

2eji 3 6/1/84



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**TRANSPORTE DE METABOLITOS
DURANTE LA AEREOLOGENESIS
EN *Neurospora crassa*.
EL TRANSPORTE DE GLUTAMINA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
JESUS AGUIRRE LINARES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TRANSPORTE DE METABOLITOS DURANTE LA AEREALOGENESIS
EN Neurospora Crassa

EL TRANSPORTE DE GLUTAMINA.

I N D I C E.

INTRODUCCION GENERAL	P. 1
ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO	P. 5
MATERIALES Y METODOS	P. 9
RESULTADOS	P. 15
DISCUSION	P. 34
REFERENCIAS	P. 42

INTRODUCCION GENERAL.

Neurospora crassa es un hongo filamentoso haploide que pertenece a la clase de los Ascomycetos. Neurospora crece y se reproduce a expensas de fuentes de carbono, nitrógeno y sales del medio (restos de materia orgánica). En términos generales, la capacidad para formar esporas parece estar relacionada con el nicho ecológico que éste y la mayor parte de hongos ocupan, donde la disponibilidad de nutrientes es variable y limitada. Durante el ciclo de vida de N. crassa (fig. 1) se producen tanto esporas sexuales como asexuales. Ambas etapas del ciclo pueden ser manipuladas en el laboratorio en condiciones controladas lo cual, unido a la relativa sencillez biológica de éste hongo, han hecho de Neurospora uno de los modelos biológicos más atractivos para estudios sobre la fisiología celular tales como: regulación de la expresión genética (Metzemberg, 1979 ; Marzluf, 1982), compartimentación celular (Davies, 1972 ; Drainas y Weiss, 1982 a y b), regulación de la asimilación de amonio (Lara et col, 1982) y diferenciación celular (Scott, 1976; Schmith y Brody 1976; Cárdenas y Hansberg, sometidos para su publicación) entre otros. Además, se dispone de más de 2000 mutantes afectadas a distintos niveles de la fisiología general del hongo; muchas de ellas con alteraciones morfológicas.

La mayor parte de estudios en N. crassa, se han hecho en alguna de las etapas del ciclo asexual, durante el cual se producen las esporas asexuales llamadas macroconidias. Estas son

