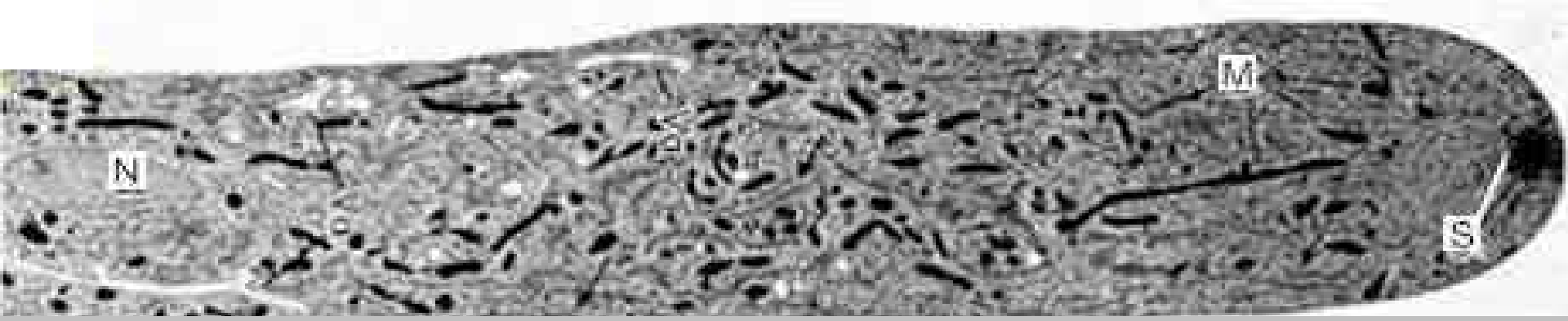
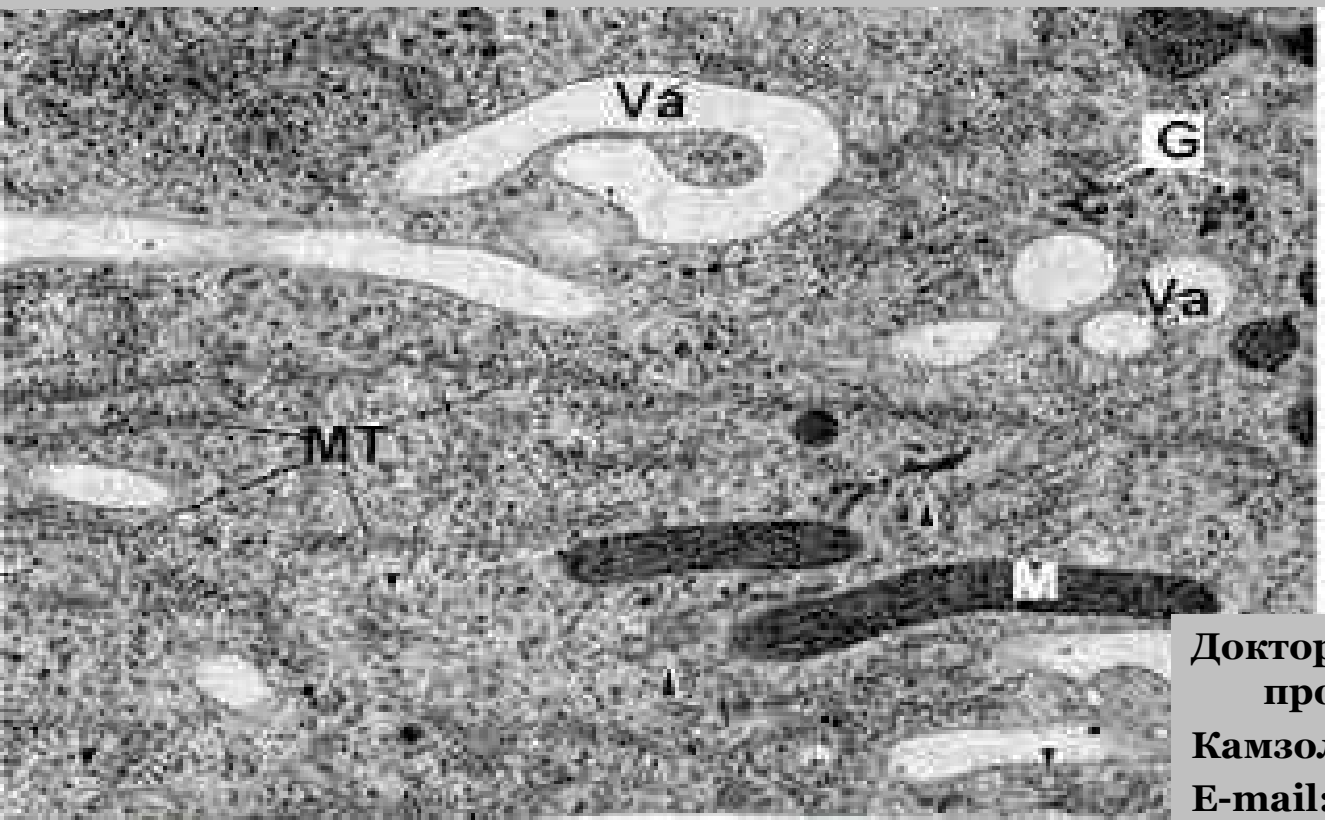
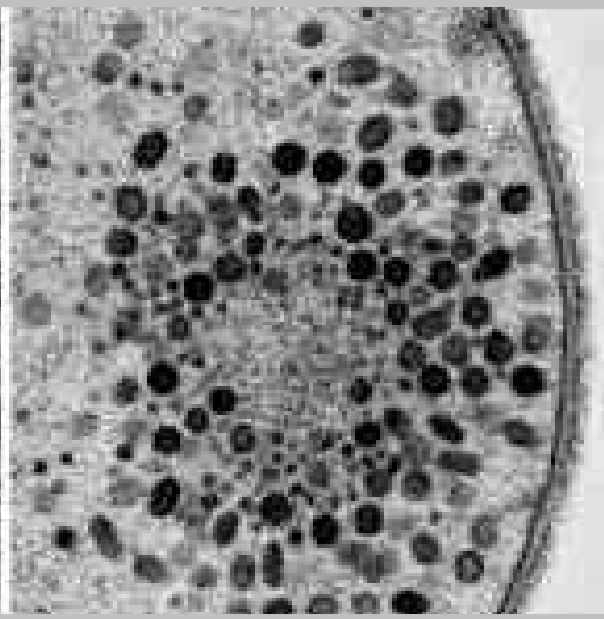


ЦИТОЛОГИЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ РОСТА ГРИБОВ





Доктор биологических наук, профессор

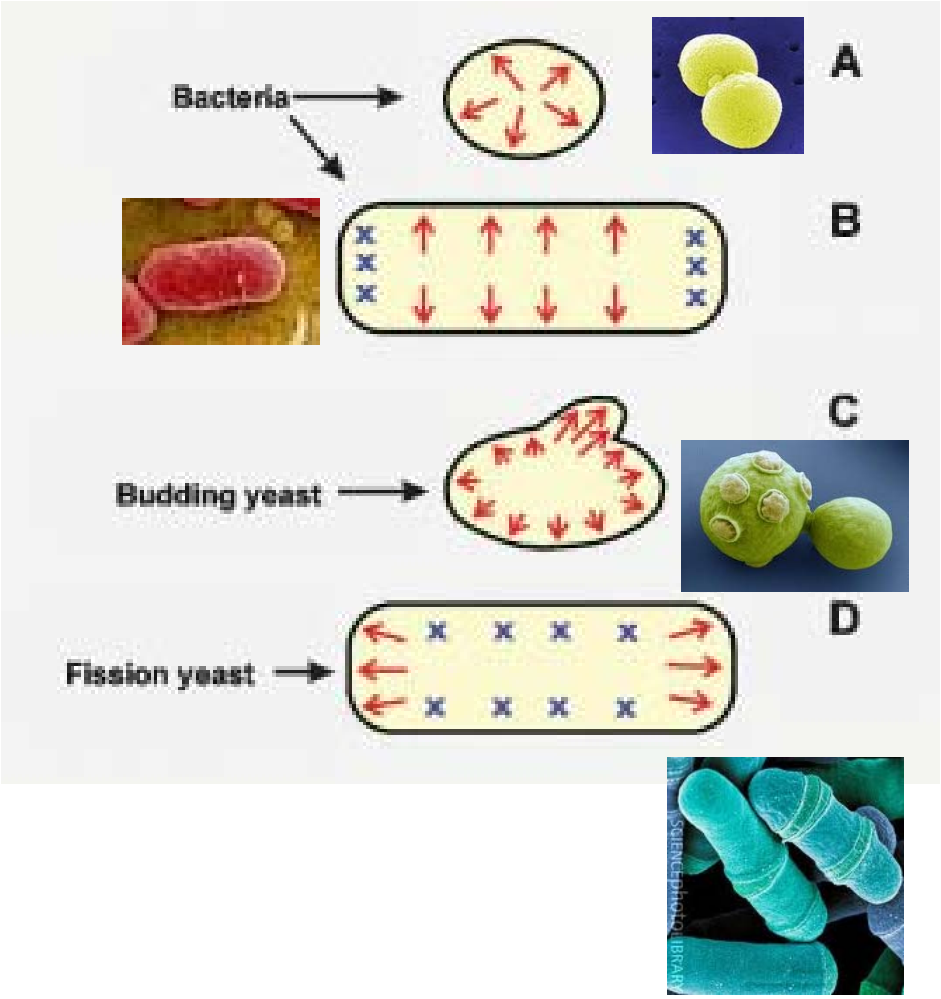
Камзолкина Ольга Владимировна

E-mail: o-kamzolkina@yandex.ru

Вопросы, которые будут затронуты:

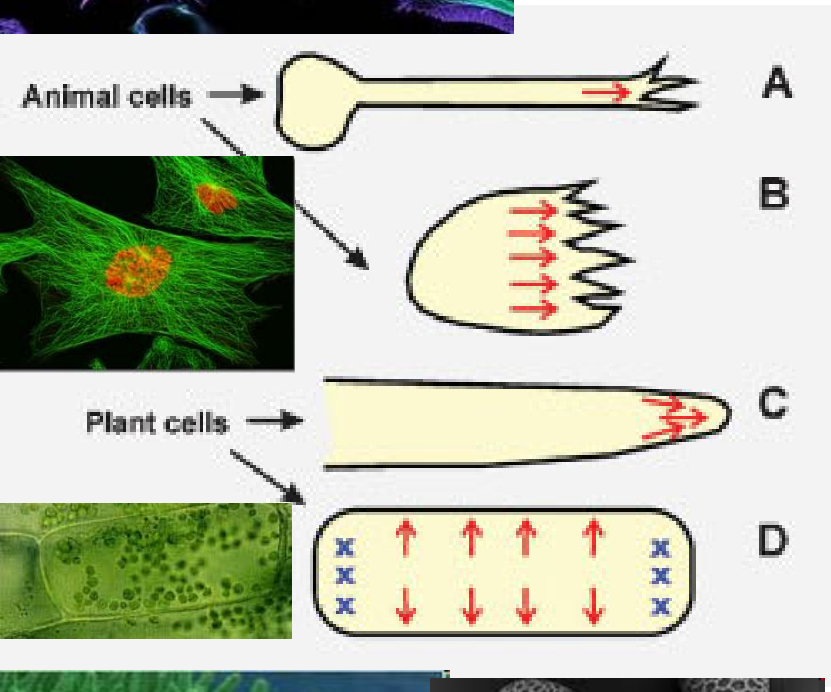
- Морфология клеток про- и эукариот.
- Изодиаметрический и полярный рост клеток грибов.
- Полярный рост клеток дрожжей и мицелиальных грибов (сходство и различие).
- Структура апикального кончика гифы у грибов и псевдогрибов.
- Молекулярные механизмы полярного роста на примере модельных объектов одноклеточных и мицелиальных грибов.

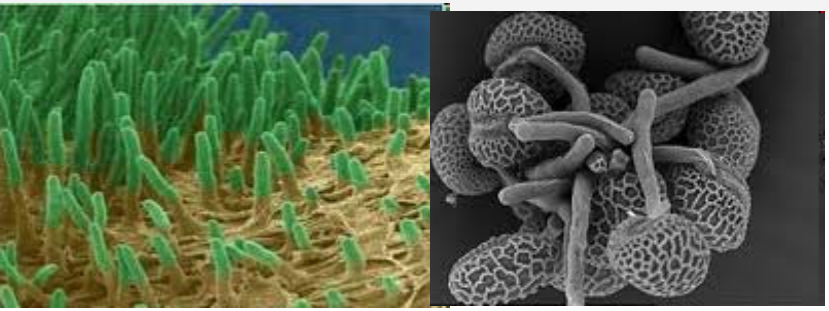
Морфология клеток у прокариот и одноклеточных эукариот (Baluška et al., 2003).



- A: Округлые клетки бактерий растут по всей поверхности клетки (красные стрелки).
- B: Палочковидные бактерии имеют не растущие концы полюса (синие стрелки) в то время как оставшаяся часть периферии растет равномерно.
- C: Рост почкующихся дрожжей зависит от клеточного цикла, в интерфазу рост по всей периферии клетки (изотропный) во время формирования новой почки в стадии митоза и цитокинеза происходит полярное накопление экзоцитозных везикул.
- D: Полярность делящихся дрожжей противоположна бактериальной полярности. Только концы полюса растут в то время как оставшаяся часть периферии клетки не растет. Красные стрелки показывают сайты роста, синие крестики отмечают не растущие места.

Морфология клеток у многоклеточных эукариот (Baluška et al., 2003).



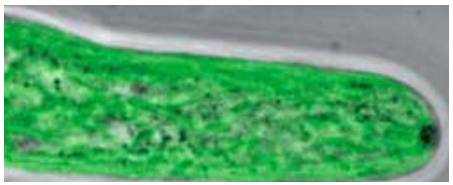


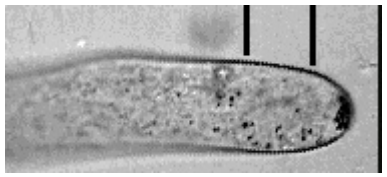
- A: Одним из наиболее ярких примеров крайне поляризованных клеток животных – нейроны, которые состоят из не растущего тела клетки с ядром и векторно растущего аксона.

B: Подвижные клетки животных подобно фибробластам поляризованы на растущих концах.

C: Апикально растущие грибы и клетки водорослей, корневые волоски и пыльцевые трубки высших растений также включают рост на самых кончиках, в то время как оставшаяся часть периферии клетки не растет . Это приводит к характерной трубчатой форме клеток и обеспечивает транспорт питательных веществ от кончика к центру колонии (грибов).

D: Растяжение клеток высших растений уникально для эукариот, так как их полярность основана на не растущих концах полюсах в то время как оставшаяся периферия растет равномерно. Соответственно растяжение растительных клеток происходит как у палочковидных бактерий при формообразовании их клеток. Однако в отличие от палочковидных бактерий эти не растущие концы клеток на полюсах вытягивающихся клеток растений не инертны, но участвуют в процессе эндоцитоза. Красные стрелки обозначают места роста, синие кресты указывают на не растущие места.



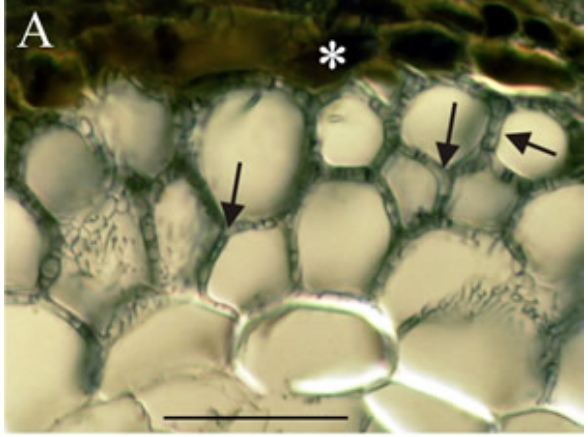


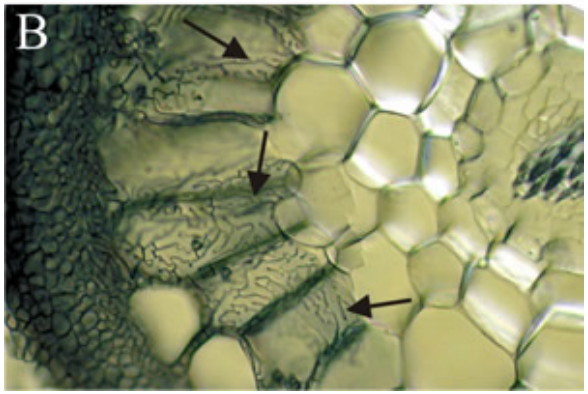
Полярность клеток.

