

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



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

**Papel del citoesqueleto de actina en la organización celular del
hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*.**

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

Presenta:

Abraham Asahel Gasca Venegas

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Abraham Asahel Gasca Venegas

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete
Codirectora de tesis

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Codirectora de tesis

Dr. Gilberto Curlango Rivera

Dr. Salvador Villarreal Reyes



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Abraham Asahel Gasca Venegas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

**Papel del citoesqueleto de actina en la organización celular del hongo entomopatógeno
*Metarhizium brunneum***

Resumen aprobado por:

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete
Codirectora de tesis

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Codirectora de tesis

El crecimiento polarizado es esencial para el desarrollo de los organismos y puede apreciarse en las raíces de las plantas, en la extensión de las neuronas y hasta en las hifas de los hongos filamentosos. En este tipo de crecimiento participan diferentes complejos proteicos, siendo uno ellos el citoesqueleto, compuesto por microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina. La dinámica de los componentes del citoesqueleto ha sido ampliamente estudiada en hongos como *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma atroviride*, entre otros, describiéndose por ejemplo la participación de los microfilamentos de actina en el transporte y posicionamiento de elementos cargo (peroxisomas, mitocondrias, vesículas, etc.) a las zonas de crecimiento más activo, así como en la formación de septos, en la respuesta inmunológica, endocitosis y exocitosis y en procesos reproductivos. Sin embargo, en hongos entomopatógenos como *Metarhizium*, poco se sabe sobre la dinámica del citoesqueleto de actina durante su desarrollo y transporte intracelular. En este trabajo se llevó a cabo la construcción de un vector para el marcaje fluorescente de la actina en *M. brunneum* mediante el reportero Lifeact-GFP. Los resultados mostraron la presencia de parches de actina distribuidos en las hifas en crecimiento. También se probó el efecto de la alteración del citoesqueleto de actina, utilizando Latrunculina B (Lat B), determinando su concentración mínima inhibitoria de 1.5 µg/mL, la cual provoca alteraciones en las hifas como ramificaciones apicales y aumento del 23 % en el grosor. Además, la dinámica de los peroxisomas y cuerpos lipídicos se vio afectada en presencia de Lat B, con disminución en su velocidad de desplazamiento del 11% y 28% respectivamente, al igual que alteraciones en la estructura de la pared celular con engrosamientos irregulares y presencia de parches de quitina, así como una disminución en la tasa de endocitosis y un incremento en la sensibilidad al colorante Rojo Congo (RC). Toda esta información ayuda en la comprensión del papel del citoesqueleto de actina y los mecanismos de distribución intracelular de *M. brunneum* en su fisiología.

Palabras clave: Entomopatógenos, citoesqueleto, F-actina, polimerización, Lifeact, Latrunculina B.

Abstract of the thesis presented by **Abraham Asahel Gasca Venegas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Cellular and Molecular Microbiology.

**Role of the actin cytoskeleton in the cellular organization of the entomopathogenic fungus
*Metarhizium brunneum***

Abstract approved by:

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete
Thesis codirector

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Thesis codirector

Polarized growth is essential for the development of organisms, and it can be seen in the roots of plants, in the extension of neurons, and even on hyphae of filamentous fungi. Different protein complexes participate in this type of growth, one of them being the cytoskeleton, made up of microtubules, intermediate filaments, and actin microfilaments. The dynamics of the cytoskeleton components has been widely studied in fungi such as *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma atroviride*, among others, describing, for example, the participation of actin microfilaments in the transport and positioning of cargo elements (peroxisomes, mitochondria, vesicles, etc.) to the most active growth zones, as well as in the formation of septa, in the immunological response, endocytosis and exocytosis and in reproductive processes. However, in entomopathogenic fungi such as *Metarhizium*, little is known about the dynamics of the actin cytoskeleton during its development and its relationship with intracellular elements and its transport. In this work, the construction of a vector for the fluorescent labeling of actin in *M. brunneum* using the Lifeact-GFP reporter was carried out. The results showed the presence of actin patches distributed in the growing hyphae. The effect of the alteration of the actin cytoskeleton was also tested, using the Latrunculin B (Lat B), determining its minimum inhibitory concentration of 1.5 µg/ml, which causes alterations in the hyphae such as apical ramifications and an increase in thickness up to 23%. In addition, the dynamics of peroxisomes and lipid bodies were affected in the presence of Lat B, with a decrease in their displacement speed of 11% and 28% respectively, as well as alterations in the structure of the cell wall with irregular thickening and presence of chitin patches, as well as a decrease in the endocytosis rate and an increase in the sensitivity to Congo Red (RC) dye. All this information helps in understanding the role of the actin cytoskeleton and the intracellular distribution mechanisms of *M. brunneum* in its physiology.

Keywords: Entomopathogens, cytoskeleton, F-actin, Lifeact, polymerization, Latrunculin B

Dedicatoria

A mi familia, por todo su apoyo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (**CONAHCyT**) por la beca de posgrado otorgada para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (**CICESE**) y al Departamento de Microbiología Celular y Molecular por la formación profesional, así como por el uso del equipo necesario para el desarrollo de este trabajo.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (**LNMA**) por la prestación de servicio de microscopía óptica y el asesoramiento brindado para este trabajo.

Al proyecto **SEP-CONAHCyT No. 2016-01-28724** por financiar parte de este proyecto.

A mi comité de tesis integrado por el **Dr. Gilberto Curlango** y el **Dr. Salvador Villarreal** por sus valiosas aportaciones en la realización de este proyecto.

A mis asesoras, la **Dra. Rosa Mouriño** por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y rescatarme en varias ocasiones, y a la **Dra. Olga Callejas**, por haber estado siempre al pendiente de mi trabajo y personalmente, apoyándome en todo lo que necesité y haber creído en mí.

A mis compañeros de Laboratorio por todos los momentos, consejos y la ayuda que me dieron durante mi estancia: **Marisela, Diego, Nahum, Alejandro, Gabriela, Alejandra, Edwin, Alberto, Omar**.

A la **Universidad de Guanajuato** y al **LABGEMOL**, por apoyarme antes, durante y después de la realización de la maestría. En especial a la **Dra. Angélica González, Dr. Juan Carlos Torres, Dra. Patricia Cuellar, Dr. Felipe Padilla, Dr. Israel Padilla, Dra. Karla Cervantes, Chely, Are, Azul y Piña**.

A **Anita, Héctor del Valle y Basi**, por ayudarme a salir adelante cuando más lo necesite y hacer cambiar mi forma de pensar tanto en tan poco tiempo.

A **mis padres y hermanos**, por siempre brindarme su apoyo y estar al pendiente de que esté bien y haberme apoyado para poder concluir con esta etapa. Y también a **Bella y Mocca**, por sacarme todo estrés con tan solo jugar con ellas un poco.

A **Alfredo y Orlando**, por los momentos compartidos viviendo el mismo hogar, las risas, caminatas, comida, idas al mercado y por haberme cuidado cuando más lo necesite. Gracias por ser mi familia temporal.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 <i>Metarhizium</i> como alternativa a pesticidas químicos	2
1.1.2 El crecimiento polarizado y el citoesqueleto en hongos.....	4
1.1.3 Dinámica del citoesqueleto de actina	6
1.1.4 Ejemplos de alteraciones en el citoesqueleto y su efecto en hongos.	7
1.2 Justificación	9
1.3 Hipótesis.....	9
1.4 Objetivos	9
1.4.1 Objetivo general.....	9
1.4.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Metodología.....	11
2.1 Cepas	11
2.2 Vectores	11
2.3 Oligonucleótidos	12

2.4	Medios de cultivo	12
2.4.1	Medios y condiciones de cultivo para <i>M. brunneum</i>	12
2.4.2	Medios de cultivo y selección para <i>A. tumefaciens</i>	13
2.4.3	Medios y condiciones de crecimiento de <i>E. coli</i>	14
2.5	Protocolos de biología molecular.....	15
2.5.1	Extracción de ADN plasmídico.....	15
2.6	Transformación de células competentes	15
2.6.1	Protocolo de transformación de <i>E. coli</i>	15
2.6.2	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> por choque térmico	16
2.6.3	Transformación de conidios de <i>M. brunneum</i> , mediante <i>A. tumefaciens</i> (Agrotransformación)..	16
2.7	Construcción del vector para el marcaje fluorescente de F-actina de <i>M. brunneum</i> mediante el reportero Lifeact-GFP.....	17
2.7.1	Amplificación del casete <i>Lifeact-gfp</i>	17
2.7.2	Clonación del casete <i>Lifeact-gfp</i> en el vector de clonación pGEM-T (pOC011-AG04).....	18
2.8	Clonación y ligación del casete Lifeact-gfp al vector pAGICA113 (pOC12-AG05).....	18
2.9	Microscopía y análisis de imágenes	18
2.10	Ensayos con droga despolimerizadora de actina	19
2.11	Ensayos de sensibilidad a Rojo Congo (RC)	20
2.12	Ensayos de endocitosis.....	20
Capítulo 3.	Resultados	22
3.1	Construcción del vector pOC12-AG05 (pAGICA113+Lifeact-GFP).....	22
3.2	Transformación de <i>M. brunneum</i> mediante <i>A. tumefaciens</i>	24
3.3	Determinación de concentración mínima inhibitoria de la droga despolimerizadora de actina Lat B.....	27
3.4	Participación del citoesqueleto de actina en la distribución intracelular de diferentes elementos cargo.....	29

3.4.1	Dinámica de peroxisomas etiquetados con proteína verde fluorescente (KAT-GFP).....	29
3.4.2	Dinámica de cuerpos lipídicos.....	34
3.4.3	Dinámica de mitocondrias.....	38
3.5	Efecto de la alteración del citoesqueleto de actina en la pared celular de <i>M. brunneum</i>	39
3.5.1	Visualización del efecto de la alteración del citoesqueleto de actina en la estructura de la pared celular de <i>M. brunneum</i>	39
3.5.2	Sensibilidad de <i>M. brunneum</i> ante Rojo Congo.....	41
3.5.3	Efecto en la sensibilidad a Rojo Congo ante la alteración del citoesqueleto de actina por la acción de Lat B.....	43
3.6	Efecto de la alteración de citoesqueleto de actina en el proceso de endocitosis en <i>M. brunneum</i> ..	45
Capítulo 4. Discusión.....		47
4.1	Localización del citoesqueleto de actina en <i>Metarhizium</i>	47
4.2	Participación del citoesqueleto de actina en la distribución intracelular de <i>M. brunneum</i>	48
4.3	Relación del citoesqueleto de actina con la pared celular de <i>M. brunneum</i>	51
4.4	Participación del citoesqueleto de actina en la endocitosis en <i>M. brunneum</i>	52
Capítulo 5. Conclusiones		54
Literatura citada		55

Lista de figuras

Figura	Página
1. Representación esquemática del ciclo infectivo de <i>Metarhizium</i> sp., en insecto hospedero.	3
2. Relación simbiótica entre <i>Metarhizium</i> y plantas.....	4
3. Diferentes estructuras de acina en hongos modelo	7
4. Técnica de agar invertido	19
5. Características del vector PRM49-OC30 y amplificación del casete <i>Lifect-gfp</i>	22
6. Restricciones enzimáticas y clonaciones para la construcción del vector pOC012-AG05	23
7. Características del vector pAGICA113 y construcción final del vector pOC012-AG05.	23
8. Transformantes de <i>A. tumefaciens</i> (AGL1) con el vector pOC012-AG05 y comprobación de inserción del vector pOC012-AG05	24
9. Transformantes de <i>M. brunneum</i>	25
10. Imágenes confocales de la expresión de Lifect-GFP en <i>M. brunneum</i>	26
11. Determinación de concentración mínima inhibitoria de Lat B en <i>M. brunneum</i>	27
12. Efecto de Lat B sobre el desarrollo y crecimiento de las hifas de <i>M. brunneum</i>	28
13. Variación en el diámetro de hifas en <i>M. brunneum</i> en presencia de Lat B	29
14. Distribución de peroxisomas en cepa de <i>M. brunneum</i> KAT-eGFP.....	30
15. Desplazamiento de peroxisomas en hifas de la cepa KAT-GFP.....	31
16. Desplazamiento de peroxisomas en hifas de la cepa KAT-GFP en tratamiento con Lat B a 1.5 µg/mL	31
17. Descripción de movimiento de peroxisomas por su desplazamiento	32
18. Velocidad de desplazamiento de peroxisomas en la cepa KAT-GFP con tratamiento de Lat B	33
19. Gráfico del diámetro de peroxisomas en la cepa KAT-GFP.....	34
20. Tinción de cuerpos lipídicos en <i>M. brunneum</i> empleando el colorante BODIPY.....	35
21. Descripción de movimiento de cuerpos lipídicos por su desplazamiento	36
22. Desplazamiento de cuerpos lipídicos en hifas de <i>M. brunneum</i> teñidas con BODIPY.....	36

23. Desplazamiento de cuerpos lipídicos en hifas de <i>M. brunneum</i> tratadas con Lat B a 1.5 a $\mu\text{g}/\text{mL}$ y teñidas con BODIPY	37
24. Velocidad de desplazamiento de cuerpos lipídicos en <i>M. brunneum</i> con tratamiento de Lat B.	38
25. Dinámica de mitocondrias en <i>M. brunneum</i>	39
26. Visualización de la pared celular en <i>M. brunneum</i>	40
27. Ensayos de sensibilidad de <i>M. brunneum</i> al Rojo Congo.....	42
28. Respuesta de <i>M. brunneum</i> al colorante Rojo Congo en presencia de Lat B	43
29. Efecto del colorante Rojo Congo y Lat B en la pared celular de <i>M. brunneum</i>	44
30. Tasa comparativa de internalización del marcador endocítico FM4-64 en hifas maduras de <i>M. brunneum</i>	45
31. Presencia del Apical Vesicle Crescent (AVC) en <i>M. brunneum</i>	46
32. Análisis estadístico de endocitosis en <i>M. brunneum</i>	46

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Cepas utilizadas en los experimentos y la descripción de sus características	11
2. Vectores empleados en el desarrollo de este trabajo	11
3. Oligonucleótidos empleados para el desarrollo de los experimentos.....	12

Abreviaturas

Lat B	Latrunculina B
GFP	Green Fluorescent Protein (Proteína Verde Fluorescente)
KAT	3-cetoacil-CoA tiolasa
DIC	Differential Interference Contrast (Contraste de Interferencia Diferencial)
RC	Rojo Congo
FM4-64	Pyridinium, 4-[6-[4-(diethylamino)phenyl]-1,3,5-hexatrienyl]-1-[3-(triethylammonio) propyl]-, dibromide, N-(3-Triethylammoniopropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide
AVC	Apical Vesicle Crescent
SPK	Spitzenkörper

Capítulo 1. Introducción

La agricultura es una de las principales fuentes económicas en el mundo, la cual puede verse gravemente afectada por la invasión de plagas y como solución a esta problemática se ha recurrido desde hace décadas al uso de pesticidas químicos. Sin embargo, el uso excesivo de estos productos ha tenido graves consecuencias: daños ambientales, pérdida de fertilidad en los campos de cultivo, afectación de animales no objetivo como insectos polinizadores, aves y algunos mamíferos pequeños e incluso a la salud del ser humano con enfermedades neurodegenerativas, anemia y cáncer (Damalas y Eleftherohorinos, 2011).

Por estas razones, se ha buscado la implementación de métodos alternos a los productos químicos, donde el control biológico representa una de las soluciones más prometedoras. Los biopesticidas se componen de microorganismos como bacterias, virus u hongos, los cuales pueden ser utilizados individualmente o en mezclas (De la Cruz et al., 2019). Su importancia radica en que los microorganismos que componen a los biopesticidas son relativamente económicos, tienen especificidad por un solo tipo de plaga, no tienen efectos secundarios en el ambiente y son inocuos para el hombre (Egbuna et al., 2020).

Los hongos entomopatógenos han sido empleados en el control de insectos plaga, ya que naturalmente desempeñan un papel importante en el medio ambiente, al balancear poblaciones de insectos como escarabajos, polillas, mosquitos, entre otros, donde es importante resaltar que sus mecanismos de acción sobre las plagas raramente producen especies resistentes, en comparación con los pesticidas químicos (de la Cruz Quiroz et al., 2019). Dentro de los hongos entomopatógenos que se usan comercialmente en los biopesticidas se encuentra el género *Metarhizium*, el cual tiene la capacidad de infectar un amplio espectro de insectos plaga como escarabajos, polillas, langostas y saltamontes, e incluso algunos insectos de importancia médica como *Anopheles gambiae* (vector de la malaria) (Roberts y St. Leger, 2004). Además de su papel como entomopatógeno, en el género *Metarhizium* se ha visto que también posee la capacidad de asociarse con plantas al encontrarse en la rizosfera, proporcionando beneficios a estas en su crecimiento de raíces, tallos y hojas (Behie S. W et. al. 2012, Liao X., et al., 2014).

Durante las diferentes interacciones que establece *Metarhizium*, ya sea con insectos o con plantas, ocurren diferentes procesos de diferenciación y transporte intracelular, ya que estos son necesarios para enfrentar las diferentes barreras y defensas que puedan tener los miembros con los que establece sus interacciones. Es aquí donde el crecimiento polarizado es esencial, en el cual intervienen diferentes componentes celulares como el citoesqueleto (microtúbulos (Mts) filamentos de actina, spetinas y

filamentos intermedios que, junto a proteínas motoras como miosina, la dineína y la dinactina, proporcionando al hongo de una estructura dinámica que mantiene su forma y organización, además de realizar el transporte de componentes celulares como organelos y vesículas (Garvalov et al., 2006).

Actualmente se cuenta con poca información sobre la dinámica del citoesqueleto de actina en hongos entomopatógenos. En el presente trabajo se tiene el interés de determinar la participación del citoesqueleto de actina en el desarrollo y crecimiento del hongo *Metarhizium brunneum*, así como de las posibles interacciones que se pueden establecer con diferentes elementos cargo como peroxisomas, cuerpos lipídicos, mitocondrias y vesículas.

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Metarhizium* como alternativa a pesticidas químicos

El género *Metarhizium* abarca una gran variedad de hongos entomopatógenos, capaces de infectar y matar un amplio espectro de insectos, los cuales han sido utilizados como una alternativa ambientalmente amigable en comparación con los dañinos pesticidas químicos que se han utilizado tradicionalmente desde hace varias décadas (St Leger y Wang, 2020). Además, dada la capacidad de *Metarhizium* de encontrarse en diferentes nichos ecológicos, no solo como entomopatógeno, sino también como saprófito o colonizador de la rizosfera (St Leger y Wang, 2020), su rango de infección se vuelve ampliamente versátil.

Se a reportado casos de la aplicación de *Metarhizium* que han dado bueno resultados: en el control de la chicharrita en cultivos de caña de azúcar en Brasil mediante *M. anisopliae* (Iwanicki et al., 2019); en el control de la pulga de ganado *Rhipicephalus microplus* en México con varias especies de *Metarhizium* (Ángel-Sahagún et al., 2010); y hasta en el control de vector de la malaria *Anopheles coluzzi* con una cepa transgénica de *M. pingshaense* con mayor capacidad infectiva en África (Lovett et al., 2019)

Metarhizium, al igual que otros hongos utilizados como biopesticida, es comercializado en formulaciones, individuales o mezclas, las cuales se componen principalmente de las estructuras reproductivas e infectivas, las esporas o conidios (de la Cruz Quiroz et al., 2019). El proceso de infección de los hongos entomopatógenos, conservado entre diferentes especies, inicia con el establecimiento de un conidio sobre la cutícula del insecto, donde bajo condiciones apropiadas de humedad y oxígeno se diferencia en una

estructura adhesiva denominada apresorio, del cual emerge una hifa infectiva que penetra la cutícula del insecto utilizando diversos complejos enzimáticos, además de la presión mecánica (Clarkson y Charnley, 1996). La hifa infectiva penetra hasta llegar al hemocele para producir blastosporas que se dispersan por la hemolinfa del hospedero, donde posteriormente germinan y producen hifas que se agrupan y ramifican por todo el interior del insecto, que, junto con el agotamiento de nutrientes y la producción de toxinas, inducen la muerte del insecto. Por último, el micelio emerge atravesando la cutícula del cadáver del hospedero para producir conidios, que luego se dispersan para infectar otros insectos y continuar el ciclo de infección (**Figura 1**) (Clarkson y Charnley, 1996; Small y Bidochka, 2005; González-Hernández et al., 2020).

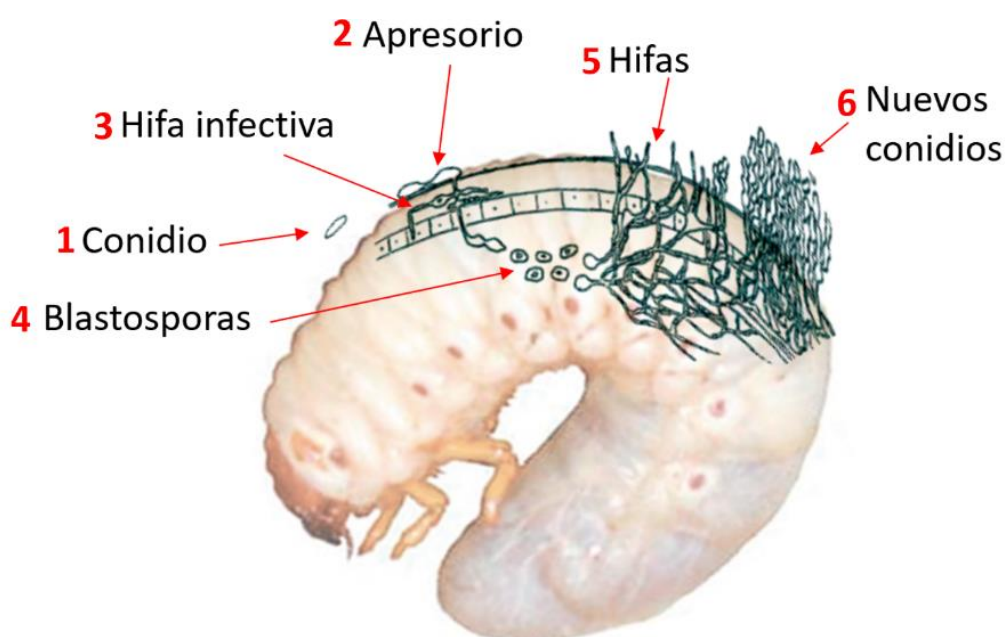


Figura 1. Representación esquemática del ciclo infeccioso de *Metarhizium* sp., en insecto hospedero. El ciclo de infección inicia con el establecimiento del conidio a la cutícula (1), para posteriormente diferenciarse en una estructura de adhesión denominada apresorio (2). Del apresorio emerge una hifa infectiva que penetra la cutícula del insecto (3). La hifa infectiva alcanza el hemocele para formar las blastosporas (4), las cuales colonizan el insecto por completo. Cuando el hospedero muere, las hifas (5) surgen del insecto para formar nuevos conidios (6) que podrán infectar a nuevos insectos. (Tomado y modificado de Small y Bidochka, 2005).

Si bien la actividad más conocida del género *Metarhizium* es su capacidad de actuar como controlador biológico, también se ha descrito la capacidad de este hongo para establecer asociaciones con plantas. Esto fue demostrado en *M. robertsii*, en donde se observó la capacidad de este hongo translocar nitrógeno marcado radioactivamente (N^{15}) previamente inyectado en insectos, a las raíces de plantas *Phaseolus vulgaris* y *Panicum virgatum*, que era posteriormente incorporado a los aminoácidos de las plantas, lo cual sugiere un potencial beneficio en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Behie et al., 2012; Liao et al.,

2014). De esta relación simbiótica con plantas, *Metarhizium* se ve beneficiado al obtener carbón fijado a través de la fotosíntesis (Behie et al., 2017), el cual es esencial para su desarrollo (**Figura 2**).

Actualmente se tienen algunos reportes en donde describen que la aplicación de *Metarhizium* beneficia a los cultivos, incluso en campos bajo condiciones de estrés, dando como resultado la producción plantas de maíz, de tomate y de soya más grandes, al igual que mayores rendimientos en la producción de cebollas (Maniania et al., 2003; Khan et al., 2012; González-Pérez et al., 2022).

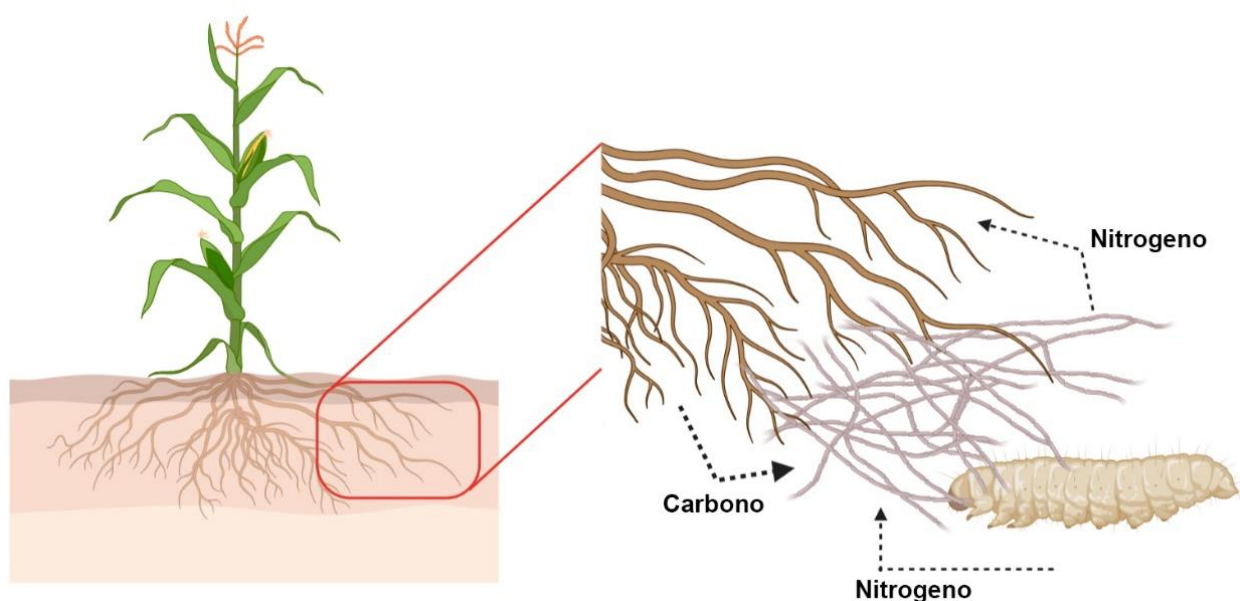


Figura 2. Relación simbiótica entre *Metarhizium* y plantas. El hongo entomopatógeno *Metarhizium* establece relaciones benéficas con las plantas, transfiriendo nitrógeno a partir de los insectos que infecta y consume. A su vez, las plantas transfieren carbono fijado a través de la fotosíntesis (modificado de Behie et al., 2017). Imagen creada en Biorender.com.

