

Tesis defendida por
Sergio David Moreno Velásquez
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria

Director del comité

Dra. Rosa Reina Mouriño Pérez

Miembro del comité

Dr. Jorge Adrián Rosales Casián

Miembro del comité

Dra. Rufina Hernández Martínez

Coordinador

*Programa de Posgrado en Ciencias de la
Vida*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director

Dirección de Estudios de Posgrado

11 de octubre del 2012.

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



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

Análisis ultraestructural de la pared celular de cepas mutantes de *cdc-24* del
hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Tesis de Maestría

Presentado por:

Sergio David Moreno Velásquez

Ensenada, Baja California, México

2012

Resumen de la tesis de Sergio David Moreno Velásquez, presenta como requisito parcial para la obtención del grado de maestro en ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología. Ensenada, Baja California. Septiembre de 2012.

Análisis Ultraestructural de la Pared Celular de Cepas Mutantes de *cdc-24* en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Director de tesis

Durante el establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado en hongos filamentosos se acumulan y coordinan múltiples complejos proteicos en la zona apical, esto con la finalidad de asegurar que los componentes celulares se incorporen a la membrana plasmática y así biosintetizar nueva pared celular. En el hongo filamentoso *Neurospora crassa*, el factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) CDC-24, es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. Se ha reportado que la cepa mutante $\Delta cdc-24$ es letal y que mutantes condicionantes a temperatura muestran un crecimiento anormal con hifas muy afectadas en su morfología. Sin embargo, no existen estudios a nivel ultraestructural del arreglo intracelular de dichas mutantes. En el presente trabajo se determinó que las tres cepas mutantes de *cdc-24* (24-21, 10-19 y 19-3) de *N. crassa*, presentan grandes afecciones a nivel intracelular. Los análisis fenotípicos de las colonias correspondientes a las tres mutantes, mostraron un crecimiento lento, con aumento en el índice de ramificación, menor índice de conidiación y baja producción de biomasa. Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), se determinó un arreglo intracelular atípico con numerosos núcleos, mitocondrias y septos en la zona apical de las hifas y un aumento en el grosor de la pared celular, con más de 290 nm de espesor en las tres mutantes. Así mismo, mediante un análisis químico se determinó un aumento en la concentración de quitina para las tres cepas mutantes en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados demuestran que una alteración en el producto génico de *cdc-24* afecta considerablemente su función y por lo tanto se altera la cascada de señalización que da lugar a un crecimiento polarizado normal y que por lo tanto se afectan procesos tales como el crecimiento, morfogénesis, distribución de organelos y biosíntesis de la pared celular entre otros.

Palabras clave: *Neurospora crassa*, crecimiento polarizado, *cdc-24*, ultraestructura, pared celular.

Abstract of the thesis presented by Sergio David Moreno Velásquez as a partial requirement to obtain the master of science degree in Life Science with orientation in Microbiology. Ensenada, Baja California, Mexico. September, 2012.

Ultrastructural analysis of the cell Wall of mutants strains of *cdc-24* in the filamentous fungus *Neurospora crassa*

Accepted summary by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Director de tesis

During the establishment and maintenance of polarized growth in filamentous fungi, multiple protein complexes accumulate and coordinate in the apical zone in order to ensure that the cell components are incorporated into the plasma membrane and new cell wall is synthesized. In the filamentous fungus *Neurospora crassa*, the guanine nucleotide exchange factor (GEF) CDC-24, is essential for the establishment and maintenance of cell polarity. It has been reported that the mutant strain $\Delta cdc-24$ is lethal and the analysis of temperature-conditional mutants show an abnormal hyphal growth and are greatly affected in their morphology. However, there are no ultrastructural studies about the intracellular organization of these mutants. In this study it was determined that the three conditional mutant strains of *N. crassa*; *cdc-24* (24-21, 10-19 and 19-3) are greatly affected, showing intracellular changes. The phenotypic analysis of the three mutants showed colonies with very slow growth, with increased branching index, lower rate of conidiation and low biomass production. Transmission electron microscopy (TEM) revealed atypical intracellular arrangement with a large amount of nuclei, mitochondria and septa in the apical zone of the hyphae, also an increase in cell wall thickness, with more than 290 nm width. Likewise, it was determined by chemical analysis an increase in the concentration of chitin for the three mutant strains compared to the wild type strain. These results demonstrate that an alteration in the product of *cdc-24* significantly affects its function and therefore disrupts the signaling cascade that leads to a normal polarized growth and therefore affect processes such as growth, morphogenesis, and organelle distribution as well as cell wall biosynthesis among others.

Keywords: *Neurospora crassa*, polarized growth, *cdc-24*, ultrastructure, cell wall.

DEDICATORIA

A lo más importante en mi universo, MI FAMILIA.

Gracias por existir

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primera instancia al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyar a los jóvenes científicos a través de becas. Así mismo, al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por permitirnos realizar nuestros estudios de posgrado durante dos años con la finalidad de guiarnos como futuros científicos, facilitándonos las herramientas necesarias para comenzar a desarrollarnos humana y profesionalmente. Por otro lado, quiero agradecer a SEP-CONACyT por el financiamiento de este trabajo ya que gracias al proyecto de Ciencia Básica (CB-2011-2-169154) se llevó a cabo esta investigación. Agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Ernestina Castro Longoria y a los miembros de mi comité, Dra. Rosa Mouriño Pérez y al Dr. Jorge Rosales Casián por guiarme y apoyarme durante el transcurso de este trabajo de investigación. Por último, quiero agradecer a lo más importante en mi vida, mi rockera familia por su apoyo supremo, a mi Constanze por servir como inspiración en todo momento y a mis grandes amigos por su apoyo incondicional. *Gracias totales*

Contenido

	Página
Resumen español.....	2
Resumen inglés.....	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimientos.....	5
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tablas.....	10
1. Introducción.....	11
1.1 El quinto reino.....	13
1.2 Crecimiento polarizado.....	14
1.3 Rho GTPasas.....	17
1.4 Papel de la Cdc24.....	19
1.5 El moho rosa del pan, <i>Neurospora crassa</i>	22
1.6 Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i>	24
1.7 Arreglo intracelular de <i>Neurospora crassa</i>	25
1.8 Pared celular de <i>Neurospora crassa</i>	27
2. Justificación.....	29
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivos.....	30
5. Materiales y Métodos.....	31
5.1 Morfología macroscópica.....	32
5.2 Tasa de crecimiento.....	32
5.3 Índice de ramificación.....	32
5.4 Medición de biomasa.....	33

	Página
5.5 Índice de conidiación.....	33
5.6 Microscopía de contraste de fases.....	33
5.7 Microscopía confocal.....	34
5.8 Microscopía electrónica de transmisión.....	35
5.9 Determinación química de quitina.....	36
6. Resultados.....	37
6.1 Morfología macroscópica.....	37
6.2 Cinética de crecimiento.....	40
6.3 Microscopía de contraste de fases.....	45
6.4 Microscopía confocal.....	50
6.5 Microscopía electrónica de transmisión.....	52
6.5.1 Ultraestructura de la cepa silvestre de <i>N. crassa</i>	52
6.5.2 Ultraestructura de la cepa mutante condicional de <i>cdc-24 (24-21)</i>	54
6.5.3 Ultraestructura de la cepa mutante condicional de <i>cdc-24 (10-19)</i>	57
6.5.4 Ultraestructura de la cepa mutante condicional de <i>cdc-24 (19-3)</i>	60
6.6 Análisis cuantitativo de quitina.....	63
Discusiones.....	64
Conclusiones.....	74
Perspectivas.....	75
Referencias bibliográficas.....	75
Apéndice A.....	83
Apéndice B.....	84
Apéndice C.....	84
Apéndice D.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Resumen esquemático de las conexiones entre procesos involucrados durante el desarrollo polarizado (Modificado de Drees <i>et al.</i> , 2001).....	21
2	Esquema representativo de la hifa de <i>Neurospora crassa</i> (modificado de Riquelme <i>et al.</i> , 2011).....	26
3	Morfología macroscópica de la cepa silvestre (WT) y las cepas mutantes condicionales de <i>cdc-24</i> de <i>Neurospora crassa</i>	36
4	Vista estereoscópica de la morfología celular de la cepa silvestre (WT) y las cepas mutantes de <i>cdc-24</i> bajo diferentes temperaturas.....	39
5	Tasa de elongación micelial de la cepa silvestre (N-150) y las cepas mutantes <i>19-3</i> , <i>10-19</i> y <i>24-21</i>	40
6	Índice de ramificación de cepas de <i>Neurospora crassa</i>	42
7	Producción de biomasa (g/3 días) de la cepa silvestre N-150 y las cepas mutantes de <i>cdc-24</i>	43
8	Producción de conidias de la cepa silvestre N-150 y las cepas mutantes de <i>cdc-24</i>	44
9	Microscopía de contraste de fases de la cepa silvestre de <i>N. crassa</i>	45
10	Microscopía de contraste de fases de la cepa mutante <i>24-21</i> ...	46
11	Microscopía de contraste de fases de la cepa mutante <i>10-19</i> ...	47
12	Células maduras de la mutante <i>19-3</i> mediante microscopía de contraste de fases.....	48
13	Microscopía de fluorescencia de las cepas mutantes y la cepa control teñidas con calcofluor.....	49

Figura		Página
14	Microscopía confocal de las cepas de <i>N. crassa</i> bajo temperatura restrictiva, teñidas con FM4-64.....	51
15	Imagen de una sección ultrafina de la cepa silvestre N-150 de <i>Neurospora crassa</i> mediante microscopía electrónica de transmisión.....	53
16	Microscopía electrónica de transmisión de una delgada sección de la mutante de <i>cdc-24</i> (24-21) sometida a criofijación.....	55
17	Microscopía electrónica de transmisión de la cepa mutante de <i>cdc-24</i> (10-19) a las 3 h de incubación a temperatura restrictiva.....	58
18	Microscopía electrónica de transmisión de hifas de la cepa mutante de <i>cdc24</i> (19-3) bajo temperatura restrictiva.....	60
19	Concentración N-acetilglucosamina ($\mu\text{g/mL}$) de la cepa silvestre y las cepas mutantes de <i>cdc24</i> de <i>N. crassa</i>	63

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Cepas de <i>N. crassa</i> utilizadas en el presente estudio.....	31
2	Velocidad de crecimiento de las cepas mutantes de <i>cdc-24</i> con respecto a la cepa silvestre N-150.....	41

1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas eucariotas utilizan el crecimiento polarizado con el fin de realizar ciertas funciones necesarias tales como el transporte de nutrientes, señalamiento neuronal, crecimiento en tubos de polen, la elongación de los vellos radiculares de las raíces y la motilidad celular (Kost *et al.*, 1999; Sebok *et al.*, 1999; Sarner *et al.*, 2000; Cole y Fowler, 2006). Aunque estos sistemas comparten un origen en común, no todas las células presentan, una función, composición de pared celular y crecimiento como los hongos filamentosos. Los hongos son organismos pluricelulares, heterótrofos que se alimentan por absorción, la mayoría carecen de movilidad y estructuralmente cuentan con pared celular. La principal función de estos organismos en el ecosistema, conjuntamente con las bacterias, es la descomposición de materia orgánica (Curtis *et al.*, 2006) y una de sus características más sobresalientes es su arquitectura y forma de crecimiento.

Toda célula fúngica presenta varios periodos morfogénéticos: primeramente, la espora inactiva termina su estado de dormancia y se expande isotrópicamente. Durante su crecimiento isotrópico todo el material y la maquinaria requerida para generar nueva pared celular y membrana plasmática es dispersada a través del córtex celular. En una segunda etapa, se selecciona un punto determinado para la salida del tubo germinativo (selección del sitio de germinación). En el tercer paso, todo el material generado para la nueva pared y membrana es dirigido hacia el punto establecido y el tubo germinativo emerge (establecimiento de la polaridad). En los hongos filamentosos, toda la maquinaria continúa sintetizando material hacia el mismo punto y el tubo germinativo se extiende apicalmente hasta dar lugar a la hifa (mantenimiento de la polaridad) (Shimada *et al.*, 2000). Sin embargo, durante su ciclo de vida sigue generando nuevos puntos de polaridad que dará lugar a nuevas hifas (Momany, 2002) y posteriormente se generará la colonia fúngica.

Las proteínas involucradas en el rompimiento de la dormancia, crecimiento isotrópico y polarizado varían entre los hongos (d'Enfert, 1997; Wendland, 2001; Osherov, 2001). Estudios realizados con *Saccharomyces cerevisiae* arrojan la existencia de varias proteínas indirectamente necesarias durante el establecimiento y mantenimiento el crecimiento polarizado (Pruyne y Bretscher, 2000). La selección del punto correcto para el desplazamiento polar es sumamente importante y depende de varias señales externas tales como los iones calcio o feromonas, además, responde a señales internas, dentro de éstas existe una amplia gama de proteínas tales como, las Rho GTPasas, MAP kinasas, GAPs, PAKs y sus reguladores. Dentro de las Rho GTPasas se encuentra la proteína CDC-24, la cual funciona como un regulador molecular para CDC-42, dicha proteína ha sido estudiada principalmente en *S. cerevisiae* y está directamente involucrada en el establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado (Hartwell *et al.*, 1971).

Los hongos de tipo levaduriforme como *S. cerevisiae*, presentan una morfología esférica, es decir presentan un crecimiento isotrópico, sin embargo tienen la capacidad de crecer de manera polarizada para finalmente generar la célula hija (Pruyne y Bretscher, 2000). El crecimiento polarizado también se presenta durante la inducción del crecimiento pseudofilamentoso bajo condiciones específicas (disminución en la concentración de nitrógeno) o durante la reproducción sexual, en donde células haploides producen feromonas que funcionan como sustancias atrayentes, por lo que, afectan la morfología de la célula parental opuesta e inducen la proyección de un tubo de apareamiento.

En la actualidad existe suficiente información sobre los componentes implicados durante el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular en levaduras, así mismo se ha demostrado que varios de estos componentes son homólogos en hongos filamentosos. Sin embargo, en sistemas filamentosos tales como *Neurospora crassa*, se cuenta con poca información acerca de los detalles implicados durante la biogénesis de la pared celular, la actividad del citoesqueleto, la transducción de señales a nivel molecular y los estudios a nivel ultraestructural durante el crecimiento polarizado, por lo que existe un creciente interés en su estudio.

En el presente trabajo se estudió el arreglo intracelular de cepas mutantes termosensibles del gen *cdc-24*. Se exploraron las diferencias a nivel ultraestructural en la distribución de organelos, así como posibles anomalías a nivel de pared celular en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*.

1.1. El quinto reino

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, en su mayoría carentes de movilidad, estructuralmente cuentan con una arquitectura única en la naturaleza, determinada principalmente por la presencia de una pared celular compuesta de varias biomoléculas de origen glúcido y protéico, donde sobresale la quitina. La función principal de las células fúngicas dentro del ecosistema es la descomposición de materia orgánica (Curtis *et al.*, 2006), la mayor parte son saprófitos que absorben nutrientes de desechos orgánicos y organismos muertos (Solomon y Ville, 1998). Los hongos degradan materia, liberan agua, carbono y componentes minerales de los compuestos orgánicos participando en el reciclaje biológico. Algunos, establecen relaciones simbióticas de diversos tipos, como en las relaciones mutualistas presentes en las micorrizas, donde se asocia una raíz vegetal conjuntamente con un hongo (Herrera y Ulloa, 1990) o en la formación de líquenes, generados entre un hongo y un alga unicelular o cianobacteria.

Durante milenios, los hongos han sido utilizados para mejorar alimentos y bebidas destinadas al consumo animal, algunas especies ofrecen nuevas estrategias para el control biológico de las plagas y recientemente han sido utilizados en la regulación biológica de otros organismos (Brock *et al.*, 1998). También son ampliamente utilizados como productores de compuestos clínicos, tales como las ciclosporinas, antibióticos, hormonas, vitaminas, alcaloides, drogas anticancerígenas y ciertas enzimas (Bennett, 1998). En la industria son importantes para la obtención de ácidos orgánicos, tales como el ácido cítrico y el ácido fumárico y son utilizados para la producción de quesos, pan, cervezas y vinos. También existen cultivos para el consumo humano, como el caso de los champiñones y el hongo japonés entre otros (Herrera y Ulloa, 1990).

Existe una amplia variedad de organismos fúngicos capaces de afectar una amplia gama de seres vivos, como algas unicelulares, plantas superiores, protozoarios, mamíferos grandes, incluso al mismo ser humano (Curtis *et al.*, 2006); por lo anterior generan grandes pérdidas económicas en la agricultura (Agrios, 1997) y en la industria gastronómica al provocar contaminaciones tóxicas, incluso hasta mortales (Herrera y Ulloa, 1990).

1.2. Crecimiento polarizado

La polaridad celular es un proceso crítico para la función de muchos tipos de células y está involucrado en diversos procesos como el transporte de nutrientes, la diferenciación celular, la activación de respuestas inmunológicas, la señalización, la motilidad, la adhesión celular al sustrato y la división celular (Dubrin y Nelson, 1996; Casamayor y Snyder, 2002). El mecanismo general de polarización, responde a señales extracelulares e intracelulares, actuando en un sitio específico de la corteza celular en respuesta a una cascada de eventos, los cuales involucran receptores, proteínas, citoesqueleto y organelos, lo que resulta en la distribución asimétrica de los componentes celulares (Momany, 2002). En términos generales el crecimiento polarizado ocurre de la siguiente manera: primero se marca el sitio de crecimiento polarizado, seguido de la retransmisión de moléculas señalizadoras río abajo para establecer la polaridad, permitiendo la organización asimétrica del citoesqueleto y por último, el crecimiento polarizado es reforzado por la secreción dirigida de material *de novo* que permite la deposición de las moléculas necesarias para el crecimiento en el sitio elegido (Park y Bi, 2007).

Drubin y Nelson (1996) determinaron que la base del crecimiento polarizado radica en la expansión localizada de la membrana plasmática y el remodelamiento constante de la pared celular, generado por el aparato secretor, citoesqueleto y numerosas proteínas que comienzan a organizarse anisotrópicamente en la zona apical de la célula.

A su vez, estos componentes esenciales parecen estar interconectados, coordinados y regulados por una extensiva red de rutas señalizadoras, las cuales involucran fosfolípidos, proteínas cinasas, iones de calcio, especies reactivas de oxígeno (ROS) y pequeñas GTPasas (Cole y Fowler, 2006).

En la actualidad existe un gran número de estudios en diversos organismos con crecimiento polarizado, en donde las GTPasas de peso molecular pequeño tienen una función clave en la señalización de ciertas moléculas y se ha mencionado que están muy conservadas en levaduras, hongos filamentosos, plantas y animales tanto a nivel funcional como estructural (Park y Bi, 2007). La levadura de gemación *S. cerevisiae*, ha sido un modelo ideal para el estudio del crecimiento polarizado, ya que a lo largo de su ciclo de vida esta expuesta a varios episodios de polaridad en respuesta a diversos estímulos, es de fácil obtención y se cuenta con su genoma completamente secuenciado, por lo que ha sido objeto de manipulación genética (Casamayor y Snyder, 2002).

Existen dos tipos celulares en las levaduras: haploides (a) y (α); y la diploide (a/α). Ambas inician la gemación entrando a la fase G1 del ciclo celular, subsecuentemente el crecimiento de la yema es dirigido apicalmente, luego se torna isotrópico, es decir, aumenta la densidad de su citoplasma en toda las direcciones hasta alcanzar una determinada talla para después dar lugar a la división nuclear y la citocinesis (Herskowitz, 1988). En *S. cerevisiae* se promueven sitios de crecimiento polarizado, antes y durante la gemación, éste también es inducido durante el crecimiento pseudofilamentoso bajo condiciones específicas del medio (como disminución en la concentración de nitrógeno). Por otro lado, durante la reproducción sexual las células haploides producen feromonas, las cuales funcionan como atrayente, por lo que afectan la morfología de la célula parental opuesta e inducen la proyección de un tubo de apareamiento (Casamayor y Snyder, 2002; Herskowitz, 1988). Se ha mencionado que las células levaduriformes presentan el mismo patrón general de crecimiento polarizado encontrado en células de otros organismos (Bourne *et al.*, 1990).

En *S. cerevisiae* la GTPasa Rsr1 también llamada Bud1p, está involucrada en la selección del sitio específico donde empezará la polarización (Bender y Pringle, 1989). Una vez establecida la polarización, se requiere el ensamblaje de los componentes necesarios para la formación del brote, los cuales están bajo el control del regulador maestro Cdc42 (Adams *et al.*, 1990). Dicho regulador interactúa con varias proteínas efectoras tales como la profilina, cofilina, fimbrina y tropomiosina (Ziman *et al.*, 1993) con la finalidad de dirigir la polarización del citoesqueleto de actina y posteriormente la secreción de vesículas hacia el sitio de crecimiento. Por otro lado, Cdc42 requiere de un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) Cdc24 para ser activado, este regulador está encargado de unir funcional y físicamente ambas GTPasas (Bender y Pringle, 1989). En levaduras con delección de *rsr1*, se reportó la formación de brotes, sin embargo, éstos se posicionaron al azar a lo largo de la célula. Por otro lado, mutantes de *Cdc42* crecieron isotrópicamente, aumentando el número de núcleos y citoplasma, con una desorganización parcial de actina, lo cual sugiere que dichas proteínas son esenciales para la organización de los constituyentes celulares hacia el sitio del brote (Adams *et al.*, 1990). Además, mutaciones en sistemas levaduriformes que codifican GEFs y proteínas de activación de GTPasas (GAPs) para Bud1 (la GEF Bud5 y la GAP Bud2) y para Cdc42 (la GEF Cdc24), causan fenotipos similares a las mutantes *rsr1* y *Cdc42* (Bender, 1993; Chant, 1991).