Наблюдаемая в разных формах в разных типах и видов клеток клеточная полярность определяется двумя фундаментальными признаками:

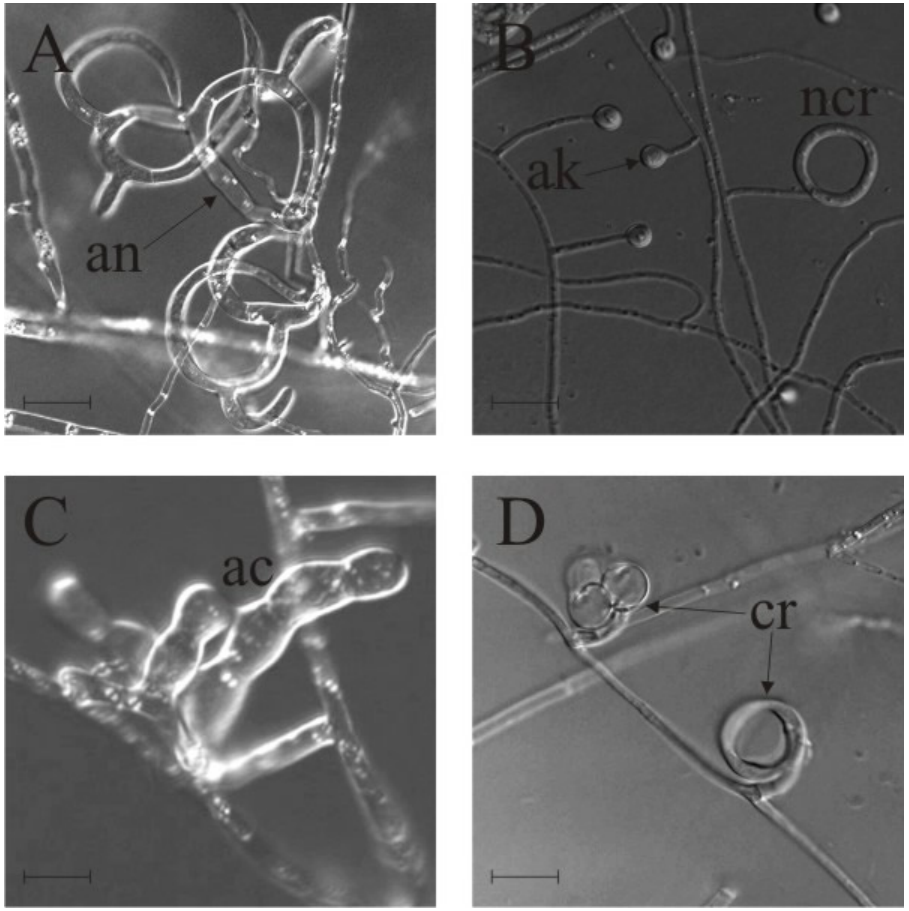
- асимметричным накоплением мобильных элементов (часто регуляторных молекул) между противоположными полюсами клетки;

- ориентированной организацией полярных элементов цитоскелета (в частности актина и микротрубочек) вдоль оси полярности.





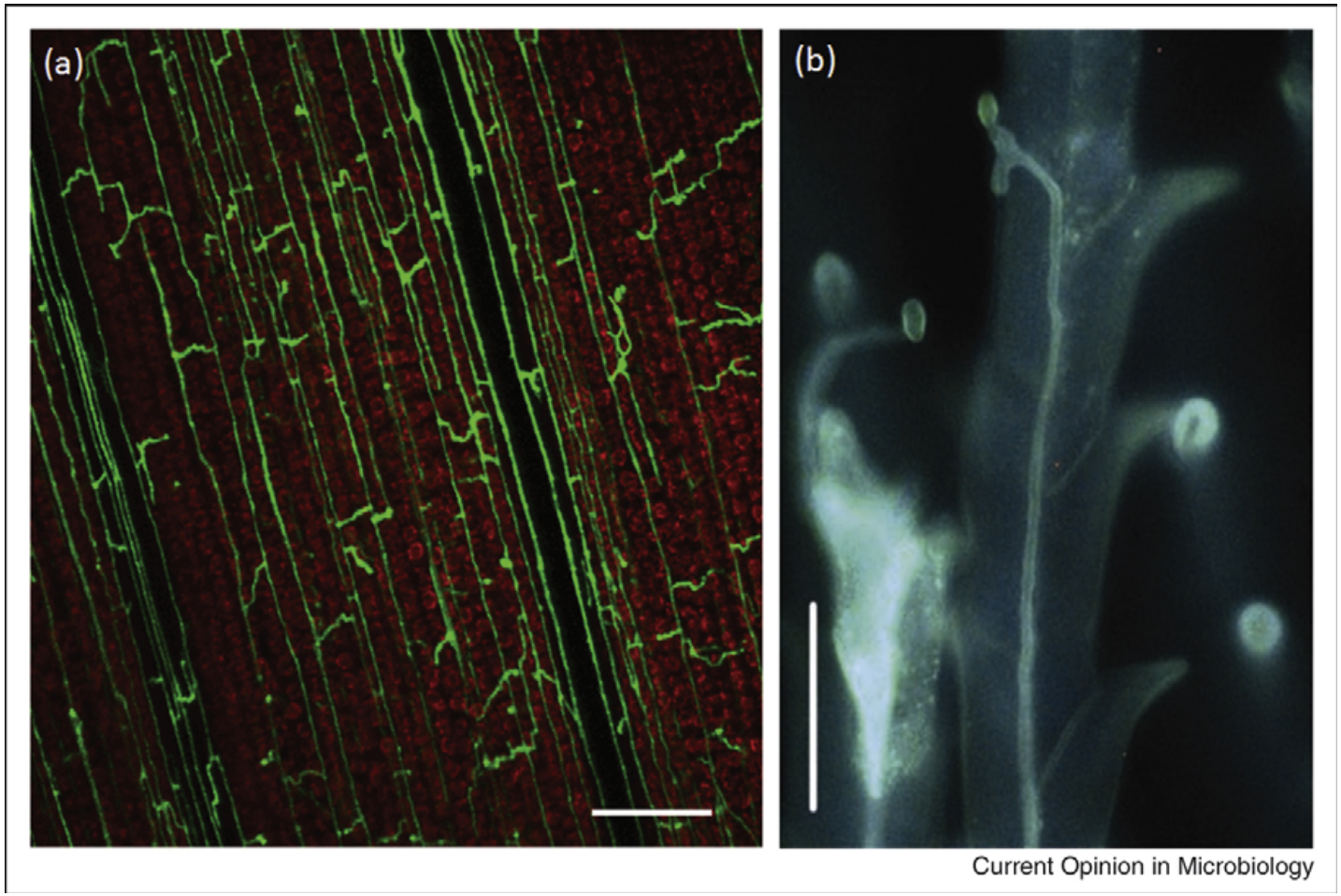
- Грибы генерируют разнообразный клеточный морфогенез для заселения субстрата и адаптации к условиям окружающей среды.



Мицелиальный таллом.
Ксилотрофы.

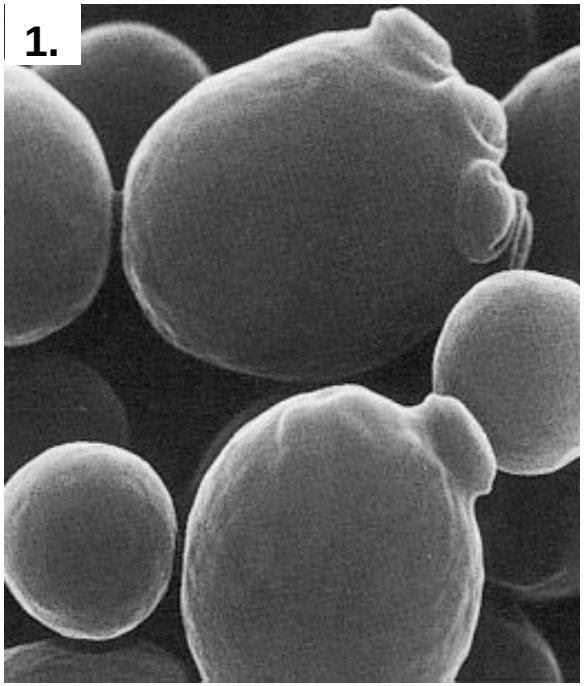
Fomitopsis pinicola

Мицелиальный таллом.
Эндофиты и фитопатогены.



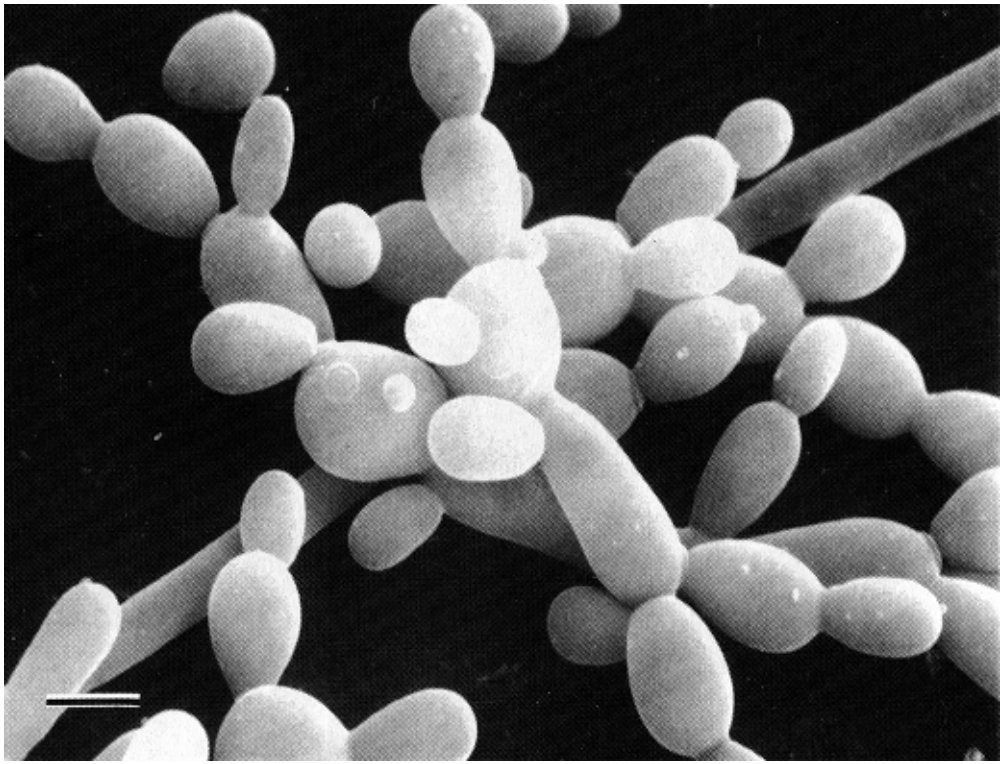
Tropic growth of fungi within plant tissues. (a) Intercalary hyphal extension by Epichloe¨ endophytes in elongating grass leaves [21]. Bar represents 100 mm. (Courtesy of C Voisey.) (b) Fluorescence microscopy of C. purpurea hyphae growing within a stigmatic hair towards the ovary of a rye plant [22]. Bar represents 20 mm.(Brand and Gow, 2009)

Дрожжевой таллом.

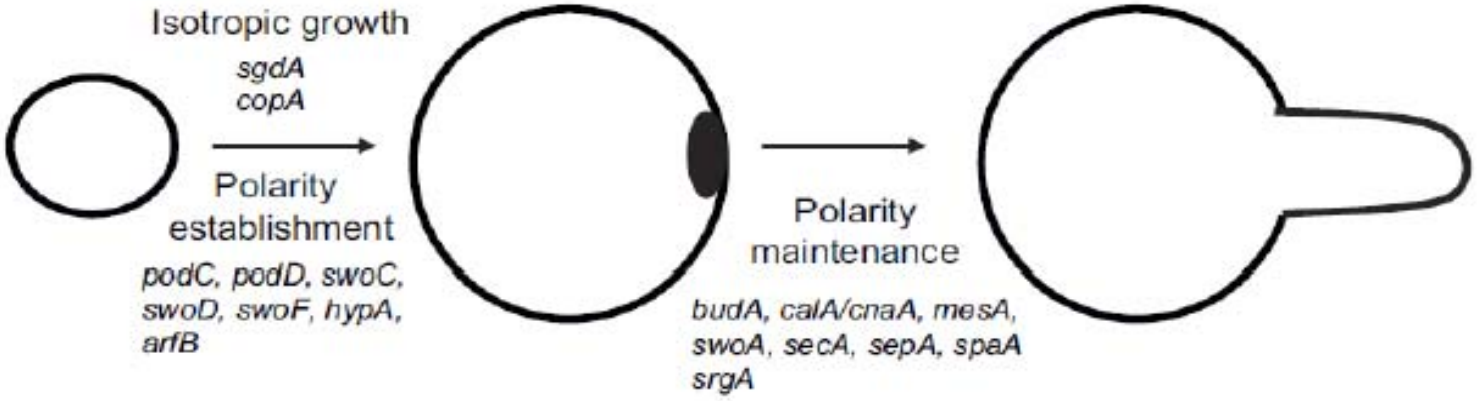


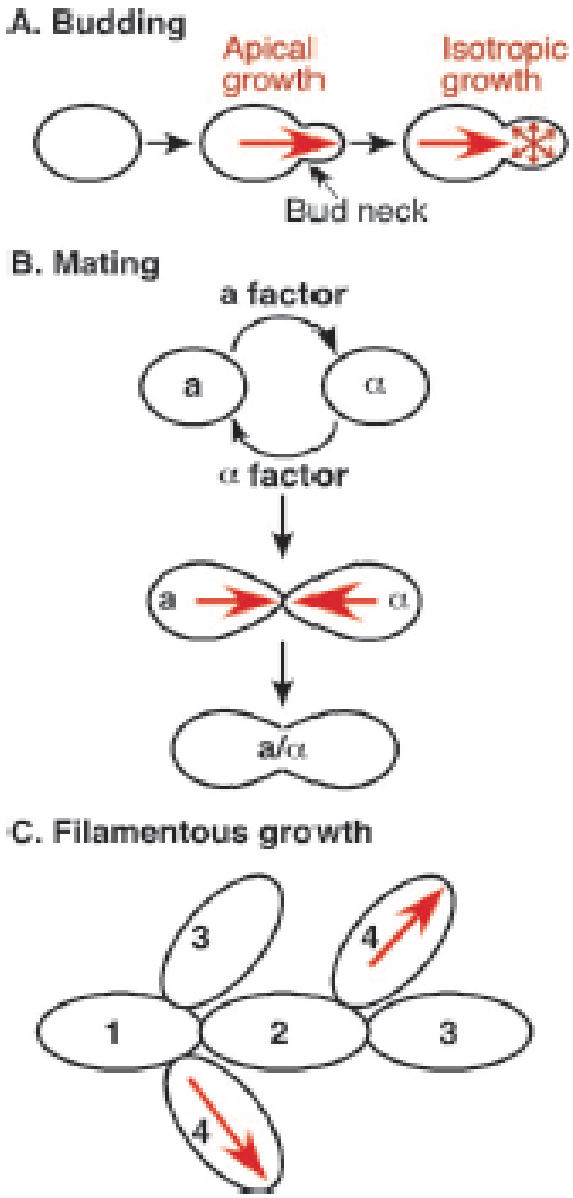
1- почкующиеся дрожжи, 2- делящиеся дрожжи

Псевдомицелий.



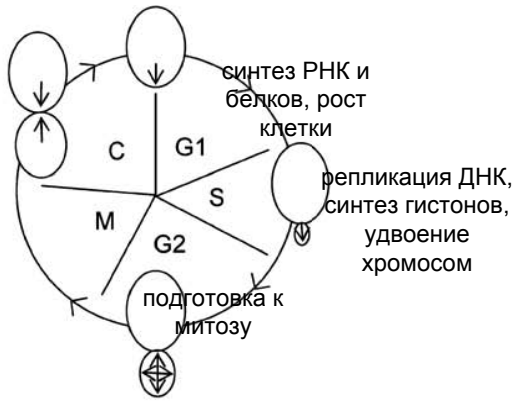
Изодиаметрический рост (споры, дрожжи на некоторых стадиях клеточного цикла).