Todo lo anterior lleva a sugerir que, en la interacción que ocurre entre *Metarhizium*, insectos y plantas, la diferenciación del hongo y su crecimiento polarizado deben desempeñar un papel importante en la intercomunicación, transporte intracelular y de nutrientes entre los miembros de estas relaciones.

1.1.2 El crecimiento polarizado y el citoesqueleto en hongos

El crecimiento polarizado en hongos es un proceso esencial para su desarrollo y morfogénesis (Takeshita, 2016), ya que estos organismos crecen casi exclusivamente por la extensión polarizada de la punta de la

hifa (Xiang y Oakley, 2014). Este tipo de crecimiento es multifactorial, donde participan diferentes complejos proteicos, entre ellos el citoesqueleto, que es fundamental para el transporte intracelular continuo de organelos hacia la punta de la hifa. El citoesqueleto se compone por microtúbulos (Mts), filamentos intermedios, microfilamentos de actina, septinas y proteínas motoras, los cuales forman una estructura dinámica, capaz de formar distintas estructuras mediante interacciones entre sus diferentes componentes, extendiéndose a través de toda la célula sirviendo de unión entre la membrana plasmática y organelos. (Alberts et al., 2014; Lodish et al., 2007). En hongos, el citoesqueleto se caracteriza por ser altamente dinámico que participa en mantener la forma, organización y polaridad celular, además de brindar soporte a los componentes citoplasmáticos, controlar los movimientos de la célula y jugar un papel importante en el transporte intracelular de vesículas y organelos (Xiang y Oakley, 2014).

El citoesqueleto microtubular está compuesto por los microtúbulos, los cuales están formados por la unión de dímeros de las proteínas α -tubulina y β -tubulina que forman protofilamentos, los cuales se agrupan en arreglos de trece de ellos. Una característica destacable de los microtúbulos es que poseen polaridad, ya que los dímeros se adicionan en uniones cabeza con cola, dando lugar al extremo (+) en el que se encuentra un anillo de β -tubulina y la adición (polimerización) y separación (despolimerización) de los dímeros es más activa y rápida durante el crecimiento de los microtúbulos, mientras que en el otro extremo (-) se encuentra un anillo de α -tubulina y la polimerización y despolimerización de dímeros es más lenta. En los hongos filamentosos, el citoesqueleto microtubular participa en varios procesos celulares esenciales, como en la división celular, la distribución de los núcleos y en el transporte de organelos. Además, mediante las proteínas motoras como la dineína, los microtúbulos participan en el transporte a largas distancias de vesículas, organelos y partículas de RNA en el citoplasma (Xiang y Oakley, 2014).

Otro de los componentes del citoesqueleto es la actina, cuyo principal componente son filamentos de actina (F-actina) conformados por la forma globular de actina (G-actina) y la proteína motora miosina. La G-actina es un polipéptido de 375 aminoácidos que tiene unida una molécula de ATP o ADP. Cabe destacar que la actina es una de las proteínas más conservadas entre los eucariotas y que ligeras variaciones en su secuencia de aminoácidos producen diferencias funcionales. Al igual que los microtúbulos los filamentos de actina poseen polaridad, con extremos con diferencias estructurales importantes: un extremo (+) de crecimiento rápido y un extremo (-) de crecimiento lento (Alberts et al., 2014). El citoesqueleto de actina es esencial para el crecimiento polarizado en los hongos y participa en el transporte de membrana celular y componentes de la pared celular en las zonas de crecimiento de las puntas de las hifas y los septos. También en el posicionamiento de organelos como mitocondrias y aparato de Golgi (Suelmann y Fischer, 2000; Hubbard y Kaminskyj, 2008).

1.1.3 Dinámica del citoesqueleto de actina

La actina se organiza en diferentes estructuras en los hongos: parches de actina, que son acumulaciones de F-actina localizadas en la membrana plasmática, que juegan un papel importante en la invaginación de la membrana plasmática durante la endocitosis; cables de actina, haces de F-actina entrelazado por las proteínas tropomiosina y fimbrina que sirven como vías para el transporte de diferentes cargos como parches de actina, peroxisomas, mitocondrias, vacuolas y mRNA; y anillos de actina asociados a los septos, formados por actina y proteínas asociadas como la proteína Miosina II (Berepiki et al., 2011).

Todas estas estructuras han sido visualizadas a través de diferentes técnicas de microscopía confocal de fluorescencia, en donde uno de los reporteros que mejores resultados ha dado es Lifeact, el cual consta de un pequeño péptido de 17 aminoácidos (MGVADLIKKFESISKEE) proveniente de la proteína Abp140 de *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene fusionado en su extremo carboxilo la proteína GFP (siglas en inglés Proteína Verde Fluorescente). Este marcador tiene una gran afinidad por la F-actina, además de destacar por su capacidad de poder seguir las dinámicas de diferentes estructuras de actina *In vivo*, sin causar alteraciones o efectos tóxicos como otros colorantes como la faloidina (Riedl et al., 2008).

Gracias a este marcador, la dinámica y localización de diferentes estructuras de actina han sido descritas en hongos modelos como *N. crassa*, *A. nidulans* y *T. atroviride* (Berepiki et al., 2010; Delgado-Álvarez et al., 2010; Schultzhaus et al., 2016; Garduño-Rosales et al., 2022), en los cuales se han encontrado arreglos y estructuras similares (**Figura 3**), pero no todas las estructuras se encuentran por igual, posiblemente por aspectos de la fisiología de cada hongo, como su tasa de crecimiento, tamaño, nicho ecológico, etc.

Adicionalmente de los marcadores para visualizar la actina, también se han utilizado algunos compuestos químicos que causan alteraciones en el desarrollo normal del citoesqueleto de actina, al producir una afectación en el ciclo de polimerización de la actina. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran la citocalasina (aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*) y la Latrunculina (producida por la esponja marina *Latrunculina magnificans*), las cuales promueven la despolimerización de los filamentos de actina. (Lodish et al., 2007). El mecanismo de acción de la Citocalasina consiste en la alteración de la cinética de polimerización de los filamentos en ambos extremos, mientras que el de la Latrunculina (Lat) consiste en asociarse con los monómeros de actina (G-actina) previniendo así la repolimerización de los filamentos (Morton et al., 2000).

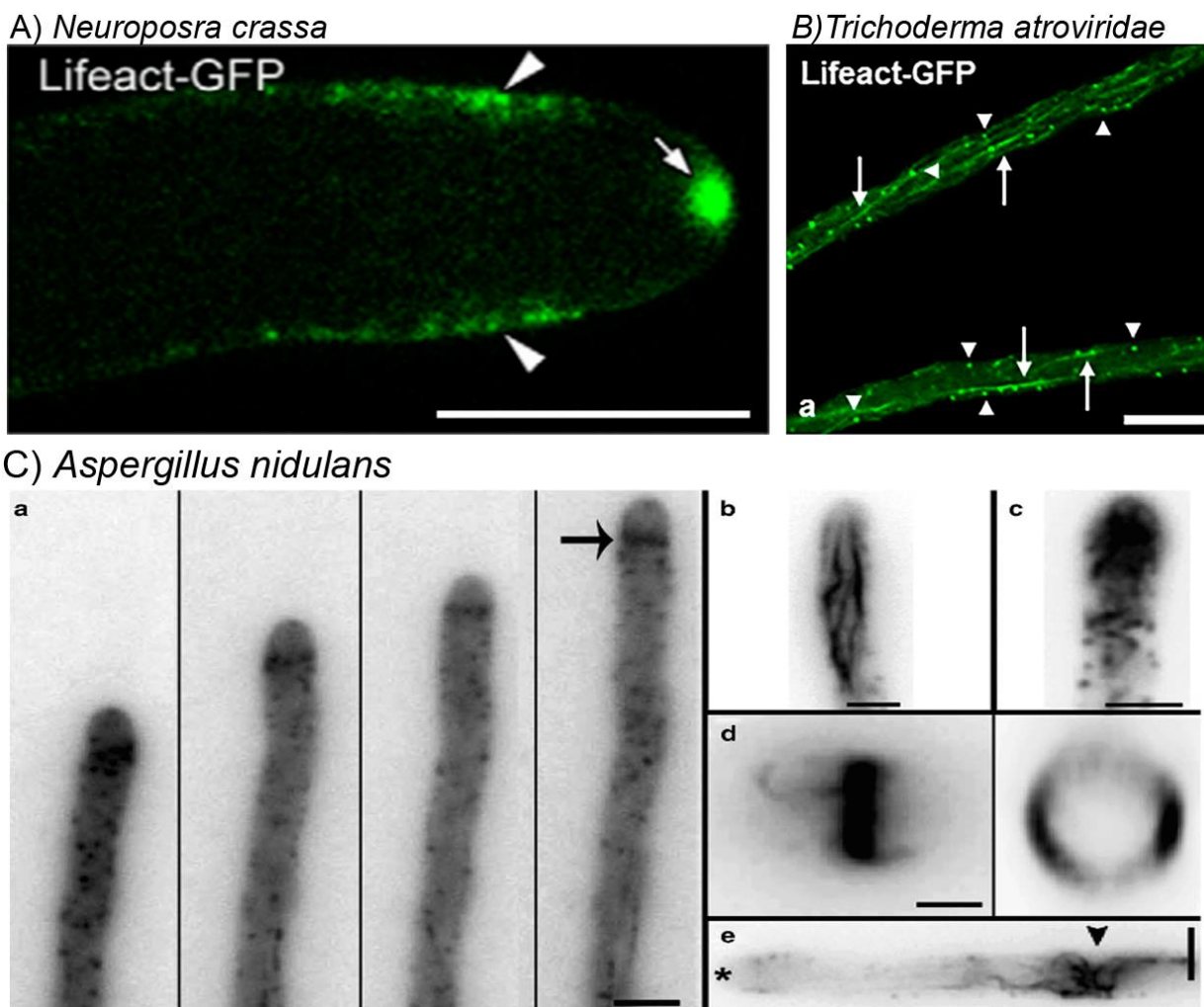


Figura 3. Diferentes estructuras de acina en hongos modelo. La dinámica y localización de la actina (F-actina) se ha descrito en hongos modelos, como: A) *N. crassa*, donde se ha reportado la acumulación de F-actina en la punta de la hifa en donde se encuentra el Sitzenkörper (flecha) y la presencia de parches de actina (triángulos); B) *T. atroviride* con filamento de actina (flechas), en los cuales se posicionan y transportan algunos parches de actina (triángulos); y C) *Aspergillus nidulans*, en donde los parches de actina dan lugar al collar subapical (flecha en a), e igualmente se pueden encontrar cables de actina (b) y la acumulación de F-actina en la parte apical de la hifa (c), así como en la formación de anillos en el septo (d) o en una red de cables de actina en una hifa en crecimiento. Barras de escala A) y B) =10 μm y C) = 2.5 μm . Tomado y modificado de: Berepiki et al., 2010; Delgado-Álvarez et al., 2010; Schultzhaus et al., 2016; Garduño-Rosales et al., 2022.

1.1.4 Ejemplos de alteraciones en el citoesqueleto y su efecto en hongos

Existen evidencias en algunos hongos filamentosos de que al afectar uno de los componentes del citoesqueleto se producen alteraciones en el desarrollo del hongo, así como en el transporte de elementos intracelulares. Por ejemplo, en el hongo *Neurospora crassa*, al afectar uno de los componentes del complejo dineína-dinactina se producen cambios en la morfología del hongo, observándose crecimiento ondulatorio de la hifa, alterando su morfología colonial con una mayor formación de vacuolas y una gran

acumulación de proteínas en esta región (Seiler et al., 1999). En otros estudios, también se ha observado que la interrupción de la función tanto de la dineína como de la dinactina causa alteraciones en la distribución de elementos cargo como núcleos y vesículas, además de observar desorganización estructural de los Mts (Callejas-Negrete et al., 2015; Mouriño-Pérez et al., 2017). Por otro lado, existen estudios en donde se ha alterado el citoesqueleto de actina, utilizando la droga despolimerizadora Latrunculina (Lat). En el caso de la levadura *S. cerevisiae*, al tratar las células levaduriformes con Lat A, estas pierden la polaridad durante el crecimiento, provocando un segundo sitio de polaridad lo que da como resultado la formación de hasta dos yemas en una sola levadura (Ayscough et al., 1997). En el caso de hongos filamentosos, como *N. crassa*, al ser tratado con Lat A se observó en hifas maduras un crecimiento distorsionado con puntas engrosadas, además de que la presencia de cables y parches de actina se ve afectada, así como en la distribución de algunos elementos cargo como núcleos (Ramos-García SL et al., 2009; Delgado-Álvarez DL et al., 2010). En el oomiceto patógeno de plantas *Phytophthora infestans*, al ser tratado con Lat B, sus hifas sufren un crecimiento aberrante, con la formación de ramificaciones apicales y el diámetro irregular de las hifas, además de que en altas concentraciones de esta droga las puntas de las hifas crecen en forma de balón, e incluso el posicionamiento de los núcleos es alterado, ya que la distancia entre los núcleos y la punta es disminuida (Ketelaar et al., 2012).

En el caso de hongos entomopatógenos, la descripción de la dinámica del citoesqueleto ha sido muy poca o nula. En este sentido, se ha descrito que la delección de la β -tubulina en *M. acridum* causa alteración en el crecimiento del hongo, distribución de núcleos, en la producción de conidios y su patogenicidad (Zhang et al., 2017). Por otro lado, Hernández Saiz (2022) pudo realizar el etiquetamiento de la β -tubulina en *M. brunneum*, y observó que *Metarhizium* forma pocos haces de microtúbulos arreglados longitudinalmente a lo largo de las hifas en crecimiento y al utilizar benomilo, droga despolimerizadora de Mts, ocurren alteraciones en la dinámica y distribución de algunos elementos cargo como peroxisomas, cuerpos lipídicos, vesículas y mitocondrias. Sin embargo, aún falta esclarecer el papel del citoesqueleto de actina en el desarrollo de *Metarhizium*, para de esta manera comprender más las interacciones y dinámica con elementos cargo intracelulares, con la finalidad de entender el papel y los mecanismos de distribución intracelular de *Metarhizium* en la fisiología, en su actividad biopesticida y como estimulador del crecimiento de plantas. Esto contribuirá a encontrar nuevas herramientas genéticas que conduzcan a un *Metarhizium* más eficiente para llevar a cabo estas funciones, que impactará en fomentar el incremento del uso de tecnología amable con el ambiente como biopesticida y mejorador del crecimiento de plantas, para disminuir con ambas actividades los costos de la producción agrícola relativos al control de plagas y fertilización de suelos.

1.2 Justificación

Metarhizium es un género de hongos ampliamente conocido por su papel como entomopatógeno, capaz de infectar a un amplio rango de insectos. Por otra parte, también se ha demostrado que este hongo forma interacciones con la rizosfera de las plantas beneficiando el crecimiento de estas. Mientras interactúa con insectos o plantas, el hongo debe desafiar barreras y compuestos tóxicos, que desencadenan eventos de diferenciación celular y transporte de orgánulos para lograr la homeostasis. En los hongos, la polaridad celular es un proceso esencial para su correcto crecimiento y morfogénesis, siendo el citoesqueleto uno de los elementos importantes para estas funciones.

Debido a que solo se tiene información de la participación del citoesqueleto microtubular en la patogenicidad y transporte intracelular en el género *Metarhizium*, en este trabajo se tiene el interés de estudiar otro elemento del citoesqueleto, como es la actina, con el fin de conocer su asociación con diferentes elementos cargo (peroxisomas, cuerpos lipídicos, mitocondrias y vesículas), y así entender de manera integral el papel y los mecanismos de distribución intracelular en *M. brunneum* en la fisiología, en su actividad biopesticida y como estimulador del crecimiento de plantas.

1.3 Hipótesis

La correcta organización del citoesqueleto de actina en *M. brunneum* es importante para el desarrollo morfológico del hongo. La alteración en la formación del citoesqueleto de actina afecta el posicionamiento, transporte y distribución de diferentes elementos cargo (peroxisomas, cuerpos lipídicos, mitocondrias y vesículas), la formación de la pared celular y funciones como la endocitosis.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Describir la dinámica del citoesqueleto de actina en relación con la organización intracelular en el hongo entomopatógeno *M. brunneum*.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1.- Construcción de un vector de expresión para el marcaje de actina en el hongo *M. brunneum*.
- 2.- Describir el efecto de alteraciones en el citoesqueleto de actina en el crecimiento polarizado del hongo entomopatógeno *M. brunneum*.
- 3.- Determinar la asociación que existe entre la actina y la dinámica de los peroxisomas, cuerpos lipídicos, mitocondrias y otros elementos cargados como vesículas.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cepas

Para el desarrollo del proyecto se utilizaron las siguientes cepas fúngicas y bacterianas:

Tabla 1. Cepas utilizadas en los experimentos y la descripción de sus características

Organismo	Cepa	Características
<i>M. brunneum</i>	CARO19	Aislado silvestre obtenido del Centro Nacional de Referencia, Colima, México.
<i>M. brunneum</i> -KAT-eGFP	Transformante de CARO19	Cepa transformante de <i>M. brunneum</i> (CARO19) que contiene una proteína de membrana de peroxisomas (3-cetoacil-CoA tiolasa (KAT)), etiquetada con la proteína verde fluorescente (eGFP). Donada por la Universidad de Guanajuato.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AGL1	Necesaria para la transformación de las cepas de <i>Metarhizium</i> por agrotransformación.
<i>Escherichia coli</i>	JM109	recA1 endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-,mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqlqZΔM15.

2.2 Vectores

Los vectores utilizados para realizar la transformación de *M. brunneum* y las diferentes construcciones realizadas en este trabajo se enlistan en la continuación:

Tabla 2. Vectores empleados en el desarrollo de este trabajo

Nombre	Características
pAGICA113	Vector binario para <i>Agrobacterium</i> . Promotor TrpC controlando al gen de resistencia a nourseotricina, promotor TEF para subclonar bajo su control ORFs de interés dentro de los bordes izquierdo y derecho T-DNA.
PRM49-OC30	Vector que contiene el fragmento Lifeact-GFP bajo el promotor <i>cgg-1</i> de <i>N. crassa</i> , el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) como marcador de selección y los extremos 3' y 5' para la recombinación homóloga en el sitio de histidina de <i>N. crassa</i> .
pOC011 - AG04	Vector pGEM-T easy que contiene el fragmento Lifeact-GFP flanqueado por los sitios de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Spe</i> I.
pOC012.- AG05	Vector construido mediante la clonación en el vector pAGICA113 del fragmento Lifeact-GFP de 792 pb en los sitios de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Spe</i> I.

2.3 Oligonucleótidos

La lista de los diferentes oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestra a continuación:

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para el desarrollo de los experimentos

Nombre	Secuencia	Tamaño (pb)	Utilizados para:
Lifeact-BamHI	5'GGATCCATGGGTGTCGCAGATT TGATCAAGAA3'	29	Amplificación del fragmento correspondiente a <i>Lifeact</i> y el ORF del gen de la proteína eGFP (792 pb).
eGFP-SpeI-R	5'GGACTAGTTTACTTGTACAGCT CGTCCATGC 3'	31	

2.4 Medios de cultivo

2.4.1 Medios y condiciones de cultivo para *M. brunneum*

Medio Mínimo (MM). Se utilizó medio mínimo descrito por Bartnicki-Garcia y Nickerson (1962), que contiene por cada litro: 20 g de glucosa, 3 g de KH_2PO_4 , 1.8 g de (NH_4NO_3) , y 20 mL de concentrado de sales 50X (MgSO_4 2.5 %, ZnSO_4 0.009 %, FeSO_4 0.005 %, MnSO_4 0.001 % y CuSO_4 0.002 %), el cual fue esterilizado por autoclave a 120 °C por 15 minutos. En el caso del medio sólido, se adicionaron 20 g de agar bacteriano (Bioxon) por litro de medio.

Medio M-100. Para preparar un litro de este medio se añadieron 10 g de dextrosa, 3 g de nitrato de potasio (KNO_3), 62.5 ml de M-100 salt solution (16 g de KH_2PO_4 , 4 g de Na_2SO_4 , 8 g de KCl , 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g CaCl_2 , 8 ml de M-100 Trace Element Solution por litro de agua destilada) y 15 g de agar bacteriano (Bioxon). Para 500 ml de M-100 Trace Element Solution se añadieron 30 mg de H_3BO_3 , 70 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 200 mg de ZnCl_2 , 20 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada.

Medio Dextrosa Sabouraud. Este medio contiene por litro: 40 g de dextrosa, 10 g de peptona y en caso de que el medio fuera solido se añadieron 15 g de agar bacteriano (Bioxon). Se esterilizó por autoclave a 120 °C por 15 minutos

Medio Mínimo de Vogel Agar al 1.5 % (MMV 1.5 %). Este medio contiene por litro 20 mL de Sales Vogel 50X (citrato de sodio 15 %, fosfato de potasio monobásico 2.5 %, nitrato de amonio 10 % y sulfato de magnesio anhidro 1 %), 7.5 g de sacarosa y 15 g de agar bacteriano (Bioxon), aforando a 1 L. Se esterilizó por autoclave a 120 °C por 15 minutos.

Medio papa dextrosa Agar (PDA). Se utilizó la mezcla preparada (DB Difco), disolviendo 39 g de esta y se aforando a 1 L. El medio se esterilizó por autoclave a 120 °C por 15 minutos.

Condiciones de crecimiento. Para la esporulación de *M. brunneum*, se inocularon 1000 conidios por caja Petri en medio MM y se incubaron a 28 °C de 6 a 10 días.

2.4.2 Medios de cultivo y selección para *A. tumefaciens*

Medio YPS. Para un litro de este medio se adicionaron 1 g de extracto de levadura (Bioxon), 10 g de peptona de caseína (Bioxon), 0.5 g de sacarosa y 0.05 g de MgSO₄ 7H₂O y el pH se ajustó a 7.0. Cuando se requería medio sólido se añadieron 15 g de agar bacteriológico (Bioxon).

Medio de inducción líquido (IMAS). Para preparar 100 ml de este medio, se adicionaron 0.18 g de dextrosa, 0.5 mL de glicerol, 40 mL de solución 2.5X (3.625 g de KH₂PO₄, 5.123 g de K₂HPO₄, 0.375 g de NaCl, 1.250 g de MgSO₄ 7H₂O, 0.165 g de CaCl₂ 2H₂O, 0.0062 g de FeSO₄ 7H₂O, 1.250 g de (NH₄)₂SO₄ en 1 litro de agua destilada) y se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Después de esterilizar por autoclave, se añadieron 4 mL de MES 1M y 2 mL de acetosiringona 10mM.

La solución 1M MES se preparó disolviendo 19.52 g de MES en 80 mL de agua destilada, el pH fue ajustado a 5.3 con KOH 5M, se esterilizó y se dividió en alícuotas de 10 mL. Las alícuotas se almacenaron a -20°C. La acetosiringona fue preparada disolviendo 0.01962 g en 90 mL de agua estéril, el pH se ajustó a 8 con KOH 5M, se esterilizó por filtración con filtro Millipore de 0.45 µm, y se dividió en alícuotas de 10 mL que fueron almacenadas a -20°C.

Medio de inducción sólido (IMAS). Se adicionaron 0.09 g de dextrosa, 0.5 ml de glicerol, 40 ml de solución 2.5X, 1.5 % de agar bacteriológico (Bioxon) y se aforó a 94 mL con agua destilada. Luego de esterilizar por autoclave, se añadieron 4 mL de MES 1M y 2 ml de acetosiringona.

Medio de selección (M-100 NAT/Cm). El medio selectivo se preparó de igual manera que el medio M-100. Después de esterilizar y habiendo atemperado el medio, se adicionó el antibiótico nourseotricina (NAT) en una concentración de 350 µg/mL y cloranfenicol 200 µg/mL.

Medio de selección (M-100 NAT/Cm) agar suave. El medio selectivo se preparó de igual manera que el medio M-100, pero la concentración de agar bacteriológico fue menor (0.8 %). Después de esterilizar y habiendo atemperado el medio, se adicionó nourseotricina (NAT) en una concentración de 350 µg/mL y cloranfenicol 200 µg/mL.

Condiciones de crecimiento. El medio utilizado para el crecimiento de *A. tumefaciens* fue YPS. La selección de clonas por resistencia al antibiótico kanamicina. Se adicionó al medio kanamicina (50 µg/mL). Los cultivos en medio sólido se incubaron a 28 °C durante 48-72 h. Los cultivos en medio líquido se realizaron en medio YPS líquido con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 28 °C por 48 h en un agitador orbital a 200 r.p.m.

2.4.3 Medios y condiciones de crecimiento de *E. coli*

Medio Luria-Bertani (LB). Este medio contiene por litro: 10 g de Bacto-Triptona, 5 g extracto de levadura (BIOXON) y 10 g de cloruro de sodio. En el caso del medio sólido se adicionaron 20 g de agar bacteriano (Bioxon) por litro de medio. Finalmente, la preparación se esterilizó en autoclave.

Medio LB-X-Gal-IPTG. Para la transformación en *E. coli* por el método descrito por Sambrook y Russell (2001), se utilizó este medio para la identificación de clonas recombinantes; cada litro de medio LB fue suplementado con IPTG (100 mM) y 2.5 mL de X-Gal 2 % en formamida (SIGMA).

Condiciones de crecimiento. El medio utilizado para el crecimiento de *E. coli* fue Luria-Bertani (LB). La selección de clonas por resistencia a antibiótico. Se adicionó al medio ampicilina (100 µg/mL) o kanamicina (50 µg/mL). Los cultivos en medio sólido se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Los cultivos de bacterias para la obtención de plásmidos se realizaron en medio LB líquido con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37 °C toda la noche en un agitador orbital a 150 r.p.m.