Se sabe que existe un gran complejo de proteínas señalizadoras que se reúnen en el sitio cortical para la formación del brote. La proteína denominada Bem1 por ejemplo, está localizada en las puntas (Pringle *et al.*, 1995), la cual se encuentra en contacto con la Cdc24 y la Bud1 sirviendo como un andamio molecular (Zheng *et al.*, 1995) y Cdc42 a su vez, se une a un par de proteínas quinasas (Ste20 y Cla4), finalmente la Rab GTPasa Ses4 regula la secreción o exocitosis hacia la membrana plasmática, resultando el en crecimiento polarizado.

Recientemente los hongos filamentosos han generado creciente interés y su impacto en humanos nunca fue tan grande como lo es en el presente, esto debido a que son los más peligrosos devastadores de cultivos agrícolas a gran escala (Agrios, 1997), están alcanzando un notorio incremento en su habilidad de causar enfermedades infecciosas (Walsh *et al.*, 2004). Además, sus productos mantienen millones de dólares en la industria biotecnológica (Wainright, 1992).

Por otro lado, a diferencia de los hongos unicelulares, los hongos filamentosos sostienen tasas de crecimiento de al menos dos órdenes de magnitud mayor a las levaduras en la gemación o al proyectar la forma filamentosa (Trinci, 1973). Las hifas de los hongos crecen apicalmente, extendiendo su colonia radialmente a partir de su germinación y focalizando el sitio de crecimiento casi exclusivamente en la punta por medio de la secreción dirigida de vesículas, que llevan los precursores necesarios para la remodelación de la membrana y pared celular (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Bartnicki-García *et al.*, 1995).

1.3. Rho GTPasas

Las proteínas Rho pertenecen a la familia de las Ras de las proteínas G, las cuales son altamente conservadas en todos los sistemas eucarióticos. Son proteínas de unión a GTP, las cuales presentan cambios conformacionales dependiendo del nucleótido al cual se unirá (Wennerberg *et al.*, 2005). Son proteínas activas únicamente cuando están unidas a GTP y pueden interactuar con proteínas efectoras, por otro lado, cuando están unidas a GDP no pueden interactuar con sus moléculas blancas, por lo cual se les denomina como “switches moleculares” (Vetter y Wittinghofer, 2001).

Las Rho GTPasas muestran alta afinidad por las uniones GDP y GTP, sin embargo solo cuando están unidas a GTP sus regiones de cambio son expuestas, permitiéndoles interactuar con una variedad de proteínas blanco para llevar a cabo su función molecular (Bishop y Hall, 2000). Por otro lado, las proteínas Rho también tienen una actividad GTPasa intrínseca, por lo tanto pueden hidrolizar GTP a GDP, lo cual permite un cambio de conformación y la inactivación de la proteína.

La transición de GDP a GTP y viceversa de las proteínas Rho esta controlada por las GEFs, GAPs y GDIs. Las GEFs (factor de intercambio de nucleótido de guanina), actúan en el sitio de unión al nucleótido de la proteína Rho y facilita la liberación del nucleótido, generando su activación (Bos *et al.*, 2007). Alternativamente, las GAPs (proteínas activadoras de GTPasa) promueven la hidrólisis de GTP a GDP, mediante la reorientación de la molécula de agua necesaria para la hidrólisis. Las proteínas Rho son también reguladas por las GDIs (inhibidores de nucleótidos de disociación de guanina), los cuales sirven como reguladores negativos de las Rho GTPasas (DerMardirossian y Bokoch, 2005).

El número de GEFs y GAPs supera a las proteínas Rho (Bos *et al.*, 2007). Una simple Rho GTPasa puede ser regulada por más de una GEF y GAP (García *et al.*, 2006). También se ha reportado que una GEF y GAP pueden regular más de una proteína Rho. Trabajos recientes han reportado que la levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*, presenta dos GEFs para Cdc42, las proteínas Scd1 y Gef1, la primera regula el crecimiento apical y la segunda regula la citocinesis (Hirota *et al.*, 2003; Coll *et al.*, 2003). Las GEFs y GAPs, presentan multidominios capaces de unirse a otras proteínas o incluso a la membrana celular. Esto las posibilita en cambiar los estados de activación de las Rho GTPasas, además de servir como un andamio proteico en orden de acoplar señales río arriba con efectores río abajo y así localizarse directamente con las Rho GTPasas (Bos *et al.*, 2007).

1.4. El papel de Cdc24

Durante el establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado en levaduras se requiere de varias Rho GTPasas, las cuales son conservadas de levaduras a mamíferos (Hall, 1998; Etienne-Manneville, 2004). Los miembros de la familia Rho GTPasas incluyen las Rho, Rac y Cdc42. En *S. cerevisiae* han sido caracterizadas cinco tipos de Rho GTPasas, la Rho 1-4 y la Cdc42 (Schmidt y Hall, 1998), los cuales están encargadas de regular varios aspectos importantes durante el crecimiento fúngico, a través de la reorganización del citoesqueleto de actina (Park y Bi, 2007). La acumulación de la Rho GTPasa Cdc42 activa, es el paso clave en el establecimiento de la polaridad, esta proteína esta regulada por un factor de recambio de nucleótido de guanina (GEF), el Cdc24, el cuál fosforila a Cdc42, activándola y estableciendo el crecimiento polarizado. Se sabe también que Cdc42 y Cdc24 son requeridos para el reordenamiento del citoesqueleto de actina durante la emergencia del tubo germinativo (Johnson, 1999). En *S. cerevisiae* se ha reportado a Cdc24 como una proteína periférica de membrana y única GEF para Cdc42, ambos genes son esenciales y su pérdida resulta en células grandes, isotrópicas y multinucleadas, lo cual indica la inhabilidad de establecer un crecimiento polarizado (Harwell, 1971 y Adams *et al.*, 1990).

Durante la fase temprana G1, Cdc24 permanece secuestrada en el núcleo por la proteína Far1, lo cual evita la activación ectópica de Cdc42. La fosforilación de Far1 por la ciclina Cdc28 desencadena su degradación y libera a Cdc24 del núcleo (Nern y Arkowitz, 2000). La interacción de Bud1/Rsr1 con Cdc24 desata su correcta localización en el sitio seleccionado, formando un complejo proteico con Bem1, Bud1, Cdc42 y Cla4. En *S. cerevisiae* se ha reportado que Cdc24p es activado por el efector Cla4p en el sitio de crecimiento polarizado. Sin embargo, la mutación de los sitios de fosforilación de Cdc24p, no genera defectos durante el crecimiento vegetativo, lo cual sugiere que la fosforilación por Cla4p no es el principal regulador de Cdc24p. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la ciclina-dependiente de cinasa Cdc28p y Boi2p están involucrados en la regulación de Cdc24p (Cole *et al.*, 2009).

Por otro lado, en mutantes de *cdc3*, *cdc4*, *cdc7*, *cdc24* y *cdc28*, los cuales están involucrados durante el crecimiento polarizado en *S. cerevisiae*, se reportó un incremento en el porcentaje de quitina junto con otros componentes de la pared celular al ser expuestos a temperatura de 37 °C (Roberts *et al.*, 1983). En este mismo trabajo, se determinó la distribución de quitina mediante la lectina WGA-Au₁₇ y se observó una deposición de quitina en todo el perímetro de la célula durante el crecimiento isotrópico, sugiriendo que no existe una interdependencia entre el producto génico Cdc24 y la localización de quitina. Sin embargo, se menciona que existe una interacción entre ambos mecanismos ya que al carecer del correcto aparato direccional controlado por los productos del gen Cdc24, se deposita quitina al azar en dichas mutantes generando un desequilibrio en la homeostasis morfológica. Actualmente, existe poca información acerca del mecanismo molecular responsable del establecimiento de la polaridad celular y el mantenimiento del crecimiento hifal en hongos filamentosos.

Wendland y Philippsen (2001) caracterizaron en el ascomiceto *Ashbya gossypii*, cuatro Rho GTPasas, la RHO1, RHO3, CDC42 y su regulador CDC24, determinando que cada GTPasa juega un papel importante en los diferentes episodios durante el ciclo de vida. Se observó que las mutantes *Agcdc42* y *Agcdc24* mostraban fenotipos indistinguibles entre ellas y fueron similares a las mutantes condicionantes de *S. cerevisiae* bajo condiciones restrictivas de temperatura, mostrando células grandes, con filamentos de actina despolarizados y multinucleadas (Sloat *et al.*, 1981; Adams *et al.*, 1990).

Recientemente se reportó que el módulo RAC-CDC-42-CDC-24 es elemental para el establecimiento y mantenimiento de la morfología y crecimiento polarizado en *N. crassa*. Se determinó que CDC-24 funciona como un único GEF para RAC y para CDC-42, ya que la cepa mutante $\Delta cdc-24$ es letal y mutantes condicionantes de *cdc-24* mostraron múltiples formas altamente ramificadas, con pérdida parcial de crecimiento polarizado (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Por otro lado, no se tiene conocimiento sobre los cambios morfológicos que ocasiona la falta de dicha proteína a nivel ultraestructural y como la carencia de CDC-24 influye en la arquitectura de la pared celular en los hongos filamentosos.

Existen varios estudios sobre múltiples interacciones entre *cdc24* y varias proteínas pertenecientes a otros complejos importantes durante el desarrollo del crecimiento polarizado. Drees *et al.*, (2001) reportaron en *S. cerevisiae* la interacción de 110 proteínas, las cuales no solo están relacionadas durante el proceso de polarización, sino en diferentes procesos al mismo tiempo (Fig. 1); lo anterior sugiere posibles mecanismos coordinados de regulación en diversos puntos de la célula y que la mutación de alguna proteína involucrada en dichos mecanismos pudiera generar diversos defectos morfológicos durante el crecimiento polarizado.

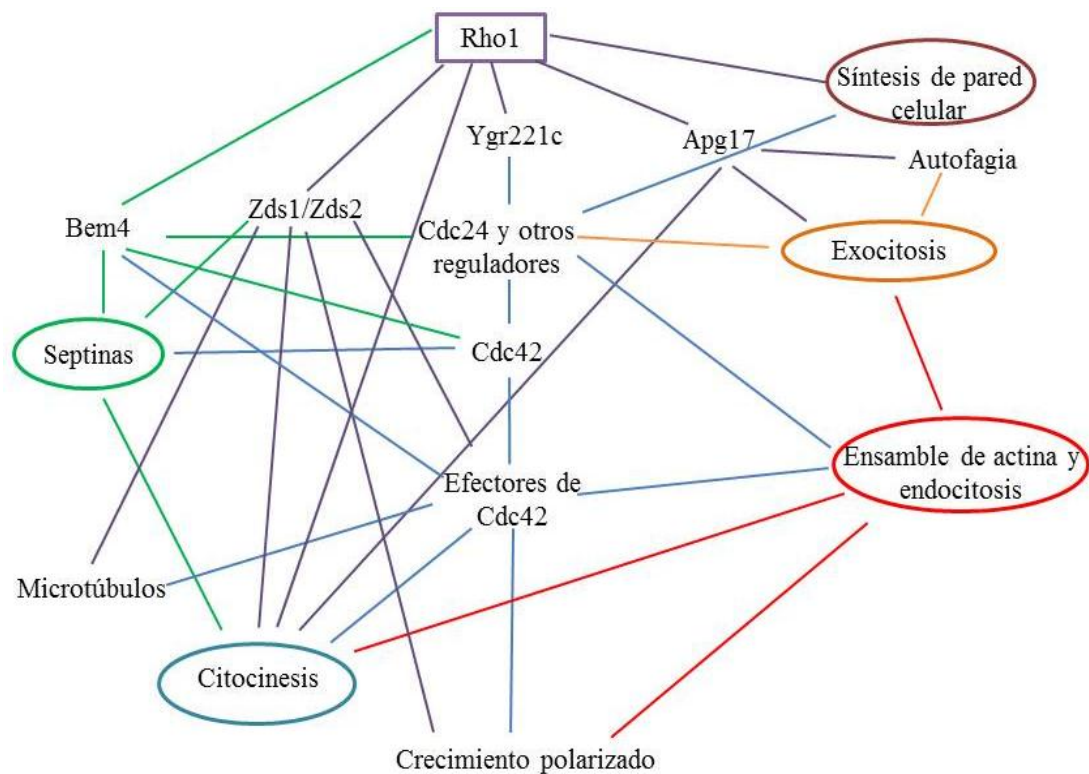


Figura 1. Resumen esquemático de las conexiones entre procesos involucrados durante el desarrollo polarizado. La línea azul representa la ruta involucrada con Cdc42; el color púrpura representa la ruta Rho; la ruta verde representa la organización de septinas; en rojo, ensamble de actina y endocitosis; amarillo, proceso de exocitosis, turquesa, citocinesis y café muestra la síntesis de la pared celular. Se observa como Cdc24 y otros reguladores pueden influir indirectamente a varios mecanismos durante el crecimiento polarizado (Modificado de Drees *et al.*, 2001).

1.5. El moho rosa del pan *Neurospora crassa*

Dentro de los ascomicetos, *N. crassa*, también conocido como el moho rosa del pan ha sido utilizado en múltiples experimentos por más de 85 años y ha inspirado en gran medida al desarrollo de la genética microbiana eucariota, comenzando una revolución molecular en la biología, demostrando que los genes codifican para proteínas (Beadle y Tatum, 1941).

Este microorganismo ha sido utilizado como un sistema biológico modelo debido a sus contribuciones en estudios de recombinación meiótica, ciclo circadiano, organización metabólica, biogénesis y función mitocondrial, en biología celular eucariota, estudio de heterocariósis, en el desarrollo sexual y mecanismos cromosómicos en hongos (Curtis *et al.*, 2006). Esto debido a que su biología es simple en comparación con otros organismos, por lo tanto, ofrece varias ventajas: su ciclo de vida es corto, presenta alta tasa de crecimiento ($>1 \mu\text{m/s}$) (Seiler y Plamann, 2003), es sencillo de cultivar, presenta fácil determinación genotípica de los cuatro productos de su meiosis, su genoma está secuenciado (aproximadamente 10, 000 genes) y durante la mayor parte de su vida es haploide (Perkins y Rowland, 2001). Genéticamente esta especie es importante, ya que cuando ocurre una mutación en su ciclo de vida haploide, los efectos se detectan inmediatamente, pues la carencia de un cromosoma homólogo impide que cualquier mutación sea enmascarada por el otro alelo no mutado (Curtis *et al.*, 2006). Dentro de su ciclo reproductivo, la meiosis ocurre en estructuras reproductoras con forma de saco (ascos), los cuales son células gigantes en donde la meiosis y mitosis posmeiótica ocurre en un citoplasma común, dando lugar a las ascosporas formadas en hileras, lo cual facilita su reconocimiento (Herrera y Ulloa, 1990).

El moho rosa, *N. crassa* es un organismo aerobio, filamentoso y está presente en varias partes del mundo (Herrera y Ulloa, 1990). Se ha reportado como un contaminante prolífico de panaderías, colonista de la vegetación quemada y un colonista común en los residuos procesados de caña de azúcar, no obstante, ha sido constituyente importante en las tortas de java llamados oncham (Perkins y Rowland, 2001).

Este ascomiceto, normalmente desarrolla colonias miceliales que consisten en una red de hifas interconectadas y multinucleadas. Las colonias crecen por extensión del ápice de la hifa, ramificando y estableciendo fusiones constantemente (Buller, 1933; Glass *et al.*, 2004), contiene septos con un poro central que permite el flujo de citoplasma y organelos; incluyendo núcleos que se mueven a lo largo de compartimentos y es utilizado en varias investigaciones relacionadas con el crecimiento polarizado (Riquelme *et al.*, 2011).

Actualmente se cuenta con más de 4,600 cultivos de *N. crassa* de poblaciones naturales disponibles en el Fungal Genetics Stock Center, las cuales carecen de patogenicidad para humanos (Perkins y Rowland, 2001).

La taxonomía de *N. crassa* es la siguiente: (Alexopolous, 1962)

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Sordariales

Familia: sordariaceae

Género: *Neurospora*

Especie: *crassa*.

1.6. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*

El hongo ascomiceto *N. crassa* se reproduce de forma asexual y sexual (Alexopoulos, 1962). Durante el ciclo asexual produce tres tipos de esporas asexuales: macroconidias, microconidias y arthroconidias; estas son liberadas al medio para colonizar un nuevo sustrato. Las macroconidias son células multinucleadas y se producen en forma de cadenas sobre conidióforos ramificados en hifas aéreas; en contraste, las microconidias son uninucleadas y son producidas sólo en las hifas vegetativas como una sola espora, por otro lado, las arthroconidias son esporas también multinucleadas, sin embargo, son producidas por septación holotática y por desarticulación de las hifas (Herrera y Ulloa, 1990).

Durante el ciclo sexual se genera una fusión de hifas vegetativas comúnmente denominadas **A** y **a** o por contacto gametangial de una espora masculina denominada espermacio, con una hifa femenina llamada tricógina. El proceso se lleva a cabo de la siguiente manera, una espora asexual del sexo opuesto (masculino) se fusiona con un pelo receptivo (tricógina) y el núcleo haploide de la espora masculina desciende por el pelo hasta fusionarse con un núcleo haploide del nódulo (Namboori, 2008). Este proceso se lleva a cabo dentro del órgano sexual femenino llamado ascogonio (Herrera y Ulloa, 1990). Seguidamente los núcleos fusionados sufren una serie de divisiones sincrónicas, se fusionan y generan meiocitos diploides. Estos meiocitos sufren meiosis y dan lugar a ascas que contienen ascosporas. En el ciclo normal de *N. crassa* se producen alrededor de 200 a 400 ascas y en cada una existen de 5 a 8 ascosporas (Perkins y Rowland, 2001). Posteriormente las esporas sexuales o ascosporas son expulsadas por el cuerpo fructífero o peritecio de manera que cada una de ellas puede originar por mitosis un nuevo individuo.

1.7. Arreglo intracelular de *Neurospora crassa*

La arquitectura intrínseca de la hifa está determinada principalmente por el citoesqueleto, el cual funciona como una plataforma que determina la organización, mantenimiento y movimiento de organelos (Riquelme *et al.*, 2002), los cuales a su vez están delimitados por acción de la pared celular, dando lugar a la morfología celular.

La célula fúngica contiene prácticamente todos los organelos encontrados en una célula eucariótica típica. Sin embargo, las estructuras y la distribución de dichos organelos no es uniforme en todas las partes de la hifa. Se ha reportado mediante microscopía electrónica de transmisión que la célula fúngica típica puede ser caracterizada en al menos cuatro regiones (Roberson *et al.*, 2010). Los primeros micrómetros (1-5 μm) corresponden a la parte de la hifa que contiene el Spitzenkörper, varias mitocondrias, ocasionalmente retículo endoplasmático liso (RE) y presenta cuerpos de Woronin (Fig. 2). Detrás de dicha región se encuentra un área de 2 a 4 veces más grande que contiene mitocondrias y varias cisternas de RE, sin embargo, carece de ciertos organelos importantes, tales como los núcleos (Riquelme *et al.*, 2011). La tercera región, se extiende hasta el primer septo, contiene una colección completa de organelos. La parte distal del septo corresponde al segmento más senil, el cual contiene todos los organelos, pero su estructura y abundancia es diferente de la que se observa en las regiones apicales y subapicales.

En años recientes *N. crassa* ha sido examinada por etiquetamiento mediante colorantes fluorescentes o proteínas específicas marcadas con fluorescencia (Bowman *et al.*, 2009, Freitag *et al.*, 2004). Los resultados de estos experimentos complementan las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, se presentan ciertas limitaciones, como el hecho de que la estructura interna y externa puede variar con diferentes regímenes de crecimiento (medio líquido, medio sólido). El arreglo intracelular también puede variar levemente en mutantes condicionantes o los cambios morfológicos pueden ser muy drásticos al deletar ciertos genes, que afecten tanto directa como indirectamente alguna ruta homeostática.

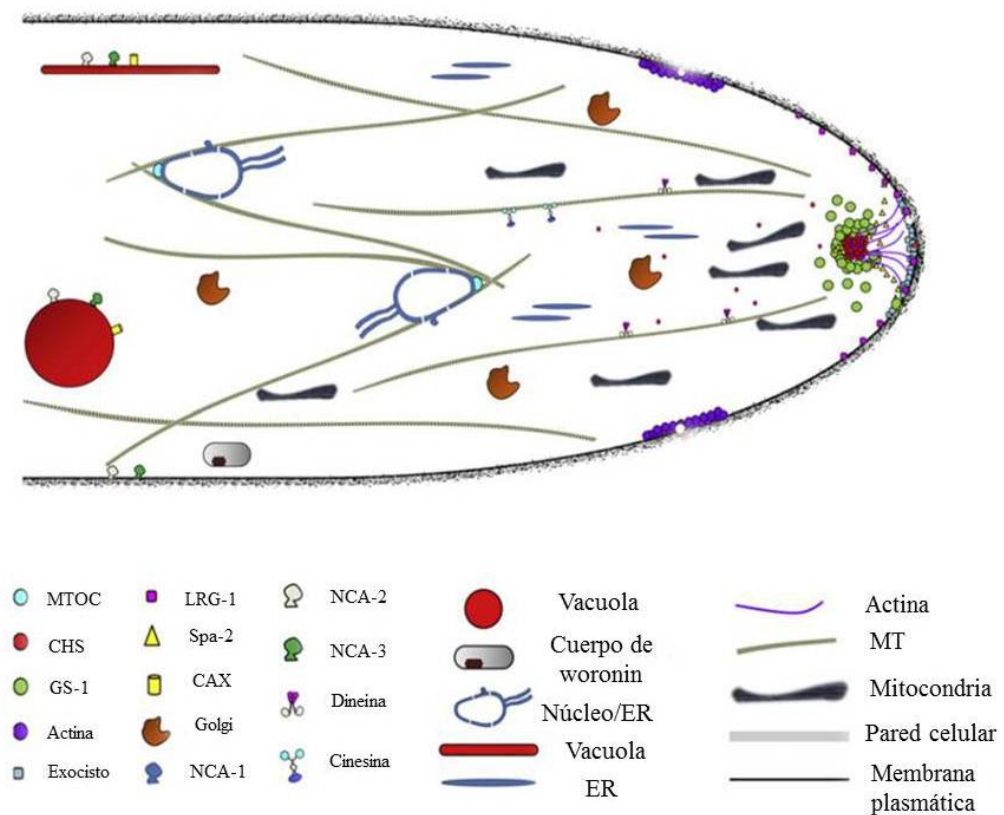


Figura 2. Esquema representativo de la hifa de *Neurospora crassa*, se muestra la distribución de organelos, el citoesqueleto y los factores de polaridad, basado en la localización de proteínas marcadas con proteínas fluorescentes. ER: retículo endoplasmático. MT: microtúbulos (modificado de Riquelme *et al.*, 2011).