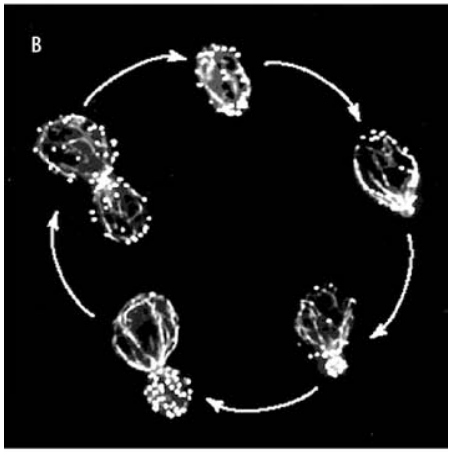


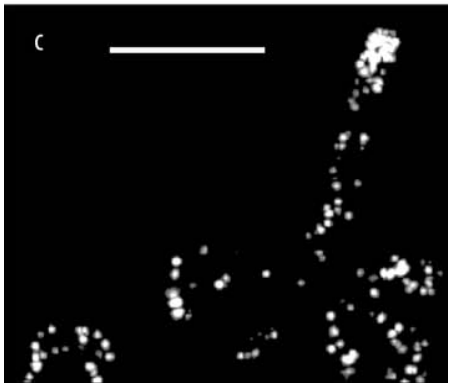


Полярный рост в жизненном цикле почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Park and Bi, 2007).

Актин и полярный рост клеток грибов.





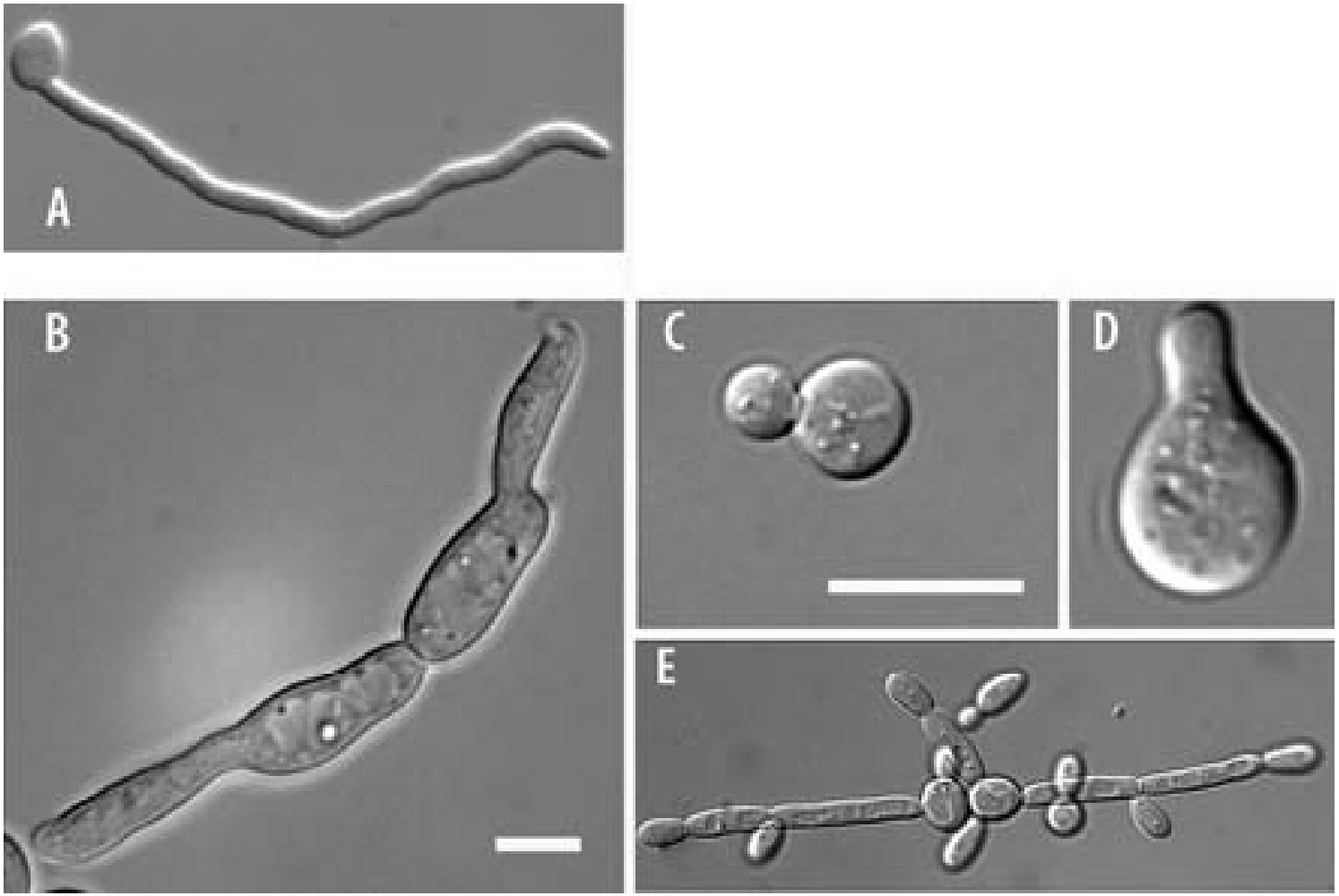


A Полярный рост связан с образцами поляризации актина: пока рост ограничен почкой, образец роста переключается от апикального к изодиаметрическому в стадии G2. После митоза (*M*) в процессе цитокинеза (*C*) рост направлен к почечному рубцу материнской клетке и связан с формированием вторичной септы

B Поляризация актинового цитоскелета в клеточном цикле *Sac. cerevisiae*. В непочкующихся клетках, кортикальные частицы актина собраны со стороны зарождающейся почки, вдоль которой ориентированы филаменты актина. В маленьких почках нити ориентированы к кончику почки, где собраны кортикальные частицы. В клетках с крупными почками актиновые нити направлены к почечному рубцу материнской клетки – актиновые нити и частицы не поляризованы в почке. После митоза они поляризуются в направлении почечного рубца материнской клетки (Phalloidin-TRITC; K. Ayscough).

C Поляризация актиновых кортикальных частиц у гиф *C. albicans* (Abp-YFP; H. Crampin, unpublished data). *Bar* 5 μm Clb2 abrogated pseudohyphal growth (Ahn et al. 1999).

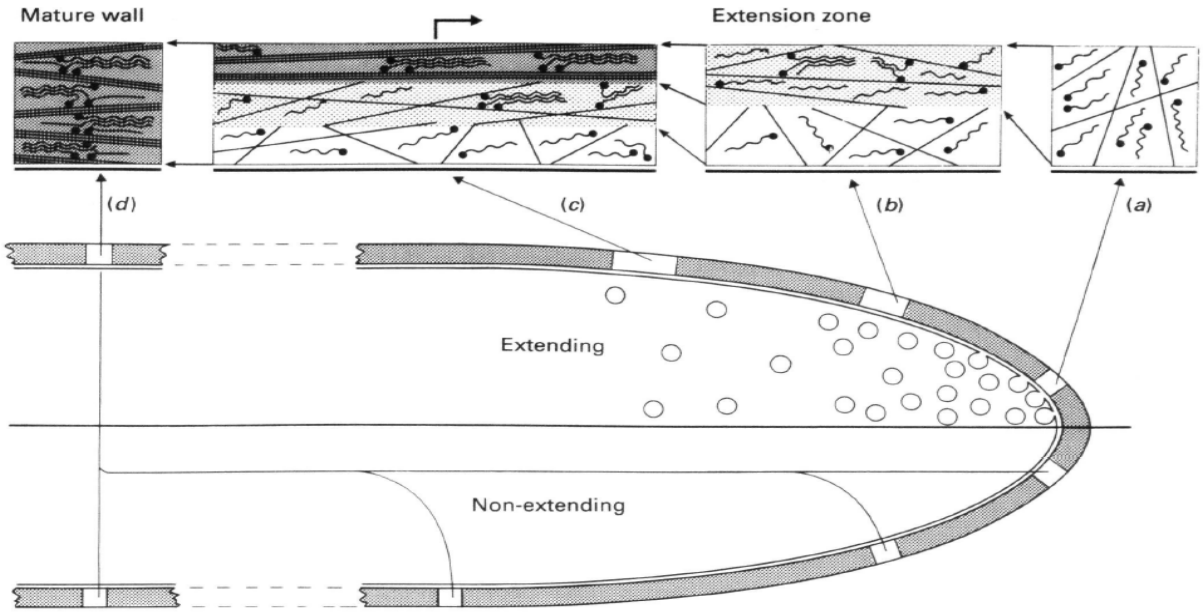
Образцы поляризованного роста у *Candida albicans* и *S.cerevisiae* (Sudnery, Court, 2007).



. **A** *C. albicans* hyphae (утрата циклинов G1), **B** *C. albicans* mating projection, **C** *Sac. cerevisiae* yeast, **D** *Sac. cerevisiae* mating projection, **E** *C. albicans* pseudohyphae (утрата циклинов G2) *Bars* 5 μm

Поляризованный рост мицелия грибов.

- Вегетативное тело большинства грибов представлено мицелием, состоящим из сильно разветвленных гиф, растущих в определенном направлении за счет апикального роста гифы.
- Поляризованный рост – фундаментальная черта физиологии грибной клетки.

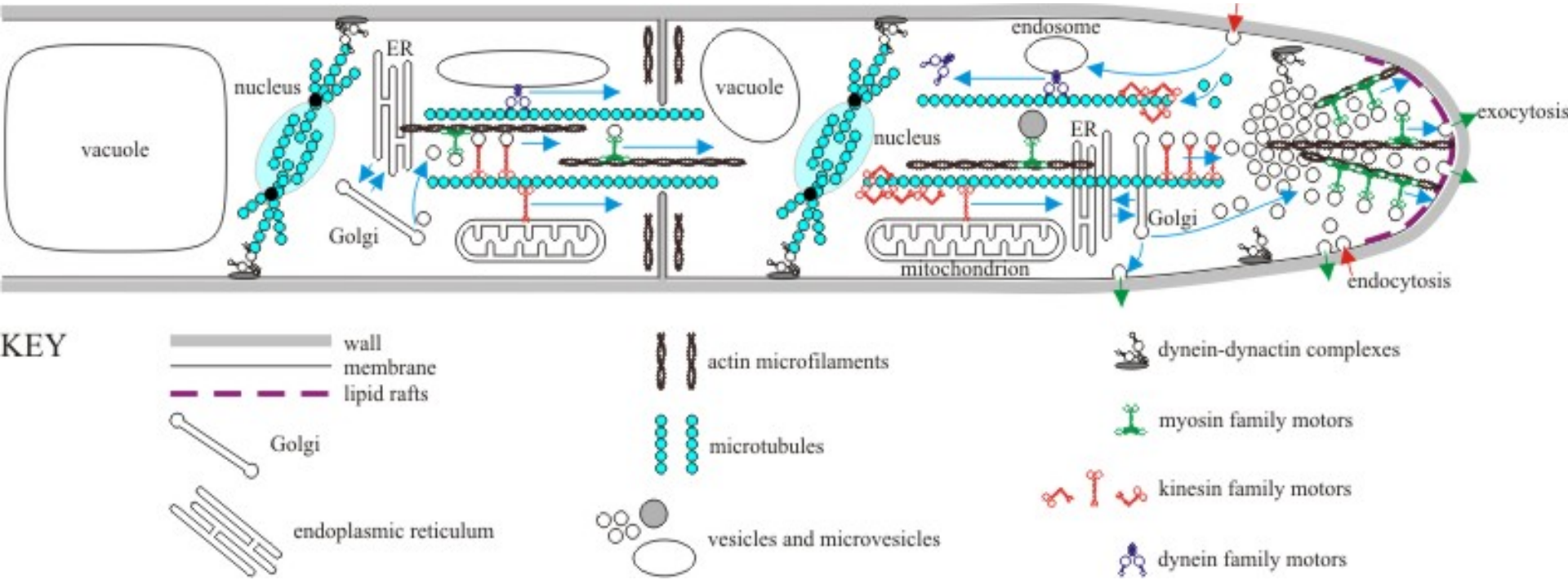


Wessels, 1993

- Поляризованный рост грибной гифы достигается ограниченным растяжением в районе апекса гифы.
- Клеточная стенка на кончике гифы имеет вязкоупругие свойства, в растяжение которой вносит вклад внутреннее давление в гифе. Тургорное давление действует как движущая сила для растяжения гифы грибов.
- Сзади кончика стенка затвердевает и сопротивляется силам тургорного давления, являющегося результатом осмотического давления в гифе.

- Растяжение гифы на апексе требует синтеза и встраивания нового материала стенки и новых мембран способом, который не ослабляет кончик.
- Этот высоко организованный процесс поддерживается постоянным течением везикул образующихся в цитоплазме и скоординирован с ростом и репликацией всех других цитоплазматических органелл, и их миграцией в сторону апекса.

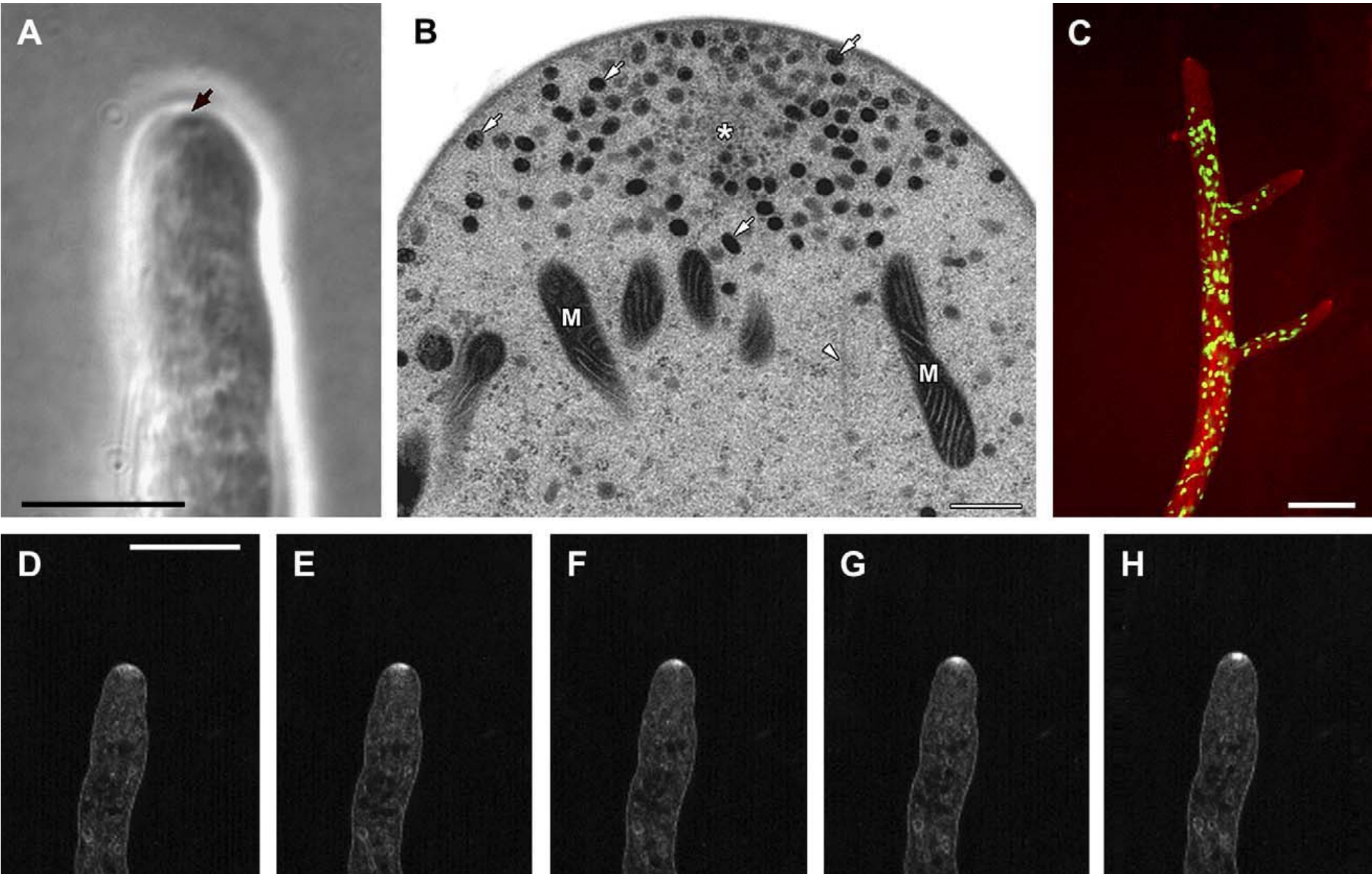
Обобщенная молекулярная модель роста гифы (Moore et al., 2011).



