

UNIVERSIDAD ATÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



VISUALIZACIÓN DEL SPITZENKÖRPER EN GERMÍNULAS DE
Neurospora crassa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

CYNTHIA LIZZETH ARAUJO PALOMARES

Ensenada, B.C.

Junio de 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

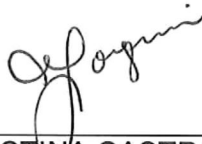
VISUALIZACIÓN DEL SPITZENKÖRPER EN GERMÍNULAS DE
Neurospora crassa

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

CYNTHIA LIZZETH ARAUJO PALOMARES

APROBADO POR:



DRA. ERNESTINA CASTRO LONGORIA
Presidente del Jurado



DRA. NAHARA ERNESTINA
AYALA SÁNCHEZ
SECRETARIO



M.C. MIGUEL HUMBERTO
CARRILLO MENDÍVIL
1er. VOCAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Ernestina Castro Longoria, por todas sus aportaciones que me brindo y que fueron importantes para mi trabajo, por todo su gran apoyo, paciencia y confianza que me brindo durante la elaboración de este trabajo. Agradezco al Dr. Salomón Bartnicki García por su aceptación y por permitir que se habrán nuevas puertas para nosotros como estudiantes. Agradezco a mi asesora de tesis, la Dra. Nahara Ayala Sánchez y a mis sinodales al M.C. Miguel Humberto Carrillo Mandívil, la Dra. María del Refugio González Esparza y el Dr. Mario Vargas Olvera por sus importantes aportaciones en el manuscrito y por sus consejos.

Agradezco a la Dra. Meritxell Riquelme, a la Dra. Rosa Mouriño por sus aportaciones, así como al Dr. Juan Manuel González Prieto por sus grandes consejos y aportaciones hacia mi persona y a nivel profesional, muchas gracias. Doy las gracias a Miriam y Gaby por sus alegrías compartidas durante este tiempo. También agradezco a mis maestros de la Facultad de Ciencias, los cuales han contribuido en mi desarrollo académico y profesional a lo largo de la carrera.

Agradezco a mi madre por haberme traído ha este mundo; agradezco a ti mamá, por ser mi madre y padre, que no cualquiera puede hacerlo y debes sentirte orgullosa.....te admiro mucho mami. Gracias mamá, por brindarme una educación.....gracias por compartir tus momentos difíciles, que míos también lo fueron. Gracias ma, por apoyarme y apoyar a mis hermanos, como solo tú sabes hacerlo, muchas gracias.....¡Estoy en deuda contigo!

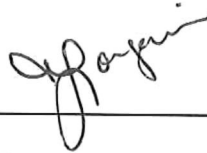
A mis amigas y amigos, muchas gracias por serlo y por estar conmigo en las buenas y en las malas. A ti Lucia ¡que no podías faltar! gracias por ser mi amiga y por todo este tiempo que hemos estado juntas compartiendo sueños y alegrías, muchas gracias.

A ti Carlos, por llegar a mi vida, por ser la persona que eres y por aceptarme como soy ¡Que es una tarea un poco difícil!. Gracias por apoyarme en esos momentos difíciles, mil gracias. Gracias por escucharme en mis días grises y negros. Gracias por permitirme compartir contigo todas mis alegrías y sobre todo mi cariño.....mil gracias. Gracias también por compartir conmigo tus ideales, tus consejos, tú cariño y espero no defraudarte.....Te amo.

RESUMEN

Resumen de la tesis de **Cynthia Lizzeth Araujo Palomares** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura de **Biología**. Ensenada, Baja California, México. Mayo de 2005.

Título: **Visualización del *Spitzenkörper* en germínulas de *Neurospora crassa*.**



Dra. Ernestina Castro Longoria

Muchos estudios que involucran al *Spitzenkörper* (Spk) se han realizado en hifas en crecimiento de hongos filamentosos maduros. El presente trabajo informa la etapa de crecimiento en la cual es posible visualizar el Spk en germínulas de *Neurospora crassa*. Utilizando video-microscopía de contraste de fases fue posible observar que antes de la presencia de la estructura apical dentro del domo apical esta área estuvo ocupado por organelos celulares. Cuando las germínulas de *N. crassa* alcanzaron una longitud de 150 μm y una tasa de crecimiento de 2 $\mu\text{m}/\text{min}$, en el ápice celular se formó una pequeña zona de exclusión, entonces es cuando se pudo visualizar en el ápice celular una condensación de fase oscura. Esta condensación de fase oscura apareció primero como un cuerpo de color gris claro al cual se le denominó como Spk inmaduro y la distribución de los organelos cambió, localizándose los organelos en la región subapical de las germínulas.

ABSTRACT

Thesis resume of **Cynthia Lizzeth Araujo Palomares** presented as a partial requisite for obtaining the Degree in Biology. Ensenada, Baja California, Mexico. Mayo de 2005.

Title: **Visualization of the *Spitzenkörper* in germling of *Neurospora crassa*.**

Most studies involving the *Spitzenkörper* (Spk) have been done in growing hyphae of mature filamentous fungi. The present work reports the phase of growth in which is possible to visualize the Spk in germlings of *Neurospora crassa*. By video-enhanced phase-contrast microscopy was possible to observe that before the Spk is formed inside the apical dome its area was occupied by organelles cells. When the germlings of *N. crassa* reached 150 μm in length and the growth rate was 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ in the apex a small zone of exclusion was formed, then a gradual condensation of a dark phase occurs. This dark condensation of phase appears first as a light gray body which was called as an immature Spk, and the distribution of the organelles changed and they become localized in the subapical region of the germlings.

ÍNDICE

ESCRITO DE APROBACIÓN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Crecimiento y desarrollo de hongos filamentosos	4
2.2 Descripción general del Spitzenkörper	5
2.3 Comportamiento del Spitzenkörper	8
2.4 Relación del Spitzenkörper con el Centro Suministrador de Vesículas	10
2.5 Ultraestructura del Spitzenkörper	11
2.6 El Spitzenkörper en germinulas de hongos filamentosos	12
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. METODOLOGÍA	15
5.1 Obtención de la cepa	15
5.2 Preparación del medio de cultivo	15
5.3 Crecimiento de la cepa	15
5.4 Recuperación de esporas	16
5.5 Preparación de cámaras de cultivo	16
5.6 Transferencia del inóculo a las cámaras de cultivo	18
5.7 Observación al microscopio	19
5.8 Captura de imágenes	19

5.9	Análisis y procesamiento de datos	19
6.	RESULTADOS	20
6.1	Germinación y crecimiento de las germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	20
6.2	Tasa de crecimiento en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	31
6.3	Ocurrencia de septos en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	35
6.4	Visualización del <i>Spitzenkörper</i> en germínulas de <i>Neurospora crassa</i> en relación a la longitud y a la organización celular del tubo germinativo	44
6.5	Presencia y tamaño del <i>Spitzenkörper</i> en relación a la tasa de crecimiento en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	49
6.6	Relación del <i>Spitzenkörper</i> con la orientación del tubo germinativo en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	51
7	DISCUSIONES	55
7.1	Germinación y crecimiento de germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	55
7.2	Ocurrencia de septos en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	56
7.3	Organización celular en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	57
7.4	Visualización del <i>Spitzenkörper</i> en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	58
7.5	Comportamiento del <i>Spitzenkörper</i> en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	59
7.6	Relación del <i>Spitzenkörper</i> con la orientación del tubo germinativo en germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	60
7.7	Tasa de crecimiento y desarrollo de germínulas de <i>Neurospora crassa</i> en relación a la visualización del <i>Spitzenkörper</i>	61
8	CONCLUSIONES	63
9	PERSPECTIVAS	64
10	BIBLIOGRAFÍA	65
11	APÉNDICE	73
11.1	Solución de sales de Vogel	73
11.2	Solución de elementos traza	74
11.3	Solución de biotina	74
12	ANEXO	75

12.1 Listado de hongos filamentosos estudiados por López-Franco y Bracker 1996	75
12.2 Representación esquemática y descripción de los tipos de <i>Spitzenkörper</i> de diferentes grupos de hongos filamentosos ..	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización apical de <i>N. crassa</i> (Modificado de López-Franco y Bracker, 1996).....	7
Figura 2. Representación esquemática de la preparación de las cámaras de cultivo.....	17
Figura 3. Clasificación de los estadios de germínulas de <i>N. crassa</i>	20
Figura 4. Germinación y crecimiento de esporas de <i>N. crassa</i> cepa silvestre de 0 a 7 horas de incubación.....	22
Figura 5. Imagen completa de una germínula de <i>N. crassa</i> con 8 horas de incubación.....	23
Figura 6. Imagen completa de una germínula de <i>N. crassa</i> con 9 horas de incubación.....	24
Figura 7. Imagen completa de una germínula de <i>N. crassa</i> con 10 horas de incubación.....	25
Figura 8. Porcentaje de los diferentes estadios de desarrollo en germínulas de <i>N. crassa</i> cepa silvestre durante 10 horas de incubación.....	27
Figura 9. Longitud promedio de las germínulas de <i>N. crassa</i> a partir de las 5 a las 10 horas de incubación.....	30
Figura 10. Tasa de crecimiento en germínulas de <i>N. crassa</i> cepa silvestre...	32
Figura 11. Tasa de crecimiento de germínulas de <i>N. crassa</i> con respecto al tiempo de incubación.....	33
Figura 12. Longitud de germínulas de <i>N. crassa</i> con respecto al tiempo de incubación.....	34
Figura 13. Representación esquemática de la clasificación de septos en germínulas de <i>N. crassa</i>	35
Figura 14. Porcentaje de la presencia de septos en germínulas de <i>N. crassa</i> ..	37
Figura 15. Correlación entre la longitud y el número de septos presentes en germínulas de <i>N. crassa</i> cepa silvestre.....	43

Figura 16. Germínulas de <i>N. crassa</i> sin una organización apical aparente.....	44
Figura 17. Germínula de <i>N. crassa</i> sin una organización apical y sin la presencia de un Spk.....	45
Figura 18. Germínula de <i>N. crassa</i>	47
Figura 19. Ápices de germínulas de <i>N. crassa</i> donde se muestra la presencia de gránulos citoplasmáticos cerca del <i>Spitzenkörper</i> (Spk).....	48
Figura 20. Correlación entre el tamaño del Spk y la tasa de crecimiento en germínulas de <i>N. crassa</i> cepa silvestre.....	50
Figura 21. Comportamiento del crecimiento de germínulas de <i>N. crassa</i> sin la presencia de un Spk en el domo apical.....	52
Figura 22. Comportamiento del crecimiento de germínulas de <i>N. crassa</i> con la presencia de un Spk dentro del domo apical.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Evaluación de los distintos estadios de *N. crassa* cepa silvestre.

*Promedio $\pm$ Desviación Estándar.....29

Tabla II. Evaluación de septos en germínulas de *N. crassa* cepa silvestre.

*Promedio $\pm$ Desviación Estándar.....38

1. INTRODUCCIÓN

Entre los organismos eucarióticos, los hongos presentan características que los hacen ser atractivos como organismos ideales para la experimentación, tal es el caso de *Neurospora crassa* Shear y Dodge, el cual es un hongo filamentoso que pertenece al grupo de los ascomicetos (Deacon, 1990).

El estudio de *N. crassa*, ha tenido gran auge dentro de las áreas de Genética, Bioquímica y Biología Celular y Molecular (Davis, 2000; Davis y Perkins, 2002), debido a que presenta propiedades que son ventajosas para su estudio. Este organismo crece en un medio relativamente simple, se cultiva fácilmente en el laboratorio y completa su ciclo de vida en un corto período de tiempo (Deacon, 1990).

El ciclo de vida de *N. crassa* comprende una fase sexual y una fase asexual (Davis, 2000). Durante la fase sexual, la reproducción se realiza por medio de cepas sexualmente compatibles, ocurre por medio de la fusión de sus hifas vegetativas, comúnmente denominadas A y a, ó por contacto gametangial de una espora masculina, denominada espermacio, con una hifa femenina, llamada tricogino. Dentro de un órgano sexual femenino de nombre ascogonio (Deacon, 1990). En cambio, durante la fase asexual de *N. crassa* se producen dos tipos de esporas asexuales, macroconidias y microconidias, las cuales son liberadas al medio y al germinar se desarrolla una nueva colonia con la subsecuente producción de esporas (Davis, 2000).

Las macroconidias son multinucleadas y se producen en forma de cadenas sobre conidióforos ramificados en hifas aéreas (Alexopoulos, 1977); en contraste, las microconidias son uninucleadas y son producidas solo en las hifas vegetativas como una sola espora (Davis, 2000). La germinación de una espora, en condiciones adecuadas para el crecimiento, inicia por la fase de hinchamiento y la subsecuente extensión de un tubo germinativo (Trinci, 1971; Trinci, 1984). El tubo germinativo, se desarrolla mediante un crecimiento apical altamente polarizado (Grove, 1978; Prosser y Trinci, 1979; Howard, 1981; Trinci, 1984) para formar una hifa, la cual continúa creciendo por extensión apical (Howard, 1981) y la formación de ramificaciones, que más adelante dará la forma de un micelio típico (Prosser y Trinci, 1979).

El crecimiento apical en hifas maduras se ha descrito como un proceso que requiere de la organización y del tráfico de organelos al ápice celular, así como de la exocitosis de vesículas formadoras de la pared celular hacia las áreas de crecimiento activo. Estas vesículas secretoras más otros componentes celulares, se van acumulando en el ápice de la hifa para formar el *Spitzenkörper*, un cuerpo apical único y dinámico que determina el crecimiento y morfología de la hifa (Girbardt, 1957; Grove, 1978; Bartnicki-García *et al.*, 1989; Bartnicki-García *et al.*, 1995; Riquelme *et al.*, 1998).

Sin embargo, en germínulas de hongos filamentosos no se ha documentado la ocurrencia de este cuerpo apical de manera detallada, por lo cual, se realizó un estudio en el que se describe la visualización del

Spitzenkörper por medio de microscopía de contraste de fases en germínulas de *Neurospora crassa* y se discute si la visualización de esta estructura está en relación a la longitud y al nivel de organización de dichas germínulas, contribuyendo así a un mejor conocimiento del crecimiento apical en hongos filamentosos, el cual podrá aplicarse a largo plazo al diseño de métodos de control de hongos patógenos y también para mejorar el crecimiento de hongos de interés biotecnológico.

2. ANTECEDENTES

2.1 Crecimiento y desarrollo de hongos filamentosos

El crecimiento en hongos filamentosos inicia por la germinación de esporas. Ekundayo y Carlile, (1964); Fletcher, (1969); Gull y Trinci, (1971) mencionan que el proceso de germinación implica una fase de hinchamiento, la cual Bartnicki-García, (1981) ha denominado como fase de crecimiento esférico. Durante este período Van Etten *et al.*, (1977) señalan que las esporas incrementan en biomasa así como en volumen. Esta fase usualmente dura un par de horas e inmediatamente después inicia el crecimiento de un tubo germinativo.

Seiler y Plamann, (2003) realizaron un estudio sobre las bases genéticas de la morfología celular en el hongo filamentoso *N. crassa* utilizando esporas de diferentes mutantes de este hongo e incluyeron la cepa silvestre como control. Encontraron que al transferir las esporas de *N. crassa* tipo silvestre a un medio de cultivo apropiado, estas se hidrataban y comenzaban con un crecimiento isotrópico con una duración de aproximadamente 2 horas. Transcurrido este tiempo el crecimiento comienza a polarizarse y un ápice es generado; a este proceso Schmit y Brody, (1976) lo denominan emergencia del tubo germinativo, y ocurre a las 3 horas (Seiler y Plamann, 2003). Posteriormente, el crecimiento polarizado resulta continuo en extensión unidireccional, por lo que Schmit y Brody, (1976) lo denominaron como

elongación del tubo germinativo y ocurre de acuerdo con Seiler y Plamann, (2003) a las 5 horas. De acuerdo con Grove, (1978); Prosser y Trinci, (1979); Howard, (1981) y Trinci, (1984) este proceso de crecimiento se convierte en un crecimiento altamente polarizado. Durante el proceso de polarización, el tubo germinativo se extiende apicalmente hasta convertirse en una hifa. En 1995, Gooday señaló que durante la etapa de extensión apical se van incorporando componentes a la membrana plasmática para formar una nueva pared celular en el ápice. De acuerdo con Katz *et al.*, (1972); Prosser y Trinci, (1979); Watters y Griffiths, (2001), cuando el flujo de vesículas secretadas dentro del segmento apical de la hifa excede la proporción máxima de absorción de vesículas que puede absorber el ápice de la hifa empieza el proceso de ramificación para dar lugar a la formación del micelio.

2.2 Descripción general del *Spitzenkörper*

El *Spitzenkörper* (Spk), ó cuerpo apical, es una estructura dinámica que al ser observada bajo contraste de fases aparece como un cuerpo oscuro. El Spk fue descrito por primera vez en 1924 por Herman Brunswik en hifas fijadas y teñidas con hierro-hematoxilina de *Coprinus sterquilinus* Fr. y *Coprinus narcoticus* (Batsch) Fr. (Brunswik, 1924). Brunswik describió al Spk como un cuerpo de tamaño variable que aparece y desaparece de la parte apical de la hifa, también observó que el Spk estaba relacionado de alguna manera con el crecimiento de la hifa. En 1957, Girbardt describió al Spk en hifas vivas de

Polystictus versicolor (L.) Pilat como un complejo de fase oscura, concluyendo que esta estructura estaba relacionada con el crecimiento apical, debido a que cuando el crecimiento de las hifas se detenía el Spk desaparecía y después que el crecimiento continuaba el Spk reaparecía. Girbardt, concluyó que el Spk tenía la capacidad de controlar la dirección de crecimiento de la hifa. Esta estructura puede ser observada en las puntas de las hifas de hongos verdaderos como los ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos.

Usando microscopía de contraste de fases y video-microscopía López-Franco y Bracker, (1996) realizaron un estudio completo acerca de la diversidad morfológica del Spk en una gran variedad de hongos filamentosos maduros de los distintos grupos de ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos (anexo 1). En dicho trabajo, alrededor de 32 hongos fueron analizados, encontrando una diversidad morfológica de Spk. López-Franco y Bracker, (1996) agruparon esta diversidad morfológica en 9 tipos de Spk (anexo 2), tomando en cuenta la apariencia del Spk por microscopía de contraste de fases y la organización subapical de los distintos hongos. De los diferentes Spk analizados, el noveno se describió previamente en 1993 por Vargas *et al.*, en *Allomyces macrogynus* (Emerson) Emerson y Wilson.

El Spk en *N. crassa* fue descrito por López-Franco y Bracker, (1996) como un agregado de vesículas densa y oscura rodeado de otra nube de vesículas menos densa, con una región central, denominada "Core" en Inglés (Fig. 1).

