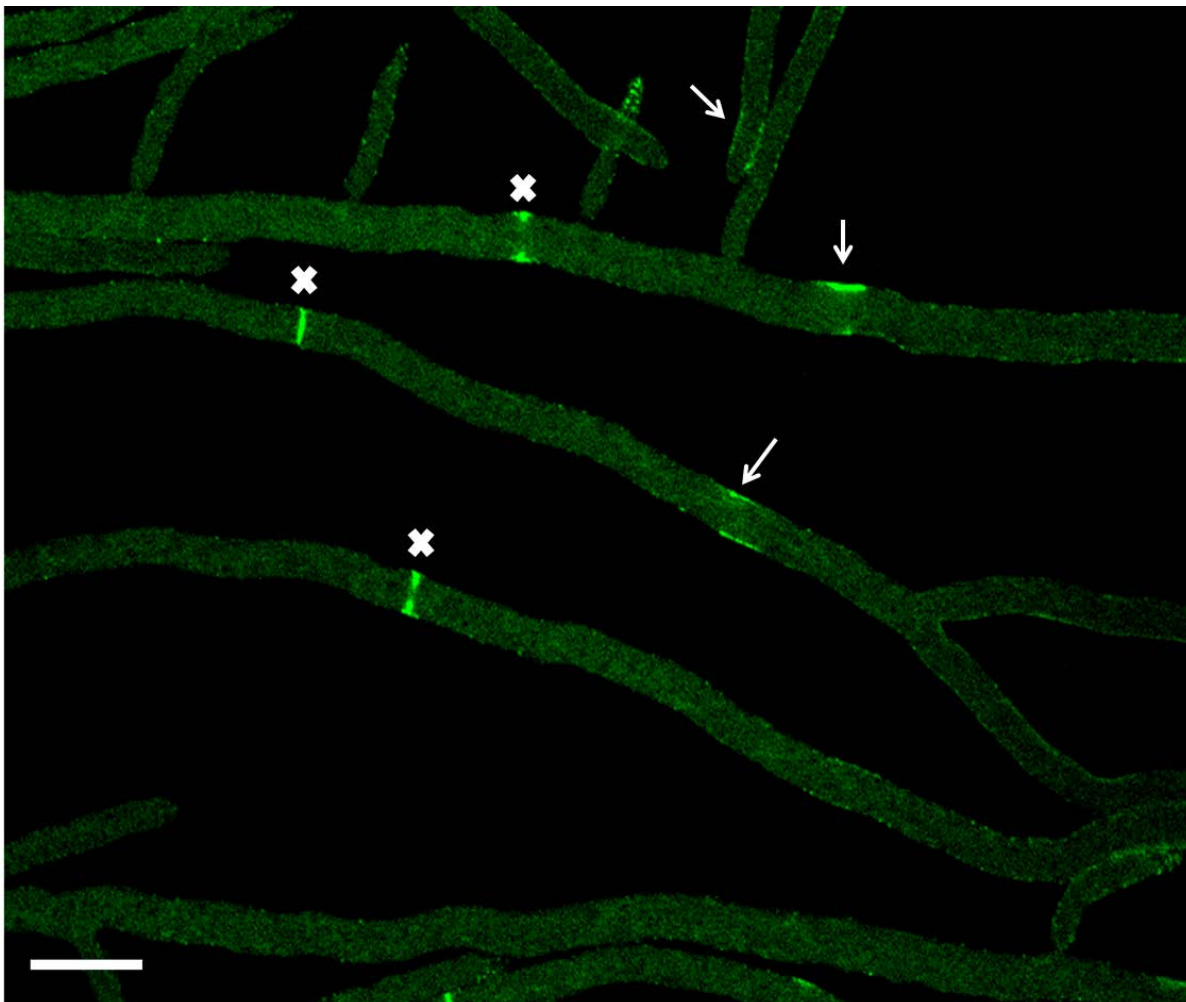


**Figura 2.** Microscopía confocal de una hifa madura de *T. atroviride* T1 que expresa Lifeact-GFP. En esta imagen se puede observar la F-actina asociada al SPK justo en el ápice de la hifa (cruz), así como en anillo subapical endocítico conformado por parches de F-actina (flechas) y algunos otros parches un poco más distales no agregados (estrellas). Escala 5  $\mu$ m.

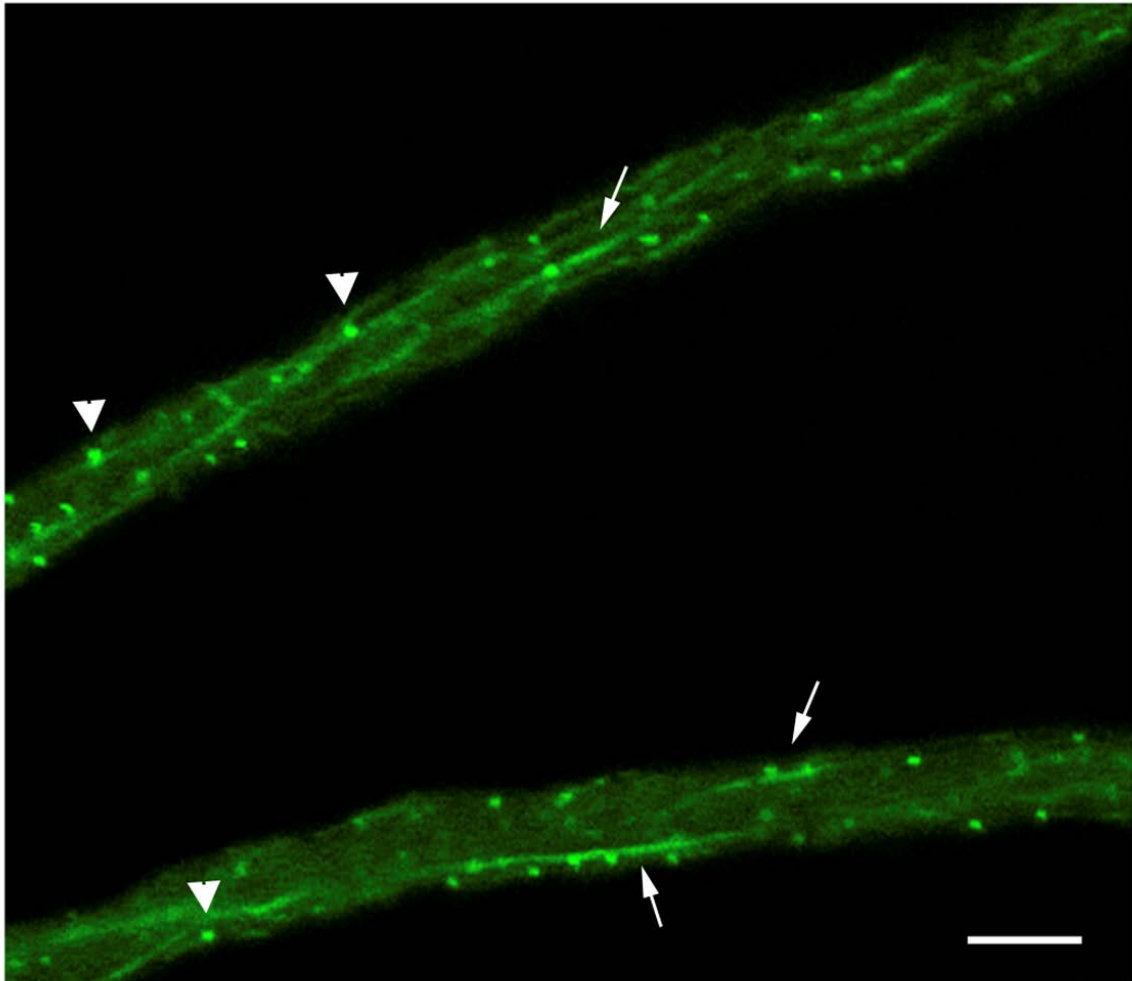


**Figura 3.** Microscopía confocal y de contraste diferencial interferencial de una hifa madura de *T. atroviride* T1 que expresa Lifeact-GFP. En esta imagen se puede observar las diferentes regiones de la hifa. En la región I se encuentra la F-actina asociada al SPK justo en el ápice, el colorante vital lipofílico FM4-64 que es afín a membranas evidencia la presencia del SPK y en el canal de traslape se puede observar la co-localización de la F-actina en la región I con el núcleo del Spk (cruz). En la región II se observa el anillo endocítico subapical, mientras que en la región III se observan solamente parches. Escala 5  $\mu$ m.





**Figura 4.** Microscopía confocal de sitios de septación de hifas maduras de *T. atroviride* T1 que expresa Lifeact-GFP. En esta imagen se puede observar septos en diferentes estadios. Las flechas corresponden a SATs y las cruces a CARs. Escala 20  $\mu\text{m}$ .