1.8. Pared celular de *Neurospora crassa*

Un componente importante en los hongos filamentosos es la pared celular, ésta presenta un amplio rango de papeles esenciales durante la interacción del hongo con su medio ambiente (Gooday, 1995), además se encarga de regular la morfogénesis e integridad celular; es una estructura altamente dinámica que cambia de composición y arreglo durante diversos eventos celulares, tales como la expansión, división, germinación, ramificación y formación de septos en hongos filamentosos (Adams, 2004).

Dentro de sus funciones, protege de la abrasión, sustancias tóxicas o inflación restrictiva del citoplasma (Borkovich y Ebbole, 2010), estructuralmente sirve como andamio proteico, el cual a su vez protege las capas internas de polisacáridos, también provee funciones agresivas, al albergar moléculas tóxicas e hidrolíticas con la finalidad de invadir un nicho ecológico (Latgé, 2007). En levaduras la mayoría de las proteínas unidas covalentemente con azúcares, están involucradas en la formación de biopelículas, interacciones célula-célula, tales como floculación, apareamiento y adhesión a superficies (Verstrepen *et al.*, 2005). En *S. cerevisiae* se ha reportado que al menos el 20% de todo su genoma está directa o indirectamente involucrado en el mantenimiento de la pared celular (De Groot *et al.*, 2001). Los hongos filamentosos presentan un turgor de 10 atm, lo cual permite penetrar minerales y fuentes orgánicas (Money, 1999).

La pared celular de *N. crassa* ha mostrado estar constituida por dos complejos estructurales, el primero que constituye el 90% presenta fibras entrecruzadas de polisacáridos, los cuales incluye glucanos y quitina. El segundo contempla una matriz estructural constituida por mananos y proteínas (Borkovich y Ebbole, 2010). El principal componente fibroso es el glucano, el cual confiere elasticidad y fuerza tensil. La quitina es el segundo constituyente sacárido, está formado por cadenas lineales de β 1-4-acetilglucosamina, ésta provee la fuerza tensil necesaria para impedir su rompimiento tanto intracelular como extracelularmente.

Los polímeros de quitina son sintetizados por complejos enzimáticos de quitina sintasa, la cual pertenece a una familia de proteínas integrales de membrana con un peso molecular de 100-130 kDa (Roncero, 2002). La quitina es vectorialmente transportada al interior de la pared celular durante su síntesis al mismo tiempo que se generan enlaces entrecruzados dando lugar a su cristalización.

En levaduras se ha reportado que la quitina compone alrededor del 2% de la pared celular (Klis *et al.*, 2002), un porcentaje bajo comparado con los hongos filamentosos que abarca de 10-15 % (Roncero, 2002). A pesar de su papel esencial, su biosíntesis y regulación a nivel ultraestructural ha permanecido poco estudiada, especialmente entre hongos filamentosos debido principalmente a que es dinámica durante el crecimiento polarizado (Látge, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los hongos filamentosos son de suma importancia dentro de nuestra sociedad, esto al ser agentes de patogenicidad en plantas, animales o al mismo ser humano, así como también son importantes productores de compuestos orgánicos de uso biotecnológico. Estos organismos presentan crecimiento polarizado infinito mientras obtengan un sustrato adecuado. Esta capacidad de crecimiento altamente especializada requiere de proteínas reguladoras para la deposición adecuada de material encargado de la síntesis de nueva membrana y pared celular. Dichos procesos son altamente regulados y algunas proteínas como las GTPasas juegan un papel clave en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. Sin embargo, se cuenta con pocos estudios acerca de dichas proteínas. En *N. crassa* se ha reportado que la GTPasa Cdc-42 y su regulador Cdc-24 juegan un papel clave durante la morfogénesis celular. En particular, la cepa mutante $\Delta cdc-24$ es letal y mutantes condicionales de este gen presenta una morfología aberrante. Sin embargo, no se ha detallado a nivel ultraestructural los cambios morfológicos que resultan cuando esta proteína no está cumpliendo su función reguladora. Por lo tanto, en el presente estudio, utilizando microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión, se observaron mutantes del gen *cdc-24* y se analizó a nivel ultraestructural el arreglo intracelular y la morfología de la pared celular.

3. HIPÓTESIS

Las cepas mutantes de *cdc-24* en *N. crassa* presentarán alteraciones en la arquitectura celular, tales como, mala distribución de organelos, cambios en el grosor de la pared celular y alteraciones en la concentración de quitina.

4. OBJETIVOS

Determinar las diferencias en el fenotipo de las cepas mutantes condicionantes de *cdc-24* de *N. crassa*, comparando con la cepa silvestre.

Determinar mediante microscopía electrónica de transmisión el arreglo intracelular y la morfología de la pared celular en la cepa silvestre y en cepas mutantes de *cdc-24* en *N. crassa*.

Determinar las diferencias en la cantidad de quitina en la pared celular de cepas mutantes de *cdc-24* de *N. crassa*, en comparación con la cepa silvestre.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de *Neurospora crassa* que se utilizaron en este trabajo están contenidas en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *N. crassa* utilizadas en el presente estudio.

Nombre de la cepa	Sustitución de aminoácidos en el dominio PH/DH	Fuente
WT N-150		FGSC #11723
Mutante <i>cdc-24</i> (24-21)	Q264R	Araujo-Palomares <i>et al.</i> , 2011
Mutante <i>cdc-24</i> (10-19)	F254S	Araujo-Palomares <i>et al.</i> , 2011
Mutante <i>cdc-24</i> (19-3)	L444S	Araujo-Palomares <i>et al.</i> , 2011

Las cepas de *N. crassa* fueron mantenidas en medio mínimo de Vogel (MMV), el cual contiene sales de Vogel 1X, solución de elementos traza y biotina; sacarosa al 2% (w/v) y agua destilada (Vogel, 1956) solidificado con agar (DIFCO) al 1.5%. El medio fue previamente esterilizado en autoclave.

Para la obtención de conidias, el hongo se cultivó en matraces de 500 mL por triplicado, conteniendo MMV y se incubó a 28 °C. Una vez que el cultivo presentó gran cantidad de conidias, éstas se recolectaron mediante filtración con la adición de agua destilada estéril. Se centrifugó a 1,200 rpm para concentrarlas y se almacenaron en tubos de microcentrifuga a -20 °C como solución de trabajo.

5.1. Morfología macroscópica

Mediante imágenes digitales se determinó la morfología macroscópica de las cepas mutantes de *cdc-24* y se llevó a cabo la comparación con la cepa silvestre N-150. Para esto, se inocularon 10 μ L de conidias en medio MMV, se mantuvieron a 28 °C durante 24 h y al observarse germinación en las cepas mutantes, se incubaron a 37°C y se tomaron imágenes digitales bajo el microscopio estereoscópico cada 12 h hasta las 48 h.

5.2. Tasa de crecimiento

Para el monitoreo de las tasas de crecimiento entre la cepa tipo silvestre y las cepas mutantes de *cdc-24*, se marcó el diámetro de tres colonias de cada cepa cinco veces en un intervalo de tiempo de 6 h (n= 3 para todos los casos). Para estabilizar el crecimiento de las cepas mutantes de *cdc-24* se utilizó un disco micelial del margen de una colonia previamente cultivada y fue inoculada en MMV en una parte cercana a la periferia de la caja de Petri (d= 15 cm), se incubó a temperatura ambiente por 6 h, al germinar se transfirió a 37°C para inducir el fenotipo mutante y se monitoreó la tasa de crecimiento marcando el borde de la colonia cada 6 h.

5.3. Índice de ramificación

Para obtener el número de ramificaciones producidas por las cepas mutantes de *cdc-24* y la cepa silvestre, se empleó microscopía estereoscópica (SZXILLB2-100 marca Olympus). La captura de imágenes se realizó con un CCD (Olympus modelo DP70). Se inoculó cada cepa en cajas de Petri con MMV agar 1.5% y se incubó a 28°C durante 24 h, al germinar las cepas mutantes se incubaron a temperatura restrictiva (37°C) durante 3 h. Se tomaron imágenes del margen de la colonia directamente de la placa de agar. El índice de ramificación se obtuvo calculando el promedio de formación de ramas cada 200 μ m, considerando desde la punta hasta la región basal.

5.4. Medición de Biomasa

Para obtener la biomasa en peso seco, las cepas mutantes de *cdc-24* y la cepa silvestre N-150, se inocularon en cajas de Petri con MMV agar 1.5% sobre una membrana de diálisis (las membranas fueron previamente pesadas), ésta fue cortada al diámetro de la caja. Las membranas fueron lavadas con agua destilada y hervidas en una solución quelante de EDTA y fueron esterilizadas en autoclave.

Las membranas se colocaron en MMV y se inoculó 10 μ L de esporas de cada cepa por separado. Se incubaron a 28°C durante 24 h y se transfirieron a temperatura restrictiva (37°C) durante 48 h, con la finalidad de inducir el fenotipo mutante. La membrana con micelio fue desprendida del medio, fue secada a 60°C y se pesó nuevamente para obtener la diferencia entre el peso inicial y el peso final.

5.5. Índice de conidiación

Se cuantificó la cantidad de conidias producidas por la mutante *cdc-24* y fue comparada con la cepa silvestre. Para esto, se inocularon 10 μ L de conidias de cada cepa en MMV, se incubaron a 28 °C durante 24 h, posteriormente las placas fueron transferidas a 37 °C por 24 h. Las conidias producidas fueron recuperadas en Sorbitol 1 M. Se cuantificó el número de conidias/mL mediante la cámara Neubauer bajo microscopía de campo claro (Olympus signo R).

5.6. Microscopía de contraste de fases

Con la finalidad de observar la dinámica interna y el crecimiento celular de manera más detallada, se realizaron observaciones de hifas maduras mediante microscopía de contraste de fases (microscopio invertido, Axiovert 200, Carl Zeiss). Se inocularon 10 μ L de conidias de cada cepa en MMV a 28°C durante 24 h, el micelio obtenido fue transferido a temperatura restrictiva por 3 h y se realizaron observaciones utilizando la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2002), en la que se realizó un corte de la zona del margen de la colonia y se colocó de manera invertida sobre un cubreobjetos.

Con la finalidad de analizar la pared celular y formación de septos se generaron imágenes de fluorescencia con el fluoróforo calcofluor (Abs/Em 514/670 nm) el cual marca los residuos de N-acetilglucosamina presente en la pared celular. Se colocaron 15 μ L de calcofluor (25 μ M) sobre un cubreobjetos y se empleó la técnica de bloque invertido para realizar las observaciones correspondientes.

5.7. Microscopía confocal

Para el análisis de las cepas de *N. crassa* utilizadas en este estudio, se inocularon conidias en MMV sólido que fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 h, el micelio obtenido fue transferido a temperatura restrictiva por 3 h y se realizaron observaciones utilizando la técnica de bloque invertido mediante microscopía confocal.

Las observaciones y análisis se llevaron a cabo en un microscopio confocal (LSM510 Meta Carl Zeiss®) con los objetivos 100X (N.A. 13, Plan Neofluar). Para detectar la presencia de estructuras membranosas se utilizó el colorante vital FM4-64 (Molecular probes, invitrogen®), el cual permite analizar en detalle procesos tales como la endocitosis, tráfico de vesículas secretoras y al Spitzenkörper. La solución de trabajo se preparó a una concentración 25 μ M en dimetilsulfóxido 100% (DMSO), el cual fue diluido en MMV. Se colocaron 10 μ L de FM4-64 sobre un cubreobjetos, las muestras fueron colocadas de acuerdo al método del bloque de agar invertido. Como fuente de iluminación se utilizó el láser Argon-2 con una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 670 nm.

5.8. Microscopía electrónica de transmisión

Para determinar el arreglo intracelular de las cepas mutantes de *cdc-24* comparada con la cepa silvestre, se realizaron observaciones a escala ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión. Para esto, el hongo fue crecido en membrana de diálisis en MMV, por 24 h a 28°C y fueron transferidos por 3 h a temperatura restrictiva. La membrana con el micelio fue cortada cerca de la zona apical en piezas de aproximadamente 1 cm².

Las muestras fueron criofijadas en propano líquido, conservado en nitrógeno líquido y posteriormente se realizó la sustitución por congelación, en la que las muestras se incubaron en una solución de acetona con acetato de uranilo (0.05%) y tetraóxido de osmio (2%) por 72 h a -85°C. Posteriormente las muestras fueron llevadas a -20°C durante 4 h, luego se incubaron a -4°C por 4 h y se pasaron a temperatura ambiente por 30 min. Las muestras se lavaron tres veces en acetona anhidra y fueron deshidratadas a diferentes concentraciones de acetona. Las muestras fueron infiltradas en resina Spurr's a diferentes concentraciones resina/etanol anhidro (15, 30, 60, y 90 % por 4 h; y se realizó una infiltración al 100 % de resina durante la noche).

Las muestras fueron embebidas en resina al 100% y se llevó a cabo la polimerización a 60 °C por 24 h. Se realizaron cortes finos de 70 nm de espesor mediante ultramicrotomo (LEICA ULTRACUT R). Las muestras fueron sometidas a una segunda tinción con acetato de uranilo al 1% por 10 min y citrato de plomo Reynolds al 1% por 5 min, se realizaron observaciones mediante un microscopio electrónico de transmisión (HITACHI H- 7500) a 80 keV.

Para la presentación de imágenes, todas las fotografías fueron digitalizadas y procesadas en Photoshop 6.0 (Adobe System).

5.9. Determinación química de quitina

Para cuantificar el contenido de quitina en el micelio de la cepa silvestre y las cepas mutantes, se utilizó el método de Morgan- Elson (1934). Se inocularon 10 μL de conidias en MMV líquido y se incubaron a 30°C por siete días, el micelio cosechado fue filtrado y liofilizado. Se incubaron 10 mg de micelio por 20 h a 100°C en una solución HCl (6 N). La solución fue calentada por 5 h a 100°C.

Se re-suspendió en 1 mL de agua y se centrifugó a 16,000 por 15 min. Se tomó una alícuota de 100 μL del supernadante de cada muestra y se mezcló en 100 μL de Na_2CO_3 al 1.5 M en acetyl-acetona al 4% (w/v). Estándares de N-acetilglucosamina fueron preparados en una solución de trabajo de 10 mg/mL en agua destilada. Las muestras se incubaron a 100 °C en un termociclador por 20 min y luego fueron refrigeradas a temperatura ambiente. Para las muestras y estándares, se agregó 700 μL de etanol al 95%, seguido por 100 μL de p-dimetilaminobenzaldehído disuelto en 30 mL de HCl (12 N) y 30 mL de etanol al 100%. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 1 h y se realizaron lecturas de absorbancia a 520 nm mediante espectrofotometría de Uv-vis (JENWAY 6505 Uv/Vis).

6. RESULTADOS

6.1 Morfología macroscópica

Las observaciones macroscópicas durante el crecimiento colonial de las mutantes condicionantes de *cdc-24* y de la cepa silvestre fueron comparadas en cultivos incubados durante 48 h (Fig. 3). Durante las primeras 12 h de incubación a temperatura ambiente, la cepa silvestre presentó un crecimiento colonial constante, sin embargo, las cepas mutantes no presentaron crecimiento. A las 24 h de incubación la cepa silvestre continuó creciendo abarcando aproximadamente la mitad de la caja de Petri (Fig. 3A), por otro lado, las cepas mutantes presentaron colonias con crecimiento parcialmente polarizado. Al corroborar el crecimiento de las cepas mutantes a las 24 h, las muestras fueron transferidas a temperatura restrictiva (37°C) para expresar la mutación de *cdc-24*. A las 24 h de incubación, la cepa silvestre no presentó alteraciones en su morfología abarcando el total de la caja de Petri (Fig. 3B). Las cepas mutantes presentaron un ligero crecimiento, las colonias mostraron bordes irregulares, gran cantidad de hifas aéreas y abultamientos en varias zonas de la colonia; no se observó algún patrón de direccionalidad, lo cual generó una colonia amorfa a simple vista (Fig. 3B).

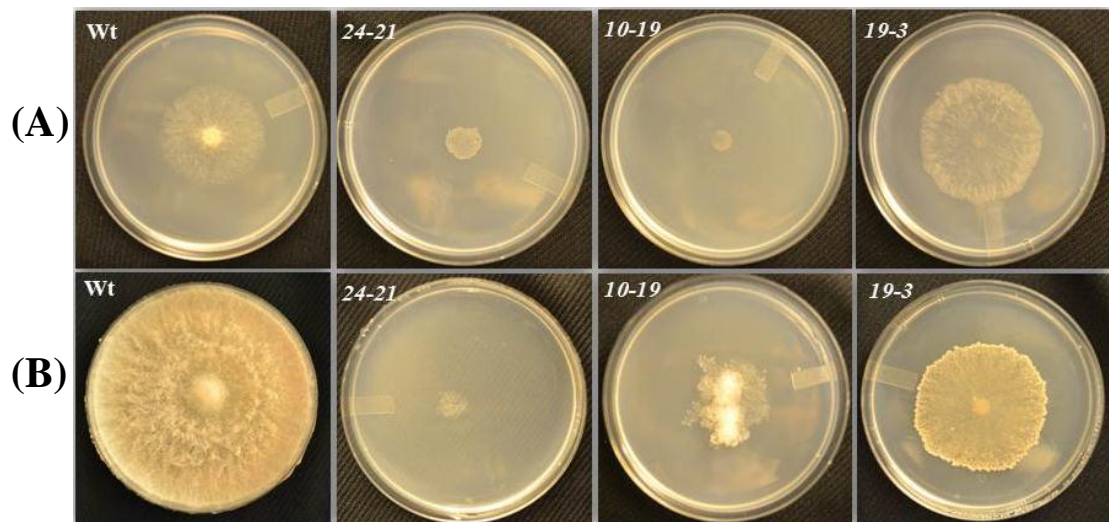


Figura 3. Morfología macroscópica de las colonias de *N. crassa*, cepa silvestre (WT) y cepas mutantes condicionales de *cdc-24*. (A) cultivos incubados a temperatura ambiente (TA); (B) cultivos transferidos a temperatura restrictiva (TR) después de 24 h a TA.

Conjuntamente con las observaciones morfológicas a nivel colonia, se realizó un monitoreo a bajo aumento durante las primeras 24 h de crecimiento a temperatura ambiente mediante microscopía estereoscópica (Fig. 4A). La cepa silvestre mostró un crecimiento constante y lineal, totalmente polarizado. Presentó gran número de hifas primarias y pocas ramificaciones cercanas al ápice. Las cepas mutantes presentaron crecimientos alterados, la cepa *24-21* mostró un crecimiento parcialmente polarizado, pocas hifas primarias, las cuales se presentaban muy separadas entre sí, además, presentaron pocas ramificaciones con un patrón de crecimiento curvado. La cepa *19-3*, exhibió un crecimiento lineal, con distribución de septos similar a la cepa silvestre, sin embargo, presentó un menor número de hifas, pocas ramificaciones y grandes espacios vacíos sin colonizar entre cada hifa. Por último, la cepa mutante *10-19* presentó pocas hifas, muy separadas entre sí y con un mayor número de ramificaciones, en general mostraron un fenotipo similar a bajo aumento.

Después de 24 h de crecimiento a temperatura ambiente, las muestras se incubaron a 37 °C por 24 h con el fin de expresar el fenotipo mutante (Fig. 4B). Bajo temperatura restrictiva, la cepa silvestre continuó creciendo de manera polarizada y no mostró alteraciones morfológicas. Sin embargo, las cepas mutantes presentaron diversas afecciones morfológicas. La cepa *24-21* mostró gran cantidad de estructuras parcialmente isotrópicas a lo largo de la hifa, además se observaron ramificaciones cercanas a la punta acompañadas de un crecimiento denso de hifas generando estructuras aglutinadas. En la cepa *19-3* se determinó un fenotipo similar a la cepa silvestre, sin embargo, presentaba una serie de ramificaciones emergentes de un solo lado de la hifa. Por último, la cepa *10-19* exhibió mayor número de ramificaciones compactas en varios puntos alrededor de la hifa, generando estructuras similares a un árbol cercanas a la zona apical. Este crecimiento altamente ramificado y parcialmente isotrópico en la zona apical, generaron colonias compactas y amorfas observadas a simple vista (Fig. 3B).