- Поляризованный рост септированного мицелия грибов связан с деятельностью цитоскелета, апикального тельца, полярисомы, экзоцисты, факторов полярности (белковых комплексов: Cdc42, Arp2/3 и др.).
- Поляризованный рост дрожжей и псевдомицелия не связан с апикальным тельцем.

Скорость роста грибов:
Neurospora crassa – 16 мкм/мин,
Saccharomyces cerevisiae – 0,16 мкм/мин

Апикальное тельце (Spitzenkörper) *Neurospora crassa* (Virag, Harris, 2005).



Впервые **апикальное тельце** было описано у фиксированных и окрашенных клеток двух видов рода *Coprinus* Brunswik (1924) с помощью световой микроскопии. Пионерской работой положившей начало в исследовании биологии Spitzenkörper (апикальное тельце) считается работа Girbardt (1957), проделанная с использованием фазово-контрастной микроскопии. Girbardt приводит первое описание Spitzenkörper для живой растущей гифы высших грибов, как темная в фазовом изображении структура, локализованная в грибе *Polystictus versicolor*. Его тщательное исследование растущей гифы показало,

- оно присутствует только в кончике растущей вегетативной гифы,
- образуется на месте прорастания споры и боковых ответвлений,
- локализовано в том месте гифы, которое коррелирует с направлением роста гифы.

Таким образом, **функции апикального тельца** – обеспечение апикального роста гифы и направленного синтеза клеточной стенки.

Далее были проведены детальные исследования ультраструктуры апикального тельца у разных групп грибо в 60-70-ые годы (Grove, Bracker), которые показали, что эт мультикомпонентный комплекс, в котором доминируют везикулы.

Цитология кончика гифы.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 1970, p. 989–1009
Vol. 104, No. 2
Copyright © 1970 American Society for Microbiology
Printed in U.S.A.

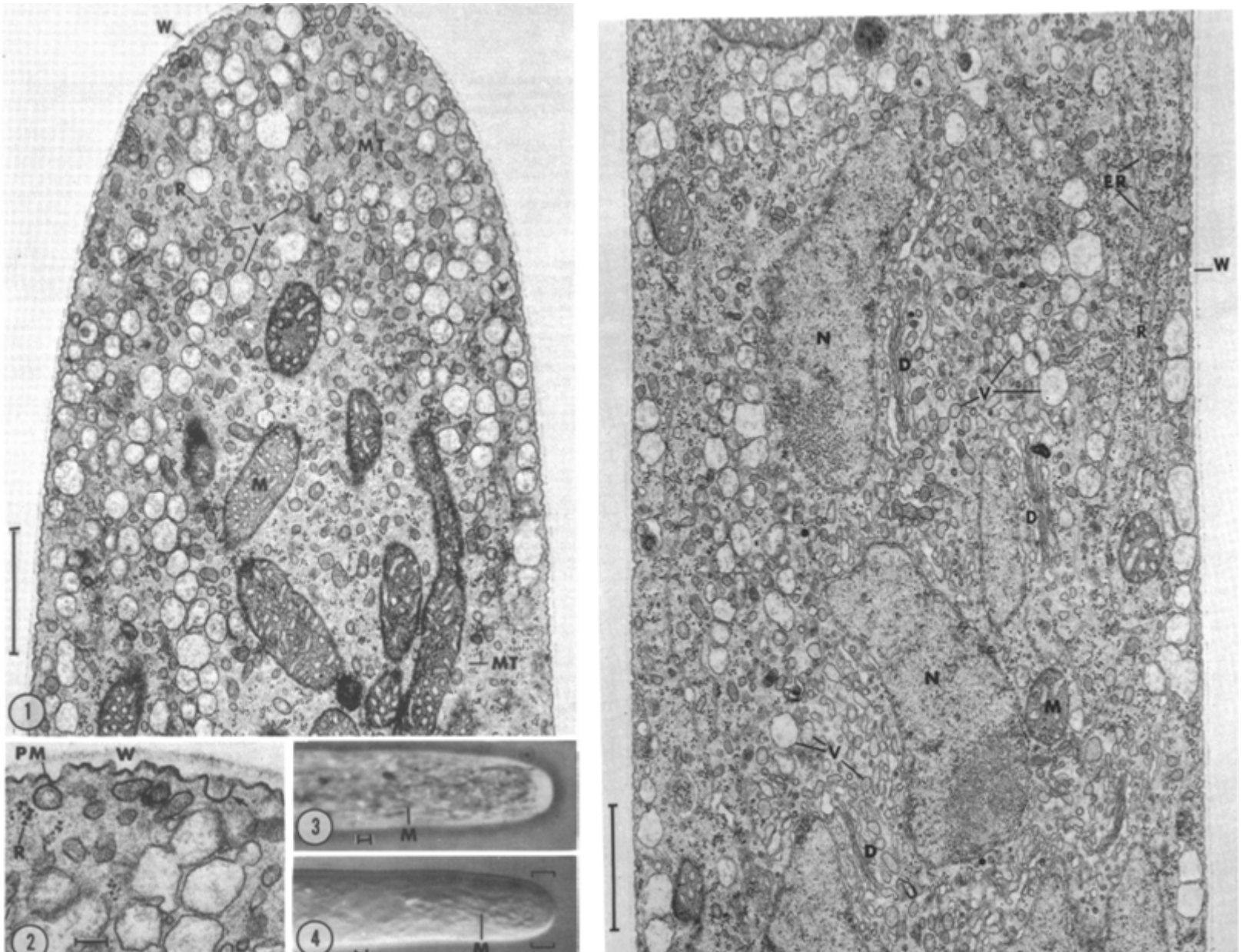
Protoplasmic Organization of Hyphal Tips Among Fungi: Vesicles and Spitzenkörper

STANLEY N. GROVE AND CHARLES E. BRACKER

MATERIALS AND METHODS

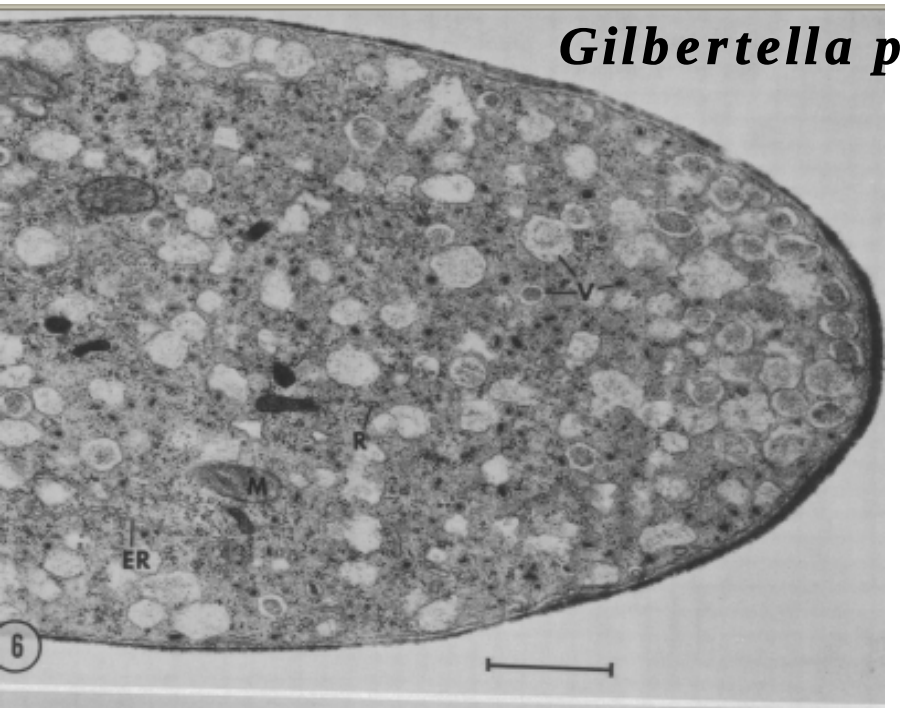
The following fungi were studied: *Oömycetes—P. aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick; *Zygomycetes—Gilbertella persicaria* (Eddy) Hesseltine; *Ascomycetes—Ascodesmis nigricans* van Tieghem, *Neurospora crassa* Shear and Dodge; *Basidiomycetes—Armillaria mellea* (Vahlex Fries) Quélet, *Rhizoctonia solani* Kuehn [imperfect stage of *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]; *Deuteromycetes—Aspergillus niger* van Tieghem, *Fusarium oxysporum* Schlectendahl f. sp. *lycopersici*, *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berth.

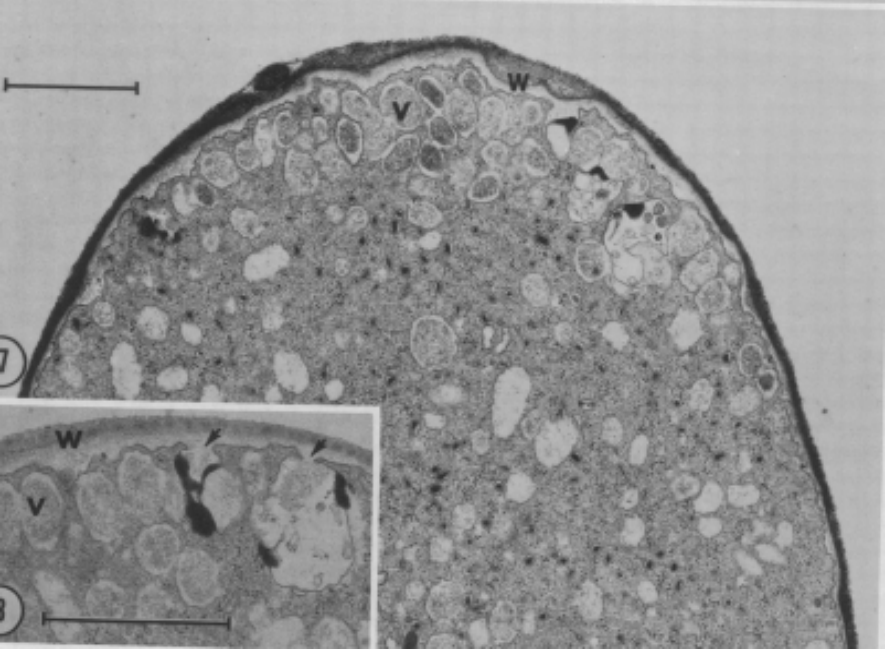
Цитология кончика гифы.
Pythium aphanidermatum (Oomycetes).

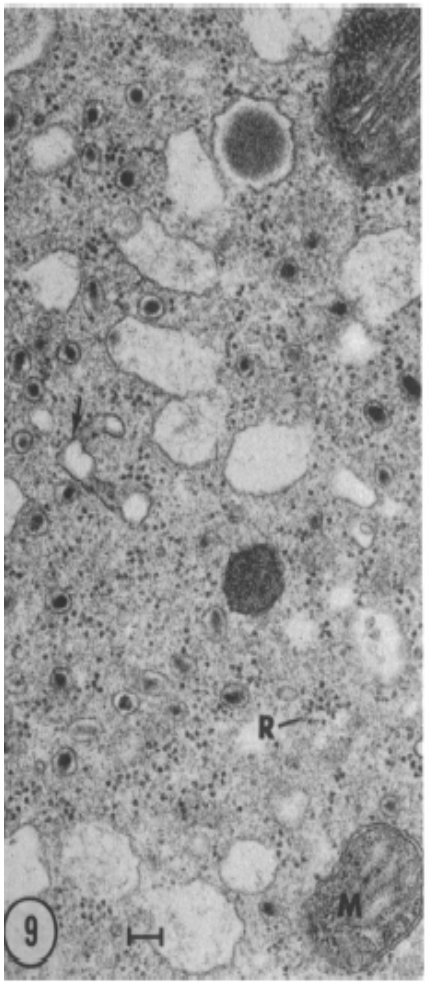


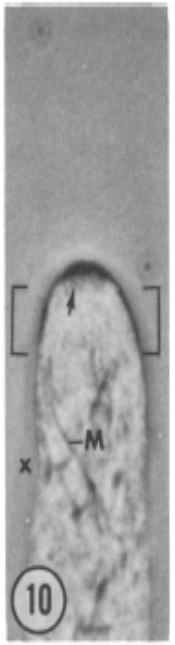
Цитология кончика гифы.

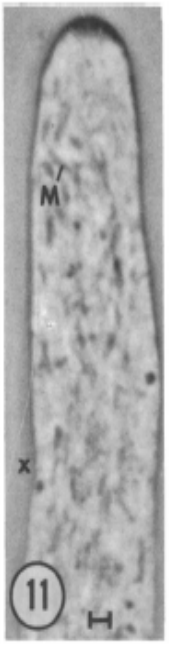
Gilbertella percicaria (Zygomycetes).