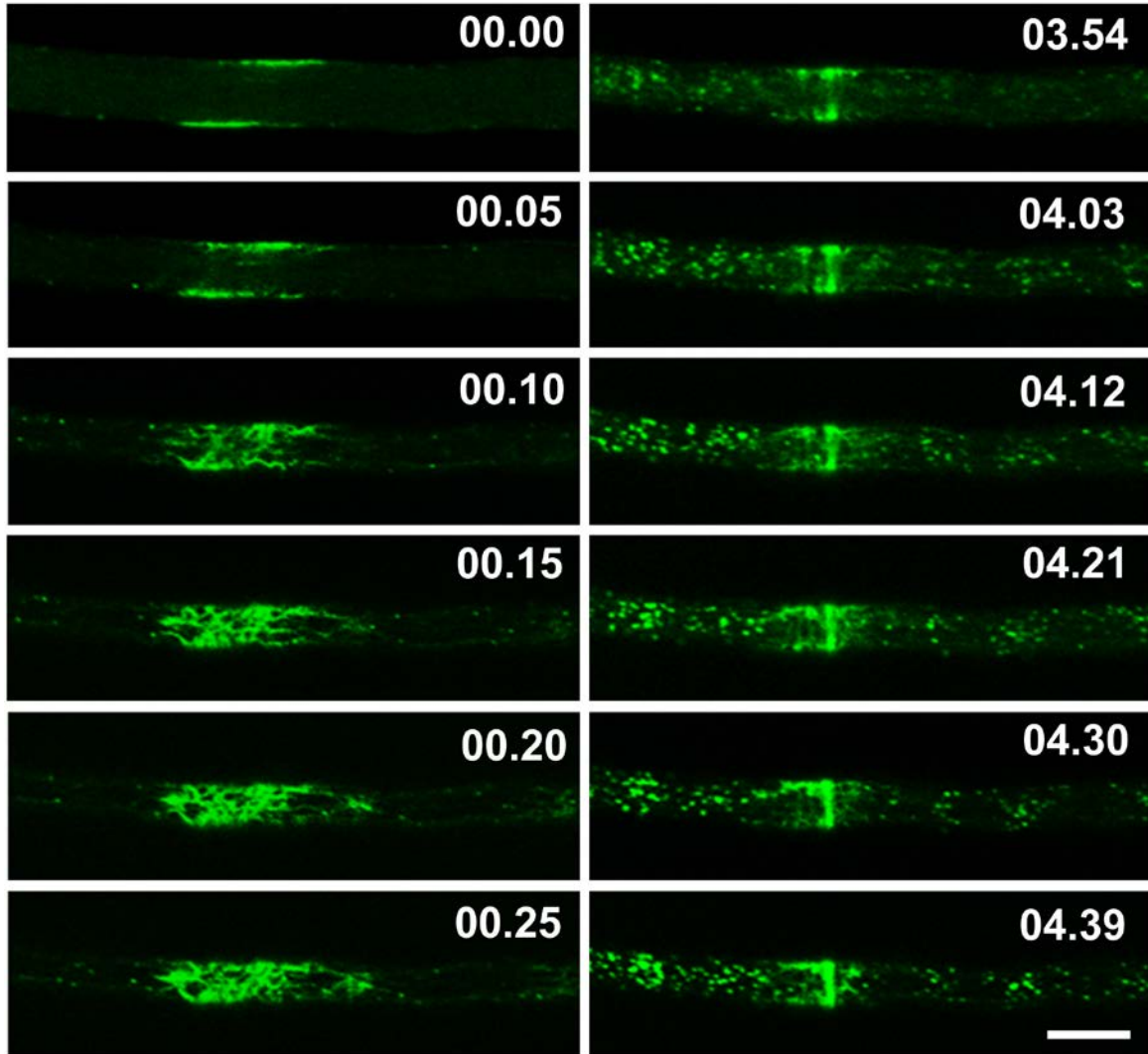


**Figura 5.** Microscopía confocal de una sección de la región III de una hifa madura de *T. atroviride* T1 que expresa Lifeact-GFP, enfocada en la región más cercana a la membrana plasmática. En esta imagen se puede observar la presencia de cables y parches de F-actina a lo largo de la región III de la hifa. Con cabezas de flecha se indican algunos parches, mientras que con flechas algunos cables. Las estructuras puntiformes correspondientes a parches, parecen viajar a través de los cables de F-actina. Escala 10  $\mu\text{m}$ .

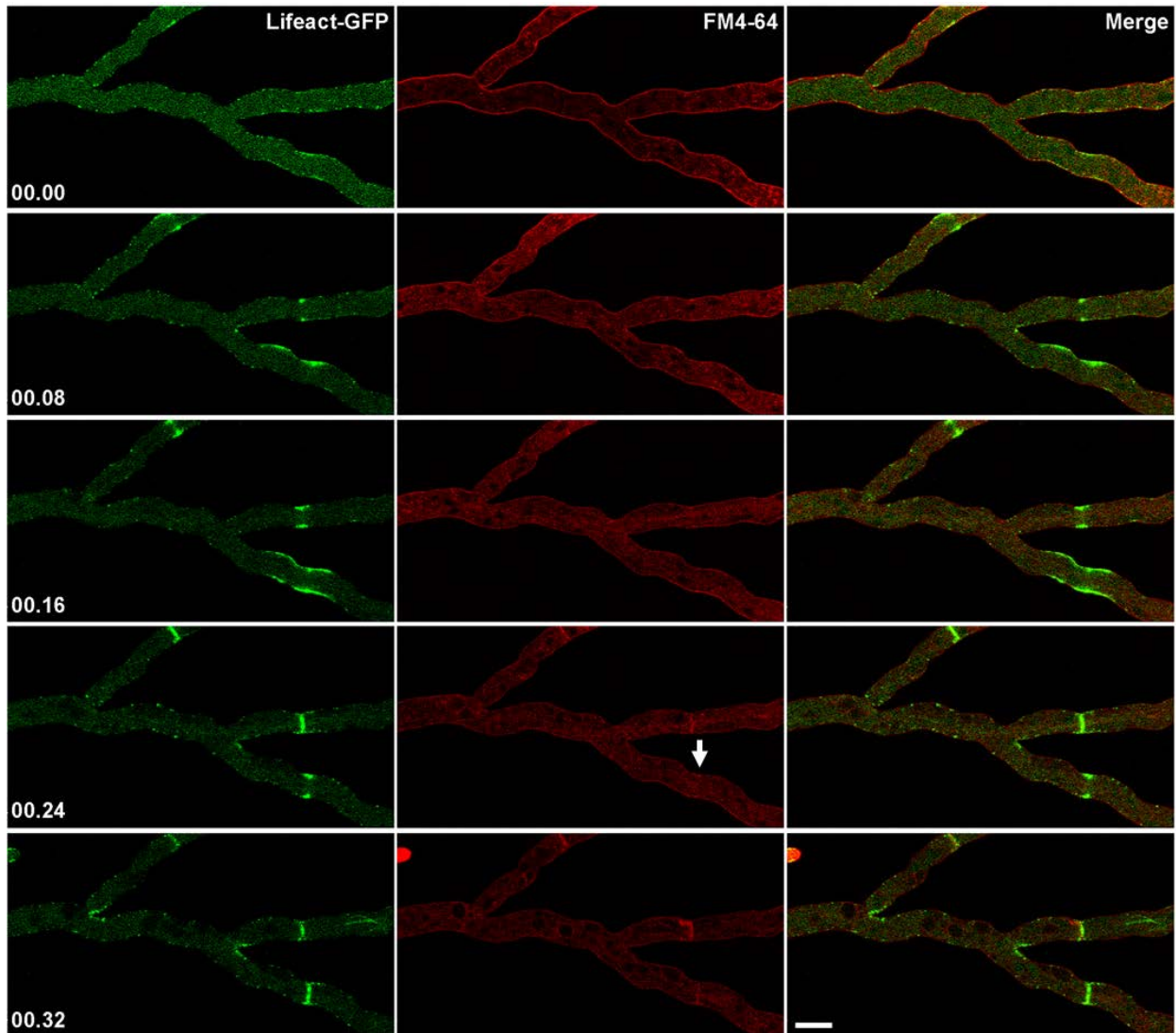
#### **7.2.4 Formación de septos**

Los sitios de septación están distribuidos en la región III de las hifas. El primer indicio de septación en la cepa T1 es un aumento de la señal de fluorescencia de la actina etiquetada con Lifeact-GFP en una zona específica a la que llegan numerosos cables de F-actina para formar la maraña de actomiosina SAT (Figura 6). Es importante notar que cuando el SAT se está formando el número de parches en la zona disminuye. Al cabo de unos diez minutos, la fluorescencia del SAT coalesce al centro formando un anillo de actomiosina o CAR. En el momento que va coalesciendo, un gran número de parches se aproximan al sitio de septación. Una vez formado el CAR, se inicia la constricción, que tiene como función guiar el crecimiento de la membrana y la pared celular centrípetamente hasta que el septo queda prácticamente cerrado (Figura 6).

Para comparar el tiempo de llegada de la actina a la formación del septo y la primera señal de crecimiento de la membrana marcada con FM4-64 al interior de la hifa, se analizaron 17 procesos de formación de septos, contabilizando la primera señal de crecimiento de la membrana como el tiempo cero (Figura 7). Se observó que la formación del SAT inicia aproximadamente a los -10:48 min:seg con una desviación estándar de 3:38 min:seg.



**Figura 6.** Microscopía confocal de la transición de SAT a CAR en *T. atroviride* T1 Lifeact-GFP. En esta serie de tiempo se observa en el tiempo 00.00 el primer indicio de formación del septo, que es la aparición de la señal de fluorescencia en un sitio específico. En el pánel de la izquierda se observa la llegada de cables y parches de ambos lados de la hifa formando el SAT y en el pánel de la derecha se observa la constricción del CAR que dará origen al septo propiamente dicho. Escala 10  $\mu$ m. Tiempo en min:seg.