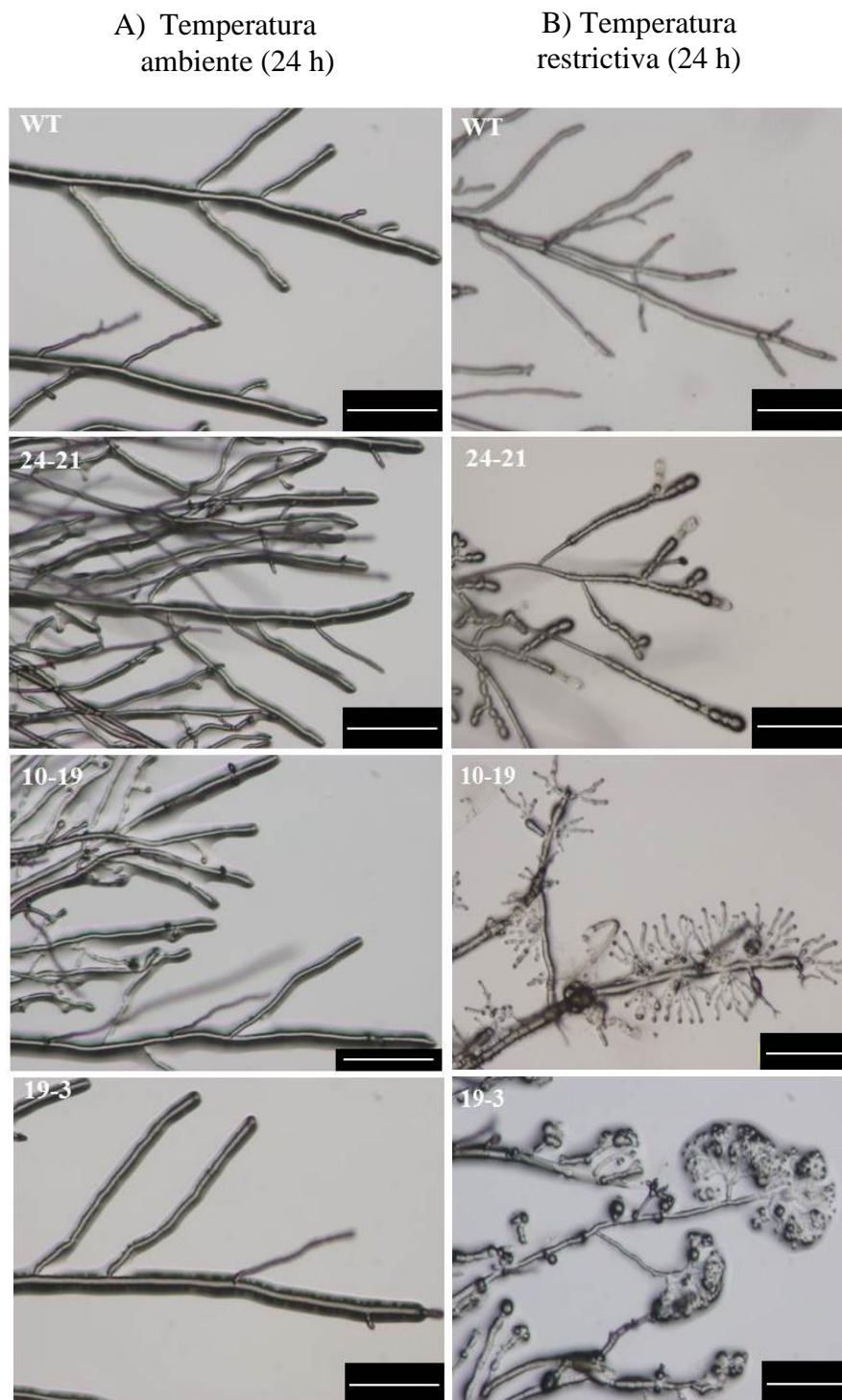


Figura 4. Vista estereoscópica de la morfología celular de la cepa silvestre (WT) y las cepas mutantes de *cdc-24* bajo diferentes temperaturas. Las barras de escala representan 100 μm .

6.2 Cinética de crecimiento

Para establecer cuantitativamente las diferencias de crecimiento entre las cepas mutantes de *cdc-24* y la silvestre, se midió la tasa de elongación micelial (Fig. 5).

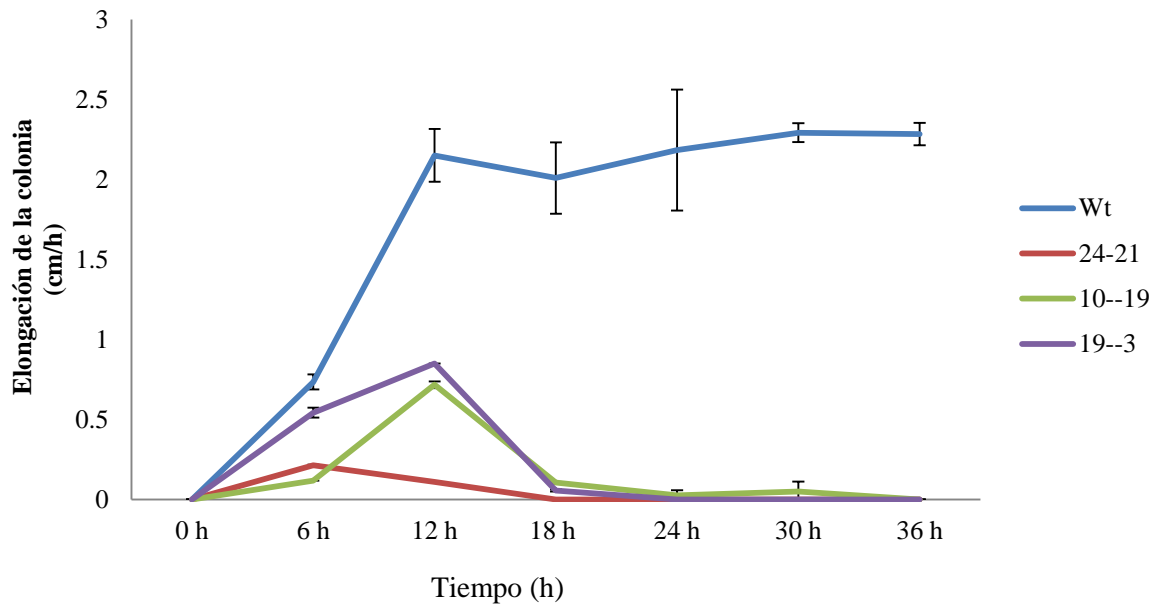


Figura 5. Elongación de la colonia de la cepa silvestre (N-150) y las mutantes de *cdc-24* 19-3, 10-19 y 24-21. Después de las primeras 6 h las cepas fueron incubadas a 37 °C, para expresar la mutación. Las barras de error representan los intervalos de confianza al 95%.

Todas las cepas crecieron durante las primeras 6 h a temperatura permisiva, sin embargo, al cambiar la temperatura, se observó una tasa de crecimiento alterada, la cepa silvestre fue afectada levemente durante las primeras horas de incubación a 37°C. Sin embargo, a las 6 h recuperó su crecimiento normal alcanzando el margen de la caja de Petri en 36 h. Por otro lado, las cepas mutantes presentaron un ligero crecimiento durante las primeras 6 h bajo temperatura restrictiva, aunque después, presentaron crecimiento casi nulo, inclusive después de 5 días de incubación.

Por medio de los resultados obtenidos de las comparaciones de tasas de crecimiento de las cepas mutantes *24-21*, *10-19* y *19-3*; y el control tipo silvestre N-150, se determinó la tasa de crecimiento para cada cepa en μmin^{-1} (Tabla 2).

Tabla 2. Tasa de crecimiento de las cepas mutantes de *cdc-24* con respecto a la cepa silvestre N-150.

Cepa	$\mu\text{m}/\text{min}$ (25 °C)	$\mu\text{m}/\text{min}$ (37 °C)*
Control wt-N150	37.5 ± 1.4	40.5 ± 2.6
<i>cdc-24 - 24-21</i>	$12.5 \pm .24$	$4.45 \pm .08$
<i>cdc-24-10-19</i>	22.9 ± 2	$8.6 \pm .27$
<i>cdc-24 - 19-3</i>	35 ± 4.1	$13.4 \pm .25$

*Valores obtenidos a las 6 h de incubación a temperatura restrictiva.

Por otra parte, se realizaron observaciones sobre la morfología de la colonia y de sus márgenes bajo temperatura restrictiva, se determinó un incremento en la frecuencia de ramificaciones. Se encontraron diferencias en las tasas de ramificación para las mutantes de *cdc-24* (n= 30), primeramente las cepas mutantes *24-21*, *10-19* y *19-3* presentaron alrededor de 1 ± 0.76 , 3 ± 0.96 y 0.83 ± 0.87 (media \pm desviación estándar) ramas cada 200 μm respectivamente. Por otro lado, la cepa silvestre (n= 30) mostró alrededor de 1 rama cada 200 μm (Fig. 6). Se observó que la cepa mutante *10-19* presentó tres veces más ramas cercanas a la zona apical que la silvestre y las otras dos mutantes, *24-21* y *19-3* presentaron un patrón de ramificación similar a la WT.

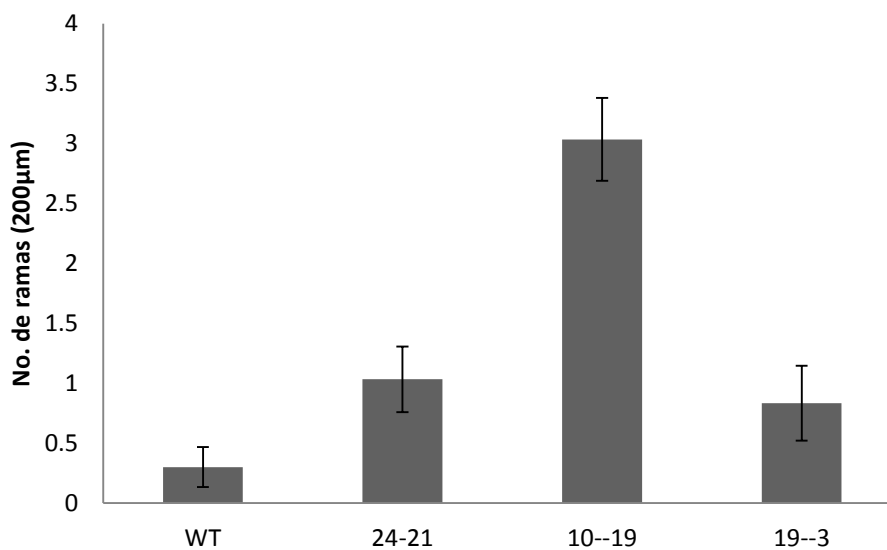


Figura 6. Índice de ramificación de cepas de *N. crassa* incubadas durante 24 h a temperatura restrictiva. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%.

Otro aspecto de la cinética de crecimiento considerada, fue la producción de biomasa a las 72 h de crecimiento (Fig.7). La biomasa producida por la cepa silvestre fue de $0.36 \pm .04$ g a los 3 días de incubación, las cepas mutantes de *cdc-24* (24-21, 10-19, 19-3) bajo las mismas condiciones presentaron un peso de 0.15 ± 0.03 , 0.13 ± 0.01 y 0.1 ± 0.01 g respectivamente. Estos datos mostraron que la cepa silvestre produjo aproximadamente el doble de biomasa en peso seco a los 3 días de incubación.

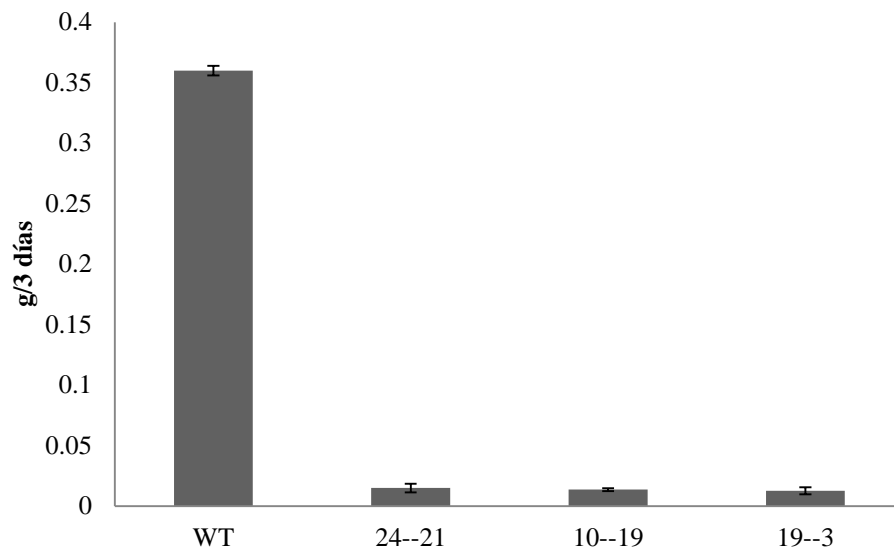


Figura 7. Producción de biomasa (g/3 d) de la cepa silvestre N-150 y cepas mutantes de *cdc-24* bajo temperatura restrictiva después del primer día de incubación a temperatura ambiente. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%.

Se determinó la producción de conidiación de la cepa silvestre y las cepas mutantes (Fig. 8). Después de incubar las cepas por 24 h a temperatura ambiente, se incubó por 24 h a temperatura restrictiva para mostrar el fenotipo aberrante. Para la cepa mutante *24-21* se obtuvo $1.8 \pm .72 \times 10^5$ conidias/mL, la cepa *10-19* presentó una producción de $8.66 \pm 1.17 \times 10^5$ conidias/mL y por último la cepa *19-3* generó $3.73 \pm .3 \times 10^5$ conidias/mL. Por otro lado, la cepa silvestre mostró una producción de $62.4 \pm 6.3 \times 10^5$ conidias/mL, generando alrededor de ocho veces más conidias con respecto a las cepas mutantes, en donde la más afectada fue la cepa *24-21*, seguida por la cepa *19-3* y la menos afectada fue la cepa *10-19*.

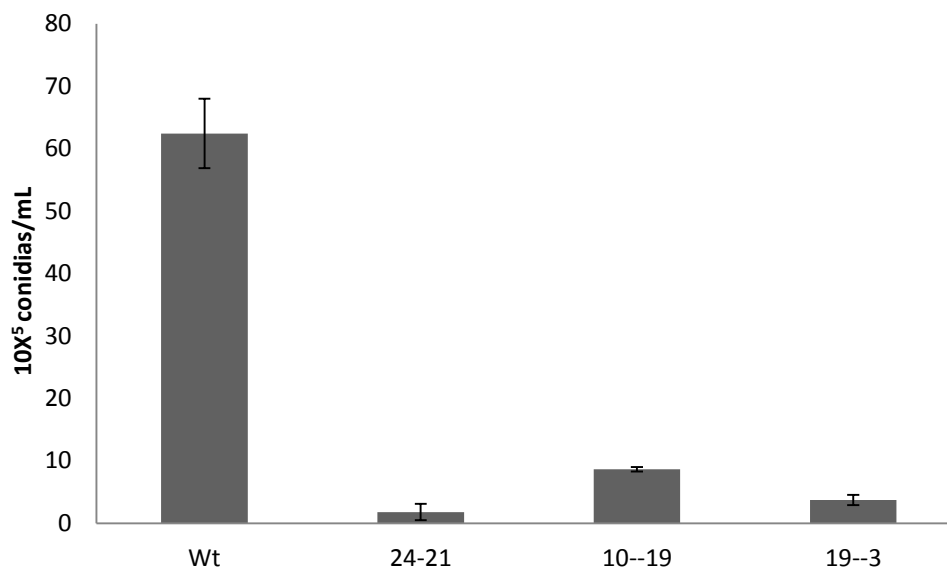


Figura 8. Producción de conidias de la cepa silvestre N-150 y las cepas mutantes de *cdc-24* incubadas por 24 h a temperatura permisiva, seguidas por una incubación de 24 h a temperatura restrictiva. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%.

6.3. Microscopía de contraste de fases

Con respecto a la dinámica interna de las células fúngicas, se realizaron observaciones de la zona apical de hifas maduras mediante microscopía de contraste de fases a alto aumento. Las cepas mutantes mostraron gran cantidad de abultamientos cercanos al ápice al exponerse a temperatura restrictiva, lo cual generó regiones celulares muy densas, dificultando su visualización mediante contraste de fase, por lo tanto, todas las cepas fueron incubadas a 37 °C por 3 h, con el fin de obtener un fenotipo mutante observable en la zona apical.

Las hifas maduras de *N. crassa* de la cepa silvestre N-150, presentaron una morfología normal mostrando un crecimiento altamente polarizado. Se observó movimiento anterógrado de citoplasma hacia la zona apical, con desemboque en un bien definido Spitzenkörper, el cual presentó gran estabilidad al mantenerse visible en el ápice, incluso con el incremento de la temperatura (Fig. 9).

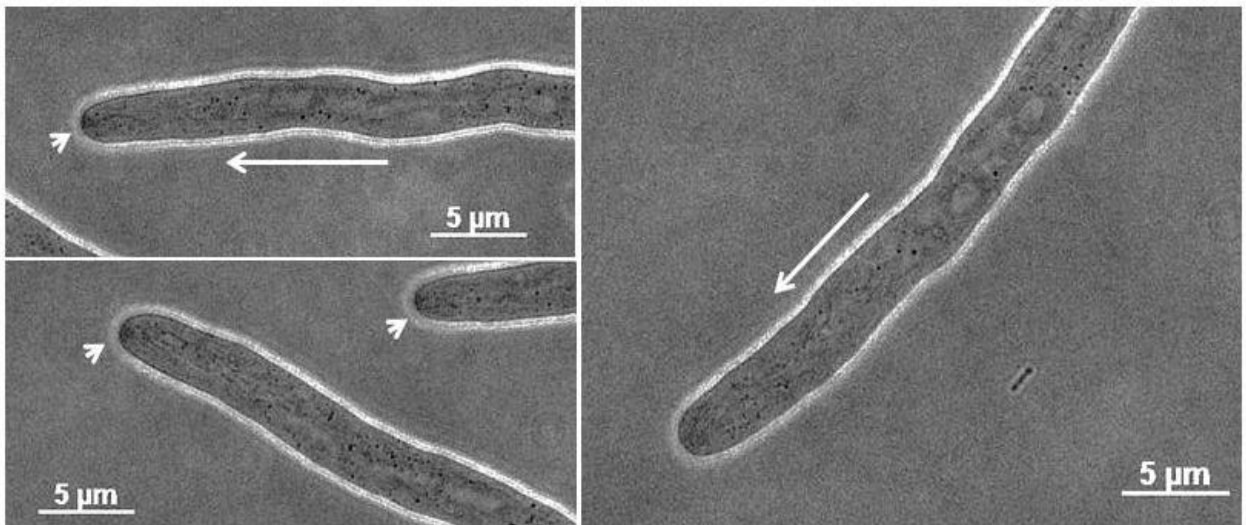


Figura 9. Microscopía de contraste de fases de la cepa silvestre de *N. crassa* incubada bajo temperatura restrictiva. Las flechas indican el constante movimiento anterógrado de citoplasma hacia la punta, el cual desemboca en el Spitzenkörper (cabeza de flecha).

La cepa mutante *24-21*, presentó el crecimiento más lento de todas las cepas estudiadas, se apreció un citoplasma altamente denso, con movimiento lento. Las hifas tardaron en recuperarse al ser expuesta a temperatura permisible, en comparación con todas las cepas de estudio. Las células mostraron ser parcialmente polarizadas, resaltando la presencia de varios puntos ligeramente isotrópicos a lo largo de las hifas. Se observó gran número de septos, con distancias cortas entre ellos, los cuales aparecían cercanos a la zona apical. Además, las células no presentaron movimiento regulado, más bien de tipo azaroso y no se observó la presencia del Spitzenkörper, tanto en zonas apicales como en nuevas ramificaciones.

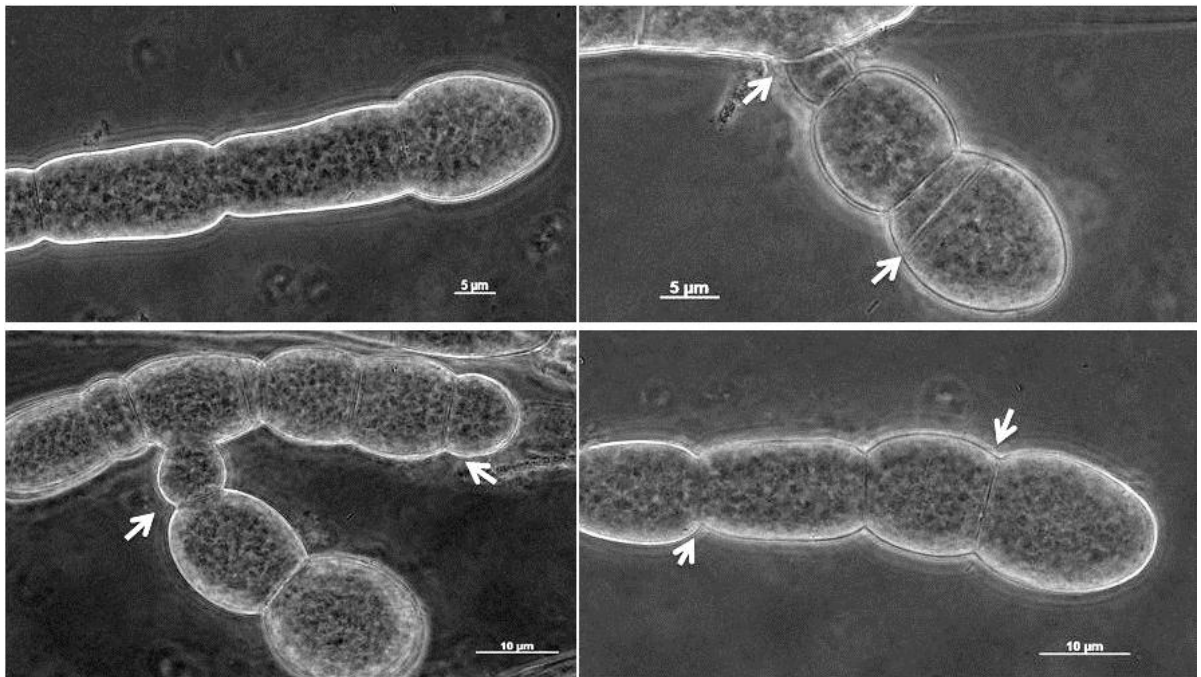


Figura 10. Microscopía de contraste de fases de la cepa mutante *24-21* incubada bajo temperatura restrictiva. Las flechas indican la presencia de septos. Se aprecia claramente la ausencia del Spitzenkörper en el ápice.

