

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**ORGANIZACIÓN Y DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE F-ACTINA DE  
*Neurospora crassa***

**Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta  
DIEGO LUIS DELGADO ÁLVAREZ**

**Ensenada, B. C., a agosto de 2008.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ORGANIZACIÓN Y DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE F-  
ACTINA DE *Neurospora crassa***

**TESIS PROFESIONAL**

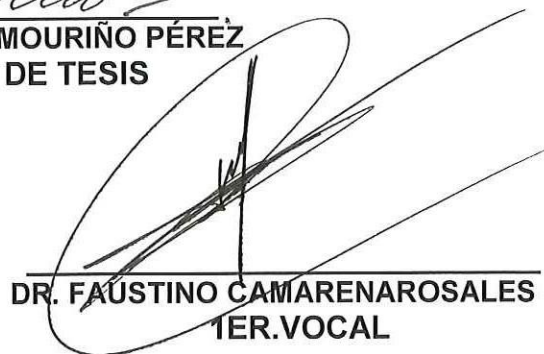
**QUE PRESENTA**

**DIEGO LUIS DELGADO ÁLVAREZ**

**Aprobado por**

  
**DRA. ROSA REYNA MOURIÑO PÉREZ**  
**DIRECTORA DE TESIS**

  
**DR. JOSÉ LUIS STEPHANO HORNEDO**  
**SECRETARIO**

  
**DR. FAUSTINO CAMARENAROSALES**  
**1ER.VOCAL**

## **Agradecimientos**

A la UABC y al CICESE, porque ahora no sólo soy un humano, soy un recurso humano.

A UC-MEXUS por su apoyo en la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Rosa Mouriño, porque después de 2 años conservó la paciencia y la cordura (creo).

Al profe Stephano, porque las pizzas de atún a las 3 de la mañana sí valieron la pena.

A Laurie Smith, Carolyn Rasmussen, Michael Freitag y Roby Roberson por su ayuda en la interpretación de resultados.

A todos los amigos, compillas, familiares, compañeros, colegas, camaradas, aliados, conocidos, hommies, colaboradores, coequiperos (cool, caja verde, pichilinguis, balonazo, des petits yeux dans la maison), eichhörchens, simpatizantes, contemporáneos y asociados, y sobre todo a quienes traslapan en las categorías anteriores (la magnitud del agradecimiento es directamente proporcional al número de traslapos).

***Dedicatoria***



Resumen de la tesis de Diego Luis Delgado Álvarez presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Agosto de 2008.

## **ORGANIZACIÓN Y DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE F-ACTINA DE *Neurospora crassa***

**Resumen aprobado:**



ÓRA. ROSA REYNA MOURINO PÉREZ

El citoesqueleto es un componente celular complejo y altamente dinámico cuyas funciones más reconocidas son dar forma y soporte a la célula. También está implicado en el transporte de vesículas y organelos, además de jugar un papel importante en la citocinesis, el movimiento de cromosomas, la endocitosis y la exocitosis. Está compuesto principalmente de las proteínas actina y tubulinas. La actina forma filamentos que se asocian principalmente a proteínas de unión a actina (ABPs), como fimbrina y tropomiosina, para formar estructuras más complejas.

Para la visualización del citoesqueleto de actina en hifas vivas y germínicas de *Neurospora crassa* se realizó microscopía confocal y de TIRF de cepas transformantes que expresan fimbrina unida a GFP y tropomiosina a RFP. La fimbrina se observó cerca de la corteza de la hifa formando parches, acumulados principalmente en el subápice celular, en tanto que la tropomiosina colocaliza con el Spk, y decora cables longitudinales en la región basal.

Los patrones que se observaron de cada proteína son muy diferentes, lo que sugiere que se asocian a dos poblaciones distintas de actina que realizan funciones diferentes. Se sugiere que la fimbrina está asociada a la población de actina responsable de la endocitosis, y tropomiosina a la actina encargada del tráfico de vesículas y exocitosis.

**Palabras clave:** actina, fimbrina, tropomiosina, confocal, TIRF, *Neurospora crassa*.

## **Abstract**

The cytoskeleton is a complex and highly dynamic cellular component whose most recognized functions are giving shape and support to the cell. It is implicated in vesicle and organelle transport, and is also a key element during cytokinesis, chromosome movement, endocytosis and exocytosis. The main components of the cytoskeleton are actin and tubulin. The actin forms microfilaments that associate mainly to actin binding proteins (ABPs), like fimbrin and tropomyosin, giving rise to more complex structures.

For the visualization of the actin cytoskeleton of live hyphae and germlings of the filamentous fungus *Neurospora crassa*, I performed confocal and TIRF imaging of two strains that express fimbrin-GFP and tropomyosin-RFP. Fimbrin was localized to cellular cortex forming patches, mainly in the subapical region, and tropomyosin was found colocalizing with the Spk in the apex and also decorating longitudinal cables in the basal region.

The contrasting patterns seen for each protein suggest that each one associates to a distinct actin population that performs a specific function. Based on the evidence it can be proposed that the actin population associated to fimbrin is responsible for endocytosis, and that the function for tropomyosin bound actin is vesicle transport and exocytosis.

**Key words:** actin, fimbrin, tropomyosin, confocal, TIRF, *Neurospora crassa*.

## **Tabla de contenido**

	<b>Página</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>3. Problema</b>	<b>11</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>13</b>
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos particulares	13
<b>5. Metodología</b>	<b>14</b>
5.1 Diseño metodológico	14
5.2 Organismos y condiciones de cultivo	14
5.3 Plásmidos	15
5.4 Construcción de los plásmidos pDD01, pDD02, pDD03, pDD04, pDD05, pDD06 y pMF350	16
5.5 Transformación de <i>N. crassa his-3</i>	25
5.6 Tinción de membranas con FM4-64	26
5.7 Observaciones de germínulas	26
5.8 Despolimerización de actina	27
5.9 Microscopía	27
5.9.1 Microscopía confocal	27
5.9.2 Microscopía de Fluorescencia por Reflexión Total Interna (TIRF)	28
5.10 Definición de regiones de la hifa	29
<b>6. Resultados</b>	<b>30</b>
6.1 Comparación del marcaje con sGFP de fimbrina y ABD2- sGFP	30
6.2 Distribución de tropomiosina y fimbrina en las regiones I y II de la hifa	31

6.3 Distribución de tropomiosina y fimbrina durante la ramificación lateral	34
6.4 Distribución de tropomiosina y fimbrina en la región basal de la hifa	37
6.5 Movilidad de parches de FIM-sGFP	40
6.6 Distribución de tropomiosina y fimbrina durante la formación de septos	42
6.7 Efecto de la despolimerización de los filamentos de actina en la distribución de tropomiosina y fimbrina	43
6.8 Distribución de tropomiosina y fimbrina en germínulas	46
<b>7. Discusión</b>	<b>48</b>
• Visualización de actina in vivo	48
• Hay dos poblaciones de actina	49
• Tropomiosina en el Spk	50
• Tropomiosina en cables	51
• Parches de fimbrina	52
• Movilidad de los parches	53
• Función de la fimbrina	54
• Efecto de la despolimerización de actina	55
• ABPs en los septos	55
• Actina asociada a núcleos	56
<b>8. Conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>9. Referencias</b>	<b>58</b>
<b>10. Apéndices</b>	<b>67</b>

## ***Lista de figuras***

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Esquema de plásmidos pMF272 y pMF334 (a) pMF272. Los flancos 3' his-3 y 5' his-3 permiten la integración por recombinación homóloga al sitio his-3, recuperando funcionalmente el gen. (Modificado de Freitag <i>et al.</i> , 2004), (b) pMF334 (Modificado de Freitag <i>et al.</i> , 2005)	<b>17</b>
<b>2</b>	Esquema de fimbrina y sus dos sitios de unión a actina, ABD1 y ABD2. Se señalan los dominios de homología a calponina (CH) ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a> )	<b>18</b>
<b>3</b>	Definición de regiones de la hifa. N = núcleos, Spk = Spitzenkörper, R = región.	<b>29</b>
<b>4</b>	Distribución de (a) FIM-sGFP y (b) ABD2-sGFP en la región subapical de hifas maduras. Escala = 5 $\mu$ m.	<b>30</b>
<b>5</b>	Distribución de dRFP-TPM-1. (a) Imagen confocal, (b) de contraste de fases y (c) composición de (a) y (b). La flecha indica la acumulación apical de tropomiosina. La cabeza de flecha señala el Spk. En (c) se observa la colocalización de tropomiosina con el Spk. Escala = 5 $\mu$ m.	<b>31</b>
<b>6</b>	Distribución de fimbrina marcada con sGFP. Imágenes confocales de (a) ABD2-sGFP, (b) tinción con FM4-64 y (c) Composición de (a) y (b). La flecha señala la acumulación subapical de ABD2-sGFP cerca de la membrana plasmática. La cabeza de flecha indica el Spk teñido con FM4-64. Escala = 10 $\mu$ m.	<b>32</b>
<b>7</b>	Diferentes planos focales y reconstrucción tridimensional del ápice de una hifa con ABD2-sGFP (a-f) rebanadas	<b>33</b>

	ópticas de 0.9 $\mu\text{m}$ de grosor, (g) reconstrucción tridimensional. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	
<b>8</b>	Distribución de dRFP-TPM-1 durante la ramificación. (a-e) Imágenes confocales y (f-j) imágenes de contraste de fases. Las flechas señalan la posición de la acumulación apical de tropomiosina y las cabezas de flecha señalan el Spk. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	<b>34</b>
<b>9</b>	Distribución de ABD2-sGFP durante la formación de una hifa lateral. (a-e) imágenes confocales y (f-j) imágenes por contraste de fases. La flecha indica la acumulación de fimbrina en el sitio donde se forma la rama lateral. Escala = 5 $\mu\text{m}$ .	<b>35</b>
<b>10</b>	Imagen confocal con ABD2-sGFP de una hifa líder y dos ramificaciones. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	<b>36</b>
<b>11</b>	Distribución de dRFP-TPM-1 en la región basal de una hifa. (a) Imagen confocal y (b) contraste de fases. La cabeza de flecha indica un región rica en parches. La flecha señala una zona con cables. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	<b>38</b>
<b>12</b>	Imágenes confocales de núcleos rodeados por dRFP-TPM-1 en la región basal de una hifa dRFP-TPM-1. Escala = 5 $\mu\text{m}$ .	<b>38</b>
<b>13</b>	Comparación de la distribución de la fluorescencia de FIM-sGFP por (a) microscopía confocal y (b) TIRFM. Escala = 5 $\mu\text{m}$ .	<b>39</b>
<b>14</b>	Movimiento de parches marcados con FIM-sGFP. Imágenes de TIRF. Las flechas verdes siguen un parche que se mueve de forma anterógrada. Las flechas rojas señalan un parche que se mueve retrógradamente.	<b>41</b>
<b>15</b>	Formación del septo marcado con dRFP-TPM-1. (a-f)	<b>42</b>

	imágenes confocales y (g-l) imágenes por contraste de fases. Las cabezas de flecha señalan la agregación de dRFP-TPM-1. Las flechas señalan la formación de un septo. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	
<b>16</b>	Localización de parches de fimbrina durante la formación de un septo. Imágenes confocales (a-f) ABD2-sGFP, (g-l) membranas teñidas con FM4-64, (m-q) composición de imágenes en el canal verde y rojo y (r-w) imágenes de contraste de fases. La flecha indica la agregación inicial de fimbrina en la pared de la hifa. La cabeza de flecha blanca señala la formación del septo. Las cabezas de flecha negra señala el septo cuando empieza a ser visible. Escala = 5 $\mu\text{m}$ .	<b>44</b>
<b>17</b>	Reconstrucción tridimensional de un septo. Suma de imágenes confocales de (a) ABD2-sGFP, (b) membranas teñidas con FM4-64 y (c) composición de (a) y (b). Se muestra la superposición de XX de rebanadas focales de 0.9 $\mu\text{m}$ de grosor. Escala = 5 $\mu\text{m}$ .	<b>45</b>
<b>18</b>	Efecto de la despolimerización del citoesqueleto de actina en la distribución de tropomiosina y fimbrina. (a) dRFP-TPM-1 y (b) FIM-sGFP. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	<b>46</b>
<b>19</b>	Reconstrucción bidimensional de una germínula dRFP-TPM-1. Escala = 5 $\mu\text{m}$ .	<b>46</b>
<b>20</b>	Distribución de parches de ABD2-sGFP en germínulas. Escala = 5 $\mu\text{m}$ .	<b>47</b>
<b>21</b>	Reconstrucción tridimensional de una germínula ABD2-sGFP. Membranas teñidas con FM 4-64. Escala = 5 $\mu\text{m}$ .	<b>47</b>
<b>22</b>	Modelo de distribución de proteínas de unión a actina.	<b>53</b>

## ***Lista de tablas***

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>I</b>	Cepas de <i>N. crassa</i> y <i>E. coli</i> utilizadas en este estudio.	<b>15</b>
<b>II</b>	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes <i>fim</i> , <i>abd1</i> , <i>abd2</i> y <i>tpm-1</i> .	<b>19</b>
<b>III</b>	Condiciones de amplificación de <i>fim</i> , <i>abd1</i> y <i>abd2</i> .	<b>20</b>
<b>IV</b>	Plásmidos creados para este trabajo.	<b>24</b>
<b>V</b>	Resumen de resultados.	<b>56</b>

## ***Lista de Videos***

<b>Video</b>	
<b>1</b>	Ápices y septos
<b>2</b>	Domo apical
<b>3</b>	Ramificación
<b>4</b>	Formación de septos
<b>5</b>	Septo
<b>6</b>	TIRF

## **1. Introducción**

El citoesqueleto es un complejo arreglo de proteínas que al polimerizarse forman cables o filamentos que sirven de soporte a la célula. Sus componentes principales son los microtúbulos, los microfilamentos de actina y los filamentos intermedios, además de una gran cantidad de proteínas asociadas a cada uno de ellos. Inicialmente al citoesqueleto se le atribuía principalmente la función de dar soporte a la célula, aunque esta idea ha ido cambiando con base en nuevos descubrimientos acerca de su estructura y dinámica (Small et al., 1999; Dos Remedios et al., 2003; Lodish et al., 2004, Smith y Oppenheimer, 2005).

La actina es una proteína altamente conservada y la más abundante en células eucarióticas. Puede encontrarse de forma monomérica, llamada G-actina (42 kD), o polimerizada formando filamentos (F-actina) de 7 nm de grosor. Cada monómero de actina tiene una hendidura con un sitio de alta afinidad a adenosín tri-fosfato (ATP), por medio de la hendidura se une a otro monómero. El extremo del filamento donde los sitios de unión a ATP están expuestos es considerado como el polo negativo (-), y el extremo opuesto es el positivo (+). La polimerización de actina ocurre en el extremo (+), donde está expuesto el lado opuesto a la hendidura del último monómero del filamento. La formación de estructuras específicas de filamentos de actina y la regulación de su polimerización y

despolimerización hacen del citoesqueleto una estructura altamente dinámica (Dos Remedios et al., 2003; Lodish et al., 2004, Walker y Garrill, 2005).

La conformación que adopta el citoesqueleto de actina depende de su interacción con proteínas de unión a actina (ABP por sus siglas en inglés). La especificidad del proceso celular en el que participa la F-actina depende de la configuración que adopte (Dos Remedios et al., 2003).

Existen diversas familias de ABPs, una de ellas es la de las proteínas que contienen la secuencia de homología a la calponina (CH). Dentro de esta familia se encuentra la fimbrina, que posee dos sitios de unión a actina, formados por dos dominios CH cada uno. Los sitios de unión a actina de fimbrina provocan que se formen haces gruesos de actina debido al entrelazamiento de éstos (Dos Remedios et al., 2003, Wang et al., 2004, Lodish et al., 2004).

La tropomiosina es una proteína de unión a actina que fue descrita inicialmente en el sistema de contracción muscular, como regulador de la unión de miosinas a los filamentos de actina. Promueve la formación de estructuras específicas del citoesqueleto de actina, mantiene la identidad bioquímica entre poblaciones distintas de microfilamentos, evita la despolimerización de los microfilamentos y regula la unión de miosina a filamentos de actina. En células eucarióticas es componente del anillo de

actomiosina que actúa en la citocinesis. (Bi et al., 1998; Dos Remedios et al., 2003; Walther y Wendland, 2003; Lodish et al., 2004; Gunning, 2008).

En hongos se ha destacado la importancia que tiene el citoesqueleto de actina en distintos procesos celulares, entre los que se encuentran la morfogénesis, división celular, la citocinesis y la septación (Walther y Wendland, 2003; Walker y Garrill, 2005). *Neurospora crassa* es un hongo filamentosos que ha sido utilizado ampliamente como organismo de estudio. Algunas de las ventajas que presenta son que durante la mayor parte de su ciclo de vida es haploide, puede ser heterocarión, es fácil obtener cruza, su genoma ha sido secuenciado y está disponible en la red y se cuenta con plásmidos que permiten el marcaje de proteínas de interés con proteínas fluorescentes (Davis, 2000; Borkovich et al., 2004; Freitag et al., 2004; Freitag y Selker, 2005; Gladfelter, 2006).