2.5 Protocolos de biología molecular

2.5.1 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó siguiendo protocolos estándar de Sambrook y Russell (2001). A partir de células de *E. coli* transformadas con el plásmido de interés, se prepararon tubos de cultivo con 3 mL de medio LB-Ampicilina (o el antibiótico que fuera necesario). Con un palillo se tomó cada una de las colonias a analizar y se inoculó al medio contenido en un tubo. Los tubos fueron puestos en agitación a 120 rpm y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Después del tiempo de incubación, cada cultivo fue recolectado en un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó por 1 min a 20800 *xg*, desechando el sobrenadante y repitiendo el procedimiento hasta que se recuperaron por completo todas las células del cultivo. La pastilla celular fue resuspendida en 100 µL de solución P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) agitando en Vortex. En seguida, se adicionaron 150 µL de solución P2 (NaOH 0.2N, SDS 1 % (p/v)), mezclando suavemente por inversión para luego incubar por 5 minutos en hielo. Al microtubo se adicionaron 200 µL solución P3 (acetato de potasio 3M) y nuevamente se mezcló por inversión.

El microtubo fue incubado por 10 minutos en hielo y se centrifugó durante 15 minutos a 20800 *xg*. El sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo, se añadieron 2 µL de RNAsa (100 mg/mL) y se incubó por 5 minutos. Después, se añadieron 800 µL de etanol absoluto, mezclando por inversión y dejando incubar a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 20800 *xg*, el sobrenadante fue desechado para en seguida lavar la pastilla con 500 µL de etanol al 70 % y se centrifugó el tubo nuevamente por 5 minutos a 20800 *xg*. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el ADN plasmídico obtenido en 80 µL de TE 1/10, almacenándolo a -20 °C hasta su uso.

2.6 Transformación de células competentes

2.6.1 Protocolo de transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* fue realizada por choque térmico siguiendo el protocolo estándar descrito por Sambrook y Russell (2001), empleando el plásmido adecuado para cada experimento. En un microtubo de 1.5 mL estéril se añadieron 50 µL de células químicamente competentes de *E. coli* y 5 µL de ADN (100 µg),

mezclando suavemente e incubando posteriormente por 20 minutos en hielo. Después, se incubó por 2 minutos a 42 °C, seguido de una incubación en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 950 µL de medio LB al microtubo con células competentes y se incubó por 1 hora a 37 °C. En seguida se centrifugó por 1 minuto a 20,800 xg , se descartaron 900 µL del sobrenadante y la pastilla se resuspendió en los 100 µL restantes, que fueron espatulados posteriormente con un asa de vidrio en una caja de Petri con medio LB-Amp (o el antibiótico pertinente). La caja Petri fue incubada toda la noche a 37 °C para la selección de transformantes.

2.6.2 Transformación de *A. tumefaciens* por choque térmico

La transformación de células de *A. tumefaciens* se hizo siguiendo el protocolo de Covert et al. (2001) con algunas modificaciones. A 100 µL de células de *A. tumefaciens* químicamente competentes se les adicionaron 5 µL de plásmido (100-1000 ng). Se incubó en hielo durante 30 min y luego se dio un choque térmico en nitrógeno líquido por 2 min. Después se incubó a 37°C por 5 min. Se adicionaron 1 mL de medio YPS y se incubó por 3 horas a 28°C con agitación de 200 rpm. La suspensión fue centrifugada a 6800 xg por 10 min a 4°C. Por último, se sembraron 50 µl de células en placas YPS suplementadas con carbenicilina 50 µg/mL y kanamicina 50 µg/mL. La placa se incubó por 48 h a 28°C o hasta ver la aparición de colonias blancas.

2.6.3 Transformación de conidios de *M. brunneum*, mediante *A. tumefaciens* (Agrotransformación)

Una colonia de *Agrobacterium* AGLH1, transformada con el plásmido de interés se creció en 5 ml de medio líquido YPS con carbenicilina 50 µL/mL y kanamicina 50 µL/mL en un matraz de 125 mL y se incubó por 16 horas a 28°C. Luego de la incubación, 1.5 mL de cultivo fueron descartados y se añadió 15.3 mL de solución IMAS, 800 µL de MES 1 M y 400 µL de acetosiringona 10 mM. En seguida se incubó por 5 horas más. Por otro lado, se preparó una solución de 5×10^5 conidios/ml, que fue centrifugada a 6800 xg por 5 minutos, descartando el sobrenadante. La pastilla que se formó fue suspendida con 1 mL del cultivo de células de *Agrobacterium* (después de la inducción con la solución IMAS), mezclando con Vortex por unos segundos.

En una caja de Petri con medio IMAS sólido se colocó un filtro de papel negro de 6 µm (Thomas Scientific) y se dispersaron 100 µL de la mezcla de conidios y células de *Agrobacterium*. La caja Petri fue incubada

por 48 h a 28°C en total oscuridad. Después de las 48 horas, el filtro fue removido y colocado en otra caja Petri que contenía medio selectivo M-100 con 300 µL/mL de cloranfenicol y 350 µL/mL de NAT (nourseotricina) y se incubó 24 h a 28°C. Al pasar las 24 horas, se vació una ligera capa de medio de selección M-100, pero en esta ocasión con una concentración de agar más baja (8 %). Nuevamente se incubó a 28°C hasta la aparición de colonias sobre la superficie del medio (de 5 a 15 días) (Covert et al., 2001). Las posibles colonias transformantes fueron transferidas en tres ocasiones a medio de selección M-100 con cloranfenicol y NAT, para asegurar la estabilidad de las transformantes.

2.7 Construcción del vector para el marcaje fluorescente de F-actina de *M. brunneum* mediante el reportero Lifeact-GFP

Para realizar el etiquetado de la F-actina en *M. brunneum*, se utilizó el reportero Lifeact, un péptido de 17 aminoácidos (proveniente de la proteína Abp140 de *S. cerevisiae*), el cual tiene fusionada la proteína verde fluorescente GFP (por sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein). Al unirse este repórter a la F-actina, emite fluorescencia y permite hacer la localización celular de los diferentes arreglos de actina en células vivas.

2.7.1 Amplificación del casete *Lifeact-gfp*

Se llevó a cabo la amplificación del fragmento *Lifeact-gfp*, utilizando como molde el vector PRM49-OC30, un vector de expresión para *N. crassa* que contiene la secuencia *Lifeact-gfp*. En un microtubo de 200 µL se colocaron 0.5 µL (200 ng) del plásmido PRM49-OC30, 5 µL de 10X LA PCR Buffer II (libre de Mg²⁺), 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 4 µL de mezcla dNTPs 2.5 mM, 2.5 µL de oligo LifeAct BamHI a 10 mM, 2.5 µL de oligo eGFP SpeI 10 mM, 0.25 µL (1.25 U) de polimerasa TaKaRa LA Taq y agua grado HPLC para completar un volumen final de 50 µL. La mezcla se sometió a reacción de amplificación en un termociclador C1000 Touch (Biorad) de la siguiente manera: 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, y por último 1 ciclo de 72 °C por 7 minutos.

El producto de PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 V durante 45 min. Posteriormente la banda fue purificada utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.7.2 Clonación del casete *Lifeact-gfp* en el vector de clonación pGEM-T (pOC011-AG04)

El cassette *Lifeact-gfp* previamente amplificado, fue clonado en el vector pGEM-T utilizando el kit pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA). El fragmento quedó flanqueado por los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Spe*I. Para la mezcla de reacción se tomaron 3 µL del producto de PCR (*Lifeact-gfp*) y se adicionó 1 µL del vector pGEM-T Easy, 1 µL de T4 DNA Ligase (Promega) y 5 µL de regulador de rápida ligación 2x. La mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* usando 2 µL del producto de ligación. La construcción final se le denominó como pOC011-AG04.

2.8 Clonación y ligación del casete *Lifeact-gfp* al vector pAGICA113 (pOC12-AG05)

Se realizó una digestión enzimática, usando las endonucleasas *Bam*HI y *Spe*I, incubándose por 2 horas a 37 °C para liberar el cassette *Lifeact-gfp* del plásmido pOC11-AG04 y linealizar al vector de expresión pAGICA113. Posteriormente, solo al vector pAGICA113 fue tratado con 1 µL fosfatasa alcalina de intestino bovino (Promega) y se incubó por 1 hora más a 37 °C. Luego de la incubación, tanto el casete *Lifeact-gfp* como el vector pAGICA113 previamente digeridos fueron recuperados en un gel de agarosa al 1 % y purificados por el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN®). Posteriormente estos se sometieron a ligación mediante el kit Quick Ligation M2200 (New England Biolabs), colocando en diferentes proporciones (1:3 y 1:5) de vector más cassette en nuevos microtubos y se les adicionó 10 µL del regulador Quick Ligase Reaction Buffer (2X), 1 µL de Quick Ligase y finalmente agua grado HPLC estéril para un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. Enseguida, se llevó a cabo la transformación a células competentes de *E. coli* con 5 µL de la ligación.

2.9 Microscopía y análisis de imágenes

Las observaciones de las cepas etiquetadas con GFP, se realizaron por microscopía confocal de barrido láser, mediante el equipo Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan), usando la técnica de agar invertido, metodología empleada para la observación y manipulación de muestras **Figura 4** (Hickey et al.,

2004). Las imágenes y videos fueron tomados utilizando dos canales simultáneamente: uno de luz fluorescente usando el láser de argón/2 con filtros eGFP (excitación a 488 nm; emisión a 520 nm) y otro de luz transmitida para obtener imágenes en contraste de interferencia diferencial (DIC), por sus siglas en inglés Differential Interference Contrast. Se utilizó el objetivo 60X Plan-Apocromático de inmersión en aceite (1.42 A.N.).

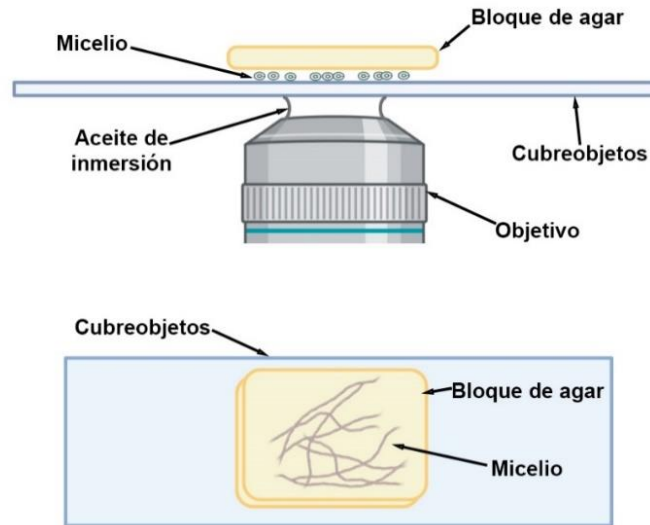


Figura 4. Técnica de agar invertido. Consiste en cortar un fragmento del medio sólido con micelio crecido, colocándolo de manera invertida sobre un cubreobjetos. Modificada de Hickey et al., 2004. Imagen creada con Biorender.com.

Se tomaron imágenes y videos de la expresión individual de Lifeact-GFP y de KAT-eGFP (proteína de membrana de los peroxisomas). Adicionalmente se analizaron imágenes y videos de cepas teñidas con fluoróforos de interés: BODIPY (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (colorante de cuerpos lipídicos) empleando el filtro de excitación 488 nm y emisión a 510 nm; FM4-64 (7 μM) (tiñe membranas) utilizando el filtro Texas Red (excitación 543 nm y emisión 591 nm); Calcofluor White al 0.01% (tiñe la pared celular) utilizando el filtro DAPI (excitación 358 nm y emisión 461 nm); y Mitotracker green (30 μM) para observar mitocondrias (excitación 488 nm; emisión 510 nm).

2.10 Ensayos con droga despolimerizadora de actina

Para establecer la asociación del citoesqueleto de actina con diferentes elementos cargo como peroxisomas, cuerpos lipídicos, mitocondrias y vesículas, se utilizó la droga despolimerizadora de actina Lat B. A partir de una solución stock de Lat B (Sigma Aldrich) 1 mg/mL, se prepararon diferentes

concentraciones de esta droga, las cuales fueron utilizadas para determinar la concentración que inhibiera en un 50% la tasa de crecimiento del hongo. Posteriormente, 1000 esporas de *M. brunneum* (CARO19) fueron expuestas en Medio Mínimo de Vogel (MMV) a las siguientes concentraciones de Lat B: 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y como control MMV sin Lat B. Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C hasta por 14 días. El experimento se realizó por triplicado, haciendo mediciones del diámetro de las colonias a los 3, 5, 7 y 14 días de incubación.

Una vez establecida la concentración mínima inhibitoria, la cepa etiquetada con GFP (KAT-eGFP) fue expuesta a dicha concentración, así como hifas de *M. brunneum* teñidas con diferentes colorantes vitales. Las observaciones se realizaron por microscopía confocal y se llevaron a cabo antes y durante la exposición a Lat B.

2.11 Ensayos de sensibilidad a Rojo Congo (RC)

El Rojo Congo (RC) es un agente que induce alteraciones en la integridad de la pared celular, con la finalidad de determinar la tolerancia *M. brunneum* hacia este colorante, se probaron diferentes concentraciones. Se prepararon placas con medio sólido PDA con concentraciones de RC de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en las que se inocularon 1×10^6 esporas de *M. brunneum*. Las placas se incubaron a 28 °C durante 14 días y se hicieron mediciones del crecimiento radial a los 5, 8, 11 y 14 días. Como control se usó *M. brunneum* crecido en medio PDA. El experimento se realizó por triplicado. Como control se usó *M. brunneum* crecido en medio PDA. Una vez determinada la concentración de RC a la cual *M. brunneum* tiene la mayor tolerancia, esta concentración se utilizó para determinar la sensibilidad de la pared al ser despolimerizada la actina con Lat B. Se prepararon placas de medio sólido PDA que contenían RC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) más Lat B (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y como controles PDA con RC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y sólo PDA. En cada placa se sembraron 1×10^6 esporas de *M. brunneum* y se realizaron mediciones del crecimiento radial a los mismos tiempos del experimento anterior. El experimento también se hizo por triplicado.

2.12 Ensayos de endocitosis

Los ensayos de endocitosis se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Echaurren-Espinosa et al. (2012). De un cultivo de *M. brunneum* crecido en MMV y MMV-Lat B durante 24 h a 30 °C, se cortó un bloque de agar que contenía micelio y se montó en un cubreobjetos mediante la técnica de agar invertido, se dejó

incubar a temperatura ambiente durante 15 min para su recuperación. Una vez colocado el cubreobjetos con la muestra en el microscopio confocal de barrido Olympus, se observó el micelio y posteriormente se aplicó 20 μ l de FM4-64 a 7.5 μ M en el borde del bloque para facilitar la difusión del líquido. Se tomaron imágenes inmediatamente de la inyección del FM4-64 así como a diferentes tiempos (3, 6 y 9 min) para evaluar la internalización del FM4-64 por las hifas.

Los análisis y cuantificación de intensidad de fluorescencia fueron realizados por el programa FIJI, el cual es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health (Collins, 2007).

2.13 Medición de los movimientos de peroxisomas y cuerpos lipídicos

Para determinar los movimientos de los peroxisomas y cuerpos lipídicos, se analizaron videos (obtenidos por microscopía confocal) de 7 a 8 hifas independientes de ~50 μ m de longitud mediante el software FIJI (ImageJ ver. 1.53), junto con la aplicación de MTrackJ. En los videos se cuantificó el tamaño, la direccionalidad y velocidad de desplazamiento de las particulares fluorescentes en presencia y ausencia de Lat B.

2.14 Análisis estadístico

Los diferentes análisis estadísticos, así como la elaboración de las diferentes gráficas se llevaron a cabo en el programa estadístico Graphpad Prism (ver. 9).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Construcción del vector pOC012-AG05 (pAGICA113+Lifeact-GFP)

Para la construcción del vector para el marcaje fluorescente (GFP) de la F-actina, se utilizó el reportero Lifeact. Para esto, se realizó una reacción de amplificación (PCR) usando como cadena patrón el vector pRM49-OC30; vector de expresión para *N. crassa* que contiene la fusión de *Lifeact* y el gen *gfp* (Figura 5A). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción fueron Lifeact-BamHI-F y eGFP-SpeI-R como se describe en materiales y métodos. El producto de la reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y como se muestra en la Figura 5B, se obtuvo una banda de amplificación del tamaño esperado de aproximadamente 792 pb correspondiente al cassette *Lifeact-gfp*. Posteriormente *Lifeact-gfp* fue purificado y clonado en el vector de almacenamiento pGEM T-easy, al cual se le denominó pOC011-AG04.

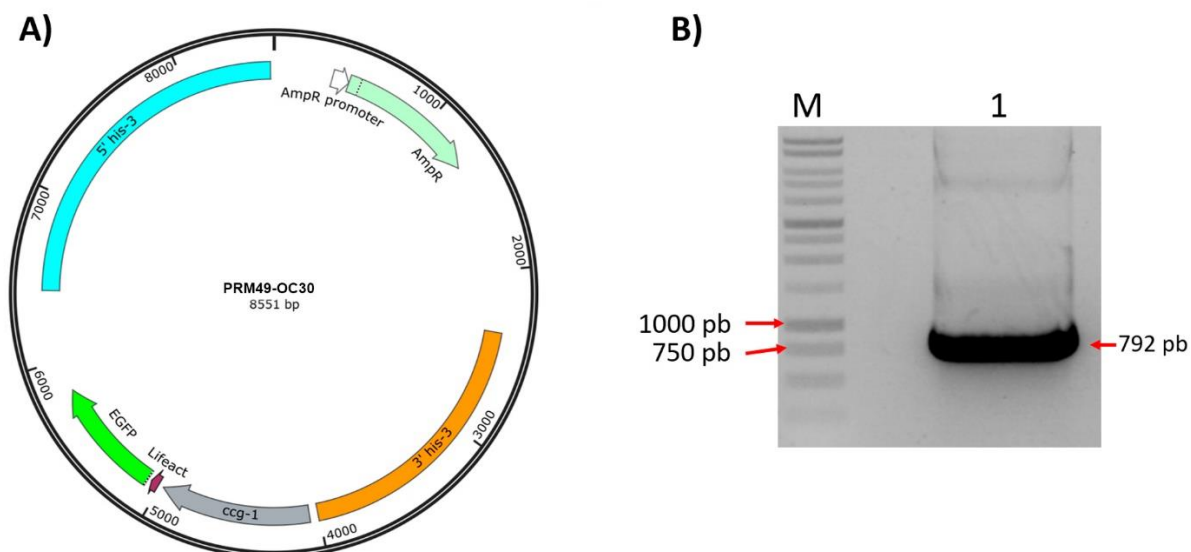


Figura 5. Características del vector PRM49-OC30 y amplificación del casete *Lifeact-gfp*. **A)** Representación esquemática del vector PRM49-OC30 que contiene el casete *Lifeact-gfp* bajo el control del promotor *ccg-1* de *N. crassa*. Además, este vector contiene el gen de resistencia a Ampicilina (Amp^R) como marcador de selección y los extremos 3' y 5' truncados del locus *his-3*, utilizados para recombinación homóloga en el sitio de histidina en *N. crassa*. **B)** Gel de agarosa que muestra la amplificación del casete *Lifeact-gfp* de 792 pb (Carril 1). M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Posteriormente el cassette *Lifeact-gfp* fue clonado al vector binario pAGICA113 (vector de expresión para *M. brunneum*), el cual se realizó por restricción enzimática con las endonucleasas *Bam*HI y *Spe*I (Figura 6A) y posterior ligación como se describe en el apartado de materiales y métodos. El producto de la ligación

fue utilizado para transformar en la cepa *E. coli* JM109, y a partir de 3 colonias transformantes, se realizó extracción del plásmido y una posterior comprobación de la integración del inserto (*Lifeact-gfp*) al vector pAGICA113 mediante restricción, usando la misma combinación de endonucleasas (**Figura 6B**).

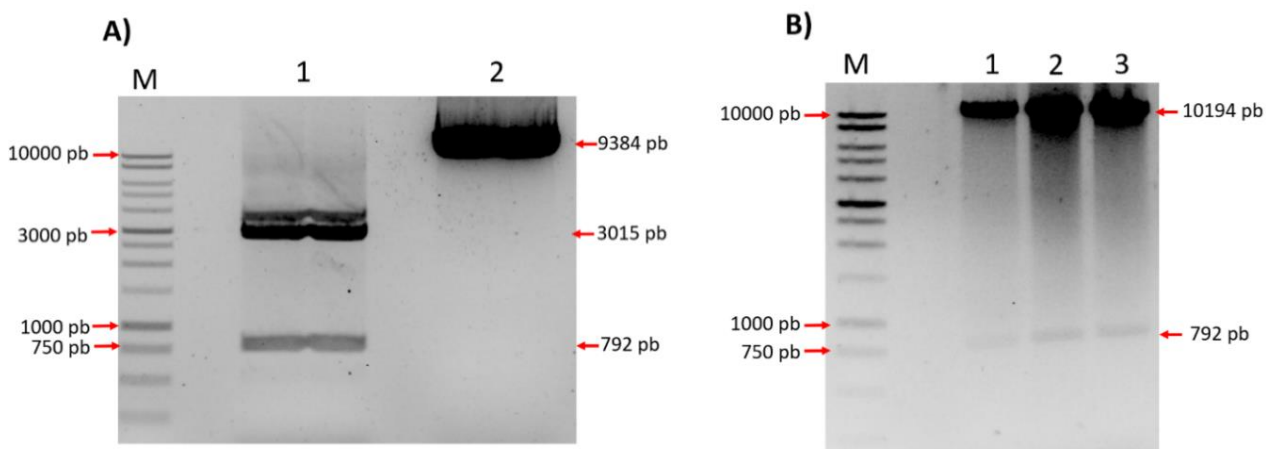


Figura 6. Restricciones enzimáticas y clonaciones para la construcción del vector pOC012-AG05. En **A)** se muestra en el carril 1 la doble digestión con vector pOC011-AG04 con las endonucleasas *Bam*HI y *Spe*I que liberan al fragmento *Lifeact-gfp* de 792 pb del vector pGEM-T esay de 3015 pb. En el carril 2 se muestra el vector pAGICA113 de 9384 pb linealizado con las mismas endonucleasas. **B)** digestión enzimática a partir de tres clonas que portaban el vector pOC012-AG05 (carril 1, 2 y 3) muestran la liberación del casete *Lifeact-gfp* (792 pb) del vector pAGICA113 (9402 pb). **M:** marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.

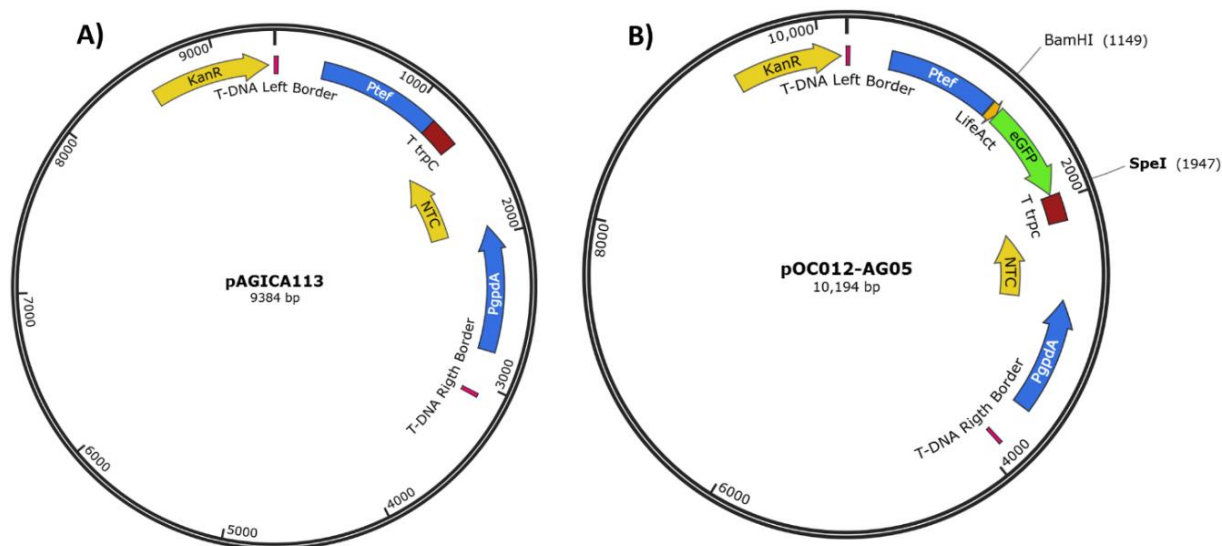


Figura 7. Características del vector pAGICA113 y construcción final del vector pOC012-AG05. **A)** Representación esquemática del vector binario pAGICA113, que contiene como marcador de selección el gen de resistencia al antibiótico nourseotricina (NTC) bajo el control del promotor pGpda y el terminador (*trpC*) de *A. nidulans* y el gen *nptII* que da resistencia a *A. tumefaciens* contra el antibiótico kanamicina (KanR). Además, el vector contiene los extremos T izquierdo y derecho necesarios para la transferencia de DNA por conjugación de *A. tumefaciens* a *Metarhizium*. **B)** Muestra la construcción pOC012-AG05 en la que el fragmento *Lifeact-gfp* fue clonado en los sitios *Bam*HI y *Spe*I, quedando bajo el control del promotor fuerte constitutivo del factor de elongación *tef1* de *M. brunneum* y el terminador *trpC* de *A. nidulans*.

El cassette *Lifeact-gfp* quedó flanqueado con el promotor *tef1* de *Metarhizium* y con el terminador *trpC* de *A. nidulans* del vector pAGICA113 (**Figura 7A**) que tiene como marcador de selección para *M. brunneum* el gen de resistencia a nourseotricina (NTC), dando como resultado final el vector pOC012-AG05 (**Figura 7B**).

3.2 Transformación de *M. brunneum* mediante *A. tumefaciens*

Una vez construido el vector pOC012-AG05 se realizó la transformación en conidios de *M. brunneum* (CARO19) mediante *A. tumefaciens*. Para esto, primero fue necesario hacer la transformación por choque térmico de células competentes AGL1 de *A. tumefaciens* como se describe en materiales métodos. Las colonias transformantes fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico kanamicina que le proporciona el vector pOC012-AG05 (**Figura 8A**). Además, se hizo comprobación de la introducción del vector deseado mediante extracción de ADN plasmídico y amplificación (PCR) del fragmento *Lifeact-gfp*, dando como resultado una banda de amplificación del tamaño esperado de 792 pb (**Figura 8B**).