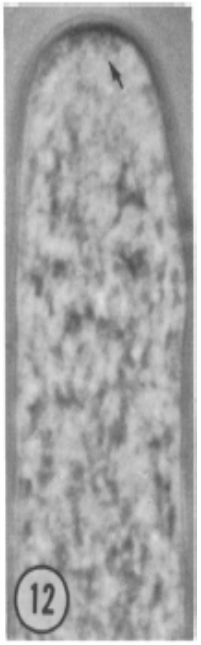


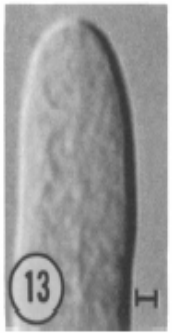


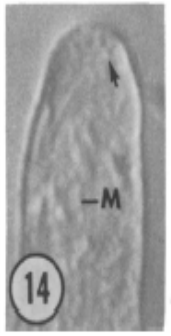


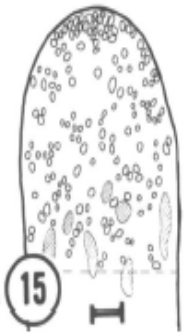




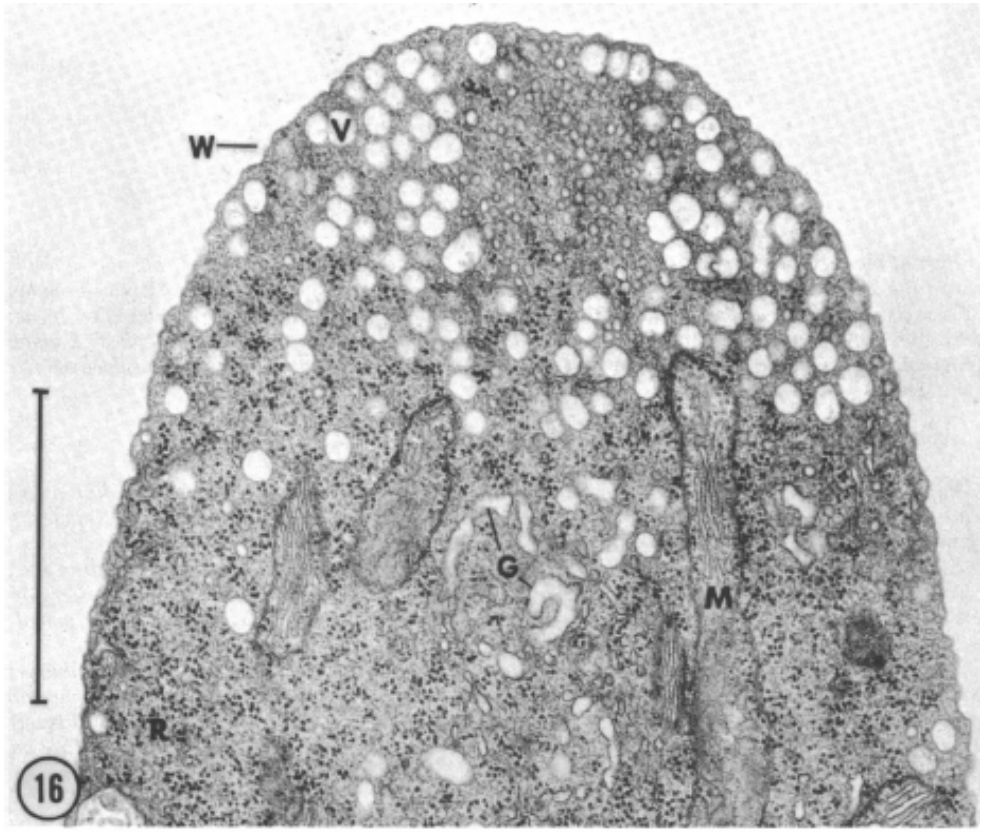


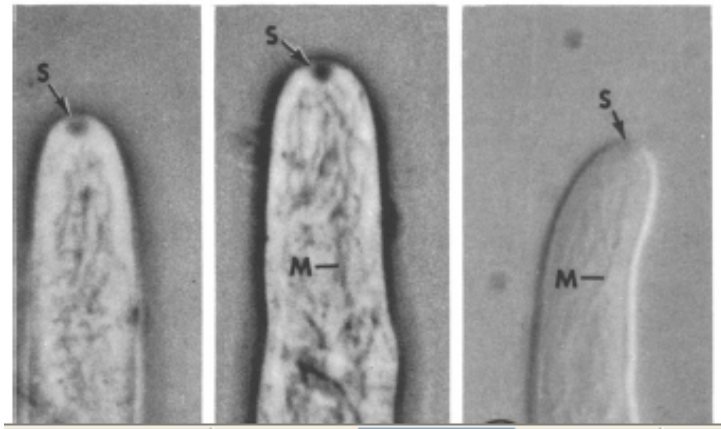




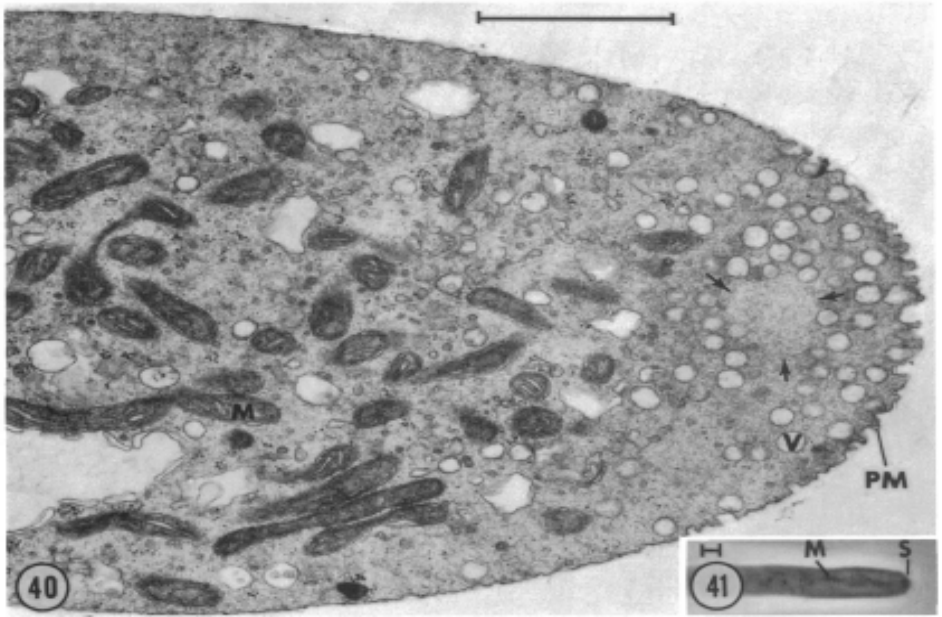


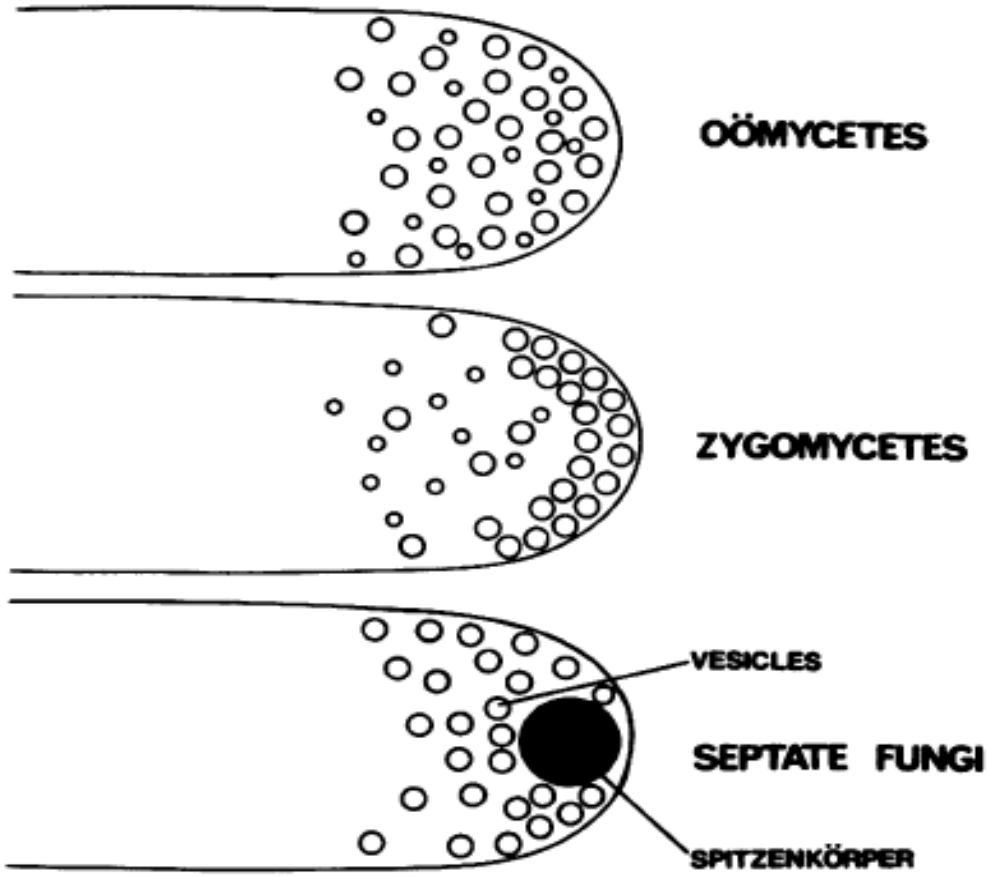
Цитология кончика гифы.
Aspergillus niger (Ascomycetes).





Цитология кончика гифы. *Armillaria mellea* (Basidiomycetes).





45

FIG. 45. *Diagrammatic comparisons of the principal forms of apical organization in hyphae, based on representatives from major taxonomic groups.*

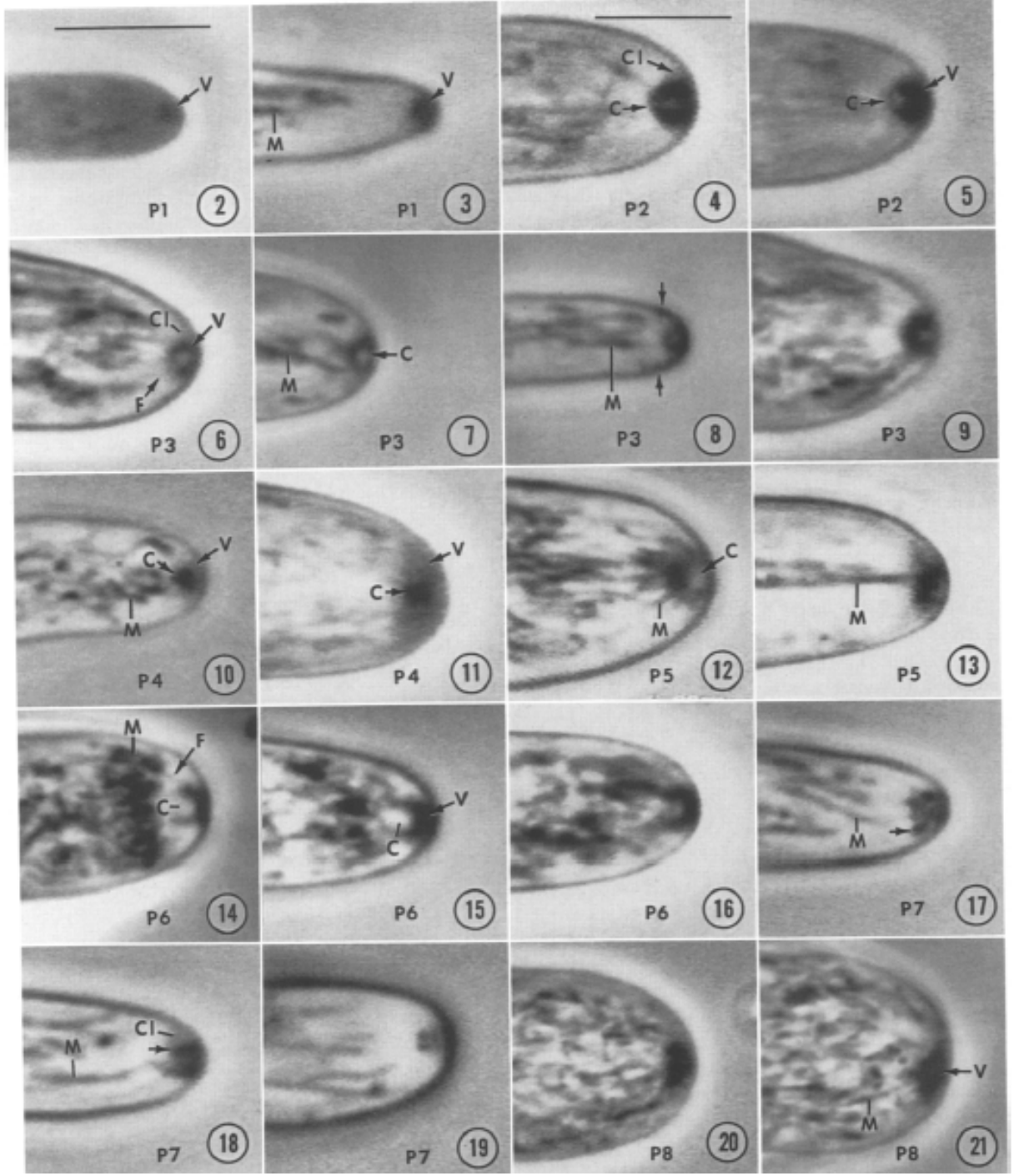
Цитология кончика гифы.

Protoplasma (1996) 195: 90–111

PROTOPLASMA
© Springer-Verlag 1996
Printed in Austria

Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi

Rosamaría López-Franco** and **Charles E. Bracker***



Разные типы апикальных тел

2-3 тип 1
4-5 тип 2
6-9 тип 3
10-11 тип 4
12-13 тип 5
14-16 тип 6
17-19 тип 7
20-21 тип 8

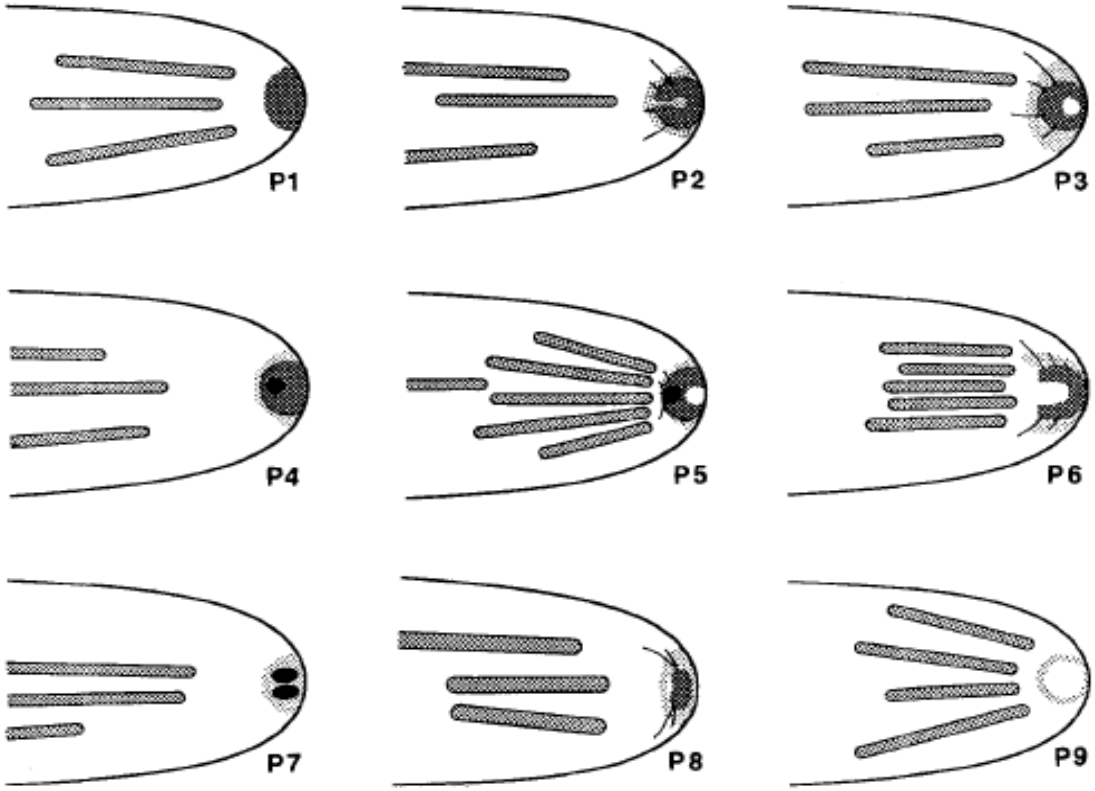
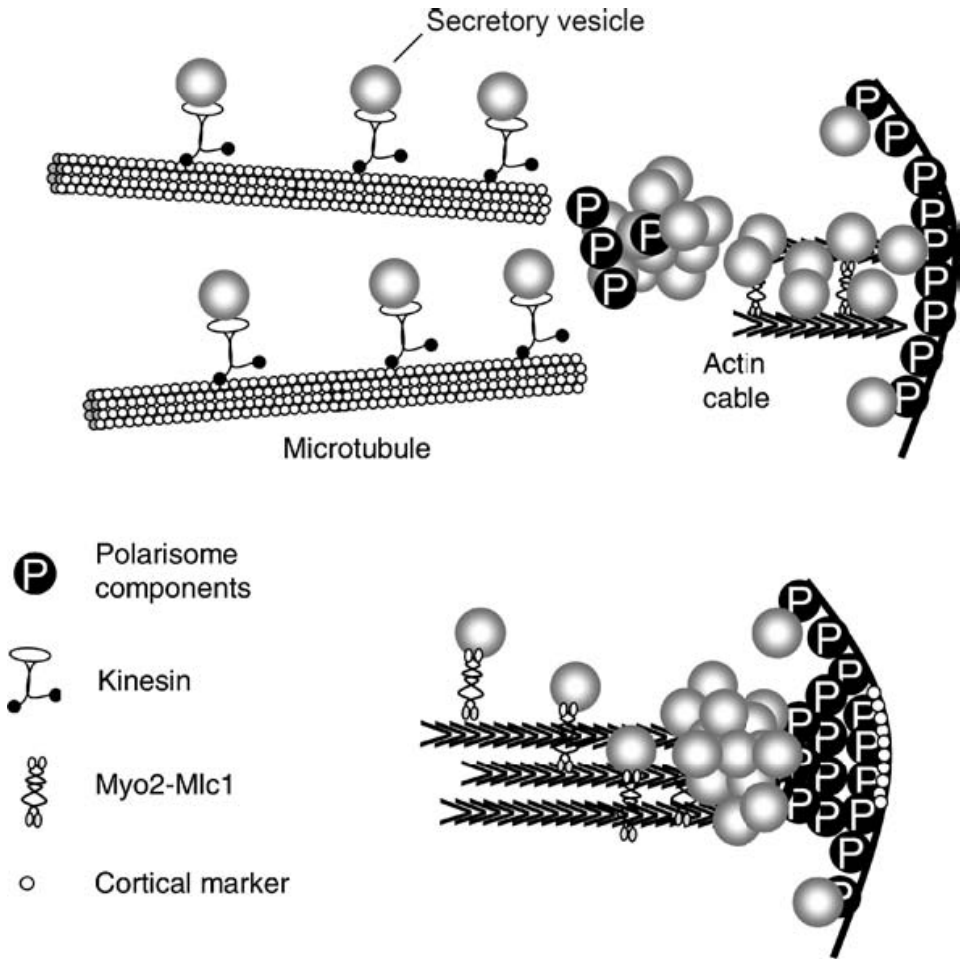


Fig. 22. Diagrammatic representation of the Spitzenkörper patterns (*P1–P9* pattern number). All Spitzenkörper diagrams are illustrated as they appeared with phase-contrast microscopy, and although there was some variation within each pattern the diagrams represent the most characteristic organization that could be interpreted from numerous videotaped images of each pattern. *P1* Spitzenkörper pattern 1. Dark vesicle cluster without a visible core. *P2* Pattern 2. Dark vesicle cluster open towards the back with a narrow light core extending to the rear of the vesicle cluster. *P3* Pattern 3. Dark vesicle cluster with an eccentric light core usually oriented towards the apical pole. *P4* Pattern 4. Gray vesicle cluster with an eccentric dark core located near the back of the cluster. *P5* Pattern 5. Gray vesicle cluster containing a light core oriented towards the apical pole and a dark core towards the back. *P6* Pattern 6. A cup-shaped dark vesicle cluster surrounding a large phase-light core. *P7* Pattern 7. A gray vesicle cloud containing two or more dark apical "granules". *P8* Pattern 8. Highly pleomorphic Spitzenkörper, often appearing with the vesicle cluster as a thick dark band within a vesicle cloud and with a small light core behind the vesicle cluster. *P9* Pattern 9. Diagrammatic representation of Spitzenkörper organization from *Allomyces mycrogynus* characterized by a large phase-light core surrounded by small apical vesicles (interpreted from Vargas et al. 1993, Srinivasan et al. 1996; and R. Roberson, Arizona State University, Tempe, AZ, unpubl. micrographs). Long mitochondria are seen behind the Spitzenkörper. Rods, mitochondria; light gray area, vesicle cloud; dark gray area, vesicle cluster; whiskers, cytoplasmic filaments; open circle, phase-light core; solid circle, phase-dark core; solid ovoids, crystalline inclusions

Две точки зрения на Spitzenkurper (Sudbery, Court, 2007).