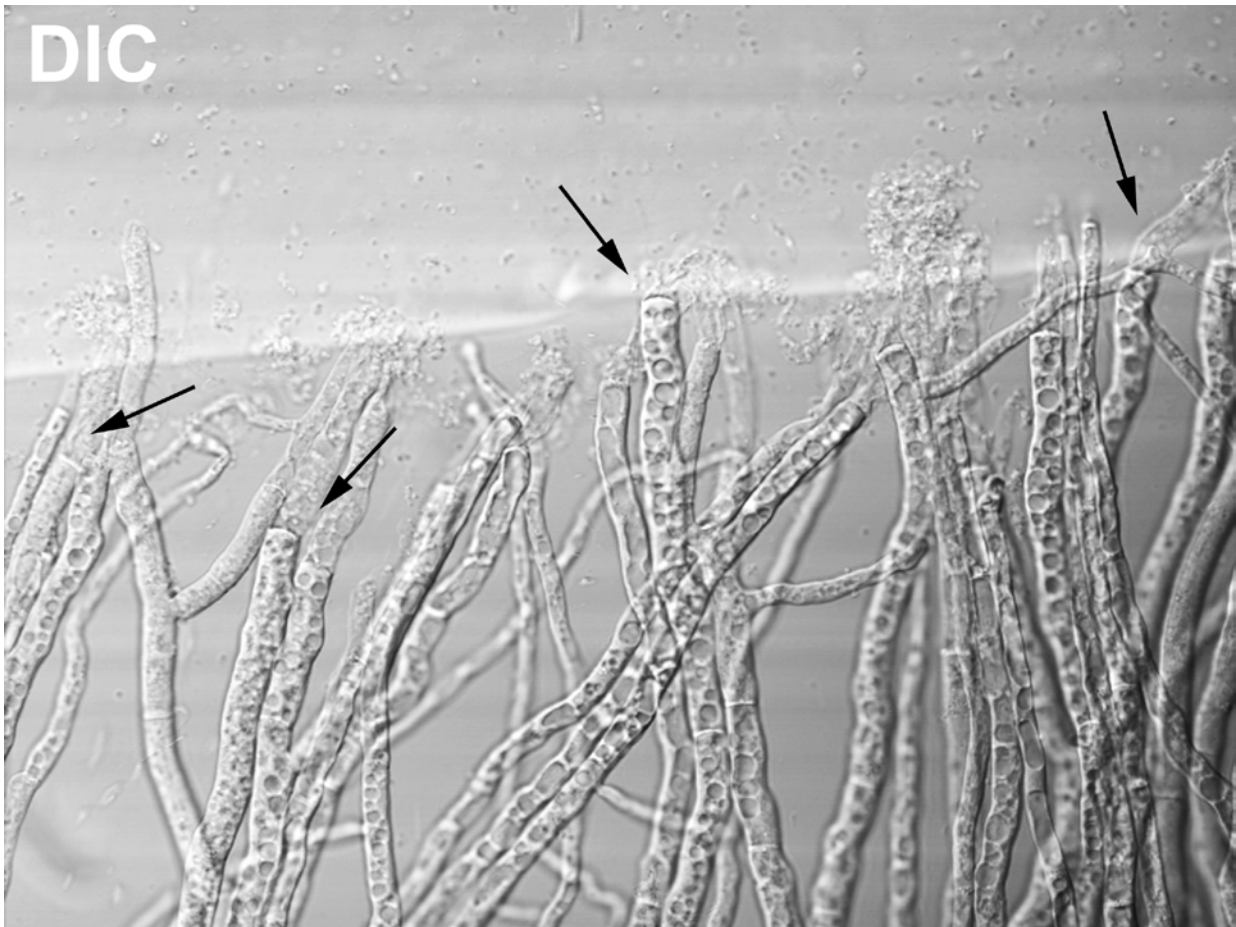
**Figura 7.** Microscopía confocal de la formación de septos en *T. atroviride* T1 que expresa Lifeact-GFP. En esta serie de tiempo se observan septos en diferentes estadios de desarrollo. La flecha blanca en el tiempo 00:16 muestra lo que representa el tiempo cero para ese septo en particular, que es la primera señal de crecimiento de la membrana plasmática al interior de la hifa. Como se puede apreciar en el canal de la GFP, la fluorescencia de la actina aparece antes de este evento. Escala 10  $\mu\text{m}$ . Tiempo en h:min.

### ***7.3 Organización de la actina de hifas maduras dañadas mecánicamente***

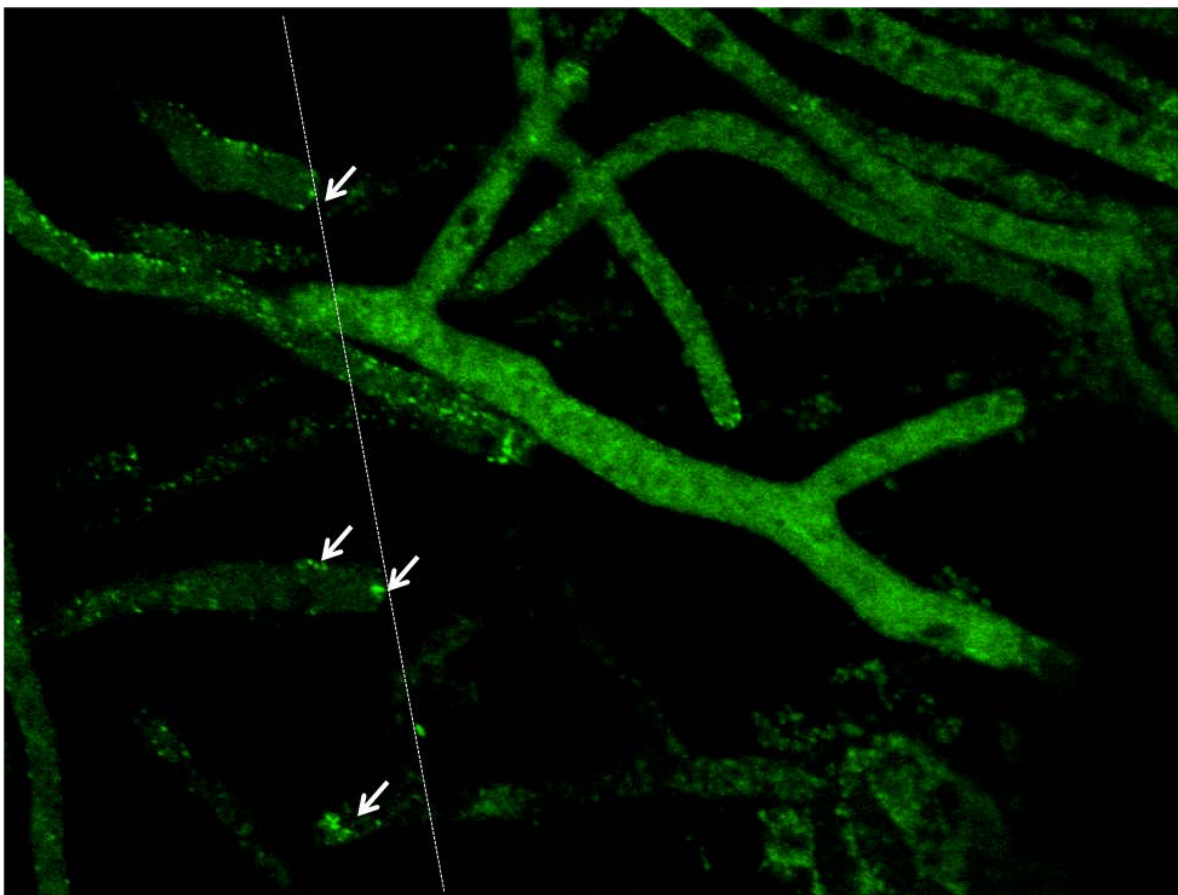
En la Figura 8 se puede observar por microscopía DIC, los efectos del daño mecánico. Se ve claramente la fuga de citoplasma después al corte. Asimismo, se pueden observar hifas vacías y también zonas altamente vacuoladas, después de los septos, que al parecer han sido taponeados para evitar la pérdida de citoplasma y de organelos. Aunque no se observan claramente los cuerpos de Woronin, se puede suponer que actúan tapando el poro septal para evitar que las hifas mueran.

En lo referente a la actina, después del corte al micelio, se observan escasos puntos fluorescentes en la región del septo que ha sido taponeado por los cuerpos de Woronin, paulatinamente el número de parches se va incrementando hasta que se forma una media luna que posteriormente se agrega para formar una acumulación más brillante en el lugar donde se reiniciará el crecimiento polarizado. Durante este proceso en regiones cercanas, se puede ver la movilidad de parches de F-actina que viajan de manera anterógrada al septo taponeado (Figura 9 y 10).

No todas las hifas fueron capaces de recuperarse después del corte con el bisturí, incluso algunas donde se ve contenido el citoplasma, no es posible observar que se instale un nuevo sitio de crecimiento. Posteriormente, a la acumulación de actina en los septos marginales, entre 30 y 50 min más tarde, se pueden observar múltiples eventos de septación en las hifas dañadas, muy cercanamente al septo que ha sido taponeado. Al igual que en las hifas sanas, el proceso de septación en las hifas dañadas incluye la formación de SATs, del CARs y finalmente de septos totalmente desarrollados (Figura 11). Este proceso de formación de un nuevo septo cerca del lugar del corte es aparentemente fundamental, debido a que las hifas dañadas que no pasan por este proceso de formación de anillos septales, no son capaces de recuperarse.

