

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR EN
MUTANTES DE ENDOCITOSIS EN EL
HONGO FILAMENTOSO *Neurospora crassa***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ARIANNE RAMÍREZ DEL VILLAR

Ensenada, Baja California

Septiembre del 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



**ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR EN MUTANTES DE ENDOCITOSIS EN
EL HONGO FILAMENTOSO *Neurospora crassa***

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PRESENTA

ARIANNE RAMÍREZ DEL VILLAR

APROBADO POR:

DRA. ROSA REYNA MOURIÑO PÉREZ
Presidente del Jurado

DR. FAUSTINO GAMARENA ROSALES
SECRETARIO

M. C. MIGUEL HÚMBERTO CARRILLO MENDÍVIL
PRIMER VOCAL

Ensenada, Baja California

Septiembre del 2012

Agradecimientos

A la **Facultad de Ciencias de la UABC** por proporcionarme los medios para mi desarrollo profesional. A mis maestros y compañeros que con sus conocimientos me ayudaron a mi formación profesional y personal.

Al **Dr. Faustino Camarena Rosales** por su disponibilidad, dedicación y consejos brindados durante mi formación en la licenciatura.

Al maestro **Miguel Humberto Carrillo Mendívil** por su tiempo y apoyo.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada** por abrirme las puertas y permitirme continuar con mi formación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca para realizar mi tesis de licenciatura.

Al **Dr. Salomón Bartnicki García** por su visión y por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo.

Al **Dr. Robert W. Roberson** por su valiosa ayuda.

A la **Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez** por el apoyo, consejos, dedicación y paciencia que me brinda tanto profesional como personalmente.

A la **Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra** por permitirme usar su laboratorio y por sus valiosos conocimientos.

A mi familia porque siempre han estado ahí cuando los necesito y han creído en mi; A mi tía **Angélica** porque aunque este lejos, siempre esta al pendiente de mi y me apoya cuando lo necesito; A mis hermanos **Alberto** y **Mauricio** que me ayudan y me animan a seguir adelante; A mi **padre** que me apoyo cuando lo requería; pero especialmente le agradezco a mi **madre** que siempre ha luchado porque tenga todo lo que necesito, por su dedicación, consejos, guía, amor y por muchas cosas más que jamás terminaré de agradecerle.

A mis amigos por nunca dejarme sola y estar siempre apoyándome. A **Carlos** por todo su amor, apoyo, por ser mi amigo y consejero; A mis amigos **Michel**, **Danna**, **Alfonso**, por brindarme su amistad, estar siempre conmigo y hacer de mi paso por la carrera una de las mejores experiencias de mi vida; A **Rominna**, que aunque lejos, siempre se ha portado como una verdadera amiga; A **Eliab**

por ser como mi hermano; A **Rosita, Diego, Ramón, Olga, Lorena, Alberto, Isadora, Naidy, y Napoleón** por todo su apoyo, paciencia y amistad; A todos los compañeros del laboratorio por los buenos momentos.

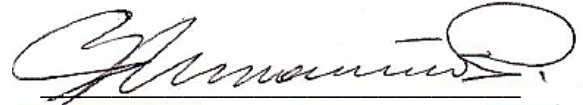
Dedicatoria

*A Rosa María Guadalupe,
Carlos
y
Valeria*

Resumen de la Tesis de Arianne Ramírez del Villar presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México.

ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR EN MUTANTES DE ENDOCITOSIS EN EL HONGO FILAMENTOSO *Neurospora crassa*

Resumen aprobado por:



Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

La morfogénesis y el crecimiento de la hifa dependen del establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado, el cual está regulado por la exocitosis de vesículas que llevan los componentes de la pared celular. Sin embargo, se ha encontrado evidencia de que la endocitosis también puede estar participando en el mantenimiento de la polaridad celular. Mutantes en proteínas que participan en la endocitosis, en hongos filamentosos presentan defectos en el crecimiento polarizado y distribución irregular de la pared celular. Para determinar el efecto que causa en *N. crassa* la mutante afectada en la endocitosis, coronina, sobre la distribución y conformación de la pared celular, se midió la tasa de elongación y biomasa y se cuantificó quitina y proteínas totales. Además se hicieron observaciones por microscopía de epifluorescencia y electrónica. La mutante $\Delta crn-1$ presentó retraso en el crecimiento y menor producción de biomasa que la cepa silvestre. La proporción de quitina en la mutante fue mayor. La morfología y distribución de la pared celular era irregular. En conclusión, en *N. crassa* la mutante de endocitosis, coronina, causa defectos en la distribución y conformación de la pared celular, lo que sugiere que la endocitosis juega un papel importante durante el crecimiento polarizado y la morfología de las hifas.

Palabras claves: *Neurospora crassa*, coronina, crecimiento polarizado, pared celular, endocitosis.

Abstract

Morphogenesis and hyphal growth depends on establishing and maintenance of the polarized growth, which is regulated by the vesicle exocytosis that carry cell wall components. However, has found evidence that endocytosis may be involved in the maintenance of cellular polarity. Mutant in proteins that participate in the endocytosis, in filamentous fungi, show defects in the polarized growth and irregular distribution of cell wall. In order to determinate the effect that cause in *N. crassa* the mutant affected in the endocytosis, coronin, in the distribution and conformation of cell wall, was measured the elongation rate and biomass, and was quantified chitin and total proteins. The mutant Δ crn-1 showed retarded growth and reduced biomass production in comparison with wild type. The proportion of chitin in the mutant was higher. By epifluorescens microscopy and electronic microscopy we observed irregular morphology and uneven distribution of cell wall. The mutant of endocytosis coronin, causes defects in the distribution and conformation of cell wall, it suggest that the endocytosis have important role in polarized growth and morphology in cells.

Key words: *Neurospora crassa*, coronin, polarized growth, cell wall, endocytosis.

Tabla de contenidos

	Contenido	Página
1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	3
2.1	Composición de la pared celular	3
2.2	Glucano	5
2.3	Quitina	6
2.4	Unión quitina/ glucano	7
2.5	Transporte de los componentes de la pared celular y endocitosis	8
3.	Objetivos	11
4.	Materiales y métodos	
4.1	Diseño experimental	12
4.2	Cepas y condiciones de cultivo	12
4.2.1	Liofilización	13
4.3	Tasa de elongación	13
4.4	Determinación de proteínas totales	14
4.4.1	Curva estándar de proteínas totales	14
4.4.2	Cuantificación de proteínas totales	15
4.5	Determinación de quitina	15
4.5.1	Curva estándar de quitina	15
4.5.2	Cuantificación de quitina	16
4.6	Microscopio invertido de epifluorescencia	16
4.6.1	Reconstrucción en 3D	17
4.7	Microscopio electrónico de transmisión	17
4.7.1	Medición del porcentaje de área de pared celular	18
5.	Resultados	
5.1	Tasa de elongación	20
5.2	Relación proteína/ quitina	21
5.3	Distribución de la pared celular	23
5.3.1	Por microscopía óptica	23
5.3.2	Por microscopía electrónica de transmisión	26
6.	Discusión	32
7.	Conclusión	35
8.	Referencias	36
9.	Apéndice	43

Lista de figuras

Figura		Página
1	Representación esquemática de la composición de la pared celular en Ascomicetos filamentosos y la síntesis de glucanos por la glucano sintetasa (GS, por sus siglas en inglés <i>glucan synthase</i>).	4
2	Esquema que representa las uniones de β -1-3 y β -1-6 glucanos que forman la pared celular en hongos	5
3	Unión de los residuos de β -(1,4)-N-acetil-glucosamir para formar la quitina de la pared celular en hongos.	6
4	Método para la medición de la tasa de elongación. Las líneas negras corresponden al crecimiento en un tiempo x. Las líneas azules son los transectos sobre los que se realizaron las mediciones del crecimiento en cada tiempo.	14
5	Procedimiento para determinar el porcentaje de pared celular en A) germínulas y B) conidias de las células WT y mutante $\Delta crn-1$.	19
6	Tasa de elongación de la mutante $\Delta crn-1$ en relación con la cepa WT. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.	20
7	Porcentaje de proteínas totales y quitina en la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.	22
8	Razón entre proteínas totales y quitina en la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT.	22
9	Reconstrucción en 3D de imágenes de conidias de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT tomadas con epifluorescencia, teñidas con solophenyl flavine al 0.1%.	24
10	Reconstrucción en 3D de imágenes de germínulas de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT teñidas con solophenyl flavine al 0.1%.y observadas por epifluorescencia. Escala = 20 μ m.	24
11	Reconstrucción en 3D de imágenes de germínulas de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT teñidas con solophenyl flavine al 0.1%.y observadas por epifluorescencia. Escala = 20 μ m	25
12	Observación de hifas maduras en el microscopio de epifluorescencia de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT, teñidas con blanco de calcoflúor al 0.1%. Escala = 50	26

	μm .	
13	Observaciones de conidias en el microscopio electrónico de transmisión de la mutante $\Delta\text{crn-1}$ (A y B) y la cepa WT (C y D). Escala = 0.5 μm .	28
14	Porcentaje del área de pared celular con respecto al área total en conidias de la mutante $\Delta\text{crn-1}$ y la cepa WT. Barras de error con un intervalo de confianza del 95%.	29
15	Observaciones en el microscopio electrónico de transmisión de la pared celular en el tubo germinal de la mutante $\Delta\text{crn-1}$ (A y B) y la cepa WT (C y D). Escala 0.5 μm (A y C) y 0.1 μm (B y D).	30
16	Porcentaje de área de pared celular respecto al área total en germínulas de la mutante $\Delta\text{crn-1}$ y la cepa WT. Barra de error con un intervalo de confianza del 95%.	31
17	Porcentaje del área de pared celular con relación al área por distancia del ápice en germínulas de la mutante $\Delta\text{crn-1}$ y la cepa WT. Barra de error con un intervalo de confianza del 95%.	31

Tablas

Tabla		Página
I	Composición de la pared celular en hongos (Modificada de Bartnicki-García, 1968)	3
II	Cepas utilizadas	12

Introducción

La pared celular de los hongos es la estructura que se mantiene en contacto con el medio externo y juega un papel importante en el mantenimiento de la forma celular, protección y resistencia a la presión osmótica interna a lo largo del ciclo celular. Durante el crecimiento de las células fúngicas se requiere la síntesis constante de nueva pared celular. La pared celular de los hongos está compuesta de 80 a 90 % de polisacáridos, y el resto consiste en proteínas y lípidos (Bartnicki-García, 1968). Es un tejido compuesto por microfibrillas de quitina entrelazadas y una matriz amorfa de glucano y proteína que llena los intersticios entre las microfibrillas de quitina (Manocha, 1967).