Estas herramientas permitieron la realización de este trabajo, en el que se describe la localización y dinámica del citoesqueleto de actina en germínulas e hifas maduras de este hongo mediante el marcaje molecular de dos proteínas de unión a actina. Se generaron plásmidos que se integran al genoma del hongo y que funcionan como marcadores auxotróficos a histidina (Freitag et al., 2004).

Se utilizó una estrategia para la visualización indirecta del citoesqueleto de actina, por medio de la fusión de proteínas de unión a actina tropomiosina a la proteína roja fluorescente (dRFP) y fimbrina a la

proteína verde fluorescente (sGFP). Se analizaron los patrones de fluorescencia mediante microscopía confocal y de fluorescencia por reflexión total interna (TIRFM).

Se encontró que cada proteína se distribuye de manera particular, lo que sugiere la presencia de al menos dos poblaciones discretas de actina en las células de *N. crassa*. La relevancia de este trabajo radica en que esta es la primera descripción in vivo del citoesqueleto de actina de *N. crassa*. La información obtenida puede extrapolarse a otros sistemas biológicos, desde levaduras y otros hongos, hasta plantas y mamíferos.

## **2. Antecedentes**

En células vegetales y levaduras los filamentos de actina sirven como vías por las que se mueven vesículas (transportadas por miosinas) que se originan en el aparato de Golgi (Geitmann y Emons, 2000; Smith y Oppenheimer, 2005), mientras que en el hongo *Saprolegnia ferax* se ha descrito que el tráfico vesicular ocurre a través de microtúbulos (McDaniel y Roberson, 2000).

El crecimiento polarizado ocurre cuando la fusión de vesículas se lleva a cabo en un sitio localizado de la corteza. El resultado de este tipo de crecimiento es la formación de células tubulares que se extienden apicalmente. Ejemplos de este tipo de células son las neuronas, algunas células vegetales (tubos de polen y rizomas) y fúngicas (levaduras e hifas) (Bartnicki-García y Lippman, 1977). En hongos filamentosos el crecimiento apical se ha relacionado con una estructura conocida como Spitzenkörper (Spk) que se encuentra en el ápice de la hifa. Está formado por una acumulación de vesículas que se liberan de forma aleatoria en todas direcciones desde el ápice hacia la membrana plasmática. La posición del Spk determina la dirección de crecimiento y por lo tanto la morfogénesis de la hifa (Bartnicki-García, 1995; López-Franco y Bracker, 1996; Gierz y Bartnicki-García, 2000).

Se ha propuesto que el Spk funciona como un centro suministrador de vesículas, en donde vesículas que inicialmente viajan a través de microtúbulos desde zonas más viejas de la hifa son retenidas en el ápice. En el Spk las vesículas cambiarían de carril (de microtúbulos a microfilamentos de actina) para ser enviadas a la corteza celular, donde liberan enzimas de síntesis de pared celular al fusionarse con la membrana plasmática (Bartnicki-García y Lippman, 1977, Bartnicki-García, 2002, Harris et al., 2005). Esta hipótesis se fundamenta en los reportes que describen la localización de actina en el Spk de distintos hongos filamentosos (Howard, 1981; Bourett y Howard, 1991; Hasek y Bartnicki-García, 1994; Virag y Griffiths, 2004, Taheri-Talesh et al., 2008).

La correlación entre la actina y el crecimiento polarizado sugiere que la polimerización de actina, además de ser responsable de la forma de la hifa y de la secreción de enzimas, es un iniciador del crecimiento (Torralba et al., 1998). Cuando se induce el crecimiento apical la expresión de los genes de actina y la concentración de la proteína no aumenta considerablemente (Brunt et al., 1998; Tinsley et al., 1998), de lo que se concluye que la polimerización y el re-arreglo de actina previamente sintetizada, y no la expresión y síntesis de nueva actina es lo que propicia el crecimiento. La polimerización de la actina no funcionaría como un morfógeno sino que formaría parte de un sistema que es regulado de otra forma (Virag y Griffiths, 2004).

En rizomas y tubos de polen se ha descrito que los filamentos de actina forman cables longitudinales que corren a lo largo de toda la célula; también se ha observado un cúmulo denso de F-actina en el subápice, pero no en el ápice extremo (Miller et al., 1996, Kost et al., 1998, Miller et al., 1999, Geitmann y Emons, 2000, Ketelaar et al., 2002, Wang et al., 2004; Smith y Oppenheimer, 2005). El tratamiento con drogas despolimerizadoras de actina afecta el crecimiento de la célula, pero sin alterar el flujo de vesículas. Los tratamientos resultan en alteraciones de la actina subapical y apical, pero no en los filamentos longitudinales (Miller et al. 1999, Gibbon et al. 1999; Smith y Oppenheimer, 2005).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se reconocen tres estructuras formadas por actina: parches, cables y anillos. Los parches de actina fueron descritos en estudios realizados en mutantes con defectos en la endocitosis (Adams y Pringle, 1984; Kübler y Riezman, 1993; Geitmann y Emons, 2000; Moseley y Goode, 2006). Posteriormente, por medio de observaciones in vivo con GFP unida a los componentes de los parches se describió que éstos son altamente móviles (Doyle y Botstein, 1996; Carlsson et al., 2002; Yang y Pon, 2002; Kaksonen et al., 2003; Huckaba et al., 2004).

En hifas de hongos filamentosos se ha observado que la actina se encuentra en la región basal formando parches y cables intercalados, mientras que en el ápice se agrupa formando parches. En contraste, en los

hongos Oomycetos la acumulación de actina apical no forma parches, sino que está dispersa (Heath, 1987; Bartnicki-García, 2000; Geitmann y Emons, 2000; Heath et al., 2000; McDaniel y Roberson, 2000; Taheri-Talesh et al., 2008; Upadhyay y Shaw, 2008).

La distribución de F-actina mencionada se basa en las descripciones de *Mucor rouxii* (Sabanero y Zazueta, 1989), *Achlya bisexualis* (Harold y Harold, 1992), *Magnaporthe grisea* y *Trichoderma viride* (Czymmek et al., 1996) y *A. nidulans* (Tanabe y Kamada, 1996; Torralba et al., 1998; Geitmann y Emons, 2000; Upadhyay y Shaw, 2008; Taheri-Talesh, 2008). En estos trabajos se realizaron observaciones en hifas fijadas y teñidas con rodamina-faloidina, inmunolocalización y con proteínas fluorescentes. Los diferentes patrones encontrados entre estos organismos se deben en parte a la utilización de diferentes técnicas (Harold y Harold, 1992; Virag y Griffiths, 2004). Mediante microscopía electrónica se ha descrito la presencia de filamentos en el Spk de *Fusarium acuminatum*, *M. grisea* y *M. rouxii* (Howard, 1981; Bourett y Howard, 1991; Hasek y Bartnicki-García, 1994). La tropomiosina fusionada con GFP ha sido utilizada como reportero del citoesqueleto de actina en *A. nidulans*, donde se observó en el ápice de las hifas (Li et al., 2006, Taheri-Talesh et al., 2008).

En hongos filamentosos se ha demostrado que el citoesqueleto de actina es esencial para el crecimiento apical y la morfogénesis de la célula. En hifas de *Gibbertella persicaria* y *A. nidulans* tratadas con citocalasina A

(CA) y *S. ferax* y *N. crassa* con latrunculina B se interrumpe el crecimiento apical y se forman puntas bulbosas (Grove y Sweigard, 1980; Grove y Sweigard 1996; Gupta y Heath, 1997; Bachewich y Heath, 1998; Riquelme et al., 1998; Torralba et al., 1998; Heath et al., 2000; Virag y Griffiths, 2004). Las deformaciones causadas por las drogas inhibidoras de actina se producen cuando la porción afectada es parte de la hifa en crecimiento. El efecto de la inhibición no siempre es persistente, debido a que la hifa deja de crecer por completo o la respuesta al inhibidor cesa (Torralba et al., 1998 y Bartnicki-García, 2002, Taheri-Talesh et al., 2008).

A pesar de los trabajos hasta ahora realizados, sigue existiendo controversia en cuanto a la localización precisa de actina en *N. crassa*. Mediante la tinción de actina con fluoresceína-faloidina se muestra una acumulación poco definida en forma de capucha que ocupa todo el ápice y subápice de la hifa (Barja et al., 1991). Por inmunolocalización se describió que la actina se ubica en el ápice coincidiendo con el Spk y en el subápice formando "placas" (Heath et al., 2000). Sin embargo, también se ha descrito por medio de esta misma técnica la presencia de actina colocalizando exclusivamente con el Spk de hifas maduras de *N. crassa* (Virag y Griffiths, 2004).

En *N. crassa* se describió que en hifas tratadas con CA aumenta la frecuencia de ramificación, y al aumentar la concentración de la droga, la hifa crece isotrópica e irregularmente (Allen et al., 1980, Virag y Griffiths,

2004). La mutación del gen de actina provoca un fenotipo muy similar al que resulta del tratamiento con CA. Se altera el patrón de ramificación, la posición del Spk y por lo tanto la forma de la hifa. El inmunomarcaje de la actina mutante revela que ésta se encuentra desplazada del ápice formando una capucha subapical en la misma posición que el Spk, lo que sugiere que la actina se relaciona directamente con el Spk y por lo tanto con la morfogénesis (Virag y Griffiths, 2004).

### **3. Problema**

Los estudios sobre la localización del citoesqueleto de actina durante el desarrollo de plantas y hongos se han realizado principalmente por medio de observaciones de muestras fijadas marcadas por medio de drogas de unión a actina con fluoróforos acoplados e inmunofluorescencia (Sabanero y Zazueta, 1989, Harold y Harold, 1992, Czymmek *et al.*, 1996, Tanabe y Kamada, 1996; Torralba *et al.*, 1998; Small *et al.*, 1999). Ningún método de marcaje y observación es completamente infalible y debido a que la actina es una proteína especialmente difícil de conservar durante la fijación, es muy probable que los patrones reportados para plantas y hongos sean artefactos de la fijación (Geitmann y Emons, 2000; Virag y Griffiths, 2004; Smith y Oppenheimer, 2005).

La expresión de proteínas fluorescentes fusionadas a proteínas de interés ha sido una herramienta ampliamente utilizada para observar su localización en células vivas. En tubos de polen y raíces de plantas se ha logrado observar *in vivo* el citoesqueleto de actina mediante la expresión transitoria de construcciones de proteínas de unión a actina (talina de ratón, fimbrina de *Arabidopsis thaliana* y versiones truncadas de fimbrina) fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP). Esta estrategia ha resultado exitosa para describir la organización de los microfilamentos de actina durante la morfogénesis de células vegetales con crecimiento apical

(Kost et al., 1998; Small *et al.*, 1999; Wang et al., 2004; Sheahan et al., 2004). En el hongo filamentoso *A. nidulans* se han realizado fusiones de tropomiosina y fimbrina a GFP (Taheri-Talesh et al., 2008, Upadhyay y Shaw, 2008).

Para la expresión de proteínas fluorescentes en *N. crassa* se han desarrollado plásmidos integrativos, que permiten la unión de genes de interés a sGFP y dRFP por medio de un amplio sitio de clonación múltiple (Fig. 1) (Freitag et al., 2004, Freitag y Selker, 2005). La transformación de *N. crassa* con estos plásmidos integrativos presenta una gran ventaja sobre las transformaciones en células vegetales, donde la expresión de proteínas fluorescentes es transitoria (Kost et al., 1998, Wang et al., 2004). De la misma forma, la expresión de proteínas de unión a actina que expresan proteínas fluorescentes sería una buena estrategia para estudiar *in vivo* la dinámica y organización de la F-actina en hifas de *N. crassa* en crecimiento.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Observar *in vivo* la organización y dinámica del citoesqueleto de actina del hongo filamentoso *N. crassa* por medio de su marcaje indirecto con fimbrina (FIM-sGFP y los sitios de unión a actina (ABD1 y ABD2 a sGFP) y dRFP-tropomiosina (dRFP-TPM-1).

### **4.2 Objetivos particulares:**

- Comparar la eficiencia de marcaje entre FIM-sGFP, ABD1-sGFP y ABD2-sGFP.
- Describir *in vivo* la localización y dinámica de las fusiones dRFP-tropomiosina (dRFP-TPM-1), fimbrina-sGFP (FIM-sGFP), ABD1-sGFP y ABD2-sGFP.
- Describir la dinámica de la tropomiosina y la fimbrina en hifas tratadas con citocalasina A.

## **5. Metodología**

### **5.1 Diseño metodológico**

El marcaje con proteínas fluorescentes de las proteínas de unión a actina se realizó por medios moleculares. La tropomiosina (TPM-1) se fusionó a la Proteína Roja Fluorescente dimérica (dRFP); la fimbrina completa (FIM) y los fragmentos de unión 1 y 2 a actina de la fimbrina (ABD1 y ABD2) se fusionaron a la Proteína Verde Fluorescente (sGFP).

Los genes *tpm-1*, *fim*, y las fracciones *abd1* y *abd2* se clonaron en plásmidos integrativos que contienen los genes de las proteínas fluorescentes. Estos plásmidos sirven como marcadores auxotróficos que permiten la selección de colonias transformantes de *N. crassa*. Los patrones de fluorescencia de las proteínas marcadas se analizaron por medio de diferentes técnicas de microscopía de fluorescencia, tanto en hifas maduras como germínulas del hongo. Se realizaron observaciones de hifas maduras sometidas a tratamiento con citocalasina A para observar el efecto de la despolimerización de los filamentos de actina en sus proteínas de unión.

### **5.2 Organismos y condiciones de cultivo**

En total se utilizaron 6 cepas de *N. crassa* y una de *Escherichia coli* (Tabla I). Todas las cepas de *N. crassa* se cultivaron a 28 °C en Medio Mínimo

de Vogel (MMV)-agar (1.5 %) y líquido. La cepa FGSC #9717 se cultivó en MMV enriquecido con histidina (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Para optimizar la germinación de conidias de *N. crassa* sometidas a electroporación se incubó en Medio de Regeneración a 30 °C y después se sembró en medio FIGS-agar (1 %), y se incubó a 28 °C. *E. coli* se cultivó en los medios Luria Bertani (LB)-agar (1.5 %) y líquido con ampicilina (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) a 37 °C.

**Tabla I.** Cepas de *N. crassa* y *E. coli* utilizadas en este estudio.

Nombre	Genotipo	Referencia
<i>N. crassa</i> tipo silvestre	<i>mat a</i>	FGSC #2489
<i>N. crassa</i> $\Delta\text{mus}$ , <i>his-3</i>	<i>mat A</i> $\Delta\text{mus-51}::\text{bar}^+$ ; <i>his-3</i>	FGSC #9717
<i>N. crassa</i> dRFP-TPM	<i>mat a his</i> <sup>+</sup> :: <i>Pccg-1-drfp</i> :: <i>tpm-1</i>	Este estudio (914-2)
<i>N. crassa</i> ABD1-sGFP	<i>mat a his</i> <sup>+</sup> :: <i>Pccg-1-abd1</i> :: <i>sgfp</i>	Este estudio (TDD04)
<i>N. crassa</i> ABD2-sGFP	<i>mat a his</i> <sup>+</sup> :: <i>Pccg-1-abd2</i> :: <i>sgfp</i>	Este estudio (TDD05)
<i>N. crassa</i> FIM-sGFP	<i>mat a his</i> <sup>+</sup> :: <i>Pccg-1-fim</i> :: <i>sgfp</i>	Este estudio (TDD06)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$\phi\text{80dlacZ}\Delta\text{M15}$	Promega®

### 5.3 Plásmidos

Los cassettes de transformación pDD04, pDD05 y pDD06 de *N. crassa* se construyeron a partir del plásmido integrativo pMF272 (8, 479 pb). Este plásmido contiene el gen de la enzima  $\beta$ -lactamasa, lo que permite la selección de colonias transformadas positivas de *E. coli*. Contiene el sitio de clonación múltiple *Xba*I, *Spe*I, *Bam*HI, *Xma*I, *Pac*I para la fusión del gen de interés al extremo 5' del gen de *sgfp*. La expresión de la fusión depende del promotor inducible *Pccg-1* de *N. crassa*. Además, contiene una secuencia truncada del gen *his-3* ( $\Delta\text{his-3}$ ), lo que permite la integración por recombinación homóloga

de la región del plásmido que contiene la fusión al genoma de la cepa de *N. crassa* con la mutación de *his-3* (Fig. 1 a).

El plásmido pMF334 posee el sitio de clonación múltiple *AscI*, *SpeI*, *MluI*, *FseI*, *BglII*, *XbaI*, que permite integrar el inserto en el extremo 3' de la dRFP. Al igual que pMF272, contiene el promotor *Pccg-1*, los flancos 3' *his-3* y 5'  $\Delta$ -*his-3*, y el gen de  $\beta$ -lactamasa (Fig. 1 b).