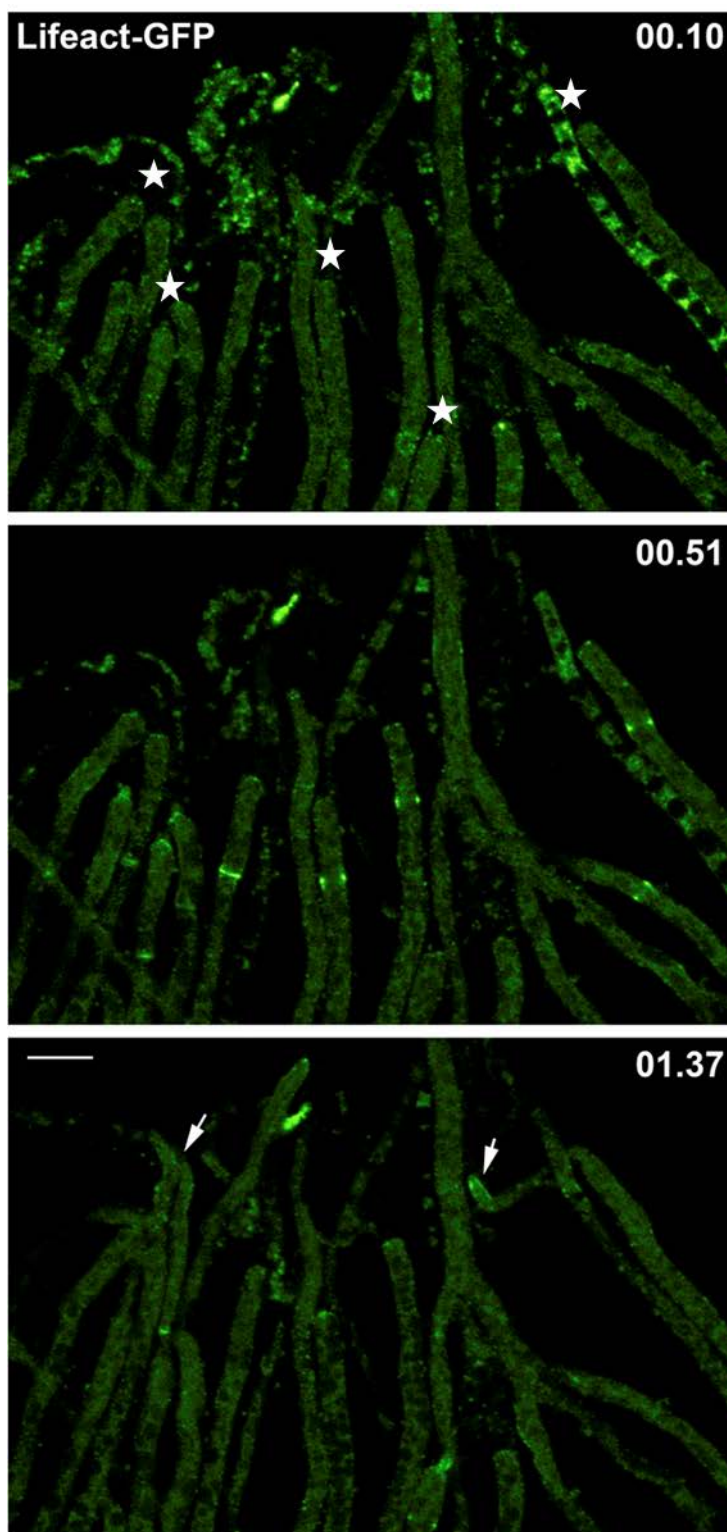


**Figura 8.** Microscopía DIC del micelio después del corte con bisturí del bloque de agar con *T. atroviride* T1. En esta micrografía se puede observar que las hifas están altamente vacuoladas, en la región después del septo que ha sido tapado. Los compartimentos inmediatos al sitio de daño están vacíos y los septos posteriores fueron taponeados por cuerpos de Woronin para evitar la fuga de citoplasma y de organelos, y con ello la muerte celular. Con flechas se indican algunas hifas que ya fueron taponeadas. La franja clara que se observa es evidencia del corte realizado con el bisturí. Los numerosos puntos que se observan en la parte superior son fugas de citoplasma por el vaciamiento del último compartimento de las hifas dañadas.

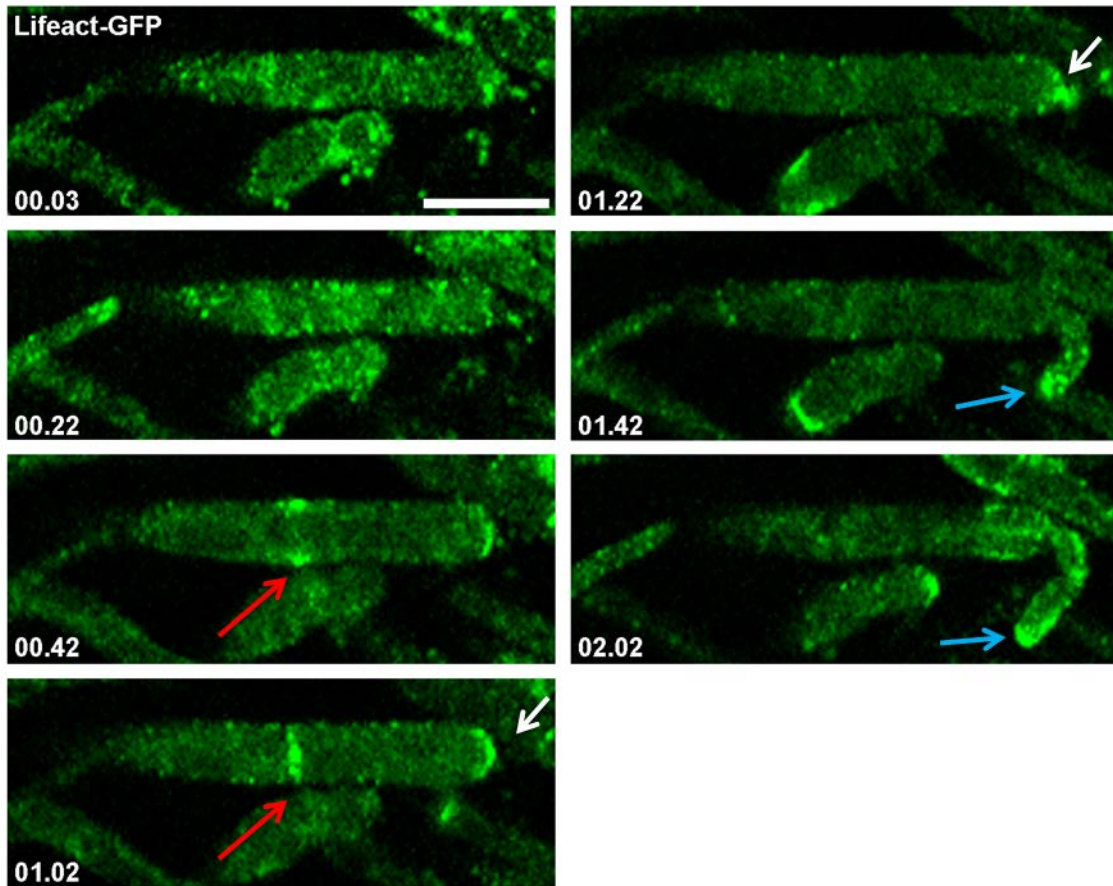


**Figura 9.** Microscopía confocal de micelio *T. atroviride* T1 que expresa Lifeact-GFP que ha sido dañado mecánicamente con un bisturí. En esta micrografía se observa que hay parches de F-actina en las hifas dañadas taponeadas (flechas). La línea punteada indica el lugar de corte del bisturí.

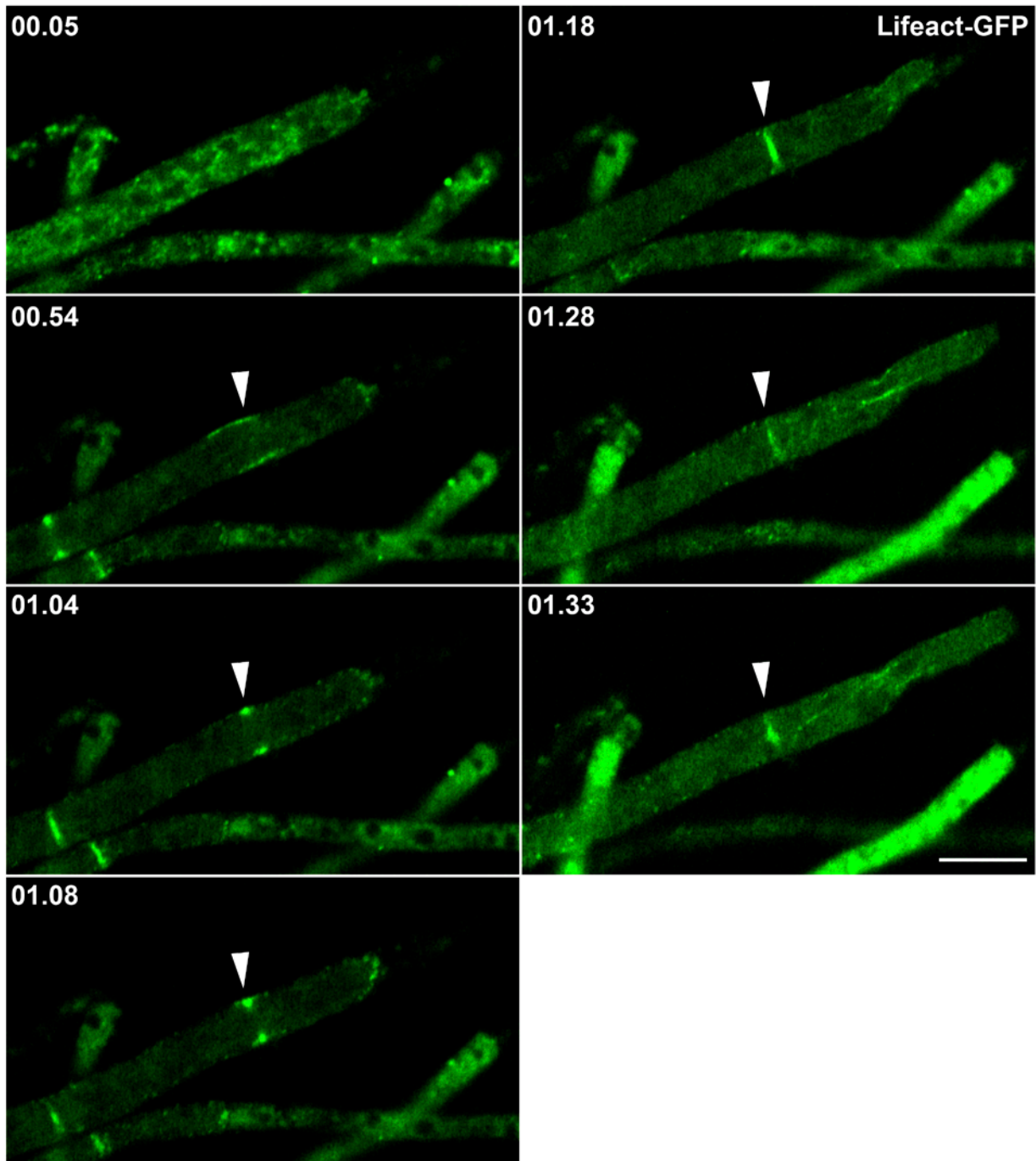




**Figura 10.** Microscopía confocal formación de septos en *T. atroviride* T1 dañado mecánicamente. En la segunda micrografía se observan numerosos eventos de septación en hifas y en la tercera con flechas se señalan algunas de estas hifas recuperadas. Escala 40  $\mu$ m. Tiempo h:min .