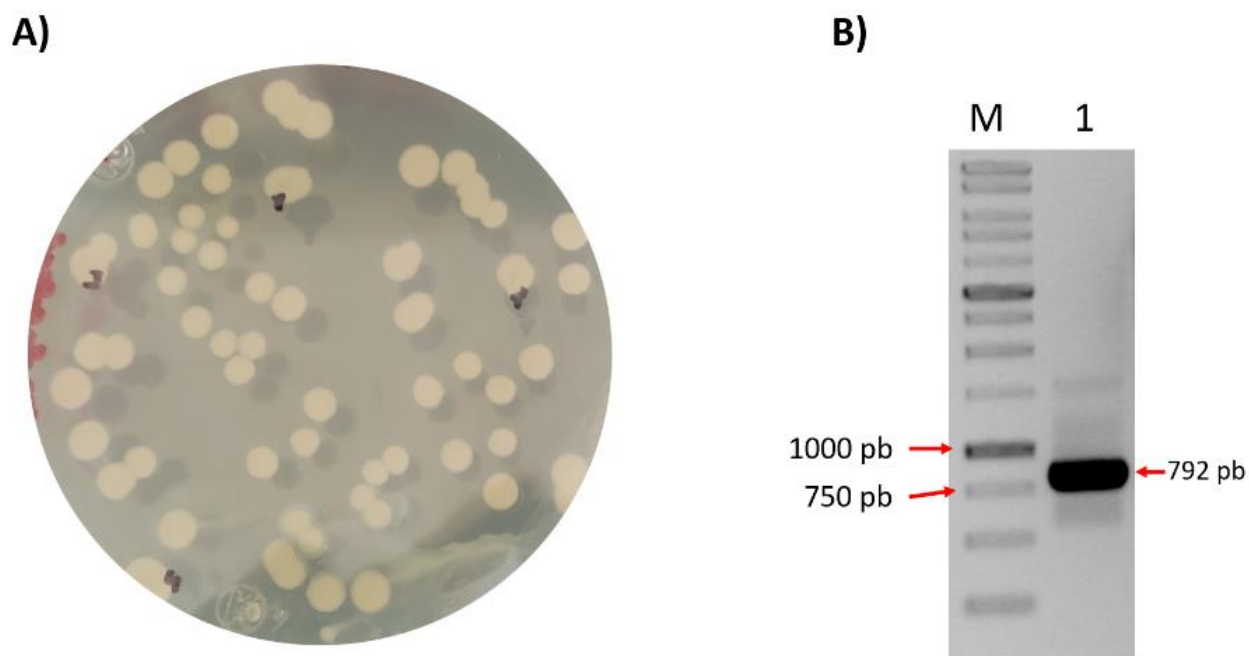


Figura 8. Transformantes de *A. tumefaciens* (AGL1) con el vector pOC012-AG05 y comprobación de inserción del vector pOC012-AG05 en *A. tumefaciens*. En **A)** se aprecian colonias transformantes de *A. tumefaciens* que fueron seleccionadas por su crecimiento en medio selectivo con kanamicina. **B)** Gel de agarosa al 1% que muestra en el carril 1 la amplificación del fragmento *Lifeact-gfp* (792 pb) usando como cadena molde ADN plasmídico extraído de una transformante de *A. tumefaciens* que contenía el vector pOC012-AG05. **M:** marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder

Las transformantes de *A. tumefaciens* que portaban el vector pOC012-AG05, fueron utilizadas para la transformación de conidios *M. brunneum*. Después de 14 días de incubación, fue posible observar la formación de colonias transformantes capaces de crecer en medio selectivo con nourseotricina (**Figura 9A**). Todas las colonias fueron transferidas en tres ocasiones a medio selectivo para asegurar la estabilidad de las transformantes. Por último, se realizó un muestreo de las colonias aisladas para observar la fluorescencia mediante un microscopio de epifluorescencia (NIKON OPTIPHOT) con el filtro GFP HYQ (excitación a 488 nm y emisión 520 nm), y en algunas de estas colonias fue posible observar fluorescencia en sus hifas (**Figura 9B**). Del evento de transformación se seleccionaron 6 transformantes que presentaron fluorescencia.

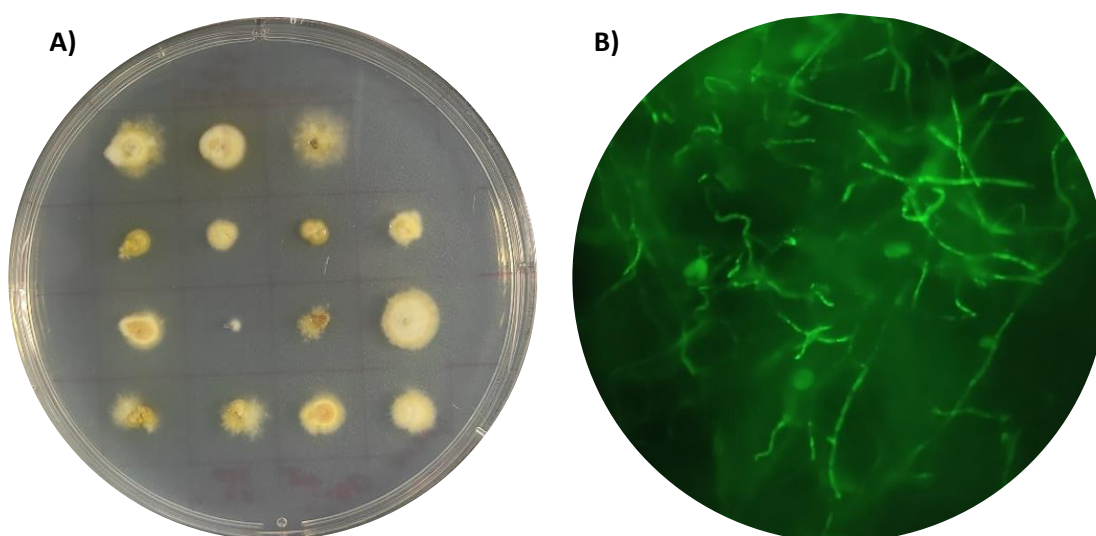


Figura 9. Transformantes de *M. brunneum*. **A)** Las transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a la nourseotricina. Las colonias que lograban crecer eran transferidas a nuevo medio selectivo para asegurar su estabilidad. **B)** Al hacer observación con microscopía de epifluorescencia se pudo apreciar expresión de la fluorescencia en las hifas de las transformantes, asegurando así también su transformación.

Mediante microscopía confocal de barrido láser se analizó la fluorescencia de las cepas transformantes en diferentes estadios. En conidios (**Figura 10A**) se apreció una acumulación de F-actina mayormente en los extremos, mientras que en germínulas (**Figura 10B**) se observa la formación de pequeños cúmulos circulares, posibles parches, distribuidos en diferentes áreas. Por otro lado, en hifas maduras (**Figura 10C**) también fue posible observar la formación de posibles parches de actina distribuidos longitudinalmente en la hifa. Sin embargo, no fue posible observar otros tipos de estructuras de actina como filamentos, cables o anillos en ninguno de los diferentes estadios. Tampoco se pudo observar la localización de la actina en la punta de la hifa, en una posible formación de Spitzenkörper (SPK) como ha sido reportada en otros hongos.

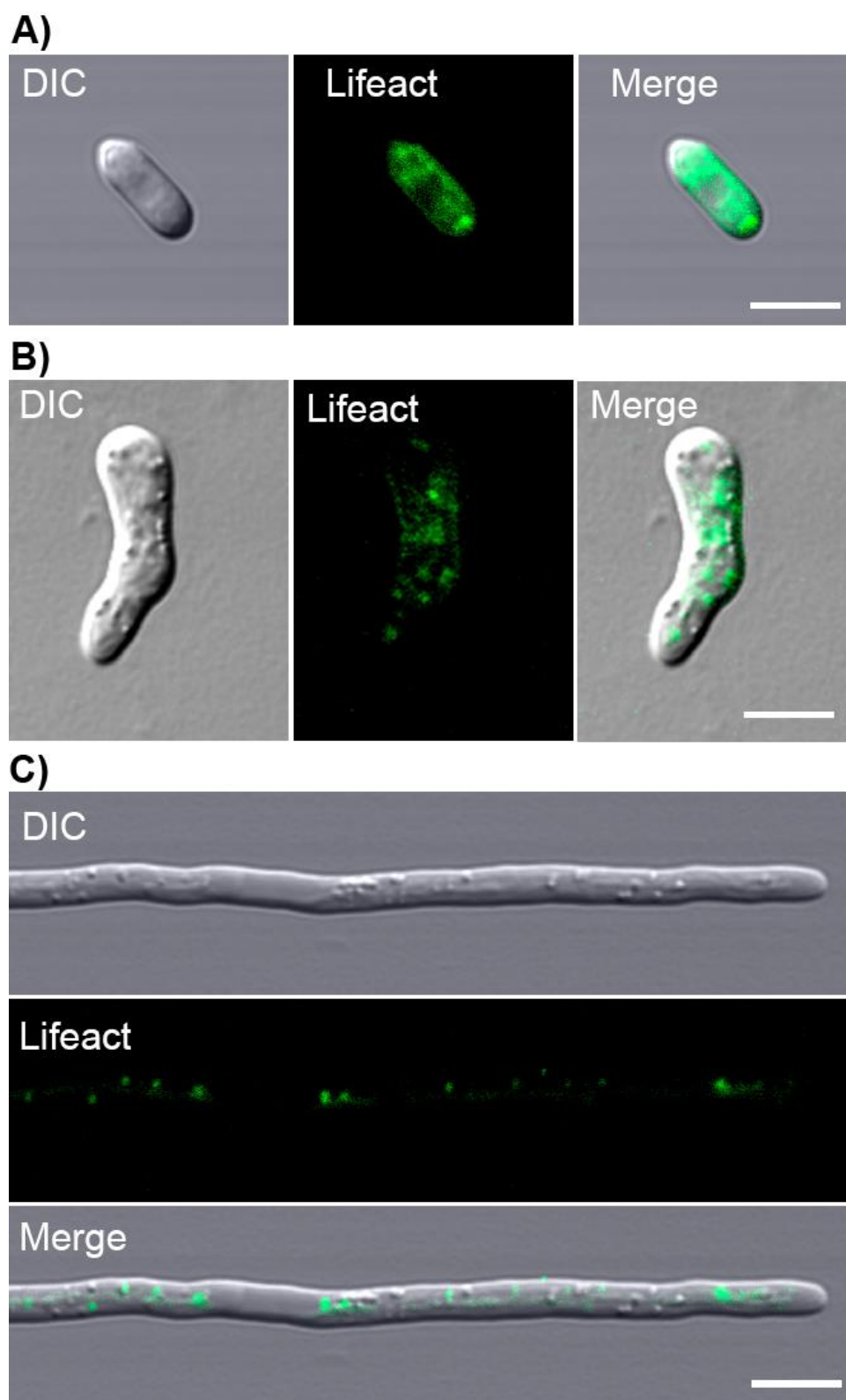


Figura 10. Imágenes confocales de la expresión de Lifact-GFP en *M. brunneum*. **A)** La actina etiquetada con Lifact-GFP se ve distribuida en todo el conidio con una mayor acumulación en los extremos **B)** En la germinula, la actina se ve como pequeños parches circulares distribuidos a lo largo de esta estructura. **C)** En hifa madura, la actina etiquetada también se encuentra en parches circulares de mayor tamaño, distribuidos longitudinalmente por toda la hifa. Barras de escala = 5 μm .

3.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria de la droga despolimerizadora de actina Lat B

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el efecto de alterar el citoesqueleto de actina sobre el crecimiento polarizado en *M. brunneum*. Para lo anterior se utilizó la droga despolimerizadora de actina Lat B para ver el efecto en el desarrollo y organización intracelular del hongo. En primer lugar, se buscó la concentración necesaria de Lat B para inhibir el crecimiento de este hongo en un 50%. Se probaron tres concentraciones: 0.5, 1.0 y 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como se describe en materiales y métodos. En la **Figura 11A** se observa que, a los 14 días de incubación existe una disminución en la tasa de crecimiento de *M. brunneum* conforme fue aumentando la dosis de Lat B, observándose más evidente a la concentración de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además, la evaluación cuantitativa nos indicó que con esta concentración se disminuye aproximadamente un 46.7 % la tasa de crecimiento del hongo en comparación con la cepa crecida sin esta droga (Control) (**Figura 11B**).

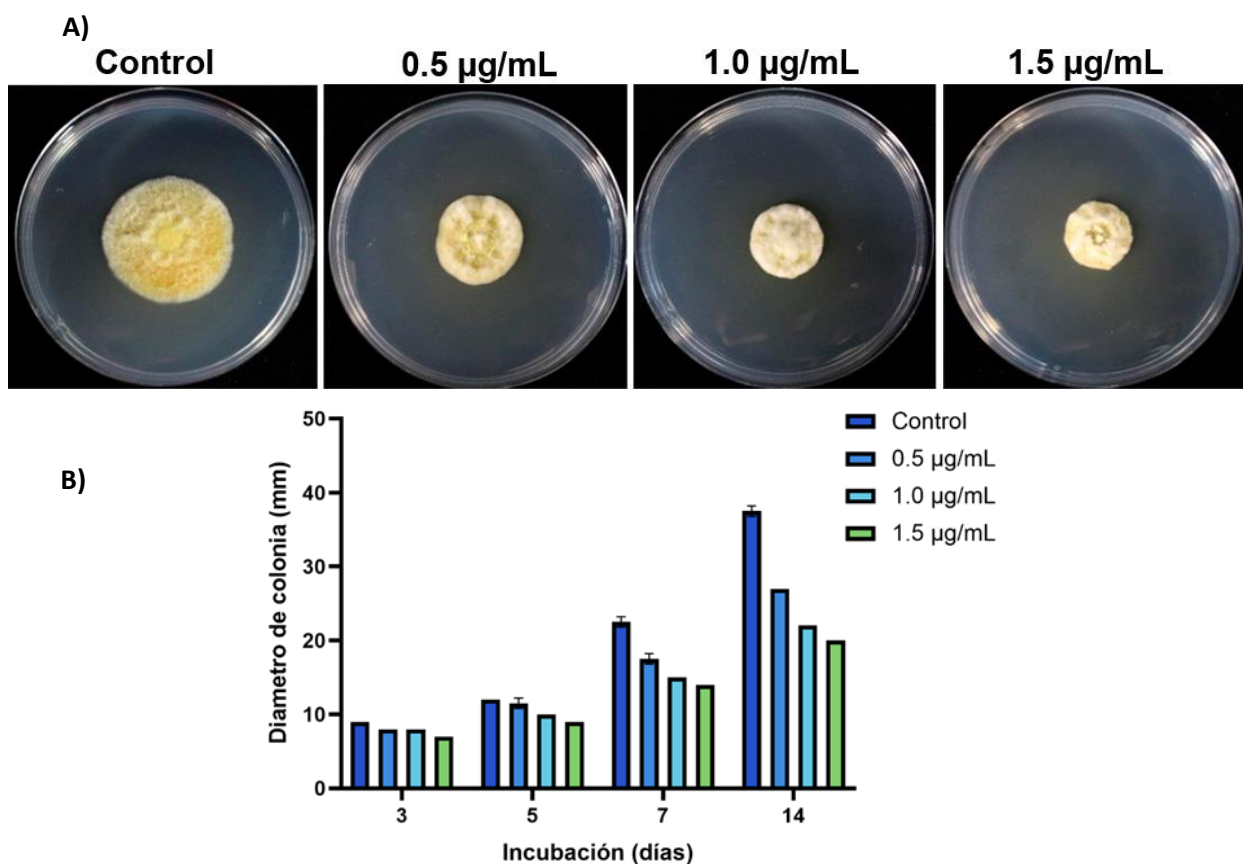


Figura 11. Determinación de concentración mínima inhibitoria de Lat B en *M. brunneum*. **A)** Morfología colonial de *M. brunneum* (CARO19) cultivado en MMV 1.5% a diferentes concentraciones de Lat B (0.5, 1.0, y 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las imágenes se tomaron con una cámara fotográfica CANON EOS REBEL T6, a los catorce días de incubación a 28°C. **B)** Gráfico correspondiente a la tasa de crecimiento de las colonias a los 3, 5, 7 y 14 días de incubación y los datos sugieren que la concentración que inhibe el crecimiento hifal aproximadamente al 50% fue de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Por otro lado, al hacer observaciones por microscopía DIC (Siglas en inglés para Contraste de Interferencia Diferencial), se determinó que a la concentración 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produce alteración en la morfología de las hifas, con la formación de ramificaciones apicales (**Figura 12**), las cuales no son común en *Metarhizium*. Con esto en cuenta, la concentración de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Lat B fue seleccionada para los experimentos posteriores.

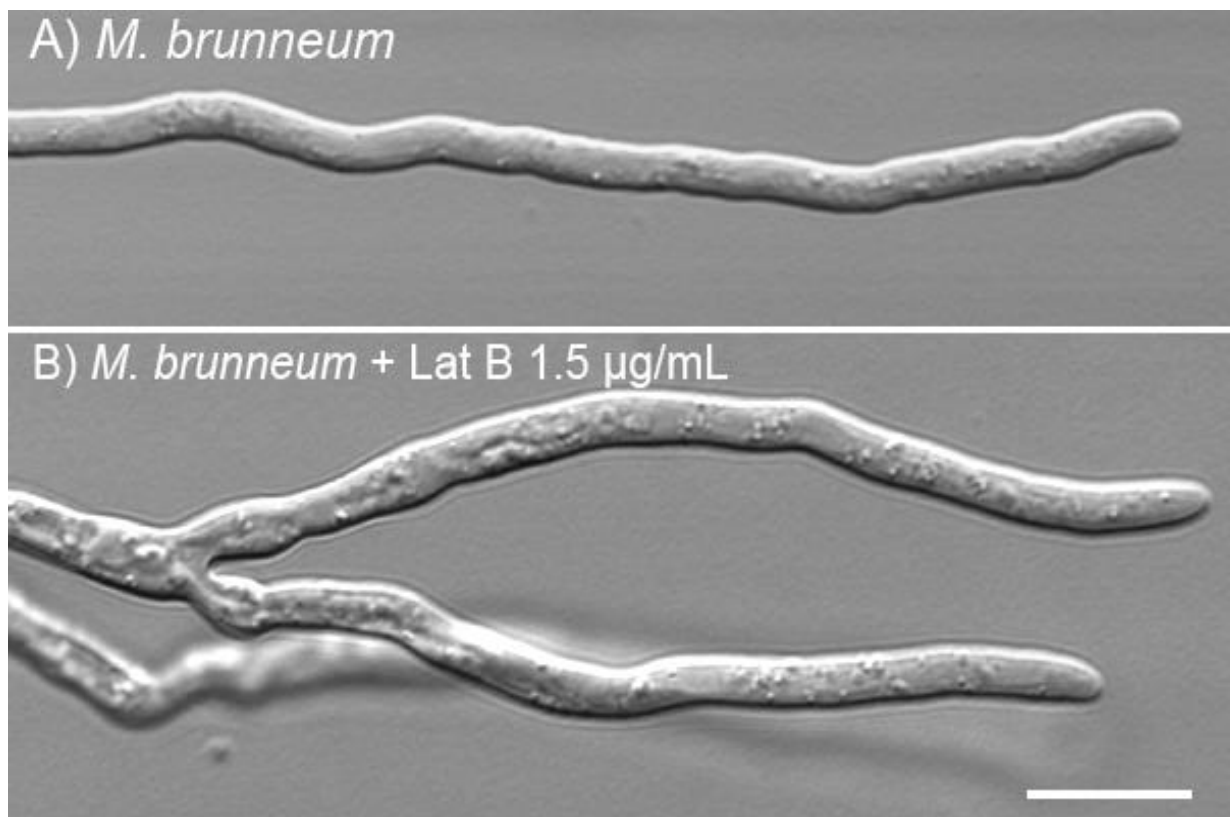


Figura 12. Efecto de Lat B sobre el desarrollo y crecimiento de las hifas de *M. brunneum*. Mediante microscopía DIC (Contraste de Interferencia Diferencial) se observaron hifas de *M. brunneum*, que en condiciones favorables (**A**) presentan una forma cilíndrica, larga y delgada, mientras que al ser expuestas a Lat B en concentración de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**B**) produce la formación de ramificaciones apicales, donde las nuevas surgen de las puntas en vez de los laterales, como es común en *Metarhizium*. Barra de escala = 10 μm .

Otro efecto notable en las observaciones microscópicas fue el engrosamiento de las hifas cuando *M. brunneum* era expuesto a Lat B, por lo cual se hicieron mediciones de los diámetros de 7 hifas tratadas con Lat B 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 7 hifas sin Lat B como control. Mediante el comparativo de los dos tratamientos (**Figura 13**) se pudo comprobar la diferencia en el diámetro de las hifas, siendo mayor en el tratamiento con Lat B, con un diámetro promedio de 3.04 μm mientras que en el tratamiento control sin Lat B el promedio fue de 2.36 μm , lo que representa una diferencia del 23%.

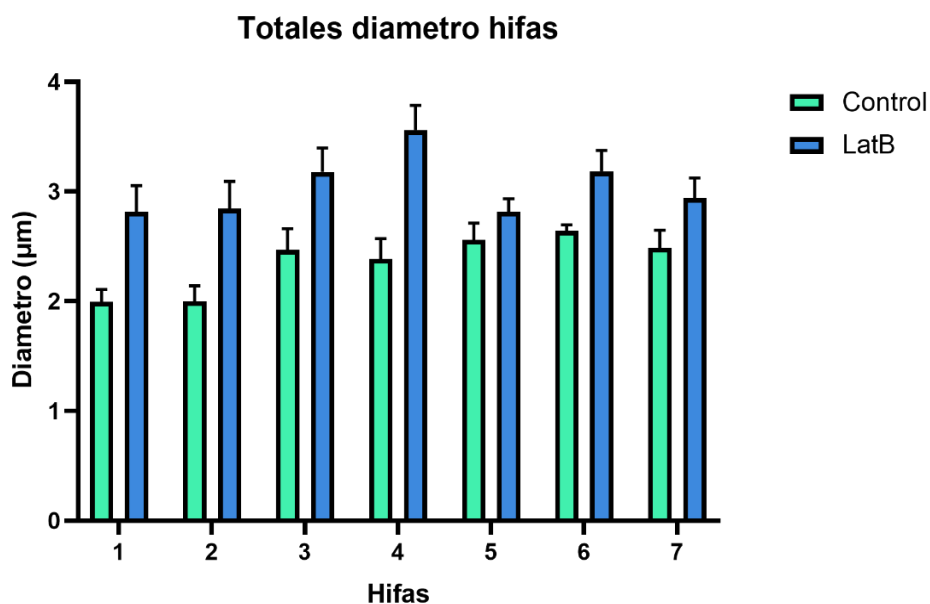


Figura 13. Variación en el diámetro de hifas en *M. brunneum* en presencia de Lat B. Las hifas expuestas a Lat B 1.5 µg/mL mostraron un aumento en el diámetro de las hifas en comparación a las hifas crecidas sin este compuesto.

3.4 Participación del citoesqueleto de actina en la distribución intracelular de diferentes elementos cargo

3.4.1 Dinámica de peroxisomas etiquetados con proteína verde fluorescente (KAT-GFP)

Se ha descrito en organismos como plantas, levaduras y hongos filamentosos que los peroxisomas son organelos que tienen un papel esencial en el metabolismo de lípidos, además de participar en la desintoxicación celular. Para realizar estas funciones, los peroxisomas requieren ser transportados y posicionados por el citoesqueleto de actina y microtubular (Neuhaus et al., 2016; Salogiannis et al., 2016; Lin y Steinberg, 2017). Con la finalidad de visualizar el efecto que pudiera causar la desorganización del citoesqueleto de actina en los peroxisomas, la cepa KAT-eGFP de *M. brunneum* se expuso a la droga despolimerizadora de actina Lat B a la concentración previamente determinada (1.5 µg/mL). Al hacer observaciones por microscopía confocal de la cepa KAT-eGFP sin tratamiento con la droga, se pudo ver que los peroxisomas tienen forma de grandes partículas fluorescentes de forma esférica distribuidas a lo largo de la hifa, desde la región distal hasta la región apical, además de que algunas de estas partículas fluorescentes tienen movimiento en distintas direcciones y velocidades (**Figura 14**).