Contrario a la mutante anterior, las hifas maduras de la cepa mutante *10-19*; presentaron un crecimiento más rápido, mostrando un fenotipo altamente aberrante al ser expuesto a temperatura restrictiva. Se observó gran número de septos cercanos al ápice, sin embargo, las hifas presentaron movimiento anterógrado de citoplasma hacia las zonas parcialmente polarizada, el Spitzenkörper estuvo presente pero fue inestable (Fig. 11). La presencia del Spitzenkörper se visualizó únicamente en hifas que estaban recuperando su crecimiento polarizado al estar bajo temperatura permisible, ya que las células aún no recuperadas carecían de este complejo multivesicular.

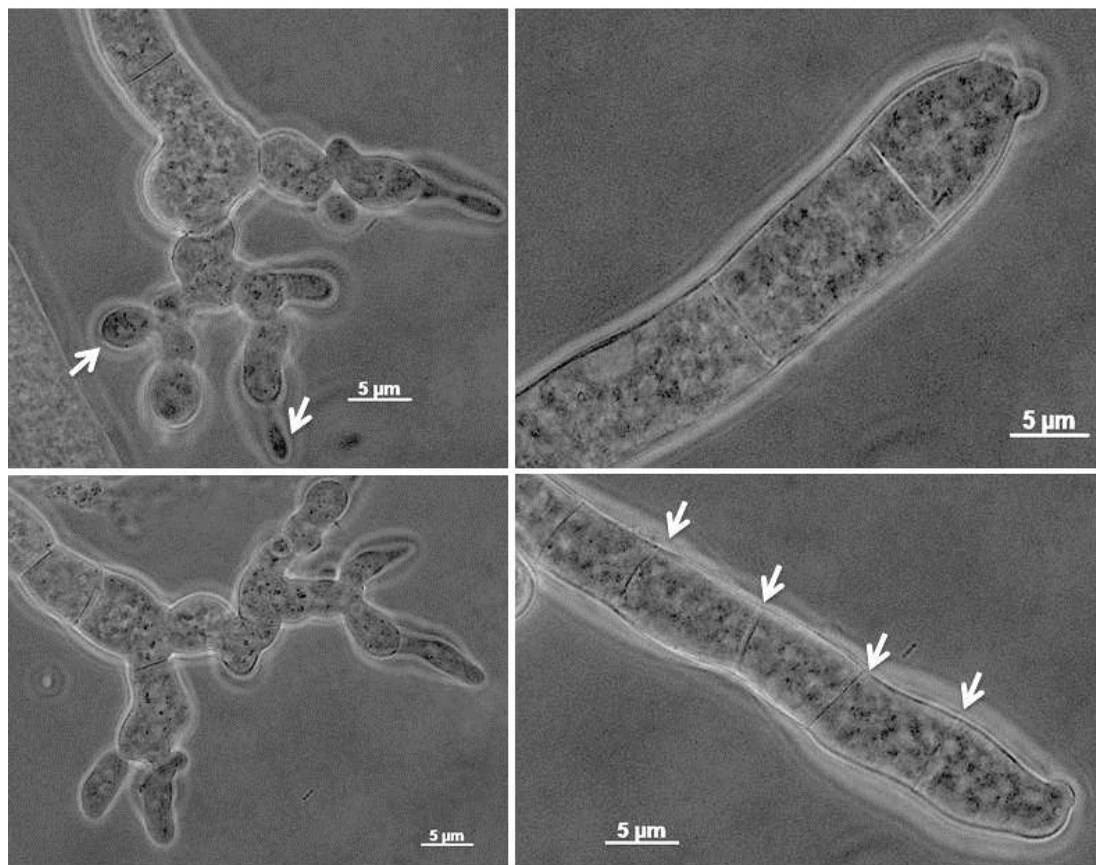


Figura 11. Microscopía de contraste de fases de la cepa mutante *10-19* incubada bajo temperatura restrictiva. La primera imagen muestra la formación aparente del Spitzenkörper (flechas blancas) acompañada de hiperamificación al ser expuesta a temperatura restrictiva. La última imagen muestra el aumento en el número de septos en una hifa madura (flechas blancas).

Las células de la cepa mutante *19-3* mostraron un fenotipo aberrante intermedio entre las mutantes previamente expuestas. Se determinó gran cantidad de bifurcaciones cerca de la zona apical, las cuales generaban gran cantidad de ramificaciones mostrando un crecimiento macroscópico abultado. Por otra parte, la cepa presentó movimiento anterógrado hacia un la zona apical, pero sin la formación de un Spitzenkörper. Aunado a esto, se observó gran cantidad de ramificaciones amorfas, aparentemente polarizadas en espacios distales a la zona apical, los cuales emergían de manera opuesta en un mismo punto de la hifa.

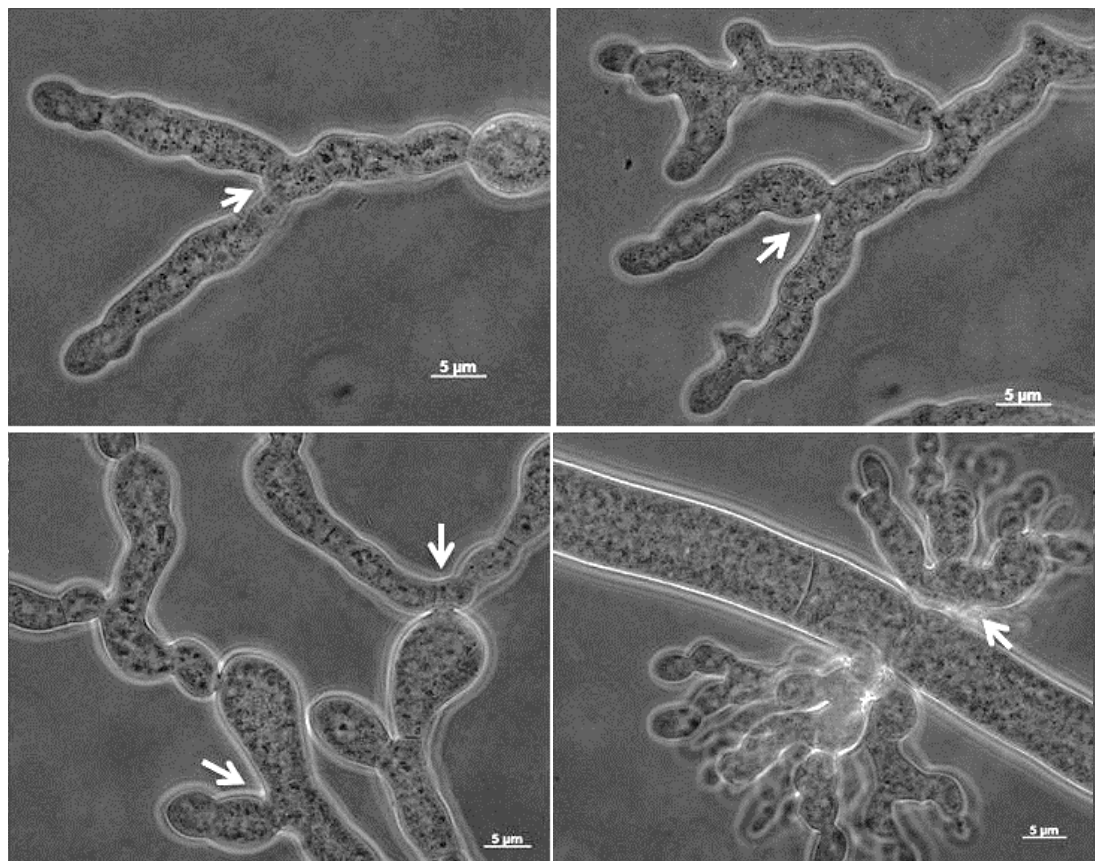


Figura 12. Células maduras de la mutante *19-3* mediante microscopía de contraste de fases. Las fechas indican bifurcaciones cerca de la zona apical. La última imagen muestra las hiper-ramificaciones generadas en la zona distal de las hifas.

En todos los casos anteriores con respecto a las cepas mutantes se observaron principalmente dos características: la presencia de abultamientos en las hifas estaba asociada a la previa disminución o interrupción del crecimiento polarizado, mientras que la cepa silvestre presentó un crecimiento continuo. Por otro lado, se observó gran cantidad de septos, inclusive en espacios cercanos a la zona apical en las cepas mutantes.

Para observar con mayor detalle la distribución de los septos y anomalías a nivel de pared celular, se realizaron tinciones con el colorante calcofluor (Fig. 13). En la cepa mutante de *cdc-24* se observó una mayor frecuencia de formación de septos, dando lugar a compartimentos pequeños, en comparación con la cepa silvestre. También se observó que las cepas mutantes formaban aparentemente una pared celular más gruesa que la cepa tipo silvestre.

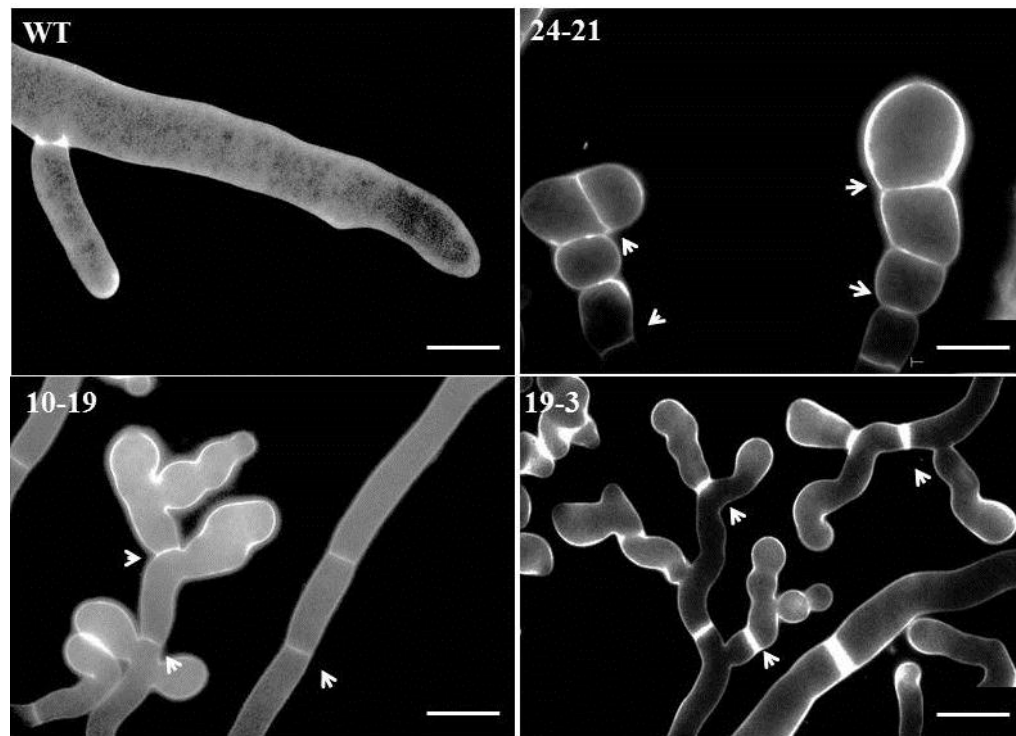


Figura 13. Microscopía de fluorescencia de las cepas mutantes y la cepa control teñidas con calcofluor. Las flechas indican la distribución de septos. Las barras de escala representan 10 μ m.

6.4. Microscopía confocal

Con la finalidad de monitorear la dinámica interna y el crecimiento celular a mayor aumento, se realizaron observaciones mediante microscopía confocal utilizando el colorante vital FM4-64 para teñir estructuras membranosas.

La cepa silvestre N-150 de *N. crassa*, bajo temperatura restrictiva, presentó crecimiento totalmente polarizado, en la zona apical se observó constante movimiento de estructuras membranosas con dirección anterógrada hacia un Spitzenkörper bien definido (Fig. 14A). Por otro lado, regiones distales de hifas maduras presentaron constante movimiento de núcleos y vacuolas a través de septos (Fig. 15B), no se observaron alteraciones a nivel membrana o de pared celular.

La cepa mutante 24-21, presentó crecimiento parcialmente polarizado, se observó un citoplasma denso, lo cual impidió observar el movimiento vesicular, además, se determinó gran cantidad de septos cercanos entre sí (Fig. 14C-D). Se observó movimiento citoplasmático lento y sin una dirección determinada y no se visualizó la presencia del Spitzenkörper. Por otra parte, las hifas mutantes de la cepa 10-19 presentaron un citoplasma poco denso, con movimiento de estructuras membranosas ligeramente anterógrado, no se observó presencia de Spitzenkörper, sin embargo, se apreciaron numerosos septos cercanos a la zona apical de las células (Fig. 14). En zonas apicales de la cepa mutante 19-3, se presentó un movimiento citoplasmático con dirección anterógrada hacia las zonas de crecimiento. Por último, se observaron numerosos septos cercanos a la zona parcial de crecimiento al mismo tiempo que entre ellos.

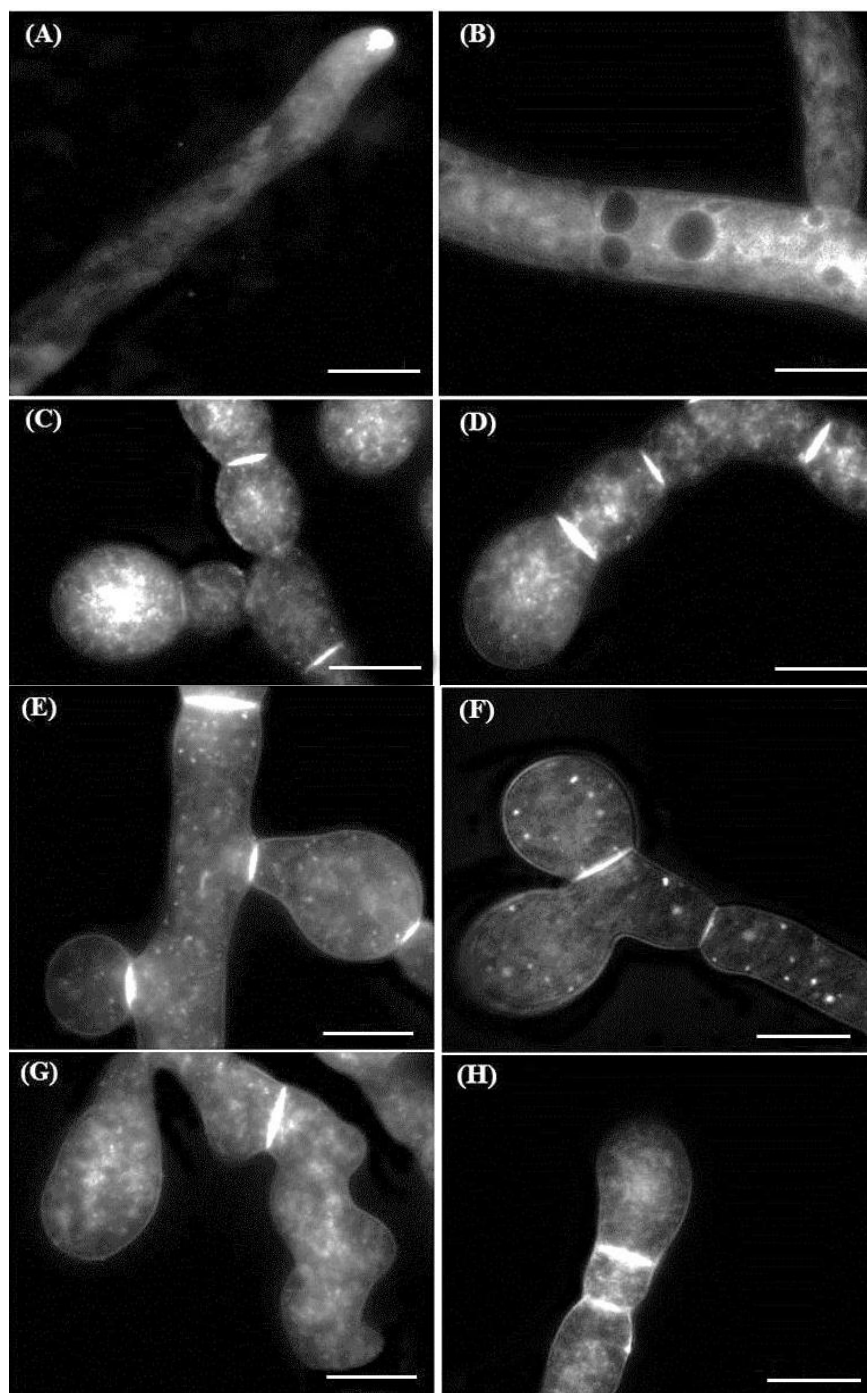


Figura 14. Microscopía confocal de las cepas de *N. crassa* bajo temperatura restrictiva, teñidas con FM4-64. (A) Zona apical de la cepa silvestre. (B) Zona distal de la Wt. (C-D) Zona apical de la cepa mutante 24-21. (E-F) Área apical de la cepa mutante 19-3. (G-H) Zona apical de la cepa 10-19. La barra de escala representa 10 μm .

6.5. Microscopía electrónica de transmisión

6.5.1 Ultraestructura de la cepa silvestre de *N. crassa*

Para analizar con detalle el arreglo intracelular de la cepa control N-150 y las cepas mutantes de *cdc-24* durante el crecimiento polarizado, se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión de zona apical, subapical y pared celular de las hifas expuestas a temperatura restrictiva.

La cepa de tipo silvestre mostró el típico arreglo morfológico presente en una hifa madura. En la zona apical se observó pocos agregados vesiculares, sin un Spitzenkörper bien definido, ya que es difícil obtenerlo durante el proceso de criofijación. Por otro lado, en la zona subapical se observaron varios organelos tales como los núcleos, mitocondrias y algunas estructuras no bien definidas a 16 μm con respecto al ápice (Fig. 15). En regiones distales, se determinó la presencia normal de septos en y el grosor de la pared celular fue de 130.6 ± 30.1 nm (n= 30).

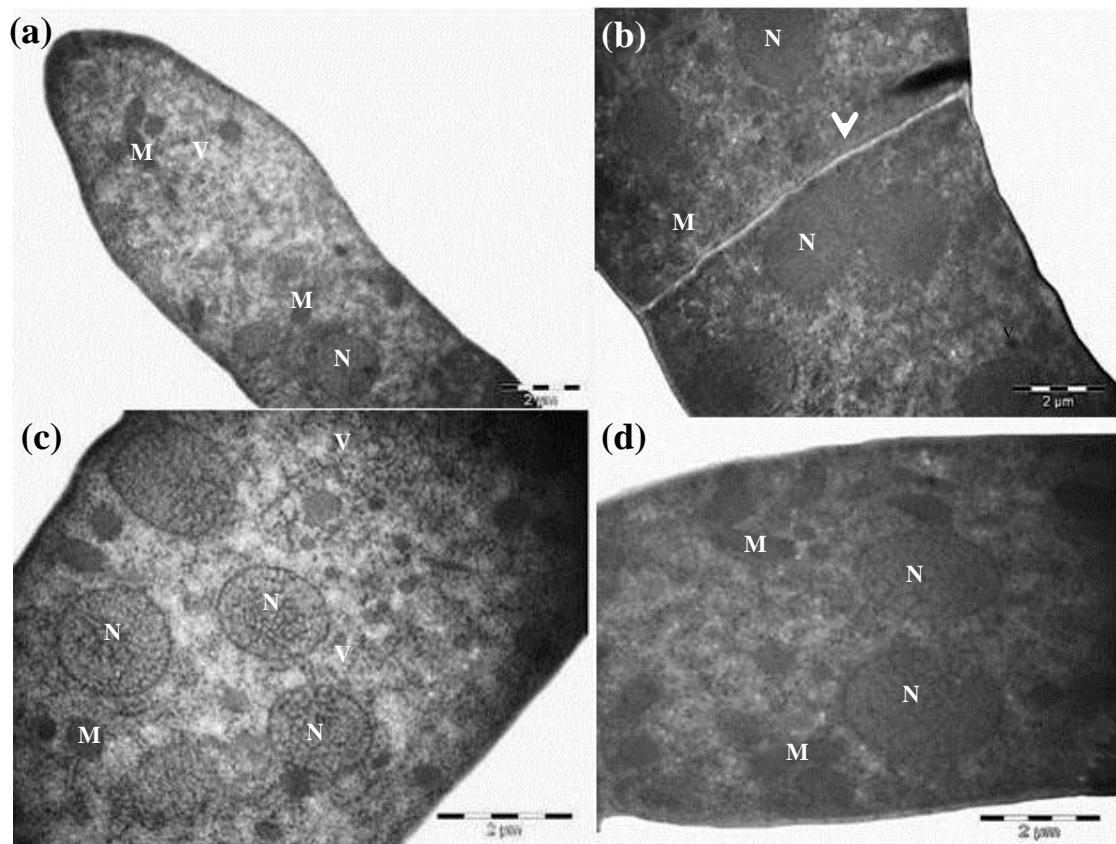


Figura 15. Imagen de una sección ultrafina de la cepa silvestre N-150 de *Neurospora crassa* mediante microscopía electrónica de transmisión. (a) En la zona subapical se observa la presencia de varias mitocondrias (M) y pocas vesículas (V); y en zonas lejanas se aprecian los primeros núcleos (N) acompañados de otras estructuras, también se muestra una distribución homogénea de pared celular. La carencia de una forma perfectamente hifóide, citoesqueleto y numerosas vesículas refleja una ligera afección en la morfología debido a la criofijación. (b) La sección longitudinal de la zona distal muestra la presencia de un septo (cabeza de flecha) con un número abundante de núcleos, mitocondrias y algunas vesículas. (c-d) Se muestran zonas distales de hifas maduras con un conjunto completo de organelos, además de una distribución homogénea de pared celular.