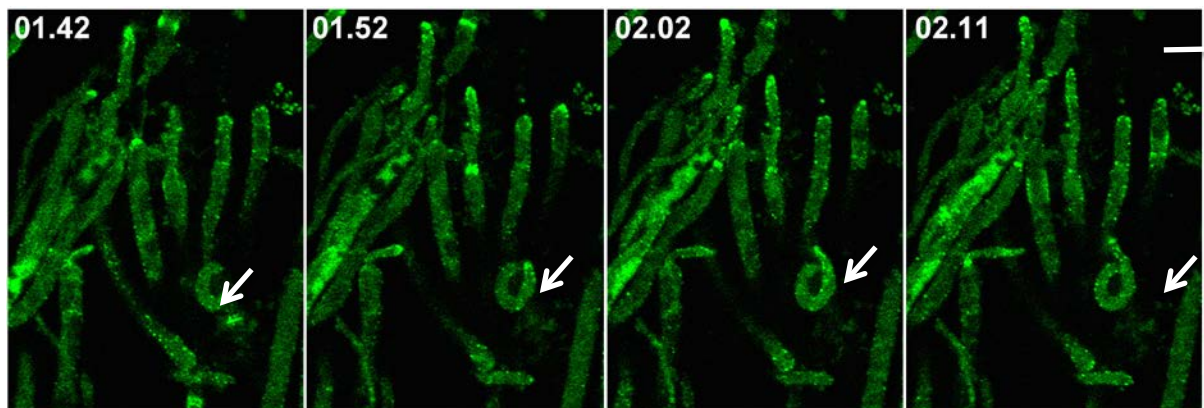
**Figura 11.** Microscopía confocal de un septo en *T. atroviride* T1 dañado mecánicamente. En esta serie de tiempo se puede observar el inicio de la formación del anillo contráctil a los 00.22 (flecha roja) y una acumulación de actina en el septo taponeado de la hifa dañada muy notorio en 01.02 (flecha blanca). En 01.22 se observa la protuberancia en el septo del que emergerá la hifa nueva (flecha blanca). En las últimas dos micrografías se observa la hifa nueva creciendo, con una acumulación de fluorescencia en la punta (flecha azul). Escala 10  $\mu$ m. Tiempo h:min.



**Figura 12.** Serie de tiempo de un acercamiento a una región de *T. atroviride* T1 dañada mecánicamente. En esta serie de tiempo se puede observar el inicio de la formación del SAT a los 00.54, el comienzo de la formación del CAR en 01.04 y una acumulación de actina en el septo taponeado de la hifa dañada. En 01.08 se observa la protuberancia en el septo del que emergerá la hifa nueva. En 01.18 se observa el anillo contráctil completo y cómo va creciendo la hifa nueva. En 01.28 y 01.33 se observa cómo va creciendo la hifa nueva y también el pase de cables de la hifa vieja a la nueva. Escala 10  $\mu\text{m}$ . Tiempo h:min.

Una vez que se ha formado el septo cercano al borde del micelio cortado, se observó que la actina continúa organizándose en el primer compartimento (Figura 11 y 12). A partir de la formación del domo de actina en el septo taponeado, alrededor de una hora después del corte, se distingue crecimiento de nuevas hifas que se van elongando lentamente al principio. Una vez que se reinició el crecimiento, además de los parches de actina es posible ver cables a partir del sitio donde la hifa fue taponeada (Figura 12).

Las hifas que crecen a partir del nuevo sitio de crecimiento, resultan ser más delgadas que las hifas previas. Algunas de las hifas crecen siguiendo el trayecto que deja marcado la parte vacía de la hifa anterior al septo taponeado. Las hifas regeneradas suelen crecer dentro de la hifa vacía siguiendo el perfil que determina la hifa dañada. La Figura 13 muestra una hifa madre que al dañarse quedó doblada, la hifa nueva creció siguiendo este patrón.



**Figura 13.** Hifas recuperadas de *T. atroviride* T1 después del daño mecánico. En esta serie de tiempo se puede observar cómo va creciendo de forma enrollada la nueva hifa una vez recuperada. Es común, aunque no absoluto, este comportamiento en las hifas hijas. Escala 10  $\mu\text{m}$ . Tiempo en h:min.

## Capítulo 8. Discusión

---

El citoesqueleto de actina en hongos se ha estudiado a través de diferentes técnicas de microscopía de fluorescencia en células fijadas y vivas a través del marcaje molecular con proteínas fluorescentes de la propia actina y de las proteínas de unión a actina (Heath *et al.*, 2000; Wang *et al.* 2004; Li *et al.*, 2006; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay y Shaw, 2008). Este estudio es el primer reporte de la dinámica de actina *in vivo* en el hongo filamentoso *T. atroviride* utilizando el reportero de actina Lifeact-GFP (Riedl *et al.*, 2008). El péptido de unión a actina, Lifeact (Riedl *et al.*, 2008) fue expresado exitosamente en *T. atroviride*, revelando dos tipos de estructuras hechas de actina como son los parches y los cables. Lifeact ha mostrado nuevamente ser un reportero exitoso para etiquetar todo el citoesqueleto de actina como en otros organismos además de los hongos.

### **8.1 Actina apical**

La localización de la actina etiquetada con Lifeact-GFP en el núcleo del SPK, es consistente con descripciones previas realizadas en diferentes hongos basados en observaciones por métodos de inmunolocalización (Bourett and Howard, 1991; Srinivasan *et al.*, 1996; Heath *et al.*, 2000; Virag and Griffiths, 2004) y células vivas utilizando diferentes marcadores de actina fusionados a proteínas fluorescentes (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Delgado-Alvarez *et al.*, 2010; Berepiki *et al.*, 2010). En la acumulación fluorescente en el ápice de *T. atroviride*, al igual que en otros hongos, no es posible resolver si se trata de un conjunto de filamentos o de parches. Sin embargo basados en reportes utilizando microscopía electrónica de transmisión, se puede suponer que se trata de una red densa de filamentos en la que los otros componentes del SPK están embebidos (Howard, 1981; Roberson and Fuller, 1988; Roberson *et al.*, 2009). Muy probablemente la actina en este sitio, sirva de andamiaje que regula la distribución y movilidad de los componentes del SPK, que resulta en un control eficiente del aparato de crecimiento apical (Sharpless and Harris, 2002; Harris *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). El hecho de que los componentes del SPK se desensamblen cuando se utilizan drogas anti-actina como la latrunculina y la citocalina, apoyan esta idea del papel estructural de la actina en el ápice (Araujo-Palomares *et al.*, 2009).

### **8.2 Parches de actina en el collar endocítico subapical**

En el subápice, se encontró un collar cortical de parches de actina, muy parecido a lo observado en *S. cerevisiae* (Adams and Pringle, 1981), *N. crassa* (Heath *et al.*, 2000; Delgado-Alvarez *et al.*, 2010; Berepiki *et al.*, 2010), *Sclerotium rolfsii* (Roberson, 1992), *Allomyces macrogynus* (Srinivasan *et al.*, 1996) y *A. nidulans* (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay and Shaw, 2008). En *T. atroviride*, se observaron abundantes parches localizados muy cerca de la membrana plasmática, a lo largo de toda la hifa, pero en particular concentradas a unos cuantos micrómetros del ápice, esta acumulación ha sido referida con anterioridad como la zona de endocitosis (Upadhyay and Shaw, 2008; Araujo-Bazán *et al.*, 2008). El papel de los parches de actina ha sido bien documentado en el proceso endocítico en *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *Aspergillus oryzae* y *N. crassa*.

### **8.3 Otras estructuras de actina en el subápice y región basal**

En la región subapical, además de los parches de actina, se observaron cables de F-actina de diferentes longitudes. Estos cables se encontraron exclusivamente en la región cortical cerca de la membrana plasmática, y no se detectaron en el citoplasma como ha sido reportado en germínulas de *A. nidulans* (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Esta ausencia de cables citoplasmáticos, también ha sido descrita en el ascomiceto *N. crassa* (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010). Esta distribución de los cables de actina, también fue observada en regiones más basales de las hifas. Un aspecto muy importante es que junto a los cables se veían parches de actina aparentemente asociados que se movían a lo largo de esto al igual que en *N. crassa* (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010).

### **8.4 Actina durante la formación de septos**

A pesar de la importancia que tiene la formación de los septos en el crecimiento y diferenciación de los hongos filamentosos, hay un conocimiento incompleto sobre su desarrollo y regulación. En este estudio solo se observó la actina y no de otros componentes durante el desarrollo de los septos, sin embargo, esto permite compararlo con otros organismos. La formación de los septos se regula en dos etapas; la primera incluye las señales de proteínas del ciclo celular y la selección del sitio de septación y la segunda del desarrollo del septo propiamente dicho. Al igual que en *N. crassa*, en *T. atroviride* la red de actina

llega al sitio futuro de septación varios minutos antes de cualquier señal de crecimiento de la membrana al interior de las hifas (Delgado-Álvarez *et al.*, 2014), incluso llega en promedio más rápido en este hongo (~10 min antes). También forma inicialmente una maraña de cables de actina entrelazados en el perímetro de la hifa, esta maraña muy probablemente este asociada a otras proteínas como la tropomiosina y la miosina de clase II (Delgado-Álvarez *et al.*, 2014). Esta maraña de actina coalesce y se transforma en un anillo contráctil en el sitio donde se formará el septo. Posteriormente el anillo contráctil de actomiosina, se constriñe para guiar el crecimiento de la membrana y la pared celular. Este proceso es muy similar a lo que ocurre en *Schizosaccharomyces pombe* y *N. crassa* (Lord, 2010; Delgado-Álvarez *et al.*, 2014). Algo muy interesante es que desde la formación del SAT hasta su transformación a CAR, no hay muchos parches alrededor, es hasta que se ensambla un CAR maduro, cuando los parches llegan al sitio de septación. Esto se debe a la necesidad de remover de éstos sitios, un exceso de membrana, cuando empiezan a llegar vesículas exocíticas cargadas con materiales para la formación de la pared y la membrana del septo. La localización de vesículas exocíticas en la formación de los septos ha sido reportada en varios hongos (Motoyama *et al.*, 1994, 1996; Fujiwara *et al.*, 1997; Ichinomiya *et al.*, 2005; Takeshita *et al.*, 2005, 2007; Yamada *et al.*, 2005; Horiuchi, 2009; Weber *et al.*, 2006; Riquelme *et al.*, 2007; Sanchez-León *et al.*, 2011 y Fajardo-Somera *et al.*, 2013).