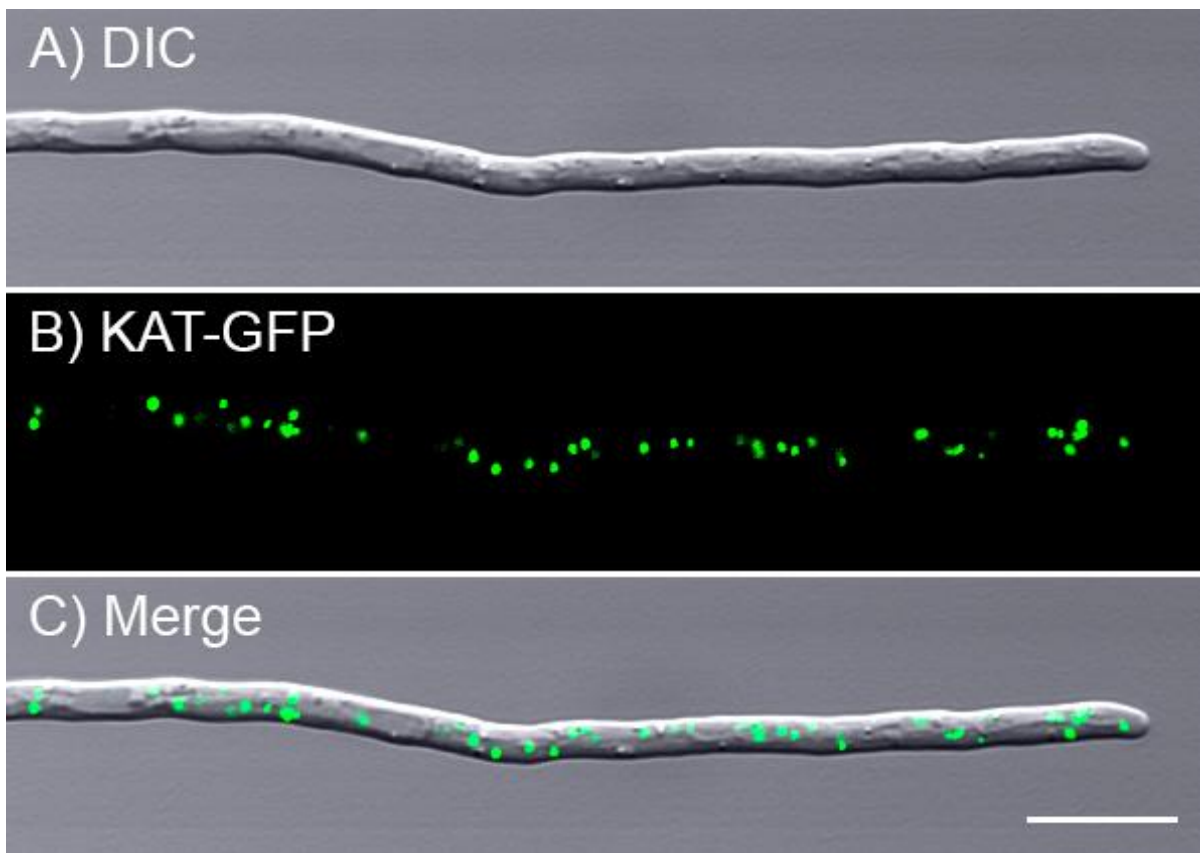


Figura 14. Distribución de peroxisomas en cepa de *M. brunneum* KAT-eGFP. **A)** Imagen DIC de hifas maduras, con su forma delgada y alargada. **B)** Imagen de fluorescencia en la que los peroxisomas tienen forma esférica de $\approx 1 \mu\text{m}$ localizadas a lo largo de toda la hifa. **C)** Superposición de A y B. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

A partir de 7 hifas analizadas por tratamiento en una distancia de $50 \mu\text{m}$, se pudo contabilizar un promedio de 22 peroxisomas por hifa del control (Sin Lat B), los cuales tienen tres tipos de movimiento: uno de movimiento rápido que recorre distancia larga, otro que recorren distancias medias y de movimientos oscilatorios (Movimientos Browniano) (**Figura 15**). Del total de peroxisomas contados, un 13.1 % de partículas tienen movimientos rápidos de distancias largas con desplazamientos máximos de hasta $16.4 \mu\text{m}$. Estos peroxisomas tienen movimientos anterógrados y retrógrados y algunos de estos se desplazan a distancias largas para luego cambiar de sentido. También se observó que algunos de estos peroxisomas adquirirían movimiento oscilatorio luego de recorrer distancias largas. En cuanto a los peroxisomas que tenían recorrido de distancias medias, representan el 35.7 % del total de la población. En estos, los movimientos eran muy cortos y oscilatorios con desplazamiento máximo promedio de $3.4 \mu\text{m}$ y en sentido anterógrado o retrogrado. Por último, los peroxisomas que solo presentaban movimiento oscilatorio sobre una misma posición representaban un 51.0 %. Estos únicamente vibran en una posición y su movimiento es mínimo.

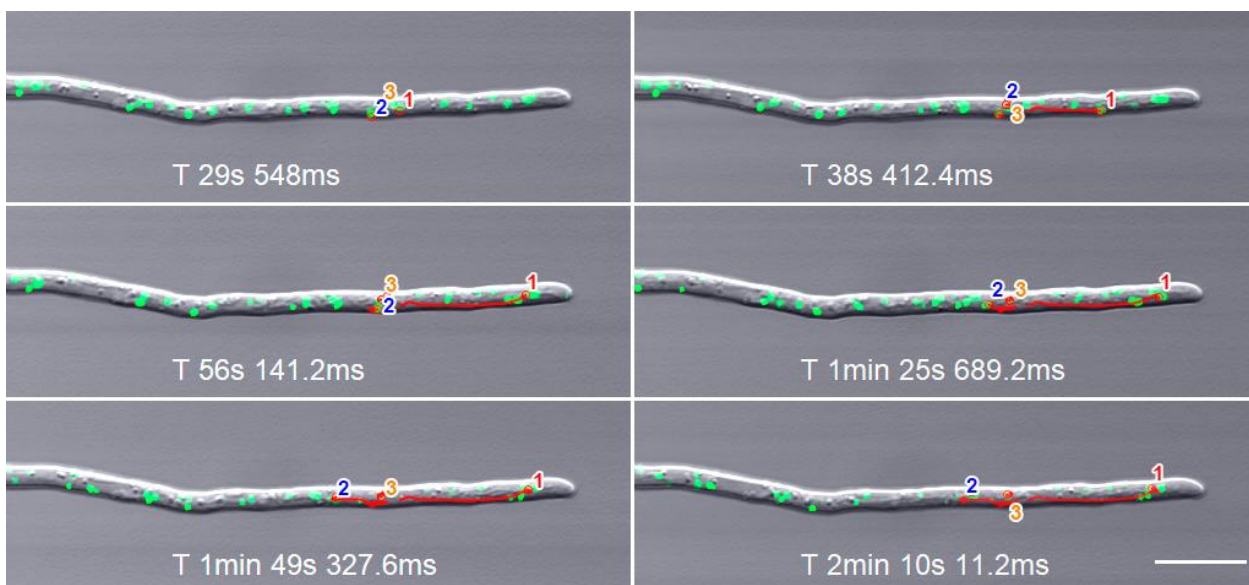


Figura 15. Desplazamiento de peroxisomas en hifas de la cepa KAT-GFP. Los peroxisomas presentaban tres tipos de movimientos: largos (1), medios (2) y oscilatorios en una misma posición (3). Las líneas rojas representan el recorrido total del peroxisoma. Barra de escala = 10 μ m.

En el caso del movimiento los peroxisomas de las 7 hifas bajo el tratamiento con Lat B, se contabilizó un promedio de 24 peroxisomas por hifa. Nuevamente se pudo apreciar que los peroxisomas tenían estos mismos tres tipos de movimiento: largos, medios y oscilatorios (**Figura 16**).

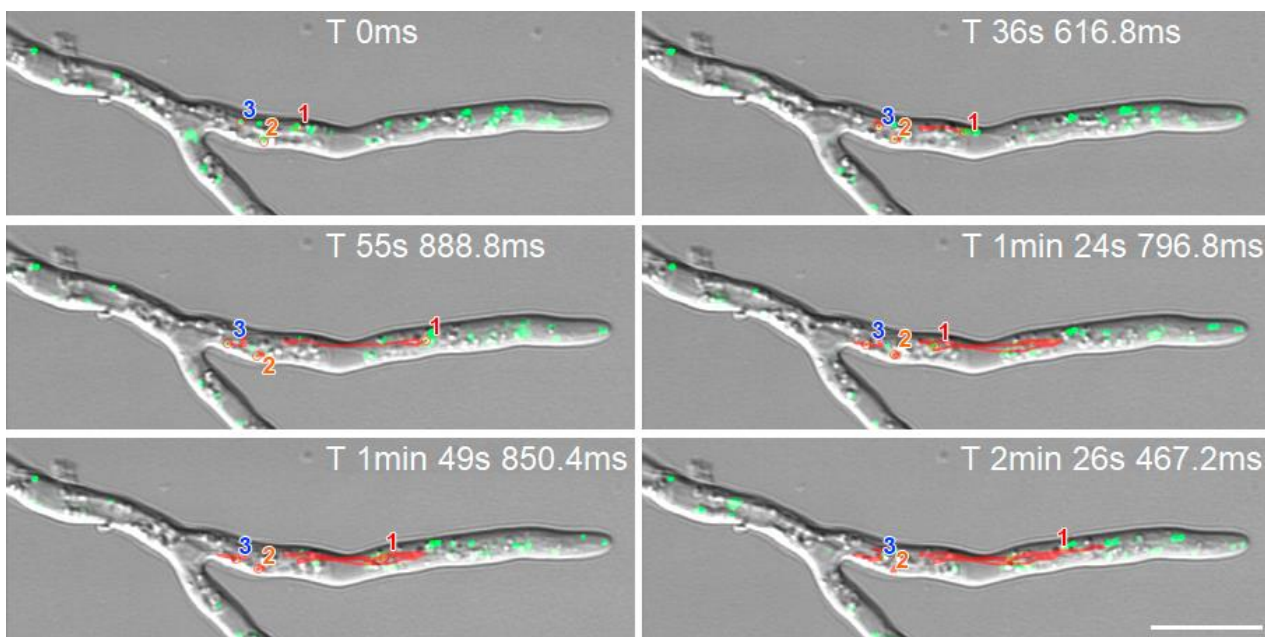


Figura 16. Desplazamiento de peroxisomas en hifas de la cepa KAT-GFP en tratamiento con Lat B a 1.5 μ g/mL. Los peroxisomas presentaban tres tipos de movimientos: desplazamientos largos (1), medios (3) y oscilatorios en una misma posición (2). Las líneas rojas representan el recorrido total del peroxisoma. Barra de escala = 10 μ m.

Aquellos que tenían movimientos de distancias largas representaban un 13.4 % con desplazamientos máximos de 13.4 μm en promedio. Estos peroxisomas exhibían un comportamiento similar al tratamiento sin Lat B, con movimientos anterógrados y retrógrados con distancias recorridas mayores al cambiar de sentido. Los peroxisomas que recorrían distancias medias representaban un 31.9 % con desplazamientos máximos promedio de 3.6 μm en sentido anterógrado o retrógrado. Los peroxisomas con movimientos oscilatorios representaban el 54.7 %.

Al hacer un comparativo entre el porcentaje de cada uno de los tres diferentes tipos de movimientos de los peroxisomas entre el tratamiento control y el tratamiento de Lat B 1.5 a $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se apreciaron diferencias (**Figura 17**).

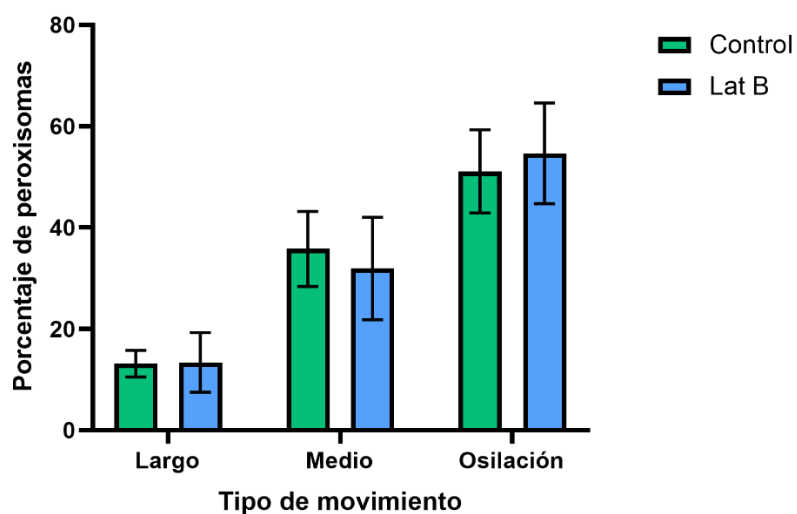


Figura 17. Descripción de movimiento de peroxisomas por su desplazamiento. Los peroxisomas de 7 diferentes hifas de 50 μm fueron contabilizados bajo tratamiento con Lat B a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La población total de peroxisomas presentaba tres tipos de movimiento: desplazamiento largo, mediano y oscilación.

También se llevó a cabo la determinación de la velocidad de desplazamiento de los peroxisomas en el tratamiento control (sin Lat B) y bajo la acción de Lat B. Estas velocidades fueron determinadas utilizando la aplicación de MTrackJ de FIJI a partir de las 7 hifas analizadas de cada tratamiento. Los promedios de velocidades en cada tratamiento se muestra en la **Figura 18A** y para comprobar si había o no diferencia entre el tratamiento con Lat B y el control, se realizó un prueba T de Student con una prueba post hoc de Mann-Whitney U ($P < 0.05$), con la cual se pudo apreciar que hay una diferencia significativa ($P = 0.0014$), ya que en el tratamiento control ($n = 146$) los peroxisomas presentan velocidades de desplazamiento promedio de 0.08 $\mu\text{m}/\text{s}$, mientras que el tratamiento de Lat B ($n = 169$) la velocidad de desplazamiento promedio fue de 0.09 $\mu\text{m}/\text{s}$ (**Figura 18B**).

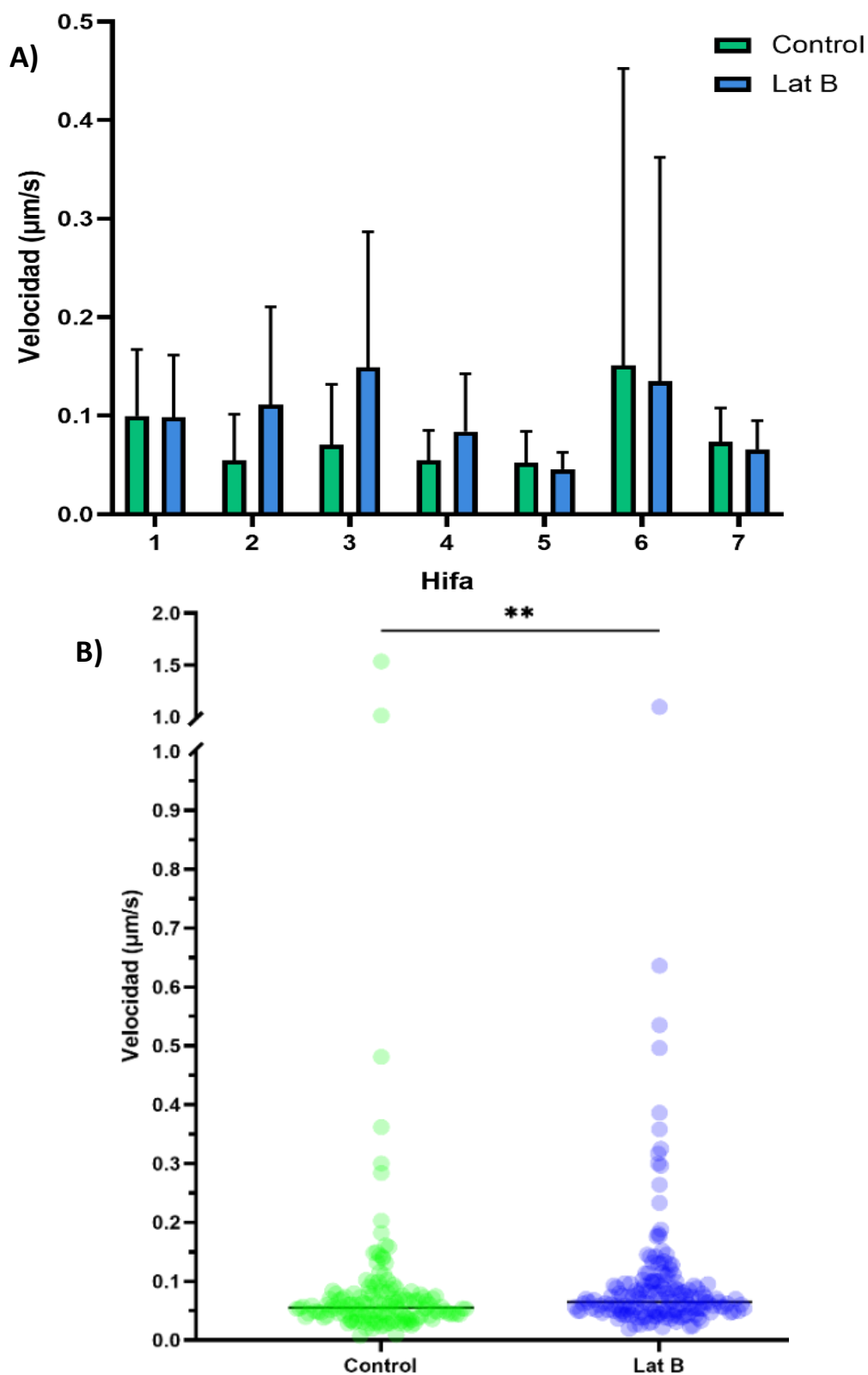


Figura 18. Velocidad de desplazamiento de peroxisomas en la cepa KAT-GFP con tratamiento de Lat B. **A)** Velocidades promedio registradas de peroxisomas en 7 diferentes hifas bajo el tratamiento control (Sin Lat B) y con Lat B en concentración de $1.5 \mu\text{g/mL}$. **B)** Comparativa entre el tratamiento control ($n=146$) y el tratamiento con Lat B ($n=169$) muestra que hay una diferencia significativa entre ambos mediante prueba T de Student y prueba post hoc de Mann-Whitney U con una $P=0.0014$.

Otro aspecto interesante que se observó al hacer el análisis de las imágenes fue que los peroxisomas parecían tener un tamaño diferente en el tratamiento con Lat B. Para esto se midieron los diámetros de 8 diferentes peroxisomas en 7 diferentes hifas en el tratamiento control y el tratamiento con Lat B. Los promedios de diámetros de los peroxisomas en cada hifa se muestran en la **Figura 19A**. Para ver si había alguna diferencia significativa entre los tratamientos se realizó una prueba T de Student ($P < 0.05$). El análisis estadístico mostró que hay una diferencia significativa ($P < 0.0001$) (**Figura 19B**), ya que el tratamiento control los peroxisomas tiene un tamaño promedio de $0.79 \mu\text{m}$ y un tamaño máximo de $1.98 \mu\text{m}$ mientras que el tratamiento con Lat B mostró tamaños menores, con un promedio de $0.60 \mu\text{m}$ y un máximo de $1.05 \mu\text{m}$.

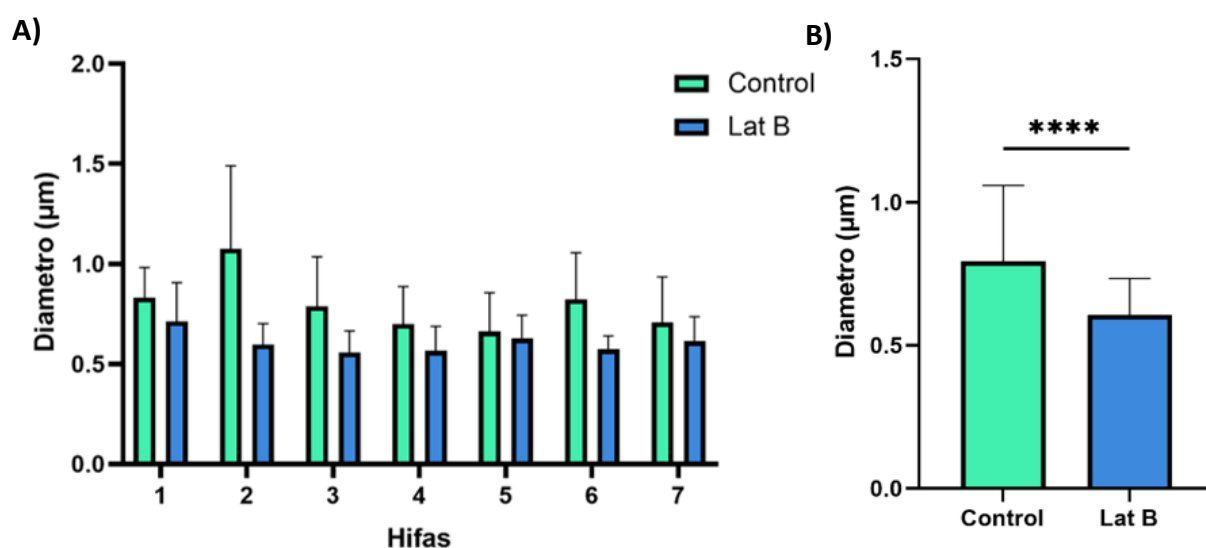


Figura 19. Gráfico del diámetro de peroxisomas en la cepa KAT-GFP. **A)** Diámetros promedios en 7 diferentes hifas bajo tratamiento control (Sin Lat B) y con Lat B a $1.5 \mu\text{g/mL}$. **B)** Comparativa entre el tratamiento control ($n=56$) y el tratamiento con Lat B ($n=56$) muestra que hay una diferencia significativa entre ambos mediante prueba T de Student con una $P < 0.0001$.

3.4.2 Dinámica de cuerpos lipídicos

Los cuerpos lipídicos son organelos formados por un núcleo de lípidos neutros recubierto por una monocapa de fosfolípidos con proteínas integrales y periféricas. Las funciones de los cuerpos lipídicos consisten en servir de fuente de energía durante la síntesis de membrana en células y procesos metabólicos relacionados con el crecimiento, además de participar también en la protección contra la lipotoxicidad (Olzmann y Carvalho, 2018). El citoesqueleto microtubular y de actina participa activamente en el transporte y posicionamiento de los cuerpos lipídicos (Kilwein y Welte, 2019), por lo cual resulta de interés ver el efecto que tendría la alteración del citoesqueleto de actina en la dinámica de los cuerpos

lipídicos. Para poder visualizar esto, el colorante BODIPY (por sus siglas en inglés de Boro dipirrometano) es de utilidad para seguir la dinámica de lípidos en distintos organismos, incluidos los hongos (Wang et al., 2018).

La cepa silvestre de *M. brunneum* se creció en medio MMV adicionado con Lat B a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sin Lat B como control, para posteriormente hacer las observaciones por agar invertido añadiendo una alícuota de 10 μL del colorante BODIPY 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al hacer las observaciones al microscopio, se pudo apreciar como el colorante teñía pequeñas partículas esféricas de 0.5–0.9 μm de diámetro en ambos tratamientos (**Figura 20**), además de observarse algunas regiones donde se acumulaba este colorante. Estas partículas fluorescentes se encuentran distribuidas a lo largo de la hifa, y en el tratamiento con Lat B fue posible observar acumulaciones de estos cuerpos lipídicos.

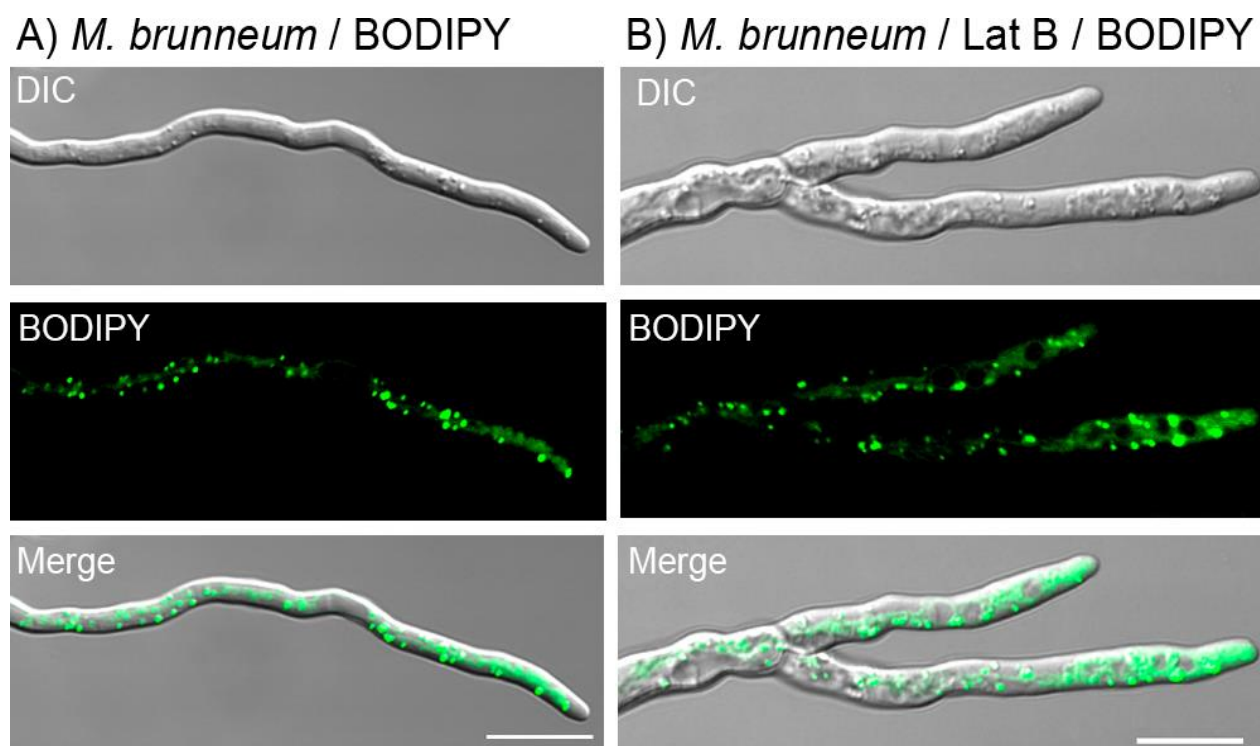


Figura 20. Tinción de cuerpos lipídicos en *M. brunneum* empleando el colorante BODIPY. A) En la cepa silvestre de *M. brunneum* teñida con BODIPY se aprecian pequeñas partículas fluorescentes esféricas de diferentes tamaños correspondientes a los cuerpos lipídicos distribuidas a lo largo de la hifa. En B) Hifas tratadas con Lat B, los cuerpos lipídicos se ven acumulados en diferentes áreas de la hifa. Barras de escala = 10 μm .

Con el antecedente de que el uso de la Lat B causó una diferencia en la velocidad de transporte en los peroxisomas, se realizó la medición de las velocidades de desplazamiento de cuerpos lipídicos de 7 hifas de *M. brunneum* de 50 μm de longitud teñidas con BODIPY tratadas con Lat B y sin Lat B como control. En

ambos tratamientos se aprecia que los cuerpos lipídicos tienen movimientos muy cortos y oscilatorios en una misma posición (**Figura 21**).

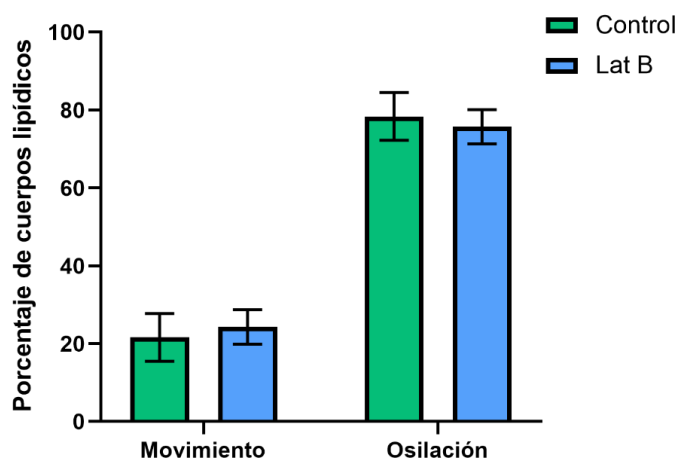


Figura 21. Descripción de movimiento de cuerpos lipídicos por su desplazamiento. Las vesículas lipídicas teñidas con BODIPY de 7 diferentes hifas de 50 μm fueron contabilizadas bajo tratamiento con Lat B a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sin esta (control). Los cuerpos lipídicos presentan dos tipos de movimiento: movimiento corto y oscilación.