La morfogénesis en hongos filamentosos depende del establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado. Esta es la clave para la formación de una gran variedad de morfologías que se presentan dentro de su ciclo de vida. Las hifas son la unidad principal en hongos filamentosos, son células que crecen de manera alargada en forma de tubo, el crecimiento es exclusivo en el ápice celular (Bartnicki-García y Lippman, 1969; Bartnicki-García y Hergert, 1989). El crecimiento polarizado se lleva a cabo por la exocitosis de vesículas provenientes de la zona subapical, que contienen enzimas o precursores de la pared celular (Bartnicki-García y Lippman, 1969; Trinci, 1978). El transporte vesicular se ha hipotetizado que se realiza a través del citoesqueleto, formado por microtúbulos y filamentos de actina. El modelo del centro suministrador de vesículas (VSC- por sus siglas en inglés

vesicle supply center model) propuesto por Bartnicki-García (Bartnicki-García, 1989; Bartnicki-García, *et al.* 2002) explica que el crecimiento de los hongos esta dado por vesículas provenientes del derivado del Golgi en la zona subapical, que se reúnen en un VSC, que se encuentra en el ápice y es conocido como Spitzenkörper (Spk). El Spk regula el crecimiento polarizado generando un gradiente exocítico de precursores de la pared celular, junto con la presión de turgor.

Otro proceso que en los últimos años ha cobrado importancia, en referencia a la morfogénesis de hongos filamentosos, es la endocitosis. Se ha encontrado evidencia del efecto que tiene la falta de endocitosis en el mantenimiento de la polaridad celular. Mutantes de endocitosis de *Aspergillus oryzae* muestran un retraso en el crecimiento apical, morfología anormal de las hifas, deslocalización de vesículas guiadas por SNARE's, y acumulación de componentes de la pared celular en estructuras largas invaginadas (Higuchi, 2009). En un estudio más reciente en *Neurospora crassa*, se observó que la mutante endocítica de coronina también muestra periodos alternados de crecimiento polarizado y crecimiento isotrópico, además de una distribución irregular de la pared celular (Echauri-Espinosa *et al.*, 2012).

Debido a lo anterior, se llevó a cabo el análisis de la conformación y distribución de la pared celular de la mutante de coronina, que está afectada en la endocitosis, en el hongo filamentoso *N. crassa*.

Antecedentes

Composición de la pared celular

La composición de la pared celular de los hongos, varía dependiendo del grupo taxonómico (Tabla I) y de la fase morfológica en que se encuentre (Bartnicki-García, 1968). Los componentes de la pared celular son sintetizados en el retículo endoplasmático y son dirigidos a la superficie por vesículas secretoras provenientes del equivalente del Aparato de Golgi (Schekman 1985, Tanner, 1990; MacKenzie, 1993).

Tabla I. Composición de la pared celular en hongos (Modificada de Bartnicki-García, 1968)

Categoría química		Grupo taxonómico	Géneros
I	Celulosa- Glucógeno	Acrasiomicetes ^a	<i>Polysphondylium</i> , <i>Dictyostelium</i>
I	Celulosa- Glucano	Oomicetes ^{a,b}	<i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Saprolegnia</i>
II	Celulosa- Quitina	Hifoquitridiomycetes ^a	<i>Rhizidiomyces</i>
IV	Quitosano- Quitina	Zygomycetes	<i>Mucor</i> , <i>Phycomyces</i> , <i>Migorhynchus</i>
V	Quitina- Glucano	Quitridiomycetes	<i>Allomyces</i> , <i>Blastocladiella</i>
		Ascomycetes	<i>Neurospora</i>
		Deuteromicetes	<i>Aspergillus</i>
		Basidiomicetes	<i>Schizophyllum</i> , <i>Fomes</i> , <i>Polyporus</i>
VI	Manano- Glucano	Ascomycetes	<i>Saccharomyces</i> ^b , <i>Candida</i>
VII	Manano- Quitina	Tricomycetes	<i>Sporobolomyces</i> , <i>Rhodotorula</i>

^a Actualmente se consideran protistas

^b Se ha encontrado quitina en la pared celular de *Apodachlya* (Lin et al., 1976) y en *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell, 1974)

Como se observa en la Tabla I, la composición de la pared celular en hongos filamentosos del grupo de los Ascomicetos, como *Neurospora sp.*, se compone principalmente de quitina y glucanos, los cuales se encuentran unidos dando la rigidez característica de la pared celular (Figura 1). Se calcula que en *N. crassa*, alrededor de dos terceras partes de la pared de la hifa están compuestas de quitina y glucano (Mahadevan y Tatum, 1963; 1967).

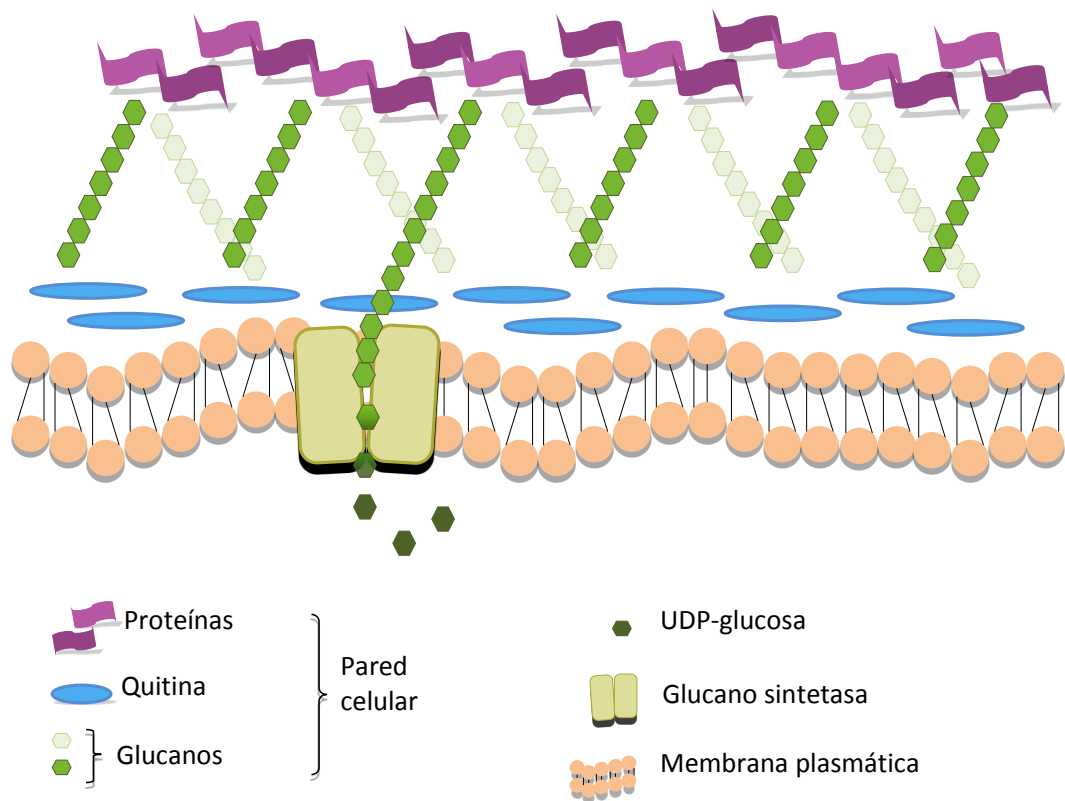


Figura 1. Representación esquemática de la composición de la pared celular en Ascomicetos filamentosos y la síntesis de glucanos por la glucano sintetasa (GS, por sus siglas en inglés *glucan synthase*).

Glucano

Los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90%) aunque algunos hongos presentan enlaces β -1,6, β -1,4, α -1,3 y α -1,4 (Figura 2). El más importante es el β -1,3-glucano al que se le unen covalentemente otros componentes. El β -1,3-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas llamadas GS (Figura 1)

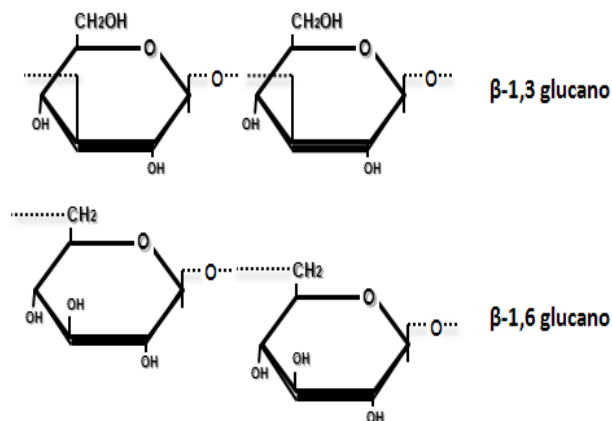


Figura 2. Esquema que representa las uniones de β -1-3 y β -1-6 glucanos que forman la pared celular en hongos.

Estudios de autorradiografías con *Saccharomyces cerevisiae* (Shematek *et al.*, 1980) y *N. crassa* (Jabri *et al.*, 1989), sugieren que las GSs son proteínas trans-membrana que aceptan el sustrato uridina difosfoglucosa (UDP-glucosa) en el citoplasma y el producto lo llevan fuera de la membrana plasmática. Los genes que codifican la β -1,3-glucano sintetasa (específicas para sintetizar β -1,3-glucano) fueron identificados en *S. cerevisiae* y se denominaron como FKS1 y FKS2 (Douglas, 1994; Qadota, 1996). Las GSs se componen de subunidades catalíticas relacionadas,

Fks1p y Fks2p, y una subunidad reguladora, Rho1p pequeña GTPasa (Inoue *et al.*, 1995; Drognova *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996). Ambos componentes están localizados en la membrana plasmática en el sitio de remodelación de la pared celular (Qadota *et al.*, 1996). La Fks1p está asociada a los parches de actina, los cuales pertenecen a lo que se conoce como el citoesqueleto de actina encargado del transporte polarizado de vesículas secretoras, mRNA y organelos, endocitosis y orientación del huso mitótico (Utsugi, 2002).

Quitina

La quitina es un polímero lineal compuesto de residuos de β -(1,4)-*N*-acetil-glucosamina y es un componente importante en la pared celular presente en muchos hongos (Figura 3). Generalmente, los hongos filamentosos contienen mayor cantidad de quitina que las levaduras.

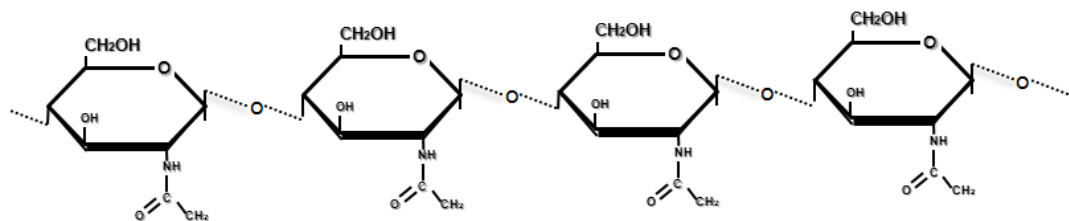


Figura 3. Unión de los residuos de β -(1,4)-*N*-acetil-glucosamina para formar la quitina de la pared celular en hongos.

La quitina es sintetizada por proteínas trans-membrana conocidas como quitinas sintetasas (CS, por sus siglas en inglés *chitin synthase*). La actividad de las CSs se encuentra en regiones de crecimiento en células de hongos y durante la formación del septo (Siestma y Wessels, 1994). Estas

enzimas actúan aceptando el sustrato de la quitina, uridina difosfo-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNac), en el espacio citoplasmático, mientras los polímeros obtenidos como producto, β -(1-4)-*N*-acetilglucosamina, son expulsados al exterior (hacia la pared celular), proceso similar al que ocurre en la formación de los β -1,3-glucanos (Duran *et al.*, 1975; Vermeulen *et al.*, 1979; Cabib *et al.*, 1983). Las CSs varían dependiendo del hongo y son codificadas por familias de múltiples genes. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* se han identificado tres miembros, mientras que en *Phycomyces blakesleeanus* se han encontrado hasta 10 miembros (Bulawa, 1993; Chitnis *et al.*, 2002). Gracias a estudios con interrupciones de los genes que codifican a las CSs, se ha encontrado que actúan en sitios particulares del hongo y presentan diferentes funciones.