.

Верхняя. Spitzenkörper станция переключения, где секреторные везикулы скапливаются при участии микротрубек перед отправкой к кончику при участии актиновых нитей. Согласно модели vesicle supply centre, большинство везикул ударяются в апекс гифы, но некоторые сливаются на периферии полярисомы.

Нижняя

Компоненты полярисомы локализованы у поверхности в виде полумесяца и возможно из-за того, что некоторые ориентированы относительно кортикального маркера они становятся более концентрированными на самом кончике. Направленные к кончику актиновые нити приводят к аккумуляции секреторных везикул в центре по сравнению с периферическими областями

Комплексы белков важные для полярности клеток грибов.

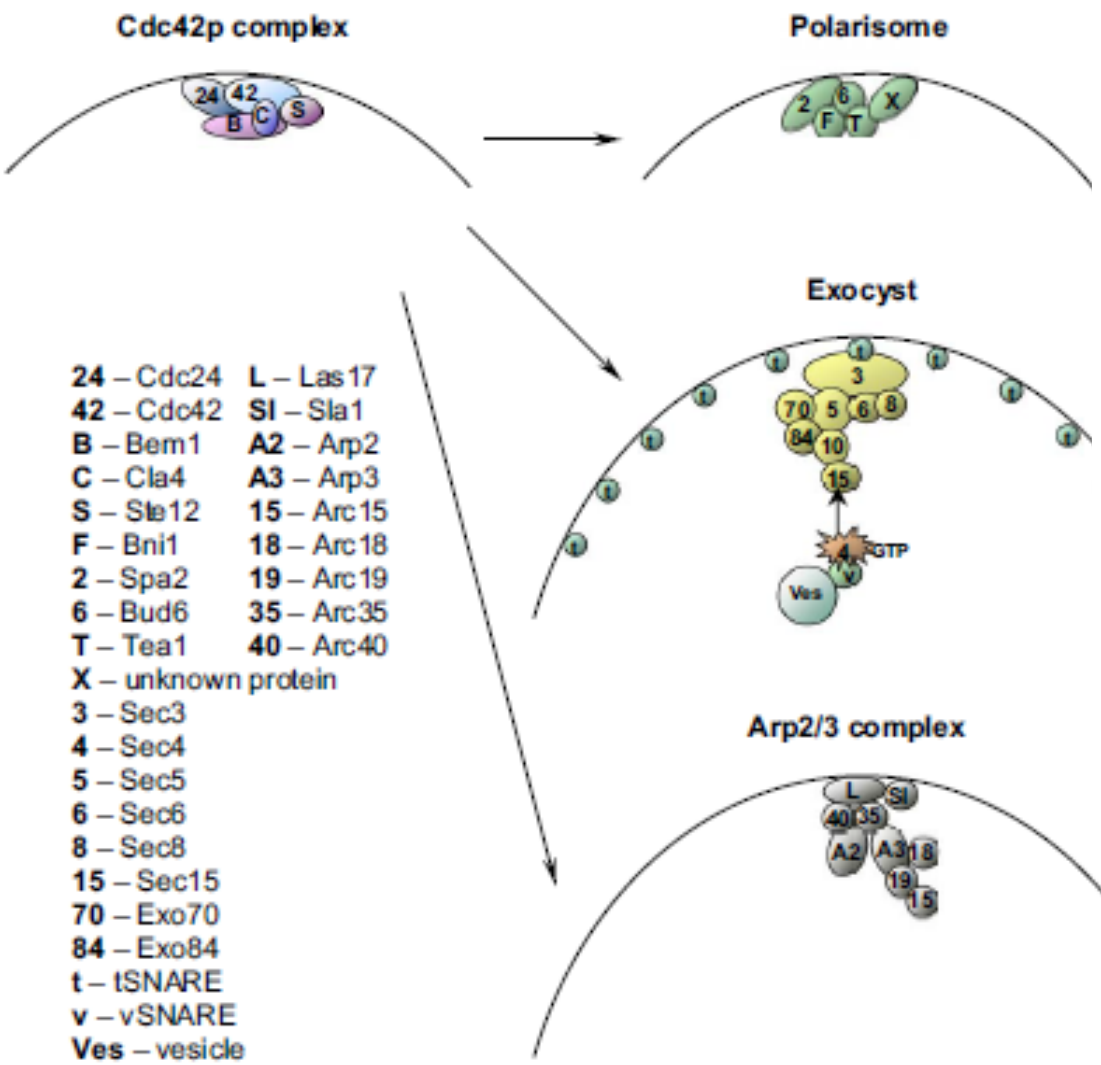


Table 1. Polarisome components in yeast and filamentous fungi.

S. cerecisiae	Filamentous fungi	Localization	Species (Reference)
Spa2	AgSpa2p	Apex and Septa	*A. gosypii* [45]
	Spa2	Apex	*C. albicans* [66]
	SpaA	Apex	*A. nidulans* [65]
	Spa2	Apex	*U. maydis* [93]
	SpaA	Apex	*A. niger* [94]
	SPA-2	Apex	*N. crassa* [59]
Pea2*	(AGR135Cp)	?	*A. gosypii* [18]
Bni1	AgBni1	Apex	*A. gossypii* [87]
	Bni1	Apex	*C. albicans* [66,86]
	SepA	Apex and Septa	*A. nidulans* [74]
	SepA	Apex	*A. niger* [95]
	BNI-1	Apex	*N. crassa* [62]
Aip3/Bud6	AgBud6	Apex	*A. gossypii* [18]
	Bud6	Apex	*C. albicans* [66]
	BudA	Septa	*A. nidulans* [65]

Lichius et al., 2012

Предполагаемые белки, участвующие в создании и поддержании полярности у грибов (Harris et al., 2009).

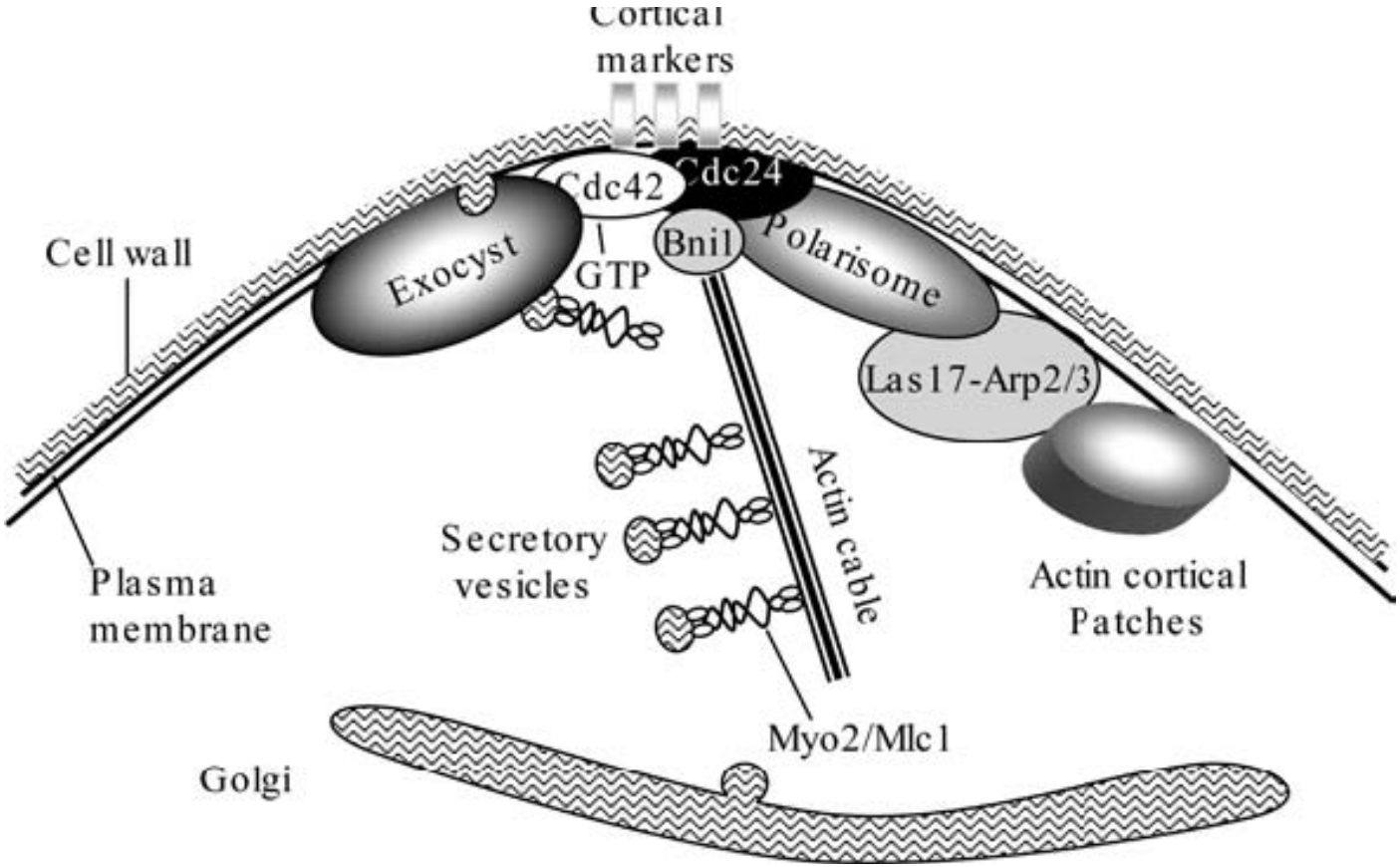
Predicted *A. nidulans* proteins involved in polarity establishment and maintenance

S. cerevisiae homologue	Mammalian homologue	*A. nidulans* locus name	*A. nidulans* protein	Known or predicted function in *A. nidulans*
Landmarks/membrane organization				
Afl1		AN0268	MesA	Membrane organization
No hit		AN4332	BarA	Ceramide synthase
Lag1		AN2464	LagA	Ceramide synthase
Sur2		AN0640	BasA	Sphinganine hydroxylase
Bud3		AN0113		
Bud4		AN6150		
Axl2		AN1359		
Rax1		AN3622	BgsB	Sexual development
Rax2		AN6685		
Bud8		No hit		
Bud9		No hit		
Cell surface				
Flo11		No hit		
Flo1		No hit		
Flo5		No hit		
Flo10		No hit		
Fig. 1		AN3036		Predicted membrane protein
Ldb17		AN3732		Protein of unknown function
Ecm33		AN4390		GPI-anchored protein
Mob1		AN2983		Possible GAP for Rho GTPase
Mob2		AN7041		Mucin
Sho1		AN7698		Osmosensor
Rho GTPases				
Cdc42		AN7487	McdA	Rho GTPase
Rac1		AN4743	RacA	Rho GTPase
Rho1		AN5740	RhoA	Rho GTPase
Rho2		AN4953		Rho GTPase
Rho3		AN4782		Rho GTPase
Rho4 (*S. pombe*)		AN2687		Rho GTPase
Cdc24		AN5592		Cdc42 GEF
	Tuba	AN10442		Predicted Cdc42 GEF
Rom1		AN4719		Rho GEF
Bem2		AN4745		Rho GAP
Bem3		AN5887		Cdc42 GAP
Rga1		AN1025		Cdc42 GAP
Sac7		AN7650		Rho GAP
Lrg1		AN7576		Rho GAP
Ste20		AN2067		p21-activated kinase
Cla4		AN8836		p21-activated kinase
Bem1		AN7030		Scaffold protein
	Dock180	AN0463		Rac GEF
	ELMO	AN8877		Rac GEF
Ras GTPases				
Ras1/Bud1		AN4685		Ras GTPase
Bud2		AN3735		Ras GAP
Bud5		AN4396		Ras GEF
Ras2		AN0182	RasA	Ras GTPase
		AN5832	RasB	Ras GTPase
Arf GTPases				
	Arf6	AN5090	ArfB	Arf GTPase
	Centaurin	AN4274		Arf GAP
	Cytohesin	AN6120		Arf GEF
Arf1/5		AN1126		Arf GTPase
Arf1		AN5912		Arf GTPase
Arf3		AN0634		Arf GTPase
Polarisome				
Bni1		AN6523	SepA	Formin
Spa2		AN3815	SpaA	Scaffold protein
Bud6		AN1324	BudA	Actin monomer-binding protein
Pea2		No hit		
Msb3		AN10355		Rab GAP
Gic1		No hit		
Arp2/3				
Las17		AN11104		Actin nucleation; endocytosis
Arp2		AN0673		Actin nucleation; endocytosis
Arp3		AN0140		Actin nucleation; endocytosis
Vrp1		AN1120		Actin nucleation; endocytosis
Myo5		AN1558	MyoA	Actin nucleation; endocytosis
Exocyst				
Sec3		AN0462		Vesicle tethering; exocytosis
Sec5		AN1002		Vesicle tethering; exocytosis

(continued on next page)