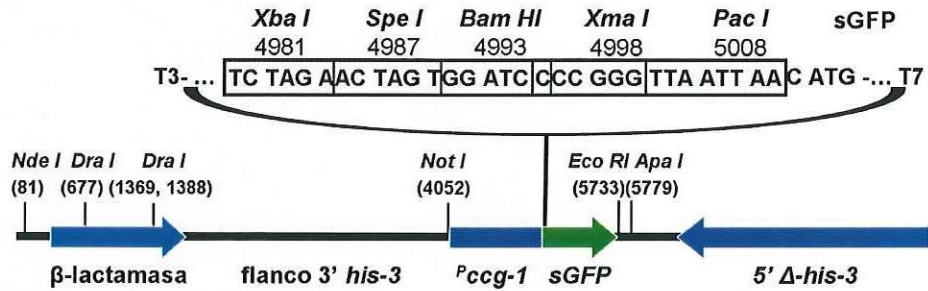
Los plásmidos para transformación de *N. crassa* generados en este estudio fueron pDD04, pDD05 y pDD06, que fueron creados clonando los fragmentos *abd1*, *abd2* y fimbrina completa a pMF272, respectivamente. Los plásmidos pDD01, pDD02 y pDD03 se realizaron clonando *abd1*, *abd2* y fimbrina completa a pGEM<sup>®</sup>. El plásmido pMF350 (9339 pb) se generó clonando el gen de tropomiosina (*tpm-1*) a pMF334 (Tabla IV).

#### **5.4 Construcción de los plásmidos pDD01, pDD02, pDD03, pDD04, pDD05, pDD06 y pMF350**

La secuencia del gen de fimbrina (*fim*) se consultó la base de datos de *N. crassa* del Instituto Broad (<http://www.broad.mit.edu/>). El gen de la fimbrina pertenece al grupo de unión V, ocupa el locus NCU03992.3 y está formado por 2, 219 pares de bases.

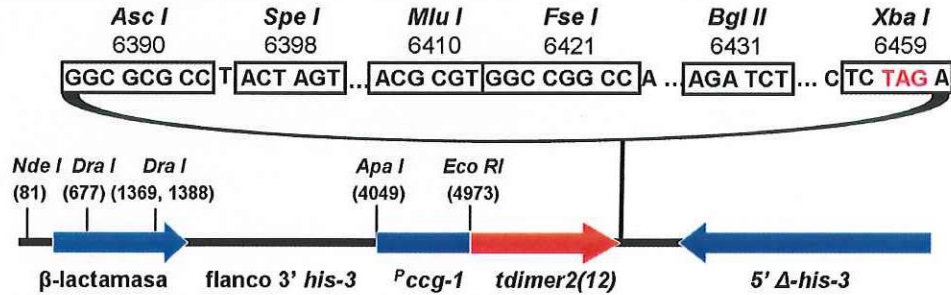
a

pMF272 (*Pccg-1-sGFP*) 8479 pb



b

pMF334 (*Pccg-1-dRFP*) 9177 pb

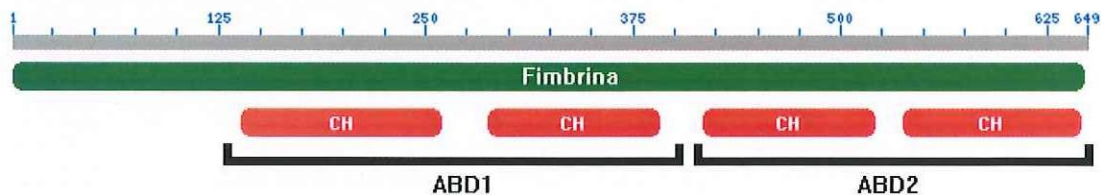


**Figura 1.** Esquema de plásmidos pMF272 y pMF334 (a) pMF272. Los flancos 3' his-3 y 5' his-3 permiten la integración por recombinación homóloga al sitio his-3, recuperando funcionalmente el gen. (Modificado de Freitag *et al.*, 2004), (b) pMF334 (Modificado de Freitag *et al.*, 2005)

La fimbrina contiene dos sitios de unión a actina (ABD), formados por dos dominios de homología a calponina (CH) cada uno. Para determinar la

posición de los sitios de unión a actina se realizó una búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Fig. 2).

La secuencia de fimbrina con intrones se utilizó para diseñar oligonucleótidos (Tabla II) para la amplificación de *fim* (2, 219 pb) y dos versiones truncadas (*abd1* y *abd2*), de 770 y 812 pb respectivamente. El *abd1* inicia en la base 361 y termina en la 1, 130 y el *abd2* desde la base 1, 408 a la 2, 219. El codón de paro TAG fue eliminado de *fim* y *abd2* y el codón de inicio ATG se añadió a las dos versiones truncadas.



**Figura 2.** Esquema de fimbrina y sus dos sitios de unión a actina, ABD1 y ABD2. Se señalan los dominios de homología a calponina (CH) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Los oligonucleótidos sentido contenían en el extremo 5' la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *XbaI* (TCTAGA), y en el extremo 5' de los oligonucleótidos antisentido se incluyó la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *PacI* (TTAATTAA), con el propósito de dirigir la

ligación de los genes al sitio de clonación múltiple de pMF272. La digestión de ambas enzimas deja extremos cohesivos.

**Tabla II.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *fim*, *abd1*, *abd2* y *tpm-1*.

Gen	Nombre	Secuencia	Secuencia de corte
<i>fim</i>	ODD1	GCTCTAGAATGAATGTCCTCAAGATCCAG	<i>Xba</i> I
	ODD2	CCTTAATTAAGGCGCCTTG	<i>Pac</i> I
<i>abd1</i>	ODD3	CTCTAGAATGTTCTTGAAGGCCACCCAGGTC	<i>Xba</i> I
	ODD4	CCTTAATTAAGGCGCCTTG	<i>Pac</i> I
<i>abd2</i>	ODD5	CTCTAGAATGGAGAAGCTTGAGGTCGAG	<i>Xba</i> I
	ODD6	CCTTAATTAAGGCGCCTTG	<i>Pac</i> I
<i>tpm-1</i>	tropNBgl	GCCAGATCTACAATGGACCGCATCAAGGAGAAA	<i>Bgl</i> II
	tropNXba	GCCTCTAGATTAGATGTTGGCAATATCAGCCTG	<i>Xba</i> I

Los genes *fim*, *abd1* y *abd2* se amplificaron utilizando como template DNA genómico de *N. crassa* tipo silvestre (FGSC #2489). Para extraer DNA se cultivó *N. crassa* por una semana en MMV líquido a 28 °C en reposo. El micelio se filtró y se mantuvo por 12 h a -68 °C. Después se sumergió en nitrógeno líquido y se maceró hasta que se obtuvo un polvo fino. La extracción del DNA se realizó con el kit de extracción de DNA genómico para plantas de QUIAGEN®.

El gen *fim* (2, 216 pb), así como las versiones truncadas *abd1* (770 pb) y *abd2* (812 pb) se amplificaron por medio de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el sistema Platinum® PCR Supermix (22 U ml<sup>-1</sup>, Tris-HCl

(pH 8.4) 22 mM, KCl 55 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.65 mM, dGTP 220 μM, dATP 220 μM, dTTP 220 μM, dCTP 220 μM) de Invitrogen<sup>®</sup>, que utiliza la enzima de alta fidelidad T<sub>aq</sub> Polimerasa. Las concentraciones finales de oligonucleótidos se usaron a 200 nM. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Apollo<sup>®</sup> ATC 401 de Nyxtechnik<sup>®</sup> bajo las condiciones que se enlistan en la Tabla III.

**Tabla III.** Condiciones de amplificación de *fim*, *abd1* y *abd2*

1 ciclo	Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
	Desnaturalización	94 °C	30 s
30 ciclos	Alineamiento	55 °C <i>fim</i> 58 °C <i>abd1</i> 55 °C <i>abd2</i>	30 s
	Extensión	72 °C	2:30 min <i>fim</i> 1 min <i>abd1</i> y <i>abd2</i>
1 ciclo	Extensión final	72 °C	5 min

El tamaño de los fragmentos amplificados fue corroborado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (100 μg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio).

La enzima T<sub>aq</sub> Polimerasa utilizada para la amplificación añade timidinas a los extremos 5' del producto de PCR, lo que permitió su clonación al plásmido pGEM<sup>®</sup> con el sistema pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega<sup>®</sup>). La clonación se realizó inmediatamente después de la amplificación. De esta forma se almacenaron los genes para su posterior digestión.

Las ligaciones pGEM::*fim*, pGEM::*abd1* y pGEM::*abd2* (llamados pDD01, pDD02, pDD03) (Tabla IV) se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  por medio de choque térmico; para esto se descongelaron en hielo alícuotas de 55  $\mu$ l de células competentes y se mezclaron con 5  $\mu$ l de cada producto de ligación. La mezcla se incubó en hielo por 40 min y se sometió a un choque térmico de 42 °C por 2 min, seguido de 2 min en hielo. Se añadieron 940  $\mu$ l de LB líquido precalentado a 37 °C a cada transformación y se incubaron por una hora a 37 °C en agitación a 200 rpm. Las células transformadas se inocularon en placas de LB-agar con ampicilina (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Las placas contenían Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor y X-Gal como sustrato indicador. Las placas se incubaron por 12 h a 37 °C. La ligación de inserto en el vector pGEM interrumpe la secuencia que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. La  $\beta$ -galactosidasa al digerir el X-Gal produce un precipitado azul, que permite discriminar colonias transformadas por plásmidos autoligados. Las colonias blancas son aquellas que fueron transformadas por plásmidos con el inserto de interés (Promega<sup>®</sup>, 2007). Se seleccionaron colonias positivas blancas para extracción de plásmido.

El DNA plasmídico de cada colonia positiva se extrajo por medio de lisis alcalina y se precipitó con etanol. Una colonia positiva se seleccionó y se cultivó en LB líquido con ampicilina (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) por 12 h en agitación a 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 13, 200 rpm y el precipitado se resuspendió en 100  $\mu$ l de solución P1 (Tris-HCl pH 8, 50 mM; EDTA 10mM y RNAasa a 0.1 mg

ml<sup>-1</sup>) e inmediatamente se añadieron 150 µl de solución P2 (NaOH 200 mM y SDS 1 %). Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se neutralizó añadiendo 200 µl de solución P3 (acetato de Potasio 3M pH 5.5). Se centrifugó a 13, 200 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante, al cual se le añadieron dos volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó por 30 min a -20 °C y después se centrifugó a 13, 200 rpm durante 5 min. El DNA plasmídico aparecía como un precipitado blanco. El etanol absoluto se eliminó y el DNA se lavó con etanol 70 % y se centrifugó por 5 min a 13, 200 rpm. El sobrenadante se decantó y el precipitado se dejó secar a 30 °C por 20 min en un concentrador. El DNA se resuspendió en 50 µl de agua estéril libre de nucleasas y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (100 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio) para comprobar por tamaño la presencia de los plásmidos.

Los plásmidos pDD01, pDD02, pDD03 y pMF272 fueron digeridos con las enzimas *Xba*I y *Pac*I de New England Biolabs® (NEB). A las reacciones de digestión se añadió Albúmina de Suero Bovino de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. A la digestión de pMF272 se le adicionó 1 µl de fosfatasa alcalina de camarón (NEB) después de 2 h de digestión para evitar su autoligación. Las reacciones se incubaron por 3 h a 37 °C y después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (100 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio) para purificar los genes y el plásmido pMF272 linearizado. Las

bandas útiles se purificaron utilizando el kit de purificación de gel Wizard® SV PCR and Gel Purification Kit (Promega®).

Cada uno de los fragmentos *abd1*, *abd2* y *fim* purificados se incubaron junto con el vector pMF272 con 3 U de ligasa por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente a 4 °C por 12 h.

El producto de cada ligación se utilizó para la transformación por choque térmico de células competentes de *E. coli* de acuerdo al procedimiento ya descrito, y enseguida se sembraron en LB-agar con ampicilina (100 µg ml<sup>-1</sup>).

Las placas con mayor número de colonias positivas de cada construcción (pMF272-*fim*, pMF272-*abd1* y pMF272-*abd2*) se seleccionaron para corroborar por PCR de colonia la presencia del inserto.

De cada placa se seleccionaron 10 colonias al azar. Los genes de interés se amplificaron utilizando la Polimerasa GoT<sub>aq</sub><sup>TM</sup> (Promega®). La mezcla de reacción contenía MgCl<sub>2</sub> (2 mM), mezcla de nucleótidos (5 mM), oligonucleótidos (200 mM). Con un palillo estéril se añadió ~1 µl de cada colonia para utilizarse como DNA template. Como control positivo se usó DNA genómico de *N. crassa* silvestre y de control negativo pMF272. La PCR se realizó con las condiciones enlistadas en la Tabla III. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % (100 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio).

Una colonia positiva de cada fragmento se seleccionó y se inoculó en 10 ml de LB líquido con ampicilina (100 µg ml<sup>-1</sup>). El cultivo se incubó a 37 °C por

12 h en agitación a 200 rpm. Los plásmidos se purificaron por lisis alcalina, como fue descrito anteriormente.

Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con las enzimas *XbaI* y *PacI* por 2 h a 37 °C para liberar el inserto y corroborar que el marco abierto de lectura estuviera intacto. Se realizó una electroforesis en gel de azarosa al 1 % (100 µg ml<sup>-1</sup> bromuro de etidio); en las tres digestiones se observó una banda de 8.5 Kb correspondiente al pMF272 y una banda que correspondía al inserto esperado (2.2 Kb para *fim*, 770 para *abd1* y 812 pb para *abd2*). Los plásmidos producidos fueron denominados pDD04 (*abd1::sgfp*), pDD05 (*abd2::sgfp*) y pDD06 (*fim::sgfp*) (Tabla IV).

El plásmido pMF350 fue generado a partir de la clonación del gen de tropomiosina (486 pb) al vector pMF334 (9177 pb), después de digestión con *BglII* y *XbaI*. La construcción de este plásmido se realizó en el laboratorio del Dr. Michael Freitag en la Universidad Estatal de Oregon en Corvallis, Oregon.

**Tabla IV.** Plásmidos creados para este trabajo.

Ligación	Plásmido	Fusión
pGEM + <i>abd1</i>	pDD01	---
pGEM + <i>abd2</i>	pDD02	---
pGEM + <i>fim</i>	pDD03	---
pMF272 + <i>abd1</i>	pDD04	ABD1-sGFP
pMF272 + <i>abd2</i>	pDD05	ABD2-sGFP
pMF272 + <i>fim</i>	pDD06	FIM-sGFP
pMF334 + <i>tpm</i>	pMF350	dRFP-TPM

### **5.5 Transformación de *N. crassa his-3***

La cepa de *N. crassa his-3* (FGSC #9717) se transformó utilizando un electroporador Gene Pulser Xcell™ (BioRad®). Se transformaron conidias que habían permanecido a -20 °C por un mes. Después de ser descongeladas se lavaron con sorbitol 1 M y se llevaron a una concentración de  $\sim 25 \times 10^6$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ . Se incubaron en hielo, 90  $\mu\text{l}$  de conidias junto con 10  $\mu\text{l}$  de plásmido ( $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ ) por 15 min (plásmidos pDD04, pDD05 y pDD06). La mezcla se transfirió a celdas de electroporación de 2 mm previamente enfriadas en hielo y se sometieron a las siguientes condiciones de electroporación: 1.5 kV, 25  $\mu\text{F}$ , 600  $\Omega$ . La duración del pulso fue de aproximadamente 13 ms. Como control negativo se realizó una electroporación de conidias sin plásmido añadido. Inmediatamente después de cada pulso se añadió 1 ml de sorbitol 1M frío a cada celda de electroporación y se mezcló rápidamente. Se añadieron 4 ml de Medio de Regeneración y se incubó a 28 °C durante 2 h. Las conidias se centrifugaron a 8, 000 rpm y se resuspendieron en 1 ml, el cuál fue sembrado en cuatro placas de medio FIGS. Las placas se incubaron a 28 °C hasta que aparecieron colonias.

Las colonias que aparecieron contenían el gen *his-3* reconstituido por recombinación homóloga y esto sirve como marcador auxotrófico y de selección. Se aislaron todas las colonias de las transformaciones con pDD04, pDD05 y pDD06 y se inocularon en tubos de 5 ml con MMV-agar inclinado, y fueron incubados a 28 °C por 12 h. Las colonias que expresaron fluorescencia

verde se seleccionaron bajo el microscopio invertido Axiovert 200 utilizando un filtro de excitación de 488 nm de longitud de onda para sGFP. Como fuente de luz se utilizó una lámpara de mercurio de 100 W. Las transformantes se nombraron TDD04 (ABD1-sGFP), TDD05 (ABD2-sGFP) y TDD06 (FIM-sGFP). En las placas correspondientes al control negativo no crecieron colonias.

### **5.6 Tinción de membranas con FM46-4**

El colorante N-(3-trietilamoniopropil)-4-(p-dietilaminofenilhexatrienil) piridinio dibromuro (FM4-64) (Molecular Probes®) es un colorante vital lipofílico que tiñe membranas (excitación/emisión máxima 515 nm/640 nm). Entra a la célula por medio de endocitosis y permite la visualización de los componentes membranosos intracelulares. (Vida y Emr, 1995). En hongos filamentosos se ha utilizado para observar las vesículas del Spk. Las cepas TDD05 y TDD06 se tiñeron con FM4-64 para observar la relación de fimbrina con el Spk. En un cubreobjetos se colocaron 10 µl del colorante (5 µM) y se depositó un trozo de agar con micelio periférico, como se describe en Hickey et al (2002).