Unión quitina/ glucano

En hongos filamentosos, los componentes que formarán la pared celular son dirigidos a la superficie por vesículas secretoras provenientes del equivalente del Aparato de Golgi (Schekman 1985; Tanner, 1990; MacKenzie, 1993) y debido a que su síntesis ocurre en el citoplasma o en el retículo endoplasmático por diferentes enzimas, la unión de quitina y β -1,3-glucanos solo puede ocurrir fuera de la membrana plasmática en la región de la pared. En el ápice de la hifa, la quitina y β -1,3-glucanos no están entrecruzadas aún y la pared presenta cierta flexibilidad. A medida que la punta crece, la quitina en el subápice se cristaliza y se une a los β -1,3-

glucanos, y la pared celular se solidifica en esta zona (Wessels, 1986; Sietsma y Wessels, 1994).

Autorradiografías muestran que la quitina y la β -1,3-glucano sintetasa son depositados fuera de la membrana plasmática y que están localizadas solo en los ápices (Van der Valk, 1977; Fevre, 1982; 1991). Otros estudios similares, pero utilizando membranas plasmáticas aisladas y nucleótidos, han demostrado que estos polímeros son sintetizados vectorialmente por proteínas integrales del plasmalema (Shematek, 1980; Cabib, 1983; Jabri, 1989).

Transporte de los componentes de la pared celular y endocitosis

Uno de los modelos que intenta explicar cómo es que se da el transporte de vesículas que contiene los precursores de quitina y glucano, y otros componentes necesarios para formar la pared celular y originar la morfología tubular característica de los hongos filamentosos, es el modelo del centro suministrador de vesículas, en el cual la exocitosis y la fuerza de turgor actúan para dar lugar a estos dos eventos (Bartnicki-García, 1989; Bartnicki-García, *et al.* 2002).

El crecimiento de la hifa involucra la adición constante de nueva membrana plasmática, proteínas y componentes de la pared celular en el ápice, por lo que teóricamente podría haber un exceso de membrana producido por las vesículas exocíticas y la nueva membrana depositada por éstas (Echauri-Espinosa *et al.*, 2012). Por lo que, se puede asumir que un mecanismo como la endocitosis participe en un proceso de reciclaje de éste

exceso de membrana que se está produciendo y también de proteínas transmembrana (Fisher-Parton *et al.*, 2000; Galleta y Cooper, 2009; Echaurre-Espinosa *et al.*, 2012). Estudios con FM4-64, un marcador de membrana, muestran la internalización de éste en una gran variedad de células (Betz *et al.*, 1996; Hoffman y Mendgen, 1998; Fisher-Parton *et al.*, 2000; Atkinson *et al.*, 2002; Peñalva, 2005). También se ha encontrado que en mutantes de endocitosis en *A. oryzae* presentan morfología anormal de las hifas, retraso en el crecimiento apical, deslocalización de vesículas dirigidas por proteínas SNARE's y acumulación de componentes de la pared celular (Higuchi, 2009). Upadhyay y Shaw (2008) proponen un modelo del papel de la endocitosis en el reciclaje de marcadores corticales de la punta de la hifa encargados de guiar vesículas exocíticas que contienen materiales necesarios para la polarización (Fisher-Parton *et al.*, 2000; Silverman-Gavrila y Lew, 2000; 2003; Gupta y Heath, 2002; Wang *et al.*, 2006; Steinberg, 2007). Además, en *N. crassa* se han encontrado homólogos de 29 proteínas involucradas en la endocitosis de levaduras (Altschul *et al.*, 1997), con una alta homología, lo que sugiere que posee la maquinaria necesaria para la endocitosis.

Un estudio reciente en *N. crassa*, demostró que la delección de la proteína coronina, causa alteraciones en el crecimiento polarizado, conidiación y morfología de la pared celular, además de que la tasa de internalización por endocitosis del colorante FM4-64 está reducida (Echaurre-Espinosa *et al.*, 2012).

La coronina es una proteína de unión a actina aislada por primera vez en *Dictyostelium discoideum*, altamente conservada en muchas especies y

tipos celulares individuales (Utrecht y Bear, 2006) y que tiene un papel importante en la migración de fibroblastos, fagocitosis y quimiotaxis en células animales (de Hostos *et al.*, 1993; Mishima y Nishida, 1999; Cai *et al.*, 2005; Forger *et al.*, 2006;). En levaduras, se ha encontrado que interactúa con microtúbulos y que inhibe la función del complejo Arp 2/3, encargado de la formación y ramificación de filamentos de actina que a su vez están involucrados en el proceso de endocitosis (Goode *et al.*, 1999; Humphries *et al.*, 2002; Rodal *et al.*, 2005).

Objetivos

Objetivo general

- Analizar la distribución y conformación de la pared celular en la mutante de endocitosis $\Delta crn-1$ en *N. crassa*.

Objetivos específicos

- Cuantificar los componentes de la pared celular tales como, quitina y proteínas en la mutante de endocitosis $\Delta crn-1$ y una cepa silvestre de *N. crassa*.
- Establecer la relación entre cantidad de pared celular en referencia al crecimiento del micelio de colonias de *N. crassa* en la mutante de endocitosis $\Delta crn-1$ y una cepa silvestre.
- Identificar las diferencias en la distribución de la pared a través de la visualización directa por microscopía óptica y electrónica en la mutante de endocitosis $\Delta crn-1$ y una cepa silvestre de *N. crassa*.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Para determinar la distribución y conformación de la pared celular en una mutante de endocitosis de *N. crassa*, se utilizó la mutante que presenta la delección de la proteína coronina ($\Delta crn-1$) y se comparó con una cepa silvestre (WT- por sus siglas en inglés Wild Type).

Cepas y condiciones de cultivo

En la Tabla II se enlistan las cepas utilizadas en este trabajo. Las conidias de ambas cepas, que se encontraban almacenadas en sorbitol 1M y glicerol al 20% a -20°C, fueron cultivadas por separado en matraces de 250 ml con 100 ml de medio mínimo de Vogel (VMM, por sus siglas en inglés Vogel Minimal Medium) que contiene 1.5% sacarosa, 1.5% agar y sales de Vogel 1X a una temperatura de 30°C y se dejaron crecer por 4 días hasta obtener conidias frescas. Las conidias se cosecharon por filtración mediante dos lavados con sorbitol 1 M y se resuspendieron en 90 μ l de sorbitol 1 M. Posteriormente, se hicieron los correspondientes conteos en la cámara de Neubauer y diluciones con agua destilada estéril para obtener la misma concentración de conidias (1.6×10^9 células ml^{-1}) para ambas cepas y se almacenaron en un tubo de microcentrífuga a -20°C.

Tabla II. Cepas utilizadas

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>N. crassa</i> WT 4200	mat a	FGSC #4200
<i>N. crassa</i> $\Delta crn-1$	mat a	Echauri-Espinosa <i>et al.</i> , 2012

Liofilización

Se añadieron 20 μ l de la misma concentración de conidias de la WT y la mutante $\Delta crn-1$, en matraces de 250 ml con 100 ml de MMV líquido y se cultivaron durante tres días a 30°C en agitación constante (200 rpm), por triplicado. Posteriormente, se eliminó el MMV líquido del matraz y se lavó el micelio con agua destilada estéril. Con ayuda de un embudo y papel filtro estéril se eliminó el exceso de líquido del micelio y se pasó a un tubo de 15 ml, que había sido pesado previamente. El micelio obtenido fue liofilizado a -40°C, a 0.133 mBar durante 24 h en un liofilizador LABCONCO FreeZone 2.5. Después, se pesó el tubo más el micelio liofilizado y se determinó el peso en gramos del micelio obtenido. Antes y después de ser liofilizado, se observó la morfología del micelio de ambas cepas en el microscopio óptico binocular CX-21 LED Olympus con un aumento de 10X y 40X.

Tasa de elongación

En cajas Petri de 15 cm con VMM se sembraron 10 μ l de conidias de la cepa WT y la mutante $\Delta crn-1$ en una orilla de la placa, y se dejó crecer durante 12 h a 30°C, por triplicado. Se marcó el crecimiento de la colonia cada 4 h (a partir de las 12 h) hasta que el micelio llenó la caja (Figura 4). El tiempo 0 (T0) corresponde al momento de inoculación, T1 son 12 h de crecimiento y el resto de los tiempos es cada 4 h. Se midió 10 veces por cada tiempo.

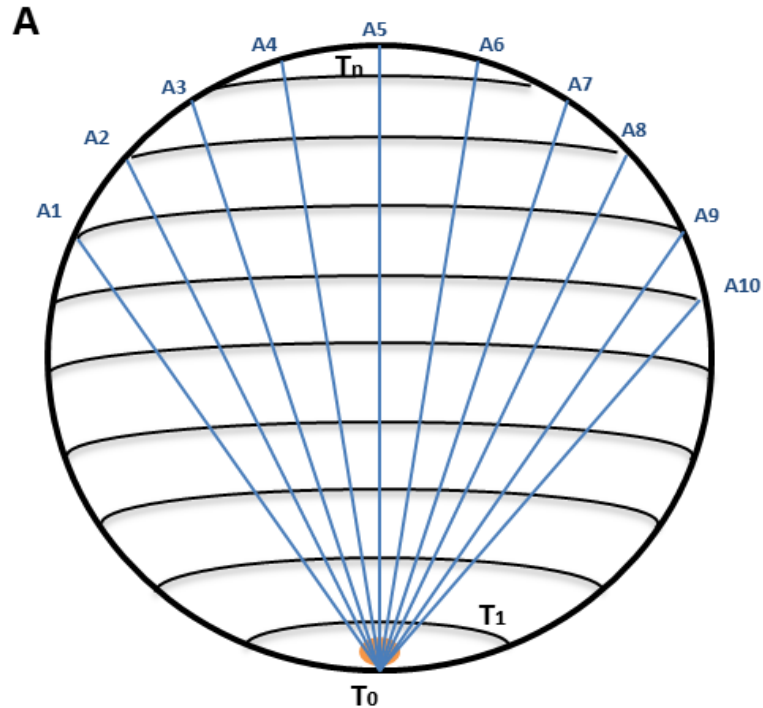


Figura 4 Método para la medición de la tasa de elongación. Las líneas negras corresponden al crecimiento en un tiempo x . Las líneas azules son los transectos sobre los que se realizaron las mediciones del crecimiento en cada tiempo.

Determinación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales de la cepa WT y la mutante $\Delta crn-1$ se determinó utilizando el método de Bradford modificado (Bradford, 1976).

Curva estándar de proteínas totales

La curva estándar se calculó utilizando una solución de 10 mg ml^{-1} de Suero de albumina bovina 100X (BSA- por sus siglas en inglés Bovine Serum Albumine) (New England BioLabs ®). Se prepararon por triplicado diferentes

concentraciones con agua destilada y la solución de BSA en tubos de cultivo y se le añadieron 1.5 ml del Reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich), se agitó en un Vortex durante 5 s. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Jenway modelo 6505 UV/Vis.