Los movimientos de los cuerpos lipídicos en el tratamiento control sin Lat B pueden apreciarse en la **Figura 22**. La mayoría (78.4 %) presentaban un movimiento oscilatorio en una misma posición mientras que el resto (21.6 %) tenían movimientos cortos con un desplazamiento promedio máximo de 3.13 μm .

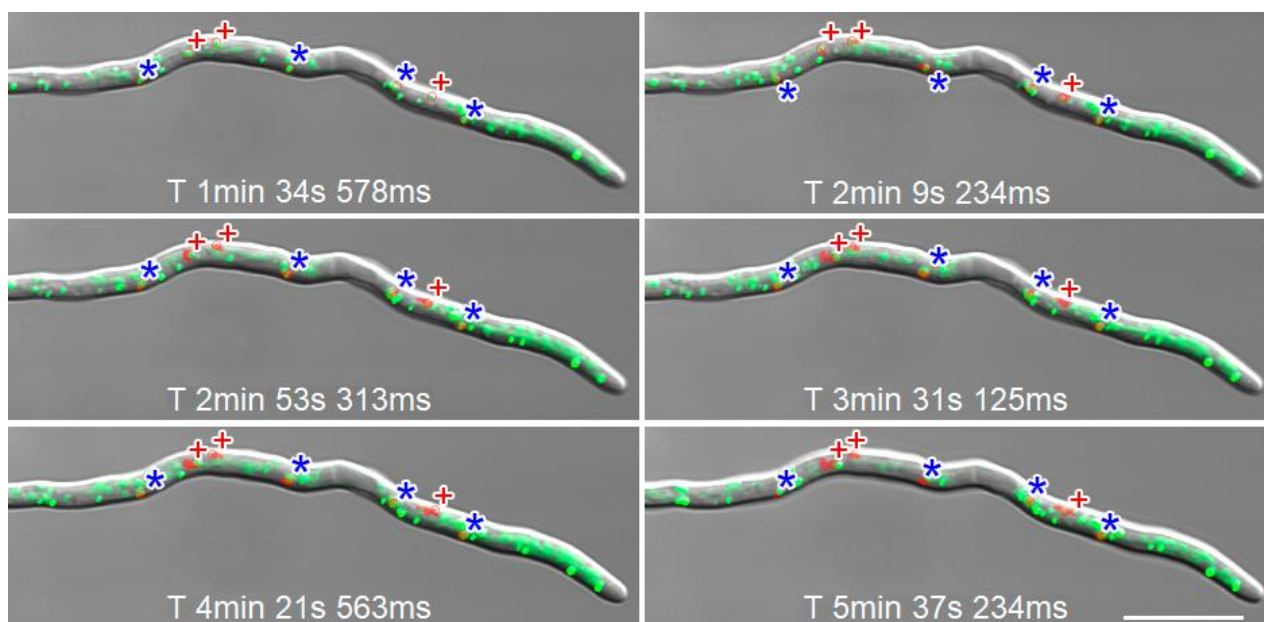


Figura 22. Desplazamiento de cuerpos lipídicos en hifas de *M. brunneum* teñidas con BODIPY. Los cuerpos lipídicos presentan dos tipos de movimientos: cortos (+) y oscilatorios en una misma posición (*). Las líneas rojas representan el recorrido total de los cuerpos lipídicos. Barra de escala = 10 μm .

En el caso de los cuerpos lipídicos en las hifas tratadas con Lat B, los dos tipos de movimiento fueron similares a los del tratamiento control: cortos (+) y oscilatorios (*) como se observa en la **Figura 23**. La mayoría de las partículas observadas (75.68 %) presentaban movimiento oscilatorio en una misma posición y el resto presentaban movimientos cortos (24.31 %) con un desplazamiento máximo promedio de 2.98 μm .

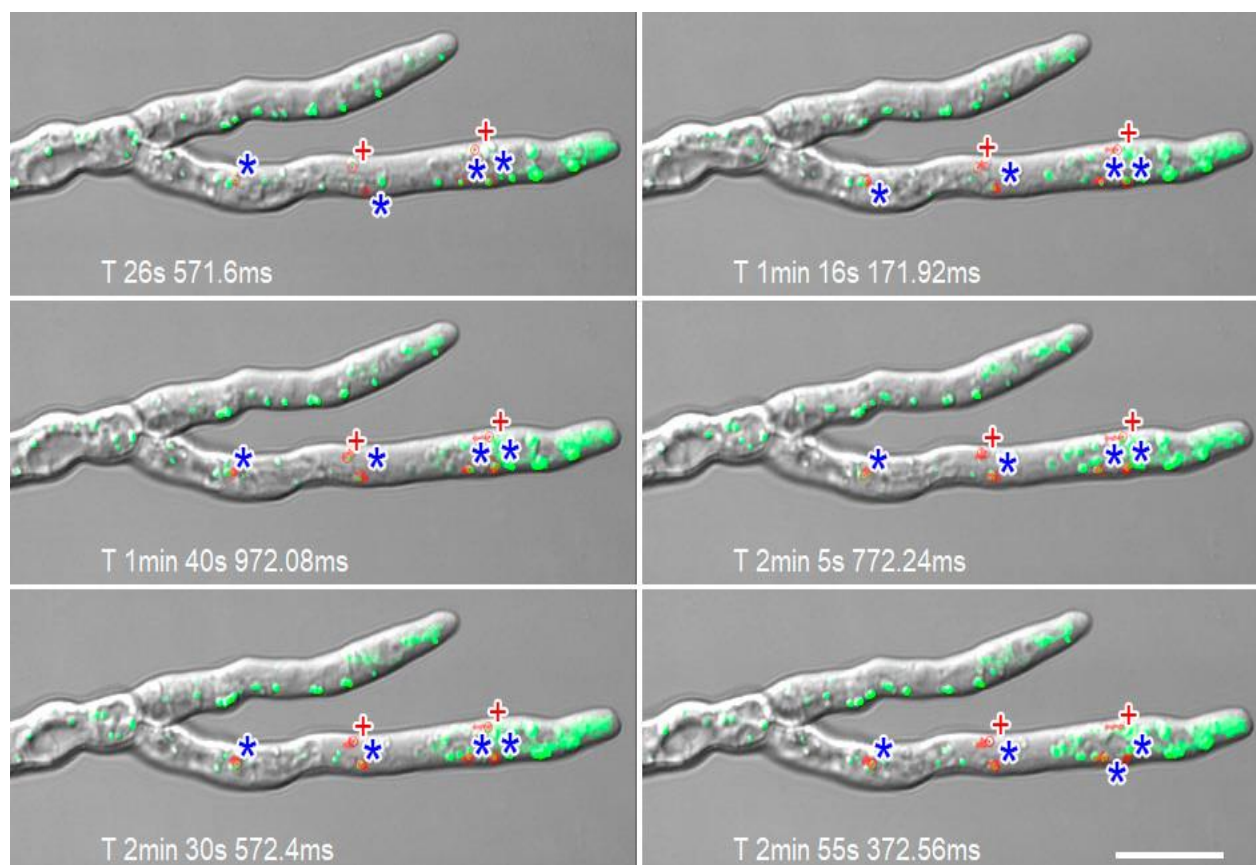


Figura 23. Desplazamiento de cuerpos lipídicos en hifas de *M. brunneum* tratadas con Lat B a 1.5 a $\mu\text{g}/\text{mL}$ y teñidas con BODIPY. Los cuerpos lipídicos presentaban dos tipos de movimientos: cortos (+) y oscilatorios en una misma posición (*). Las líneas rojas representan el recorrido total de los cuerpos lipídicos. Barra de escala = 10 μm .

Para ver si había alguna diferencia significativa en la velocidad de desplazamiento de los cuerpos lipídicos contabilizados en cada una de las hifa (**Figura 24A**), se realizó una prueba T de Student con una prueba post hoc de Mann-Whitney U ($P < 0.05$), con la cual se pudo observar que había una diferencia significativa ($P < 0.0001$), puesto que los cuerpos lipídicos del tratamiento control ($n = 177$) tienen una velocidad promedio de desplazamiento de 0.05 $\mu\text{m}/\text{s}$, mientras que los del tratamiento con Lat B ($n = 280$) presentaron una velocidad promedio de desplazamiento de 0.07 $\mu\text{m}/\text{s}$ (**Figura 24B**), lo que representó una diferencia del 28.5%.

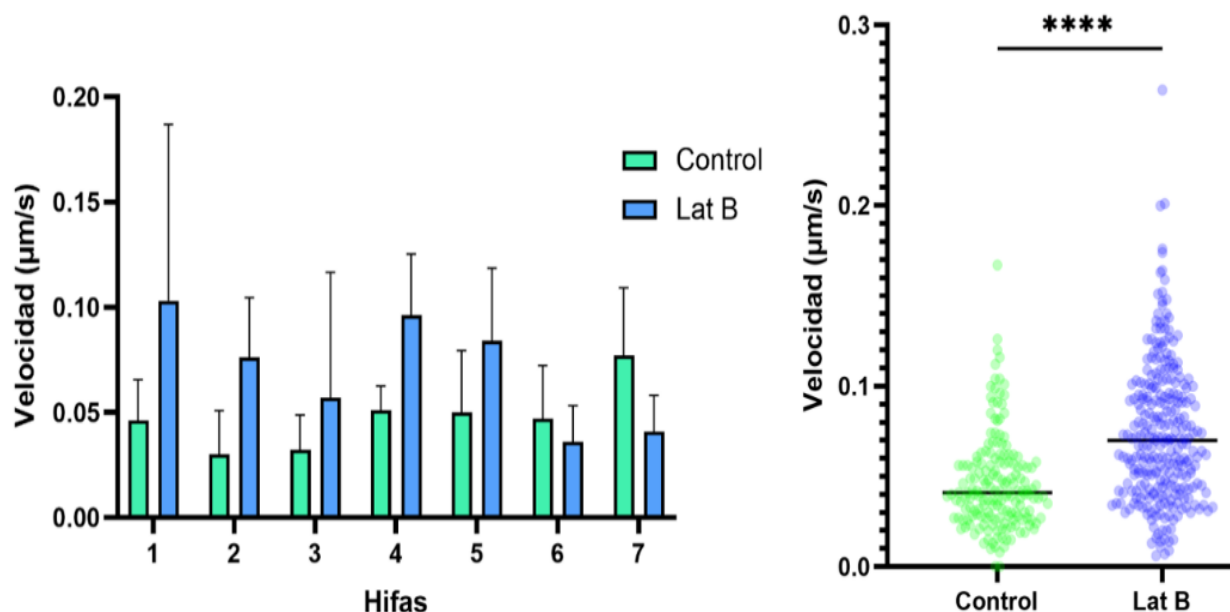


Figura 24. Velocidad de desplazamiento de cuerpos lipídicos en *M. brunneum* con tratamiento de Lat B. **A)** Velocidades promedio de cuerpos lipídicos en 7 diferentes hifas bajo el tratamiento control (sin Lat B) y con Lat B a 1.5 µg/mL. **B)** Comparativa entre el tratamiento control (n=177) y el tratamiento con Lat B (n=280) muestra que hay una diferencia significativa entre ambos mediante prueba T de Student y prueba post hoc de Mann-Whitney U con una P<0.0001.

3.4.3 Dinámica de mitocondrias

En hongos filamentosos las mitocondrias son estructuras tubulares donde una de sus principales funciones es la de generar energía en forma de ATP. Por otra parte, en recientes estudios se ha descrito que el citoesqueleto actina juega un papel importante en la regulación de la dinámica de las mitocondrias para mantener la homeostasis celular (Hickey y Read, 2009; Jones et al., 2022). Con el fin de analizar la distribución de las mitocondrias en *M. brunneum* al alterar el citoesqueleto de actina, se utilizó el fluorocromo MitoTracker Green que tiñe específicamente estos organelos. Mediante la obtención de imágenes por microscopía confocal, se pudo observar que normalmente *M. brunneum* presenta estructuras tubulares alargadas distribuidas en toda la hifa desde la región basal hasta la apical y que aparentemente se mueven mediante el flujo citoplasmático (**Figura 25A**). Además, en algunas regiones se observaron acumulaciones de estos filamentos, así como algunas estructuras semiesféricas (**Figura 25A**). Cuando se realizó el tratamiento con Lat B a la concentración de 1.5 µg/mL, se pudo observar que las estructuras filamentosas correspondientes a las mitocondrias se encuentran difusas, pero manteniéndose en algunas regiones casi intactas en su posicionamiento a lo largo de la hifa, sin observarse grandes alteraciones, pero siendo evidente la ausencia de las estructuras semiesféricas (**Figura 25B**).

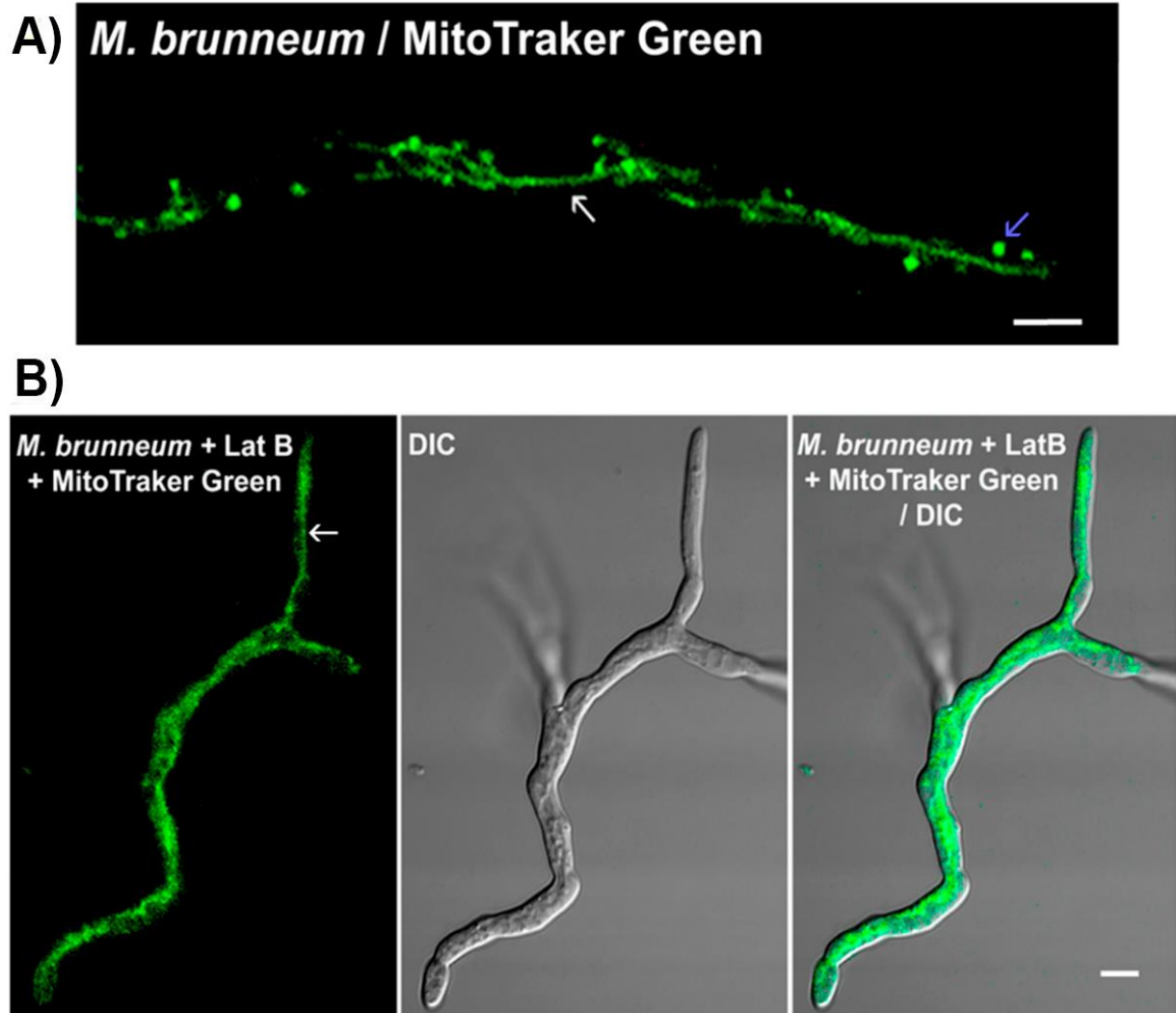


Figura 25. Dinámica de mitocondrias en *M. brunneum*. A) Imágenes confocal de hifas de *M. brunneum* teñidas con MitoTracker Green para visualizar mitocondrias. Estas presentaban una forma tubular alargada (flechas blancas) y también una forma semiesférica (flechas azules). B) Hifas teñidas con MitoTracker Green y tratadas con 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Lat B. DIC (Contraste de Interferencia Diferencial). Barra de escala = 5 μm

3.5 Efecto de la alteración del citoesqueleto de actina en la pared celular de *M. brunneum*

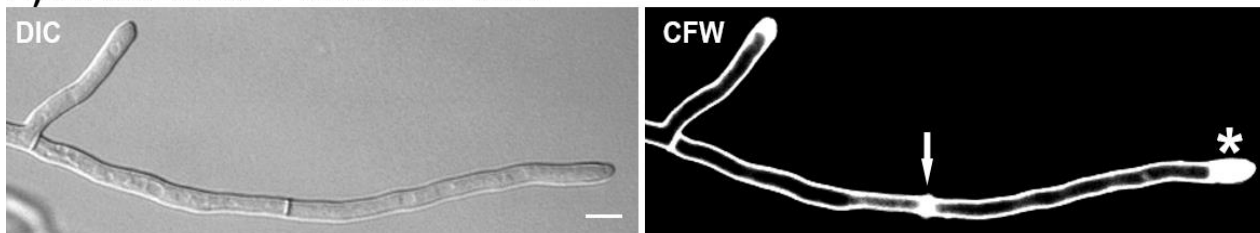
3.5.1 Visualización del efecto de la alteración del citoesqueleto de actina en la estructura de la pared celular de *M. brunneum*

La pared celular en los hongos está conformada por una gran variedad de elementos que incluyen la quitina, glucanos y glicoproteínas. Esta estructura es altamente dinámica con funciones esenciales

relacionadas con diferentes procesos biológicos, como son el control de la permeabilidad celular y en la protección contra estrés producido por factores mecánicos y químicos. De igual manera, la alteración de esta estructura esencial puede tener efectos graves en el desarrollo morfológico y crecimiento de las células, lo que puede producir su muerte (García-Rubio et al., 2020). Por otra parte, también se ha establecido en hongos filamentosos, que el citoesqueleto de actina tiene una estrecha relación con la pared celular, ya que participa como pistas para el transporte a corta distancia de vesículas que contienen enzimas (quitina sintetas y glucano sintetas) y material de membrana para la correcta síntesis de la pared (Delgado-Álvarez et al., 2010; Riquelme M y Martínez-Núñez L., 2016).

Con el objetivo de visualizar si existen cambios en la estructura de la pared celular en *M. brunneum* cuando se encuentra alterado el citoesqueleto de actina, se utilizó el colorante vital Calcofluor White (CFW). Para lo anterior, conidios de *M. brunneum* fueron crecidos en medio MMV (tratamiento control) y medio MMV adicionado con Lat B a una concentración de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mediante el método de agar invertido, se colocó el colorante (10 μL) entre la muestra correspondiente a cada tratamiento, para luego realizar observaciones de varias hifas maduras por microscopía confocal, obteniéndose las imágenes que se muestran en la **Figura 26**.

A) *M. brunneum* / Calcofluor white



B) *M. brunneum* / Lat B / Calcofluor-white

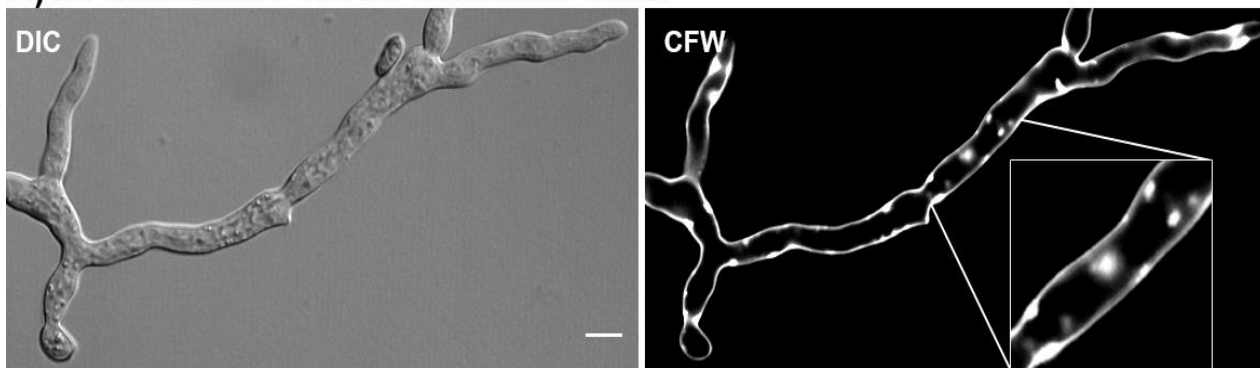


Figura 26. Visualización de la pared celular en *M. brunneum*. A) Imagen confocal de *M. brunneum* teñido con Calcofluor White (CFW), se observa una señal de fluorescencia uniforme y definida en toda la hifa correspondiente a la pared celular, con un mayor grosor en los septos (flecha) y ápice (asterisco). B) Hifas tratadas con Lat B a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y teñidas con CFW, muestran pérdida de la uniformidad de la pared celular con formación de depósitos fluorescentes y con una disminución en el grosor del ápice. Barras de escala = 5 μm .

Los resultados mostraron que en el tratamiento control, la señal de fluorescencia que corresponde a la pared celular, tiene una composición uniforme en toda la hifa, observándose un incremento de la señal de fluorescencia en los septos y en el ápice de las hifas, indicando un mayor grosor en la pared celular (**Figura 26A**), como previamente fue descrito por Hernández Saiz en el 2022. Las observaciones realizadas en hifas tratadas con Lat B, mostraron alteraciones en la pared celular con pérdida de uniformidad a lo largo de toda la hifa, así como la acumulación de quitina en forma de pequeños parches irregulares dispersados en toda la hifa, así como algunos de estos se encontraron cercanos a los bordes de la pared (**Figura 26 B**).

3.5.2 Sensibilidad de *M. brunneum* ante Rojo Congo

El Rojo Congo (RC) es un agente químico utilizado como colorante y tiene la capacidad de causar niveles de estrés a la pared celular en varias especies de hongos, afectando el adecuado desarrollo de esta, ya que este compuesto altera las enzimas relacionadas con la adecuada síntesis de la pared celular. Debido a que el citoesqueleto de actina participa en mediar la respuesta a este tipo de estrés, así como en la síntesis de nueva pared celular durante el crecimiento de las hifas de los hongos, resulta importante analizar si afectar el citoesqueleto de actina, empleando nuevamente Lat B, causa una alteración en la sensibilidad de *M. brunneum* ante el colorante RC.

Para esto, primero se llevó a cabo la determinación de la sensibilidad de la cepa CARO19 de *M. brunneum* a diferentes concentraciones de RC: 50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El hongo fue crecido en placas con medio que contenían las concentraciones de RC previamente mencionadas. Posteriormente, se realizaron mediciones del diámetro de colonia a los 5, 8, 11 y 14 días de incubación. En la **Figura 27A** se muestran como a los 14 días de incubación hubo una disminución de la tasa de crecimiento del hongo conforme aumentó la concentración de RC, siendo la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde *M. brunneum* tiene una tasa crecimiento promedio de 21.80 mm de diámetro, que fue similar al control (sin RC) de 24.03 mm, lo que representó una diferencia del 9.5%. Por otro lado, a partir de la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC es donde se notó un mayor efecto sobre la tasa de crecimiento con 13.28 mm de diámetro, representando una disminución del 55.3 % en comparación con el control (**Figura 27B**).

Otra afectación que se observó en el crecimiento de las colonias expuestas a mayores concentraciones de RC (más de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue la formación de una gran cantidad de micelio aéreo, además de que las colonias tenían una forma irregular en comparación con el tratamiento control (**Figura 27A**).