### **5.7 Observaciones de germínulas**

La distribución y dinámica de fimbrina y tropomiosina se observó durante la formación del tubo germinativo y desarrollo de la hifa madura. Se observaron germínulas de las cepas que expresan las fusiones ABD2-sGFP y dRFP-TPM-

1. Conidias de estas cepas se resuspendieron en agua estéril y se esparcieron en una placa de MMV-agar. Cada hora a partir del momento de incubación se tomaron imágenes confocales para observar la distribución de las proteínas.

### **5.8 Despolimerización de actina**

La citocalasina A (CA) es una droga que impide la polimerización de actina (Torralba *et al.*, 1998). Las cepas TPM-dRFP y FIM-sGFP se sembraron en placas de MMV agar (1.5 %) con CA ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) para corroborar la asociación de tropomiosina y fimbrina a actina. La concentración utilizada permite observar el efecto de la droga sin ser letal para la célula (Ramos-García, 2006).

### **5.9 Microscopía**

#### **5.9.1 Microscopía confocal**

Todas las imágenes confocales y de contraste de fases se capturaron por medio de un microscopio confocal LSM 510 Meta de Carl Zeiss® (Göttingen, Alemania). La sGFP y el colorante FM4-64 se excitaron a 488 nm con un láser de Argón; la dRFP fue excitada a 543 nm con un láser de He/Ne. Se utilizaron objetivos 63x/1.4 A.N. Plan-Apocromático y 100x/1.3 A. N. Plan-Neofluar de inmersión en aceite. Se capturaron simultáneamente imágenes de

contraste de fases en un canal con un fotomultiplicador de luz transmitida. Se realizaron reconstrucciones tridimensionales apilando imágenes obtenidas de diferentes planos focales. La información fue analizada con el software LSM Image Examiner de Carl Zeiss® v. 3.2. Las muestras para el microscopio confocal se prepararon invirtiendo un bloque de MMV-agar de forma que el micelio (tiempo de incubación 8-12 h) quedara pegado al cubreobjetos (Hickey *et al.*, 2002).

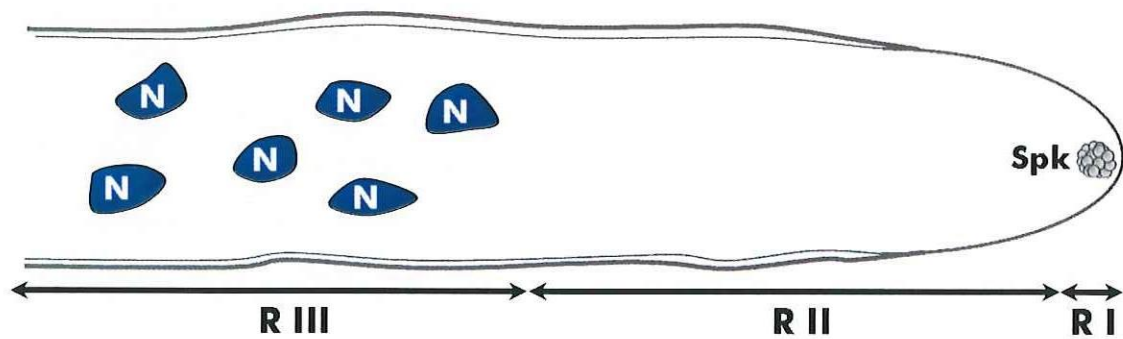
### ***5.9.2 Microscopía de Fluorescencia por Reflexión Total Interna (TIRFM)***

El microscopio de TIRF utiliza ondas evanescentes que logran excitar sólo las proteínas fluorescentes que se encuentran a menos de ~200 nm entre el cubreobjetos y el espécimen, por lo que se elimina el ruido de fondo y sólo se observa el comportamiento de los elementos marcados cercanos a la corteza celular. En este trabajo se utilizó TIRF para observar el comportamiento de los parches corticales de fimbrina. Las imágenes de TIRF se obtuvieron con un microscopio invertido IX-70 equipado con un objetivo 60x/1.45 A.N. apocromático (Olympus America Inc., Center Valley, PA) y un láser de Kriptón/Argón (Melles Griot, Carlsbad, CA) (488nm). Las imágenes fueron capturadas con una cámara Cascade 512B EMCCD (Photometrics, Tucson, AZ) a una resolución de 512x512 y una frecuencia de captura de 50-

200 ms. Para el control de la cámara y la captura de imágenes se utilizó el programa MetaMorph 6.0/6.1 (Universal Imaging, Downington, PA).

### 5.10 Definición de regiones de la hifa

Para el estudio de las hifas de hongos filamentosos McDaniel y Roberson (2000) definen tres regiones (Fig. 3): (i) Región I, comprende los primeros 2 a 5  $\mu\text{m}$  del ápice de la hifa, donde se encuentra el Spitzenkörper (Spk); (ii) la Región II, o región subapical, comienza detrás del Spk y termina donde comienza la distribución de los núcleos; (iii) Región III, inicia donde se ubica el primer núcleo y hasta la región basal.

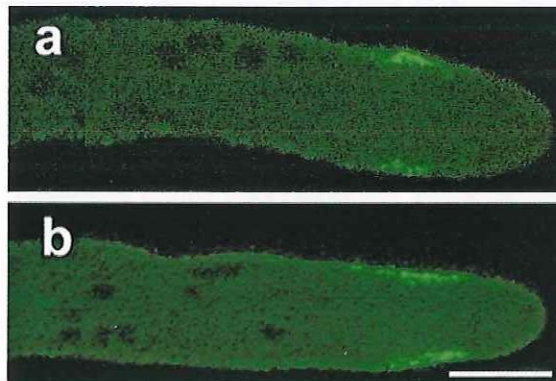


**Figura 3.** Definición de regiones de la hifa. N = núcleos, Spk = Spitzenkörper, R = región.

## 6. Resultados

### 6.1 Comparación del marcaje de FIM, ABD1 y ABD2 con sGFP

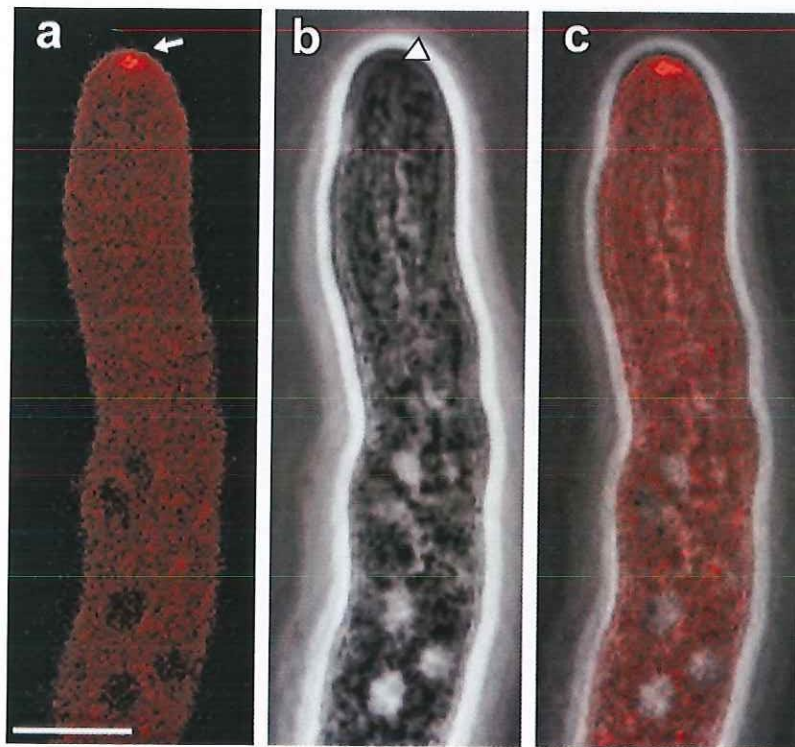
En la cepa transformada con la construcción ABD1::sGFP no se observó expresión de la fluorescencia, sin embargo con las construcciones FIM::sGFP y ABD2::sGFP se logró una clara expresión de la proteína fluorescente. La eficiencia del marcaje, así como la intensidad y distribución de la fluorescencia de las transformantes que expresan las fusiones ABD2-sGFP y FIM-sGFP fueron prácticamente idénticas (Fig. 4).



**Figura 4.** Distribución de (a) FIM-sGFP y (b) ABD2-sGFP en la región subapical de hifas maduras. Escala = 5  $\mu$ m.

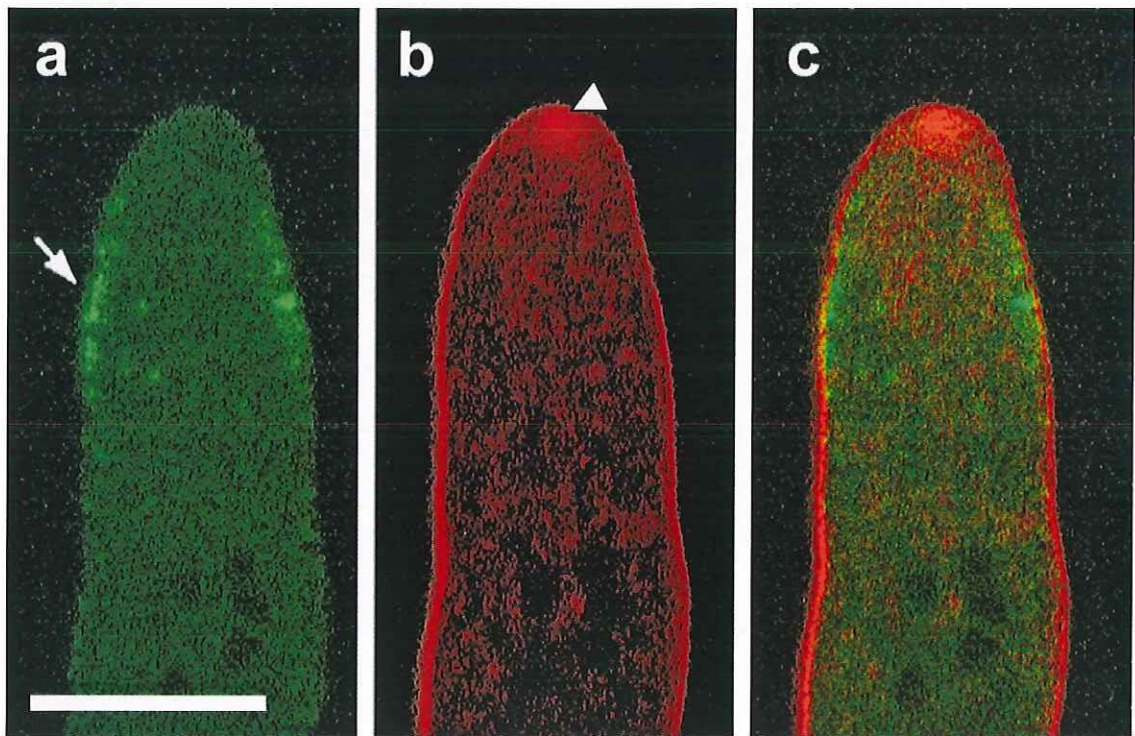
## 6.2 Distribución de tropomiosina y fimbrina en las regiones I y II de la hifa

Mediante microscopía confocal de hifas maduras de la cepa que expresa la fusión dRFP-TPM-1 se observó una acumulación de tropomiosina de  $1.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$  de diámetro (promedio  $\pm$  desviación estándar) en el ápice de la célula (Fig. 4 a). Esta acumulación correspondía a  $\sim 80\%$  del área total del Spk (Fig. 5 b). Durante el crecimiento de la hifa la acumulación desaparecía y reaparecía al igual que el Spk conforme cambiaban de plano focal.



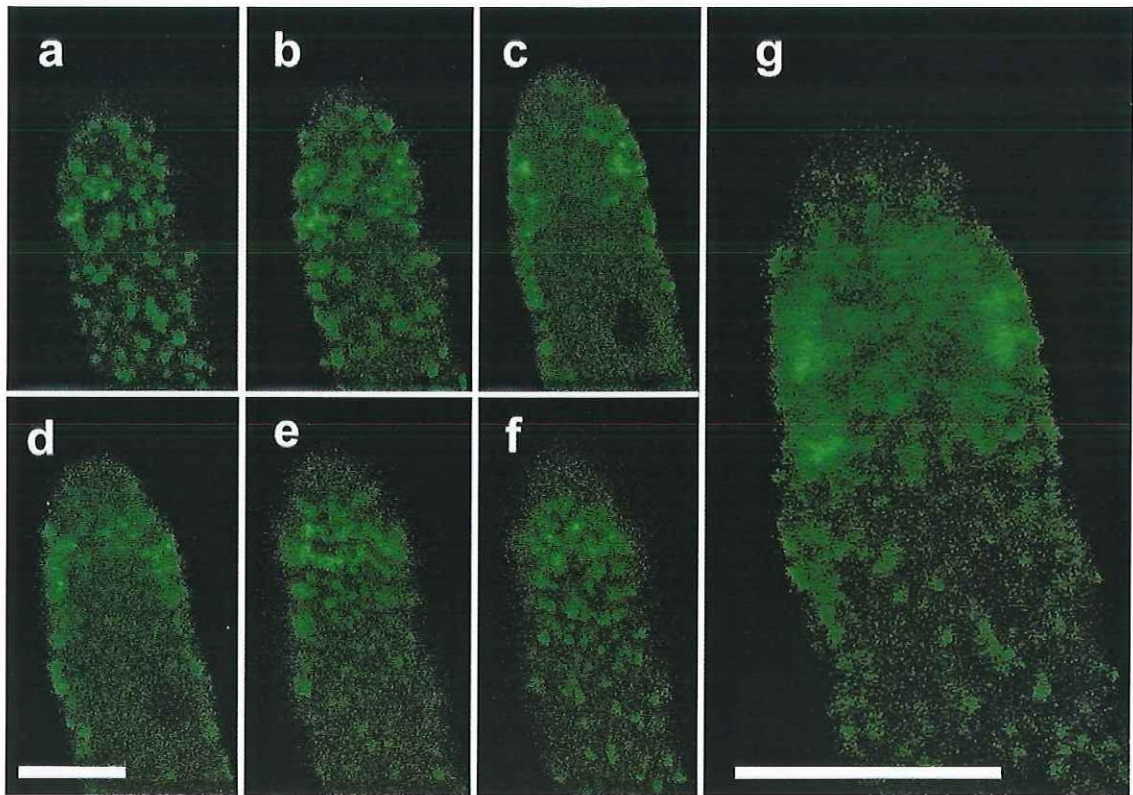
**Figura 5.** Distribución de dRFP-TPM-1. (a) Imagen confocal, (b) de contraste de fases y (c) composición de (a) y (b). La flecha indica la acumulación apical de tropomiosina. La cabeza de flecha señala el Spk. En (c) se observa la colocalización de tropomiosina con el Spk. Escala =  $5 \mu\text{m}$ .

La fimbrina se encontró formando parches a lo largo de toda la hifa, acumulados principalmente en la región subapical (región II), situados inmediatamente detrás del Spk. (Fig. 6 c, Video 1). Los parches de esta acumulación subapical se encuentran aparentemente unidos a la membrana plasmática. La acumulación persiste durante todo el crecimiento de la hifa.



**Figura 6.** Distribución de fimbrina marcada con sGFP. Imágenes confocales de (a) ABD2-sGFP, (b) tinción con FM4-64 y (c) Composición de (a) y (b). La flecha señala la acumulación subapical de ABD2-sGFP cerca de la membrana plasmática. La cabeza de flecha indica el Spk teñido con FM4-64. Escala = 10  $\mu$ m.