Cuantificación de proteínas totales

Para las muestras problema, se utilizó micelio liofilizado de la cepa WT y la mutante $\Delta crn-1$, se preparó una solución de trabajo de 5 mg ml⁻¹ para cada cepa. Se hizo una dilución 1:4 y se llevó a cabo el mismo procedimiento que para la curva estándar.

Determinación de quitina

La quitina fue determinada por el método de Morgan-Elson (Morgan y Elson, 1934) como se describe en Larson *et al* (2011) con modificaciones mínimas.

Curva estándar de quitina

Se prepararon soluciones de 100 μ l de diferentes concentraciones a partir de una solución de trabajo de 10 mg ml⁻¹ de N-acetil-D-glucosamina (Sigma-Aldrich) por triplicado. Se añadieron 100 μ l de 1.5 M Na₂CO₃ en 4% (p/v) de acetilacetona y se incubaron a 100°C por 20 min en un bloque térmico VWR™. Los tubos fueron puestos a enfriar a temperatura ambiente y se le añadieron 700 μ l de etanol al 95% y 100 μ l de la solución de Ehrlich I y

se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. En un espectrofotómetro Jenway modelo 6505 UV/Vis se midió la absorbancia a 520 nm.

Cuantificación de quitina

A partir de las muestras liofilizadas se tomaron 5 mg de micelio de la cepa WT y la mutante $\Delta crn-1$ y se pusieron en un tubo de microcentrífuga de 1.7 ml con 1 ml de 6 N HCl. La mezcla se puso en baño María a una temperatura de 100°C por 20 h y después se seco en un bloque térmico VWR™ a 100°C durante 5 h en una cámara de extracción. Posteriormente, el material seco fue resuspendido en 1 ml de agua destilada y se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. Se tomaron 100 μ l del sobrenadante de cada muestra y se pusieron en un tubo nuevo. A partir de este paso se llevó a cabo el mismo procedimiento que el que se hizo para la curva estándar.

Microscopio invertido de epifluorescencia

Para determinar si existen diferencias en la distribución de la pared celular en la mutante de endocitosis de *N. crassa* se observaron conidias y germínulas de la cepa WT y la mutante $\Delta crn-1$ en el microscopio de epifluorescencia utilizando los colorantes vitales Solophenyl Flavine al 0.1% y blanco de calcoflúor al 0.1% (Hoch *et al.* 2005).

Se espatularon conidias frescas de la cepa WT y la mutante $\Delta crn-1$ en placas con VMM y se dejaron germinar durante 4 h a una temperatura de 30°C. En un cubreobjetos se añadieron 10 μ l de Solophenyl Flavine 0.1% y se colocó un bloque de agar invertido. Las cepas fueron observadas con un

objetivo plan-apocromático 63 X/1.4 A.N., utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia Axiovert 200 Carl Zeiss con un filtro FITC y se tomaron imágenes en diferentes planos focales de las conidias y germínulas observadas. Las placas con conidias y germínulas de la cepa WT y mutante fueron incubadas nuevamente a 30°C y observadas en el microscopio de epifluorescencia con el tratamiento del colorante 2 h después, 2 veces más. El procedimiento para la observación y tinción con el colorante blanco de calcoflúor al 0.1% fue el mismo que el utilizado con el Solophenyl Flavine 0.1%.

Reconstrucción en 3D

Para la reconstrucción en 3D de las imágenes tomadas en el microscopio invertido de epifluorescencia se utilizó el software MetaMorph®

Microscopio electrónico de transmisión

Por medio de imágenes tomadas en el microscopio electrónico de transmisión se midió el grosor de la pared celular de la cepa WT y la mutante *Δcrn-1*.

Las germínulas y conidias fueron crecidas sobre membranas de diálisis, estériles y desionizadas en VMM a 23°C. Las células fueron criofijadas sumergiéndolas rápidamente en propano líquido enfriado a -186°C con nitrógeno líquido y después fueron substituidas en acetona con tetróxido de osmio al 2% y acetato de uranilo al 0.05% a 85°C por 48 h. Se enjuagaron en acetona al 100%, para posteriormente ser infiltradas en resina epóxica y

embebidas en dos capas de teflón y polimerizados a 60°C por 24 h. Después de la polimerización en resina, las células fueron seccionadas en un Ultramicrotomo Leica (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA) y posteriormente teñidas por 10 min con acetato de uranilo al 2% en etanol al 50% y por 5 min en citrato de plomo. Las secciones fueron examinadas usando un microscopio electrónico de transmisión FEI CM12S (FEI Electronics Instruments, Co., Mahwah, NJ) a 100 kV acoplado a una cámara digital Gatan 689 CCD (1024x1024 pixeles; Gatan Inc., Pleasanton, CA). Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Robert W. Roberson de la Universidad Estatal de Arizona, en Tempe, AZ.

Medición del porcentaje de área de pared celular

El porcentaje del área de pared celular de la cepa WT y la mutante *Δcrn-1* se midió utilizando el software MetaMorph®. En las imágenes tomadas en el microscopio electrónico de transmisión, se hicieron dos mediciones en la región apical y subapical de las germínulas; se midió el área de la pared celular y el área total de la célula, todas las mediciones se hicieron en intervalos constantes. Con estos datos se calculó el porcentaje de la pared celular que correspondía a cada zona de la germínula (Figura 5A). Para las conidias el procedimiento fue el mismo, solo que en éstas se midió toda la célula (Figura 5B).

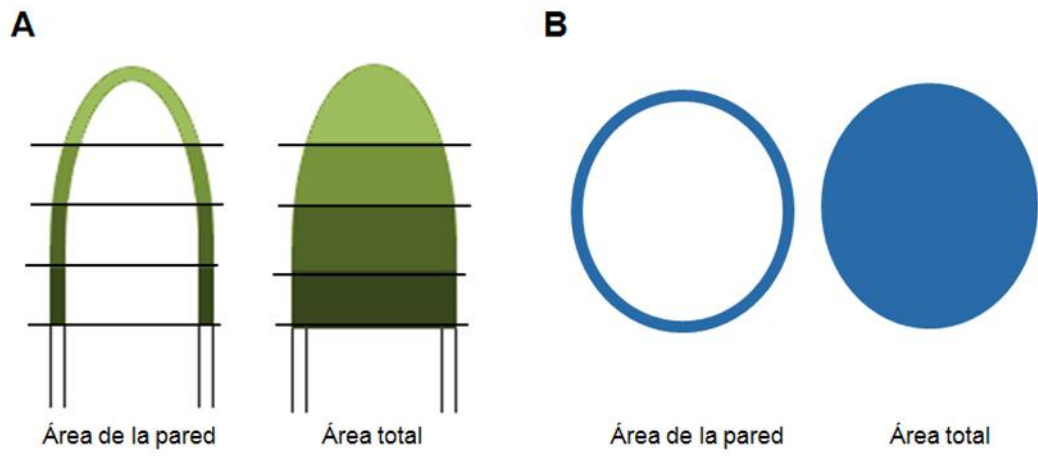


Figura 5. Procedimiento para determinar el porcentaje de pared celular en A) germínulas y B) conidias de las células WT y mutante $\Delta crn-1$.

Resultados

Tasa de elongación

Se midió la tasa de crecimiento de la cepa WT y la mutante $\Delta crn-1$ durante 48 h, tiempo en el que la cepa WT llenó la placa de cultivo. La figura 6 muestra la gráfica de las diferencias en la elongación de la colonia, los resultados indican que la mutante $\Delta crn-1$ tiene una tasa de elongación de aproximadamente la mitad ($23.4 \mu\text{m min}^{-1}$) que la cepa WT ($46.7 \mu\text{m min}^{-1}$) en el mismo periodo.

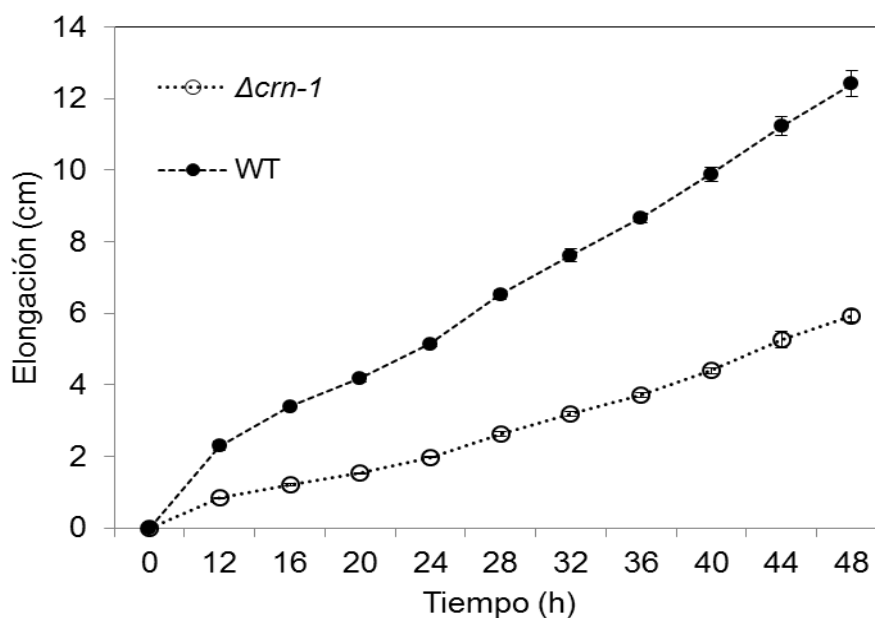


Figura 6. Tasa de elongación de la mutante $\Delta crn-1$ en relación con la cepa WT. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

Además de medir la tasa de elongación, se calculó la producción de biomasa en 24 horas de las muestras liofilizadas. La mutante $\Delta crn-1$ produjo

$99.2 \pm 47.8 \text{ mg d}^{-1}$ (promedio \pm error estándar), mientras que en la cepa WT fue de $153.0 \pm 31.2 \text{ mg d}^{-1}$

Relación proteína/quitina

Se analizó bioquímicamente el contenido de quitina para establecer las diferencias en la producción de pared celular en la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT. Como la tasa de elongación fue menor en la mutante $\Delta crn-1$, adicionalmente se cuantificaron las proteínas totales para estandarizar el valor de la quitina de acuerdo al crecimiento de cada cepa. Se encontró que aproximadamente el 30% del peso total corresponde a proteínas, en la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT (31.5 y 35.4%, respectivamente) (Figura 7). Sin embargo, la proporción de quitina en la mutante $\Delta crn-1$ fue de 14.1% del peso total y en la cepa WT fue de 9.1% (Figura 7). La razón calculada entre proteínas totales y quitina indica que la mutante $\Delta crn-1$ contiene más quitina que la cepa WT (Figura 8).