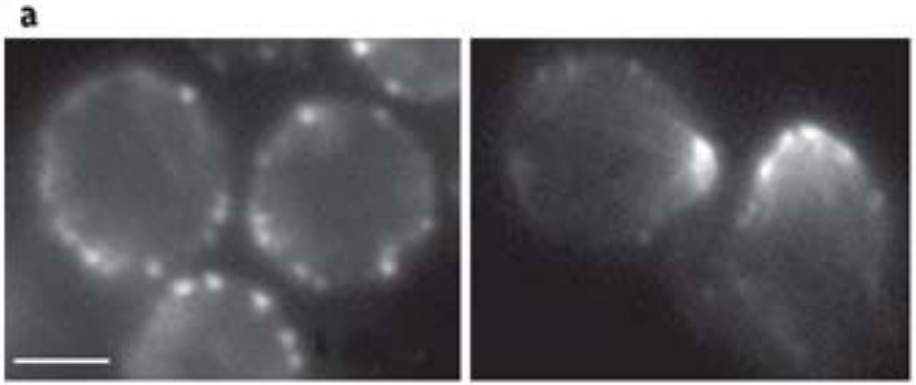
S. cerevisiae homologue	Mammalian homologue	*A. nidulans* locus name	*A. nidulans* protein	Known or predicted function in *A. nidulans*
Sec6		AN1988		Vesicle tethering; exocytosis
Sec8		AN7730		Vesicle tethering; exocytosis
Sec10		AN8879		Vesicle tethering; exocytosis
Sec15		AN6493		Vesicle tethering; exocytosis
Exo70		AN6210		Vesicle tethering; exocytosis
Exo84		AN0560		Vesicle tethering; exocytosis
Sec4		AN6974	SrgA	Rab GTPase
Sec2		AN4759		Rab GEF
Scaffolds				
	Paxillin	AN7626		Scaffold protein
	Paxillin	AN3659		Scaffold protein
	Striatin	AN8071		Scaffold protein
Actin				
	α-Actinin	AN7707		Actin filament bundling
Sac6		AN5803		Fimbrin; endocytosis
Scp1		AN1935		Actin filament bundling
	Gelsolin	AN1306		Actin filament severing
	Fragmin	AN0837		Actin filament severing
Tpm1		AN5686	TpmA	Actin filament stabilization
Cap1		AN2126		Actin capping
Aip1		AN10942		Actin depolymerizing factor
Cof1		AN2317		Actin depolymerizing factor
Crn1		AN6341		Actin patch assembly
Sla1		AN1462		Actin patch assembly
Sla2		AN2756		Actin binding protein; endocytosis
Myo1		AN4706		Myosin II
Myp2 (*S. pombe*)		AN8862		Myosin II
Mlc1		AN6732		Myosin light chain
Microtubules				
Tea1 (*S. pombe*)		AN4564	TeaA	Cell end marker
Tea2 (*S. pombe*)		AN8286	KipA	Kinesin
Tea4 (*S. pombe*)		AN1099		SH3 domain protein
Mod5 (*S. pombe*)		AN4214	TeaR	Cell end marker protein kinase; cell end identity
Pom1 (*S. pombe*)		AN7678		Microtubule-binding protein
Bim1		AN2862		CAP-Gly domain protein
Tip1 (*S. pombe*)		AN1475	ClpA	Microtubule-associated protein
Alp14 (*S. pombe*)		AN5521	AlpA	CAP-Gly domain protein
Other proteins involved in polarity				
Chk1		AN5529	CotA	Serine/threonine kinase
Vps18		AN2266	DigA	Vacuolar sorting
Vps33		AN2418	HbrA	Vacuolar sorting
		AN6720	HbrB	Likely involved in branching
Trs120		AN6533	HypA	Vesicle tethering; TRAPPII subunit
Sec7		AN6709	HypB	COPI-mediated vesicle formation
Nmt1		AN3839	SwoF	N-myristoyltransferase
Pmt4		AN5105	SwoA	Protein mannosyltransferase
		AN5802	SwoK	RRM RNA binding protein
Ynk1		AN8216	SwoH	Nucleoside diphosphate kinase
Pgi1		AN6037	SwoM	Phosphoglucose isomerase
Chf5		AN8851	SwoC	rRNA pseudouridine synthase
Cdc28		AN4182	AhbA/NimX	Cyclin-dependent kinase
		AN5137	AhbB	Cytochrome P450 protein
Msf1		AN6253	PodG	Phenylalanine tRNA synthetase alpha subunit
Fcp1		AN2902	PodH	Transcription factor IIF interacting component of the CTD phosphatase

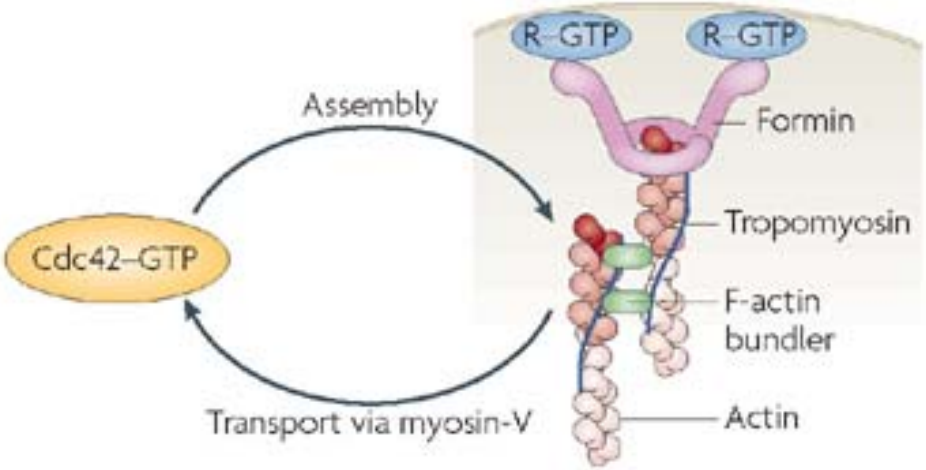
Общее представление на поляризованный рост у почкующихся дрожжей (Sudbery, Court, 2007).



Механизм нарушения симметрии и возникновения полярности у клеток почкующихся дрожжей при участии актинового цитоскелета

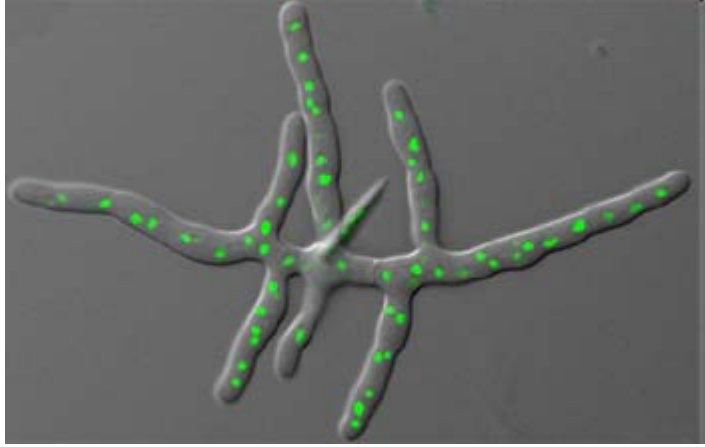
(Li, Gundersen, 2008).

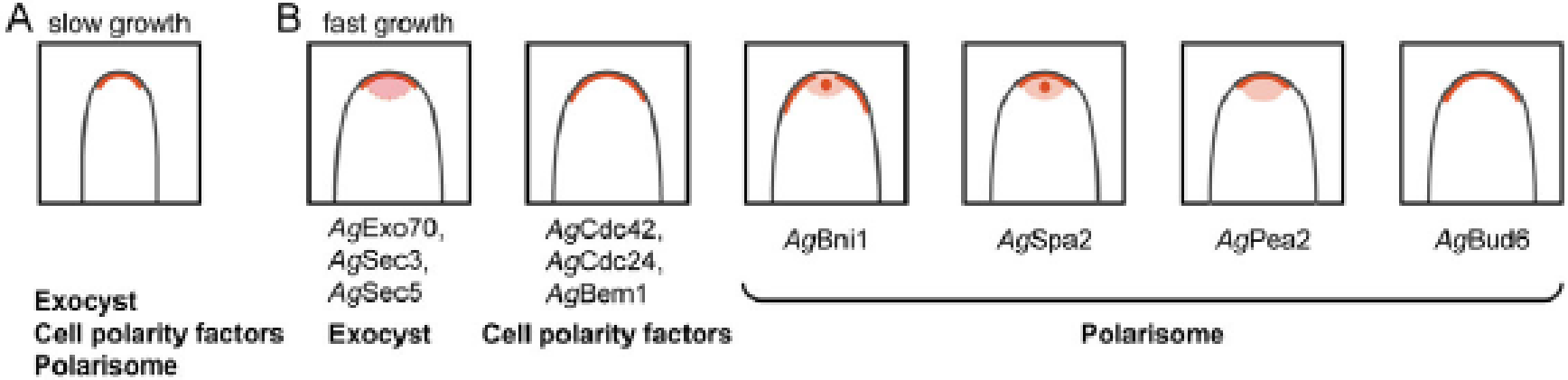


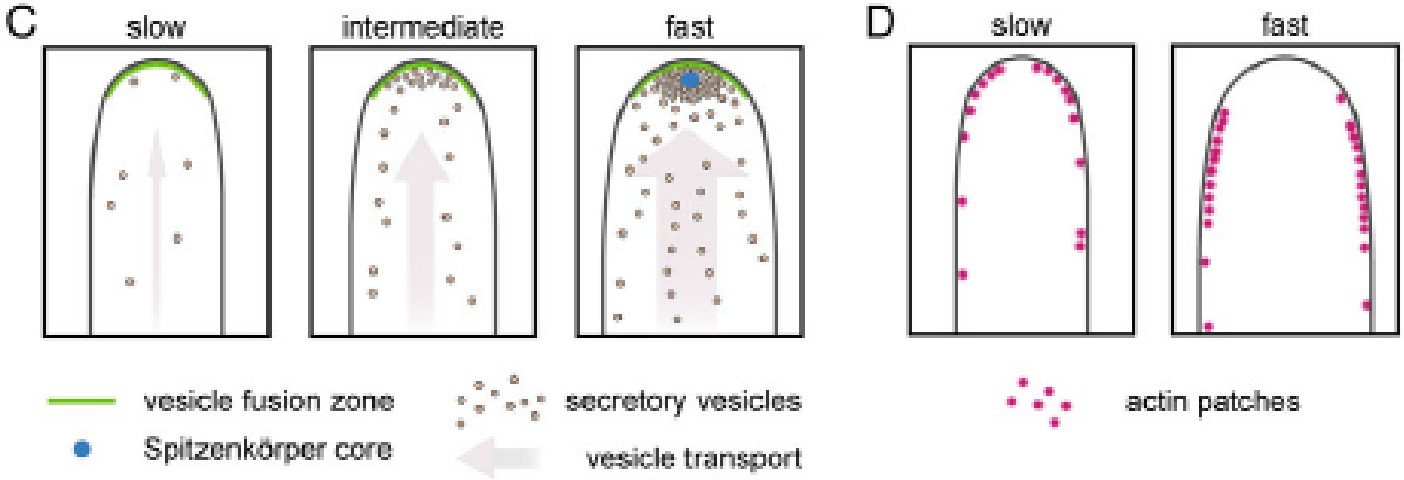


G1-остановка (неполярных) дрожжевых клеток может быть индуцирована к спонтанной поляризации вслед за экспрессией активности Cdc42. Фотографии на левой панели показывают распределение актина в клетках в стадии G1 клетки с неактивированным Cdc42 (слева) или соответственно с активированной формой Cdc42 (справа и левая часть схемы). Амплификация стохастической асимметрии в распределении Cdc42 хотя и цепь с обратной связью обеспечивает стимуляцию Cdc42, поляризованное формирование актиновых кабелей и их и Cdc42 транспорт миозин-V-опосредованный (правая часть схемы). Эта петля с обратной связью может привести к нарушению симметрии путем случайного накопления Cdc42 вдоль мембраны. Scale bar, 3 m.

Полярисома, экзоциста и апикальное тельце у *Ashbya gossypii* (Köhli et al., 2008).

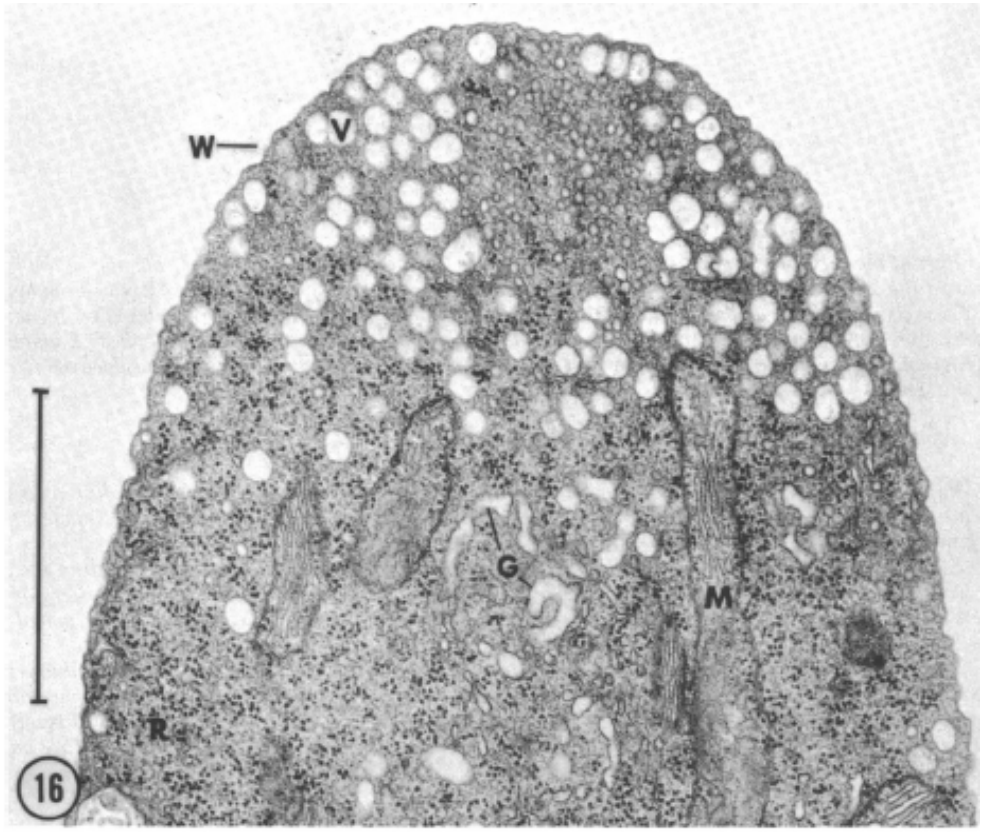


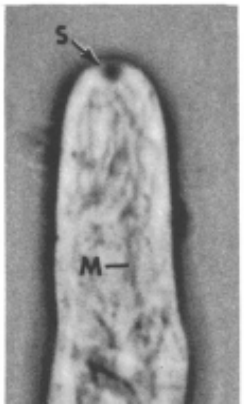


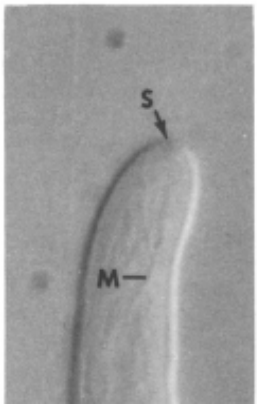


Геном *A.gosssypii* (Eremotecium gossypii) имеет 92 % генов консервативных для *S. cerevisiae,* растет только в виде мицелия.

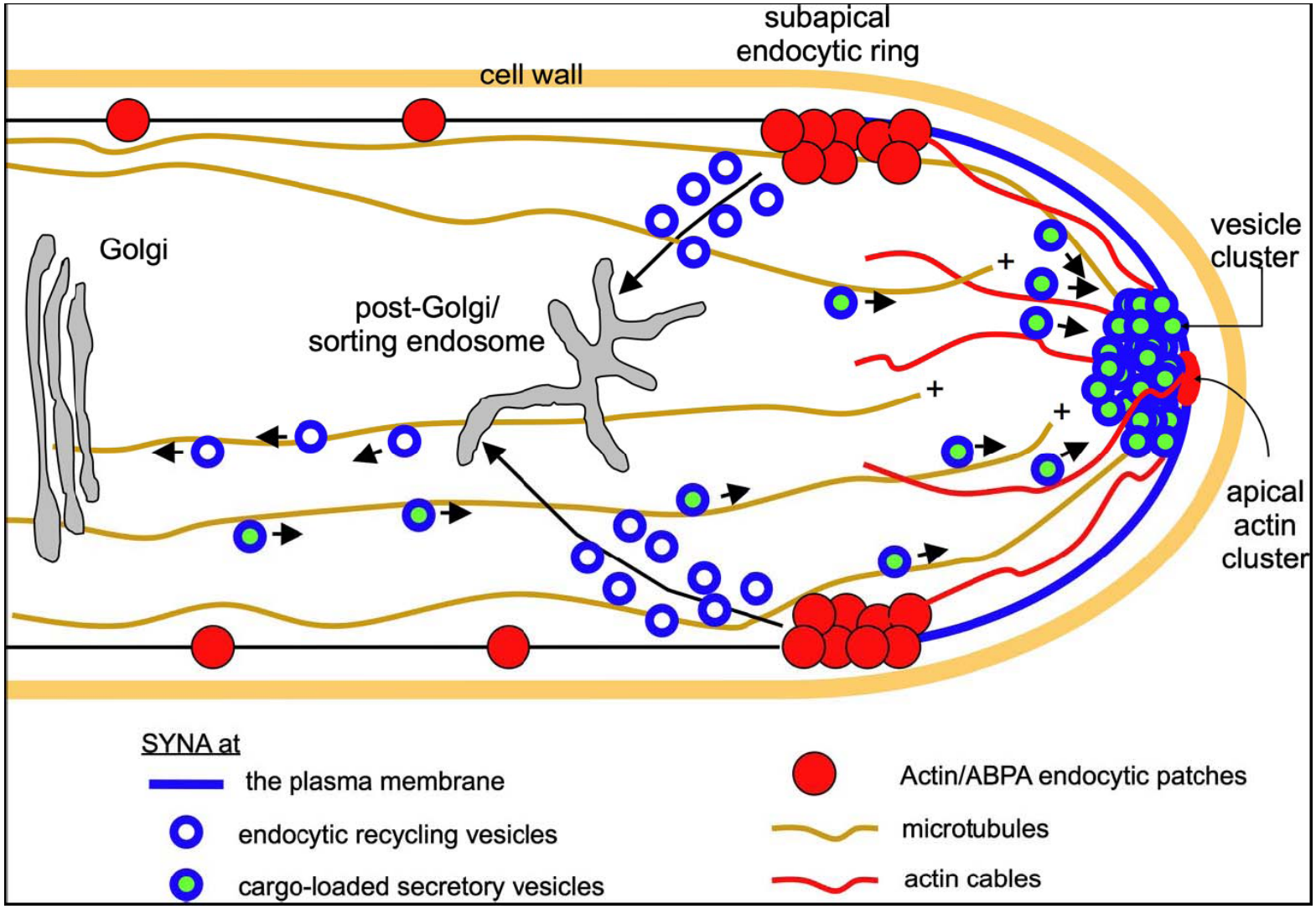
Цитология кончика гифы.
Aspergillus niger (Ascomycetes)
(Grove, Bracker, 1970).