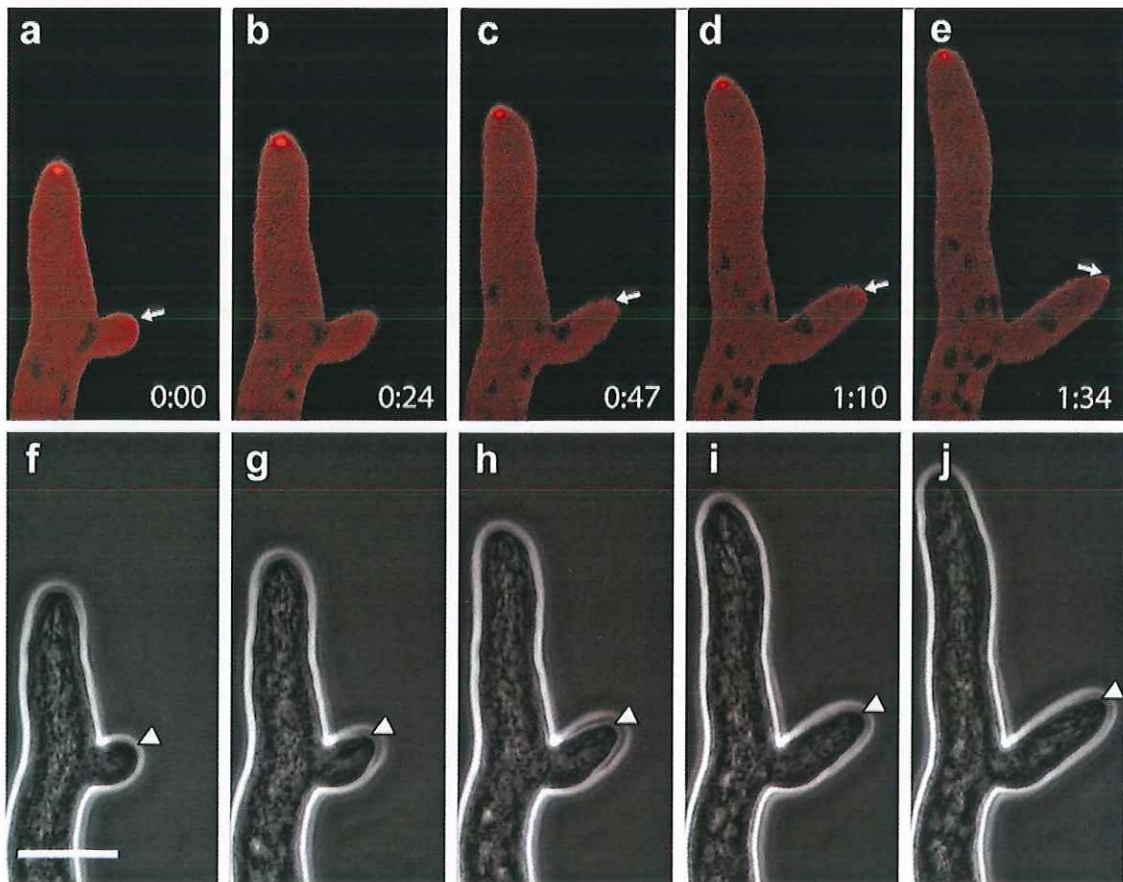
En la Figura 7 (a-f) se muestran rebanadas ópticas en el eje z y una reconstrucción tridimensional (Fig. 7 g). Se puede distinguir una zona libre de parches desde el ápice hasta 3.5  $\mu\text{m}$  de la célula, seguido de un anillo denso de parches de  $\sim 5 \mu\text{m}$  de largo en la región II de la hifa. Detrás de esta zona, la distribución de los parches de fimbrina es más espaciada (Figs. 6 y 7, Video 2).



**Figura 7.** Diferentes planos focales y reconstrucción tridimensional del ápice de una hifa con ABD2-sGFP (a-f) rebanadas ópticas de  $0.9 \mu\text{m}$  de grosor, (g) reconstrucción tridimensional. Escala =  $10 \mu\text{m}$ .

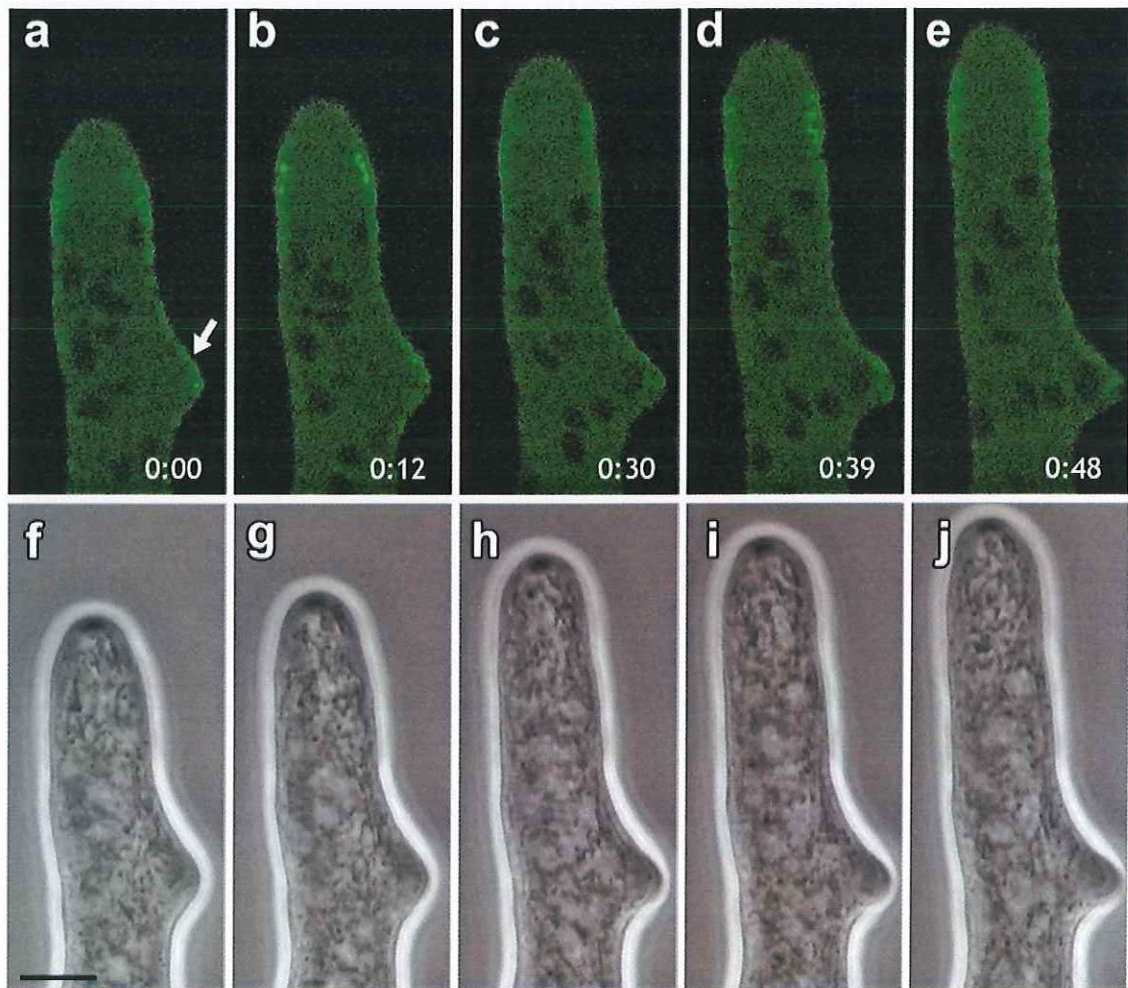
### 6.3 Distribución de tropomiosina y fimbrina durante ramificación lateral

Durante la formación de la hifa lateral, la tropomiosina se acumula en el lugar donde la rama emergerá y se mantiene hasta que está formada por completo, colocalizando con el nuevo Spk (Fig. 8). La acumulación de dRFP-TPM-1 de la hifa lateral se comporta de la misma forma que en la hifa líder (Fig. 8 b).



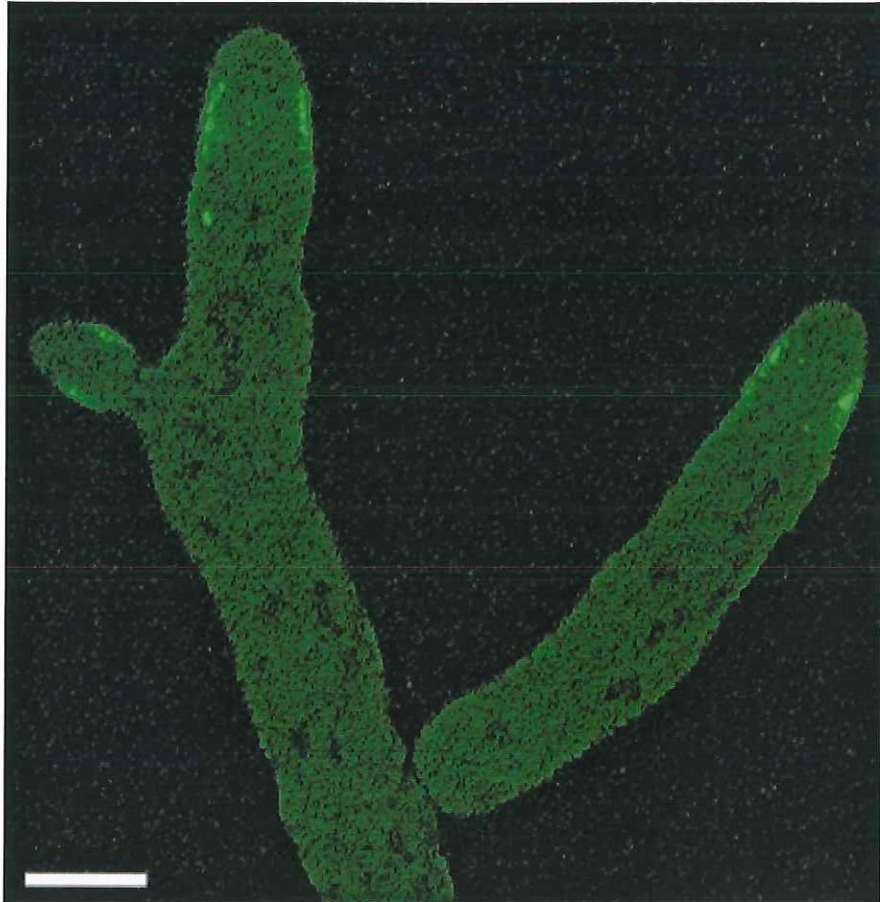
**Figura 8.** Distribución de dRFP-TPM-1 durante la ramificación. (a-e) Imágenes confocales y (f-j) imágenes de contraste de fases. Las flechas señalan la posición de la acumulación apical de tropomiosina y las cabezas de flecha señalan el Spk. Escala = 10  $\mu$ m.

Durante el crecimiento de la hifa la distribución de los parches de fimbrina es igual en ambos lados de la hifa. Cuando se forma una ramificación los parches se acumulan en la pared donde la hifa lateral va a emerger (Fig. 9<sup>a</sup>, Video 3).



**Figura 9.** Distribución de ABD2-sGFP durante la formación de una hifa lateral. (a-e) imágenes confocales y (f-j) imágenes por contraste de fases. La flecha indica la acumulación de fimbrina en el sitio donde se forma la rama lateral. Escala = 5 $\mu$ m.

Una vez que aparece la rama lateral los parches siguen su contorno. Cuando ha crecido lo suficiente se forma el anillo de parches de la región subapical (Fig. 10).

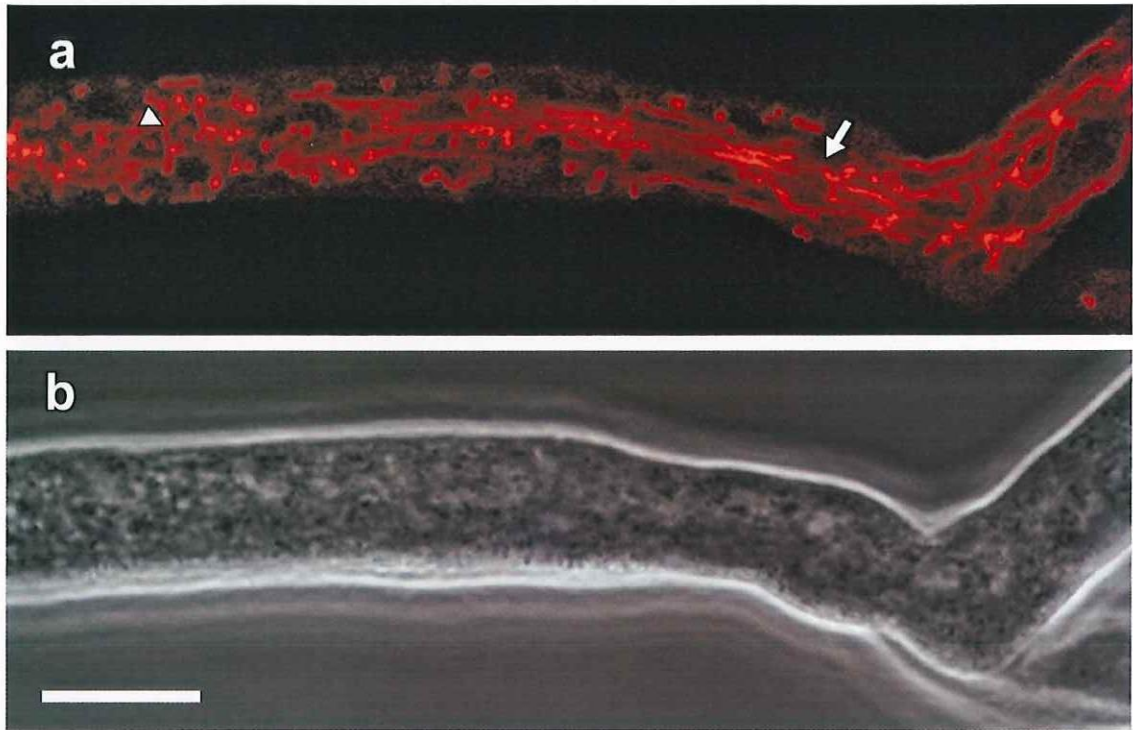


**Figura 10.** Imagen confocal con ABD2-sGFP de una hifa líder y dos ramificaciones. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

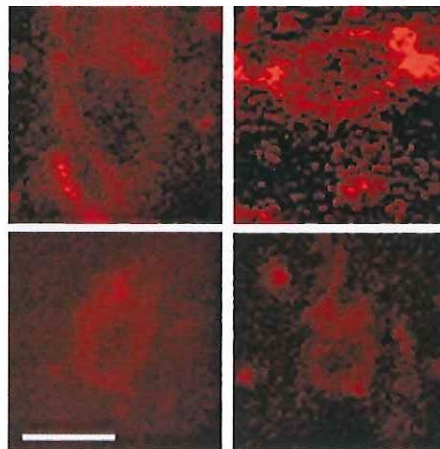
#### **6.4 Distribución de tropomiosina y fimbrina en la región basal de la hifa**

Posterior a la acumulación de RFP-TPM-1 en el ápice, continúa una zona de exclusión de  $31.8 \pm 11.3 \mu\text{m}$  donde no se detectó fluorescencia. Detrás de la zona de exclusión la dRFP-TPM-1 se distribuye en cables y parches (Fig. 11 a). Los cables son gruesos y recorren la hifa longitudinalmente, intercalados con éstos se observan parches (Fig. 11 a). Tanto los cables como los parches parecen moverse con el flujo del citoplasma. En la región III, también se observó fluorescencia rodeando algunos núcleos (Fig. 12), esta distribución perinuclear de tropomiosina es transitoria, y no todos los núcleos se observaron rodeados al mismo tiempo.

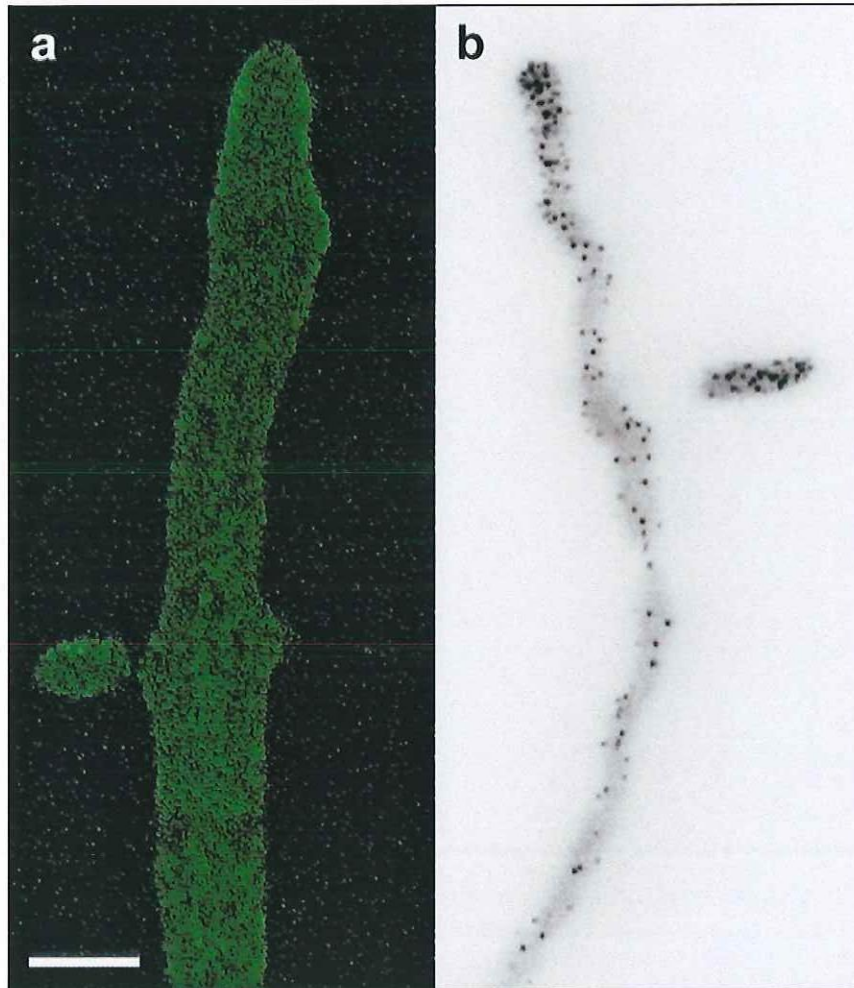
La distribución de parches de fimbrina de la región basal se exploró inicialmente por medio de microscopía confocal, donde se observaron parches dispersos en los bordes de la hifa (Fig. 13 a). Gracias a la microscopía de TIRF (Fig. 13 b, Video 6) se logró determinar que los parches son más abundantes en la corteza de lo que se observa por microscopía confocal.