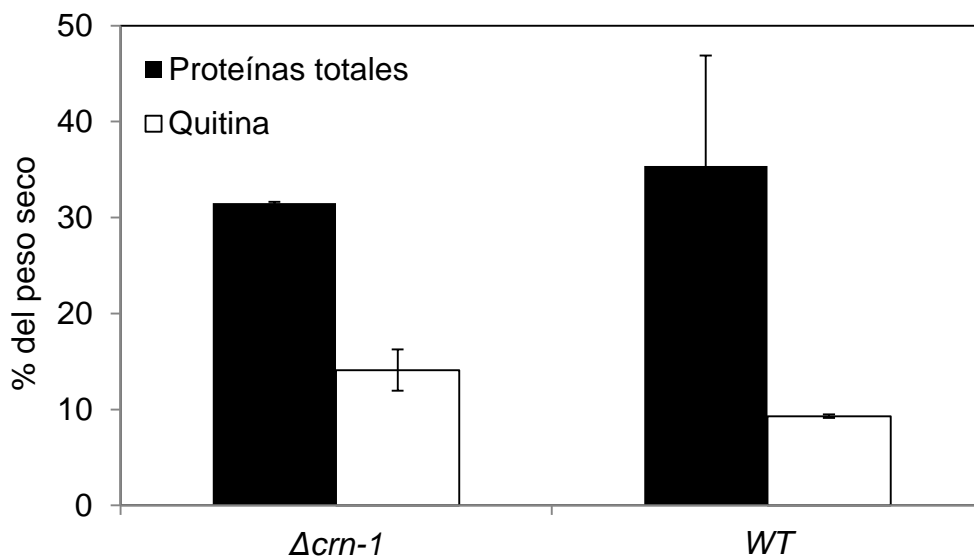


Figura 7. Porcentaje de proteínas totales y quitina en la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT. Barras de error muestran el intervalo de confianza al 95%.

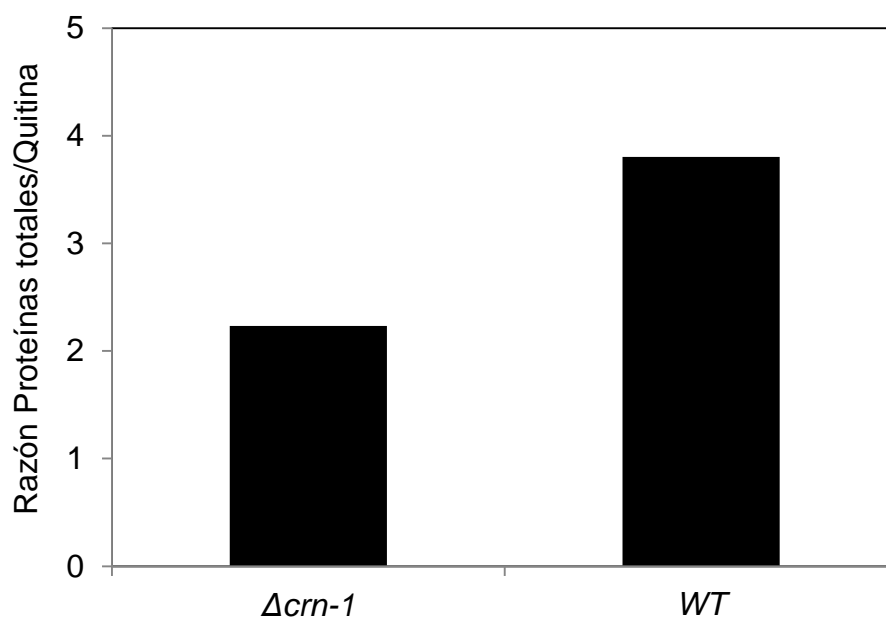


Figura 8. Razón entre proteínas totales y quitina en la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT.

Distribución de la pared celular

Por microscopía óptica

La distribución de la pared celular en conidias y germínulas en la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT fue observada por microscopía de epifluorescencia tiñéndola con el colorante solophenyl flavine al 0.1%.

En conidias, ambas cepas tenían una distribución de la pared celular asociada a la superficie de la célula. La mutante $\Delta crn-1$, no presentó acumulación antes de la aparición del tubo germinal, por el contrario, en la cepa WT se pudo observar mayor fluorescencia en el sitio de germinación (Figura 9). Una vez que las conidias han germinado, la mutante $\Delta crn-1$ presentó una acumulación de pared celular en la zona apical, y en la esfera germinal (Figura 10). Como la mutante $\Delta crn-1$ tiene periodos de crecimiento polarizado e isotrópicos intermitentes, la morfología de los tubos germinales se ve afectada, dando la impresión de la generación de varias yemas previo al establecimiento del crecimiento polarizado efectivo. Durante este fenómeno, se observó una acumulación de la pared celular en los sitios donde aparentemente crecerá la célula en forma polarizada, pero no en los que verdaderamente crece de esta manera (Figura 11 y 12).

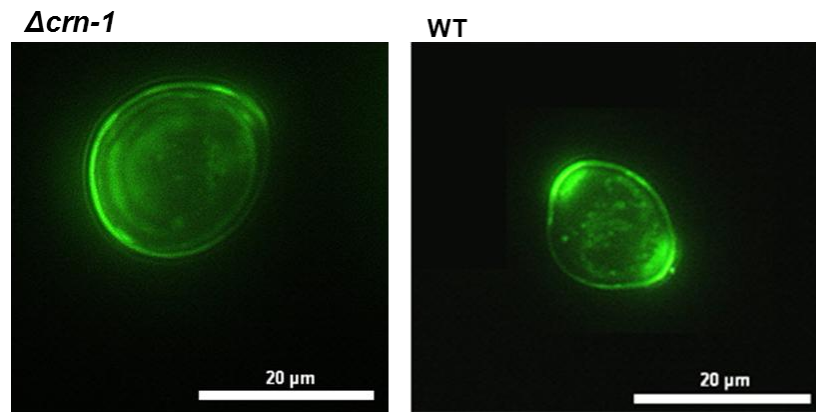


Figura 9. Reconstrucción en 3D de imágenes de conidias de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT tomadas con epifluorescencia, teñidas con solophenyl flavine al 0.1%.

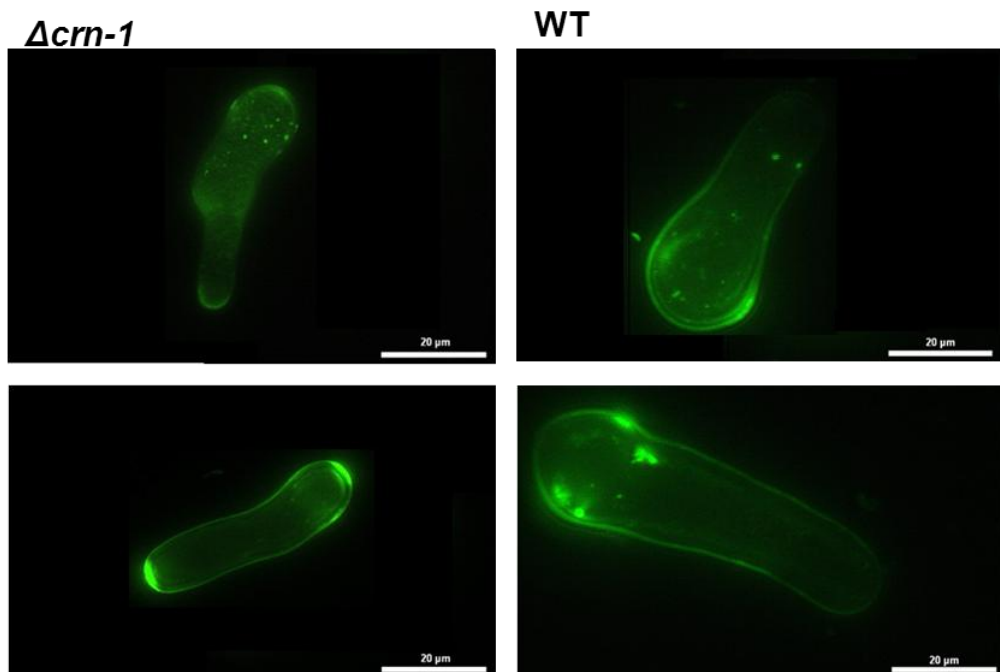


Figura 10. Reconstrucción en 3D de imágenes de germínulas de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT teñidas con solophenyl flavine al 0.1%.y observadas por epifluorescencia. Escala = 20 μm .

$\Delta Crn-1$

WT

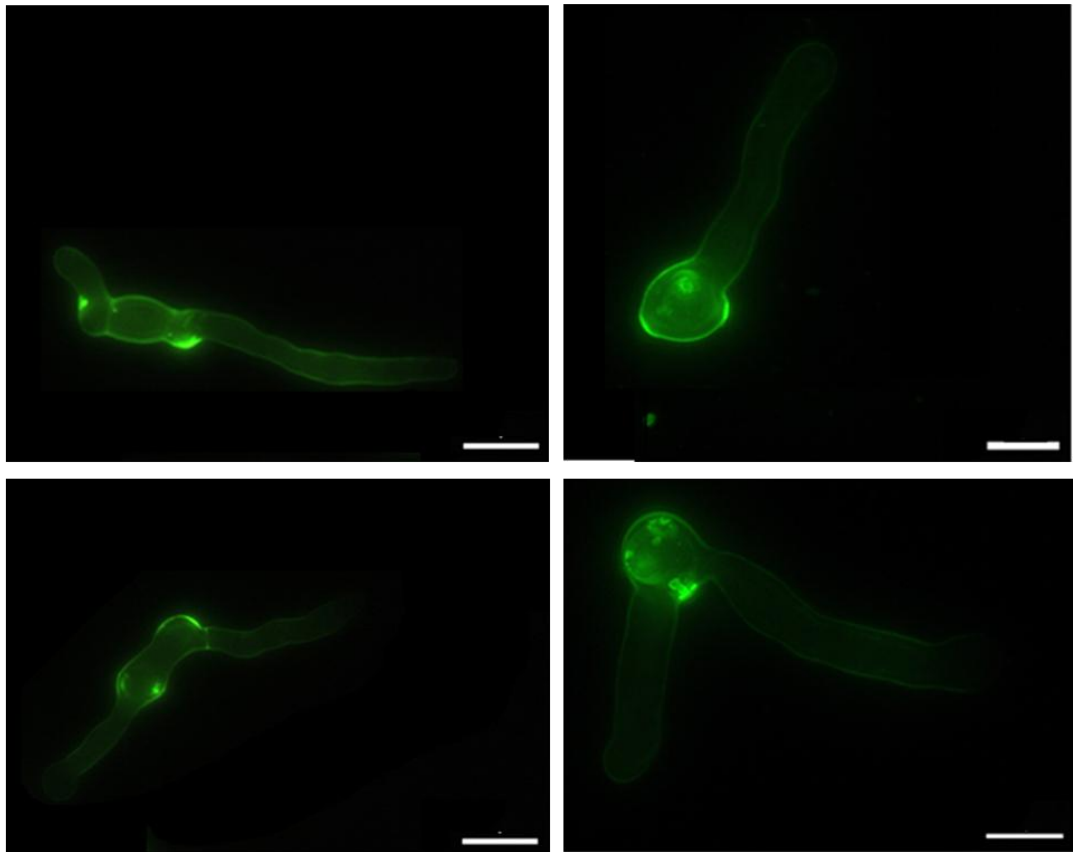


Figura 11. Reconstrucción en 3D de germinulas de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT observadas por epifluorescencia, teñidas con solophenyl flavine al 0.1%. Escala = 20 μ m.