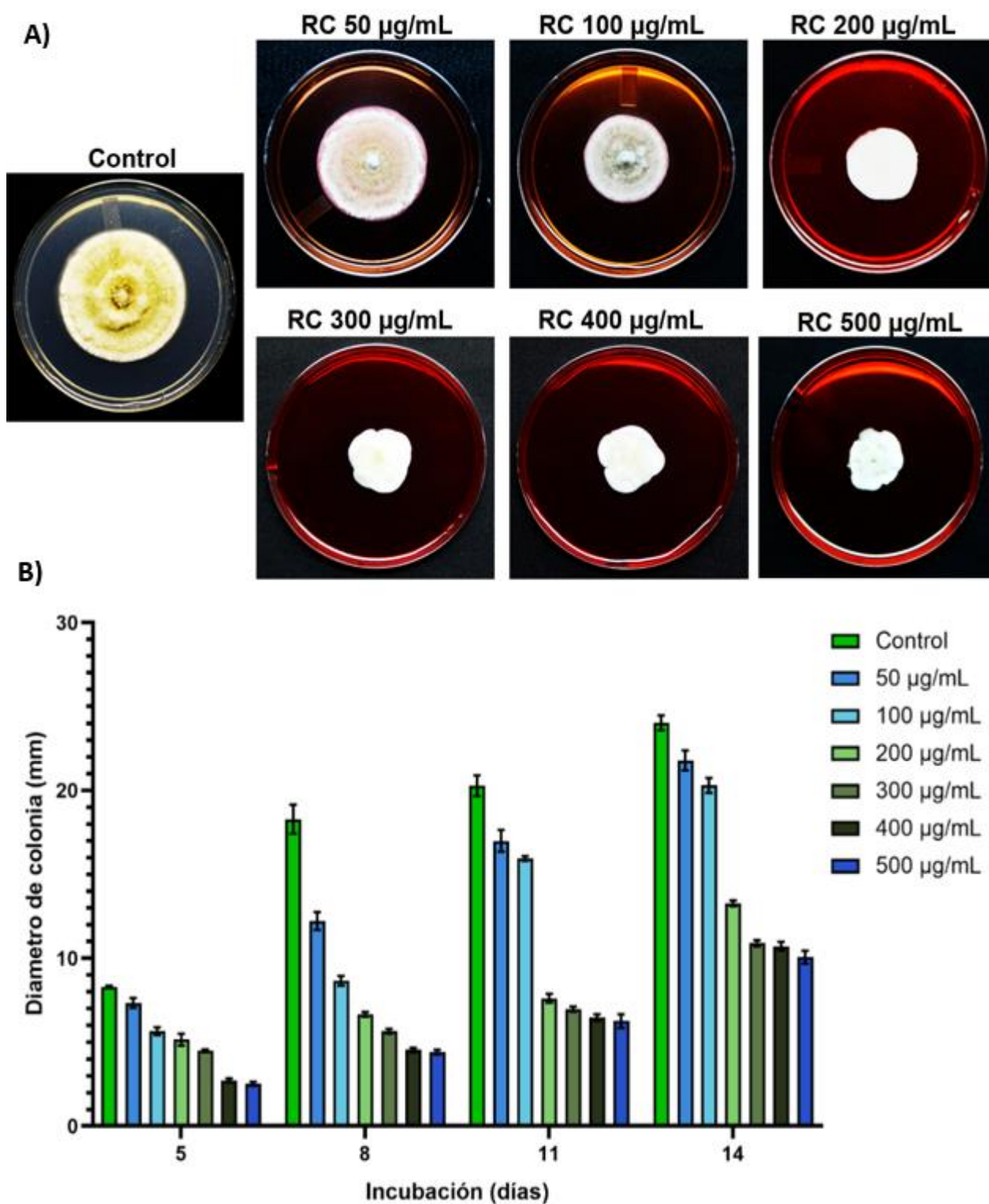


Figura 27. Ensayos de sensibilidad de *M. brunneum* al Rojo Congo. **A)** Morfología colonial de *M. brunneum* (CARO19) cultivado en PDA (control) y PDA con diferentes concentraciones de RC (50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL). Las imágenes se tomaron con una cámara fotográfica CANON EOS REBEL T6, a los catorce días de incubación a 28°C. **B)** Gráfico correspondiente a la tasa de crecimiento del hongo con los diferentes tratamientos a los 5, 8, 11 y 14 días de incubación, y los datos sugieren que la concentración a la cual *M. brunneum* presenta la mayor tolerancia al RC es de 50 µg/ml.

3.5.3 Efecto en la sensibilidad a Rojo Congo ante la alteración del citoesqueleto de actina por la acción de Lat B

Una vez que se determinó que *M. brunneum* tiene la mejor tolerancia a 50 $\mu\text{g/mL}$ de RC, esta concentración se utilizó para probar la sensibilidad de la pared celular cuando el hongo tiene el citoesqueleto de actina alterado. Para esto *M. brunneum* se creció en medio PDA suplementado con RC a 50 $\mu\text{g/mL}$ más Lat B a 1.5 $\mu\text{g/mL}$ (PDA+RC+Lat B) y como controles únicamente medio PDA y medio PDA más RC a 50 a $\mu\text{g/mL}$ (PDA+RC). Los tratamientos fueron incubados durante 14 días realizando mediciones del radio de la colonia a los 5, 8, 11 y 14. En la **Figura 28A** se aprecia que la tasa de crecimiento de *M. brunneum* en PDA y PDA+RC fue similar, únicamente observándose una disminución del 13.1 % en PDA+RC, mientras que en el tratamiento de Lat B más RC se vio una disminución notoria en el crecimiento de la colonia, con una reducción del 52.5 % en comparación con el tratamiento control (**Figura 28B**), lo que indica que la despolimerización de actina produce una mayor sensibilidad de *M. brunneum* al RC.

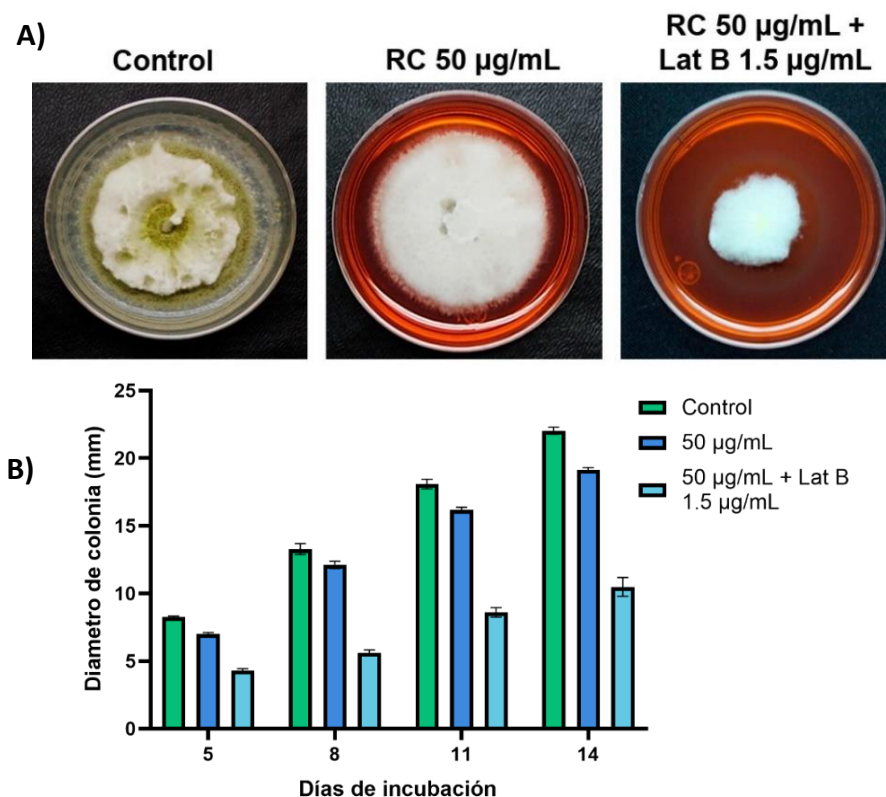


Figura 28. Respuesta de *M. brunneum* al colorante Rojo Congo en presencia de Lat B. Para probar el efecto de Lat B sobre la sensibilidad de *M. brunneum* al RC, se utilizó la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y Lat B a 1.5 $\mu\text{g/mL}$ y como control el hongo crecido en medio PDA sin colorante ni Lat B, realizando mediciones del diámetro de las colonias a los 5, 8, 11 y 14 días. En **A)** se muestra la morfología colonial a los 14 días de incubación, donde la colonia del tratamiento control y el tratamiento de 50 $\mu\text{g/mL}$ de RC tienen diámetros similares, pero en presencia de Lat B disminuye considerablemente el diámetro de la colonia. Las imágenes se tomaron con una cámara fotográfica CANON EOS REBEL T6. **B)** Gráfico correspondiente a la tasa de crecimiento del hongo en los distintos tratamientos.

Teniendo en cuenta que *M. brunneum* se vuelve sensible al RC en presencia de Lat B y con el fin de ver las alteraciones que pudieran tener en la estructura de la pared del hongo, se realizaron observaciones mediante microscopía confocal en hifas crecidas en medio PDA adicionado con RC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) más Lat B 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Primero se observaron hifas provenientes de medio PDA (**Figura 29A**), las cuales presentan una forma delgada y larga, típica de *Metarhizium*. Después se hizo la observación de hifas crecidas en medio PDA adicionado únicamente con RC (**Figura 29B**), donde se apreció que las hifas mantienen su forma delgada y alargada. Además, el RC reveló como la pared celular tiene una señal de fluorescencia consistencia casi uniforme, con algunas acumulaciones en algunas regiones. Por último, en las observaciones de las hifas crecidas en medio adicionado con RC y Lat B (**Figura 29C**), se aprecia cómo es que las hifas tienen una forma distorsionada, con múltiples ramificaciones apicales. De igual manera, el RC reveló una alteración considerable en la pared celular, ya que esta no era uniforme y estaba engrosada en múltiples regiones.

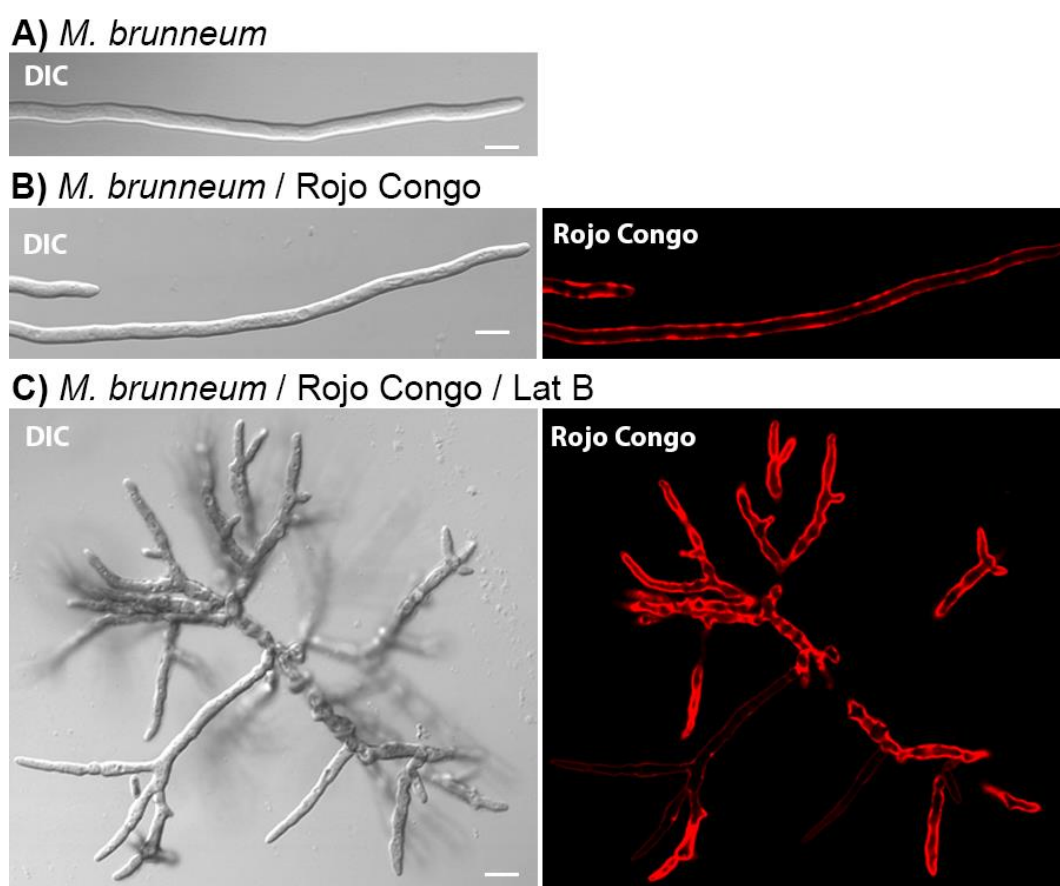


Figura 29. Efecto del colorante Rojo Congo y Lat B en la pared celular de *M. brunneum*. El hongo fue crecido en **A)** medio PDA, **B)** PDA más RC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y **C)** PDA más RC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con Lat B 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las hifas fueron analizadas por microscopía confocal y DIC, donde se observó que el RC no produce alteración en el crecimiento de las hifas, y la pared celular fue mayormente teñida de manera uniforme, mientras que en el caso de las hifas crecidas en medio con RC y Lat B el crecimiento fue aberrante, con ramificaciones apicales y la pared celular engrosada e irregular. Barras de escala = 5 μm .

3.6 Efecto de la alteración de citoesqueleto de actina en el proceso de endocitosis en *M. brunneum*

Se ha descrito que la endocitosis en hongos filamentosos, además de participar en la internalización de moléculas de señalización, también participa en internalizar proteínas y lípidos de la membrana plasmática (productos del exceso de membrana generada por la exocitosis) para ser recicladas (Read y Kalkman, 2003; Lara-Rojas et al., 2016). En las diferentes etapas de la endocitosis participan distintas proteínas, siendo una de ellas los parches de actina. Con el fin de evaluar si la endocitosis se ve afectada al despolimerizar actina, se utilizó el colorante lipofílico FM4-64.

Al hacer observaciones por microscopía confocal en hifas de *M. brunneum* crecidas en presencia de Lat B y en ausencia (control), se estableció que tras la adición del FM4-64 la membrana plasmática se marcó casi inmediatamente en ambos tratamientos, pero con una menor intensidad en el tratamiento con Lat B (Figura 32A y 30B). En el tratamiento control la señal de fluorescencia en el citoplasma se observó primero en la región subapical después de 3 min, aumentando rápidamente conforme pasaba el tiempo (Figura 32B y Figura 32A). En el tratamiento con Lat B, la intensidad de la fluorescencia en el citoplasma fue menor, con una reducción del 70% en comparación con el tratamiento control después de 3 min de exposición al colorante y se mantuvo a este porcentaje durante todo el tiempo (Figura 32A).

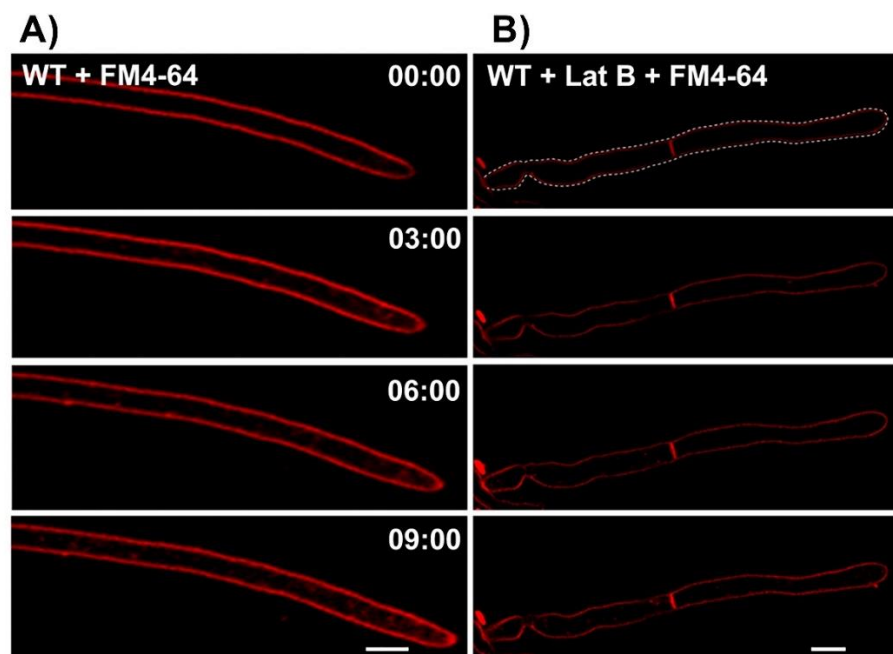


Figura 30. Tasa comparativa de internalización del marcador endocítico FM4-64 en hifas maduras de *M. brunneum*. **A)** Hifas cultivadas en MMV. **B)** Hifas cultivadas en MMV con Lat B a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tiempo: min:seg. Barra de escala = 5 μm .

Por otra parte, en presencia de Lat B no se observó un AVC (Apical Vesicle Crescent) teñido por FM4-64 a diferencia de lo observado en el tratamiento control, donde sí se observó claramente esta estructura (Figura 31).

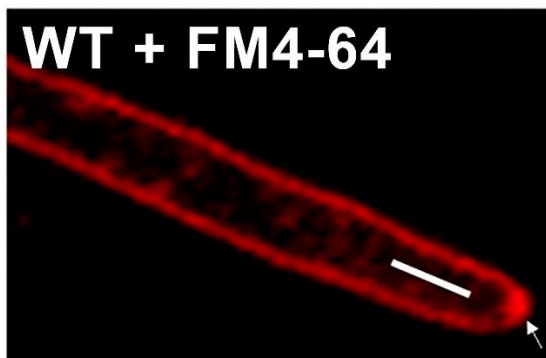


Figura 31. Presencia del Apical Vesicle Crescent (AVC) en *M. brunneum*. La línea donde se midió la intensidad de fluorescencia. La flecha señala al AVC en la punta de la hifa.

Para comparar si el tratamiento con Lat B había causado una diferencia en la internalización del FM4-64, se realizó un análisis estadístico utilizando una prueba T de Student ($\alpha=0.5$), mostrando una diferencia significativa ($P<000.1$) y siendo la tasa de endocitosis menor en presencia de Lat B en comparación con el tratamiento control (Figura 32B).

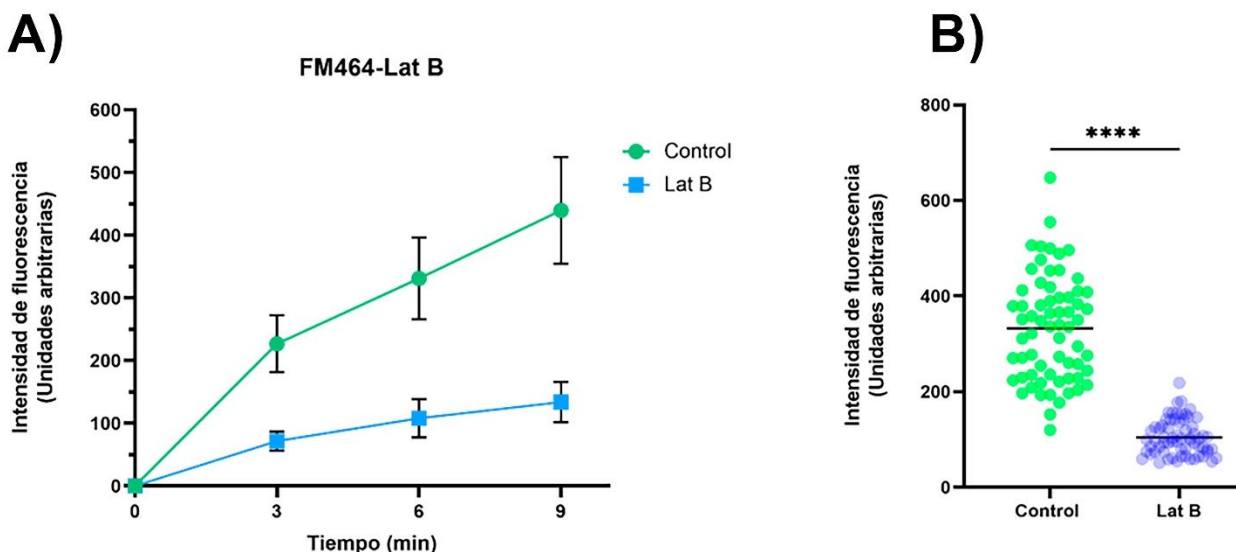


Figura 32. Análisis estadístico de endocitosis en *M. brunneum*. **A)** Gráfico de la intensidad de fluorescencia en la región citoplasmática subapical (5 μm desde la punta) en MMV (n=22) y MMV más Lat B (n=23). **B)** Comparativa entre tratamiento control (n=84) y el tratamiento con Lat B (n=92) mostró una diferencia significativa entre ambos por prueba T de Student ($P<000.1$).

Capítulo 4. Discusión

El género *Metarhizium* comprende una gran variedad de especies fúngicas de suma importancia en el sector agrícola, debido a su potencial como agente de control de insectos plaga causantes pérdidas millonarias, además de representar una alternativa a los pesticidas químicos que han causado daños considerables al ambiente y a la salud del ser humano (de la Cruz Quiroz et al., 2019). Otra característica destacable del género *Metarhizium* es su capacidad para potenciar el crecimiento de plantas durante su interacción benéfica con estas (Behie et al., 2012; Liao et al., 2014), lo que refuerza aún más aplicación como biopesticida en el campo.

Durante el proceso de infección, así como durante la interacción con las raíces de las plantas, distintos factores ambientales e intracelulares desencadenan una serie de eventos de diferenciación y transporte de organelos, los cuales son necesarios para el crecimiento del hongo, así como en la producción de energía y hasta en desintoxicación celular, donde el citoesqueleto desempeña un papel esencial (Timonen y Peterson, 2002). Sin embargo, el conocimiento del citoesqueleto en *Metarhizium* es casi nulo, por lo que en este estudio se abordó el papel del citoesqueleto de actina en el desarrollo de este hongo.

4.1 Localización del citoesqueleto de actina en *Metarhizium*

El citoesqueleto de actina en hongos participa en múltiples funciones celulares, como crecimiento celular, regulación de la polaridad celular, división celular (citocinesis), transporte intracelular de organelos, endocitosis y exocitosis (Berepiki et al., 2010; Delgado-Álvarez et al., 2010). Para visualizar la localización de la f-actina en *M. brunneum*, en este trabajo se realizó la construcción del vector expresión pOC012-AG05, que contiene la secuencia nucleotídica del reportero *Lifeact-gfp* bajo el promotor *tef- α 1*, promotor fuerte y constitutivo de *M. brunneum*. Este vector se utilizó para transformar a *M. brunneum* mediante la técnica de Agrotransformación obteniendo cepas transformantes que lograban expresar Lifeact-GFP, ya que la fluorescencia de estas era visible en las observaciones en microscopía confocal.

La localización y dinámica de la actina en hongos se ha reportado en diferentes hongos modelos y se ha descrito que la actina forma diferentes estructuras como filamentos, cables, parches y anillos. Además, en hongos como *N. crassa* se ha descrito que los microfilamentos de actina se localizan en la punta de la hifa en donde se encuentra el SPK, funcionando como sostén y vía de transporte de vesículas mediados por

proteínas motoras (Delgado-Álvarez et al., 2010). Al analizar conidios de *M. brunneum* expresando Lifeact-GFP, se pudo apreciar fluorescencia en todo el conidio, pero con mayor concentración en los extremos. En germínulas, se lograron ver cúmulos de actina en forma de parches distribuidos mayormente en la hifa en crecimiento. En hifas maduras, nuevamente se pudo visualizar únicamente cúmulos de actina a lo largo de toda la hifa, pero estructuras como filamentos o anillos no fueron posibles de visualizar. Tampoco fue posible ver los arreglos de actina en la punta de la hifa en donde se encontraría el AVC (estructura similar al Spk). Una característica que podría influenciar en por qué no se ven a detalle las otras estructuras formadas por la actina en las cepas transformantes de *M. brunneum* es el tamaño de sus hifas, ya que en el hongo modelo *N. crassa*, el hongo donde se ha hecho una descripción más detallada del citoesqueleto de actina (Delgado-Álvarez et al., 2010; Berepiki et al., 2010), sus hifas tienen un diámetro de entre 10-15 μm , mientras que en *Metarhizium* sus hifas tienen un diámetro de entre 2-4 μm . En otros hongos, como *A. nidulans*, se ha descrito mayormente la presencia de actina en forma de parches distribuidos a lo largo de hifas maduras y estructuras como cables son vistos raramente (Fischer et al., 2008; Araujo-Bazán et al., 2008; Taheri-Talesh et al., 2008), lo cual coincide con lo que se pudo observar en *M. brunneum*, que tiene un grosor de hifas similar a *A. nidulans* (3-5 μm).

Sin embargo, las cepas transformantes de *M. brunneum* con Lifeact-GFP presentaron dificultades al momento de ser observadas en microscopía confocal, ya que la fluorescencia emitida era de muy corta duración (< 1 min.), e incluso las cepas fueron perdiéndose entre las transferencias que se hacían a nuevos medios de cultivo. Esto suele pasar en los hongos sometidos al proceso de Agrotransformación, ya que estas cepas pueden ser poco estables o incluso las inserciones de material genético externo pueden llegar a ocurrir en sitios no específicos, interrumpiendo funciones de genes o causando mutaciones que pueden resultar fatales. Esto abre la posibilidad de reintentar la Agrotransformación, haciendo variaciones que promuevan una mayor eficiencia en la obtención de transformantes, cómo hacer ajustes en la concentración de acetosiringona, los tiempos de incubación o la temperatura del cultivo, factores claves en este proceso (Li et al., 2017).

4.2 Participación del citoesqueleto de actina en la distribución intracelular de *M. brunneum*

En varios hongos modelo, como *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, se ha descrito la participación del citoesqueleto de actina en el posicionamiento y transporte de elementos intracelulares (Navarro-

Espíndola et al., 2020; Taheri-Talesh et al., 2008; Togo et al., 2017), principalmente en las zonas de crecimiento activo. Para conducir estudios relacionados con la participación del citoesqueleto de actina se ha utilizado la droga despolimerizadora de actina Latrunculina (A y B). Cuando se usa esta droga, las diferentes estructuras que forma la F-actina se ven alteradas, lo que produce consecuencias en el desarrollo de los hongos, como en su crecimiento, polaridad, así como en el transporte de componentes intracelulares como peroxisomas, vesículas, endosomas, entre otros. (Ketelaar et al., 2012; Togo et al., 2017). En este trabajo se probó el efecto de alterar el citoesqueleto de actina con Latrunculina B (Lat B) en la dinámica del transporte de peroxisomas, empleando la cepa *M. brunneum* (KAT-GFP), la cual contiene a los peroxisomas etiquetados en su membrana por la proteína GFP. Cuando esta cepa no tenía el citoesqueleto afectado, los peroxisomas mostraron 3 tipos de desplazamiento: rápidos y largos, de distancia media y oscilatorio en una misma posición. Los movimientos rápidos a distancias largas pueden atribuirse a un movimiento mediado a través de los microtúbulos, ya que estos abarcan mayores distancias al interior de las hifas en comparación a microfilamentos de actina (Guimaraes et al., 2015; Li et al., 2017). En el caso de los peroxisomas que tenían desplazamientos en distancias más cortas u oscilatorios, estos podrían deberse al transporte a través de los microfilamentos de actina o su posicionamiento en forma estáticas en las redes formadas por los filamentos de actina. En un estudio en *A. nidulans* (Steinberg, 2016), en el cual también se utilizó una cepa con los peroxisomas etiquetados con GFP, se pudo ver una dinámica similar, con tres tipos de movimiento similares, además de que las velocidades y distancias recorridas por los peroxisomas en este hongo eran similares a las vistas en este trabajo con *M. brunneum*. Así mismo, al alterar el citoesqueleto microtubular en *M. brunneum* se pudo apreciar que los peroxisomas que en condiciones normales tienen un desplazamiento largo y de velocidad alta disminuyen hasta en un 82%, mientras que los peroxisomas de movimientos cortos y de menor velocidad o de movimiento oscilatorio no se ven afectados (Hernández Saiz, 2022). Esto sugiere que en *M. brunneum* el citoesqueleto microtubular participa en el desplazamiento de los peroxisomas a largas distancias, mientras que los movimientos cortos u oscilatorios están relacionados con el citoesqueleto de actina.