### **8.5 La actina después del daño mecánico**

Los organismos en la naturaleza están constantemente expuestos a condiciones adversas, y pueden sufrir daño por diferentes mecanismos. Este daño puede alterar aspectos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de los organismos e incluso producirles la muerte. En plantas y animales, ha sido ampliamente estudiada la respuesta al daño mecánico (Gingell, 1970; Szubinska, 1971; Togo *et al.*, 1990; Bi *et al.*, 1995; Abreu-Blanco *et al.*, 2011b; Kono *et al.*, 2012; Yumura *et al.*, 2014). Estos sistemas tienen mecanismos muy sofisticados y conservados que les permiten reparar el daño a sus células a través de cambios en sus transcriptomas, proteomas y metabolomas (Hernandez-Oñate y Herrera-Estrella, 2015). Los cambios mediados por el daño mecánico incluyen activación de receptores, flujo de calcio, liberación de ATP, activación de cascadas de cinasas, presencia de especies reactivas de oxígeno y activación de la ruta de las oxilipinas (Mittler *et al.*, 2011).

A pesar de todo el avance en el conocimiento de los mecanismos de reparación de daño mecánico en plantas y animales, lo que se conoce sobre la respuesta en hongos es muy limitada. El hongo *T. atroviride*

ha sido utilizado para estudiar este fenómeno con mayor profundidad, encontrando que la respuesta al daño mecánico, en efecto involucra especies reactivas de oxígeno,  $\text{Ca}_2^+$ , la cascada de las cinasas y la ruta de señalización de lípidos en este organismo (Hernandez-Oñate y Herrera-Estrella, 2015). Además de los reportes en *T. atroviride*, existen otros estudios sobre daño mecánico en otros hongos filamentosos como *Schizophyllum commune* (Leonard y Dick, 1973), *Sclerotium rolfsii* (Georgiou *et al.*, 2006), and *Glomus intraradices* (Fester y Hause, 2005), no obstante no aportan información mas detallada.

Sin embargo, a nivel celular, lo único que se conoce es que los hongos filamentosos responde al daño mecánico sellando los poros septales por los cuerpos de Woronin para prevenir la perdida de citoplasma y organelos y con ello la muerte celular (Jedd, 2011). Después de que han sido taponeados los septos, se generan nuevos sitios de crecimiento y pueden aparecer una o más hifas. Mientras esto sucede, se ha demostrado que hay una acumulación de especies reactivas de oxígeno (Belozerskaya y Gessler, 2007; Gessler *et al.*, 2007). Este estudio está enfocado en entender aspectos celulares de la organización de actina durante la recuperación de estos sitios de crecimiento, debido a que en estudios del transcriptoma de *T. atroviride* después del daño mecánico se ha demostrado que hay una regulación de al menos 25 genes relacionados con la organización citoesquelética.

Bement *et al.* (1999) observaron que en ovocitos de *Xenopus* que son heridos, la actina se acumula en el sitio de herida. Yumura y colaboradores (2014) también describieron una acumulación de actina en el sitio de herida en la ameba *Dyctiostelium*. En *T. atroviride* también se observa una acumulación conspicua de actina en el sitio de herida y en el poro septal sellado por cuerpos de Woronin. Abreu-Blanco *et al.* (2012a) sugieren que la actina podría estar brindando soporte mecánico para evitar la expansión de la herida como ha sido mencionado para *Dyctiostelium* (Yumura *et al.*, 2014).

En este trabajo se distinguieron varias etapas después del daño mecánico hasta la recuperación del crecimiento. Se observó que las hifas recuperadas crecen dentro de las hifas dañadas, al igual que se reporta en otros trabajos (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Es muy evidente, que se debe formar un septo previo a la zona de recuperación para que la hifa quede protegida en caso de que se lesione nuevamente el micelio. Hifas que no desarrollaban un septo, no se recuperaban. Para que ocurra la septación de las células fúngicas, la participación de la actina y algunas proteínas asociadas es indispensable (Delgado-Álvarez *et al.*, 2010, 2014). La actina además de participar en la formación de los septos anteriores, también puede estar jugando un papel importante al acumularse en la región donde crecerá nuevamente una hifa, probablemente para reorganizar el aparato de crecimiento apical.



El  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un papel fundamental en la recuperación de la membrana plasmática, por lo que estos cambios en la actividad de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  pueden estar asociados a los cambios en el citoesqueleto de actina como se ha propuesto (Yumura *et al.*, 2014). El  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para el funcionamiento de la actina y su asociación puede ayudar a una rápida recuperación de la membrana y prevenir la expansión de la herida. Con los resultados de Hernández-Oñate y colaboradores (2012), esta función tiene sentido, pues genes relacionados con la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  y despolimerización severa de la actina (*sda1* de *S. cerevisiae*) se expresan simultáneamente cuando ocurre el daño mecánico del micelio de *T. atroviride*.

A pesar de que se realizó un seguimiento de la recuperación de las células de *T. atroviride* por más de tres horas, no fue posible observar la reorganización de la actina en el núcleo del SPK. Esto probablemente se deba a que las células se encuentran en estrés metabólico y su recuperación toma más tiempo. Observaciones a mayor tiempo deberán ser realizadas para también evaluar la dinámica de la actina durante la conidiación que es una de las respuestas más notables en *T. atroviride* como consecuencia del daño mecánico.

## Capítulo 9. Conclusiones

---

- Lifeact, al igual que en otros eucariotas, es un excelente reportero de actina en *T. atroviride*, que muestra dos poblaciones de actina: parches y cables. En la región I, la actina se encuentra en el centro del SPK, en la región II forma un collar endocítico de parches. En la región II y III hay cables de diversas longitudes donde se observan parches viajando a través de ellos.
- Aunque durante la septación se producen estructuras como el SAT y el CAR como en *N. crassa*, es un proceso más lento.
- La actina inicia su reorganización prácticamente de inmediato después del daño mecánico, acumulándose en el compartimento anterior a los poros septales taponeados. Se forma un septo muy cercano al septo taponeado antes de que el crecimiento reinicie, esta es una señal de recuperación que es necesario para la sobrevivencia de la hifa.
- La recuperación de organización de la actina en las hifas nuevas es un proceso indispensable que puede tomar varias horas.

## Literatura Citada

- Abreu-Blanco, M.T., Verboon, J.M., Liu, R., Watts, J.J., Parkhurst, S.M. 2012a. *Drosophila* embryos close epithelial wounds using a combination of cellular protrusions and an actomyosin purse string. *J Cell Sci*, 125, 5984-5997.
- Abreu-Blanco, M.T., Watts, J.J., Verboon, J.M. Parkhurst, S.M. 2012b. Cytoskeleton responses in wound repair. *Cell Mol Life Sci*, 69, 2469-2483.
- Adams, A., Pringle, J. 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 98, 934-945.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2009. *Essential Cell Biology* (3<sup>rd</sup> edition). USA: Garland Science.
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A., Espeso, E.A. 2008. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 67(4), 891-905.
- Araujo-Palomares, C.L., Riquelme, M. Castro-Longoria, E. 2009. The polarisome component SPA-2 localizes at the apex of *Neurospora crassa* and partially colocalizes with the Spitzenkörper. *Fungal Genet Biol*, 46(8), 551-563.
- Bartnicki-García, S., Bartnicki, D.D., Gierz, G., López-Franco, R., Bracker, C.E. 1995. Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Experimental Mycology*, 19(2), 153-159.
- Bartnicki-García, S. 1984. Kingdoms with walls. In *Structure, Functions, and Biosynthesis of Plant Cell Walls* (ed. W.M. Dugger, and S. Bartnicki-García), Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiology, (pp. 1-18).
- Bartnicki-García, S. 2002. *Molecular biology of fungal development*. Marcel Dekker, (pp. 29-58).
- Bartnicki-García, S., Hergert, F., Gierz, J. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma*, 153(1-2), 46-57.
- Bartnicki-García, S., Lippman, E. 1969. Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science*, 165(3890), 302-304.
- Belozerskaya, T.A., Gessler, N.N. 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 43, 565-575.
- Bement, W.M., Mandato, C.A., Kirsch, M.N. 1999. Wound-induced assembly and closure of an actomyosin purse string in *Xenopus* oocytes. *Curr Biol*, 9, 579-587.

- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol*, 7, 249-260.
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J.Y., Tilsner, J., Read, N.D. 2010. F-actin Dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 9(4), 547-557.
- Berepiki, A., Lichius, A., Read, N.D. 2011. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol*, 9(12), 876-887.
- Bi, G.Q., Alderton, J.M., Steinhardt, R.A. 1995. Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *J Cell Biol*, 131, 1747-1758.
- Bourett, T.M., Howard, R.J. 1990. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe griseae*. *Can J Bot*, 68, 329-342.
- Bourett, T.M., Howard, R.J. 1991. Ultrastructural immunolocalization of F-actin in a fungus. *Protoplasma*, 163, 199-202.
- Bracker, C.E., Murphy, D.J., López-Franco, R. 1997. Laser microbeam manipulation of cell morphogenesis in growing fungal hyphae. In *Functional Imaging and Optical Manipulation of Living Cells*, pp. 67-80. Edited by Farkas, D.L., Tromberg, B.J. Bellingham, WA: SPIE (International Society for Optical Engineering) (Proceedings of SPIE vol. 2893).
- Bretscher, A. 2003. Polarized growth and organelle segregation in yeast: the tracks, motors, and receptors. *J Cell Biol*, 160, 811-816.
- Brotman, Y., Gupta, J.K., Viterbo, A. 2010. *Trichoderma*. *Current Biol*, 20(9), 390-391.
- Casas-Flores, S., Rios-Mombers, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., Herrera-Estrella, A. 2014. BLR-1 and BLR-2 are key regulatory elements for photoconidiation and mycelial growth in *T. atroviride*. *Microbiology*, 150, 3561-3569.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma* – application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. Wiley & Sons, New York, N.Y.
- Dagdas, Y.F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L.S., Bielska, E., Steinberg, G., Talbot, N.J. 2012. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science*, 336(6068), 1590-1595.
- Darenfed, H., Mandato, C.A. 2005. Wound-induced contractile ring: a model for cytokinesis. *Biochem Cell Biol*, 83, 711-720.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal Biology* (4<sup>th</sup> edition). England: Blackwell Publishing.
- Delgado-Álvarez, D.L., Bartnicki-García, S., Seiler, S., Mouriño-Pérez, R.R. 2014. Septum Development in

*Neurospora crassa*: The Septal Actomyosin Tangle. PLoS ONE, 9(5), 1-10.

- Delgado-Álvarez, D.L., Callejas-Negrete, O.A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R.W., Smith, L.G., Mouriño-Pérez, R.R. 2010. Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol, 47(7), 573-586.
- Domínguez, R., Holmes, K.C. 2011. Actin structure and function. Annu Rev Biophys, 40, 169-186.
- Drubin, D.G., Miller, K.G., Botstein, D. 1988. Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. J. Cell Biol, 107, 2551-2561.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P. 2011. *Trichoderma*, the genomix of opportunistic success. Nat. Rev. Microbiol, 9, 749-759.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C., Bretscher, A. 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. Nature Cell Biology, 4, 32-34.
- Fajardo-Somera, R. A., Roberson, R. W., Johnk, B., Bayram, O., Braus, G. H., Riquelme, M. 2013. The role and traffic of chitin synthases in *Neurospora crassa*. Presentado en el 27th Fungal Genetics Conference. Mittler R, et al. (2011) ROS signaling: The new wave? Trends Plant Sci, 16, 300–309.
- Fehrenbacher, K.L., Boldogh, I.R., Pon, L.A. 2003. Taking the A-train: actin-based force generators and organelle targeting. Trends Cell Biol, 13(9), 472-477.
- Fehrenbacher, K.L., Yang, H.C., Gay, A.C., Huckaba, T.M., Pon, L.A. 2004. Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. Current Biology, 14, 1996-2004.
- Fester, T., Hause, G. (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. Mycorrhiza, 15, 373–379.
- Fujiwara, M., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. 1997. A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. Biochem Biophys Res Commun, 236, 75-78.
- Geli, M.I., Riezman, H. 1998. Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. J Cell Sci, 111(Pt 8), 1031-1037.
- Georgiou, C.D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., Zervoudakis, G. 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. Integr Comp Biol, 46, 691–712.
- Gessler, N.N., Averyanov, A.A., Belozerskaya, T.A. 2007. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochem, 72, 1091–1109.
- Gingell, D. 1970. Contractile responses at the surface of an amphibian egg. J Embryol Exp Morphol, 23, 583-609.

- Girbardt, M. 1969. Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhypen. *Protoplasma*, *67*, 413-441.
- Grayston, S.J., Vaugham, D., Jones, D. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants; the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol*, *5*, 29-56.
- Grove, S.N., Bracker, C.E. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi. *J Bacteriol*, *104*, 989-1009.
- Gruber, S., Seidl-Seiboth, V. 2012. Self versus non-self: fungal cell Wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiol*, *158*, 26-34.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol*, *96*, 190-194.
- Harris, S. D., Read, N. D., Roberson, R. W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M. Momany, M. 2005. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell*, *4*, 225-229.
- Harris, S.D. 2010. Hyphal growth and polarity. In: Borkovich, K.A., Ebbole, D.J. (eds). *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. ASM, Washington , D.C.
- Hasek, J., Bartnicki-Garcia, S. 1994. The arrangement of F-actin and microtubules during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores. *Arch. Microbiol*, *161*, 363-369.
- Heath, I.B., Gupta, G., Bai, S. 2000. Plasma membrane-adjacent actin filaments, but not microtubules, are essential for both polarization and hyphal tip morphogenesis in *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, *30*, 45-62.
- Henis, Y., Chet, I., Avizohar-Hershenzon, Z. 1965. Nutritional and mechanical factors involved in mycelial growth and production of Sclerotial by *Sclerotium rolfsii* in artificial medium and amended soil. *Phytopathol*, *55*, 87-91.
- Hernández-Oñate, M.A., Esquivel-Naranjo, E.U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., Herrera-Estrella, A.H. 2012. An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *PNAS*, *109*(37), 14918-14923.
- Hernández-Oñate, M.A., Herrera-Estrella, A.H. 2015. Damage response involves mechanisms conserved across plants, animals and fungi. *Curr Genet*, *61*, 359-372.
- Hickey, P.C., Jacobson, D., Read, N.D., Glass, N.L., 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, *37*, 109–119.
- Horio, T., Oakley, B.R. 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*, *16*, 918-926.
- Horiuchi, H. 2009. Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth,

conidiophore development and septum formation. *Med Mycol*, *47*, S47-S52.

- Howard, R. J. 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J Cell Sci*, *48*, 89-103.
- Huckaba, T. M., Gay, A. C., Pantalena, L. F., Yang, H. Pon, L. A. (2004). Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, *167*, 519-530.
- Ichinomiya, M., Yamada, E., Yamashita, S., Ohta, A., Horiuchi, H. (2005). Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, *4*, 1125-1136.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., Andrews, N.W. 2008. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent endocytosis. *J Cell Biol*, *180*(5), 905-914.
- Jedd, G. 2011. Fungal evo-devo: Organelles and multicellular complexity. *Trends Cell Biol*, *21*, 12–19.
- Karpova, T.S., McNally, J.G., Moltz, S.L., Cooper, J.A. 1998. Assembly and function of the actin cytoskeleton of yeast: relationships between cables and patches. *J Cell Biol*, *142*(6), 1501-1517.
- Kilmartin, J.V., Adams, A.E. 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J Cell Biol*, *98*(3), 922-933.
- Kono, K., Saeki, Y., Yoshida, S., Tanaka, K., Pellman D. 2012. Proteasomal degradation resolves competition between cell polarization and cellular wound healing. *Cell*, *150*, 151-164.
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Druzhinina, I. 2014. Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. En Gupta., V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuohy, M.G., *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Poland, Elsevier. (pp. 3-24).
- Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I.S. 2008. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J. Zhejiang Univ Sci B*, *9*, 753–763.
- Kübler, E., Riezman, H. 1993. Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Embo J*, *12*, 2855-2862.
- Kwon, Y.H., Hoch, H.C., Aist, J.R. 1991. Initiation of appressorium formation in *Uromyces appendiculatus*: organization of the apex, and the responses involving microtubules and apical vesicles. *Can J Bot*, *69*, 2560-2573.
- Lahlali, R., Hijri, M. 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiol Lett*, *311*, 152-159.

- Leonard TJ, Dick S 1973. Induction of haploid fruiting by mechanical injury in *Schizophyllum commune*. *Mycology*, 65, 809–821.
- Li, S., Du, L., Yuen, G. Harris, S. D. 2006. Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell*, 17, 1218-1227.
- Lichius, A., Berepiki, A., Read, N.D. 2011. Form follows function – the versatile fungal cytoskeleton. *Fungal Biol*, 115(6), 518-540.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. 2005. *Biología Celular y Molecular* (5<sup>ta</sup> edición). Colombia: Editorial Médica Panamericana.
- Lord, M. 2010. Cytokinesis mechanisms in yeast. *Nature Education*, 3, 53.
- Marks, J., Hagan, I.M., Hyams, J.S. 1986. Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl*, 5, 229-241.
- McDade, J.R., Archambeau, A., Michele, D.E. 2014. Rapid actin-cytoskeleton-dependent recruitment of plasma membrane-derived dysferlin at wounds is critical for muscle membrane repair. *FASEB J*, 28(8), 3660-3670.
- McDaniel, D.P., Roberson, R.W., 2000. Microtubules are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genet Biol*, 31, 233–244.
- McNeil, P.L. 2002. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci*, 115, 873-879.
- McNeil, P.L., Miyake, K., Vogel, S.S. 2003. The endomembrane requirement for cell surface repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 4592-4597.
- Medina-Castellanos, E., Esquivel-Naranjo, E.U., Heil, M., Herrera-Estrella, A. 2014. Extracellular ATP activates MAPK and ROS signaling during injury response in the fungus *Trichoderma atroviride*. *Front Plant Sci*, 5(659), 1-11.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci*, 16(6), 300-309.
- Moseley, J.B., Goode, B.L. 2006. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70, 605-645.
- Mostowy, S., Cossart, P. 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(3), 183-194.
- Motegi, F., Arai, R., Mabuchi, I. 2001. Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell*, 12(5), 1367-1380.
- Motoyama, T., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. 1994. Isolation of a chitin synthase gene (chsC) of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 58, 2254-2257.