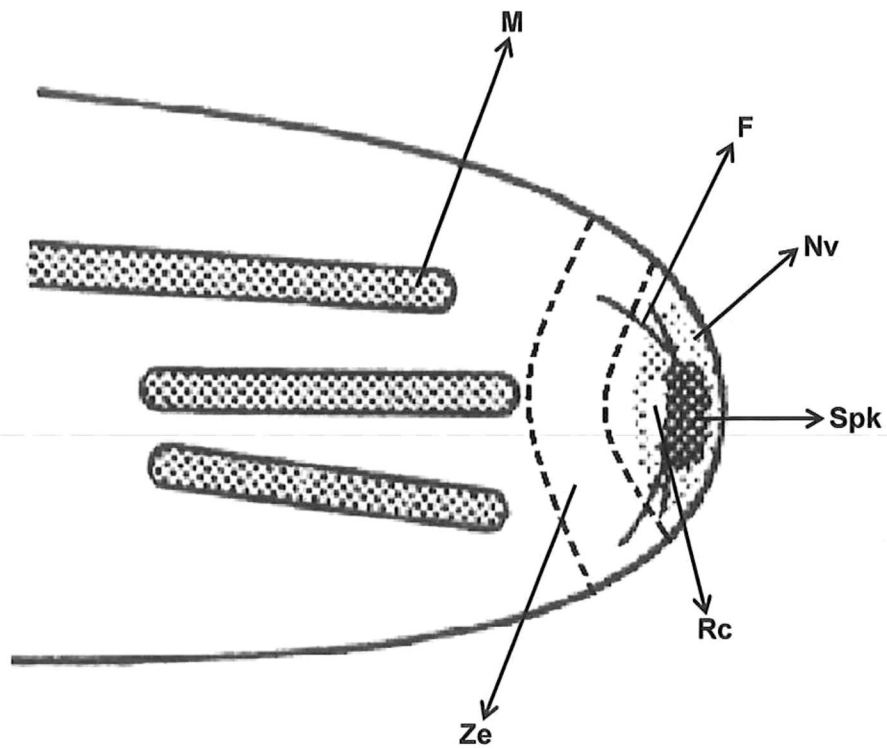


Figura 1. Organización apical de *N. crassa*. (Modificado de López-Franco y Bracker, 1996). M-mitocondrias, F-filamentos, Nv-nube de vesículas, Spk-*Spitzenkörper*, Rc-región central ("Core"), Ze-zona de exclusión.

2.3 Comportamiento del *Spitzenkörper*

En hifas maduras, se ha demostrado que existe una relación entre el comportamiento y la posición del Spk, trayectoria y dirección del crecimiento de las hifas.

Experimentos hechos por Bracker *et al.*, (1997), apoya la hipótesis de que el patrón de crecimiento apical es dirigido por la posición del Spk, debido a que realizaron una manipulación de la estructura con la ayuda de un láser, produciendo cambios en la dirección de crecimiento en hifas así como la producción de otras alteraciones morfológicas. Riquelme *et al.*, (1998) encontraron que la posición del Spk afecta la dirección y el crecimiento de las hifas causando cambios dramáticos en la morfología.

Estudios recientes de Riquelme *et al.*, (2000) señalan que en *N. crassa* cepa silvestre el Spk produjo movimientos dominantes, acompañado de frecuentes oscilaciones transversales, mientras que en hifas con morfologías alteradas como las “*roppy*” (cepa de *N. crassa* con mutación en el gen que codifica para la subunidad mayor de la dinactina, el cual es requerido para el transporte eficiente de vesículas a lo largo de los microtúbulos), el Spk mostró una trayectoria errática; en ambos casos, la trayectoria del cuerpo apical mostró una tendencia sobre el eje longitudinal de las células.

Otros estudios, proporcionan evidencia en la relación citoesqueleto-Spk, sugiriendo que el citoesqueleto probablemente puede propulsar y controlar el movimiento del Spk. Observaciones realizadas con respecto a contracciones

citoplasmáticas por Reynaga-Peña y Bartnicki-García, (1997) sugieren que el citoesqueleto participa en la dinámica del Spk. Howard y Aist, (1977) mostraron que después de un tratamiento anti-tubulina, el Spk de *F. acuminatum* desaparecía. Grove y Swigard, (1981); Roberson y Vargas, (1994) y Srinivasan *et al.*, (1996) demostraron que una interrupción en los microtúbulos o en los filamentos de actina, causa la desaparición y aparición del Spk en *Rhizoctonia solani* Kühn y *A. macrogynus*.

Estudios basados con el uso del benomilo y citocalasina proponen que los microtúbulos del citoesqueleto estuvieron directamente implicados en mantener la trayectoria del Spk (Riquelme *et al.*, 1998). Observaciones con dineina en mutantes “*roppy*” argumentan que los microtúbulos del citoesqueleto desempeñan un papel importante en la formación y comportamiento del Spk (Riquelme *et al.*, 2000). Un caso similar fue el de Wu *et al.*, (1998) donde muestran que la cinesina fue esencial para el posicionamiento normal del Spk en hifas de *Nectria haematococca* Berk. y Br. Riquelme *et al.*, (2000) concluyeron que la asociación de microtúbulos a proteínas motoras, es esencial para mantener una alta velocidad de crecimiento, un Spk constante y una forma casi perfecta de la hifa.

2.4 Relación del *Spitzenkörper* con el Centro Suministrador de Vesículas

De acuerdo a Bartnicki-García *et al.*, (1989) el Spk es considerado como un centro de distribución de vesículas citoplasmáticas para la construcción de la pared celular, además de contribuir en la morfogénesis de hongos.

Utilizando diferentes técnicas como la video-microscopía y el análisis de imágenes de microscopía electrónica, Bartnicki-García *et al.*, (1989) crearon un modelo matemático computarizado basado en uno de los componentes principales del Spk, las vesículas apicales. Mediante este modelo cibernético se siguió el comportamiento del Spk durante el crecimiento de células vivas de *Fusarium acuminatum* Ellis y Everhart, así como la posición del Spk en células fijas de *Polystictus versicolor* (L.) Pilat; *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. y *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) Kummer. Con este modelo, el Centro Suministrador de Vesículas (CSV), correspondió a la posición del Spk tanto en hifas vivas como en hifas fijas debido a la notable coincidencia entre el CSV y el Spk. Bartnicki-García, (2002) concluye que la morfología de los hongos filamentosos está determinada por la interacción entre el movimiento del Spk y por la cantidad de vesículas que provienen del Spk para la construcción de la pared celular.

2.5 Ultraestructura del *Spitzenkörper*

La composición estructural del Spk fue descrita por primera vez por McClure *et al.* (1968), quienes encontraron que el complejo de fase oscura observado mediante microscopía de baja resolución correspondió a una densa acumulación de vesículas cuando fue examinado bajo microscopía electrónica; también observaron que cerca de la región ocupada por el Spk había la presencia de mitocondrias y grupos de ribosomas. Posteriormente en 1969, Girbardt reportó que el Spk contiene vesículas apicales, microvesículas y ribosomas. Subsecuentemente un estudio realizado por Grove y Bracker en 1970, corrobora la presencia de vesículas, microvesículas y ribosomas, en el Spk; así mismo, Grove y Bracker (1970) hacen referencia que en el Spk aparece una pequeña zona especializada dentro del conglomerado de vesículas el cual contiene microvesículas, microtúbulos y algunos ribosomas. Esta zona según Grove y Bracker se encontraba rodeada por vesículas y carecía de un límite o de una membrana. Once años más tarde, Howard en 1981 señaló que la ultraestructura del Spk incluye un conglomerado de vesículas apicales, ribosomas y microvesículas dentro de una red de microfilamentos y confirma el trabajo de Grove y Bracker (1970) de una región especializada dentro del conglomerado de vesículas. Recientemente un estudio realizado por McDaniel y Roberson, (2000) en *A. macrogynus*, encontraron otro componente celular, el cual forma parte de la región central del Spk, la γ -tubulina.

2.6 El *Spitzenkörper* en germínulas de hongos filamentosos

El estudio del Spk en germínulas de hongos filamentosos es escaso y en dichos estudios no se reporta la longitud total de las germínulas. Caesar-Ton *et al.*, (1987) verificaron la presencia de vesículas en germínulas de *N. crassa* y de *Uromyces phaseoli* (Pers.) G. Winter; reportando que en las germínulas de *N. crassa* en la región distal de 2 a 3 μm del domo apical se encontraba un fuerte agregado de vesículas, justo donde se forma el Spk. En germínulas de *Uromyces vignae* Barclay y *Puccinia graminis* Persoon, Dijksterhuis (2003) describe algunas características del Spk y reporta que estos son diferentes a los Spk descritos por López-Franco y Bracker, (1996), ya que carecen de una región central. Hoch y Staples, (1983) y Kwon *et al.*, (1991) reportan que en tubos germinativos de *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, tampoco se ha observado dicha región central en el Spk. La siguiente característica que distingue al Spk en los hongos de la roya, es la localización asimétrica del Spk dentro del ápice de la hifa del tubo germinativo de *U. vignae* y *P. graminis*; este hecho, también fue reportado en tubos germinativos de *U. appendiculatus* así como en tubos germinativos de otros hongos patógenos como *Cochliobolus sativus* (Ito y Kurib.) Drechsler Dastur (Clay *et al.*, 1994) y *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr (Bourrett y Howard, 1989). Otra característica que se observó en el Spk de *U. vignae* y *P. graminis*, fue un comportamiento altamente dinámico durante tiempos cortos mientras se desarrollaba el tubo germinativo (Dijksterhuis, 2003).

3. HIPÓTESIS

La etapa de crecimiento en la cual es posible visualizar el *Spitzenkörper* en germínulas de *N. crassa*, mediante el uso de la microscopía de contraste de fases, depende de la longitud del tubo germinativo y el grado de organización celular.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la etapa de crecimiento en la cual es posible visualizar el *Spitzenkörper* en germínulas de *N. crassa* por medio de microscopía de contraste de fases y establecer la posible relación entre su aparición y la longitud del tubo germinativo y el grado de organización celular.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Establecer la longitud aproximada del tubo germinativo en la cual es posible visualizar el *Spitzenkörper* en las germínulas de *N. crassa*.

2) Determinar la relación existente entre la organización interna de la célula y la aparición del *Spitzenkörper*.

3) Determinar la relación existente entre la orientación del tubo germinativo y la visualización del *Spitzenkörper*.

4) Determinar la tasa de crecimiento en germínulas de *N. crassa* desde la fase de emergencia del tubo germinativo hasta la aparición del *Spitzenkörper*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Obtención de la cepa

La cepa utilizada fue *Neurospora crassa* Shear y Dodge, cepa silvestre con clave RL21 SG-1050, donada por el Dr. Stuart Brody del departamento de Biología de la Universidad de California, de San Diego.

5.2 Preparación del medio de cultivo

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizó medio completo de Vogel (MCV), que contiene sales de Vogel 1X (Apéndice I: cuadro I-III), sacarosa 2% (w/v), extracto de levadura 0.5% , caseína 0.5%, gelatina 16% y agua destilada (Vogel, 1956). Este medio se esterilizó en autoclave a 120°C por 15 minutos a 15 libras de presión. El MCV se transfirió a tubos con rosca de 18 X 150 mm estériles y a frascos de 25 ml estériles los cuales se almacenaban a 4°C.

5.3 Crecimiento de la cepa

Para cultivar la cepa de *N. crassa* se utilizaron los tubos con rosca conteniendo MCV solidificado en forma oblicua para una mayor superficie de cultivo. La cepa se transfirió a este medio utilizando la técnica microbiológica por picadura. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que el micelio se encontraba maduro con una producción de abundantes esporas.

5.4 Recuperación de esporas

La recuperación de esporas se llevó a cabo bajo condiciones estériles, colocando 5 mL de agua destilada (esterilizada en autoclave a 120°C por 15 minutos a 15 libras de presión) en un tubo cónico estéril de 15 mL. A ese volumen de agua, se le agregó una masa de micelio conteniendo las esporas de cultivos maduros de *N. crassa*; posteriormente se homogenizó con ayuda de un agitador tipo Vortex. Después, el homogenizado se filtró mediante un embudo que contenía como filtro tela sintética tipo magitel doble de un tamaño de 5 cm² aproximadamente, ambos estériles; posteriormente, se realizaron diluciones hasta obtener una concentración aproximada de 2.7×10^6 células/mL; el conteo se realizó utilizando una cámara de Neubauer o hematocitómetro de 1/10 mm de profundidad.

5.5 Preparación de cámaras de cultivos

La preparación de las cámaras de cultivo se realizó con base a la metodología descrita por López-Franco, (1992) la cual fue modificada de acuerdo a las necesidades de este trabajo. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar. Primeramente se prepararon cámaras húmedas, las cuales consistieron en una caja petri de 9 cm de diámetro, a la cual se le colocó un papel filtro de 7.5 cm de diámetro humedecido con agua destilada; posteriormente, se colocó una varilla de vidrio en forma de "V" estéril y un portaobjetos de 25 X 75 mm estéril (Fig. 2a). El

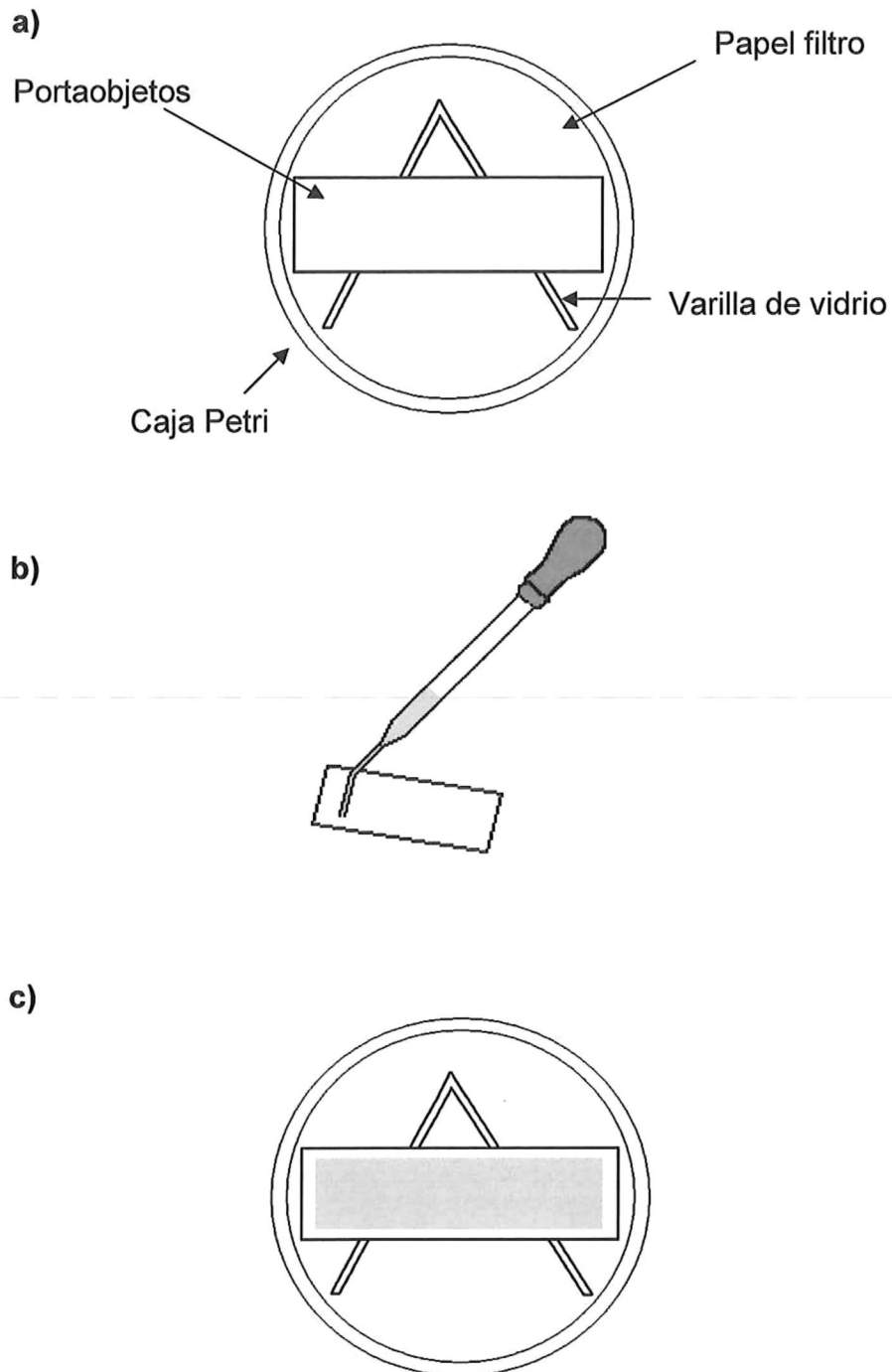


Figura 2. Representación esquemática de la preparación de las cámaras de cultivo. a) Preparación de la cámara húmeda, b) colocación del medio de cultivo en portaobjetos, c) cámara húmeda con medio de cultivo.

MCV se liquificó mediante baño maría. Una vez liquificado y libre de burbujas, se tomó una pipeta Pasteur (la cual se calentó en el mechero de Bunsen hasta que se doblo ligeramente) y con la ayuda de un bulbo, se tomó una pequeña cantidad de MCV el cual se colocó en el extremo de un portaobjetos con una inclinación de 25° aproximadamente. El MCV se extendió con la pipeta Pasteur formando una ligera capa (Fig. 2b); este procedimiento se hizo de manera rápida para que el orificio de la pipeta no se obstruyera, pero haciendo un movimiento suave, constante y sin despegar la pipeta Pasteur del portaobjetos. Después, el portaobjetos fue regresado a la cámara húmeda para dejar solidificar (Fig. 2c).

5.6 Transferencia del inóculo a las cámaras de cultivo

Una vez que las esporas de la cepa de *N. crassa* fueron recuperadas, se tomaron 10 µl de esporas (2.7×10^6 células/ml aproximadamente) y se inocularon en un extremo de la cámara de cultivo. Con la ayuda de una pipeta Pasteur esterilizada y doblada ligeramente se realizó un frotis suave y constante sobre el medio, el frotis se realizó varias veces para asegurar que las esporas quedaran distribuidas por todo el cultivo. La preparación se incubó a una temperatura de 27 ± 2 °C.

5.7 Observación al microscopio

Las observaciones al microscopio de las células fúngicas se realizaron cada hora a partir de la hora 0 hasta las 10 horas de incubación. Por lo tanto, se utilizó una muestra para cada hora de incubación. A cada muestra se colocó un cubreobjetos de 22 X 30 mm de manera muy suave para evitar estrés en las células; posteriormente se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó bajo el microscopio compuesto, VANOX-S (Olympus), utilizando la lente de inmersión 100X más un lente óptico de 25X utilizando contraste de fases.