La afectación en el transporte de otro elemento intracelular fue probada con el colorante BODIPY, para ver la relación del citoesqueleto de actina con el transporte de cuerpos lipídicos. Este colorante ha sido utilizado para el estudio de la dinámica de lípidos en hongos como *Penicillium* sp., *Magnaporthe oryzae*, y *Phaeosphaeria* sp., en donde se observó que los cuerpos lipídicos presentan una forma semiesférica y están distribuidos a lo largo de las hifas (Wang et al., 2018; Kuroiwa et al., 2012). Las observaciones en microscopía confocal en *M. brunneum* teñido con BODIPY mostraron que las vesículas lipídicas tenían forma semiesférica y se distribuían a lo largo de la hifa madura. Adicionalmente, se analizó el movimiento de los cuerpos lípidos y se observó que tenían dos tipos de movimiento, uno oscilatorio con

desplazamientos cortos (<25 %) y otro de oscilación únicamente (75 %) en ambos tratamientos ya que la dirección de su movimiento era en sentido anterógrado y retrógrado. Sin embargo, los cuerpos lipídicos en general presentaban una velocidad de desplazamiento mayor en el tratamiento con Lat B en comparación al tratamiento control. Sin bien se ha descrito que los cuerpos lipídicos pueden ser transportados a través de los microtúbulos y el citoesqueleto de actina (Kilwein y Welte, 2019b) en las observaciones realizadas no fue posible apreciar movimientos largos y rápidos característicos del transporte a través de microtúbulos, sino únicamente movimientos cortos, lo que podría indicar un transporte mayor únicamente a través del citoesqueleto de actina.

Por último, se probó el efecto de la alteración del citoesqueleto de actina en la dinámica de las mitocondrias. Las observaciones en microscopía confocal permitieron ver que las mitocondrias de *M. brunneum* tiene una forma tubular alargada que se encuentran distribuidas a lo largo de toda la hifa, así como la presencia de cúmulos circulares. Esto concuerda con lo observado en otros hongos como en el patógeno de humanos *Candida albicans*, en el cual se ha descrito que las mitocondrias pueden encontrarse en cúmulos circulares distribuidos en citoplasma en su forma levaduriforme, mientras que en su forma filamentosa se aprecian algunos cúmulos, pero también se precian redes tubulares de mitocondrias distribuidas longitudinalmente en las hifas. En el caso *Aspergillus fumigatus*, un hongo filamentoso patógeno de humanos, también se ha visto que las mitocondrias se encuentran formando redes tubulares, así como redes fragmentadas que se encuentran dispersas en el citoplasma de las hifas (Navarro-Espíndola et al., 2020). La posición y el movimiento de las mitocondrias en los hongos dependen tanto del citoesqueleto microtubular como el de actina, pero esto varía entre especies o estadios de desarrollo. En la levadura *S. cerevisiae* se ha reportado que el movimiento de las mitocondrias está mediado por los microfilamentos de actina, así como en el hongo filamentoso *A. nidulans* (Westermann y Prokisch, 2002). Sin embargo, en otra especie de levadura, *Schizosaccharomyces pombe*, la distribución de las mitocondrias se da a través de los microtúbulos, al igual que en los hongos filamentosos *Fusarium acuminatum*, *N. crassa*, *Uromyces phaseoli*, entre otros (Westermann y Prokisch, 2002). Los resultados de este trabajo mostraron que la distribución de las mitocondrias en *M. brunneum* no se veía alterada cuando el citoesqueleto de actina era afectado, únicamente las mitocondrias se encuentran más dispersas. Por otro lado, en el trabajo de Hernández Saiz (2022), al alterar el citoesqueleto microtubular de *M. brunneum* las mitocondrias se aglomeraban formando en diferentes áreas a lo largo de toda la hifa, lo que podría indicar que el citoesqueleto microtubular en *M. brunneum* es el que tiene una mayor participación en la dinámica de las mitocondrias.

4.3 Relación del citoesqueleto de actina con la pared celular de *M. brunneum*

Dado que la pared celular de los hongos representa la primera barrera contra los factores de estrés ambientales, mantiene la integridad y forma de las células y participa en los procesos de infección de hongos patógenos, como *C. albicans*, un adecuado desarrollo de la pared celular es esencial (Arana et al., 2009; Hopke et al., 2018). Además, la pared celular tiene un papel importante en la definición del papel ecológico y la interacción de los hongos con los sustratos y otros organismos.

Uno de los agentes utilizados en estudios relacionados con la integridad de la pared celular de los hongos ha sido el Rojo Congo (RC). Este agente químico es un colorante que tiene la capacidad de inducir estrés en la pared celular, debido a su capacidad de intercalarse con la quitina y β 1-3-glucanos, inhibiendo las enzimas necesarias para la síntesis de quitina y de enzimas que unen a la quitina con los β 1-3-glucanos (Lima et al., 2021). Sin embargo, se ha reportado la capacidad de varias especies de hongos de tolerar la presencia de RC e incluso la capacidad de degradarlo, aunque eso depende en gran medida de cada especie. En este trabajo se determinó la concentración de RC necesaria para inhibir el crecimiento de la cepa CARO19 de *M. brunneum*, siendo esta de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y que produjo una reducción del 55% en el diámetro de colonia. Esto concuerda con lo observado en el trabajo de Lima et al., en el 2021, en donde probaron la sensibilidad al RC de varias cepas de *Metarhizium* y se observó que *Metarhizium* tiene una baja tolerancia al RC puesto que hay cepas (*M. acridum* ARSEF 324, *M. anisopliae* ARSEF 2341, *M. brunneum* ARSEF 1187) que con concentraciones de 100 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tienen disminución en el diámetro de colonia de más del 50%. Esta diferencia en la tolerancia al RC está relacionada con los diferentes ambientes en los que se encuentran cada cepa, así como los insectos hospederos de cada una de las cepas.

Puesto que el citoesqueleto de actina participa en el transporte de los diferentes componentes que conforman la pared celular, así como participar en la mediación de la respuesta inmune ante agentes que causan daño a la pared celular, en este trabajo se analizó el efecto de altera el citoesqueleto de actina con Lat B y su respuesta a la sensibilidad al RC. Los resultados mostraron un incremento altamente marcado en la sensibilidad al RC en presencia de Lat B, ya que con la concentración mínima probada de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la colonia tenía una disminución del 52 % en el diámetro, similar a la diferencia observada cuando se tiene únicamente el RC en concentraciones mayores a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Un análisis microscópico de la pared celular mostró que cuando *M. brunneum* es crecido en presencia de RC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la pared celular mantiene una estructura uniforme a lo largo de la hifa, además de presentar un incremento en la punta de la hifa. Cuando el hongo es crecido en RC y afectado por Lat B, las hifas crecen distorsionadas y la pared celular sufre cambios, pues se pierde su estructura uniforme, algunas zonas se engrosan y otras más se adelgazan, así

como la aparición de parches fluorescentes y disminución del grosor de la pared en las puntas de las hifas. Esto puede deberse a un mal transporte de los componentes de la pared celular a través del citoesqueleto desestabilizado por la acción de Lat B, por lo cual el citoesqueleto de actina es esencial para una formación adecuada de la pared celular. Por otro lado, Hernández Saiz (2022) reportó que cuando el citoesqueleto microtubular es afectado en *M. brunneum*, la pared el grosor celular y los septos no se ve afectado, manteniendo una forma bien definida, pero hay una disminución muy notoria en el grosor del ápice de la hifa, indicando una mayor participación del citoesqueleto de actina en la adecuada formación de la pared celular. Todo esto deja una ventana para posteriormente probar si hay un cambio en la virulencia de este hongo cuando hay alteración del citoesqueleto de actina, así como la pared celular de este, ya que en patógenos de humanos se ha visto que, al haber afectación de alguno de estos factores, la virulencia se ve disminuida (Arana et al., 2009).

4.4 Participación del citoesqueleto de actina en la endocitosis en *M. brunneum*

La endocitosis en hongos filamentosos consiste en la internalización de compuestos ambientales a través de la membrana plasmática, para su procesamiento y reciclado de vuelta a esta o para su degradación al interior de la célula por los lisosomas (Steinberg, 2014). Se ha descrito que este proceso es mediado por el citoesqueleto de actina específicamente por los parches de actina junto con proteínas asociadas (MYO-1, Coronina, Fimbrina y complejo ARP-2/3) y que al ser alterados cualquiera de estos elementos, causa una fuerte disminución en la endocitosis (Delgado-Álvarez et al., 2010; Lara-Rojas et al., 2016). Por otra parte, existen reportes en levaduras como *S. cerevisiae* y *S. pombe*, donde se describe la mediación de la endocitosis mediante la internalización del colorante lipofílico FM4-64 (Commer y Shaw, 2021). Sin embargo, en hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *Ustilago maydis* y *Neurospora crassa*, se ha visto que el transporte de vesículas durante la endocitosis se da principalmente a través del citoesqueleto microtubular (Commer y Shaw, 2021). Teniendo esto en cuenta, en este trabajo se utilizó FM4-64 como marcador de endocitosis en *M. brunneum*, y se estableció que al alterar el citoesqueleto de actina con Lat B produce una disminución del 70% en la internalización del FM4-64 (cinco veces menor en comparación con el tratamiento sin Lat B), el cual refleja una disminución de la endocitosis. Lo anterior probablemente es debido a que los parches de actina son posicionados y transportados por los filamentos de actina y que al estar despolimerizados los filamentos no cumplen con su función. Por otra parte, no se observa el AVC característico en la punta de la hifa, este tipo de estructura se compone principalmente de vesículas secretoras y este grupo de vesículas además de ser transportados hacia la membrana apical por filamentos

de actina, también funcionan en la estratificación del AVC (Roberson, 2020), que al ser despolimerizada la actina pierden estabilidad las vesículas.

Capítulo 5. Conclusiones

Las cepas transformantes Lifact-GFP de *M. brunneum* mostraron actina en forma de pequeños parches a lo largo de la hifa. Sin embargo, no fue posible ver otras estructuras típicas como los filamentos, cables o anillos de actina o acumulación en el en el AVC. La concentración de 1.5 µg/mL de Lat B disminuye el crecimiento del hongo en aproximadamente un 50% y produjo alteraciones evidentes en la polaridad celular con la formación de hifas distorsionadas y ramificación apical. La desorganización del citoesqueleto de actina produce alteración en el transporte y posicionamiento de elementos cargo, como los peroxisomas y cuerpos lipídicas, vesículas y mitocondrias. También se pudo ver que las alteraciones en citoesqueleto de actina afectan la endocitosis y la correcta deposición de la pared celular a través de la exocitosis. Todo esto señala que en *M. brunneum*, el citoesqueleto de actina tiene un papel muy importante en la organización intracelular, dinámica de organelos y en el proceso de secreción y endocitosis.

Literatura citada

- Ángel-Sahagún, C. A., Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Pescador-Rubio, A., Skoda, S. R., Cruz-Vázquez, C., Lorenzoni, A. G., Galindo-Velasco, E., Fragoso-Sánchez, H., y Foster, J. E. (2010). Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Veterinary Parasitology*. Elsevier, 170(3–4). doi: 10.1016/J.VETPAR.2010.02.037
- Arana, D. M., Prieto, D., Román, E., Nombela, C., Alonso-Monge, R., y Pla, J. (2009). The role of the cell wall in fungal pathogenesis. *Microbial biotechnology*. Wiley-Blackwell, 2(3) doi: 10.1111/J.1751-7915.2008.00070.X
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A., y Espeso, E. A. (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*. Mol Microbiol, 67(4). doi: 10.1111/J.1365-2958.2007.06102.X
- Ayscough, K. R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., y Drubin, D. G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *The Journal of cell biology*. J Cell Biol, 137(2), pp. 399–416. doi: 10.1083/JCB.137.2.399
- Bartnicki-Garcia, S. y Nickerson, W. J. (1962). Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochimica et biophysica acta*. Biochim Biophys Acta, 58(1) doi: 10.1016/0006-3002(62)90822-3
- Behie, S. W., Moreira, C. C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P. M., y Bidochka, M. J. (2017). Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8. doi: 10.1038/NCOMMS14245
- Behie, S. W., Zelisko, P. M., y Bidochka, M. J. (2012). Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*. American Association for the Advancement of Science, 336(6088). doi: 10.1126/SCIENCE.1222289/SUPPL_FILE/BEHIE.SOM.PDF
- Berepiki, A., Lichius, A., y Read, N. D. (2011). Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nature reviews*. Microbiology. Nat Rev Microbiol, 9(12). doi: 10.1038/NRMICRO2666
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J. Y., Tilsner, J., y Read, N. D. (2010). F-Actin Dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. American Society for Microbiology (ASM), 9(4). doi: 10.1128/EC.00253-09
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M. y Roberts, K. (2014). *Molecular biology of the cell*. Journal of Chemical Information and Modeling, 53(9).
- Callejas-Negrete, O. A., Plamann, M., Schnittker, R., Bartnicki-García, S., Roberson, R. W., Pimienta, G., y Mouriño-Pérez, R. R. (2015). Two microtubule-plus-end binding proteins LIS1-1 and LIS1-2, homologues of human LIS1 in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology: FG & B*. Fungal Genet Biol, 82. doi: 10.1016/J.FGB.2015.07.009

- Clarkson, J. M. y Charnley, A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in microbiology*. *Trends Microbiol*, 4(5). doi: 10.1016/0966-842X(96)10022-6
- Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. *Biotechniques*, 43(1 Suppl). doi: 10.2144/000112517
- Commer, B. y Shaw, B. D. (2021). Current views on endocytosis in filamentous fungi. *Mycology*. Taylor & Francis, 12(1). doi: 10.1080/21501203.2020.1741471
- Covert, S. F., Kapoor, P., Lee, M. H., Briley, A., y Nairn, C. J. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research*. Elsevier, 105(3). doi: 10.1017/S0953756201003872
- Damalas, C. A. y Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8. doi: 10.3390/ijerph8051402
- de la Cruz Quiroz, R., Cruz Maldonado, J. J., Rostro Alanis, M. de J., Torres, J. A., y Parra Saldívar, R. (2019). Fungi-based biopesticides: shelf-life preservation technologies used in commercial products. *Journal of Pest Science* 2019 92:3. Springer, 92(3). doi: 10.1007/S10340-019-01117-5
- Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G., y Mouriño-Pérez, R. R. (2010). Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology: FG & B. Fungal Genet Biol*, 47(7). doi: 10.1016/J.FGB.2010.03.004
- Echauri-Espinosa, R. O., Callejas-Negrete, O. A., Roberson, R. W., Bartnicki-García, S., y Mouriño-Pérez, R. R. (2012). Coronin Is a Component of the Endocytic Collar of Hyphae of *Neurospora crassa* and Is Necessary for Normal Growth and Morphogenesis. *PLoS ONE*. PLOS, 7(5). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0038237
- Egbuna, C., Sawicka, B., Tijjani, H., Kryeziu, T. L., Ifemeje, J. C., Skiba, D., y Lukong, C. B. (2020). Biopesticides, Safety Issues and Market Trends. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-819304-4.00004-X
- Fischer, R., Zekert, N., y Takeshita, N. (2008). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular microbiology*. *Mol Microbiol*, 68(4). doi: 10.1111/J.1365-2958.2008.06193.X
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., y Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 10. doi: 10.3389/FMICB.2019.02993/BIBTEX
- Garduño-Rosales, M., Callejas-Negrete, O. A., Medina-Castellanos, E., Bartnicki-García, S., Herrera-Estrella, A., y Mouriño-Pérez, R. R. (2022). F-actin dynamics following mechanical injury of *Trichoderma atroviride* and *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genetics and Biology*. Academic Press, 159. doi: 10.1016/J.FGB.2022.103672
- Garvalov, B. K., Zuber, B., Bouchet-Marquis, C., Kudryashev, M., Gruska, M., Beck, M., Leis, A., Frischknecht, F., Bradke, F., Baumeister, W., Dubochet, J., y Cyrklaff, M. (2006). Luminal particles within cellular microtubules. *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 174(6). doi: 10.1083/JCB.200606074/VIDEO-2

- González-Hernández, G. A., Padilla-Guerrero, I. E., Martínez-Vázquez, A., y Torres-Guzmán, J. C. (2020). Virulence Factors of the Entomopathogenic Genus *Metarhizium*. *Current protein & peptide science. Curr Protein Pept Sci*, 21(3). doi: 10.2174/1389203721666200116092407
- González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Bautista, E., Delgado-Sánchez, P., y Jiménez-Bremont, J. F. (2022). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances *Arabidopsis*, tomato, and maize plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry. Elsevier Masson*, 176. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2022.02.008
- Guimaraes, S. C., Schuster, M., Bielska, E., Dagdas, G., Kilaru, S., Meadows, B. R. A., Schrader, M., y Steinberg, G. (2015). Peroxisomes, lipid droplets, and endoplasmic reticulum “hitchhike” on motile early endosomes. *The Journal of cell biology. J Cell Biol*, 211(5). doi: 10.1083/JCB.201505086
- Hernández Saiz, A. I. (2022). Análisis de la dinámica de los microtúbulos en el hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*. [Tesis de Maestría en Ciencias]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.
- Hickey, P. C. y Read, N. D. (2009). *Imaging living cells of Aspergillus in vitro. Medical Mycology. Oxford Academic*, 47(SUPPL. 1). doi: 10.1080/13693780802546541/2/13693780802546541F0012G.GIF
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., y Read, N. D. (2004). *Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes and Confocal Microscopy. Methods in Microbiology. Academic Press*, 34. doi: 10.1016/S0580-9517(04)34003-1
- Hopke, A., Brown, A. J. P., Hall, R. A., y Wheeler, R. T. (2018). Dynamic Fungal Cell Wall Architecture in Stress Adaptation and Immune Evasion. *Trends in microbiology. Trends Microbiol*, 26(4). doi: 10.1016/J.TIM.2018.01.007
- Hubbard, M. A. y Kaminskyj, S. G. W. (2008). Rapid tip-directed movement of Golgi equivalents in growing *Aspergillus nidulans* hyphae suggests a mechanism for delivery of growth-related materials. *Microbiology (Reading, England). Microbiology (Reading)*, 154(Pt 5). doi: 10.1099/MIC.0.2007/014811-0
- Iwanicki, N. S., Pereira, A. A., Botelho, A. B. R. Z., Rezende, J. M., Moral, R. de A., Zucchi, M. I., y Delalibera Júnior, I. (2019). Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. *Scientific Reports 2019 9:1. Nature Publishing Group*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-38594-8
- Jones, M. D., Naylor, K., Jones, M. D., y Naylor, K. (2022). Simple to Complex: The Role of Actin and Microtubules in Mitochondrial Dynamics in *Amoeba*, *Yeast*, and *Mammalian Cells. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 23. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 23(16). doi: 10.3390/IJMS23169402
- Ketelaar, T., Meijer, H. J. G., Spiekerman, M., Weide, R., y Govers, F. (2012). Effects of latrunculin B on the actin cytoskeleton and hyphal growth in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology. Academic Press*, 49(12). doi: 10.1016/J.FGB.2012.09.008
- Khan, A. L., Hamayun, M., Khan, S. A., Kang, S. M., Shinwari, Z. K., Kamran, M., ur Rehman, S., Kim, J. G., y Lee, I. J. (2012). Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher

- growth and mitigates salt stress. *World journal of microbiology & biotechnology*. *World J Microbiol Biotechnol*, 28(4). doi: 10.1007/S11274-011-0950-9
- Kilwein, M. D. y Welte, M. A. (2019). Lipid droplet motility and organelle contacts. *Contact* (Thousand Oaks (Ventura County, Calif.)). NIH Public Access, 2(585). doi: 10.1177/2515256419895688
- Kuroiwa, T., Ohnuma, M., Imoto, Y., Misumi, O., Fujiwara, T., Miyagishima, S. Y., Sumiya, N., y Kuroiwa, H. (2012). Lipid droplets of bacteria, algae and fungi and a relationship between their contents and genome sizes as revealed by BODIPY and DAPI staining. *Cytologia*. Japan Mendel Society, 77(3). doi: 10.1508/CYTOLOGIA.77.289
- Lara-Rojas, F., Bartnicki-García, S., y Mouriño-Pérez, R. R. (2016). Localization and role of MYO-1, an endocytic protein in hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology: FG & B. Fungal Genet Biol*, 88. doi: 10.1016/J.FGB.2016.01.009
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., y Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd., 16(1). doi: 10.1186/S12934-017-0785-7/TABLES/5
- Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., y St. Leger, R. J. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied microbiology and biotechnology*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(16). doi: 10.1007/S00253-014-5788-2
- Lima, D. M. C. G., Costa, T. P. C., Emri, T., Pócsi, I., Pupin, B., y Rangel, D. E. N. (2021). Fungal tolerance to Congo red, a cell wall integrity stress, as a promising indicator of ecological niche. *Fungal biology*. *Fungal Biol*, 125(8). doi: 10.1016/J.FUNBIO.2021.03.007
- Lin, C. y Steinberg, G. (2017). Spatial organization of organelles in fungi: Insights from mathematical modelling. *Fungal Genetics and Biology*. Academic Press, 103. doi: 10.1016/J.FGB.2017.03.006
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., y Matsudaira, P. (2007). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- Lovett, B., Bilgo, E., Millogo, S. A., Ouattarra, A. K., Sare, I., Gnambani, E. J., Dabire, R. K., Diabate, A., y St. Leger, R. J. (2019). Transgenic *Metarhizium* rapidly kills mosquitoes in a malaria-endemic region of Burkina Faso. *Science* (New York, N.Y.). *Science*, 364(6443). doi: 10.1126/SCIENCE.AAW8737
- Maniania, N. K., Sithanatham, S., Ekesi, S., Ampong-Nyarko, K., Baumgärtner, J., Löhr, B., y Matoka, C. M. (2003). A field trial of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for control of onion thrips, *Thrips tabaci*. *Crop Protection*. Elsevier, 22(3). doi: 10.1016/S0261-2194(02)00221-1
- Morton, W. M., Ayscough, K. R., y McLaughlin, P. J. (2000). Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature cell biology*. *Nat Cell Biol*, 2(6). doi: 10.1038/35014075
- Mouriño-Pérez, R. R., Riquelme, M., Callejas-Negrete, O. A., y Galván-Mendoza, J. I. (2017). Microtubules and associated molecular motors in *Neurospora crassa*. <http://dx.doi.org/10.3852/15-323>. *Taylor & Francis*, 108(3). doi: 10.3852/15-323
- Navarro-Espíndola, R., Suaste-Olmos, F., y Peraza-Reyes, L. (2020). Dynamic Regulation of Peroxisomes and Mitochondria during Fungal Development. *Journal of Fungi*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 6(4). doi: 10.3390/JOF6040302

- Neuhaus, A., Eggeling, C., Erdmann, R., y Schliebs, W. (2016). Why do peroxisomes associate with the cytoskeleton? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1863(5). doi: 10.1016/J.BBAMCR.2015.11.022
- Olzmann, J. A. y Carvalho, P. (2018). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 20:3. Nature Publishing Group, 20(3). doi: 10.1038/s41580-018-0085-z
- Read, N. D. y Kalkman, E. R. (2003). Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology*. Academic Press, 39(3). doi: 10.1016/S1087-1845(03)00045-8
- 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., y Wedlich-Soldner, R. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature methods*. *Nat Methods*, 5(7). doi: 10.1038/NMETH.1220
- Roberson, R. W. (2020). Subcellular structure and behaviour in fungal hyphae. *Journal of Microscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 280(2). doi: 10.1111/JMI.12945
- Roberts, D. W. y St. Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc., 54. doi: 10.1016/S0065-2164(04)54001-7
- Salogiannis, J., Egan, M. J., y Reck-Peterson, S. L. (2016). Peroxisomes move by hitchhiking on early endosomes using the novel linker protein PxdA. *The Journal of cell biology*. *J Cell Biol*, 212(3). doi: 10.1083/JCB.201512020
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schultzhaus, Z., Quintanilla, L., Hilton, A., y Shaw, B. D. (2016). Live Cell Imaging of Actin Dynamics in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*. *Microsc Microanal*, 22(2). doi: 10.1017/S1431927616000131
- Seiler, S., Plamann, M., y Schliwa, M. (1999). Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Current Biology*. *Cell Press*, 9(15). doi: 10.1016/S0960-9822(99)80360-1
- Small, C. L. N. y Bidochka, M. J. (2005). Up-regulation of Prl, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological research*. *Mycol Res*, 109(Pt 3). doi: 10.1017/S0953756204001856
- St Leger, R. J. y Wang, J. B. (2020). *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. *Open biology*. *Open Biol*, 10(12). doi: 10.1098/RSOB.200307
- Steinberg, G. (2014). Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Current opinion in microbiology*. *Curr Opin Microbiol*, 20. doi: 10.1016/J.MIB.2014.04.001
- Steinberg, G. (2016). The mechanism of peroxisome motility in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier, 97. doi: 10.1016/J.FGB.2016.10.006

- Suelmann, R. y Fischer, R. (2000). Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell motility and the cytoskeleton. Cell Motil Cytoskeleton*, 45(1). doi: 10.1002/(sici)1097-0169(200001)45:1<42::aid-cm4>3.0.co;2-c
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Osmani, S. A., y Oakley, B. R. (2008). The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular biology of the cell. Mol Biol Cell*, 19(4). doi: 10.1091/MBC.E07-05-0464
- Takeshita, N. (2016). Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry*, 80(9). doi: 10.1080/09168451.2016.1179092
- Timonen, S. y Peterson, R. L. (2002). Cytoskeleton in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil. Springer*, 244(1–2). doi: 10.1023/A:1020209213524/METRICS
- Togo, Y., Higuchi, Y., Katakura, Y., y Takegawa, K. (2017). Early endosome motility mediates α -amylase production and cell differentiation in *Aspergillus oryzae*. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-16163-1
- Wang, J., Guo, X., Li, L., Qiu, H., Zhang, Z., Wang, Y., y Sun, G. (2018). Application of the Fluorescent Dye BODIPY in the Study of Lipid Dynamics of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecules (Basel, Switzerland). Molecules*, 23(7). doi: 10.3390/MOLECULES23071594
- Westermann, B. y Prokisch, H. (2002). Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology. Academic Press*, 36(2). doi: 10.1016/S1087-1845(02)00019-1
- Xiang, X. y Oakley, B. (2014). *The Cytoskeleton in Filamentous Fungi. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. John Wiley & Sons, Ltd.* doi: 10.1128/9781555816636.CH16