6.5.2 Ultraestructura de la cepa mutante condicional de *cdc-24* (24-21)

A las 3 h de incubación a temperatura restrictiva, las hifas maduras de la cepa 24-21 mostraron un fenotipo afectado a varios niveles (n= 30). Primeramente, se observaron gran cantidad de células con crecimiento ligeramente polarizado en las zonas apicales, así mismo, mostraron morfologías parcialmente isotrópicas a lo largo de las hifas (Fig. 16). En la zona apical de la mayoría de las células, se observaron aberraciones a nivel membrana y pared celular. Se destacó la abundante presencia de septos cercanos al ápice, con una distancia de separación de alrededor de 8 μm con respecto al ápice. Además, otro aspecto destacado, fue la presencia de varios núcleos y mitocondrias cercanas a la punta (2 μm de distancia). En todos los casos se observaron pocas macrovesículas secretoras en la zona de crecimiento polarizado las cuales presentaban dimensiones de 0.47 μm de diámetro.

Por otro lado, tanto en células parcialmente polarizadas como en hifas ligeramente isotrópicas, no se encontró Spitzenkörper, sin embargo, se observaron pequeñas aglomeraciones vesiculares, distribuidas en varias zonas alrededor de la hifa. En dichas zonas no se observaron alteraciones a nivel membrana, sin embargo, la pared celular presentó un aumento en el grosor con respecto a la cepa silvestre, presentando un grosor de 293.5 ± 105.7 nm (n= 30). Por otra parte, varias células presentaron fragmentos aislados de citoplasma de alrededor de 0.4 μm de diámetro de espesor, los cuales estaban englobados en pared celular, en dichos espacios no se observaron organelos o vesículas y se encontraron únicamente en regiones cercanas al ápice celular.

En zonas distales al ápice se observó una morfología similar a la cepa silvestre, las células presentaban un diámetro de 10 μm y al igual que la zona apical, se determinó la presencia de grandes cantidades de vesículas y posiblemente peroxisomas, además de numerosas mitocondrias y núcleos. Sin embargo, partes distales presentaron gran cantidad de septos, con una separación de 8 μm entre cada septo, además, el grosor de la pared celular fue similar al encontrado en la zona apical.

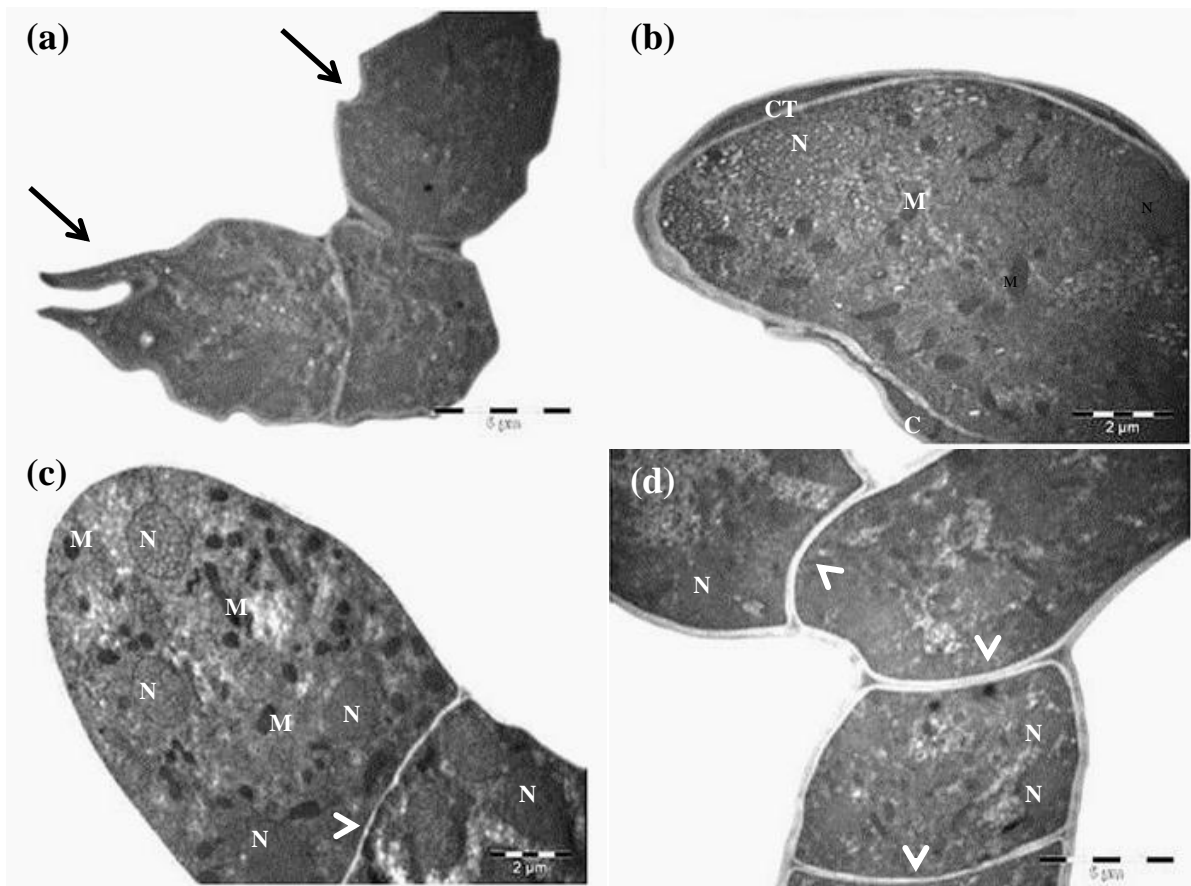


Figura 16. Microscopía electrónica de transmisión de una delgada sección de la mutante de *cdc-24* (*24-21*) sometida a criofijación. (a) células altamente afectadas a nivel de membrana y pared celular (flechas oscuras). (b) fragmentos aislados de citoplasma (CT) sin estructuras funcionales. (c) presencia de números núcleos (N) y formación de septos (punta de flechas) cercanos a la zona apical. (d) zona distal con presencia de varios núcleos, mitocondrias (M) y numerosos septos.

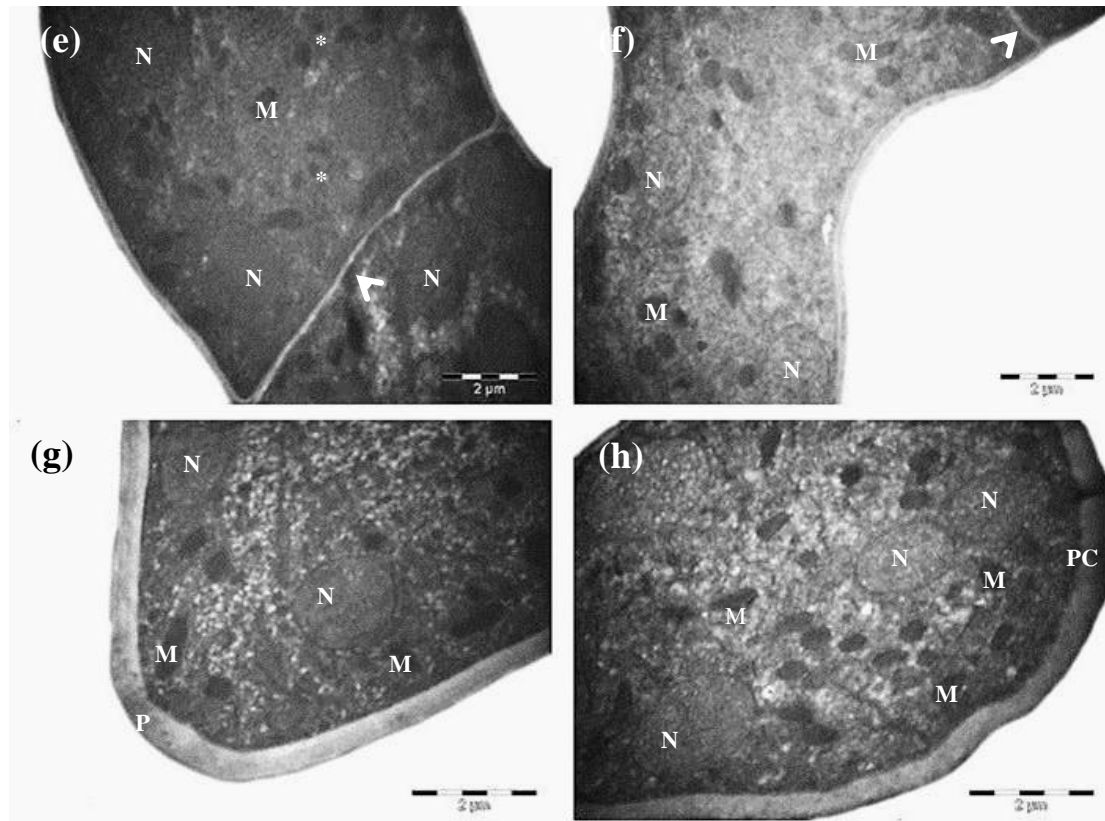


Figura 16. Continuación. (e-f) zona distal con presencia de núcleos, mitocondrias (M), vesículas (asterisco) y septos (punta de flecha). (g-h) se observa un incremento del grosor de la pared celular (PC) en el ápice. No se observaron vestigios del Spitzenkörper.

6.5.3 Ultraestructura de la cepa mutante condicional de *cdc-24* (10-19)

La cepa mutante *10-19* (Fig. 17) a las 3 h de incubación a 37°C mostró un fenotipo altamente aberrante (n=30). Las células en todas las zonas presentaron un diámetro de 7.6 µm, siendo más delgadas que la cepa tipo silvestre. Claramente se observaron afecciones a nivel membrana y pared celular, principalmente en el ápice, generando fenotipos altamente amorfos en el 50 % de las hifas observadas. Con respecto a la zona apical de hifas jóvenes, se encontraron septos a 8.5 µm de distancia del ápice, núcleos a 1.2 µm de distancia, al igual que mitocondrias a 2.1 µm de separación con respecto al ápice y también se visualizaron gran cantidad de macrovesículas, las cuales se encontraban a 0.4 µm separadas del ápice. Por otro lado, las alteraciones a nivel de pared celular, principalmente en la zona apical, se reflejó en estructuras puntiagudas con diferentes grosores, presentes en la mayoría de las hifas (292.1 ± 127.7 , n=30), similar a la cepa *24-21*. Al igual que las otras mutantes, no se determinó la presencia de un complejo multivesicular en la punta, y éstas estaban altamente distribuidas en varias direcciones circundantes al ápice.

Con respecto a las zonas distales, se observó una integridad celular muy similar a la cepa de tipo silvestre, en esta cepa mutante en cuanto a la morfología de la pared celular y distribución de organelos. Sin embargo, al igual que la mutante *24-21*, se observó gran número de septos, los cuales se encontraban cercanos entre sí. Por otro lado, se observaron varias secciones transversales de células con doble envoltura de pared celular y sin un patrón polarizado, lo cual generaba dos compartimentos citoplasmáticos, el primero midió alrededor de 4 µm y englobaba un citoplasma vacío, el segundo de 6.5 µm de diámetro presentaba vesículas y un núcleo (Fig. 17F-H).

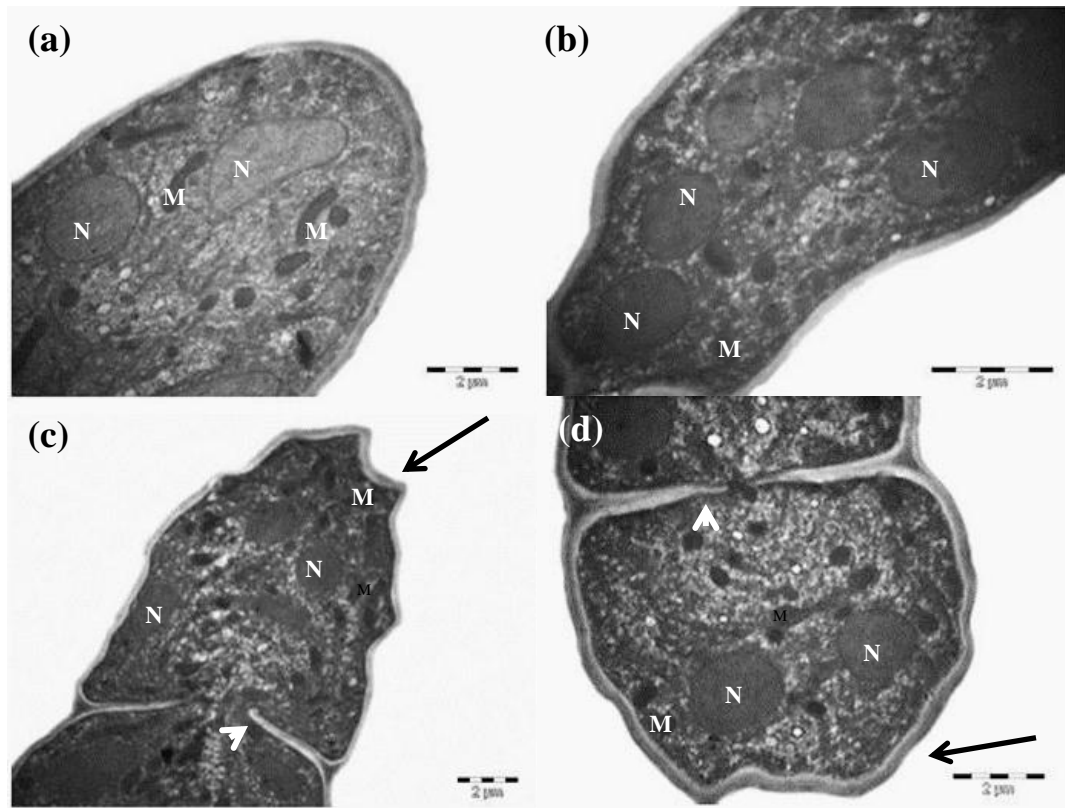


Figura 17. Microscopía electrónica de transmisión de la cepa mutante de *cdc-24* (10-19) a las 3 h de incubación a temperatura restrictiva. (a) Presencia de núcleos (N), mitocondrias (M) aledañas al ápice. (b) Se exhibe la gran cantidad de núcleos en la zona apical de una hifa madura. (c-d) Se muestra las afecciones a nivel de pared y membrana presente (flechas oscuras) en el ápice, además, se observa la presencia de un septo (punta de flecha) cercano al ápice.

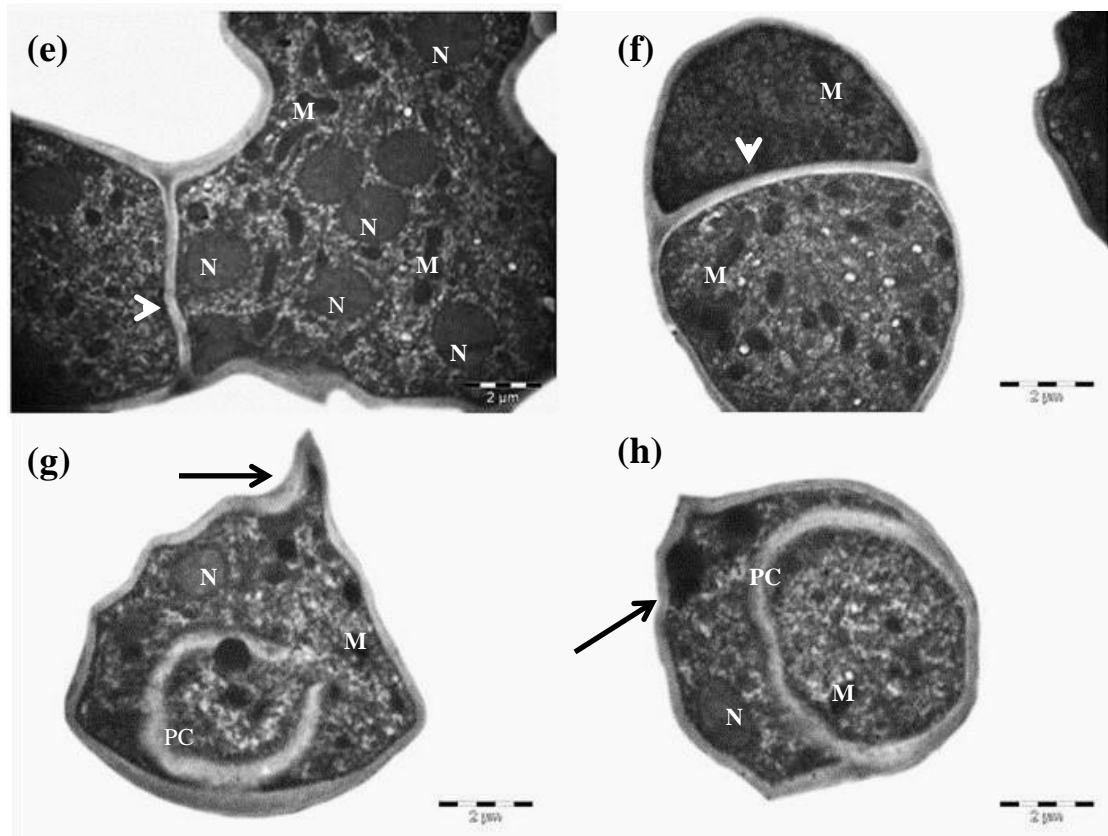


Figura 17. Continuación. (e) Se muestra la zona distal de una hifa madura, presenta gran cantidad de núcleos y la pared celular presenta mayor grosor que la cepa silvestre. (f-h) Se muestran células isotrópicas con anomalías a nivel de membrana y pared celular (flechas negras), además, de la formación de la misma en el interior de la célula (PC).

6.5.4 Ultraestructura de la cepa mutante condicional de *cdc-24* (19-3)

La cepa mutante 19-3 (n=30) mostró un efecto ligeramente disímil con respecto a los fenotipos previamente expuestos bajo temperatura restrictiva (Fig. 18). Las células presentaron un diámetro de 4 μm en la zona apical, sin embargo, éste aumentó al triple a partir del primer septo dando lugar a células de 12 μm de diámetro.

Esta cepa mutante presentó gran cantidad de células parcialmente isotrópicas. Al igual que las otras mutantes, en la zona apical, no se observó la presencia del Spitzenkörper, incluso en células parcialmente polarizadas. La presencia de septos cercanos al ápice fue abundante (9.6 μm), además, los septos fueron abundantes con una distancia de separación de alrededor de 9 μm entre cada uno. Se observaron varios núcleos y otros organelos, como mitocondrias y vesículas a 1 μm de distancia al ápice.

Tanto en células polarizadas como en isotrópicas no se observaron alteraciones morfológicas a nivel membrana y pared celular como en la mutante previamente mencionada. Sin embargo, se determinó un gradiente de grosor de la pared celular, el cual fue mayor en la punta (322.4 ± 72.7 nm) y se reducía conforme se alejaba de la punta (300 ± 69.4 nm). Por otra parte, en zonas distales al ápice se observó una morfología muy similar a la cepa silvestre con gran cantidad de organelos, una distribución de septos uniformes y sin alteraciones a nivel de membrana y pared celular.

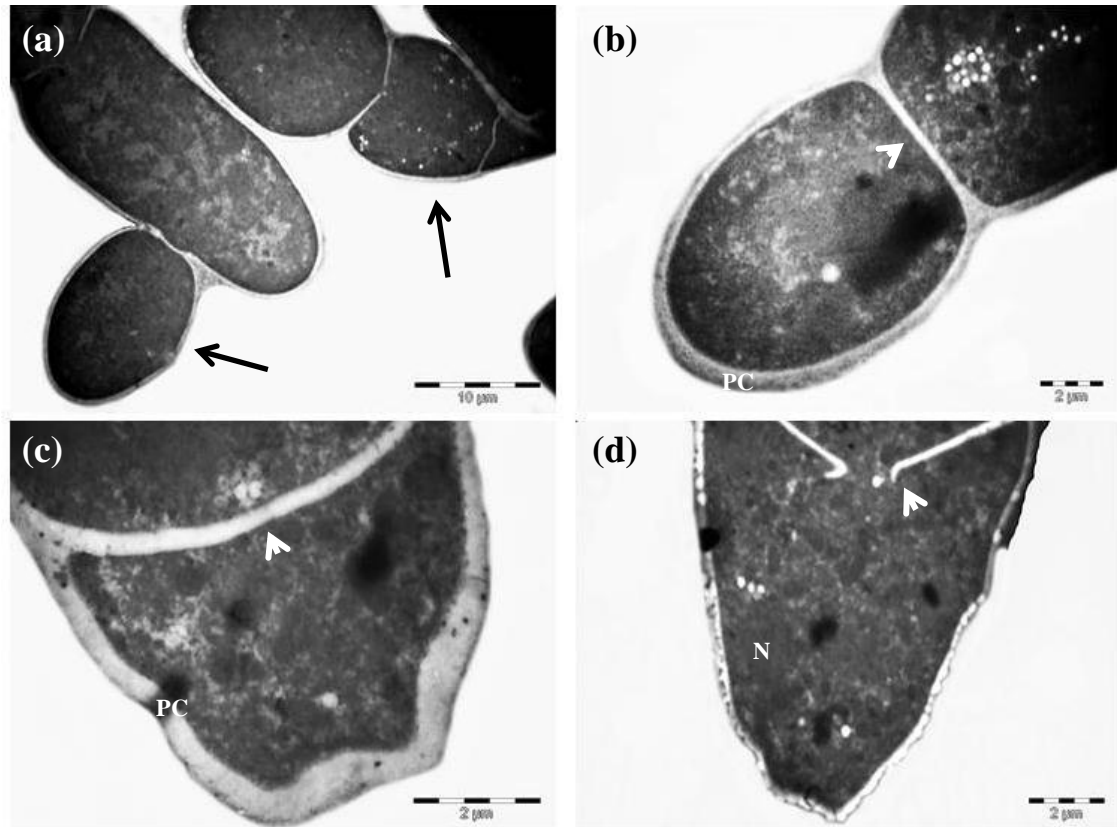


Figura 18. Microscopía electrónica de transmisión de hifas de la cepa mutante *cdc-24* (*19-3*) bajo temperatura restrictiva. (a) Las flechas muestran varias células con comportamiento isotrópico a bajo aumento. (b-d) Se exhibe la presencia de septos y el aumento del grosor de la pared celular (PC) en la zona apical.