- Mouriño-Pérez, R.R., Riquelme, M., Callejas-Negrete, O.A., Galván-Mendoza, J.I. 2016. Microtubules and associated molecular motors in *Neurospora crassa*. *Mycologia*, *108*(3), 515-527.
- Mouriño-Pérez, R.R., Roberson, R.W., Bartnicki-García, S. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, *43*(6), 380-400.
- Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D., Botstein, D. 1994. Ultrastructure of the yeast F-actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J Cell Biol*, *125*, 381-391.
- Munn, A.L., Stevenson, B.J., Geli, M.I., Riezman, H. 1995. end5, end6, end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, *6*(12), 1721-1742.
- Nelson, G., Kozlova-Zwiderman, O., Collins, A.J., Knight, M.R., Fincham, J.R.S., Stanger, C.P., Renwick, A., Hensing, J.G.M., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Read, N.D. 2004. Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin. *Molecular Microbiology*, *52*(5), 1437-1450.
- Pantazopoulou, A., Peñalva, M.A. 2011. Characterization of *Aspergillus nidulans* RabC/Rab6. *Traffic*, *12*, 386-406.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol*, *23*, 23-54.
- Pollard, T.D., Wu, J.Q. 2010. Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*, 149-155.
- Pruyne, D., Bretscher, A. 2000. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci*, *113*(Pt 3), 365-375.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., Boone, C. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed end association. *Science*, *297*, 612-615.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., Bretscher, A. 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *20*, 559-591.
- Ramos-García, S.L., Roberson, R.W., Freitag, M., Bartnicki-Garcia, S., Mouriño-Pérez, R.R., 2009. Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, *8*, 1880-1890.
- Reddy, A., Caler, E.V., Andrews, N.W. 2001. Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, *106*, 157-169.
- Rida, P.C., Nishikawa, A., Won, G.Y., Dean, N. 2006. Yeast-to-hyphal transition triggers formin-dependent Golgi localization to the growing tip in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, *17*, 4364-

4378.

- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*, *5*(7), 605-607.
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J. M., Sánchez-León, E. F., Verdín-Ramos, J. A., Beltrán-Aguilar, A., Freitag, M. 2007. Spitzenkörper localization and intracellular traffic of GFP-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, *6*, 1853-1864.
- Riquelme, M., Reynaga-Peña, C.G., Gierz, G., Bartnicki-García, S. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol*, *24*, 101-109.
- Riquelme, M., Roberson, R.W., McDaniel, D.P., Bartnicki-García, S. 2002. The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, *37*(2), 171-179.
- Riquelme, M., Sánchez-León, E. 2014. The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, *20*, 27-33.
- Roberson, R.W. 1992. The actin cytoskeleton in hyphal cells of *Sclerotium rolfii*. *Mycologia*, *84*, 41-51.
- Roberson, R.W., Abril, M., Blackwell, M., Letcher, P., McLaughlin, D.J., Mouriño-Pérez, R.R., Riquelme, M., Uchida, M. 2009. Hyphal Structure, Capítulo 2. In: *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. Eds. Borkovich, K. and Ebbole, D. ASM Press, Washington, D.C.
- Roberson, R.W., Fuller, M.S. 1988. Ultrastructural aspects of the hyphal tip of *Sclerotium rolfii* preserved by freeze substitution. *Protoplasma*, *146*, 143-149.
- Roberson, R.W., Vargas, M.M. 1994. The tubulin cytoskeleton and its sites of nucleation in hyphal tips of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*, *182*, 19-31.
- Robertson, A.S., Smythe, E., Ayscough, K.R. 2009. Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci*, *66*(13), 2049-2065.
- Rossanese, O.W., Reinke, C.A., Bevis, B.J., Hammond, A.T., Sears, I.B., O'Connor, J., Glick, B.S. 2001. A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, *153*, 47-62.
- Sánchez-León-Hing, E.F., Verdín-Ramos, J.A., Freitag, M., Roberson R.W., Bartnicki-García, S., Riquelme, M. 2011. Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: Actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryot Cell*, *10*, 683-695.
- Sawyer, J.M., Harrell, J.R., Shemer, G., Sullivan-Brown, J., Roh-Johnson, M., Goldstein, B. 2010. Apical

constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis. *Dev Biol*, *341*, 5-19.

- Schapiro, A.L., Valpuesta, V., Botella, M.A. 2009. Plasma membrane repair in plants. *Trends Plant Sci*, *14*(12), 645-652.
- Schirmbröck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., Kubicek, C.P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolitic enzymes and peptaibol antibiotics: molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol*, *60*, 4364-4370.
- Schott, D.H., Collins, R.N., Bretscher, A. 2002. Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J Cell Biol*, *156*, 35-39.
- Schroeder, T.E. 1973. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc Natl Acad Sci USA*, *70*, 1688-1692.
- Seiler, S., Justa-Schuch, D. 2010. Conserved components, but distinct mechanisms for the placement and assembly of the cell division machinery in unicellular and filamentous ascomycetes. *Molecular Microbiology*, *78*, 1058-1076.
- Sharpless, K.E., Harris, S.D. 2002. Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell*, *13*, 469-479.
- Srinivasan, S., Vargas, M., Roberson, R.W. 1996. Functional, organizational, and biochemical analysis of F-actin in the hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Mycologia*, *88*, 57-80.
- Steinberg, G. 2007. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell*, *6*, 351-360.
- Suelmann, R., Fischer, R. 2000. Nuclear migration in fungi different motors at work. *Microbiol Res*, *151*, 247-254.
- Szubinska, B. 1971. "New membrane" formation in *Amoeba proteus* upon injury of individual cells. Electron microscope observations. *J Cell Biol*, *49*, 747-772.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E.A., Peñalva, M.A., Osmani, S.A., Oakley, B.R. 2008. The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*, *19*, 1439-1449.
- Takeshita, N., Ohta, A., Horiuchi, H. 2005. CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell*, *16*, 1961-1970.
- Takeshita, N., Vienken, K., Rolbetzki, A., Fischer, R. 2007. The *Aspergillus nidulans* putative kinase, KfsA (kinase for septation), plays a role in septation and is required for efficient asexual spore formation. *Fungal Genet Biol*, *44*, 1205-1214.

- Togo, T., Alderton, J.M., Bi, G.Q., Steinhardt, R.A. 1999. The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J Cell Sci*, *112*, 719-731.
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A.M., Laborda, F. 1998. Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, *144*, 45-53.
- Trinci, A.P.J. 1978. Wall and hyphal growth. *Science Program of Oxford*, *65*, 75-99.
- Upadhyay, S., Shaw, B.D. 2008. The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, *68*(3), 690-705.
- Utsugi, T., Minemura, M., Hirata, A., Abe., M., Watanabe, D., Ohya, Y. 2002. Movement of yeast 1,3-beta-glucan-synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes Cells*, *7*,1-9.
- Vinale, F., D'Ambrosio, G., Abadi, K., Scala, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S.L., Lorito, M. 2004. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. *J Zhejiang Univ Science*, *30*, 2-8.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol Biochem*, *40*, 1-10.
- Virag, A., Griffiths, A. J.F. 2004. A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fungal Genet Biol*, *41*,213-225.
- Waddell, L.B., Lemckert, F.A., Zheng, X.F., Tran, J., Evesson, F.J., Hawkes, J.M., Lek, A., Street, N.E., Lin, P., Clarke, N.F., *et al.* 2011. Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch. *J Neuropathol Exp Neurol*, *70*, 302-313.
- Wang, Y., Fan, L-M., Zhang, W-Z., Zhang, W., Wu, W-H. 2004. Ca<sup>2+</sup>-permeable channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* pollen are regulated by actin microfilaments. *Plant Physiol*, *136*, 3892-3904.
- Wang, C-L., Shaw, B.D. 2016. F-actin localization dynamics during appressorium formation in *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, *108*(3), 506-514.
- Weber, I., Assmann, D., Thines, E., Steinberg, G. 2006. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell*, *18*, 225-242.
- Woo, S.L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R.L., Harman, G.E., Kubicek, C.P., Del Sorbo, G., Lorito, M. 1999. Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Mol Plant-Microbe Interact*, *12*, 419-429.
- Yamada, E., Ichinomiya, M., Ohta, A. Horiuchi, H. 2005. The class V chitin synthase gene *csmA* is crucial

for the growth of the *chsA chsC* double mutant in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, *69*, 87-97.

Yang, H.C., Pon, L.A. 2002. Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, *99*, 751-756.

Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T.C., Bretscher, A. 2000. Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature*, *406*, 1013-1015.

Yokoyama, K., Kaji, H., Nishimura, K., Miyaji, M. 1990. The role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*, *136*, 1067-1075.

Yumura, S., Hashima, S., Muranaka, S. 2014. Myosin II does not contribute to wound repair in *Dictyostelium* cell. *Biology Open*, *3*, 966-973.

Yumura, S., Mori, H., Fukui, Y. 1984. Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J Cell Biol*, *99*, 894-899.

Yumura, S., Uyeda, T.Q. 2003. Myosins and cell dynamics in cellular slime molds. *Int Rev Cytol*, *224*, 173-225.

## Anexos

### Medio Mínimo de Vogel Agar al 1.5% (MMV 1.5%)

Para 500 mL:

Sales de Vogel 50X (10 mL)

Sucrosa (7.5 gr)

Agar (7.5 gr)

Aforar con agua destilada a 500 mL

Para 100 mL de sales de Vogel a concentración de 50X:

Citrato de sodio (15 gr)

Fosfato de potasio monobásico (2.5 gr)

Nitrato de amonio (10 gr)

Sulfato de magnesio anhidro (1 gr)

Elementos traza (500  $\mu$ L)

Biotina (0.1 mg/mL) (250  $\mu$ L)

Cloroformo para preservar (200  $\mu$ L)

Aforar con agua destilada a 100 mL

Para 100 mL de elementos traza:

Ácido cítrico \* H<sub>2</sub>O (5 gr)

ZnSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (5 gr)

Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O (1 gr)

CuSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O (0.25 gr)

MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O (0.05 gr)

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> anhidro (0.05 gr)

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O (0.05 gr)

Cloroformo para preservar (1 mL)

Aforar con agua destilada a 100 mL