El mismo experimento de tinción de la pared celular se repitió con el colorante blanco de calcoflúor al 0.1%, se observaron resultados similares que con el solophenyl flavine al 0.1%, por lo que solo se muestra en la figura 12 la tinción de hifas maduras, donde observamos una acumulación de fluorescencia a lo que corresponde la pared celular del ápice y el subápice en la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT.

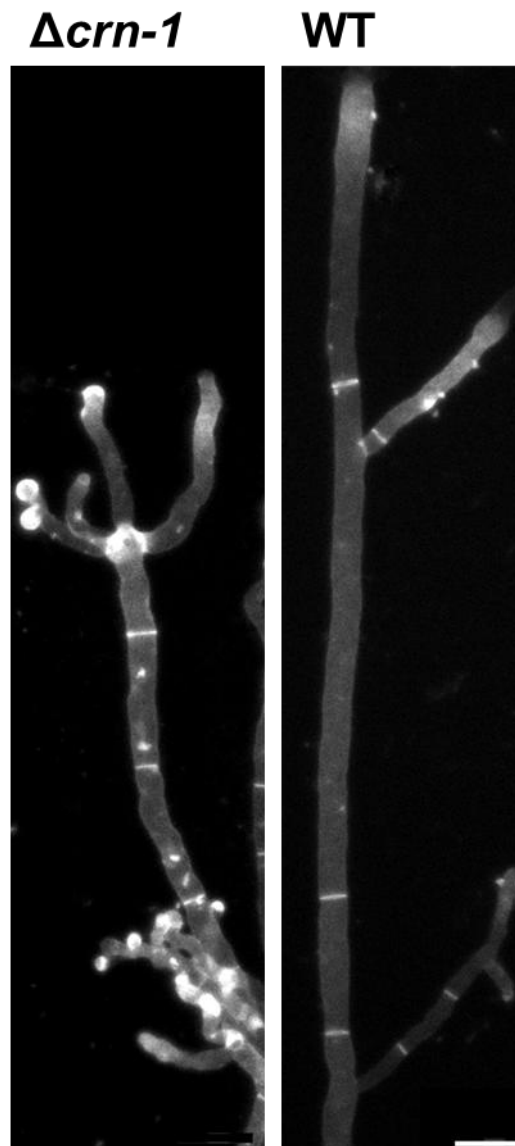


Figura 12. Observación de hifas maduras en el microscopio de epifluorescencia de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT, teñidas con blanco de calcoflúor al 0.1%. Escala = 50 μ m

Por microscopía electrónica de transmisión

Para tener información cuantitativa del grosor y distribución de la pared celular en conidias y germínulas de la cepa WT y de la mutante $\Delta crn-1$, se prepararon muestras para observar la ultraestructura de estas células. Las conidias de la mutante $\Delta crn-1$ presentaron una distribución irregular de la

pared celular (Figura 13A y B), en contraste con la cepa WT, en la que se observaba una distribución homogénea (Figura 13C y D). En la figura 14, se muestra el porcentaje que representa el área de la pared con respecto al área total de la conidias, en la mutante $\Delta crn-1$ el porcentaje de pared celular fue de 9.5% y en la cepa WT de 16.6%. En germínulas ocurre lo opuesto, la mutante $\Delta crn-1$ tiene un grosor mayor de pared celular que está distribuida de manera irregular (Figura 15A y B), la diferencia en el porcentaje de pared de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT fue de 11.4%, siendo mayor la cantidad de pared en la mutante (figura 16). En la figura 17, se muestra el porcentaje que corresponde al área de la pared con relación al área total, en diferentes secciones desde el ápice en germínulas, en la mutante $\Delta crn-1$ el porcentaje de pared en el domo apical fue de 42.7%, siendo la región donde hubo mayor diferencia con la cepa WT (13%)

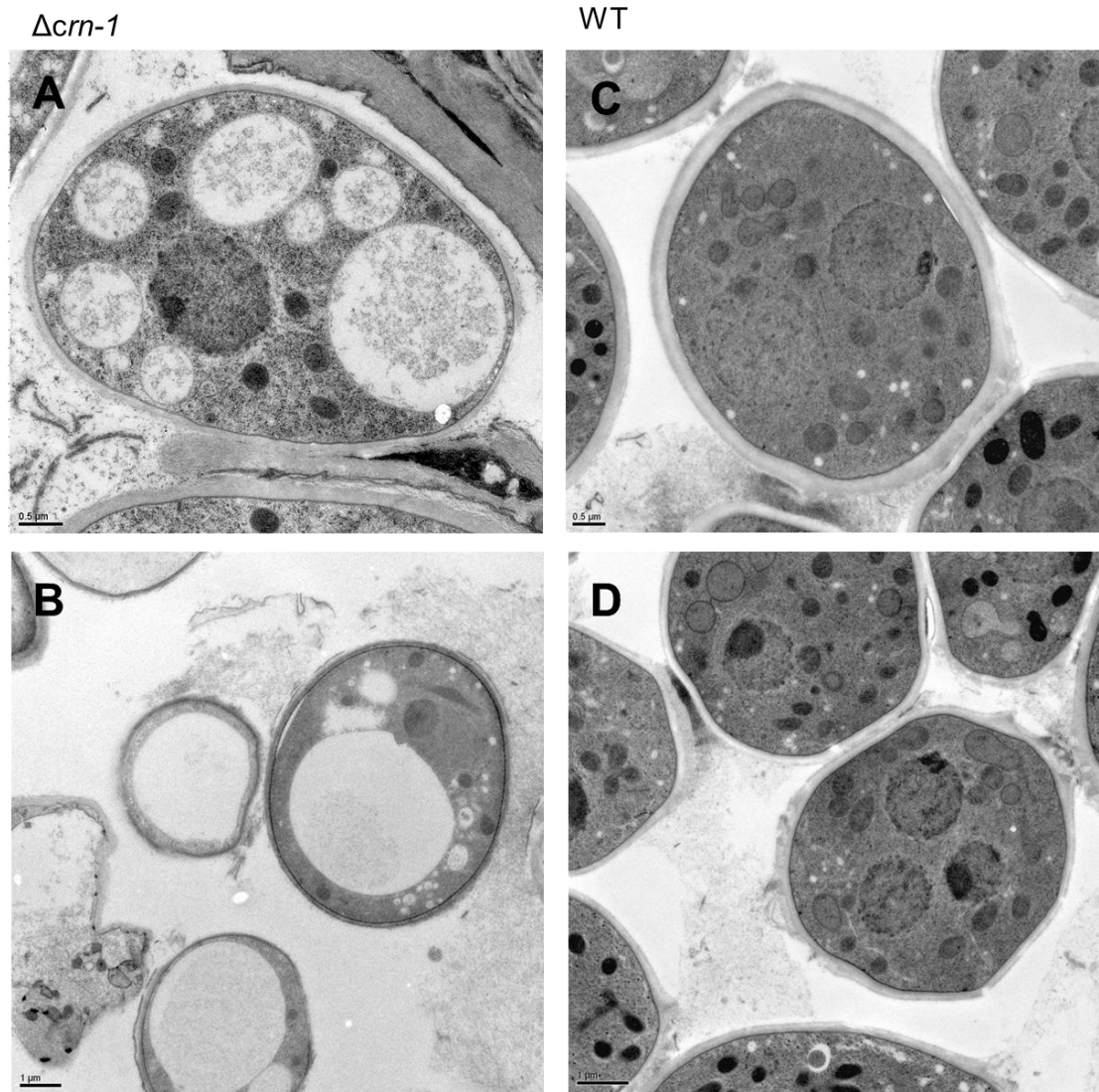


Figura 13. Observaciones de conidias en el microscopio electrónico de transmisión de la mutante $\Delta crn-1$ (A y B) y la cepa WT (C y D). Escala = 0.5 μm .

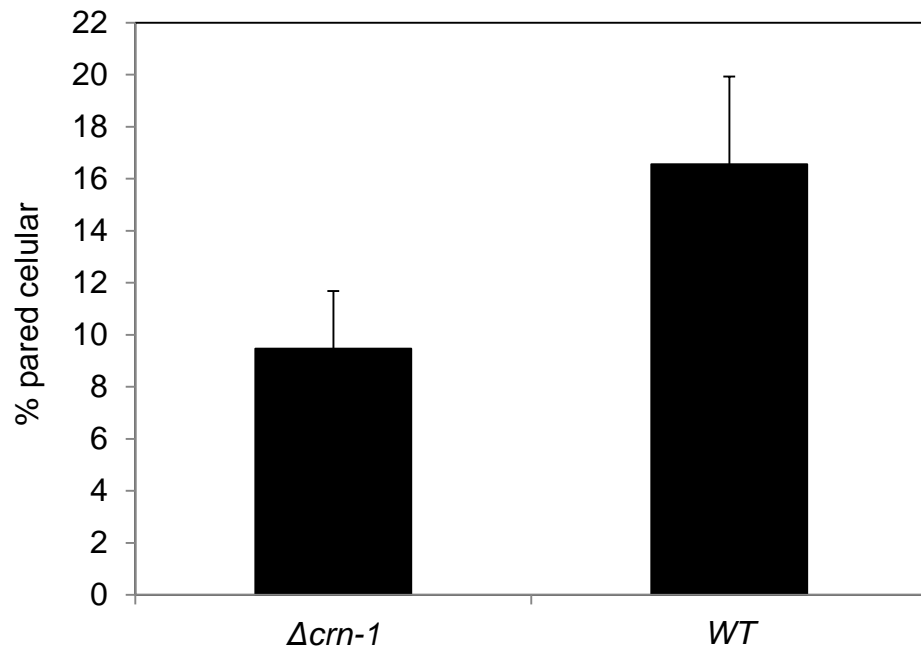


Figura 14. Porcentaje del área de pared celular con respecto al área total en conidias de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT. Barras de error con un intervalo de confianza del 95%.