5.8 Captura de imágenes

Las imágenes obtenidas durante las observaciones fueron capturadas con una cámara Hamamatsu modelo C2400 y procesadas con un Procesador de imágenes Argus-10. Para las video-grabaciones se utilizaron cintas Super VHS así como una video-grabadora Time-Lapse Modelo AG-6740 para análisis posteriores.

5.9 Análisis y procesamiento de datos

Para los análisis de las células fúngicas con longitudes mayores a 30 μm , se realizaron mosaicos de imágenes individuales utilizando una video grabadora Modelo BR-S525U y el programa para captura, análisis y procesamiento de imágenes Image-Pro Plus®. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete Microsoft® Excel 2002 y el paquete para gráficos Sigma-Plot versión 6.0.

6. RESULTADOS

6.1 Germinación y crecimiento de las germínulas de *Neurospora crassa*

De acuerdo a la clasificación de Schmit y Brody (1976), en este trabajo se determinaron 4 estadios de desarrollo (Fig. 3):

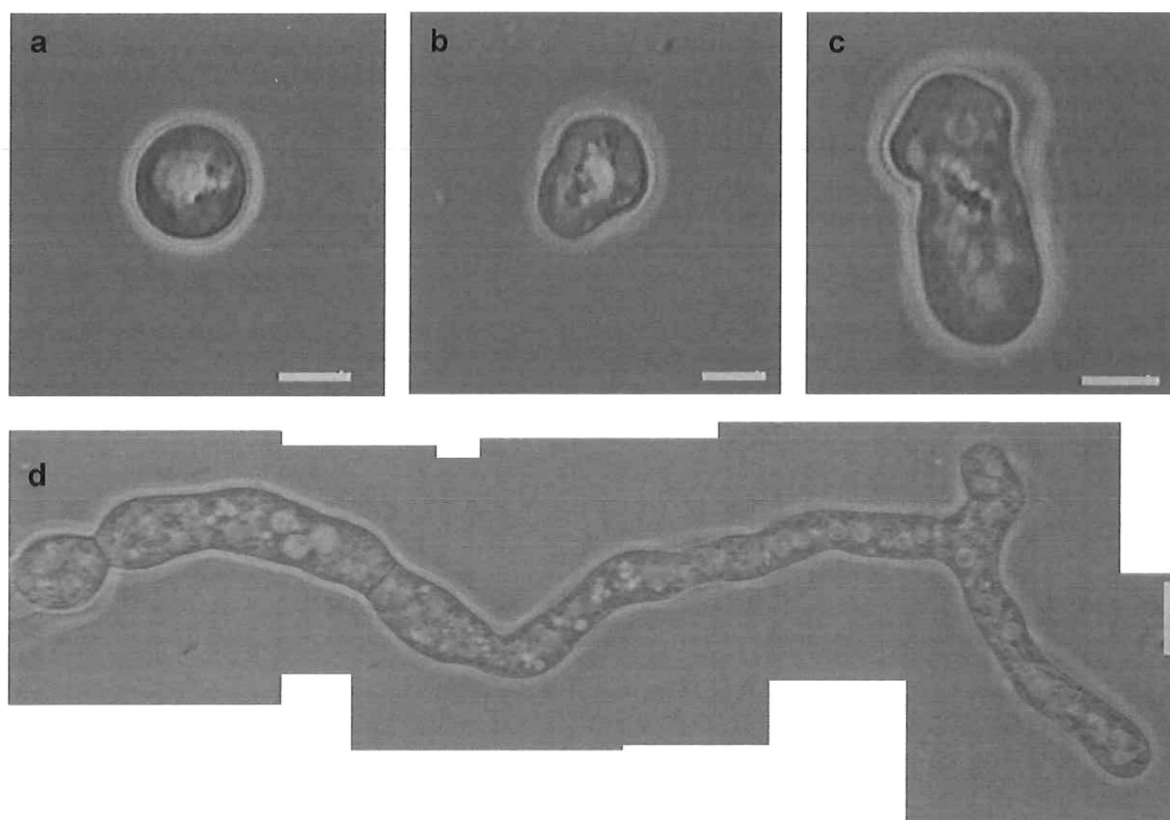


Figura 3. Clasificación de los estadios de germínulas de *N. crassa*. a) Fase de hidratación, b) fase de emergencia del tubo germinativo, c) fase de elongación del tubo germinativo, d) fase de la formación de la primera ramificación. Escala 5 μ m.

En la figura 4 se observa el cambio en morfología de las células fúngicas a lo largo del tiempo. Al tiempo de 0, 1 y 2 horas de incubación, las esporas comienzan gradualmente a crecer en forma isotrópica (Fig. 4, 0-2h). Posteriormente, en el período de 3 a 4 horas de incubación, el crecimiento isotrópico cesa para iniciar con la emergencia del tubo germinativo en un punto de la espora (Fig. 4, 3-4h). A partir de las 5 horas de incubación, ocurre la elongación del tubo germinativo, es decir, un crecimiento polarizado (Fig. 4, 5-7h; Fig. 5; Fig. 6). Transcurridas 10 horas, las germínulas ya comenzaban a presentar pequeñas ramificaciones (Fig. 7).

La determinación de los estadios de crecimiento se realizó mediante la observación de 100 células cada hora a partir del tiempo cero hasta las 10 horas de incubación. Al tiempo de las 0, 1 y 2 horas de incubación, el 100% de las células examinadas presentaron la fase de hidratación (Fig. 8). A partir de las 3 horas en adelante se empezaron a observar en las células fúngicas diferencias morfológicas, el 82% de las células observadas se encontraban en fase de hidratación, y el 18% ya presentaban la fase de emergencia del tubo germinativo (Fig. 8). A las 4 horas, el 62% de las células estaban en la fase de hidratación, mientras que el 38% correspondía a la fase de emergencia del tubo germinativo (Fig. 8). Posteriormente, a las 5 horas, el 31% de las células observadas se encontraban aún en fase de hidratación, el 56% en emergencia del tubo germinativo y el 13% ya comenzaban a presentar la siguiente

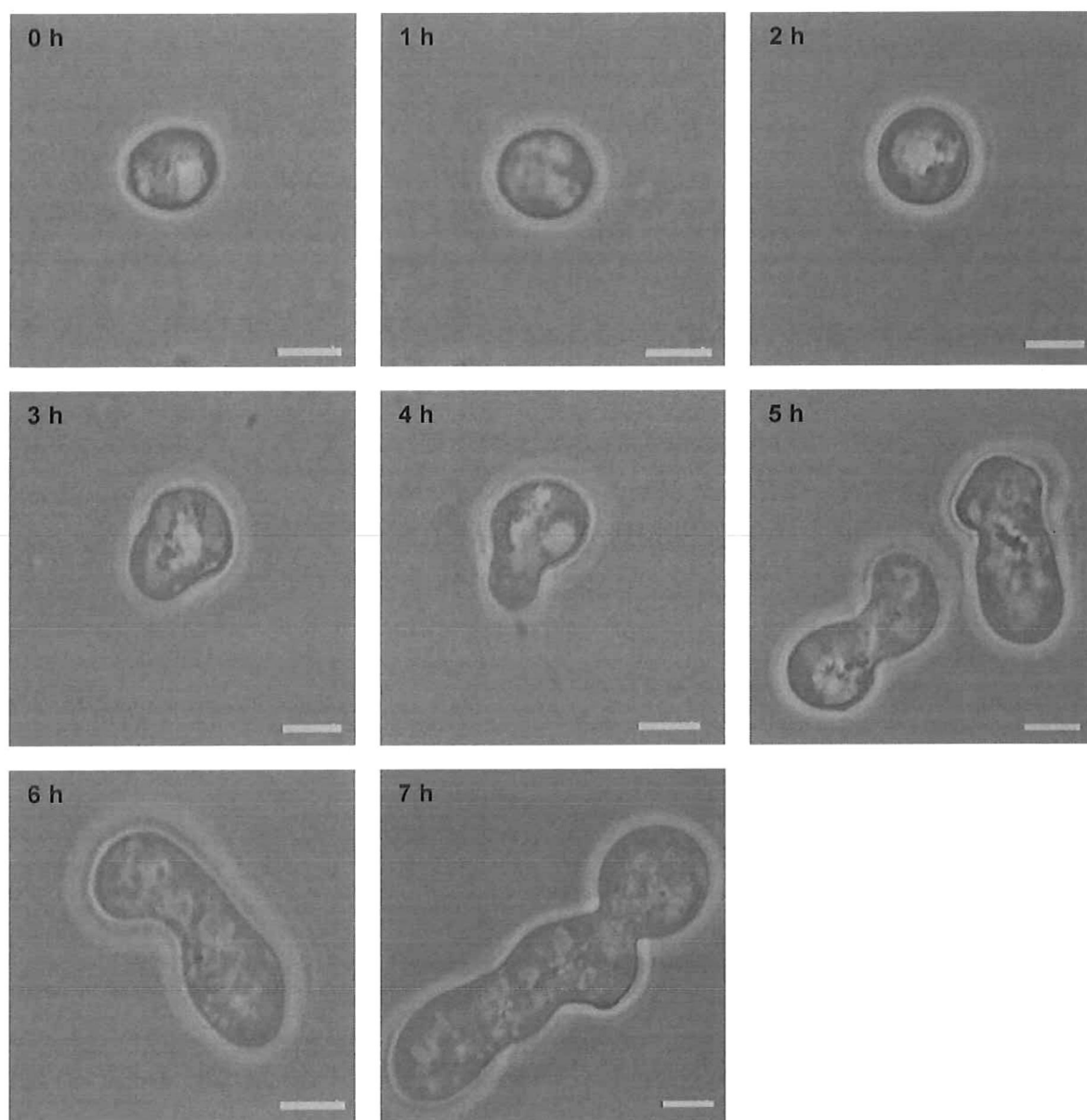


Figura 4. Germinación y crecimiento de esporas de *N. crassa* cepa silvestre de 0 a 7 horas de incubación. Escala 5 μm .

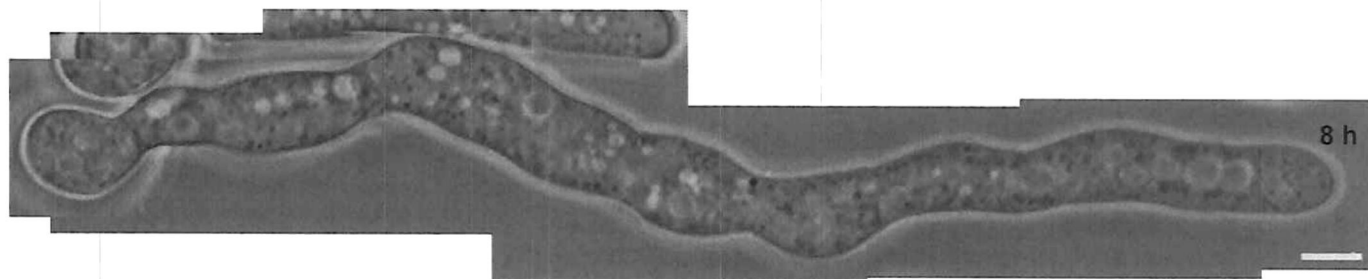


Figura 5. Imagen completa de una germínula de *N. crassa* con 8 horas de incubación. Longitud de 116 μm . Escala 5 μm .

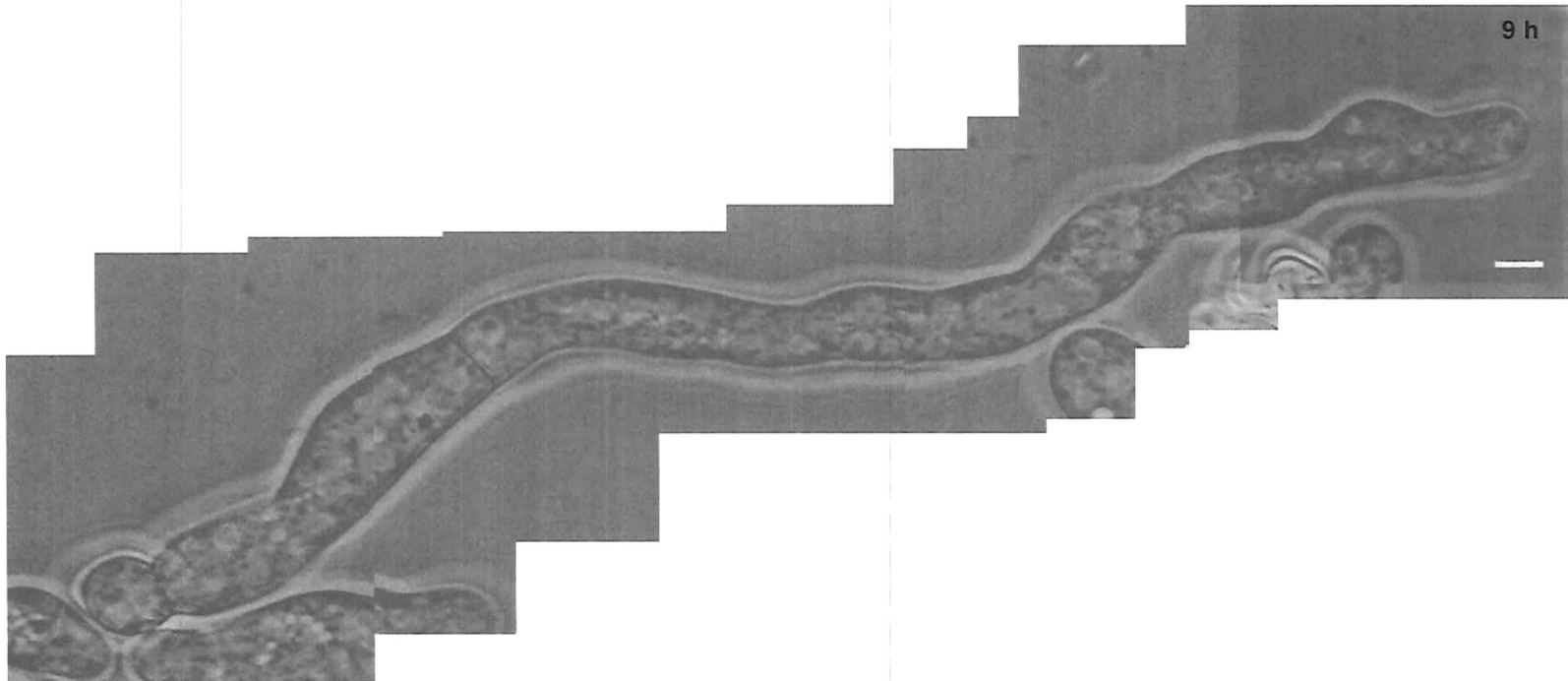


Figura 6. Imagen completa de una germínula de *N. crassa* con 9 horas de incubación. Longitud de 150 μm . Escala 5 μm .

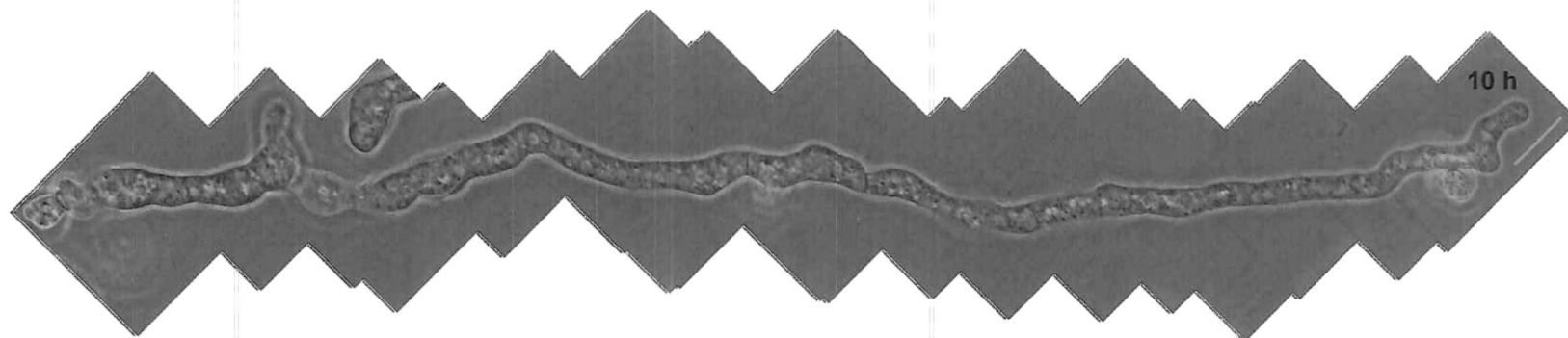


Figura 7. Imagen completa de una germinula de *N. crassa* con 10 horas de incubación. Longitud de 356 μm . Escala 15 μm .

fase de crecimiento, la elongación del tubo germinativo (Fig. 8). A las 6 horas, se encontró que un 40% de las células presentaban emergencia del tubo germinativo, un 43% en elongación del tubo germinativo y el 17% de las células pertenecían a la fase de hidratación (Fig. 8). A las 7 horas, el 12% de las esporas se encontraban en fase de hidratación, el 30% en emergencia del tubo germinativo y el 58% en elongación del tubo germinativo (Fig. 8). Al tiempo de 8 y 9 horas de incubación, el porcentaje de esporas en fase de hidratación fue del 15% en ambos tiempos y en el estadio de emergencia del tubo germinativo fue del 19% y 20 % respectivamente. Con respecto al estadio de la elongación del tubo germinativo los porcentajes fueron de 66% y 65% respectivamente (Fig. 8).

Finalmente, a las 10 horas, el 14% de las esporas aún se encontraban en fase de hidratación, el 13% en emergencia del tubo germinativo, el 55% en elongación del tubo germinativo y sólo el 18% de las células fúngicas restantes ya presentaban pequeñas ramificaciones (Fig. 8).