**Figura 11.** Distribución de dRFP-TPM-1 en la región basal de una hifa. (a) Imagen confocal y (b) contraste de fases. La cabeza de flecha indica un región rica en parches. La flecha señala una zona con cables. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .



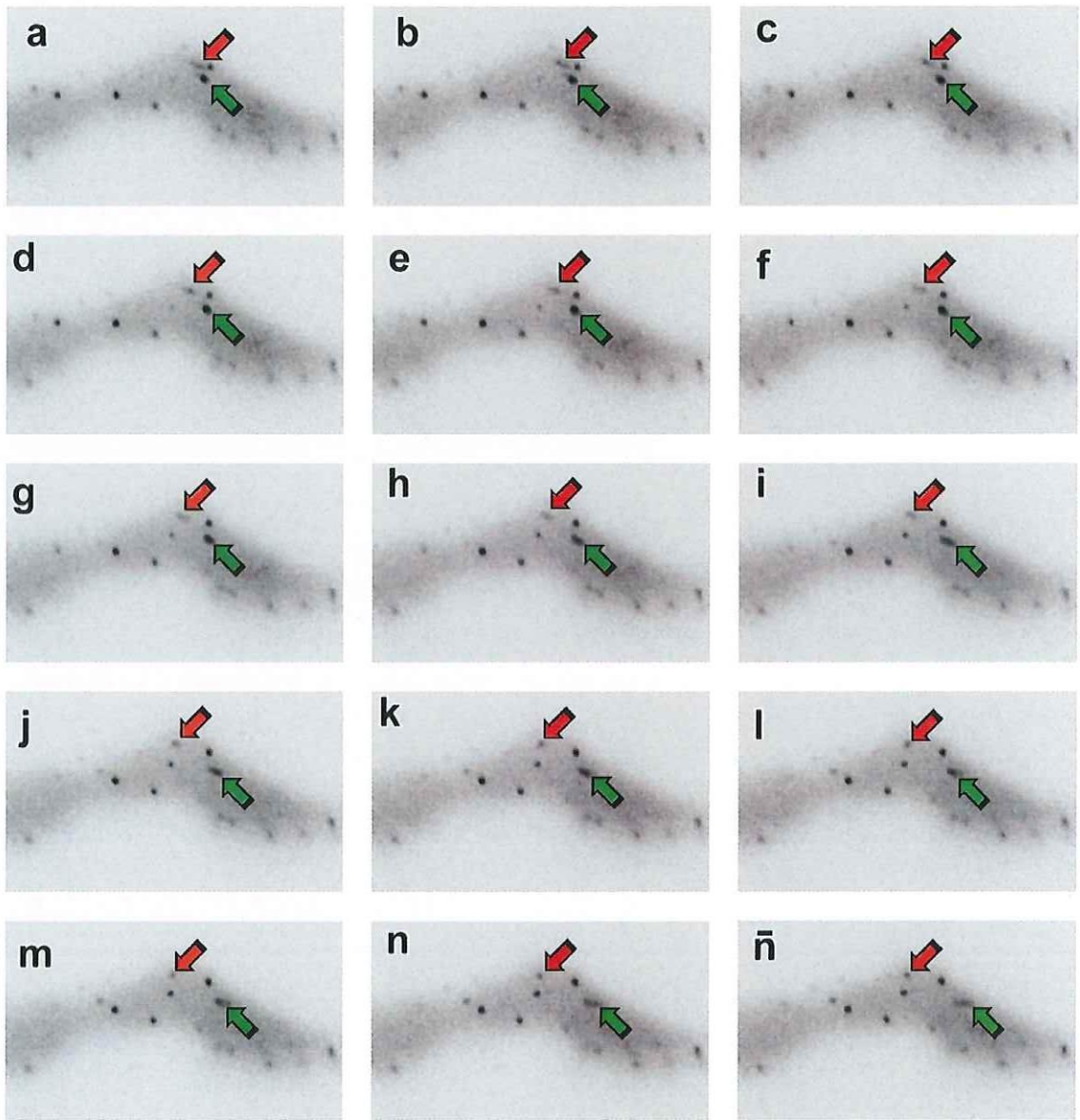
**Figura 12.** Imágenes confocales de núcleos rodeados por dRFP-TPM-1 en la región basal de una hifa dRFP-TPM-1. Escala = 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 13.** Comparación de la distribución de la fluorescencia de FIM-sGFP por (a) microscopía confocal y (b) TIRFM. Escala = 5  $\mu$ m.

### **6.5 Movilidad de parches de fimbrina**

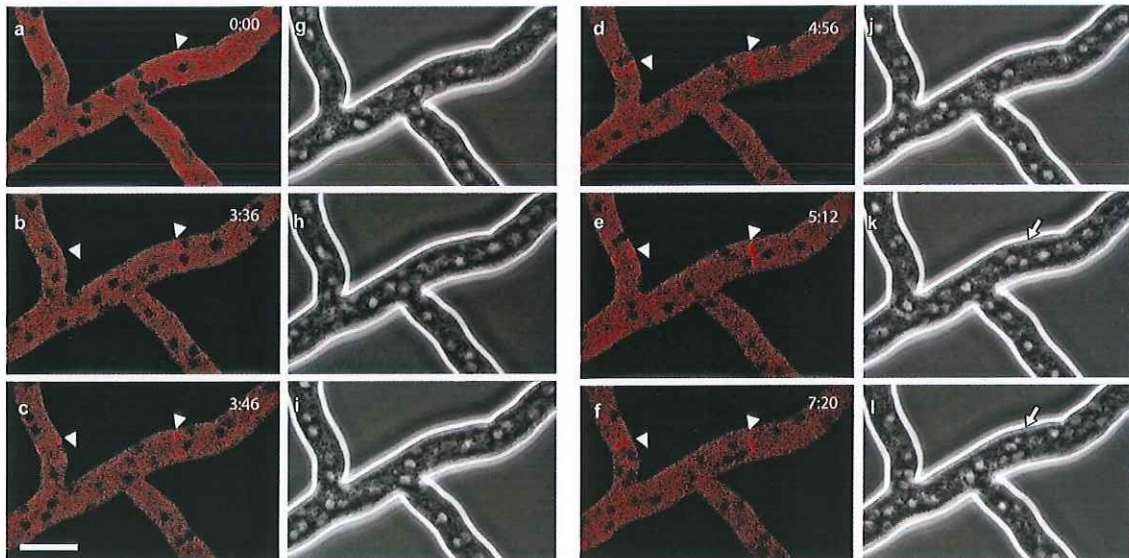
Se analizó el movimiento de los parches de fimbrina mediante series de tiempo de TIRFM y se identificaron tres tipos: (i) estáticos, (ii) de movilidad limitada y (iii) altamente móviles. Cada parche se movía de forma independiente. En el subápice de la hifa la mayoría de los parches tienen movilidad limitada. Se mueven a distancias cortas, perpendiculares a la pared de la hifa, aunque también se encuentran parches estáticos y algunos que se mueven linealmente paralelos a la hifa. En la región basal los parches son en su mayoría estáticos, sin embargo hay algunos altamente móviles, que se mueven en forma de saltos, paralelos al eje de la hifa, tanto de forma anterógrada (hacia el ápice de la hifa), como retrógrada (alejándose del ápice de la hifa) (Fig. 14, Video 6). Se observó que un solo parche puede moverse rápidamente, detener su movimiento y reanudarlo, o después de detenerse mantenerse estático. Se observaron parches que se movían inicialmente hacia el ápice, y después de detenerse reanudaban su movimiento pero en sentido contrario. Los parches móviles del subápice celular pasan debajo de los parches estáticos o de movilidad limitada.



**Figura 14.** Movimiento de parches marcados con FIM-sGFP. Imágenes de TIRF. Las flechas verdes siguen un parche que se mueve de forma anterógrada. Las flechas rojas señalan un parche que se mueve retrógradamente.

## 6.6 Distribución de tropomiosina y fimbrina durante la formación de septos

Antes de la formación del septo, la tropomiosina se acumula en el borde de la hifa donde ocurrirá la septación (Fig. 15 a). La acumulación forma un anillo contráctil que se aleja de la periferia y viaja hacia el centro de la hifa (Fig. 15 a-f). La fluorescencia se observa aproximadamente 5 minutos antes de que la invaginación de la membrana sea observada por contraste de fases (Fig. 15 j). Una vez que el septo está formado la señal fluorescente desaparece.



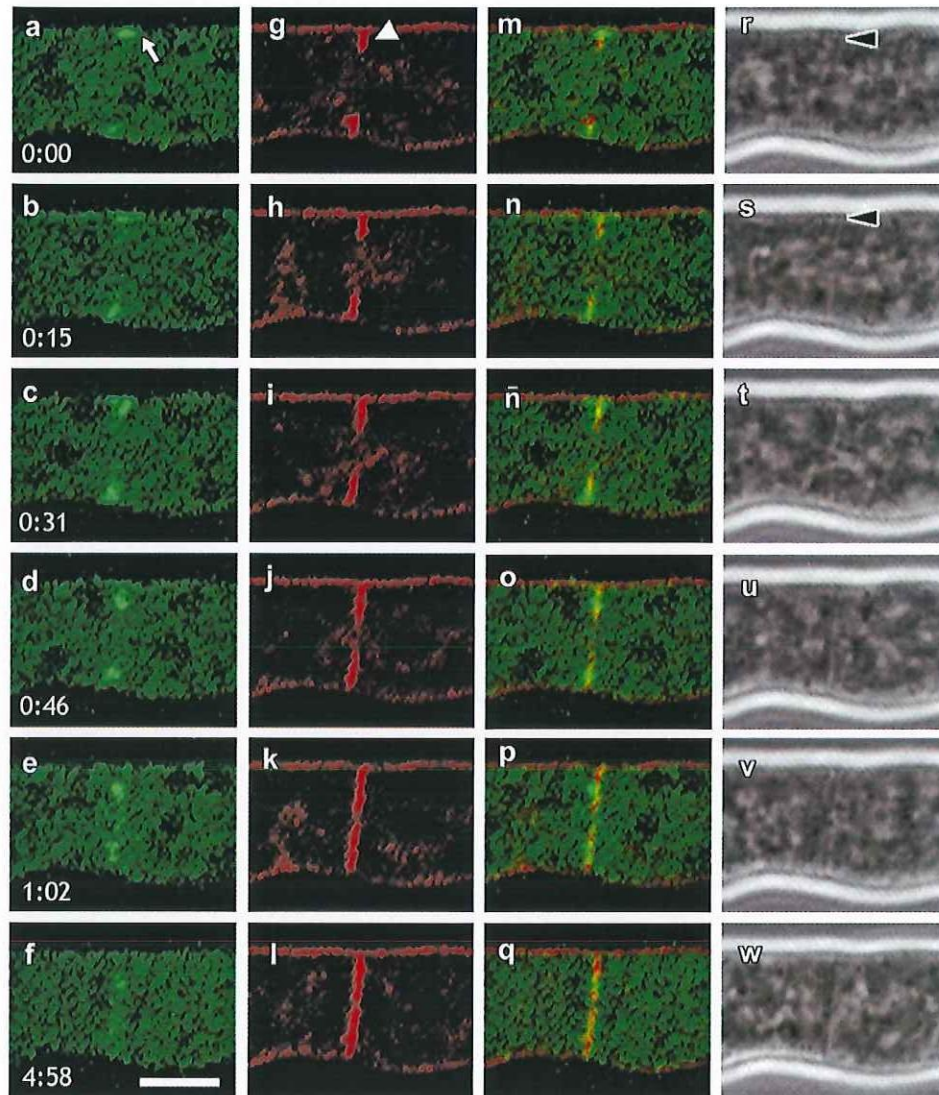
**Figura 15.** Formación del septo marcado con dRFP-TPM-1. (a-f) imágenes confocales y (g-l) imágenes por contraste de fases. Las cabezas de flecha señalan la agregación de dRFP-TPM-1. Las flechas señalan la formación de un septo. Escala = 10  $\mu$ m.

En el caso de la fimbrina, parches fluorescentes se acumulan en el borde de la célula donde el septo se formará (Fig. 17 a, Video 4). Los parches de fimbrina forman un par de anillos que flanquean a la membrana citoplasmática que se invagina durante la formación del septo (Fig. 17, Video 5). La aparición de las acumulaciones de fimbrina ocurre algunos segundos antes de que los septos puedan ser detectados por contraste de fases (Fig. 17 b) y desaparecen al estar totalmente formado (Figs. 17 f y q).

### ***6.7 Efecto de la despolimerización de los filamentos de actina***

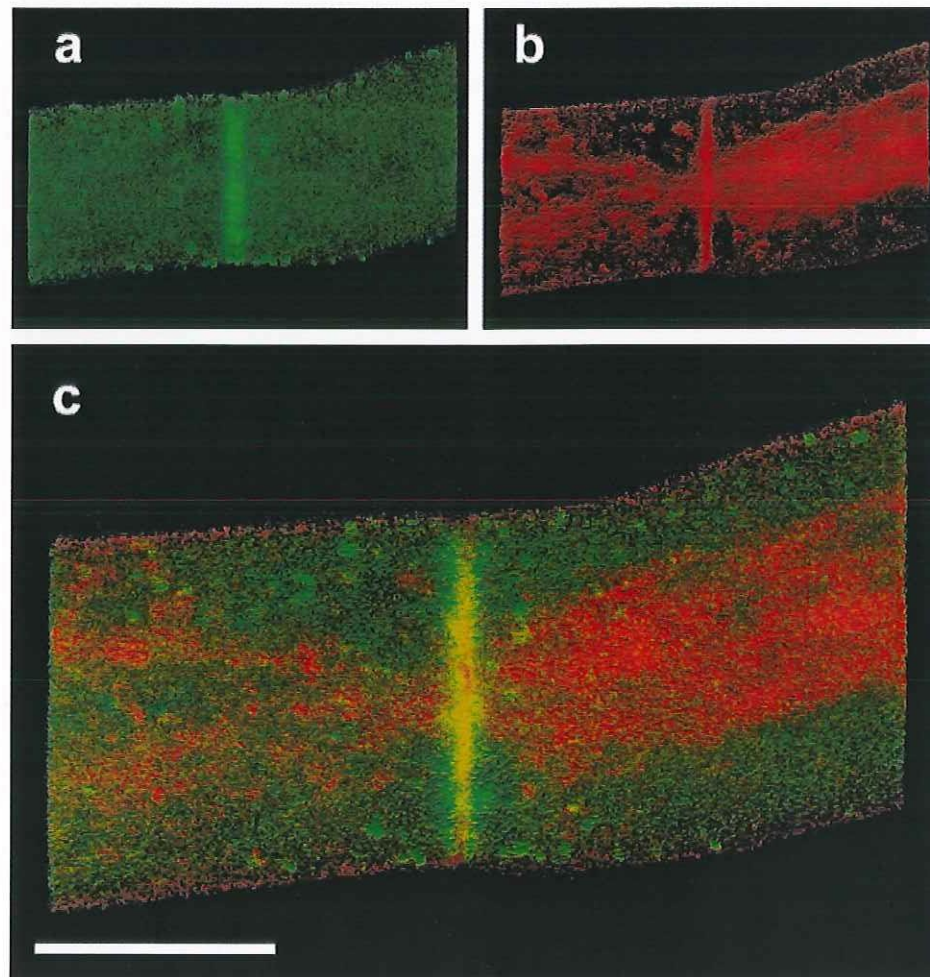
El efecto de la despolimerización del citoesqueleto de actina con citocalasina A ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) se evaluó en las cepas FIM-sGFP y dRFP-TPM-1. La forma de la hifa y el patrón de ramificación se alteraron por completo. Se incrementó el número de ramificaciones y en su mayoría eran apicales.

Los patrones de fluorescencia de FIM-sGFP y dRFP-TPM-1 descritos se modificaron. En hifas que expresaban dRFP-TPM-1 no se detectó acumulación de fluorescencia apical. Los cables gruesos de la región basal se afectaron y se perdieron casi por completo. En su lugar se observaron filamentos de menor grosor y longitud, además de acumulaciones difusas a lo largo de toda la hifa (Fig. 18 a).