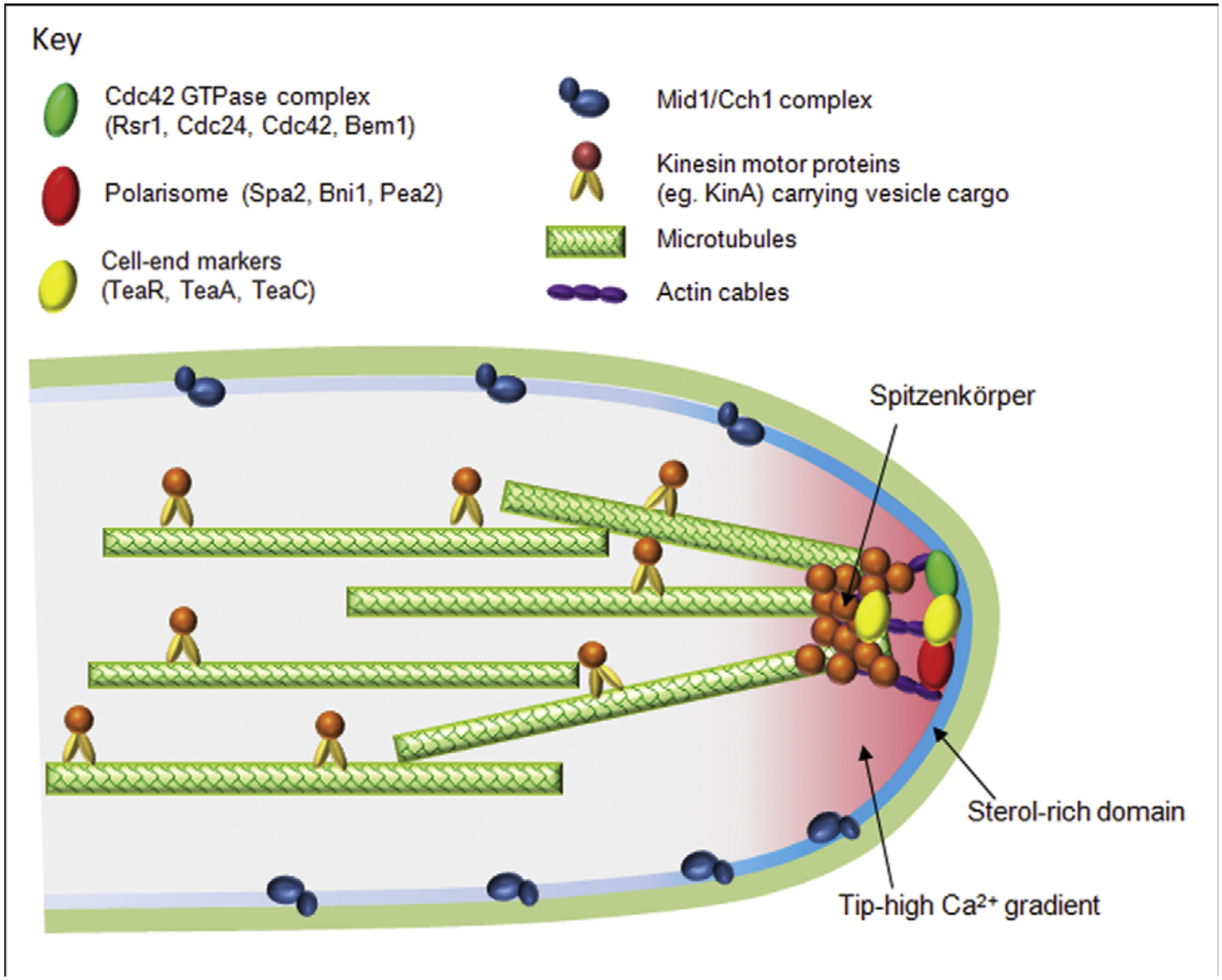




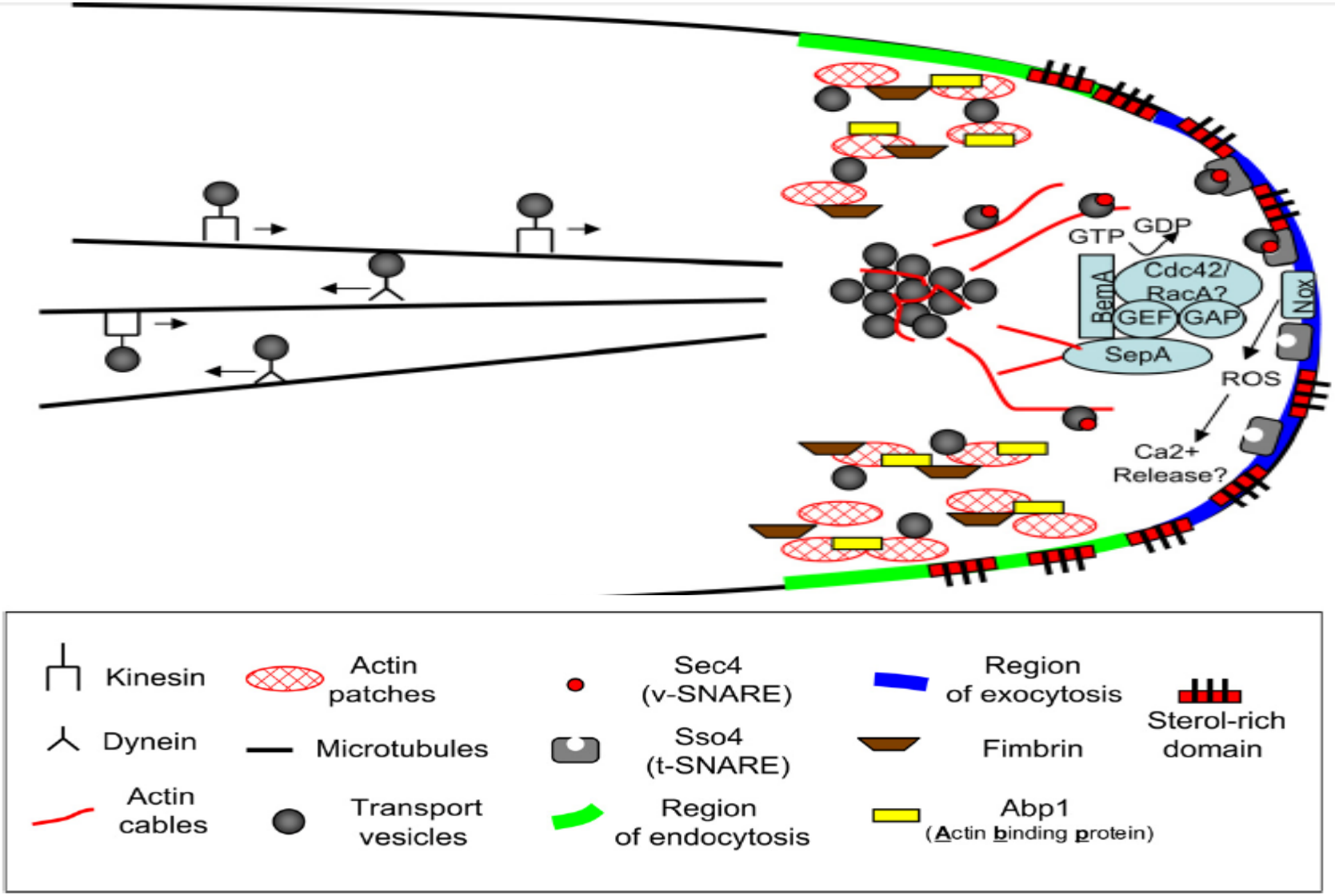
Молекулярная модель роста кончика гифы *A. nidulans* (Taheri-Talesh et al., 2008).



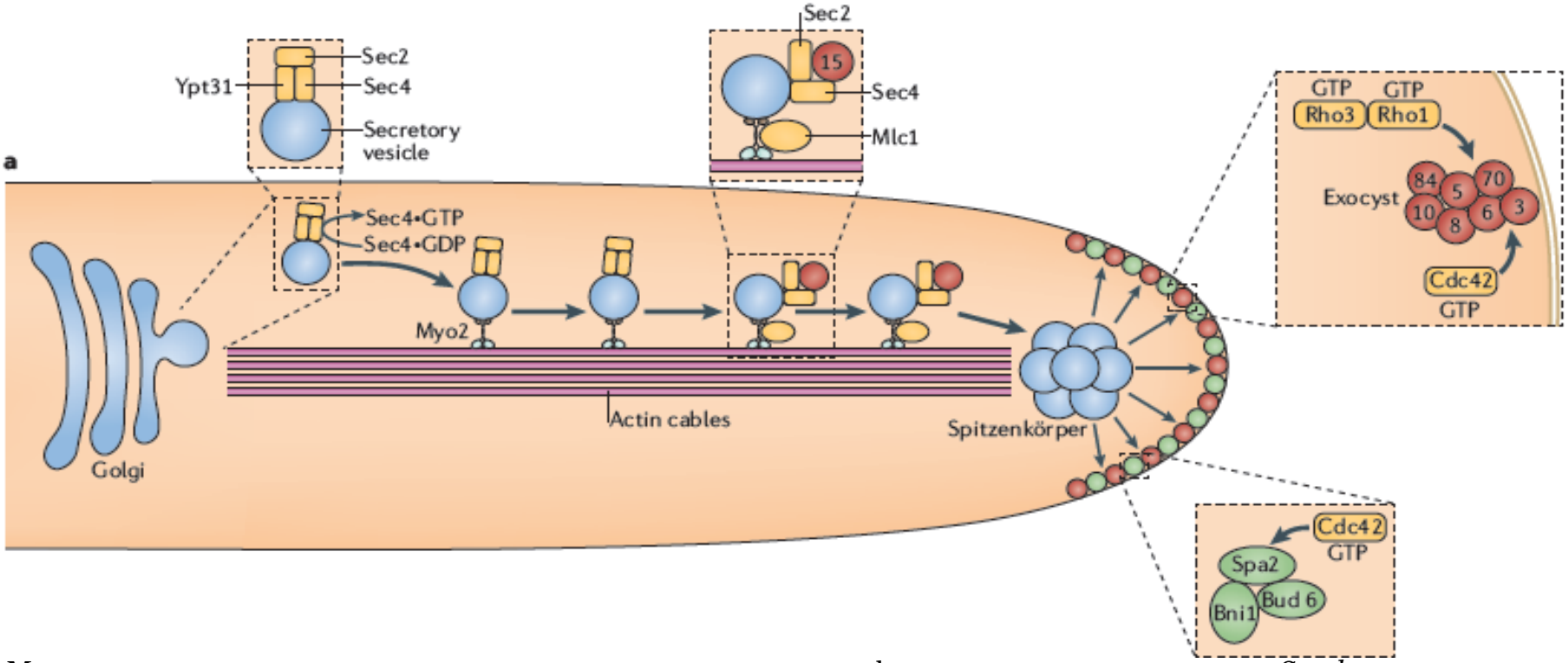
Молекулярная модель роста кончика гифы *A. nidulans* (Brand and Gow, 2009).

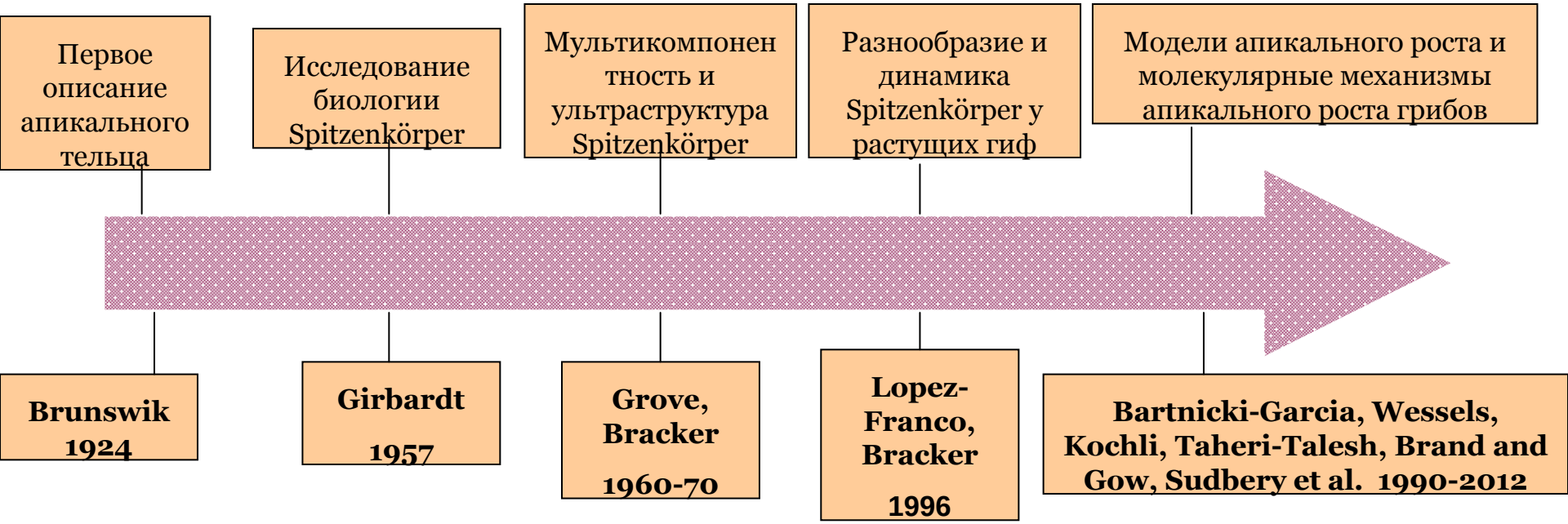


Молекулярная модель роста гифы у *Aspergillus nidulans* (Si, 2010).



Молекулярный механизм поляризованного роста у *Candida albicans* (Sudbery, 2011).



a | Модель доставки секреторных везикул, встраиваемых в кончик гифы при поляризованном росте *Saccharomyces cerevisiae* (reviewed in REF. 99). На *trans*-Golgi сети (TGN), GTPаза Ypt31 набирает Sec2 к поверхности возникающих везикул. Sec2 активируется Rab GTPазой Sec4, и везикулы получают право покинуть TGN. Компонент экзоцисты Ypt31 вытесняется Sec15, который физически взаимодействует с Sec2 и Sec4. Везикулы транспортируются в направлении кончика вдоль актиновых нитей. Эти нити образуются вокруг формина Bni1, помогающего полярисоме, которая локализована у клеточной поверхности и состоит из Spa2 и белка выбора места почкования 6 (Bud6). Myosin 2 (Myo2; тип V myosin), обеспечивает транспорт везикул. Везикулы накапливаются в субапикальном кластере Spitzenkörper перед экзоцистой, которая состоит из Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 и Exo84 (для ясности компоненты экзоцисты показаны красными кружками с приставками Sec или Exo). Начальный контакт вероятно между Sec15 и Sec10. Слияние с плазматической мембраной опосредовано v-SNARE (Sec9) на везикуле и маркером-мембраны SNAREs (Sec9 and Sso2) на плазматической мембране. Контролирующая деление клетки Rho GTPаза 42 (Cdc42) дирижирует множеством функций, которые необходимы для поляризованного роста.

Ключевые этапы в исследовании апикального роста грибов.