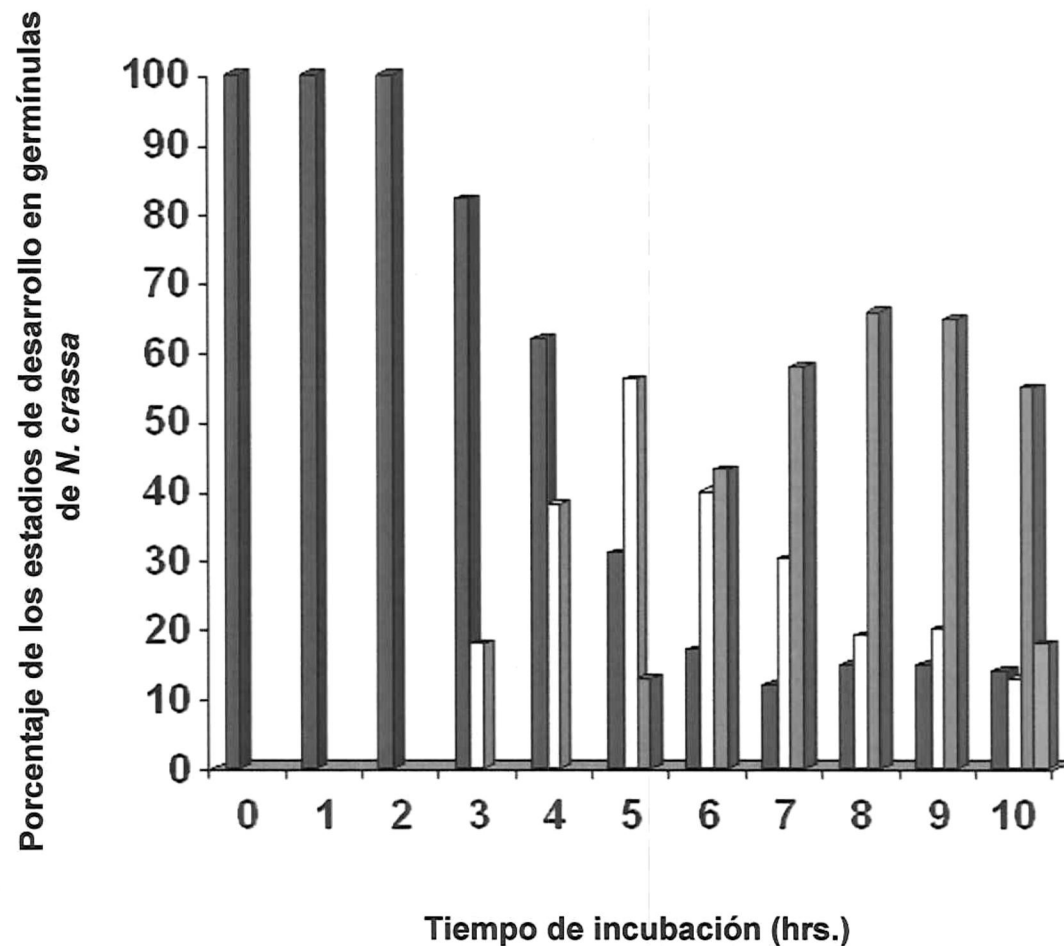


Figura 8. Porcentaje de los diferentes estadios de desarrollo en germinulas de *N. crassa* cepa silvestre durante 10 horas de incubación (n = 100). Fase de hidratación ■, emergencia del tubo germinativo □, elongación del tubo germinativo ■, formación de ramificación ■.

El crecimiento y desarrollo de células fúngicas de *N. crassa* se determinó mediante la medición de 30 células por cada hora de incubación (Tabla I). De acuerdo a los resultados anteriores, la fase de hidratación ocurre a partir de las 0 a las 2 horas de incubación, por lo tanto a las 0 horas, las células fúngicas presentaron un diámetro promedio de $7.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$; 1 hora más tarde, el diámetro promedio fue de $7.5 \pm 0.9 \mu\text{m}$ y a las 2 horas, el diámetro fue de $7.6 \pm 0.9 \mu\text{m}$. La siguiente fase que se presenta durante el crecimiento y desarrollo en hongos filamentosos es la emergencia del tubo germinativo, ocurriendo en un período de 3 a 4 horas, durante este lapso de tiempo, las células presentaron una longitud promedio total de $9.6 \pm 2.4 \mu\text{m}$. La fase de elongación del tubo germinativo comienza a presentarse a partir de las 5 horas de incubación y en este estudio se encontró que al tiempo de 5 horas las células presentaron una longitud promedio de $17.4 \pm 4.0 \mu\text{m}$ (Fig. 9) con un valor mínimo de $14.1 \mu\text{m}$ y un máximo de $25.1 \mu\text{m}$; al tiempo de 6 horas, la longitud promedio fue de $22.8 \pm 7.3 \mu\text{m}$, presentando un valor mínimo de $14.1 \mu\text{m}$ y un máximo de $37.4 \mu\text{m}$; a las 7 horas, la longitud promedio fue de $40.6 \pm 30.8 \mu\text{m}$, cuyo tamaño mínimo encontrado fue de $13.7 \mu\text{m}$, mientras que el valor máximo fue de $105 \mu\text{m}$; a las 8 horas de incubación, la longitud promedio que se presentó fue de $71.2 \pm 28.5 \mu\text{m}$ con un valor mínimo de $22.7 \mu\text{m}$ y su valor máximo fue de $116.4 \mu\text{m}$; para las 9 horas de incubación, la longitud promedio fue de $82.8 \pm 46.1 \mu\text{m}$ con un mínimo de $28.2 \mu\text{m}$ y un máximo de

Tabla I. Evaluación de los distintos estadios de *N. crassa* cepa silvestre. * Promedio $\pm$ Desviación Estándar.

Estadio	Tiempo en horas	Longitud (μm) *
Fase de hidratación	0	7.3 ± 0.8
	1	7.5 ± 0.9
	2	7.6 ± 0.9
Fase de emergencia del tubo germinativo	3 - 4	9.6 ± 2.4
Fase de elongación del tubo germinativo	5	17.4 ± 4.0
	6	22.8 ± 7.3
	7	40.6 ± 30.8
	8	71.2 ± 28.5
	9	82.8 ± 46.1
	10	168.0 ± 76.9
Fase de formación de ramificación	10	357.8 ± 91.4

155.7 μm ; en cambio, a las 10 horas de incubación la longitud promedio fue de $168.0 \pm 76.9 \mu\text{m}$ con un mínimo de 76.4 μm y un máximo de 332.1 μm (Fig. 9). Otro estadio de desarrollo que se presenta en germínulas de *N. crassa*, es la fase de la formación de la primera ramificación; dicha fase ocurre aproximadamente a las 10 horas y la longitud promedio que se presentó fue de $357.8 \pm 91.4 \mu\text{m}$ donde el valor mínimo fue de 242.8 μm y el valor máximo fue de 453.5 μm (Fig. 9).

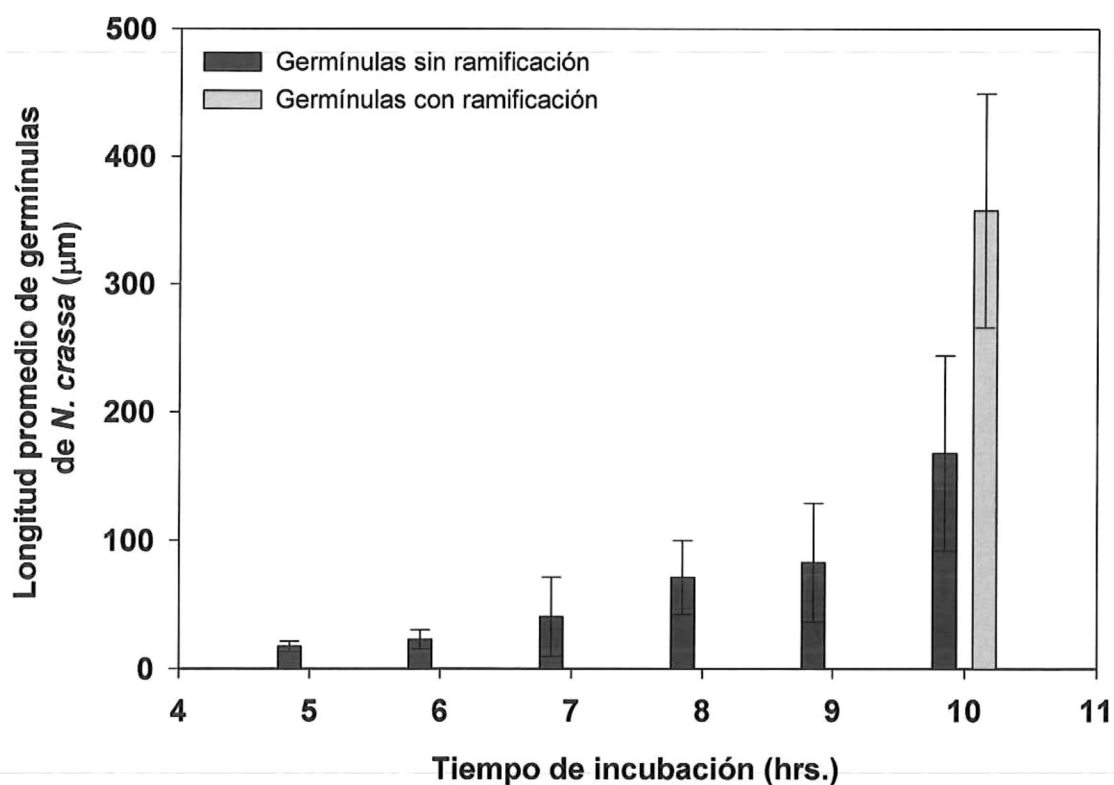


Figura 9. Longitud promedio de las germínulas de *N. crassa* a partir de las 5 a las 10 horas de incubación. Promedio $\pm$ desviación estándar ($n = 30$).

6.2 Tasa de crecimiento en germínulas de *Neurospora crassa*

Para determinar la tasa de crecimiento de las germínulas de *N. crassa*, se realizaron grabaciones desde la fase de emergencia del tubo germinativo y durante un período de 10 horas de crecimiento. Se utilizó el microscopio compuesto a un aumento total de 250x.

En este análisis, se observó que durante los estadios tempranos de crecimiento (emergencia del tubo germinativo) la tasa de crecimiento es muy lenta, a longitudes menores a las 100 μm , se determinó que la tasa de crecimiento promedio fue de $0.1 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$. (Fig. 10). No obstante, se determinó que conforme las germínulas aumentaban en longitud, la tasa de crecimiento también aumentó. A una longitud de 150 μm , la tasa de crecimiento promedio fue de $1.4 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{min}$. (Fig. 10). Como se puede observar en la figura 10 no todas las germínulas de *N. crassa* crecieron a la misma velocidad, por lo tanto algunas de las germínulas alcanzaron longitudes mayores durante el tiempo de grabación. Algunas de las germínulas registraron una longitud mayor a las 450 μm presentando una tasa de crecimiento promedio de $3.9 \pm 1.1 \mu\text{m}/\text{min}$.

La figura 11 muestra los valores de la tasa de crecimiento de la germínulas contra el tiempo expresado en minutos, observándose que la tasa de crecimiento de las germínulas *N. crassa* presentan una tendencia aparentemente exponencial a pesar de mostrar frecuentes oscilaciones en sus tasas de crecimiento. En la figura 12, se puede observar que también el

incremento en la longitud de las germínulas con respecto al tiempo sigue una tendencia exponencial.

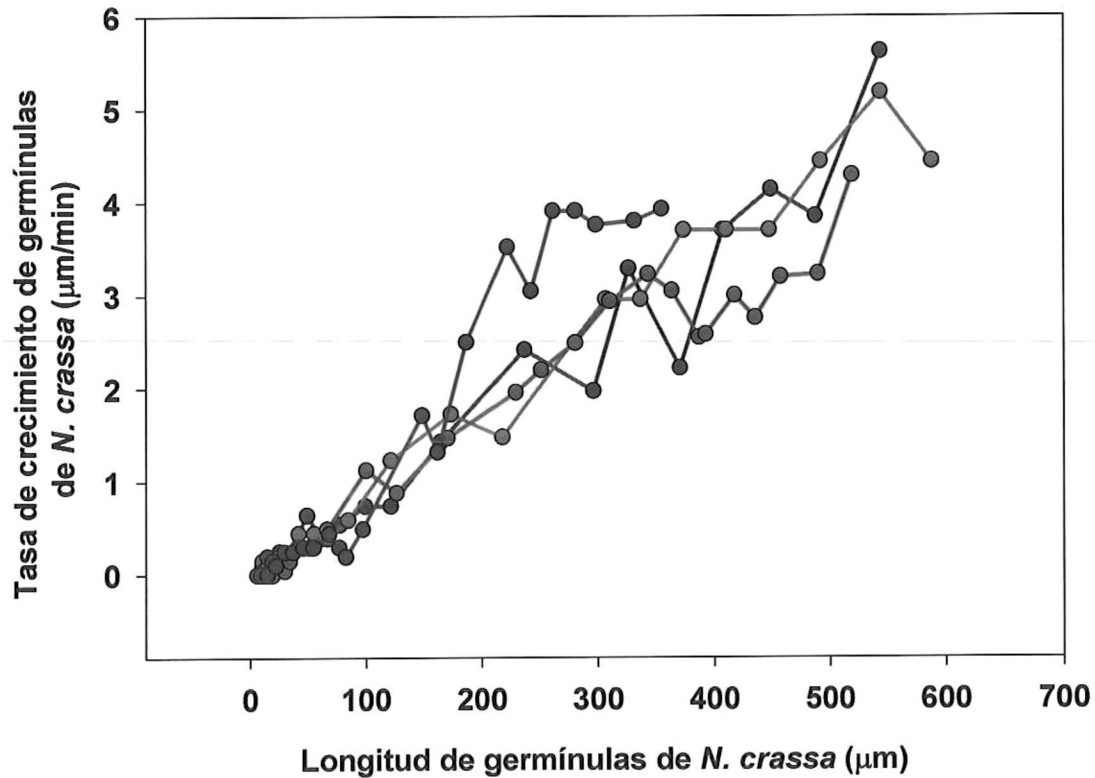


Figura 10. Tasa de crecimiento de germínulas de *N. crassa* cepa silvestre. Cada línea representa una germínula ($n = 4$).

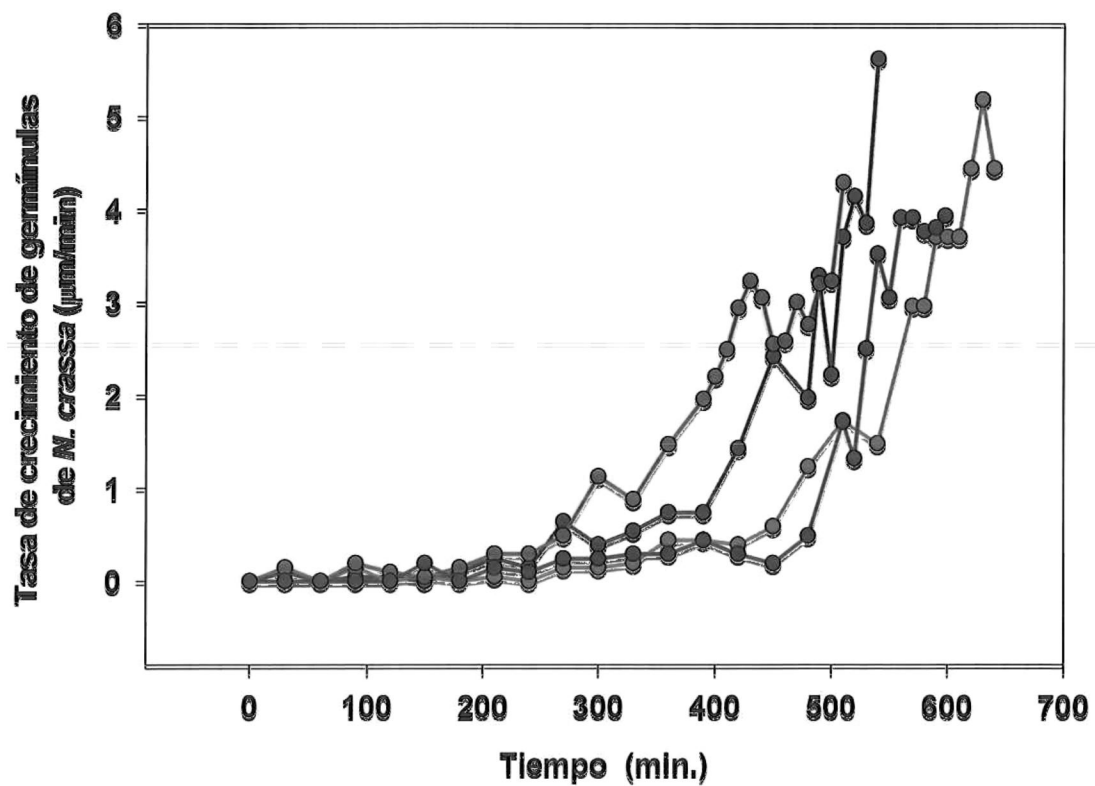


Figura 11. Tasa de crecimiento de germinulas de *N. crassa* con respecto al tiempo de incubación. Cada línea representa una germinula ($n = 4$).

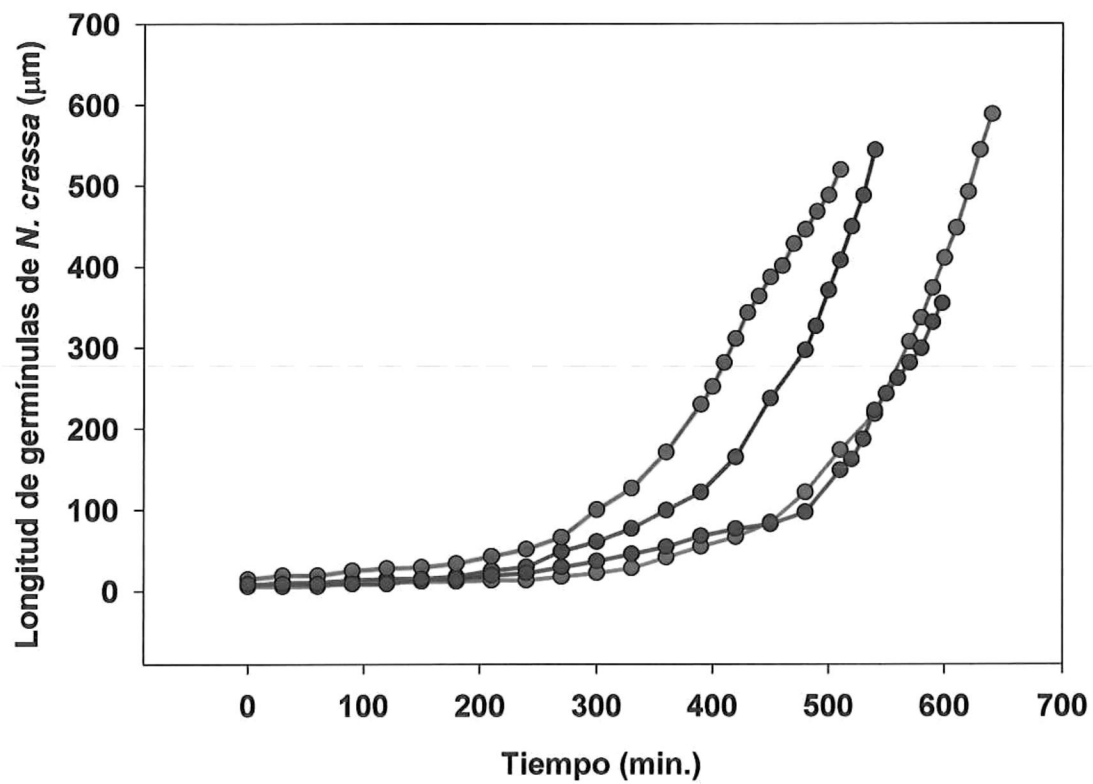


Figura 12. Longitud de germinulas de *N. crassa* con respecto al tiempo de incubación. Cada línea representa una germinula (n = 4).