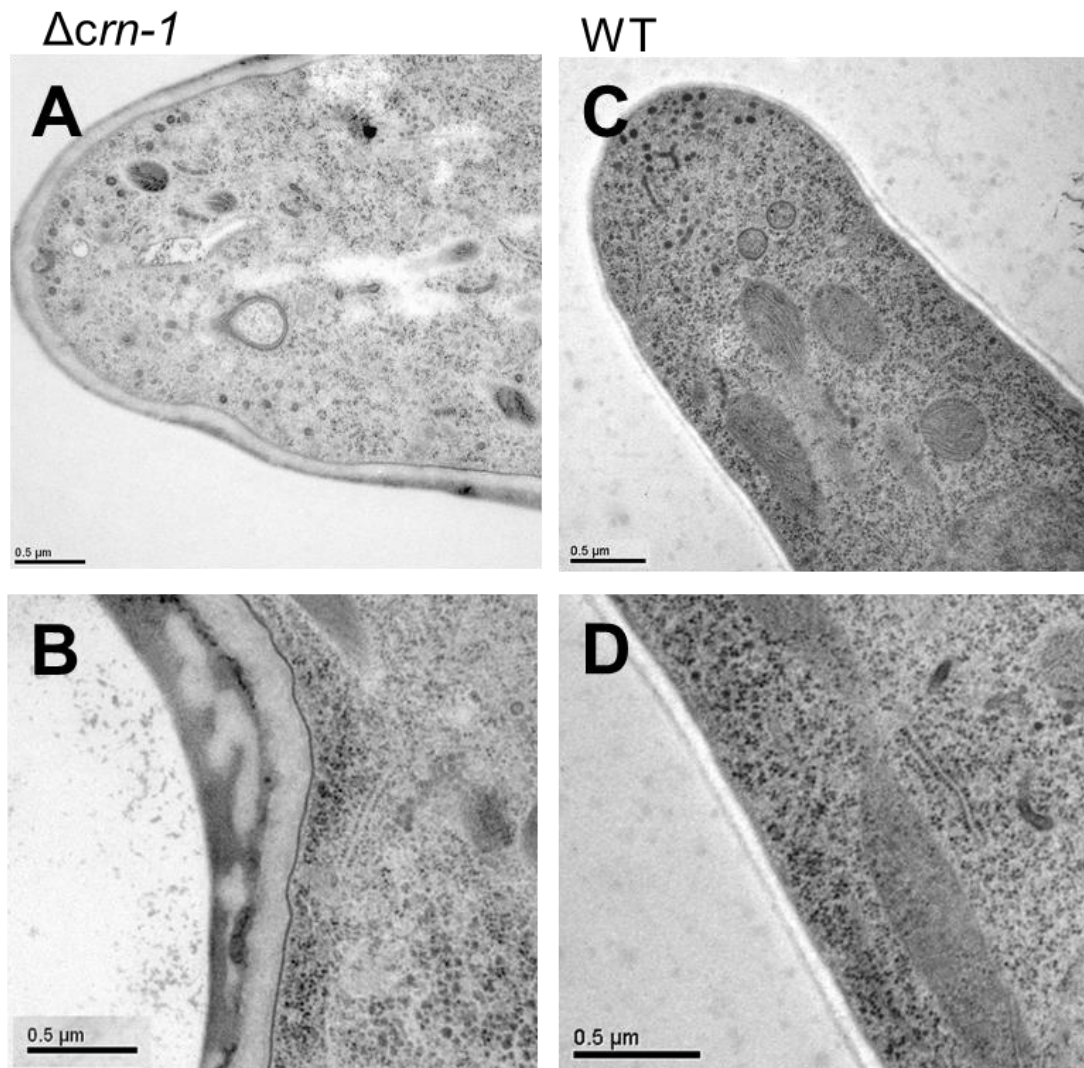


Figura 15. Observaciones en el microscopio electrónico de transmisión de la pared celular en el tubo germinal de la mutante $\Delta crn-1$ (A y B) y la cepa WT (C y D). Escala 0.5 μm (A y C) y 0.1 μm (B y D).

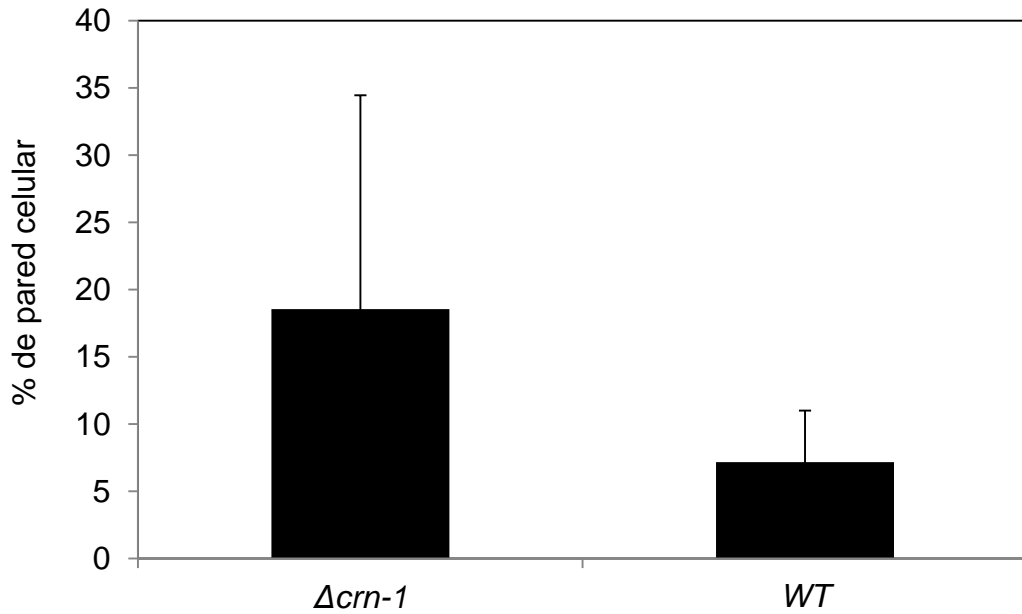


Figura 16. Porcentaje de área de pared celular respecto al área total en germínulas de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT. Barra de error con un intervalo de confianza del 95%.

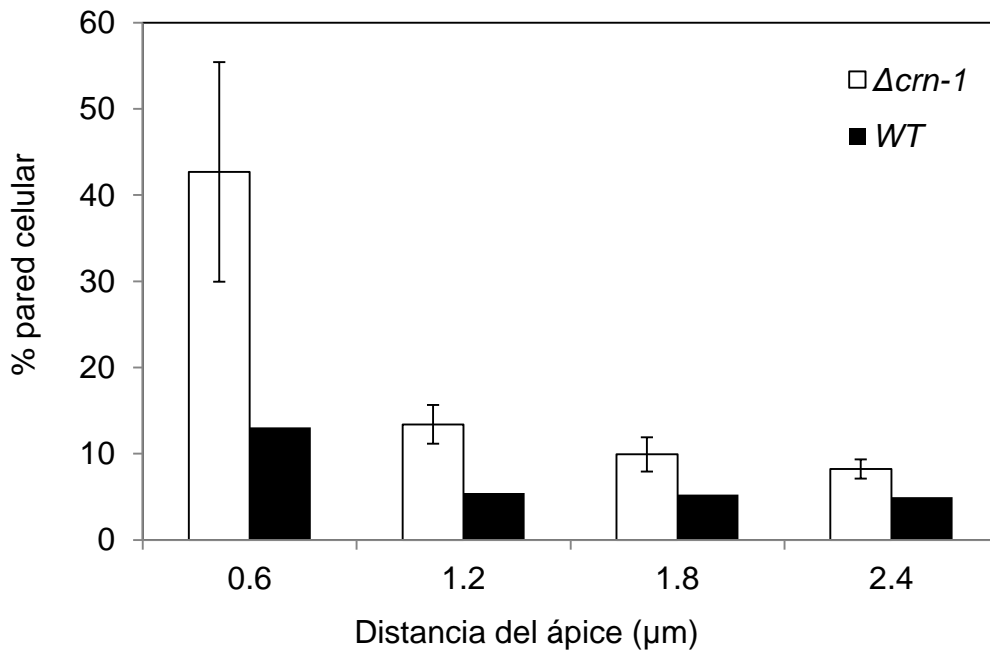


Figura 17. Porcentaje del área de pared celular con relación al área por distancia del ápice en germínulas de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT. Barra de error con un intervalo de confianza del 95%.

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, las mutantes carentes de coronina en *N. crassa* presenta defectos en el crecimiento, morfología y producción de biomasa de las hifas. La tasa de elongación en la mutante $\Delta crn-1$ fue de aproximadamente la mitad con respecto a la cepa silvestre al igual que la biomasa producida, siendo similar a lo reportado por Echaury-Espinosa *et al.* (2012). De acuerdo a ellos, las irregularidades en el crecimiento y morfología de las hifas sin coronina, pueden deberse a que provoca inestabilidad en el citoesqueleto de actina lo cual afecta al Spk y por lo tanto también a la migración de vesículas exocíticas que llevan los componentes para la construcción de la pared celular, necesarios para generar una hifa con forma y crecimiento regular (Bartnicki-García, 1989; 2002; Echaury-Espinosa *et al.* 2012)

La mutante $\Delta crn-1$ tiene mayor proporción de pared celular en relación con la cepa WT, esto puede ser debido a que la forma en que crece la mutante de coronina en cuanto a la tasa de elongación y la morfología, hace que el depósito de materiales de construcción de la pared celular se haga de manera más compactada e irregular. Podemos suponer que tanto en células carentes de coronina como las silvestres, la cantidad de vesículas exocíticas son similares, por lo que no hay diferencias en la producción de quitina, sin embargo, como el crecimiento de las células sin coronina es más lento, la entrega de vesículas exocíticas se realiza de forma irregular lo que lleva

consigo un engrosamiento de la pared celular sin que esto signifique un incremento en la elongación de la hifa.

Consistente con estudios en mutantes de endocitosis (Gourlay *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2005; Upadhyay y Shaw, 2008; Higuchi, 2009; Echaury-Espinosa *et al.*, 2012), las observaciones de la mutante $\Delta crn-1$ con el microscopio de epifluorescencia y electrónico revelaron defectos en la deposición, grosor y morfología de la pared celular. Los defectos en la mutante de coronina, como ya se había mencionado anteriormente, pueden deberse a la deposición deslocalizada de los componentes de la pared celular por parte de vesículas exocíticas guiadas por el citoesqueleto de actina defectuoso, lo que provoca grosor irregular de la pared en diferentes zonas de la célula y aspecto ondulado de la membrana plasmática producido por el exceso de pared en estas zonas. Además las diferencias en el porcentaje de pared celular ocupado por conidias y germínulas de la mutante $\Delta crn-1$ y la cepa WT, con respecto a ellas mismas, no necesariamente esta asociada a la deposición de vesículas exocíticas, si no que también podría deberse a la fase del ciclo celular en el que se encuentren (Cro *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1998; Spellman *et al.*, 1998).

De acuerdo a las observación en la mutante $\Delta crn-1$ por Echaury-Espinosa *et al.* (2012), el Spk desaparecía en periodos intermitentes y esto estaba relacionado con los patrones de crecimiento isotrópico y polarizado. Cuando el Spk desaparece, las vesículas exocíticas comienzan a depositarse por todos lados como ocurre en conidias que tienen un crecimiento isotrópico antes de germinar, y una vez que el Spk se vuelve a

formar, las vesículas son depositadas correctamente y el crecimiento polarizado se restablece. Entonces, los defectos en el Spk, producidos por un mal funcionamiento en el citoesqueleto de actina que se encuentra afectado por la ausencia de coronina en la mutante $\Delta cm-1$, hace que las vesículas exocíticas no están siendo transportadas correctamente produciendo las acumulaciones irregulares de pared celular, el aumento en la proporción de quitina, el crecimiento lento y las irregularidades en el porcentaje de área ocupada por la pared celular.

Durante el crecimiento de la hifa se requiere la adición de proteínas y componentes que formarán la pared celular, que en su mayoría son transportados por vesículas exocíticas, por lo que constantemente se adhiere nueva membrana plasmática en el ápice y como consecuencia se produciría un exceso de membrana en la región de crecimiento. Este exceso de membrana podría ser contrarrestado por la endocitosis, mecanismo por el cual se reciclaría la membrana plasmática, proteínas y componentes formadores de pared celular. En la mutante de coronina, no se produce el reciclaje debido a que el mecanismo de endocitosis se encuentra afectado por el mal funcionamiento del citoesqueleto de actina, produciendo los defectos en la morfología y crecimiento de la hifa.