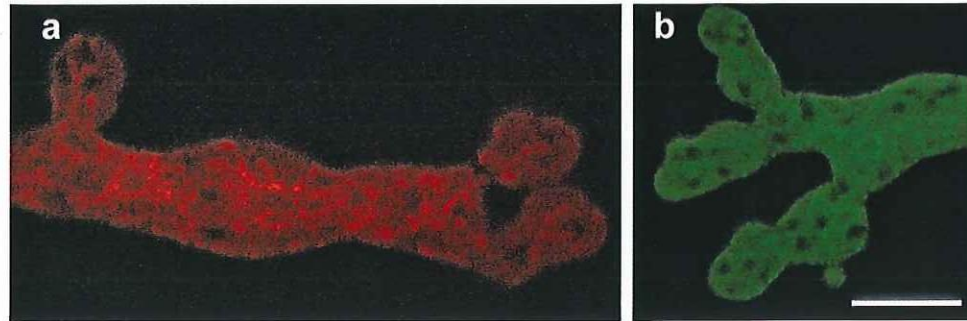


**Figura 16.** Localización de parches de fimbrina durante la formación de un septo. Imágenes confocales (a-f) ABD2-sGFP, (g-l) membranas teñidas con FM4-64, (m-q) composición de imágenes en el canal verde y rojo y (r-w) imágenes de contraste de fases. La flecha indica la agregación inicial de fimbrina en la pared de la hifa. La cabeza de flecha blanca señala la formación del septo. Las cabezas de flecha negra señala el septo cuando empieza a ser visible. Escala = 5  $\mu$ m.

En las hifas que expresaban FIM-sGFP tratadas con CA se perdieron los parches del anillo subapical, así como los de la región basal. En su lugar se detectó fluorescencia formando el mismo tipo de acumulaciones difusas que para el caso de la cepa con dRFP-TPM-1 (Fig. 18 b).



**Figura 17.** Reconstrucción tridimensional de un septo. Suma de imágenes confocales de (a) ABD2-sGFP, (b) membranas teñidas con FM4-64 y (c) composición de (a) y (b). Se muestra la superposición de XX de rebanadas focales de 0.9  $\mu\text{m}$  de grosor. Escala = 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18.** Efecto de la despolimerización del citoesqueleto de actina en la distribución de tropomiosina y fimbrina. (a) dRFP-TPM-1 y (b) FIM-sGFP. Escala = 10  $\mu\text{m}$

### **6.8 Distribución de tropomiosina y fimbrina en germínulas**

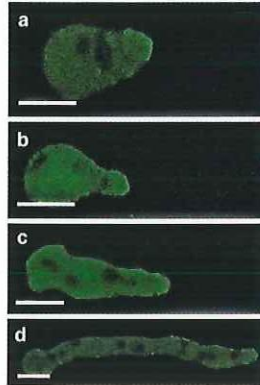
Durante la formación del tubo germinal en conidias con dRFP-TPM-1, se forman cables gruesos, paralelos a la germínula (Fig. 19). Éstos son menos abundantes que los observados en hifas maduras. La acumulación apical de tropomiosina y el Spk no se observaron en ninguna germínula.



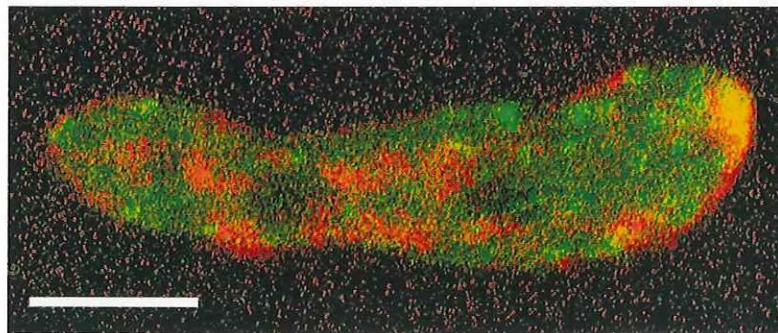
**Figura 19.** Reconstrucción bidimensional de una germínula dRFP-TPM-1. Escala = 5  $\mu\text{m}$ .

En las etapas tempranas de la germinación de conidias, la fimbrina se acumuló formando parches donde el tubo germinal se formó. Una vez formado, los parches se agrupan en forma de anillo subapical, de la misma manera que

en hifas maduras. En la región basal de la germínula se observan parches, en menor cantidad que en el ápice. Estos parches se acumulan en el polo opuesto al tubo germinal.



**Figura 20.** Distribución de parches de ABD2-sGFP en germínulas. Escala = 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 21.** Reconstrucción tridimensional de una germínula ABD2-sGFP. Membranas teñidas con FM 4-64. Escala = 5  $\mu\text{m}$ .

## **7. Discusión**

### **Visualización de actina *in vivo***

El citoesqueleto de actina en hongos se ha estudiado a través de diferentes técnicas de microscopía de fluorescencia en células fijadas e *in vivo* a través del marcaje molecular con proteínas fluorescentes de la propia actina y de las proteínas de unión a actina (Barja et al., 1991; Kost et al., 1998; Heath et al., 2000; Wang et al. 2004; Li et al., 2006; Taheri-Talesh et al., 2008; Upadhyay y Shaw, 2008). Este estudio es el primer reporte de la dinámica de actina *in vivo* en el hongo filamentoso *N. crassa* a través de la fusión de ABPs como tropomiosina y fimbrina a proteínas fluorescentes

El marcaje de fimbrina se realizó uniendo la sGFP a la proteína completa y a las fracciones de unión a actina ABD1 y ABD2. El entrelazamiento de microfilamentos ocurre cuando una molécula de fimbrina posee sus dos sitios de unión a actina, por lo que el uso de la fusión ABD2-sGFP supone una ventaja sobre la FIM-sGFP, ya que se pierde la función de la proteína completa y solo se consigue la decoración de los filamentos de actina sin afectarla. Las fusiones FIM-sGFP y ABD2-sGFP hacen visibles la población de actina que se asocia a fimbrina. No es necesario realizar el rescate de un genotipo mutante del gen de fimbrina con la construcción ABD2-sGFP porque no se sobrexprea una proteína funcional, es tan solo como se mencionó anteriormente una decoración de

F-actina. Esta estrategia fue utilizada previamente en rizomas de *A. thaliana*, con la que se mostraron diferencias en la eficiencia de marcaje y los patrones de fluorescencia utilizando las construcciones AtFim1-GFP, ABD1-GFP, ABD2-GFP, BD1/2-GFP (Wang et al., 2004). Similar a estos resultados fue la construcción realizada con el dominio 1 de unión a actina (ABD1) de *N. crassa*, con la que no se observó expresión de la fluorescencia, sin embargo, las construcciones FIM-sGFP y ABD2-sGFP mostraron un mismo patrón y dinámica.

### ***Hay dos poblaciones de actina***

En *N. crassa* existen al menos dos poblaciones de actina: una asociada a fimbrina que forma parches corticales a lo largo de toda la célula, y que se agrupan formando un anillo en la región subapical adyacente al Spk y otra asociada a tropomiosina, que forma un parche que colocaliza con el Spk, además de cables gruesos y parches en la región basal, como se muestra en el modelo (Fig. 22). Se puede destacar que hay una población de actina asociada a fimbrina y otra que está exclusivamente asociada a tropomiosina. En estudios previos se han mostrado también discrepancias al tratar de inmunolocalizar a la actina con diferentes anticuerpos. Un ejemplo en *N. crassa* es la observación de actina formando placas subapicales, además de colocalizar con el Spk (Heath et al., 2000), mientras que en otros intentos sólo ha sido visible la actina asociada al Spk

(Virag y Griffiths, 2004). La utilización de inmunomarcaje no logra diferenciar entre distintas poblaciones de actina y tampoco tiñe toda la actina presente en la célula. Sin embargo, el marcaje de moléculas de actina con proteínas fluorescentes no permite visualizar los parches y los cables simultáneamente (Taheri-Talesh et al., 2008; Upadhyay y Shaw, 2008). La utilización de fimbrina y tropomiosina como marcadores indirectos del citoesqueleto de actina permite la observación indirecta de las poblaciones de actina por separado, lo que permitirá en el futuro realizar estudios sobre las diferencias en la función de cada población y de los grupos de proteínas a las que están asociadas.

### ***Tropomiosina en el Spk***

En el Spk de *N. crassa*, la actina está asociada a tropomiosina pero no a fimbrina. Esto es similar a la distribución reportada en *A. nidulans*, donde por medio de una fusión a GFP de la tropomiosina se localizó en el Spk de hifas maduras (Li et al., 2006; Taheri-Talesh et al., 2008). La presencia de actina en el Spk de *N. crassa* ya había sido reportada con anterioridad (Barja et al., 1991; Heath et al., 2000; Virag y Griffiths, 2004), sin embargo esta es la primera vez que se determina su asociación a una proteína de unión. Lo anterior sugiere que al estar asociada a tropomiosina, la actina presente en el Spk debe tener una función de transporte activo ya que es

esta proteína la que regula la relación entre actina y miosina (Tabla V) (Lodish et al., 2004; Gunning, 2008).

Se puede pensar que la tropomiosina es un indicador de que la actina localizada en la región apical es la responsable del transporte de vesículas del Spk a la membrana plasmática como se había propuesto anteriormente (Bartnicki-García, 2002).

### ***Tropomiosina en cables***

La tropomiosina también se asocia a cables gruesos y parches en la región basal tanto de hifas como de germínulas de *N. crassa*, lo que no había sido descrito hasta ahora. En *A. nidulans* también se detectaron filamentos de tropomiosina, aunque de menor grosor y situados en el subápice. Los filamentos de *A. nidulans* parecen estar unidos al Spk, y van desapareciendo al alejarse de éste (Taheri-Talesh et al., 2008).

La descripción que se presenta para *A. nidulans* difiere del patrón que aquí se reporta. En este estudio se observó una zona de exclusión de fluorescencia detrás del Spk, y en ningún momento se vieron filamentos o cables asociados a él. Los cables de tropomiosina comienzan a ~ 30  $\mu\text{m}$  del ápice. En los trabajos anteriores con anticuerpos anti-actina no se reportaron cables ni filamentos en la que reportan la localización de actina de *N. crassa* observaron cables ni filamentos en la región basal de la hifa,

únicamente en las regiones apical y subapical (Barja et al., 1991; Heath et al., 2000; Virag y Griffiths, 2004)

### ***Parches de fimbrina***

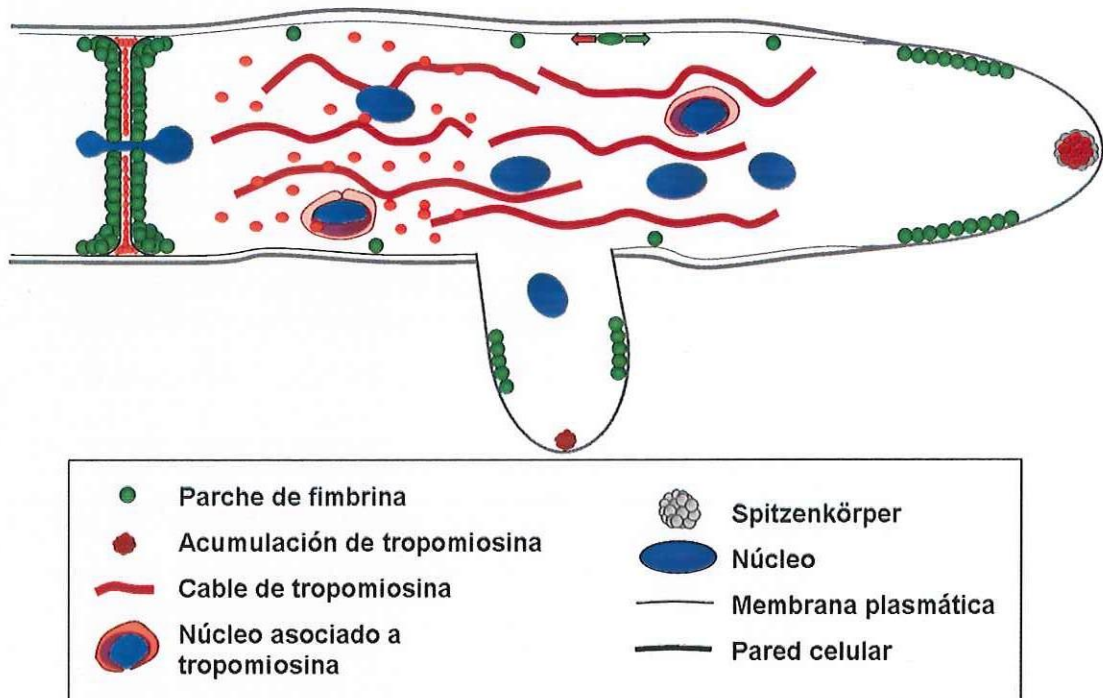
La distribución de fimbrina que se observó en hifas de *N. crassa* fue en forma de parches muy cercanos a la corteza celular, formando un denso anillo rodeando el subápice. Los parches subapicales tienen una gran semejanza a las placas de actina observadas por medio de inmunofluorescencia en los subápices de *N. crassa* y de *M. rouxii* (Hasek y Bartnicki-García, 1994; Heath et al., 2000).

Con TIRFM se hizo evidente que la densidad de parches corticales en la región basal era mayor que lo que se podía visualizar por microscopía confocal. Los patrones de fluorescencia de la fimbrina etiquetada que se observaron en *N. crassa* son muy similares a los observados en los subápices de hifas maduras y germínulas de *A. nidulans* con las fusiones FimA::GFP y Act::GFP, aunque en *N. crassa* los parches basales son más abundantes que lo reportado en *A. nidulans* (Upadhyay y Shaw, 2008).

La primera descripción de parches corticales de actina se realizó en *S. cerevisiae* donde se tiñó actina por medio de rodamina-faloidina (Adams y Pringle, 1984). En este mismo organismo el marcaje con GFP de Sac6p (homólogo de fimbrina) revela parches corticales que colocalizan con FM4-64 (Huckaba et al., 2004), lo que indica que la fimbrina de levaduras es un

componente de la maquinaria endocítica, como se había propuesto anteriormente (Kübler y Riezman, 1993; Geli y Riezman, 1998).

En base a los resultados mostrados se propone el siguiente modelo de distribución de proteínas de unión a actina.



**Figura 22.** Distribución de proteínas de unión a actina

### ***Movilidad de los parches***

Para complementar las observaciones del comportamiento de los parches de fimbrina en la corteza celular, se utilizó una novedosa técnica de microscopía (TIRF), que permite observar hasta los primeros 200 nm de la

célula. Además de ésta, la TIRFM tiene otras ventajas, como la alta resolución temporal y el bajo fotoblanqueamiento de las muestras. Este es el primer reporte sobre el comportamiento de los parches corticales de actina utilizando esta técnica, y el segundo en hongos filamentosos (Uchida et al., 2008). Esta técnica además permitió determinar que los parches de fimbrina no son estructuras estáticas sino que exhiben distintos tipos de movimiento, asociados a la región de la hifa donde se encuentran. La movilidad de los parches es variable; algunos son altamente móviles, viajando largas distancias paralelos a la hifa, tanto de forma anterógrada (hacia el ápice), como retrógrada (alejándose del ápice). Los parches rápidos ocasionalmente forman cometas que parecen decorar temporalmente las vías sobre las que se mueven. En el subápice celular, donde se acumulan principalmente tienen movilidad limitada, lo que contrasta con los parches de la región basal, que son menos abundantes pero más móviles.

### ***Función de la fimbrina***

La posición que ocupan los parches de actina-fimbrina y su alta concentración en el subápice sugieren que la fimbrina, pero no la tropomiosina, juega un papel en la endocitosis (Tabla V). Lo anterior se apoya también en las observaciones de hifas tratadas con CA, donde los parches corticales desaparecieron y el marcador endocítico FM4-64 dejó de

ser internalizado. Esta hipótesis se sustenta también en trabajos realizados en *S. cerevisiae* y en *A. nidulans*, donde por medio de mutaciones del gen de fimbrina la endocitosis se vio afectada hasta en 70 % para el caso de *S. cerevisiae*, mientras que la mutación de tropomiosina provocó efectos en la distribución del citoesqueleto de actina pero no afectó la endocitosis (Kübler y Riezman, 1993; Riezman et al, 1996; Geli y Riezman, 1998; Upadhyay y Shaw, 2008).

### ***Efecto de la despolimerización de actina***

El tratamiento con CA demuestra claramente que ambas proteínas están asociadas a actina, ya que en ambos casos el patrón de fluorescencia se desorganizó. Lo observado en *N. crassa* difiere de lo reportado en *A. nidulans* el tratamiento con CA provoca también puntas hinchadas, aunque la distribución de la fluorescencia se mantiene localizada en el ápice de las hifas (Torralba et al., 1998).

### ***ABPs en los septos***

La presencia de tropomiosina en los sitios de septación de *N. crassa* indica que está presente un anillo contráctil de actomiosina, de la misma manera que se ha visto en prácticamente todas las células animales y fúngicas (Bi et al., 1998, Moseley y Goodman, 2006). Este anillo contráctil en células animales, vegetales y levaduras produce dos células completamente separadas, mientras que en hongos filamentosos la

citocinesis no es completa, sino que resulta en la compartimentalización de la hifa.

Durante la formación del septo la tropomiosina funcionaría regulando la unión de vesículas que aportan enzimas de construcción de pared celular. Suponiendo que la función de la fimbrina está exclusivamente asociada a la endocitosis, los parches que flanquean la membrana del septo podrían regular el reciclaje de membrana plasmática a ambos (Ver modelo, Fig. 22).