6.3 Ocurrencia de septos en germínulas de *Neurospora crassa*

Mediante observaciones preliminares se detectó la presencia de septos en las germínulas de *N. crassa* a partir de un período de incubación de 7 horas, por lo cual la ocurrencia de septos en germínulas se determinó mediante la medición de 20 células a partir de las 6 hasta las 10 horas de incubación tomando el siguiente criterio de clasificación (Fig. 13):

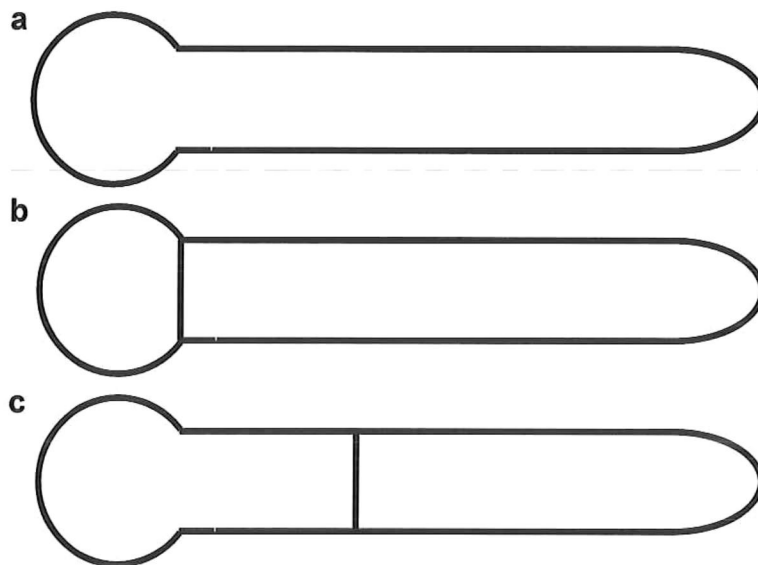


Figura 13. Representación esquemática de la clasificación de septos en germínulas de *N. crassa*. a) Germínula sin septo, b) germínula con septo en el cuello del tubo germinativo, c) germínula con septo en el tubo germinativo.

En la figura 14 y en la tabla II, se observa que a las 7 horas de incubación, el 60% de las germínulas de *N. crassa* con una longitud de $41.7 \pm 18.7 \mu\text{m}$ no presentaron septos y el 40% restante con una longitud de $48.5 \pm 23.9 \mu\text{m}$ presentaron un solo septo ubicado en el cuello del tubo germinativo. A las 8 horas de incubación, el 45% de las germínulas con una longitud de $67.1 \pm 18 \mu\text{m}$, no presentaron septos, mientras del 35% de las células con una longitud de $84.1 \pm 26.6 \mu\text{m}$ presentaron un septo, el 30% presentaron el septo en el cuello del tubo germinativo, y el 5% presentaron el septo en el tubo germinal. El 20% restante de las células con una longitud de $85.3 \pm 26.2 \mu\text{m}$, presentaron dos septos. A las 9 horas de incubación, el 40% de las germínulas con longitud de $46 \pm 22.8 \mu\text{m}$ no tenían aún septos, el 40% con longitud de $69.6 \pm 35.7 \mu\text{m}$, contaban con un septo en donde el 35% presentaba el septo en el cuello del tubo germinal y el 5% lo presentaba en el tubo germinativo; el 15% de las germínulas con longitud de $114.2 \pm 37.2 \mu\text{m}$ contaba con dos septos y un 5% con una longitud de 154.2 presentó tres septos. Finalmente, a las 10 horas de incubación, la cantidad de germínulas con septos incrementó, solo el 10% de las germínulas ($126.7 \pm 13 \mu\text{m}$) no contaban con la presencia de septos, mientras que un 10% ($103.2 \pm 56.7 \mu\text{m}$) presentaban un septo, donde un 5% el septo estuvo presente en el cuello del tubo germinativo y en el otro 5% en el tubo germinativo. Por otro lado, el 35% de las germínulas ($139.4 \pm 56.7 \mu\text{m}$) presentaban dos septos además el 5% de ellas ya presentaban 2 ramificaciones, el 20% ($275.5 \pm 68.2 \mu\text{m}$) presentaron tres septos, un 10%

($207.8 \pm 49.4 \mu\text{m}$) presentaron cuatro septos, un 5% ($453.5 \mu\text{m}$) presentó cinco septos y la presencia de 2 ramas, otro 5% ($332.1 \mu\text{m}$) presentó seis septos y una ramificación, finalmente un último 5% ($402.8 \mu\text{m}$) presentó 8 septos a lo largo de toda la germínula y 2 ramificaciones. La formación del primer septo detrás de la zona apical del tubo germinativo, se formó a una distancia promedio de $88.8 \pm 42.7 \mu\text{m}$. La distancia promedio entre septo y septo fue de $34.4 \pm 22.3 \mu\text{m}$.

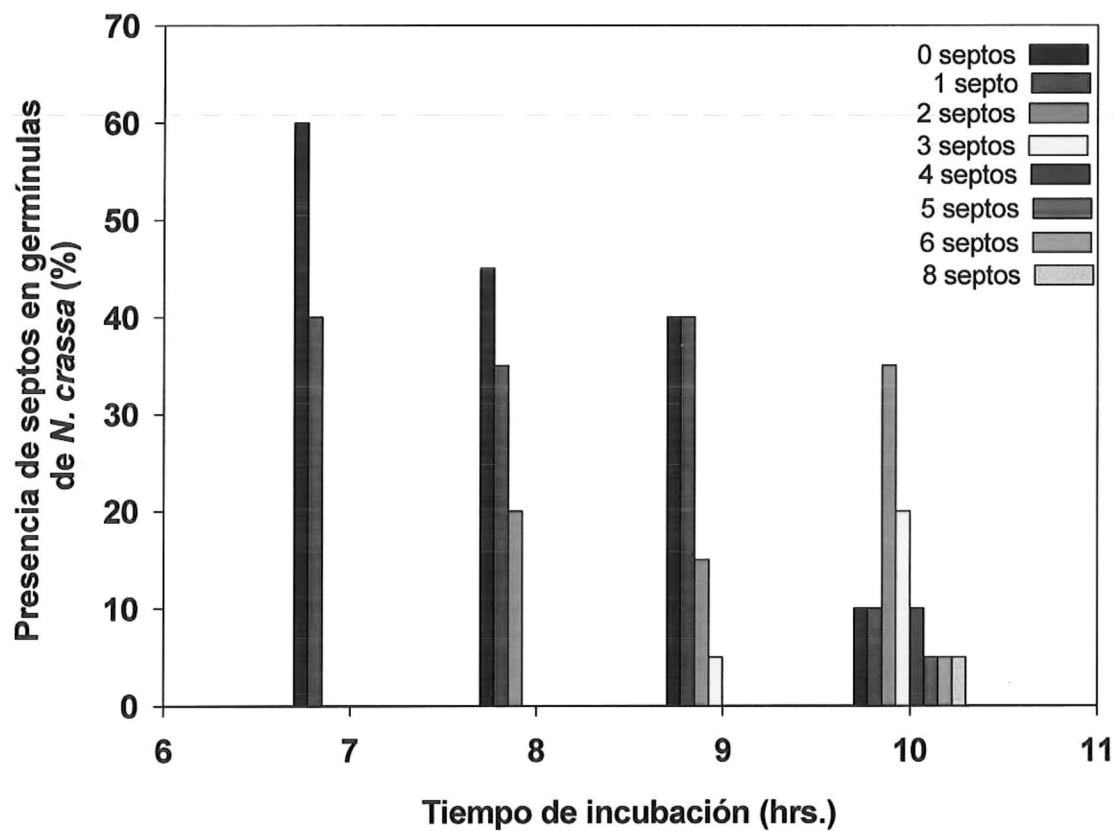


Figura 14. Porcentaje de la presencia de septos en germínulas de *N. crassa* (n = 20).

Tabla II. Evaluación de septos en germínulas de *N. crassa* cepa silvestre. * Promedio $\pm$ desviación estándar (n = 20).

Tiempo de incubación (hrs.)	Longitud de las germínulas (μm) *	No. de septos	% del total	Comentarios
6	27.7 ± 9.1	0	100 %	
7	41.7 ± 18.7	0	60 %	
	48.5 ± 23.9	1	40 %	Todas las germínulas presentaron el septo en el cuello del tubo germinativo.
8	67.1 ± 18	0	45 %	
	84.1 ± 26.6	1	35 %	30% con el septo en el cuello del tubo germinativo y el 5% tenían el septo en el tubo germinativo a una distancia del ápice celular de $62.5 \mu\text{m}$.
	85.3 ± 26.2	2	20 %	Las germínulas presentaron un septo en el cuello del tubo germinativo y otro en el tubo germinativo. La distancia del 1er. septo detrás del ápice celular se presentó a una distancia promedio de $42.2 \pm 16.2 \mu\text{m}^*$ y la distancia promedio entre septo y septo fue de $21.7 \pm 6.8 \mu\text{m}^*$.

Continuación tabla II.

Tiempo de incubación (hrs.)	Longitud de las germínulas (μm)*	No. de septos	% del total	Comentarios
9	46 $\pm$ 22.8	0	40 %	
	69.6 $\pm$ 35.7	1	40 %	35% de las germínulas presentaban el septo en el cuello del tubo germinativo y el 5% de las células tenían el septo en el tubo germinativo a una distancia del ápice celular de 71.8 μm .
	114.2 $\pm$ 37.2	2	15 %	Las germínulas presentaron un septo en el cuello del tubo germinativo y otro en el tubo germinativo. La distancia promedio del 1er. septo detrás del ápice celular fue de 70.4 $\pm$ 21.3 μm^* y la distancia promedio entre septos fue de 20 $\pm$ 12.8 μm^* .
	154.2	3	5 %	Germínula con un septo en el cuello del tubo germinativo y los 2 septos restantes a lo largo del tubo germinativo. La distancia del 1er. septo detrás del ápice celular fue de 68.7 μm y la distancia promedio entre septos fue de 29.4 $\pm$ 4.4 μm^* .

Continuación tabla II.

Tiempo de incubación (hrs.)	Longitud de las germínulas (μm) *	No. de septos	% del total	Comentarios
10	126.7 $\pm$ 13	0	10 %	
	103.2 $\pm$ 37.9	1	10 %	El 5% de las germínulas presentaron el septo en el cuello del tubo germinativo y el otro 5% en el tubo germinativo a una distancia del ápice celular de 83.1 μm .
	139.4 $\pm$ 56.7	2	35 %	Germínulas con un septo en el cuello del tubo germinativo y otro en el tubo germinativo. La distancia promedio del 1er. septo detrás del ápice celular fue de 93.6 $\pm$ 41.4 μm^* y la distancia promedio entre septo y septo fue de 22 $\pm$ 10.6 μm . El 5% de estas germínulas presentaron 2 ramificaciones, una ramificación a una distancia de 98.1 μm del ápice celular y la otra ramificación a 51.2 μm del ápice celular.
	275.5 $\pm$ 68.2	3	20 %	15% de las germínulas presentaron un septo en el cuello del tubo germinativo y el resto de los septos se presentaron a lo largo del tubo germinativo. 5% de las germínulas presentaron los septos a lo largo del tubo germinativo. La distancia promedio del 1er. septo detrás del ápice celular fue de 138.1 $\pm$ 24.2 μm^* y la distancia entre septo y septo fue de 43.2 $\pm$ 21.8 μm^* .

Continuación tabla II.

Tiempo de incubación (hrs.)	Longitud de las germínulas (μm) *	No. de septos	% del total	Comentarios
10	207.8 $\pm$ 49.4	4	10 %	Germínulas con un septo en el cuello del tubo germinativo y el resto a lo largo del tubo germinativo. El primer septo detrás del ápice celular se encontró a una distancia promedio de 68.7 $\pm$ 19.4 μm^* y la distancia promedio entre septo y septo fue de 34.5 $\pm$ 17.7 μm^* .
	453.5	5	5 %	Germínula con un septo en el cuello del tubo germinativo y el resto de los septos distribuidos a lo largo del tubo germinativo. El 1er septo detrás del ápice celular se encontró a una distancia de 159.3 μm y la distancia promedio entre septo y septo fue de 57 $\pm$ 51.5 μm^* . Este 5% presentó 2 ramificaciones en donde la 1ra. ramificación se encontró a una distancia de 52.5 μm del ápice celular y la 2da. ramificación se localizó a 377.5 μm del ápice celular.
	332.1	6	5%	Germínula con un septo en el cuello del tubo germinativo y los demás septos a lo largo del tubo germinativo. El 1er septo detrás del ápice celular se encontró a una distancia de 121.8 μm y la distancia promedio entre septo y septo fue de 30.8 $\pm$ 15.6 μm^* . A esta germínula se le observó la presencia de una sola ramificación encontrándose a una distancia del ápice celular de 25 μm .

Continuación tabla II.

Tiempo de incubación (hrs.)	Longitud de las germínulas (µm) *	No. de septos	% del total	Comentarios
10	402.8	8	5%	Germínula con un septo en el cuello del tubo germinativo y el resto de los septos distribuidos a lo largo del tubo germinativo. El 1er septo detrás del ápice celular se encontró a una distancia de 55.6 µm y la distancia promedio entre septo y septo fue de $40.8 \pm 18 \mu\text{m}^*$. A esta germínula se le observaron 2 ramificaciones. La 1ra ramificación se encontró a una distancia de 75 µm del ápice celular, mientras que la 2da. ramificación se observó a una distancia de 281.2 µm del ápice celular.

En la figura 15 se muestra que a longitudes menores de 150 μm , las germínulas mostraron un intervalo de 0 a 2 septos por germínula, y a longitudes mayores de 150 μm , el número de septos va incrementando progresivamente, $R = 0.712$.

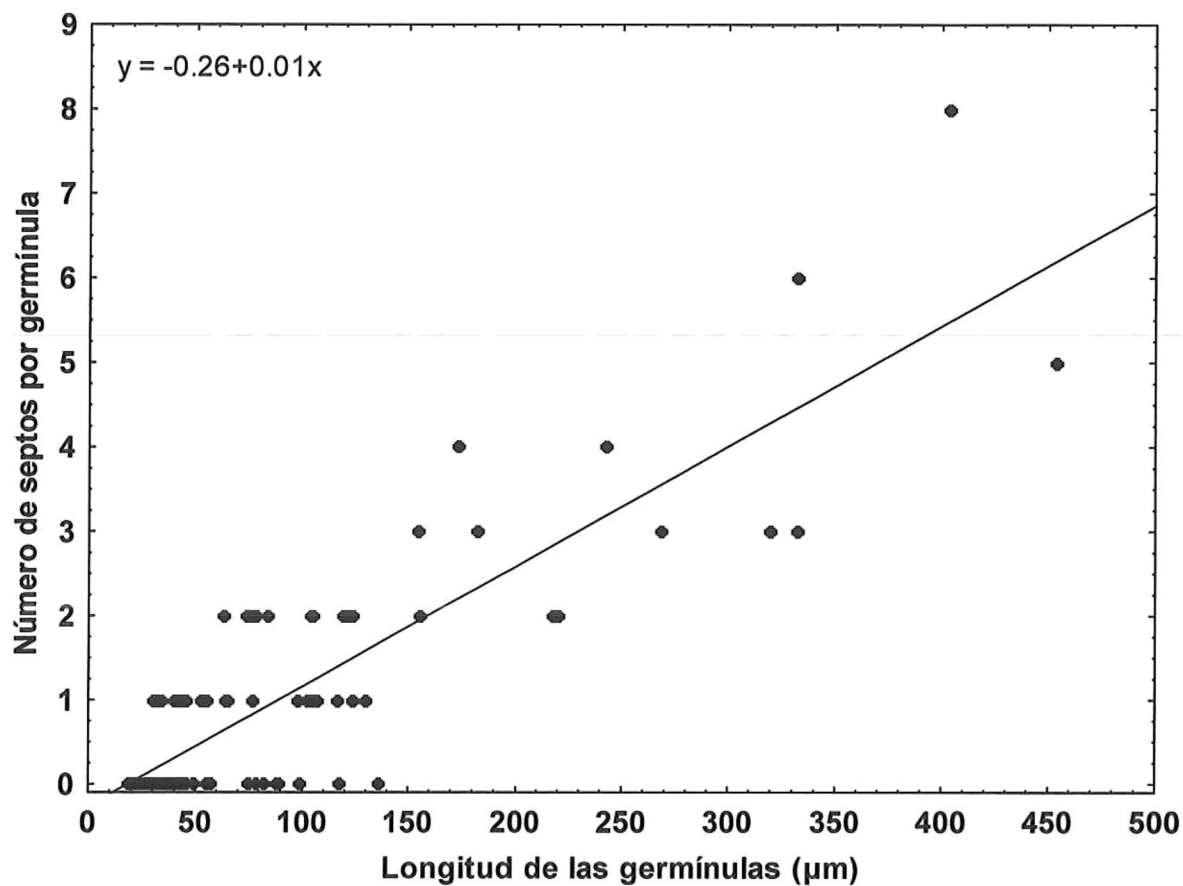


Figura 15. Correlación entre la longitud y el número de septos presentes en germínulas de *N. crassa* cepa silvestre. $R = 0.712$ ($n = 20$).

6.4 Visualización del *Spitzenkörper* en germínulas de *Neurospora crassa* en relación a la longitud y a la organización celular del tubo germinativo

En germínulas menores a los 150 μm la visualización del Spk no se registró (Fig. 16 y Fig. 17). En dichas germínulas los organelos como mitocondrias, núcleos y gránulos citoplasmáticos se encontraron abarcando toda la germínula sin una organización especial visible (Fig. 16a-c y Fig. 17). En general, algunos núcleos podían ser visibles dentro del ápice celular (Fig. 16b-c, Fig. 17). En ocasiones, algunos gránulos citoplasmáticos y vesículas presentaban movimientos rápidos dentro de dicha región.