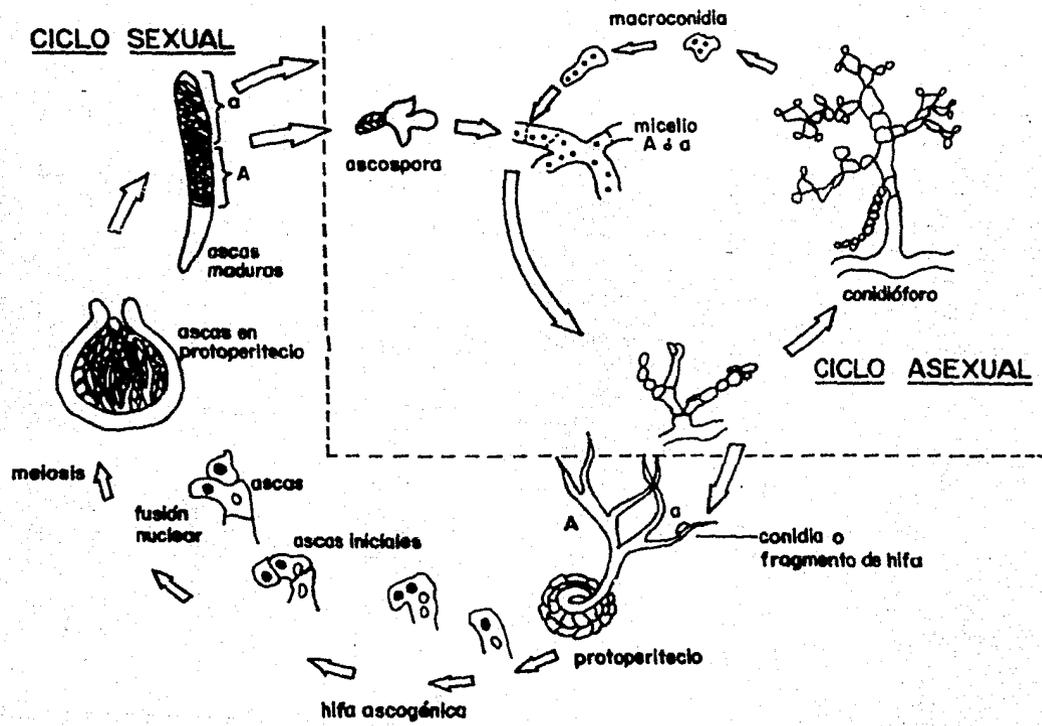


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*

células multinucleadas que presentan características de vida latente, esto es, son longevas, poseen un coeficiente respiratorio muy bajo y son resistentes a factores medioambientales extremos como son desecación, altas temperaturas (124 °C, 3 min.), congelamiento y altas concentraciones de ácido (HCl 0.2N, 8 min.) (Schmit y Brody, 1976). Sin embargo, las conidias al ser - hidratadas inician rápidamente una alta actividad metabólica y - se vuelven sensibles a las condiciones del medio ambiente. Si en el medio además de agua hay algunas sales, la conidia forma el tubo germinal. En éstas condiciones la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno sostiene el alargamiento, crecimiento y ramificación del tubo germinal formado filamentos llamados micelios. Este tipo de crecimiento puede ser mantenido indefinidamente si se conservan las condiciones de crecimiento invariables (Schmit y Brody, 1976) Creciendo *Neurospora* a partir de un inóculo de conidias, en un cultivo líquido con agitación rotatoria, se puede observar una curva sigmoide de crecimiento durante la cual se producen; La germinación de las conidias en las primeras 3-5 h, el crecimiento exponencial hasta las 12 h con un tiempo de duplicación de - aproximadamente 2.5 h y finalmente la fase estacionaria.

Cuando algún nutriente se vuelve limitante y *N. crassa* se encuentra en contacto con el aire, el crecimiento se detiene y se produce un cambio fisiológico que conduce a la formación de hifas especializadas que crecen hacia la fase aérea (formación del micelio aéreo; proceso al que se hace referencia en algunos casos como aerealoqénesis). Durante éste proceso la ontogénia de la conidia se inicia con un " hinchamiento " y crecimiento de novo

del extremo de la hifa fértil (Cole 1981). Posteriormente las conidias se producen en forma de rosario donde la continuidad citoplásmica se mantiene entre los miembros de la cadena y permite la translocación de material a las conidias apicales en desarrollo (Kendrick, 1971). Las gemas de éste rosario se separan por tabiques dobles de pared celular y después de un período de maduración de aproximadamente 3 días son capaces de reiniciar el ciclo asexual (Schmit y Brody, 1976). La dispersión de las conidias se produce principalmente a través del aire.

En el laboratorio estamos interesados en la esporulación asexual de *Neurospora*. Para su estudio se ha elegido el sistema de obtención sincrónica de micelio aéreo de Stine y Clark (1967). Una comparación de los diversos sistemas que en la actualidad se usan para estudiar la esporulación en Neurospora, incluido éste, ha sido realizada con anterioridad (Cárdenas, 1983). De ésta comparación destacan las siguientes ventajas que el método de Stine y Clarck tiene :

- a) La sincronía y rapidez del proceso (en 16-18 h aprox. se produce micelio aéreo y conidias).
- b) La viabilidad de las conidias producidas en éste sistema (Cárdenas, 1983).
- c) La posibilidad de separar el micelio aéreo en cantidades suficientes para el análisis bioquímico.

El método mencionado consiste esencialmente en colocar micelio crecido previamente en líquido, en contacto con el aire (micelio sustrato) en condiciones apropiadas de humedad, luz, temperatura y en ausencia de nutrientes, para que a partir de

éste se inicie el crecimiento de hifas aéreas. Es importante mencionar que durante éste proceso el micelio sustrato se diferencia en dos estratos denominados micelios inferior y superior .

ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO.

Los datos que se mencionan a continuación se han obtenido de los trabajos de Cárdenas (1983) y Cárdenas y Hansberg (sometidos para su publicación) excepto cuando se proporcione otra referencia .

El micelio aéreo y las conidias de *N. crassa* poseen una poza muy elevada de glutamato, el cual puede constituir hasta el 2.5% - del peso seco de las conidias (Schmit y Brody, 1975). Esta poza es consumida durante los primeros minutos de hidratación de las conidias y como se ha mencionado antes, la hidratación es el primer evento en la germinación de la conidia. Con la disminución de la poza de glutamato, coincide la aparición de ácido γ -aminobutírico (GABA) el cual puede producirse del catabolismo del glutamato a través de la enzima glutamato descarboxilasa, en zima que por otra parte parece ser exclusiva de las conidias. Todos éstos cambios producen un aumento transitorio en los niveles de NADH y NADPH. Se ha propuesto que éste aumento en el poder reductor puede causar un cambio en el estatus de oxidación de algunas proteínas importantes para la reactivación de la actividad metabólica y el rompimiento de la latencia en la conidia, por ejemplo los complejos de iniciación de síntesis de proteínas (Schmit y Brody, 1975; Christensen y Schmit, 1980; Brody, 1981).