### ***Actina asociada a núcleos***

En *N. crassa* la asociación de tropomiosina a algunos núcleos sugiere que podría ocurrir transporte de mRNA desde el núcleo hasta el ápice de la hifa. La mitosis de los núcleos de *N. crassa* es asincrónica (Gladfelter, 2006), por lo que su asociación a tropomiosina indicaría una fase del núcleo de producción de mRNA, o una fase de la mitosis.

**Tabla V.** Resumen de resultados.

	<b>Tropomiosina</b>	<b>Fimbrina</b>
<b>Estructura que forma</b>	Cables gruesos y parches subapicales	Parches corticales
<b>Localización en la hifa</b>	Región I: Spk Región II: Núcleos Región III: cables, parches y núcleos. Septos: formando un anillo contráctil	Región I: no está presente Región II: anillo subapical Región III: parches corticales móviles Septos: dos anillos flanqueantes
<b>Función propuesta</b>	Transporte de vesículas y exocitosis Parte del sistema contráctil de actomiosina	Endocitosis

## 8. Conclusiones

- La utilización de proteínas truncadas que conservan los sitios de unión a actina revelan el mismo patrón que la proteína completa. El anclaje de los dos dominios de unión a actina de fimbrina son independientes entre sí. Se puede unir uno sin necesidad de la presencia del otro.
- En *N. crassa* existen al menos dos poblaciones de actina, una asociada a fimbrina formando un anillo de parches en la región subapical adyacente al Spk y la otra asociada a tropomiosina, formando un parche colocalizado con el Spk, cables gruesos y parches en la región basal.
- Ambas poblaciones de actina están involucradas en la formación de los septos. La asociada a tropomiosina como parte del anillo contráctil y la asociada a fimbrina como un doble anillo que flanquea la membrana del septo.
- Los parches de fimbrina/actina son altamente móviles y se mueven de forma independiente entre ellos, mientras que los parches de tropomiosina son estáticos.
- La citocalasina A afecta a ambas poblaciones de actina.

## 9. Referencias

- Adams, A. E. M. y J. R. Pringle. 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. 90: 934-945.
- Allen, E. D., R. Aiuto y A. S. Sussman. 1980. Effects of cytochalasins in *Neurospora crassa*. *Protoplasma*. 102: 63-75.
- Bachewich C. y I. B. Heath. 1998. Radial F-actin arrays precede new hypha formation in *Saprolegnia*: implications for establishing polar growth and regulating tip morphogenesis. *Journal of Cell Science*. 111: 2005–2016.
- Barja, F., B. N. Nguyen Thi, y G. Turian. 1991. Localization of actin and characterization of its isoforms in the hyphae of *Neurospora crassa*. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters*. 77: 19-24.
- Bartnicki-García S. y E. Lippman. 1977. Polarization of cell wall synthesis during spore germination of *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology*. 1: 230–240.
- Bartnicki-García, S., G. Gierz, R. López-Franco C. E. Bracker. 1995. Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: A test of the hyphoid model. *Experimental Mycology*. 19: 153-159
- Bartnicki-García, S. 2002. Hyphal tip growth: outstanding questions. *Molecular Biology of Fungal Development*. H. D. Osiewacz, ed. 29-58.

- Bi, E., P. Maddox, D. J. Lew, E.D. Salmon, J. N. McMillan, E. Yeh y J. R. Pringle. 1998. Involvement of an Actomyosin Contractile Ring in *Saccharomyces cerevisiae* Cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*. 142 (5): 1301–1312.
- Borkovich K. A., L. A. Alex, O. Yarden, M. Freitag, G. E. Turner, N. D. Read, S. Seiler, D. Bell-Pedersen, J. Paietta, N. Plesofsky, M. Plamann, M. Goodrich-Tanrikulu, U. Schulte, G. Mannhaupt, F. E. Nargang, A. Radford, C. Selitrennikoff, J. E. Galagan, J. C. Dunlap, J. J. Loros, D. Catcheside, H. Inoue, R. Aramayo, M. Polymenis, E. U. Selker, M. S. Sachs S, G. A. Marzluf, I. Paulsen, R. Davis, D. J. Ebole, A. Zelter, E. R. Kalkman, R. O'Rourke, F. Bowring, J. Yeadon, C. Ishii, K. Suzuki, W. Sakai, R. Pratt. 2004. Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (1): 1-108.
- Bourett T. M. y R. J. Howard. 1991. Ultrastructural immunolocalization of actin in a fungus. *Protoplasma*. 163: 199-202.
- Carlsson, A. E., A. D. Shah, D. Elking, T. S. Karapova y J. A. Cooper. 2002. Quantitative analysis of actin patch movement in yeast. *Biophysical Journal*. 82: 2333-2343.
- Czymmek, K. J., T. M. Bourett y R. J. Howard. 1996. Immunolocalization of tubulin and actin in thick-sectioned fungal hyphae after freeze-substitution fixation and methacrylate de-embedment. *Journal of Microscopy*. 181: 153-161.
- Davis, R. H. 2000. *Neurospora*: Contributions of a Model Organism. Oxford University Press, New York. 217 p.

- Dos Remedios, C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry y N. J. Nosworthy. 2003. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiology Review*. 83: 433-473.
- Doyle, T. y D. Botstein. 1996. Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 3886-3891.
- Freitag, M., P. C. Hickey, N. B. Raju, E. U. Selker y N. D. Read. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics, and function of nuclei, and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 897-910.
- Freitag, M. y E. U. Selker. 2005. Expression and visualization of Red Fluorescent Protein (RFP) in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter*. 52: 14-17
- Geitmann, A. y A. M. C. Emons. 2000. The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. *Journal of Microscopy*, 198: 218-245.
- Geli, M. I. y H. Riezman. 1998. Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *Journal of Cell Science*. 111: 1031-1047
- Gibbon, B.C., D. R. Kovar, y C. J. Staiger. 1999. Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 11: 2349–2363.
- Gierz, G. y S. Bartnicki-García. A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. 2001. *Journal of Theoretical Biology*. 208: 151-164.
- Gladfelter, A. S. 2006. Nuclear anarchy: asynchronous mitosis in multinucleated fungal hyphae. *Current Opinion in Microbiology*. 9 (6): 547-552.

- Grove, S. N. y J. A. Sweigard. 1980. Cytochalasin A inhibits spore germination and hyphal tip growth in *Gibbertella persicaria*. *Experimental Mycology*. 4: 239-250.
- Grove, S. N. y J. A. Sweigard. 1996. Apical cytoplasmic organization and polar growth in *Rhizoctonia solani* are modified by cytochalasins. *World Wide Web Journal of Biology online*. <http://epress.com/w3jbio/growve/grove.htm>
- Gunning, P. 2008. Tropomyosin. *Bioscience Chapter Database*. Chapter 3662. <http://www.eurekah.com/chapter/3662>
- Gupta, G. D. y I. B. Heath. 1997. Actin disruption by latrunculin B causes turgor-related changes in tip growth of *Saprolegnia ferax* hyphae. *Fungal Genetics and Biology*. 21, 64-75.
- Harold, F. M. y R. L. Harold. 1992. Configuration of actin microfilaments during sporangium development in *Achlya bisexualis*: comparison of two staining protocols. *Protoplasma*. 171: 110-116.
- Harris, S. D., N. D. Read, R. W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann, M. Momany. 2005. Polarisome meets Spitzenkörper: Microscopy, genetics and genomics converge. *Eukaryotic cell Minireviews*. 4 (2): 225-229.
- Hasek J., y S. Bartnicki-García. 1994. The arrangement of F-actin and microtubules during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores. *Archives of Microbiology*. 161: 363–369.
- Heath, I. B. 1987. Preservation of a labile cortical array of actin filaments in growing hyphal tips of the fungus *Saprolegnia ferax*. *European Journal of Cell Biology*. 44, 10-16.

- Heath, I. B. 1995. The cytoskeleton. The Growing Fungus. Editores Gow N. A. R. y G. M. Gadd. Chapman Hall, London, pp. 99–134.
- Heath, I. B., G. Gupta y S. Bai. 2000. Plasma membrane-adjacent actin filaments, but not microtubules, are essential for both polarization and hyphal tip morphogenesis in *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 30: 45–62.
- Hickey, P. C., D. J. Jacobson, N. D. Read, y N. L. Glass. 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 37: 109-119.
- Howard, R. J. 1981. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *Journal of Cell Science*. 48: 89-103.
- Huckaba, T. M., A. C. Gay, L. F. Pantalena, H. C. Yang, L. A. Pon. 2004. Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomas and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. 167 (3): 519-530.
- Kaksonen, M., Y. Sun, Drubin. 2003. A Pathway for Association of Receptors, Adaptors, and Actin during Endocytic Internalization. *Cell*. 115: 475-487.
- Ketelaar, T., C. Faivre-Moskalenko, J. J. Esseling, N. C. A. de Ruijter, C. Grierson, M. Dogterom y A. M. C. Emons. 2002. Positioning of nuclei in Arabidopsis root hairs: An actin regulated process of tip growth. *Plant Cell*. 14: 2941–2955.

- Kost, B., P. Spielhofer; N-H. Chua. 1998. A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vitro* and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *The Plant Journal*. 16 (3): 393-401.
- Kübler, E. y H. Riezman. 1993. Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 12 (7): 2855-2862.
- Li, S., L. Du, G. Yuen y S. Harris. 2006. Distinct Ceramide Synthases Regulate Polarized Growth in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*. 17: 1218–1227
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell. 2004. *Molecular Cell Biology*. Fifth edition. W. H. Freeman, E. U. A. 779-787 pp.
- López-Franco, R. y Ch. Bracker. 1996. Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma*. 195: 90-111.
- McDaniel, D. P. y R. W. Roberson. 2000. Microtubules Are Required for Motility and Positioning of Vesicles and Mitochondria in Hyphal Tip Cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genetics and Biology*, 31 (3): 233-244.
- Miller, D.D., S.A. Lancelle, P.K. Hepler. 1996. Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lillium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma*. 195: 123-132.

- Miller, R.K., D. Matheos, y M.D. Rose. 1999. The cortical localization of the microtubule orientation protein, Kar9p, is dependent upon actin and proteins required for polarization. *Journal of Cell Biology*. 144: 963-975.
- Moseley, J. B. y B. L. Goode. 2006. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70 (3): 605-645.
- Ramos-García, L. 2006. Papel del flujo citoplasmático y las proteínas motoras asociadas a los microtúbulos en el desplazamiento nuclear en hongos filamentosos. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. 62 pp.
- Riezman, H., A. Munn, M. I. Geli y L. Hicke. 1996. Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences Journal*. 52 (12): 1033-1041.
- Riquelme, M., C. G. Reynaga-Peña, G. Gires y S. Bartnicki-García. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology*. 24: 101–109.
- Sabanero, M. y R. Zazueta. 1989. Actin in *Mucor rouxii*. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters*. 60 (2): 227–231
- Šamaj, J., F. Baluška, B. Voigt, M. Schlicht, D. Volkmann y Diedrik Menzel. 2004. Endocytosis, Actin Cytoskeleton, and Signaling. *Plant Physiology*. 135: 1150-1161.

- Sheahan, M. B., C. J. Staiger, R. J. Rose y D. W. McCurdy. 2004. A Green Fluorescent Protein Fusion to Actin-Binding Domain 2 of Arabidopsis Fimbrin Highlights New Features of a Dynamic Actin Cytoskeleton in Live Plant Cells. *Plant Physiology*. 136: 3968-3978.
- Small, J.-V., K. Rottner, P. Hahhne y K. I. Anderson. 1999. Visualizing the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique*. 47: 3-17.
- Smith, L.G. y D. G. Oppenheimer. 2005. Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21: 271-295.
- Taheri-Talesh, N., T. Horio, L. Araujo-Bazán, X. Dou, E. A. Espeso, M. A. Peñalva, S. A. Osmani y B. R. Oakley. 2008. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*. 19: 1439-1449.
- Tanabe, S. y T. Kamada. 1996. Dynamics of the actin cytoskeleton, hyphal tip growth and the movement of the two nuclei in the dikaryon of *Coprinus cinereus*. *Mycoscience*. 37: 339-344.
- Tinsley, J. H., I. H. Lee, P. F. Minke, M. Plamann. 1998. Analysis of actin and actin-related protein 3 (ARP3) gene expression following induction of hyphal tip formation and apolar growth in *Neurospora*. *Molecular and General Genetics*. 259: 601±609.
- Torralba, G., M. Raudaskoski, A. M. Pedregosa y F. Laborda. 1998. Effect of Cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*. 144: 45-53.

- Uchida, M, R. R. Mouriño-Pérez, M. Freitag, S. Bartnicki-García, R. W. Roberson. 2008. Microtubule dynamics and the role of molecular motors in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 45(5):683-92
- Upadhyay, S. y B. Shaw. 2008. The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 68 (3): 690-705.
- Vida, T. A. y S. D. Emr. 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*. 128 (5): 779-792.
- Virag, A y J.A. Griffiths. 2004. A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 213-225.
- Walker, S. A. y A. Garrill. 2006. Actin microfilaments in fungi. *Mycologist* 20: 26-31.
- Walther, A. y J. Wendland. 2003. Review: Septation and cytokinesis in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 40 (3): 187-196.
- Wang, Y., Ch. M. Motes, D. R. Mohamalawari, y E. B. Blancaflor. 2004. Green Fluorescent Protein Fusions to *Arabidopsis* Fimbrin 1 for Spatio-Temporal Imaging of F-Actin Dynamics in roots. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 59 (2): 79-93.
- Yang, H. C. y L. A. Pon. 2002. Actin cable dynamics in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (2): 751-756.

## **10. Apéndice I: medios de cultivo**

### Sales de Vogel 50 x (1 L)

En 750 ml de agua destilada, agregar en orden y mezclar en a temperatura ambiente:

Na <sub>2</sub> citrato, 5 ½ H <sub>2</sub> O	150 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhídrido	250 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , anhídrido	100 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10 g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	5 g
Solución de elementos traza	5 ml
Solución de biotina	2.5 ml

Agregar 2 ml de cloroformo como preservativo

Almacenar a 4 °C.

### Medio Completo de Vogel-agar 1.5 % (1 L)

Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	20 g
Agar	15 g
Extracto de levadura	0.5 g
Caseína	0.5 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por autoclave

### Medio Completo de Vogel líquido (1 L)

Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	20 g
Extracto de levadura	0.5 g
Caseína	0.5 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

Esterilizar por autoclave

### Medio Mínimo de Vogel-Agar 1.5 %(1 L)

Sales de Vogel 50 X	20 ml
Sacarosa	15 g

Agar 15 g  
Agua destilada Aforar a 1 L  
Esterilizar por autoclave

Medio Mínimo de Vogel líquido (1 L)

Sales de Vogel 50 X 20 ml  
Sacarosa 15 g  
Agua destilada Aforar a 1 L  
Esterilizar por autoclave

Medio agar agua (1 L)

Sales de Vogel 50 X 20 ml  
Agar 15 g  
Agua destilada Aforar a 1 L  
Esterilizar por autoclave

Medio Sintético de Cruzas (1 L)

KNO<sub>3</sub> 0.50 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.35 g  
KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> 0.25 g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.25 g  
NaCl 0.05 g  
Elementos traza 50 µl  
Biotina 50 µl  
Agar 10 g  
Agua destilada Aforar a 500 ml  
Esterilizar por autoclave

Solución de elementos traza (100 ml)

En 95 ml de agua destilada disolver con agitador magnético sucesivamente las siguientes soluciones:

ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 5 g  
Ácido cítrico · 1 H<sub>2</sub>O 5 g  
Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 1 g  
CuSO<sub>4</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 0.25 g  
MnSO<sub>4</sub> · 1 H<sub>2</sub>O 0.05 g

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> anhidrido	0.05 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.05 g

Al volumen final de aproximadamente 100 ml, agregar 1 ml de cloroformo como preservativo. Se almacena a temperatura ambiente.

#### L-histidina (25 mg ml<sup>-1</sup>)

L-histidina	1.25 g
Agua destilada	50 ml
Esterilizar por filtración (0.25 µg)	

#### Solución FIGS 10 x (1 L)

Sorbosa	200g
Fructosa	5 g
Glucosa	5 g
Inositol	2 g
Agua destilada	Aforar a 1 L
Esterilizar por filtración (0.22 µm)	

#### Medio FIGS-Agar 1 % (1 L)

Sales de Vogel 50X	20 ml
Agar	10 g
Agua destilada	880 ml
Solución FIGS 10 X	100 ml después de esterilizar

#### Medio de regeneración (1 L)

Sales de Vogel 50 X	6 ml
Sorbitol	54.6 g
Extracto de levadura	6 g
H <sub>2</sub> O destilada	252 ml
Solución de FIGS 10 X	30 ml después de esterilizar

#### Medio LB-Agar 1.5 % (1 L)

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	15 g

NaCl                      10 g  
Agar                        20 g  
Agua destilada        Aforar a 1 L  
Esterilizar por autoclave

Medio LB líquido (1 L)

Bacto-triptona        10 g  
Extracto de levadura   15 g  
NaCl                      10 g  
Agua destilada        Aforar a 1 L  
Esterilizar por autoclave