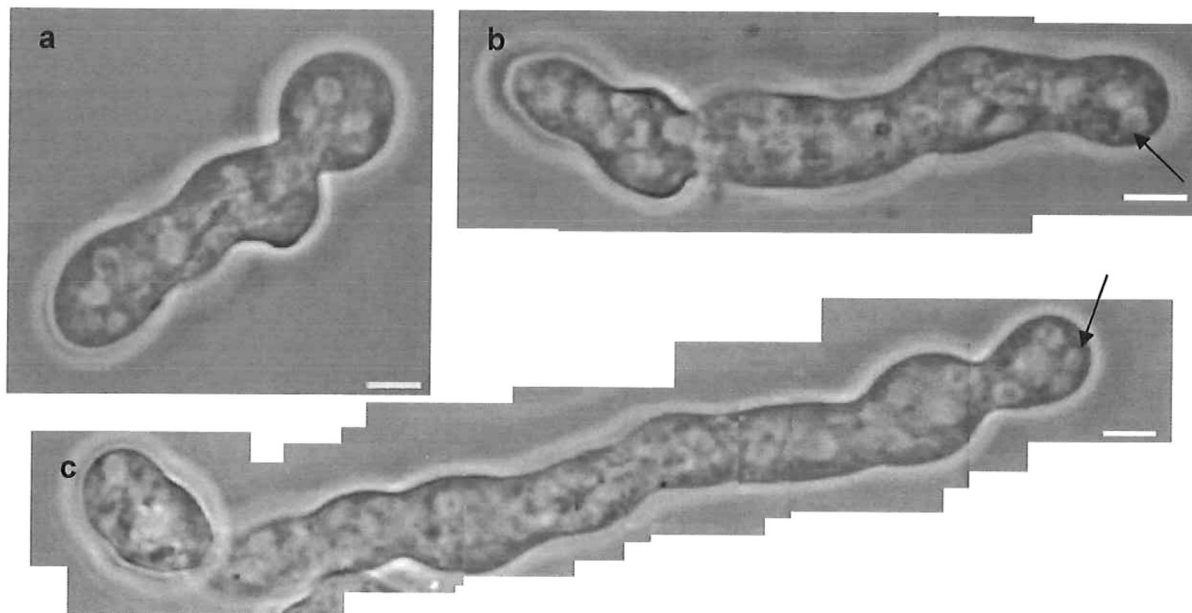


Figura 16. Germínulas de *N. crassa* sin una organización apical aparente. Las flechas indican núcleos en el ápice celular. a) Germínula de 35 μm de longitud, b) germínula de 57 μm de longitud, c) germínula de 105 μm de longitud. Escala 5 μm .

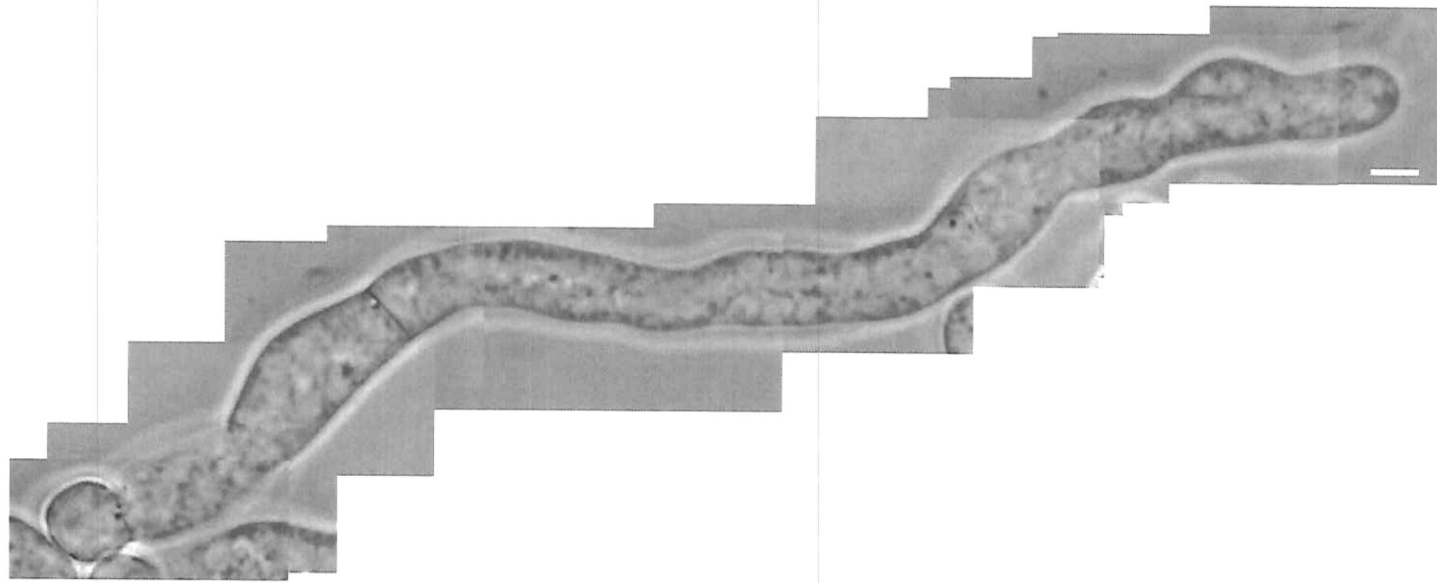


Figura 17. Germínulas de *N. crassa* sin una organización apical y sin la presencia de un Spk. Longitud de 150 μm . Escala 5 μm .

A partir de las 150 μm de longitud, las germínulas ya presentaban un desplazamiento de los núcleos a la zona subapical, las mitocondrias presentaban un tamaño pequeño y una forma granular, mientras que los núcleos mostraban una forma ovoide encontrándose muy cerca de dicha región ($5.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$). Conforme las germínulas se elongaban, los organelos poco a poco presentaban cierto grado de organización celular, donde las mitocondrias se mostraban más grandes y alargadas y los núcleos se alejaban cada vez más de la región apical (Fig. 18a). Mientras sucedía este proceso, en los ápices de las germínulas, se comenzó a observar una pequeña zona de exclusión (una zona de color claro) con un tamaño promedio de $0.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$; detrás de esta zona de exclusión un grupo de mitocondrias era visible y posterior a las mitocondrias se hallaban los núcleos (Fig. 18b). Después se observó como la zona de exclusión era más grande y más definida (Fig. 18c) con un tamaño promedio de $0.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$; detrás de la zona de exclusión las mitocondrias aparecen como un grupo más definido. Por otra parte, cuando el Spk se hace visible en los ápices de los tubos germinativo de germínulas, éste aparece como un cuerpo muy pequeño con una apariencia de color gris claro con un tamaño promedio de $0.3 \mu\text{m}$ (Fig. 18d) al cual se le denominó como inmaduro, posterior a este cuerpo apical, se pudo observar como la zona de exclusión rodeaba al Spk. Detrás de esta zona de exclusión, el grupo de los núcleos se aleja cada vez más del ápice celular (Fig. 18d).

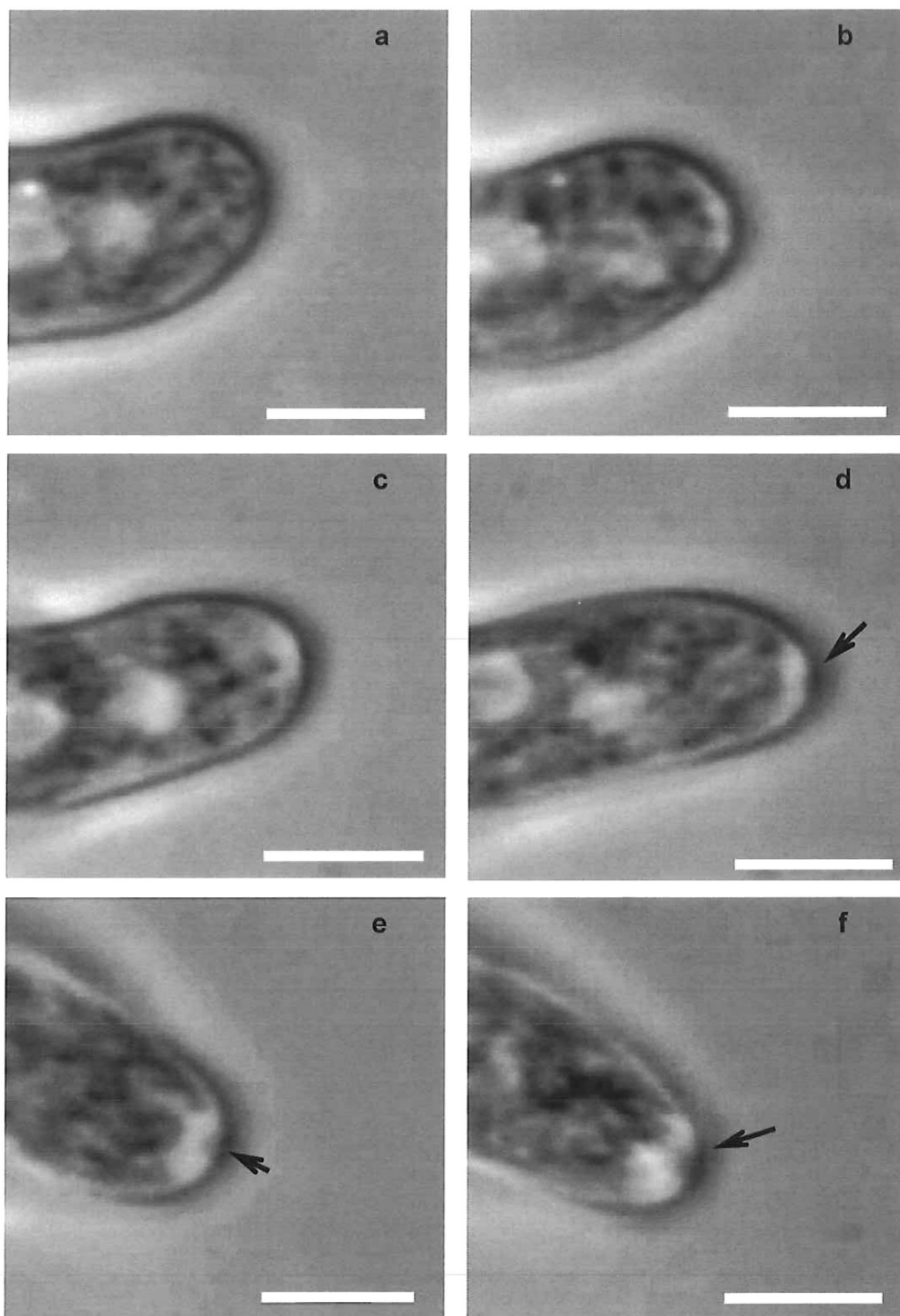


Figura 18. Germínula de *N. crassa*. a) Germínula con núcleos desplazados a la zona subapical, b) formación de la zona de exclusión, c) zona de exclusión más definida, d) aparece un Spk inmaduro de color gris, e-f) Spk más definido. Escala 5 μm .

Posteriormente, el Spk inmaduro va progresivamente haciéndose más visible y aparece como un cuerpo más oscuro (Fig. 18e) observándose una zona de exclusión también más definida y más grande alrededor del Spk. El grupo de mitocondrias alargadas y algunos núcleos ya se encuentran más alejados del ápice celular. Aproximadamente al tiempo de 30 minutos, el Spk es mucho más definido, observándose oscuro y esférico de un tamaño promedio de $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$, rodeado por una zona de exclusión bien delimitada de una longitud promedio de $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (Fig. 18f). En ocasiones, el Spk estuvo acompañado de 1 a 3 gránulos citoplasmáticos (Fig. 19), así como la presencia de algunas mitocondrias que hacían contacto con el Spk (Fig. 18f).

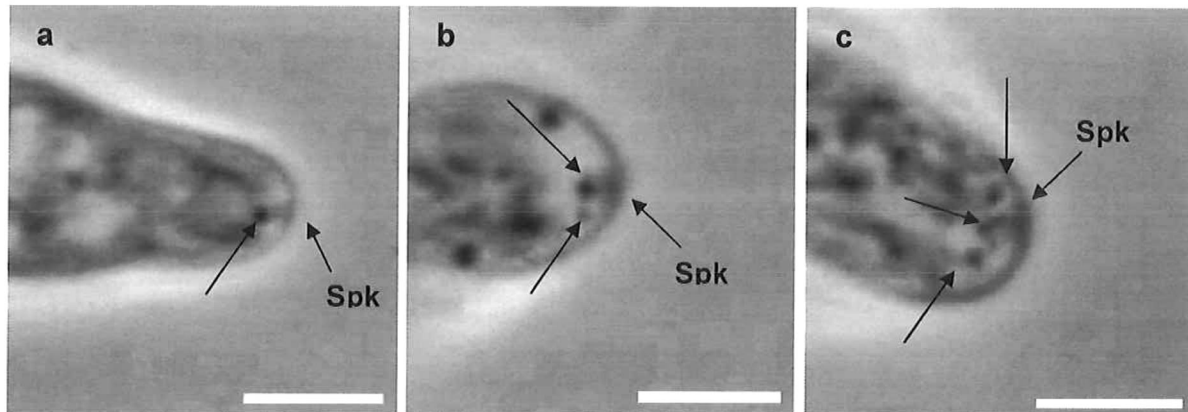


Figura 19. Ápices de germinulas de *N. crassa* donde se muestra la presencia de gránulos citoplasmáticos cerca del *Spitzenkörper* (Spk). a) Con un gránulo, b) dos gránulos, c) tres gránulos. Escala 5 μm .

6.5 Presencia y tamaño del *Spitzenkörper* en relación a la tasa de crecimiento en germínulas de *Neurospora crassa*

La presencia y el tamaño del Spk en relación a la tasa de crecimiento se evaluó en una de diez germínulas de *N. crassa* de una longitud de 450 μm . Cuando el Spk se observó como una estructura inmadura, la tasa de crecimiento que presentó la germínula fue de 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ y el Spk presentó un tamaño aproximado de 0.2 μm (Fig. 20). Durante un tiempo aproximado de 20 minutos el Spk inmaduro fue visualizado de manera inconsistente, apareciendo y desapareciendo del ápice celular. Sin embargo durante este tiempo la zona de exclusión se visualizó de manera constante y la tasa de crecimiento aumentó paulatinamente. Una vez que el Spk alcanzó un tamaño aproximado de 0.5 ± 1 μm se visualizó de manera constante y la tasa de crecimiento en esta fase aumentó a 3.6 ± 0.4 $\mu\text{m}/\text{min}$. En la figura 20 se puede observar que aunque el índice de correlación es de 0.660, la tasa de crecimiento en germínulas de *N. crassa* está aparentemente en relación con el tamaño del Spk, ya que conforme aumenta de tamaño el Spk, la tasa de crecimiento también es mayor.

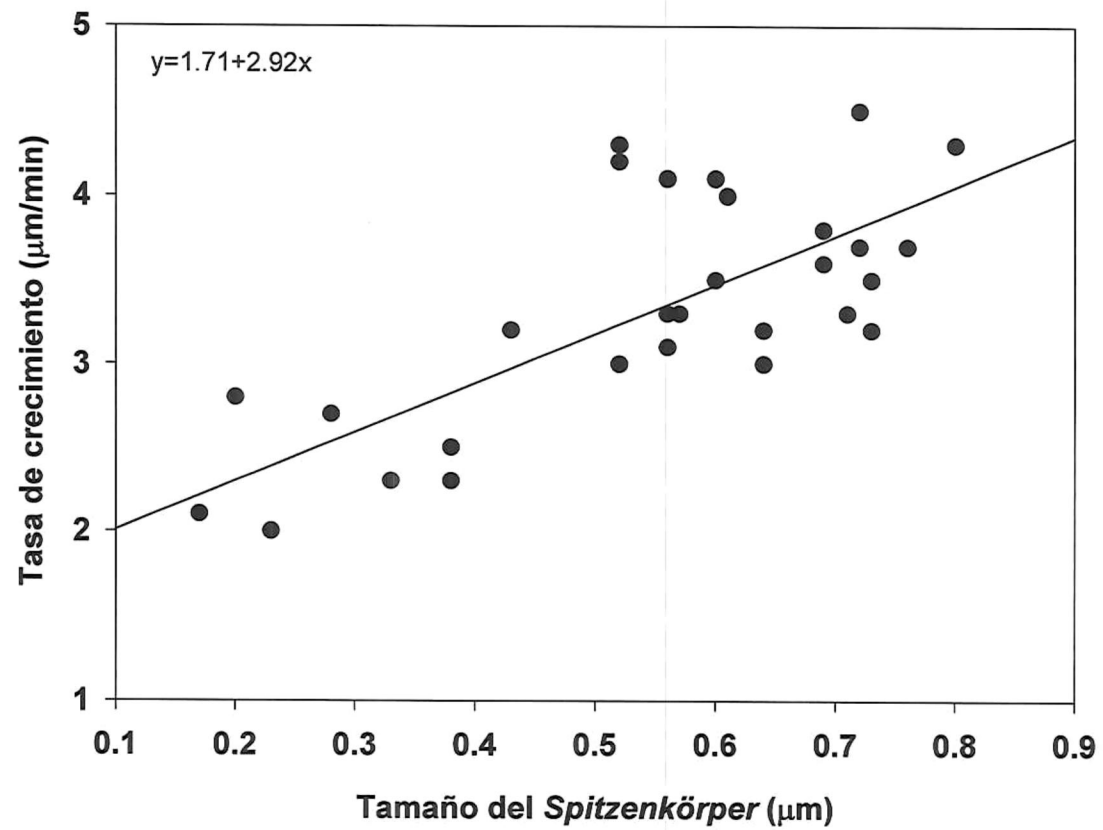


FIGURA 20. Correlación entre el tamaño del Spk y la tasa de crecimiento en germínulas de *N. crassa* cepa silvestre. $R = 0.660$ ($n = 1$).

6.6 Relación del *Spitzenkörper* con la orientación del tubo germinativo en germínulas de *Neurospora crassa*

Una vez visualizado el Spk, la orientación del tubo germinativo en germínulas de *N. crassa* estuvo determinada por la posición de dicha estructura. Sin embargo, antes de visualizarse el Spk en su fase oscura en el ápice celular, primeramente apareció una pequeña zona de exclusión, la cual aparentemente también estuvo relacionada con la orientación del tubo germinativo (Fig. 21).