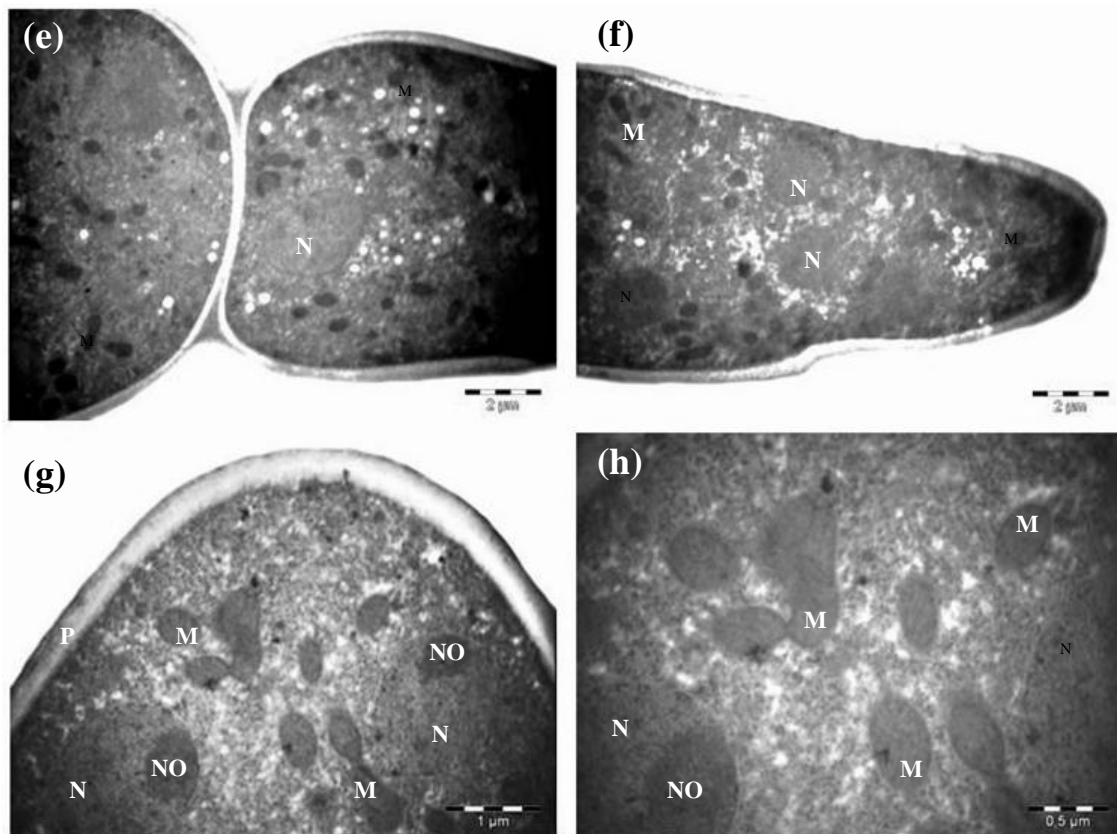


Figura 18. Continuación. (e-f) Se muestra una sección de la misma hifa que muestra la presencia de núcleos (N) cercanos al ápice. (g-h) Se expone la misma célula a diferentes aumentos, se observa claramente la presencia de mitocondrias (M) y núcleos con sus respectivos nucléolos (NO) en la zona apical.

Para determinar si existen diferencias significativas entre el grosor de la pared celular de las cepas estudiadas en el presente trabajo (Wt, 24-21, 10-19 y 19-3) se llevó a cabo una prueba de comparación múltiple de muestras independientes Kruskal Wallis ANOVA, con el programa STATISTICA (StatSoft Inc. Version 6.1). Se encontraron diferencias altamente significativas entre la cepa silvestre y las cepas mutantes (K-W, $p=0.001$), no se encontraron diferencias entre el grosor de la pared celular de las cepas mutantes de *cdc-24*.

6.6. Análisis cuantitativo de quitina

Después de 7 días de incubación a temperatura restrictiva, la cepa tipo silvestre presentó una concentración de $6.13 \pm .01$ $\mu\text{g/mL}$ de N-acetilglucosamina, siendo la cepa con menor concentración de quitina (Fig. 19). Con respecto a las mutantes de *cdc-24*, las cepas *10-19*, *19-3* y *24-21*, presentaron una concentración de 10.20 ± 0.05 , 7.48 ± 0.01 y 7.25 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$ de N-acetilglucosamina respectivamente.

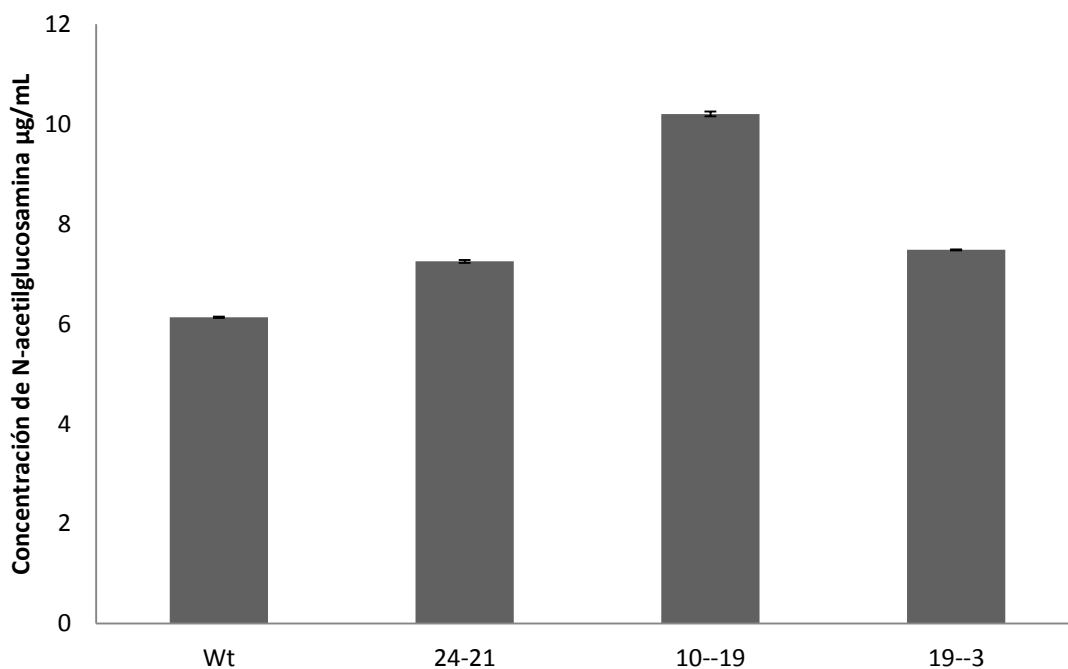


Figura 19. Concentración N-acetilglucosamina ($\mu\text{g/mL}$) de la cepa silvestre y las cepas mutantes de *cdc-24* de *N. crassa* a 7 días de incubación a temperatura restrictiva. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

DISCUSIONES

Muchos eventos celulares tales como la replicación del ADN, la producción de ribosomas, la síntesis de proteínas, germinación de esporas y procesos durante el crecimiento polarizado, están controlados por genes esenciales. Por lo tanto, se generan mutantes sensitivas a temperatura, los cuales demuestran defectos condicionantes (Dieterle, *et al.*, 2010). Actualmente, existen un gran número de mutantes condicionantes a nivel de crecimiento polarizado, generados con el propósito de entender su papel en la morfogénesis celular. Dichas mutantes, son resultado de una mutación simple, en donde la extensión micelial es inhibida a partir de los 35 °C; y la incubación prolongada de algunas de estas cepas sensibles a temperatura no es letal. Actualmente, existen numerosas cepas de *N. crassa* condicionantes a temperatura, las cuales están afectadas en varias rutas. Mas de 100 cepas mutantes temperatura sensitivas están presentes en el Fungal Genetic Stock Center, 56 de ellas son letales, 36 presentan auxotrofia y 13 presentan alteraciones fenotípicas a temperatura restrictiva (>35 °C), las cuales participan en la síntesis de proteínas, en su transporte o control de calidad (Dieterle *et al.*, 2010). Sin embargo, la gran mayoría no presentan estudios a nivel ultraestructural, dejando de lado, la arquitectura y morfología intracelular de cepas mutantes.

Para obtener un mejor entendimiento sobre la contribución de la proteína CDC-24 a nivel morfológico y complementar descriptivamente estudios previos, se estudió su cinética celular, además, se comparó la organización y dinámica citoplasmática en hifas maduras de *Neurospora crassa* de mutantes condicionantes de *cdc-24* mediante diversas técnicas de microscopía, incluyendo microscopía electrónica de transmisión.

Las cepas mutantes del gen *cdc-24* no son capaces de germinar (Seiler *et al.*, 2003), por lo que, se generaron cepas mutantes condicionantes, para describir las anomalías en diversos eventos cinéticos y morfológicos, como la tasa de crecimiento, producción de biomasa, cantidad de quitina en la pared celular, número de ramificaciones, dinámica citoplasmática y arquitectura celular.

La morfogénesis de la hifa requiere de dos aspectos: 1) el establecimiento de la polaridad durante la germinación o ramificación y 2) el mantenimiento del crecimiento polar durante la elongación. *N. crassa* presenta una tasa de extensión rápida ($>1 \mu\text{m/s}$), tanto a temperatura ambiente como a temperaturas superiores a los 35°C (Seiler y Plamann, 2003). En el presente estudio la tasa de crecimiento micelial de cepas mutantes de *cdc-24*, mostraron un patrón de elongación anormal, tanto a nivel colonial como a nivel hifal, dando lugar a colonias con un crecimiento de hasta 10, 4 y 3 (*24-21*, *10-19* y *19-3*, respectivamente) veces menor con respecto a la cepa tipo silvestre, probablemente como resultado de la distorsión de la morfogénesis, al desestabilizar ciertos complejos protéicos presentes en la punta, causando anomalías en el tiempo adecuado de deposición de nuevo material hacia el ápice.

Así mismo, se determinó que las mutantes de *cdc-24*, producen ocho veces menor cantidad de conidios con respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere que esta mutación está involucrada también durante la generación de estructuras reproductoras, probablemente relacionada a la mala distribución de los componentes necesarios para elegir nuevos puntos especializados en dar lugar a conidioforos. En el hongo filamentoso *N. crassa* han sido reportadas varias proteínas reguladoras de la morfogénesis celular, tales como la CDC-42 y la COT1 (Araujo-Palomares *et al.*, 2011; Maerz *et al.*, 2008). La proteína COT1 se encarga de regular directamente la pared celular, mientras que la Rho GTPasa CDC-24 regula CDC-42 durante el establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado. Las mutantes condicionantes de COT1 exhiben una tasa lenta de crecimiento y un aumento en el índice de ramificación bajo temperatura restrictiva, un patrón similar a las cepas mutantes de *cdc-24* a 37°C . Esto sugiere que a pesar de su diferencia funcional, al parecer están estrechamente relacionadas en algún punto durante el crecimiento polarizado, tal y como se reportado en levaduras con otras proteínas (Sloat *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1983; Slater *et al.*, 1985; Shimada *et al.*, 2000).

Por otro lado, la ramificación es un comportamiento clave en el desarrollo colonial, además, media la interacción de las células con otros sistemas biológicos (Rayner *et al.*, 1995). Este proceso tiene dos propósitos: primeramente incrementar el área de superficie de la colonia, la cual presumiblemente aumenta la asimilación de nutrientes; segundo, mediante las ramificaciones se lleva a cabo eventos de fusión entre hifas, siendo importantes durante el intercambio de nutrientes y señales entre diferentes células de la misma colonia (Harris, 2008). Se han reportado varias rutas implicadas durante el proceso de ramificación, tales como las proteínas G, CDC-42, septinas o ciertas cinasas, así mismo, estructuras celulares como el Spitzenkörper.

A temperatura restrictiva las cepas mutantes de *cdc-24*, presentaron diversas tasas de ramificaciones, mostrando un mayor índice de ramificación cercano a la zona apical con respecto a la cepa silvestre, siendo la *10-19* la cepa más afectada al presentar tres veces mayor cantidad de ramificaciones cercanas a la punta, por otro lado, las mutantes *19-3* y *24-21* presentaron un patrón de ramificación similar, generando dos veces mayor ramificación que la cepa tipo silvestre. Estos datos sugieren que ocurre una acumulación anormal de vesículas exocíticas, probablemente debido a la perturbación indirecta de CDC-42, el cual no dirige adecuadamente el citoesqueleto de actina, y por consecuencia las vesículas no llegan a un punto específico, lo que genera (sin interrumpir el flujo citoplasmático) una baja extensión hifal y el suministro de vesículas comienzan a exceder la capacidad de la hifa, dando lugar a la formación de ramificaciones cercanas a la punta (Trinci, 1974). Mutantes condicionantes de los reguladores maestros de la polaridad, RAC y CDC-42 en *N. crassa*, han demostrado que germinan a 37°C (Araujo-Palomares *et al.*, 2011), sin embargo, células condicionantes de *cdc-24* no germinan a temperatura restrictiva (Seiler *et al.*, 2003), lo que supone un papel importante durante el desarrollo de germínulas bajo este activador.

Se sugiere que *cdc-24* es vital durante el proceso de germinación y desarrollo del hongo, demostrando que es un componente indispensable durante el establecimiento del crecimiento polarizado, incluso más que durante el mantenimiento del mismo, ya que una vez germinadas las cepas mutantes, se observa un crecimiento lento pero constante bajo temperatura restrictiva.

Por otro lado, mediante microscopía de contraste de fases se observó una constante dinámica vesicular en la cepa silvestre, tanto a nivel apical como sub-apical. Sin embargo, en cepas mutantes se determinó un movimiento citoplasmático altamente azaroso, sin ningún patrón de movimiento controlado hacia una región específica en donde depositar el nuevo material. Aunque las estructuras membranosas fueron teñidas con el colorante vital FM4-64, el monitoreo de vesículas fue muy limitado, esto posiblemente por la presencia excesiva de citoplasma, el cual da lugar a hifas de mayor volumen, generando células con un patrón de crecimiento parcialmente isotrópico. También se observó una gran cantidad de núcleos y organelos totalmente desorganizados, un patrón similar al reportado en levaduras mutantes de *cdc-24* (Bender, 1993; Chant, 1991; Harwell, 1971 y Adams *et al.*, 1990). Se sabe que la dinámica intracelular de las vesículas es un útil indicador de la función del citoesqueleto; sin embargo, su papel en el crecimiento hifal aún no se ha detallado del todo (Riquelme *et al.*, 2002).

De acuerdo a los resultados, no es claro que la deficiencia de *cdc-24* causa una profunda ruptura en la distribución y función en los microtúbulos y filamentos de actina. Sin embargo, es claro que las mutaciones en el gen *cdc-24* resultaron en una desorganización citoplasmática y una movilidad intracelular altamente alterada, impactando negativamente la organización y estabilidad del Spitzenkörper. También desencadenó una serie de alteraciones a nivel de organización y distribución de organelos, tales como núcleos y mitocondrias, los cuales de alguna manera se presentaron en la posición que ocupa el Spitzenkörper en el ápice celular. Al final, esto dio lugar a una reducción significativa de la tasa de crecimiento y a una morfología hifóide altamente alterada.

Aunado a la casi total despolarización celular, se observó una gran cantidad de septos con una distribución totalmente aleatoria. Se ha especulado que la punta de la hifa esta involucrada en la determinación de los sitios de septación en *A. nidulans* (Kaminskyj, 2000). En *A. nidulans* recientemente se mostró que la velocidad de crecimiento de la punta de la hifa es reducida durante la formación de ramificaciones laterales y septación (Knechtle *et al.*, 2003). Esto podría explicarse por el redireccionamiento del flujo vesicular de la punta hacia los sitios seleccionados. Interesantemente, este decremento genera información posicional para producir septación. Este argumento es un punto a favor con respecto al modelo que sostiene que varias proteínas necesarias para la septación están posicionadas en la punta de la hifa (Walther y Wendland, 2003). Araujo-Palomares *et al.*, (2011) reportó la presencia de RAC y CDC-42 en septos de *N. crassa*, sin embargo, no se conocen las contribuciones específicas de dichas proteínas durante este proceso en hongos filamentosos. El incremento en la abundancia de septos en mutantes de *cdc-24* sugiere su participación como un regulador negativo que podría funcionar de manera antagonista con las GTPasas RHO1 y RHO4, los cuales son reguladores positivos de la formación de septos en *N. crassa*, *A. nidulans* y *C. albicans* (Vogt y Seiler, 2008; Rasmussen y Glass, 2005).

En las levaduras de fisión y gemación, la actividad de *Cdc42p* esta regulada por *Cdc24p* o su homólogo *Scd1*, respectivamente (Park y Bi, 2007). CDC-24 está implicada en la regulación del crecimiento polarizado en *A. gossypii* y *C. albicans*, también ha sido reportado en hongos filamentosos, tales como *Penicillium marneffei*, *A. nidulans*, *A. niger* y *N. crassa* (Wendland y Philippsen, 2001; Virag *et al.*, 2007; Bassilana *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2011 y Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Sin embargo, únicamente existen estudios morfológicos descriptivos a nivel ultraestructural en *S. cerevisiae*, dejando de lado el análisis sobre la integridad celular que proporciona el producto génico de este regulador en hongos filamentosos.

Mediante microscopía de contraste de fases Bartnicki-García (1999) y López-Franco y Bracker (1996), reportan cuatro regiones discretas en hifas maduras de *N. crassa*: 1) La región I, la cual se extiende de 2 a 3 μm con respecto al ápice, 2) La región II la cual se extiende de 10 a 20 μm atrás de la región I, ésta presenta gran número de vesículas y mitocondrias; 3) La región III que conforma la zona subapical que se extiende de 30 a 40 μm atrás de la región II, en donde se presentan los primeros núcleos y 4) La región IV en donde incrementa el número de vesículas, mitocondrias y núcleos. No obstante, las hifas mutantes de *cdc-24* no presentaron dichas regiones discretas de citoplasma, al ser observadas mediante microscopía de contraste de fases y confocal, lo cual se corroboró mediante microscopía electrónica de transmisión. En mutantes de *cdc-24* los núcleos y las mitocondrias fueron abundantes en todas las regiones de la hifa y frecuentemente se presentaron en el ápice a 1.2 μm con respecto a la membrana, en comparación con la cepa silvestre en las que se presentaron a distancias superiores, reportado anteriormente por Riquelme *et al.*, (2011) para la cepa de tipo silvestre. En *A. nidulans*, se ha reportado que la migración nuclear ocurre durante varios estados de desarrollo, incluyendo el crecimiento vegetativo y la producción de esporas asexuales (Suelmann y Fischer, 2000). Durante el crecimiento vegetativo, los núcleos en interfase migran hacia la punta de la hifa, sin embargo, estos mantienen una velocidad similar a la velocidad de extensión hifal, dando lugar a una distancia constante entre el núcleo y la punta de la hifa (Xiang y Fischer, 2004). Se ha reportado que al incrementar el volumen citoplasmático se induce la síntesis de ADN generando cariocinesis en forma excesiva, lo cual explicaría el aumento en el número de núcleos (Xiang y Fischer, 2004).

La importancia central del citoesqueleto en la morfogénesis hifal está bien establecida, los microtúbulos son los responsables primarios del transporte de vesículas a grandes distancias hacia el Spitzenkörper, mientras que los microfilamentos de actina son el control primario de la organización de vesículas dentro del mismo, desembocando el nuevo material hacia la membrana plasmática (Harris *et al.*, 2005).

Las cepas mutantes mostraron sin lugar a dudas un ligero vestigio de Spitzenkörper, éste fue altamente disminuido, casi nulo. Se observaron pocas vesículas asociadas a la zona apical, tal y como se ha mostrado en cepas mutantes afectadas a nivel de crecimiento polarizado, tanto a escala de microtúbulos como filamentos de actina (Seiler *et al.*, 2003).

Posiblemente, la mala regulación de CDC-42, la cual afecta directamente los filamentos de actina, también desestabiliza de manera indirecta los microtúbulos (Ramos-García *et al.*, 2009), tanto en zonas distales como en zonas cercanas al ápice, lo cual afecta el posicionamiento de ciertos organelos y vesículas. Así mismo, a la formación de complejos estructurales, tales como el Spitzenkörper. Por lo tanto, no existe un complejo específico encargado de direccionar el material recién sintetizado.

En hongos filamentosos, los cuales dependen del movimiento de organelos a largas distancias, a través del citoesqueleto, logran un rápido crecimiento hacia la punta. En *N. crassa* y *A. nidulans*, mutantes convencionales de proteínas motoras deterioran la extensión hifal, sugiriendo que dichas proteínas están involucradas indirectamente en la secreción de componentes de pared celular (Requena *et al.*, 2001; Seiler *et al.*, 1997). Además, mutantes de *nudC*, están involucradas no únicamente en la migración nuclear (como se esperaría), también afectan el crecimiento polarizado y la integridad de la pared celular (Chiu *et al.*, 1997). Por otro lado, en *A. fumigatus*, ciertos GEFs que regulan la síntesis y mantenimiento de la pared celular, no son esenciales y no generan fenotipos aberrantes al ser mutados (Hu *et al.*, 2007). Con base a estos estudios, se puede concluir que muchas proteínas que no están involucradas durante el crecimiento polarizado, afectan la regulación del mismo a varios niveles, además, proteínas implicadas durante la regulación de la pared celular, parecen no generar defectos en ésta al ser mutadas. Por lo tanto, se realizaron análisis de la pared celular en mutantes de *cdc-24*, con el fin de corroborar si el regulador de CDC-42 afecta la síntesis de nueva pared.