Esta hipótesis ha sido extendida a otros organismos capaces de esporular como Bacillus subtilis, donde también se han encontrado altos niveles de glutamato acumulado en las esporas, e incluso a organismos cuyas esporas acumulan otro tipo de compuestos capaces de generar poder reductor al ser catabolizados (Brodý, 1981).

Por otra parte, estudiando la asimilación de amonio durante la formación del micelio aéreo en el sistema de Stine y Clarck, se ha encontrado que el micelio aéreo no posee actividad de las enzimas que sintetizan glutamato; la deshidrogenasa glutámica-NADP dependiente y la glutamato sintasa. La mutante am-1;en(am)-2, que carece de la actividad de éstas dos enzimas, es sin embargo capaz de acumular glutamato en el micelio aéreo.

Junto con los resultados anteriores se encontró que varios aminoácidos se acumulan durante la fase preestacionaria de crecimiento, principalmente alanina, glutamina, glutamato, arginina y ornitina (Mora, Y. y col., 1978; Cárdenas y Hansberg, sometido para publicación). Estos aminoácidos acumulados se consumen en el micelio sustrato durante la aereologénesis. Entre ellos, la glutamina y la alanina se consumen más rápidamente que los demás. Si experimentalmente se reduce la poza de la glutamina antes de inducir la aereologénesis, la producción de micelio aéreo se ve disminuida en dos tercios. Este efecto no se revierte cuando se administran en lugar de glutamina los compuestos nitrogenados que requieren glutamina para su síntesis (Arg, Trp, His, Asn, aminoazúcares y purinas). Con éstos experimentos se concluyó que N. crassa requiere una alta poza de glutamina para esporular; requerimiento que no se observa para otros aminoácidos (glutamato,

alanina, prolina y triptofano).

Estos datos tomados en conjunto sugieren que glutamina podría ser un acarreador de nitrógeno del micelio sustrato hacia el micelio aéreo si es que es movilizadada en ese sentido. La glutamina en el micelio aéreo proporcionaría glutamato y además podría adecuar las pozas de otros aminoácidos a los requerimientos del micelio aéreo. Se ha propuesto que glutamina pudiera cumplir estas funciones a través del ciclo que se muestra en la figura 2 (en el ciclo participan las enzimas glutamino-transaminasa y alanino-transaminasa; las cuales poseen actividad muy elevada en el micelio aéreo en comparación con el micelio sustrato).

Los objetivos de éste trabajo son: Analizar si la glutamina del micelio sustrato es transportada hacia el micelio aéreo y si es capaz de generar el glutamato acumulado en el micelio aéreo y en las conidias de Neurospora crassa.