Conclusión

- La mutante de coronina $\Delta crn-1$ presenta morfología irregular con patrones de crecimiento isotrópico y polarizado de manera intermitente, lo que altera su tasa de elongación.
- La proporción de quitina en las células de *N. crassa* incrementa cuando carece de la proteína coronina.
- Las células en la mutante $\Delta crn-1$ muestran irregularidades en la morfología y distribución de la pared celular. En conidias, la pared celular abarca menor área, mientras que en germínulas el porcentaje de área de pared aumenta, principalmente en el ápice, en relación a la cepa silvestre.
- La evidencia sugiere que la carencia de coronina en las células de *N. crassa* causa deficiencias en la conformación y distribución adecuada de la pared celular, lo que causa una tasa de elongación menor.

Referencias

- Bartnicki-García, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.
- Bartnicki-García, S. 2002. Molecular biology of fungal development, Marcel Dekker, New York. 29–58 pp.
- Bartnicki-García, S. y Lippman, E. 1969. Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science.* 165: 302-304.
- Bartnicki-García, S. y Nickerson, W. J. 1962. Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochim Biophys Acta.* 58: 102-119.
- Bartnicki-García, S., Hergert, F., y Gierz, J. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma* 153: 46–57.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry.* 72: 248-254.
- Bulawa, C. E. 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol.* 47: 505-534.
- Cai, L., N. Holoweckyj, M. D. Schaller, y J. E. Bear. 2005. Phosphorylation of coronin 1B by protein kinase C regulates interaction with Arp2/3 and cell motility. *J. Biol. Chem.* 280: 31913–31923

- Cabib, E., Bowers, B., Roberts, R. L. 1983. Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. 80 (11): 3318-3321.
- Cabib, E., Bowers, B., Roberts, R. L. 1993. Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. Proc Acad Sci USA. 80: 3318-3321.
- de Hostos, E. L., Rehfuess C. Bradtke, B., Waddell D. R, Albrecht R, Murphy J y Gerisch G. 1993. *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. J. Cell Biol. 12: 163–173.
- de Hostos, E. L. 1999. The coronin family of actin-associated proteins. Trends Cell Biol. 9: 345–350.
- de Terra, N. y Terra, E. L. 1963. A relationship between cell wall structure and colonial growth in *Neurospora crassa*. American Journal of Botany, 50 (7): 669-677.
- Din, A. B., Specht, C. A., Robbins, P. W., Yarden, O. 1996. chs-4, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. Mol Gen Genet. 250: 214-222.
- Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Mandala, S. M., Frommer, B. R., Kurtz, M. B. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETGJ) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1, 3-beta-D-glucan synthase. Proc. Natl. Acad. Sci., Genetics. 91: 12907-12911.

- Duran, A., Bowers, B., Cabib, E. 1975. Chitin synthetase zymogen is attached to yeast plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72: 3952-3955.
- Echauri-Espinoza, R. O., Callejas-Negrete, O. A., Roberson, R. W., Bartnicki-García, S., Mouriño-Pérez, R. R. 2012. Coronin Is a Component of the Endocytic Collar of Hyphae of *Neurospora crassa* and Is Necessary for Normal Growth and Morphogenesis. *PLoS ONE*. 7 (5): e38237.
- Farkas, V. 1979. Biosynthesis of cell walls of fungi. *Microbiological Review*. 43 (2): 117-144.
- Fisher-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A. y Read, N. D. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analyzing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J. Microsc.* 198: 246-259.
- Foger, N., Rangell, L., Danilenko, D. M., y Chan, A. C. 2006. Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis. *Science* 313: 839–842.
- Galletta, B. J., Cooper, J. A. 2009. Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Curr Opin Cel Biol*. 21: 20e27.
- Gupta, G.D., y Heath I.B. 2002 Predicting the distribution, conservation and functions of SNAREs and related proteins in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 36: 1-21.
- Hartwell, L. H. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. American Society for Microbiology. 38 (2): 164-198.

- Higuchi, Y., Shoji, J., Arioka, M., Kitamoto, K. 2009. Endocytic recycling at the tip region in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Communicative & Integrative Biology*. 2 (4): 327-328.
- Hoch, H. C., Galvani, C. D., Szarowski, D. H., Turner, J. N. 2005 Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia*. 97 (3): 580-588.
- Hoch, H. C., Galvani, C. D., Szarowsky, D. H., Turner, J. N. 2005. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycology*. 97 (3): 580–588.
- Jabri, E., Quigley, D. R., Alders, M., Hrmova, M., Taft, C.S. 1989. (1-3) β -glucan synthesis of *Neurospora crassa*. *Curro. Microbiol*. 19: 153-61.
- Larson, T. M., Kendra, D. F., Busman, M., Brown, D. W. 2011. *Fusarium verticillioides* chitin synthases CHS5 and CHS7 are required for normal growth and pathogenicity. *Curr Genet*. 57: 177–189.
- Lee, J. I., Yu, Y. M., Rho, Y. M., Park, B. C., Choi, J. H., Park, H. M., Maeng, P. J. 2005. Differential expression of the *chsE* gene encoding a chitin synthase of *Aspergillus nidulans* in response to developmental status and growth conditions. *FEMS. Microbiol Lett*. 249: 121–129
- Lin C. C., Sicher, R. C., Aronson, J. M. 1976. Hyphal Wall Chemistry in *Apodachlya*. *Arch Microbiol*. 108 (1): 85-91
- MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J., Belshaw, N. J., Archer, D. B. 1993. Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. *J. Gen. Microbial*. 139: 2295-2307

- Mahadevan, P. R. y Tatum, E. L. 1967. Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*. *J Cell Biol.* 35 (2): 295-302.
- Manocha, M. S., Colvin, R. 1967. Structure and composition of the cell wall of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology.* 94 (1): 202-212.
- Mishima, M. y Nishida, E. 1999. Coronin localizes to leading edges and is involved in cell spreading and lamellipodium extension in vertebrate cells. *J. Cell Sci.* 112: 2833–2842.
- Miyazaki, A., Ootaki, T. 1997. Multiple genes for chitin synthase in the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *J Gen Appl Microbiol.* 43: 333-340.
- Morgan, W. T. J., Elson, L. A. 1934 A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochem J.* 28: 988–995.
- Peñalva, M. A. 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology.* 42: 963-975.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B. 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1, 3- β -glucan synthase. *Science.* 272: 279–281.
- Read, N. D. y Kalkman E. R. 2003. Does endocytosis occur in fungal hyphae?. *Fungal Genetics and Biology.* 39: 199-203.
- Sietsma, J., y Wessels, J. G. H. 1994. Apical wall biogenesis. En J. Wessels y F. Meinhardt (ed.), *The Mycota*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Germany. p. 126-141

- Schekman, R. 1985. Protein localization and membrane traffic in yeast. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 115-143.
- Shematek, E. M., Braatz, J. A. E., Cabib, 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of β -(1-3) glucan synthetase. *J. Biol. Chem.* 225 (3): 888-894.
- Silverman-Gavrila, L. B., y Lew, R. R. 2000 Calcium and tip growth in *Neurospora crassa*. *Protoplasma.* 213: 203-217.
- Steinberg, G. 2007. Hyphal growth: a Tale motors, lipids, and Spitzenkörper. *Eukaryotic Cell.* 6 (3): 351-360.
- Trinci, A. P. J. 1978 Wall and hyphal growth. *Science Program of Oxford.* 65: 75-99.
- Utrecht, A. C. y Bear, J. E. 2006. Coronins: the return of the Crown. *Trends Cell Biol.* 16: 421-426
- Upadhyay, S. y Shaw, B. 2008. The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology.* 68 (3): 690-705.
- Utsugi, T., Minemura, M., Hirata, A., Abe, M., Watanabe, D., Ohya, Y. 2002. Movement of yeast 1,3- β -glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes to Cells.* 7 (1): 1–9.
- Van der Valk, P., Wessels, J. G. H. 1977. Light and electron microscopic autoradiography of cell-wall regeneration of protoplasts of *Schizophyllum commune*. *Acta Bot. Neerl.* 26: 43-52.

- Vermeulen, C. A., Reaven, M.B.J.M., Wessels, J.G.H. 1979. Localization of chitin synthase in subcellular fractions of *Schizophyllum commune* protoplast. J Gen Microbiol. 114: 87-97
- Wang, G., Lu, L., Zhang, C. Y., Singapuri, A. y Yuan, S. 2006 Calmodulina concentrates at the apex of growing hyphae and localizes to the Spitzenkörper in *Aspergillus nidulans*. Protoplasma. 228: 159-166.
- Wessel, G. H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 413-437.
- Wessels, J. G. H. 1986. Cell wall synthesis in apical hyphal growth. Int. Rev. Cytol. 104: 37-79.

Apéndice

Recetas para medios de cultivo

Medio mínimo de Vogel

Medio mínimo de Vogel (1 L)	Cantidad
Sacarosa	15 g
Agar	15 g
Sales de Vogel 50 X	20 ml
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por autoclave

Medio mínimo de Vogel líquido

Medio mínimo de Vogel líquido (1 L)	Cantidad
Sacarosa	15 g
Sales de Vogel 50 X	20 ml
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por autoclave

Sales de Vogel 50 X

En 750 ml de agua destilada disolver en orden y mezclar a temperatura ambiente con ayuda de un agitador magnético las siguientes soluciones:

Sales de Vogel (1 L)	Cantidad
Na ₂ citrato · 5 ½ H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄ , anhídrido	250 g
NH ₄ NO ₃ , anhídrido	100 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	10 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	5 g
Solución de elementos traza	5 ml
Solución de biotina	2.5 ml

Aforar a 1 L con H₂O destilada y agregar 2 ml de cloroformo como conservador y almacenar a 4 °C.

Solución de elementos traza

En un volumen de 95 ml de agua destilada agregar en orden y disolver con agitador magnético las siguientes soluciones:

Solución de elementos traza (100 ml)	Cantidad
Ácido cítrico · 1 H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	1 g
CuSO ₄ · 6 H ₂ O	0.25 g
MnSO ₄ · 1 H ₂ O	0.05 g
H ₃ BO ₃ anhídrido	0.05 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.05 g

Aforar a 100 ml con H₂O destilada y agregar 1 ml de cloroformo como conservador, y almacenar a 4 °C.

Solución de biotina

Solución de biotina (50 ml)	Cantidad
Biotina	0.005 g
Agua destilada	50 ml

Almacenar a 4 °C en tubos falcón.

Solución 6N HCl

Solución 6N HCl (50 ml)*	Cantidad
12 N HCl (37%-1.18 densidad)	25 ml
H ₂ O destilada	25 ml

El agua destilada debe enfriarse primero antes de añadir el 12 N HCl o bien puede prepararse en un baño de agua fría. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución 1.5M Na₂CO₃ en 4% (p/v) acetilacetona

La solución debe de prepararse el mismo día que va a usarse.

Solución 1.5 M Na₂CO₃ en 4% (p/v) acetilacetona Cantidad (10 ml)

Na ₂ CO ₃	1.6 g
Acetilacetona	400 µl

Aforar a 10 ml con H₂O destilada y disolver.

Solución de Ehrlich I

Agregar los reactivos en orden:

Solución de Ehrlich I (10 ml)	Cantidad
Etanol absoluto	5 ml
12 N HCl (37%-1.18 densidad)	5 ml
C ₉ H ₁₁ NO	260 mg

El etanol debe de enfriarse primero y después se agregar el 12 N HCl o bien puede prepararse en un baño de agua fría. Almacenar a -4 °C y es estable durante 30 días.