En la figura 21, se muestra una secuencia de crecimiento de germínulas de *N. crassa*, en la cual solo se visualiza la zona de exclusión. Al tiempo de 0:13 min. en el ápice celular del tubo germinativo de las germínulas, la zona de exclusión está dirigida hacia la parte media apical superior del eje longitudinal del tubo germinativo la cual parece orientar en dicha dirección a la germínula. A los 2 min. se observó como la pequeña zona de exclusión se encuentra localizada sobre el eje longitudinal del tubo germinativo. A los cuatro minutos, se observó como el crecimiento apical aparentemente dirigido por la pequeña zona de exclusión, está orientado hacia la parte media apical inferior del eje longitudinal. A los seis minutos, se observó un cambio en la dirección de crecimiento del tubo germinativo, 2 minutos después (a los 8 min.), el crecimiento sigue en la misma dirección, observándose aún una pequeña zona de exclusión en el ápice celular; a los 10:21 min. se observó que la zona

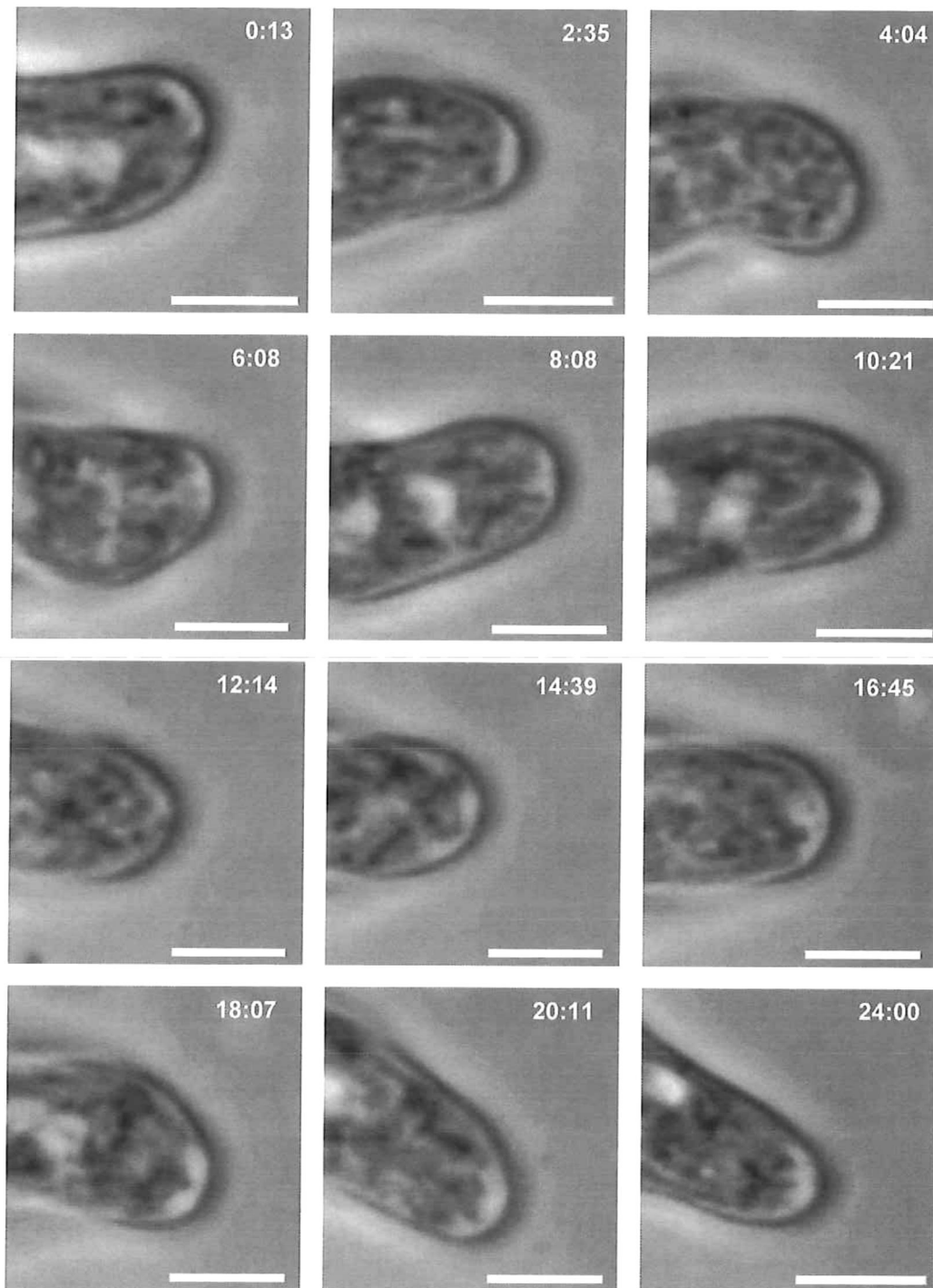


Figura 21. Comportamiento del crecimiento de germínulas de *N. crassa* sin la presencia de un Spk en el domo apical. El número en la parte superior derecha indica tiempo en minutos y segundos. Escala 5 μm .

de exclusión cambió de posición dentro del ápice celular y con ello la dirección de crecimiento. Dos min. después, el crecimiento polarizado comenzó a seguir su eje longitudinal, tomando una apariencia de línea recta, pero la visualización de la zona de exclusión fue casi nula. A los 14 y 16 min. se observó que el crecimiento del tubo germinativo sigue su eje longitudinal y nuevamente pudo ser visible una zona de exclusión. A los dieciocho min., se observó que la dirección de crecimiento cambió hacia la zona apical media inferior, siguiendo el eje longitudinal del tubo germinativo; a los 20 min., se observó que el crecimiento apical mantuvo el eje longitudinal observándose aún en la parte apical la zona de exclusión pero un poco más grande. Posteriormente, 4 min. después, en el ápice celular se siguió observando la zona de exclusión y la elongación apical mantuvo su eje longitudinal en la misma dirección. Durante la observación de la zona de exclusión en los ápices celulares de las germínulas de *N. crassa* pudo observarse una estructura de apariencia muy clara dentro de la zona de exclusión (posiblemente un Spk).

Aproximadamente después de 30 minutos de grabación apareció el Spk en su forma inmadura conservando la dirección de crecimiento y una vez que el Spk se encuentra bien definido dentro del domo apical, el tubo hifal de las germínulas presentó en general una dirección fija sobre su eje longitudinal sin un crecimiento ondulatorio aparente (Fig. 22).

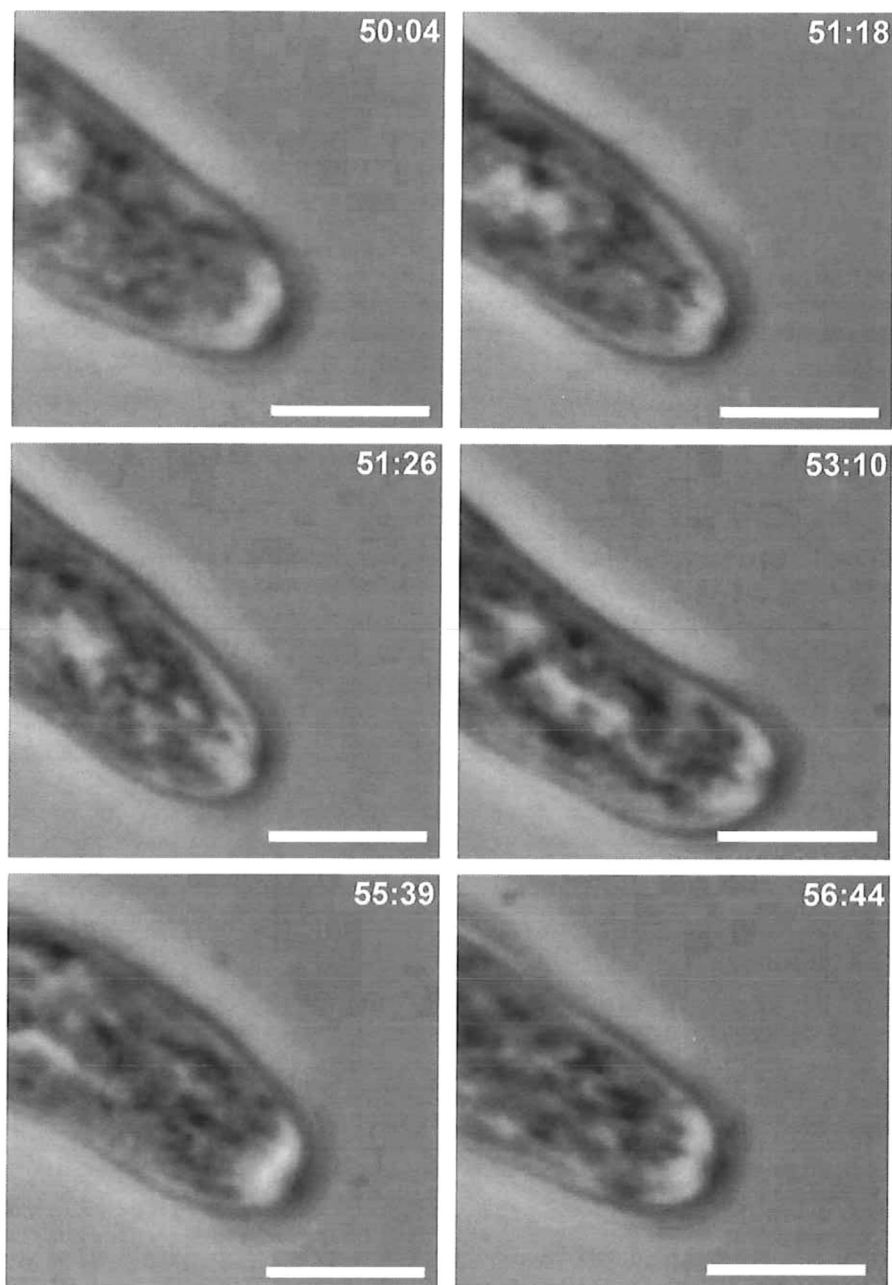


Figura 22. Comportamiento del crecimiento de germinulas de *N. crassa* con la presencia de un *Spitzenkörper* (Spk) dentro del domo apical. El número en la parte superior derecha indica tiempo en minutos y segundos. Escala 5 μm .

7. DISCUSIONES

El estudio de germínulas de *N. crassa* cepa silvestre mediante el uso de microscopía de contraste de fases y la video-microscopía, permitió analizar acontecimientos como el proceso de germinación y la visualización del Spk en los ápices celulares. Este es el primer reporte donde se muestran detalles citológicos en la organización celular apical, ontogenia, comportamiento del Spk y tasa de crecimiento en germínulas de *N. crassa*.

La grabación de imágenes microscópicas fue esencial para llevar a cabo el análisis cuantitativo y cualitativo de los procesos citológicos que ocurren en el interior de las células fúngicas; lo cual hizo posible observar sucesos que ocurren a corto plazo y que son importantes en los cambios morfológicos de las germínulas de *N. crassa*.

Estos hallazgos, contribuyen a aportar nueva información en germínulas y refuerza que el Spk juega un papel importante en el crecimiento apical y morfogénesis tanto en germínulas como en hongos maduros (Girbardt, 1957, 1969; McClure *et al.*, 1968; Grove y Bracker, 1970; Bartnicki-García, 1989; Bracker *et al.*, 1997 y Riquelme *et al.*, 1998).

7.1 Germinación y crecimiento de las germínulas de *Neurospora crassa*

Para conocer más acerca el desarrollo morfológico que presenta el hongo ascomiceto *N. crassa*, se realizó un trabajo de reconocimiento de las

diferentes fases de desarrollo del hongo. Cuatro estadios distintos fueron reconocidos: fase de hidratación, fase de emergencia del tubo germinativo, fase de elongación del tubo germinativo y fase de formación de ramificaciones; tres de estos estadios (fase de hidratación, emergencia del tubo germinativo y elongación del tubo germinativo) ya habían sido descritos por Schmit y Brody, (1976) y señalados por Seiler y Plamann, (2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron muy similares a los descritos por los autores antes mencionados; pero, Seiler y Plamann, (2003), mencionan en su escrito, que a las 10 horas de incubación de las esporas del hongo *N. crassa* una nueva hifa es generada por ramificación del compartimiento subapical. Mediante las observaciones realizadas en este trabajo, se confirma que a partir de las 10 horas de incubación, en las germínulas de *N. crassa* dan inicio a las primeras ramificaciones. Por esta razón, este proceso se tomó como otra fase de desarrollo en las germínulas.

Es importante señalar, que debido a la amplia variación de puntos de vista, es recomendable hacer ensayos de este tipo para poder tomar criterios que puedan ser favorables en la elaboración de cualquier trabajo de investigación.

7.2 Ocurrencia de septos en germínulas de *Neurospora crassa*

Hunsley y Gooday, (1974) reportaron en hifas maduras de *N. crassa*, que la formación de septos inicia a las 100-180 μm detrás del ápice de la hifa y la

separación entre septo y septo es de $55 \pm 25 \mu\text{m}$. Sin embargo, en este trabajo se encontró que la formación del primer septo detrás de la zona apical del tubo germinativo, se formó a una distancia promedio de $88.8 \pm 42.7 \mu\text{m}$ y la distancia promedio entre septo y septo fue de $34.4 \pm 22.3 \mu\text{m}$. La diferencia que se presentó en germínulas con respecto a lo reportado para hifas maduras de *N. crassa* puede ser debido a que las germínulas son muy pequeñas y poseen un diámetro menor (aproximadamente la mitad del diámetro de una hifa madura). Por otro lado, la formación de septos en germínulas puede ser un indicador de que la célula comienza a presentar cierto grado de organización o cierta madurez celular. Sin embargo en este trabajo no se pudo determinar si existe alguna relación septo-spk, aunque el Spk fue visualizado únicamente en germínulas con presencia de dos septos en adelante.

7.3 Organización celular en germínulas de *Neurospora crassa*

La descripción citoplasmática subapical ha sido descrita solo en hifas maduras de *N. crassa* por López-Franco y Bracker, (1996). En cambio, la descripción citoplasmática subapical en germínulas no se había documentado.

De acuerdo a las observaciones realizadas, en este trabajo se determinó que algunos organelos citoplasmáticos como núcleos y mitocondrias nos permiten determinar el grado de organización en las células fúngicas, debido a que antes de la visualización del Spk en las germínulas, dichos organelos se encontraban ocupando toda la célula fúngica; sin embargo, cuando las

mitocondrias pasaron de una forma pequeña a una forma más grande y alargada apareció un Spk inmaduro, que gradualmente se fue definiendo hasta visualizarse como un Spk de fase oscura. Al visualizarse esta estructura, se puede reconocer que los organelos celulares presentan cierto grado de organización, lo cual nos lleva a determinar que la visualización del Spk en germínulas de *N. crassa* parece depender del nivel de organización intracelular.

7.4 Visualización del *Spitzenkörper* en germínulas de *Neurospora crassa*

La visualización del Spk en germínulas utilizando microscopía de contraste de fases, se dio a partir de longitudes mayores de 150 μm . El Spk apareció dentro de la región distal del domo apical como lo reportó Caesar-Ton *et al.*, (1987) en germínulas de *N. crassa*.

Cuando el Spk se visualizó dentro del domo apical en las germínulas de *N. crassa*, fue debido a la presencia de una nube de vesículas en la región apical. Este Spk, fue muy pequeño y con una apariencia de color gris muy claro (con contraste de fases) al cual se le denominó como Spk inmaduro. Este cuerpo apical inmaduro, presentaba una forma amorfa. Es posible que la apariencia amorfa y el color del Spk es debido a que en el ápice celular no se encontraban las vesículas necesarias (componente principal del Spk (McClure *et al.*, 1968; Girbardt, 1969; Grove y Bracker, 1970 y Howard, 1981)) para dar la forma esférica y oscura como se ha sido descrito en los trabajos de Brunswik,

(1924); Girbardt, (1957) y por López-Franco y Bracker (1996), aunque hay que tomar en cuenta que estos estudios solo se han realizado en hifas de hongos maduros.

Posteriormente, esta estructura amorfa fue progresivamente haciéndose más visible, hasta que apareció como un cuerpo esférico y oscuro como fue descrito para hifas maduras por Brunswik, (1924); Girbardt, (1957) y López-Franco y Bracker (1996). Cuando el Spk en germínulas presenta las características antes descritas, muy posiblemente es debido a que la cantidad de vesículas citoplasmáticas dentro del ápice celular son las suficientes para formar al complejo y dar la forma que caracteriza al Spk.

La morfología de los Spk que se observaron en este trabajo, fue similar al descrito para *N. crassa* por López-Franco y Bracker, (1996). Sin embargo la región central ("Core") descrita por dichos autores, no se visualizó en ninguna germínula. Es posible que debido a que el Spk en estadios tempranos de *N. crassa* es de tamaño muy pequeño y no sea posible visualizar completamente su estructura.

7.5 Comportamiento del *Spitzenkörper* en germínulas de *Neurospora crassa*

Riquelme *et al.*, (2000) han reportado que en hifas maduras de *N. crassa* cepa silvestre, el Spk mostró movimientos dominantes acompañado de pequeñas oscilaciones transversales. Se asume en este trabajo que el

movimiento dominante ocurre cuando las germínulas presentan una velocidad de elongación promedio de aproximadamente $3.6 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$. Cuando las germínulas alcanzaron esta velocidad el Spk mostró un movimiento constante sobre el eje longitudinal del ápice con la presencia de ligeras oscilaciones transversales dentro del domo apical sin perder la dirección fija sobre su eje.

Así mismo, también se observó que mientras las células fúngicas no presentaban una organización intracelular visible, el Spk no se visualizó. Sin embargo, cuando aparece como un Spk inmaduro, esta estructura aparece y desaparece constantemente con movimientos altamente irregulares, causando al tubo germinativo cambios en la dirección de crecimiento; un caso similar es el que se reporta en germínulas de *U. vignae* y *P. graminis* por Dijkterhuis, (2003).

7.6 Relación del *Spitzenkörper* con la orientación del tubo germinativo en germínulas de *Neurospora crassa*

Observaciones realizadas en este trabajo, muestran que el comportamiento del Spk dentro del domo apical trajo como consecuencias cambios en la dirección de crecimiento. Este hecho ha sido argumentado con anterioridad por Brunswik, (1924); Girbardt, (1957); Bracker *et al.*, (1997); Riquelme *et al.*, (1998); Riquelme *et al.*, (2000) y Bartnicki-García, (2002), en hongos maduros.

En este trabajo se estableció que en germínulas de *N. crassa* la zona de exclusión es la primera en visualizarse (aunque no se descarta la posibilidad de

que en ésta zona de exclusión exista un agregado de vesículas que no sea posible visualizarlas mediante microscopía de contraste de fases) y que un cambio en el comportamiento de esta estructura así como de un Spk inmaduro, ocasionó en el tubo germinativo cambios constantes en la dirección de crecimiento, ocasionando en las germínulas una forma ondular. No obstante, después que el Spk se visualizó como una estructura de fase oscura, el tubo germinal presentó una morfología “linear” y casi perfecta de la hifa. Un caso parecido, fue reportado por Riquelme *et al.*, (1998) en hifas maduras de *N. crassa*.