La determinación de quitina total en la pared celular de mutantes de *cdc-24* en *N. crassa*, confirma el incremento en la deposición de quitina previamente reportado en *S. cerevisiae*, bajo temperatura restrictiva (Sloat *et al.*, 1981; Sloat *et al.*, 1978; Roberts *et al.*, 1983). Las cepas mutantes de *N. crassa* presentaron un incremento significativo en la concentración de quitina, estos análisis fueron corroborados a nivel celular mediante microscopía electrónica. Aunque no se identificó que proporción de la pared celular está formada por quitina, todas las cepas presentaron un incremento en el grosor de la pared de más del doble, tanto en la zona apical como en las zonas sub-apicales.

Dicho grosor puede surgir como un regulador negativo con respecto al crecimiento, es decir, al aumentar, el grosor de la pared celular, aumenta la fuerza tensil, con el fin de impedir su rompimiento tanto intracelular (por el aumento de la turgencia) como extracelularmente (estrés osmótico) (Borkovich y Ebbole, 2010), lo que dará lugar a hifas de lento crecimiento y generará un aumento de volumen citoplasmático. Roberts *et al.*, (1983) reportó que durante el crecimiento isotrópico la cantidad y distribución de quitina, no presenta una interdependencia con el producto génico de *cdc-24*, sin embargo, existe una interacción entre ambos mecanismos, ya que al carecer del correcto aparato direccional, generado por la inadecuada activación de CDC-42, se ve comprometida la integridad de la pared celular, al presentar una despolarización en la deposición de quitina.

Se sabe que el genoma del hongo filamentoso *N. crassa*, codifica siete quitina sintasas, las cuales están involucradas directamente en la biosíntesis de quitina (Riquelme y Bartnicki, 2008). En el presente estudio, claramente se observó el aumento homogéneo del grosor de la pared celular, sin embargo, no se sabe si está relacionado con el aumento de la producción de las siete proteínas o es repuesta de solo algunas, por lo tanto, sería interesante estudiar el nivel de expresión y localización de las quitinas sintasas en mutantes de *cdc-24*.

Además, se ha reportado que la cantidad de quitina producida por especies disímiles, no esta directamente correlacionada con el número de genes. *A. fumigatus* tiene siete diferentes quitinas sintasas y la pared celular conserva la misma proporción de quitina que *N. crassa* (Bowman y Free, 2006), además, la quitina es el componente más abundante en la cutícula de los insectos y éstos codifican únicamente dos quitina sintasas (Merzendorfer, 2006). Recientemente, se ha reportado una heterogeneidad estructural de la pared celular en el hongo *A. fumigatus*, por lo tanto, se sugiere que los datos químicos al igual que en *N. crassa*, sean complementados por análisis inmunocitoquímicos a ultraestructura, los cuales requerirán del desarrollo de una librería de marcadores tales como lectinas y anticuerpos específicos monoclonales. Con tal librería, la dinámica y los eventos secuenciales en la biogénesis de la pared celular será marcados citoquímicamente, como ya se ha hecho en plantas (Persson *et al.*, 2007).

Además, la localización de polisacáridos en la pared celular tiene varias implicaciones durante la vida de las células fúngicas, tales como el soporte contra el estrés osmótico o la formación de un andamio para la proteínas de la pared que sirven como reconocimiento a señales externas (Netea *et al.*, 2006).

En años recientes han surgido varios estudios genéticos en sistemas filamentosos, donde se caracterizan funciones morfogenéticas basadas en diferentes componentes del citoesqueleto, pared celular y rutas de señalización (Riquelme *et al.*, 2002; Borkovich *et al.*, 2004; Latgé, 2007). Notablemente, estos estudios han demostrado que el establecimiento y mantenimiento de la polaridad hifal, esta comprometida con mutaciones que afectan, entre otras funciones, proteínas motoras relacionadas con microtúbulos y filamentos de actina, la deposición de quitina, la señalización de AMP cíclico y MAPKs cinasas. Aunque estos estudios han provisto pocas ideas acerca del metabolismo molecular subyacente a la morfogénesis celular, han revelado suficientes diferencias sobre sistemas levaduriformes (Sloat *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1983).

Cabe mencionar que la interrupción de un gen que codifica a una proteína involucrada en algún evento celular, no siempre resulta en un obvio fenotipo afectado. Por ejemplo, los defectos a nivel de pared celular son más fácilmente observados mediante la eliminación de múltiples genes involucrados en una misma ruta (Bowman y Free, 2006). Sin embargo, mutantes de *cdc-24* generaron un fenotipo inesperado en varios puntos de la célula, lo que demuestra el papel esencial de este regulador del crecimiento polar.

Recientemente, intentos sistemáticos para identificar grandes fracciones de genes involucrados en la morfogénesis hifal han sido iniciados en *N. crassa* y *A. nidulans*. Se han realizado múltiples mutaciones que son temperatura sensitivas, las cuales afectan el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. La caracterización fenotípica de dichos productos génicos han mostrado estar involucrados a varios niveles durante la morfogénesis celular, lo cual no era lo esperado (Shaw *et al.*, 2002). Por ejemplo, el aumento en el grosor de la pared celular, así como el aumento en la concentración de quitina, además, se encontró la presencia de organelos cercanos al ápice, los cuales involucran a los microtúbulos.

Una vez que los sitios de polarización son especificados, la información posicional es traducida por módulos conservados de CDC-42 y otras Rho GTPasas (Bishop y Hall, 2000). Como en células animales, el módulo RAC, puede mediar este paso en los hongos filamentosos (Araujo-Palomares, 2011). Efectores de GTPasas regulan la organización del citoesqueleto y el tráfico de vesículas y este proceso está bien conservado en el genoma de *N. crassa* y otros hongos filamentosos (Borkovich *et al.*, 2004). Así, este modelo prevé un marco útil para la evaluación de las funciones de dichas proteínas morfogenéticas que están altamente conservadas entre animales, levaduras y hongos filamentosos. Sin embargo, el papel funcional de la gran mayoría de las proteínas involucradas durante el crecimiento polarizado permanece incierto.

CONCLUSIONES

- La carencia de la proteína funcional CDC-24 genera defectos en la cinética celular del hongo *N. crassa*, al distorsionar la morfología de la hifa, generando hifas con crecimiento isotrópico, con numerosas ramificaciones, un decremento en la producción de conidios, una reducción de producción de biomasa y una tasa de crecimiento prácticamente nula.
- La mutación de *cdc-24* en *N. crassa* mostró a nivel ultraestructural una variedad de fenotipos incluyendo: ausencia del Spitzenkörper y caos en el posicionamiento nuclear, mitocondrial y vesicular.
- Mutaciones en el gen *cdc-24* afecta la integridad de la pared celular, acompañado de un aumento en la concentración de quitina, así mismo, se ve comprometida la formación de septos en regiones apicales y sub-apicales.

Referencias bibliográficas

- Adams E., Johnson D., Longnecker R., Sloat B. y J. Pringle (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. 111(1) 131-142.
- Adams D.J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150(7) 2029-2035.
- Agrios, G.N. (1997) *Plant Pathology*. 4th ed. Academic Press. London.
- Alexopoulos C.J. (1962) *Introducción a la Micología*. Wiley, New York.
- Araujo-Palomares C., Richthammer C., Seiler S. y E. Castro-Longoria (2011) Functional Characterization and Cellular Dynamics of the CDC42-RAC-CDC24 Module in *Neurospora crassa*. *PlosOne*. 110(5) 115-121
- Bartnicki-García S., Hergert F. y G. Gierz (1989) Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma*. 153(1) 46-57.
- Bartnicki-García S., Bartnicki D., Gierz G., López-Franco R. y C. Bracker (1995) Evidence that spitzenkörper behavior determines the shapes of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Experimental Mycology*. 19(2) 153-159.
- Bassilana M., Hopkins J. y R. Arkowitz (2005) Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryotic Cell*. 4(3) 588-603.
- Beadle W. y L. Tatum (1941) The genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 27(11) 449-506.
- Bender A. (1993) Genetic evidence for the roles of the bud-site-selection genes BUD5 and BUD2 in control of the Rsr1p (Bud1p) GTPase in yeast. *Proceedings of the National Academic of sciences of the United States of America*. 90(21) 9926-9935.
- Bennett J. (1998) Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 66(2) 101-107.
- Bishop A. y A. Hall (2000) RhoGTPases and their effector proteins. *Biochemistry. Journal* 348(1) 241-255.
- Borkovich, K. y D. Ebbole. 2010. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. American Society of Microbiology (ASM). New York.

- Borkovich A., Alex A., Yarden O. y M. Freitag, *et al.* (2004) Lesson from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(1) 1-108.
- Bos J., Rehmann H. y A. Wittinghofer (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 129(5) 865-877.
- Bourne H., Sanders D. y F. McCormick (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch of diverse cell functions. *Nature*. 348(6297) 125-132.
- Bowman S. y S. Free (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 28(8) 799-808.
- Bowman B., Draskovic M., Freitag M y E. Bowman (2009) Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. 8(12) 1845-1855.
- Buller A. H. (1993) *Researches on Fungi*. Longman. London.
- Chant J. (1999) Cell polarity in yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 15:365-391.
- Casamayor A. y M. Snyder (2002) Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Current opinion in Microbiology*. 5(2) 179-186.
- Cole K., Barbour J., Midkiff J., Marble B. y D. Johnson (2009) Multiple proteins and phosphorylations regulate *Saccharomyces cerevisiae* Cdc24p localization. *FEBS Letters*. 20(583) 3339-3343.
- Cole R. y J. Fowler (2006) Polarized growth: maintaining focus on the tip. *Current Opinion in Plant Biology*. 6(9) 579-588.
- Coll P., Trillo Y., Ametzazurra A. y P. Pérez (2003) Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*. 14(1) 313-323.
- Chiu H., Xiang X., Dave A. y N. Morris (1997) Deletion of *nudC*, a nuclear migration gene of *Aspergillus nidulans*, causes morphological and cell wall abnormalities and is lethal. *Molecular Biology of the Cell*. 8(9) 1735-1749.
- Curtis H., Barnes A. y G. Flores (2006) *Biología*. En: Curtis H. y Flores G. 6ª Edición. Panamericana Buenos Aires.

- De Groot W., Ruíz C. y R. Vázquez de Aldana (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in the cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative and Functional Genomics*. 3(2) 124-142.
- Dieterle M., Wiest A., Plamann M. y K. McCluskey (2010) Characterization of the Temperature-Sensitive Mutations *un-7* and *png-1* in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE*. 5(5) e10703.
- Drees B., Sundin B., Brazeau E., Caviston J., Chen G., Guo W., Kozminski K., Lau M., Moskow J., Tong A., Schenkman L., McKeinzie A., Breenwald P., Longtine M., Bi E., Chan C., Novick P., Boone C., Pringle J., Davis T., Fields S. y D. Drubin (2001) A protein interaction map for cell polarity development. *The journal of Cell Biology*. 154(3) 549-571.
- D'enfert C. (1997) Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetic Biology*. 2(21) 163-172.
- DerMardirossian C. y G. Bokoch (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology*. 15(7) 356-363.
- Dubrin G. y W. Nelson (1996) Origins of cell polarity. *Cell*. 84(3) 335-344.
- Etienne Manneville S. (2004) Cdc42-the center of polarity. *Journal of Cell Science*. 117:1291-1300.
- Freitag M., Hickey P., Raju N., Selker E. y N. Read (2004) GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 41(10) 897-910.
- García P., Tajadura V., García I. y Y. Sánchez (2006) Role of Rho GTPases and RhoGEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast*. 23(13) 1031-1043.
- Glass N.L., Rasmussen C., Roca G. y N. Read (2004) Hyphal homing fusion and mycelial interconnectedness. *Trends in Microbiology*. 3(12) 135-141.
- Gooday W. (1995) *Cell Walls in the Growing Fungus*. London: Chapman y Hall.
- Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 5350(279) 509-514.
- Harris S., Read N., Roberson R., Shaw B., Seiler B., Plamann M. y M. Momany (2005) Polarisome Meets Spitzenkörper: Microscopy, Genetics, and Genomics Converge. *Eukaryotic Cell*. 2(4) 225-229.

- Hartwell L. H. (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research*. 69(2) 265–276.
- Hartwell H., Culotti J., Pringle R. y J. Reid (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*. 74(2) 267–286.
- Herskowitz I. (1988) Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. 52(4) 536-553.
- Herrera T. y M. Ulloa (1990) *El Reino de los Hongos*. Fondo de Cultura Económica. México. D.F.
- Hickey P., Swift S., Roca M. y N. Read (2004) Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology*. 35(34) 63-87.
- Hirota K., Tanaka K., Ohta K. y M. Yamamoto (2003) Gef1 y Scd, the two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, forms a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology Cell*. 14:3617-3627.
- Hu W., Sillaots S., Lemieux S., Davison J., Breton A., Linteau A., *et al.* (2007) Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*. 3(3) e24.
- Klis M., Mol P., Hellingwerf K. y S. Brul (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 26(3) 239-256.
- Knechtle P., Dietrich F. y P. Philippsen (2003) Maximal polar growth potential depends on the polarisome component AgSpa2 in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Molecular Biology Cell*. 14(10) 4140-4154.
- Kost B., Lemichez E., Spielhofer P., Hong Y., Tolias K., Carpenter C. y N. Chua (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *The Journal of Cell Biology*. 145(2) 317-330.
- Kwon J., Arentshorts M., Roos E., van del Hondel C., Meyer V., *et al.*, (2011) Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Molecular Microbiology*. 79(5) 1151-1167.
- Latgé P. (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 66(2) 279-290.

- López F. y C. Bracker (1996) Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma*. 195(1) 90-111.
- Maerz S., Ziv C., Voght N., Helmstaedt K., Cohen N., Gorovits R., Yarden O. y S. Seiler (2008) The Nuclear Dbf2-Related Kinase COT1 and the Mitogen-Activated Protein Kinases MAK1 and MAK2 Genetically Interact to Regulate Filamentous Growth, Hyphal fusion and Sexual Development in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 179(3) 1313-1325.
- Merzendorfer H. (2006) Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology*. 176(1) 1-15.
- Momany M. (2002) Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion Microbiology*. 5:580-585.
- Money P. (1999) On the origin and functions of hyphal walls and turgor pressure. *Mycological Research*. 10(103) 1360-1365.
- Namboori B. (2008) Six decades of *Neurospora ascus* biology at Stanford. *Fungal Biology Reviews*. 1(22) 26-35.
- Netea G., Gow A., Munro A., Bates S., Collins C. y G. Ferwerda (2006) Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(6) 1642-1650.
- Oshero N. y G. May (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*. 199(2) 153-160.
- Park O. y E. Bi (2007) Central Roles of Small GTPases in the Development of Cell polarity in Yeast and Beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1(71) 48-96.
- Perkins D. y D. Rowland (2000) Evidence for Safety of *Neurospora* Species for Academic and Commercial Uses. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12) 5107-5109.
- Perkins D. y D. Rowland (2001) *Neurospora* at the Millennium. *Fungal Genetics and Biology*. 31(3) 153-167.
- Persson S., Caffall K., Freshour G., Hilley T., Bauer S. y P. Poindexter (2007) The *Arabidopsis* irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *The Plant Cell*. 19(1) 237-255.

- Pringle J., Bi E., Harkins H., Zahner J., De Virgilio C., Chant J., Corrado K. y H. Fares (1995) Establishment of cell polarity in yeast. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 60:729-744.
- Pruyne D. y A. Bretscher (2000) Polarization of cell growth in yeast. *Journal of Cell Science*. 113(3) 365-375.
- Rasmussen G., y N. Glass (2005) A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. 4(11) 1913-1925.
- Rayner A.D., Griffith S. y A. Ainsworth (1995) Mycelial interconnectedness. In: Gow NAR, GAD GM, eds. *The Growing Fungus*. London: Chapman and Hall.
- Requena, N., Alberti Seguí C., Winzenburg E., Horn C., Schliwa M., Philippsen P., Liese R. y R. Fischer (2001) Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 42(1) 121-132.
- Riquelme M. y S. Bartnicki-García (2008) Advances in understanding hyphal morphogenesis: ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases. *Fungal Biology Reviews*. 2(22) 56-70.
- Riquelme M., Roberson R., McDaniel D. y S. Bartnicki-García (2002) The effects of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 37(2) 171-179.
- Riquelme M., Yarden O., Bartnicki García S., Bowman B., Castro-Longoria E., Free S., Fleißner A., Freitag M., Lew R., Mouriño-Pérez R., Plamann M., Rasmussen C., Richthammer C., Roberson R., Sánchez-Leon E., Seiler S. y M. Watters (2011) Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha—a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*. 115(6) 446-474.
- Roberson R., Abril M., Blackwell M., Letcher P., McLaughlin D., Mouriño-Pérez R., Riquelme M. y M. Uchida (2010) Hyphal structure, in cellular and molecular biology of filamentous fungi. In: Borkovich K. Ebbold D (eds), *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. ASM Press. Washington. D.C.
- Roberts R., Bowers B., Slater M. y E. Cabib (1983) Chitin Synthesis and Localization in Cell Division Cycle Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 3(5) 922-930.
- Roncero C. (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetics*. 41(6) 367-378.
- Russell J., Loo M. y N. Schricker (1985) Growth and macromolecular synthesis phenotypes of a heat-sensitive mutant strain, *rip-1*, of *Neurospora crassa*. *Molecular and General Genetics*. 200(2) 247-251.

Sarner S., Kozma R., Ahmed S. y L. Lim (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42, and Rac 1 act downstream of Ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *Molecular and Cell Biology*. 20(1) 158-172.

Sebok A., Nusser N., Debreceni B., Guo Z., Santos M., Szeberenyi J. y G. Tigyi (1999) Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation, and regeneration in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. 73(3) 949-960.

Seiler S., Nargang F., Steinberg G. y M. Schliwa (1997) Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal*. 16(11) 3025-3034.

Seiler S. y M. Plamann (2003) The Genetic Basis of Cellular Morphogenesis in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell*. 14(11) 4352-4364.

Shaw D., Momany C. y M. Momany (2002) *Aspergillus nidulans* swoF encodes an N-myristoyl transferase. *Eukaryotic Cell*. 1(2) 241-248.

Shimada Y., Gulli M. y M. Peter (2000) Nuclear sequestration of the Exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nature Cell Biology*. 2(2) 117-124.

Slater M., Bowers B. y E. Cabib (1985) Formation of Septum-Like Structures at Locations Remote from the Budding Sites in Cytokinesis-Defective Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 162(2) 763-767.

Sloat B., Adams A. y R. Pringle (1981) Roles of the CDC24 gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *The Journal of Cell Biology*. 89(3) 395-405.

Sloat B. y J. Pringle (1978) A mutant of yeast defective in cellular morphogenesis. *Science*. 200(4346) 1171-1173.

Solomon P. (1998) *Biología De Ville*. 4ª ed. McGraw-Hill Interamericana.

Suelmann R. y R. Fischer (2000) Nuclear migration in fungi-different motors at work. *Research in Microbiology*. 151(4) 247-254.

Trinci A. P. (1973) Growth of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa* in batch culture and on agar medium. *Archives of microbiology*. 91(2) 113-126.

Trinci A. P. (1974) A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal of General Microbiology*. 81(1) 225-236.

- Verstrepen J., Jansen A., Lewitter F. y R. Fink (2005) Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature Genetics*. 37(9) 986-990.
- Vetter I. y A. Wittinghofer (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 5545(294) 1299-1304.
- Vogel H. J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora*. *Microbiology and Genetical Bull.* 13:42-43.
- Vogt N. y S. Seiler (2008) The RHO1-specific GTPase-activating protein LRG1 regulates polar tip growth in parallel to Ndr kinase signaling in *Neurospora*. *Molecular Biology of the Cell*. 11(19) 4554-4569.
- Wainright M. (1992) *An introduction to fungal biotechnology*. Wiley. New York. N. Y.
- Walsh J., Groll A., Hiemenz J., Fleming R., Roilides E. y E. Anaissie (2004) Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*. 10:48-66.
- Walther A. y J. Wendland (2003) Septation and cytokinesis in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 3(40) 187-196.
- Wandland J. (2001) Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genetic Biology*. 2(34) 63-82.
- Wennerberg K., Rossman K. y J. Der (2005) The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*. 118: 843- 846.
- Xiang X. y R. Fischer (2004) Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 4(41) 411-419.
- Zheng Y., Bender A. y A. Cerione (1995) Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 270:626-630.
- Ziman M., Preuss D., Mulholland J., Brien O., Botstein D. y D. Johnson (1993) Subcellular Localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding Protein Involved in the Control of Cell Polarity. *Molecular Biology of the Cell*. 4(12) 1307-1311.

Apéndice A. Solución de sales de Vogel (Vogel, 1956).

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

Nota: El resultado final que equivale a 1 L se le añade 2 mL de cloroformo como agente preservador.

Apéndice B. Solución de elementos traza (Vogel, 1956).

Constituyentes:	Fórmula:	Cantidad:
1. Solución de elementos traza		g/95 mL de agua destilada
2.1 Ácido cítrico	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	5 g
2.2 Sulfato de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	5 g
2.3 Sulfato de amonio ferroso	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	1 g
2.4 Sulfato de cobre	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$.25 g
2.5 Sulfato de manganeso	$MnSO_4 \cdot H_2O$.05 g
2.6 Ácido bórico	$H_3BO_3 \cdot \text{anhidro}$.05 g
2.7 Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$.05 g

Nota: El resultado final que equivale a 100 mL se le añade 1 mL de cloroformo como agente preservador.

Apéndice C. Solución de Biotina (Vogel, 1956).

Constituyentes:	Fórmula:	Cantidad:
2. Solución de Biotina	Biotina	5 mg/50 mL de agua destilada

Apéndice D. Medio mínimo de Vogel (Vogel, 1956).

Constituyente:	Cantidad:
Sales de Vogel 50 X	1.24 mL
Sacarosa 2 %	1.24 mL
Agar 1.5 %	15 g

Nota: Estas proporciones corresponden para 1 L de MMV.