Con estos resultados podemos decir que el comportamiento de la estructura apical en germínulas (zona de exclusión, Spk inmaduro y Spk maduro) al igual que en hifas maduras (Spk maduro), demuestra una relación con la posición, trayectoria y dirección de crecimiento en hongos filamentosos.

7.7 Tasa de crecimiento y desarrollo de germínulas de *Neurospora crassa* en relación a la visualización del *Spitzenkörper*

La tasa de crecimiento en germínulas de *N. crassa* parece estar relacionada con la aparición del Spk, debido que en germínulas con longitudes menores de 100 μm , la tasa de crecimiento es menor de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ y esto puede ser debido que en dichas longitudes, en los ápices celulares de las germínulas de *N. crassa* no se visualiza el Spk. Sin embargo, a longitudes de 150 μm , la tasa de crecimiento promedio aumentó a $1.4 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{min}$. Además, durante la

elongación apical de las germínulas se observaron decrementos en la tasa de crecimiento, los cuales se relacionaron con la desaparición del Spk. Otras variaciones intrínsecas en la tasa de crecimiento en hifas maduras, han sido reportadas y correlacionadas con procesos fisiológicos como la mitosis y la formación de septos por Robinow, (1963); el ciclo celular por Fiddy y Trinci, (1976) y Trinci, (1978) y ramificaciones dicotómicas por Trinci, (1970) y Lysek (1972); Sin embargo, López-Franco *et al.*, (1994) señala que todas las variaciones antes señaladas, fueron medidas a una escala de tiempo mucho muy largo, lo cual no puede ser comparado directamente.

8. CONCLUSIONES

- El *Spitzenkörper* en germínulas de *N. crassa* utilizando microscopía de contraste de fases puede visualizarse a partir de longitudes de 150 μm .
 - En germínulas de *N. crassa*, el *Spitzenkörper* aparece primeramente como una estructura inmadura, amorfa y de color gris claro el cual sólo es posible observar una vez que la célula ha alcanzado un alto grado de organización intracelular.
-
- El *Spitzenkörper* en germínulas de *N. crassa*, al igual que en hifas maduras, es una estructura que determina la dirección de crecimiento.
 - La formación del *Spitzenkörper* en las germínulas de *N. crassa* parece estar determinada por la cantidad de vesículas que se encuentran en el ápice celular.
 - Las germínulas de *N. crassa* presentan una tasa de crecimiento exponencial la cual parece tener una relación directa con la aparición del *Spitzenkörper*.
-

9. PERSPECTIVAS

Es posible que a longitudes menores a las 150 μm exista una concentración muy baja de vesículas apicales y debido a ello no sea posible observar el Spk por microscopía de contraste de fases. Por lo cual, es necesario realizar un estudio utilizando Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), para observar si en efecto existe un agregado de vesículas en la zona apical que dará origen al Spk.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alexopoulos, C.J. 1977. Introducción a la micología. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 615 pp.

Bartnicki-García, S. 1981. Cell wall construction during spore germination in Phycomycetes. The Fungal Spore. 1981. Ed. G. Turian & H.R. Hohl. 533-556 pp. London, UK: Academic Press.

Bartnicki-García, S., F. Hergert y G. Gierz. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. Protoplasma. **153**:6-57.

Bartnicki-García, S., D.D.G. Gierz., R. López-Franco y C.E. Bracker. 1995. Evidence that the Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. Experimental Mycologia. **19**:153-159.

Bartnicki-García, S. 2002. Hyphal tip growth: Outstanding question. Molecular Biology of Fungal Development. En: Molecular Biology of Fungal Development. Marcel Dekker. New York. 1-25 pp.

Bourrett, T.M y R.J. Howard. 1989. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Can. J. Bot. **68**: 329-342.

Bracker, C.E., D.J. Murphy, R. López-Franco. 1997. Laser microbeam manipulation of cell morphogenesis in growing fungal hyphae. En: D.L. Farkas, B.J. Tromberg, (eds). Functional Imaging and Optical Manipulation of Living Cells. Bellingham, W.A: SPIE-The International Society for Optical Engineering (Proceedings of SPIE Vol. 2983). 67-80pp.

Brunswik, H. 1924. Untersuchungen über die geschlechts und kernverhältnisse bei der hymenomyzetengattung *Coprinus*. En: Botanische Abhandlung (K. Goebel, Ed.). Gustav Fisher Verlag, Jena. 1-152 pp.

Caesar-Ton, C., K. Hoang-Van, G. Turian y H.C. Hoch. 1987. Isolation and characterization of coated vesicles from filamentous fungi. European J. of Cell Biol. **43**:189-194.

Clay, R.P., J. Enkerli y M.S. Fuller. 1994. Induction and formation of *Cochliobolus sativus* appressoria. Protoplasma. **178**:34-47.

Davis, R.H. 2000. *Neurospora*. Contributions of a model organism. Oxford. University press. 333 pp.

Davis, R.H. y D.D. Perkins. 2002. *Neurospora*: a model of model microbes. Nature Review Genetics. **3**:7-13.

Deacon, J.W. 1990. Introducción a la Micología Moderna. Ed. LIMUSA. México, D.F. 350 pp.

- Dijksterhuis, J. 2003. Confocal microscopy of Spitzenkörper dynamics during growth and differentiation of rust fungi. *Protoplasma*. **222**:53-59.
- Ekundayo, J.A. y M.J. Carlile. 1964. The germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*: spore swelling and germ-tube emergence. *J. of Gen. Microbiol.* **35**:261-269.
- Fiddy, C. y A.P.J. Trinci 1976. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **97**:169-184.
- Fletcher, J. 1969. Morphological and nuclear behaviour of germinating conidia of *Penicillium griseofulvum*. *Transactions of the British Mycological Society*. **53**:425-432.
- Girbardt, M. 1957. Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor*. *Planta*. **50**:47-59.
- Girbardt, M. 1969. Die ultrastruktur der apikalregion von pilzhyphen. *Protoplasma*. **67**:413-441.
- Gooday, G.W. 1995. The dynamics of the growth. *Mycological Research*. **99**:385-394.
- Grove, S.N. y C.E. Bracker. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and spitzenkörper. *J. of Bact.* **104**:989-1009.
- Grove, S.N. 1978. The cytology of hyphal tip growth. In: *The Filamentous Fungi* (Smith J.E., Berry D.R. Eds.). 28-50 pp. Arnold, London.

- Grove, S.N. y J.A. Sweigard. 1981. The Spitzenkörper persists after tip growth is arrested by cytochalasins. *Mycol. Soc. Am. Newsl.* **32**:33.
- Gull, K. y A.P.J. Trinci. 1971. Fine structure of spore germination in *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology.* **68**:207-220.
- Hoch, H.C. y R.C. Staples. 1983. Ultrastructural organization of the non-differentiated urediospore germling of *Uromyces phaseoli* variety *typical*. *Mycologia.* **75**:795-824.
- Howard, R.J. y J.R. Aist. 1977. Effects of MBC on hyphal tip organization, growth, and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D₂O. *Protoplasma.* **92**:195-210.
- Howard, R.J. 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J. Cell Science.* **48**:89-103.
- Hunsley, D. y G.W. Gooday. 1974. The structure and development of septa in *Neurospora crassa*. *Protoplasma.* **82**:125-146.
- Katz, D., D. Goldstein y R.F. Rosenberger. 1972. Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *J. of Bacteriol.* **109**:1097-1100.
-

- Kwon, Y.H., H.C. Hoch y J.R. Aist. 1991. Initiation of appressorium formation in *Uromyces appendiculatus*: organization of the apex, and the responses involving microtubules and apical vesicles. *Can. J. Bot.* **69**:2560-2573.
- López-Franco, R. 1992. Organization and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips. Tesis de doctorado. Purdue University. 185 pp.
- López-Franco, R., S. Bartnicki-García y C. E. Bracker. 1994. Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Developmental Biol.* **91**:12228-12232.
- López-Franco, R. y C.E. Bracker. 1996. Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma.* **195**:90-111.
- Lysek, G. 1972. Rhythmic micelial growth in *Podospora anserina*. *Arch. Microbiol.* **87**:129-137.
- McClure, W.K., D. Park y P.M. Robinson. 1968. Apical organization in the somatic hyphae of fungi. *J.I of Microbiol.* **50**:177-182.
- McDaniel, D.P. y R.W. Roberson. 2000. Microtubules are required for vesicles and mitochondria movility and positioning in hyphal tip cells of *Allomyces nacrogyrus*. *Fungal Genetics Biology.* **31**:233-244.
- Prosser, J.I. y P.J. Trinci. 1979. A model for hyphal growth and branching. *J. of Gen. Microbiol.* **111**:153-164.

- Reynaga-Peña, C., G. Gierz y S. Bartnicki-García. 1997. Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. *Cell Biology*. **94**:9096-9101.
- Riquelme, M., C.G. Reynaga-Peña., G. Gierz y S. Bartnicki-García. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology*. **24**:101-109.
- Riquelme. M., G. Gierz. y S. Bartnicki-García. 2000. Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology*. **146**:1743-1752.
-
- Roberson, R.W. y M.M. Vargas. 1994. The tubulin cytoskeleton and its sites of nucleation in hyphal tips of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*. **182**:19-31.
- Robinow, C.F. 1963. Observations on cell growth, mitosis and division in the fungus *Basidiobolus ranarum*. *J. Cell Biol.* **17**:123-152.
- Schmit, J.C. y S. Brody. 1976. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol. Reviews*. **40**:1-41.
- Seiler, S. y M. Plamann. 2003. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell*. **14**:4352-4364.
-

- Srinivasan, S., M.M. Vargas y R.W. Roberson. 1996. Functional, organizacional, and biochemical análisis of actin in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Mycologia*. **88**:57-70.
- Trinci, A.P.J. 1970. Kinetics of apical and lateral branching in *Aspergillus nidulans* and *Geotrichum lactis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **55**:17-28.
- Trinci, A.P.J. 1971. Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies. *J. of Gen. Microbiol.* **67**:325-344.
- Trinci, A.P.J. 1978. The duplication cycle and vegetative development in moulds. En: *The filamentous fungi*. Vol. 3. (Smith, J. E. y D. R., Berry Eds.) Halsted Press Book. New York. 132-163 pp.
- Trinci, A.P.J. 1984. Regulation of hyphal branching and hypal orientation. The ecology and physiology of the fungal mycelium. En: *Symposium of British Mycological Society*. (H. H. Jennings and A. D. M. Ranger Eds). 23-52 pp.
- Van Etten, J.L., L.D. Dunkle y S.N. Freer. 1977. Germination of *Rhizopus stolonifer* sporangiospores. En: *Eukaryotic microbes as model developmental systems*. (D.M.O. Day y P.A. Horgen Eds). Marcel Dekker. New York. U.S.A. 372-374 pp.
- Vargas, M., J.M. Aronson y R.W. Roberson. 1993. Cytological organization of hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*. **176**:43-52.

- Vogel, H.J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora*. Microbial Genetics Bulletin. **13**:42-43.
- Watters, M.K. y A.J.F. Griffiths. 2001. Tests of a cellular model for constant branch distribution in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Applied and Environmental Microbiology. **67**:1788-1792.
- Wu, Q., T.M. Sandroock., B.G. Turgeon., O.C. Yoder., S.G. Wirsal y J.R. Aist. 1998. A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. Molecular Biology Cell. **9**:89-101.
-
-

11. APÉNDICE

11.1 Solución de sales de Vogel

Cuadro I. Solución madre para preparar medio de Vogel (Vogel, 1956).

Constituyentes:	Formula:	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 de Biotina		2.5 mL

NOTA: Al resultado total que equivale a 1 L se le añade 2mL de cloroformo como agente preservador.

11.2 Solución de elementos traza

Cuadro II. Fórmula para preparar solución de elementos traza (Vogel, 1956).

Constituyentes:	Formula:	Cantidad:
2. Solución de elementos traza		g/95ml de agua destilada
2.1 Acido cítrico	$C_6H_8O_7 \cdot 1 H_2O$	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	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.25 g
2.5 Sulfato de Manganeso	$MnSO_4 \cdot 1 H_2O$	0.05 g
2.6 Acido Bórico	$H_3BO_3 \cdot \text{anhidro}$	0.05 g
2.7 Molibdato de Sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0.05 g

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

11.3 Solución de biotina

Cuadro III. Fórmula para preparar solución de Biotina (Vogel, 1956).

Constituyentes:	Formula:	Cantidad:
3. Solución de Biotina	Biotina	5 mg/50 mL de agua destilada

12. ANEXO

12.1 Listado de hongos filamentosos estudiados por López-Franco y Bracker, (1996).

Hongo estudiados

Ascomicetos: Pirenomicetos

- Gelasinospora* sp. 1
- Gelasinospora* sp. 2
- Gibberella fujikuroi* (Swada) Ito
- Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr
- Neurospora crassa* Shear y Dodge
- Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary
- Sordaria fimicola* (Roberge ex Desmaz.) Ces. y De Not.

Ascomicetos: Loculoascomicetos

- Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) V. Arx y Olive
- Leptosphaerulina briosana* (Poll.) Graham and Luttrel

Deuteromicetos: Coleomicetos

- Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson

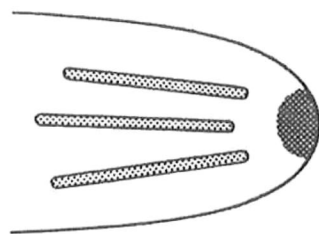
Hifomicetos

- Alternaria solani* Sorauer
- Aspergillus flavus* Link
- Aspergillus niger* van Tieghem
- Aspergillus tamarii* Kita
- Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi
- Bipolaris maydis* (Nisikado y Miyake) Shoemaker
- Bipolaris zeicola* (G. L. Stout) Shoemaker
- Exserohilum turcicum* (Pass.) K. J. Leonard y E. G. Suggs
- Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc.
- Fusarium demicellulare* Brick
- Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Fr.
- Galactomyces citri-aurantii* Butler
- Penicillium expansum* Link
- Trichoderma viride* Pers.: Fr.

Basidiomicetos

- Agaricus brunnescens* Peck
- Morchella deliciosa* Fr.
- Rhizoctonia solani* Kuehn (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk)
- Rhizoctonia cerealis* van der Hoeven
- (*Ceratobasidium cereale* Murria y Burpee)
- Sclerotium rolfsii* Sacc. (*Athelia rolfsii* (Cruzi Tu y Kimbrough))
- Trametes versicolor* (Fr.) Pilat

12.2 Representación esquemática y descripción de los tipos de *Spitzenkörper* de diferentes grupos de hongos filamentosos (López-Franco y Bracker, 1996).



Tipo 1: *Spitzenkörper* (Spk) oscuro, sin una región central ("Core") presente. *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, *A. brunnescens*, *Gaeumannomyces graminis* y *Trametes versicolor*.

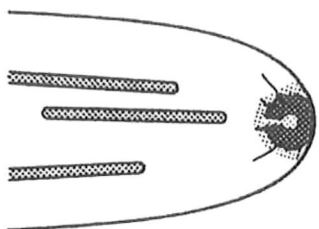
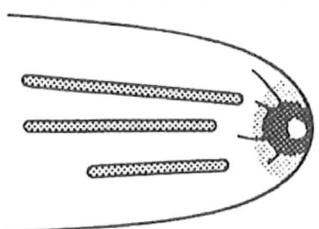
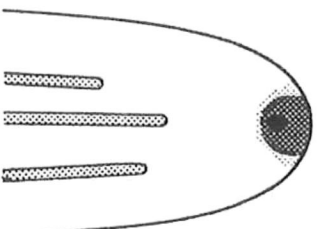


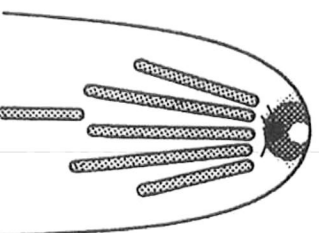
Figura 2: Spk oscuro y abierto de la parte posterior, con una región central extendiéndose a la parte posterior del conglomerado de vesículas. *Sclerotium rolfsii*.



Tipo 3: Spk oscuro rodeado por una nube de vesículas. Presenta una región central excéntrica y clara, usualmente orientado hacia el polo apical y filamentos. *Alternaria solai*, *Bipolaris maydis*, *B. zeicola*, *Exserohilum turcicum*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *Magnaporthe grisea* y *Trichoderma viride*.

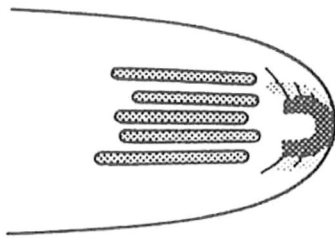


Tipo 4: Spk de color gris-oscuro con una ligera nube de vesículas. Presenta una región central excéntrica y oscura, localizado en la parte posterior del conglomerado de vesículas. *Aspergillus niger* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

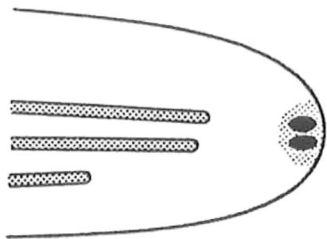


Tipo 5: Spk gris-oscuro, con dos regiones centrales: uno claro y orientado hacia el polo apical y el otro oscuro y orientado en la parte posterior del agregado de vesículas. *Galactomyces citri-aurantii* y *Morchella deliciosa*.

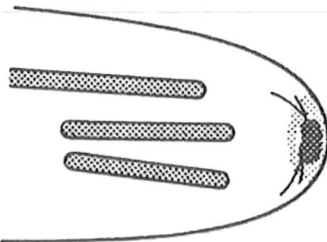
Continuación.



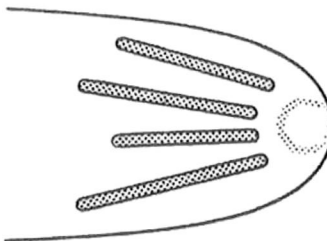
Tipo 6: Spk oscuro en forma de "U" rodeando una región central grande y clara. *Gelasinospora* sp., *Rhizoctonia cerealis* y *R. solani*.



Tipo 7: Spk gris-claro, conteniendo 2 o mas gránulos apicales y oscuros sin una región central presente. *Colletotrichum graminicola*, *C. magna* y *Leptosphaerulina briosana*



Tipo 8: Spk altamente pleomorfo. Regularmente aparece con un agregado de vesículas como una banda densa y oscura sin una nube de vesículas, y con una región central pequeña detrás del agregado de vesículas. *Neurospora crassa* y *Sordaria fimicola*.



Tipo 9: Spk con una región central grande y clara, rodeada por pequeñas vesículas apicales. *Allomyces macrogynus*.