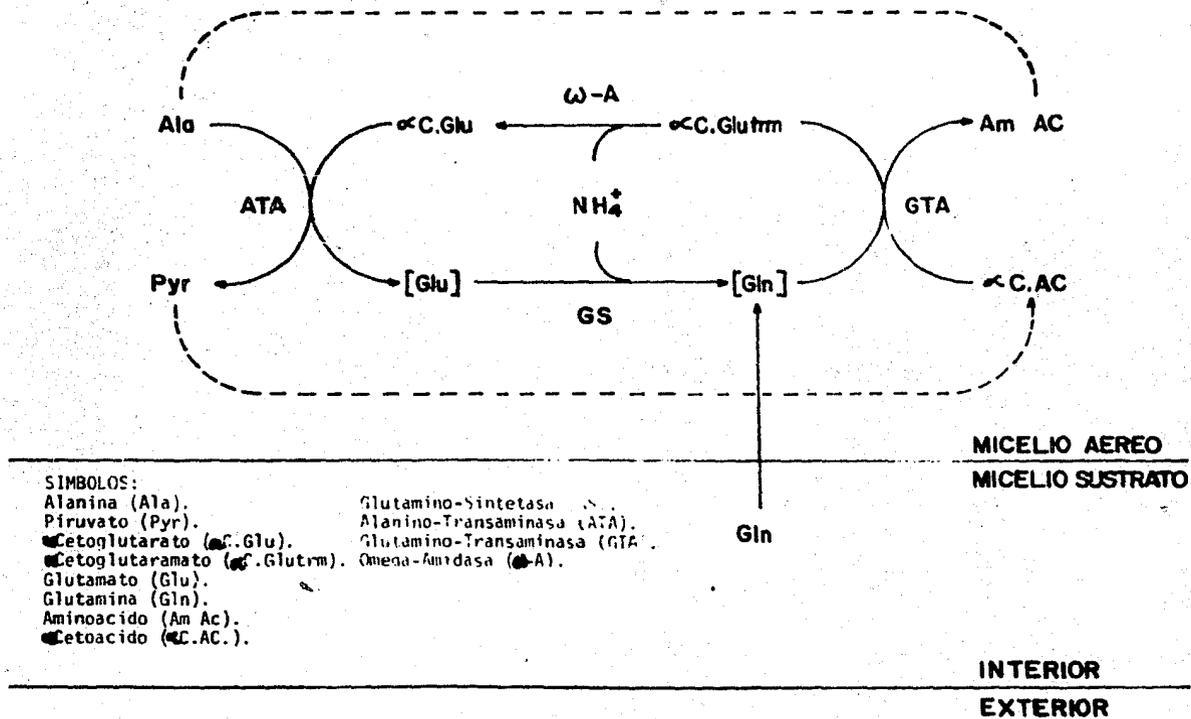


FIGURA 2. CICLO PROPUESTO PARA PRODUCIR GLUTAMATO A PARTIR DE GLUTAMINA EN EL MICELIO AEREO DE *Neurospora crassa*.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS Y REACTIVOS.

Se usaron las cepas 74-A, prol-3 y gln-1b; silvestre y auxótrofos de prolina y glutamina respectivamente. Estas cepas fueron obsecuadas por el Dr. Jaime Mora. Todos los reactivos usados fueron de un alto grado de pureza. Los aminoácidos radioactivos fueron surtidos por New England Nuclears y por Amersham.

CONDICIONES DE CULTIVO.

A partir de cultivos sólidos en medio mínimo Voguel (Voguel, 1967), suplementado con sacarosa al 1.5% (p/v, MM-sacarosa) con prolina (0.2 mg/ml) para la cepa prol-3 o glutamina (10 mM) para la cepa gln-1b (usando MM sin NH₄N03), se obtuvo una suspensión de conidias en agua destilada estéril a 4 °C. Esta suspensión se filtró a través de lana de vidrio y se dividió en fracciones de 2 ml, que se incubaron durante 1 h a 4 °C., posteriormente se congelaron a -10 °C y finalmente se almacenaron a -70 °C (Leef y Mazur, 1978).

Estas conidias fueron descongeladas en un baño de agua a 40 °C y se equilibraron a temperatura ambiente antes de ser usadas para inocular. El crecimiento en líquido de las distintas cepas se llevó a cabo ajustando el inóculo de conidias a 0.05 D.O./ml (un millón de conidias/ml) en MM-sacarosa sin NH₄N03 suplementado

con glutamina 5 mM para la cepa gln-1b; con prolina 0.1mg/ml para la cepa prol-3. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación rotatoria constante (240 rpm) durante 15 h, excepto cuando se indique otra cosa.

CRECIMIENTO DEL MICELIO AEREO.

Se filtraron 25 o 300 ml de cultivo a través del papel filtro Whatman 41 y la mata micelial se lavó con 50 ml de agua a 4 °C y subsecuentemente con 50 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.03 M, pH 6,1 (modificado de Stine y Clarck, 1967). Una vez eliminado el exceso de solución amortiguadora, las matas miceliales fueron transferidas a cajas petri e incubadas en una cámara ambiental a 25 °C, 80% de humedad relativa y luz continua. A distintos tiempos los cultivos se sacaron de la cámara ambiental y se procesaron de la siguiente manera: Se separó el micelio aéreo con ayuda de una espátula y la mata micelial restante se separó con ayuda de una piseta y agua a 4 °C en dos capas; el micelio superior (capa inmediata inferior al micelio aéreo) y el micelio inferior (capa inmediata inferior al micelio superior). Los tres micelios colectados en agua se filtraron y las pastillas obtenidas se almacenaron hasta su uso en etanol al 80% o en ácido tricloroacético (TCA, a una concentración final de 5%) a -20 y 4 °C respectivamente.

INCORPORACION DE METABOLITOS RADIOACTIVOS.

a) EN LIQUIDO.

Después de 15 h de crecimiento en líquido, cultivos de 200 ml de la cepa gln-1b se centrifugaron 5 min. a 3000 rpm y temperatura ambiente, los cultivos se juntaron y se resuspendieron en un tercio de su volumen original en MM-sacarosa sin NH_4NO_3 y sin glutamina; y se incubaron en agitación 30 minutos a 30°C y 240 rpm. Después de ésta incubación, el cultivo se centrifugó como se ha indicado anteriormente y la pastilla micelial se resuspendió en el mismo medio pero en un volumen un tercio menor. En éstas condiciones se adicionó al cultivo 0.1 ml de Gln-14C uniformemente marcada (U) (0.1 mCi/ml) y se incubó 10 minutos con agitación. Después de esto se añadió glutamina fría 5mM, y se incubó durante 10 minutos más. En seguida se tomaron 2 alicuotas de 10 ml, se filtraron y lavaron con 25 ml de agua a 4°C y a continuación los micelios se colocaron en 6 ml de etanol al 80% (v/v). Del resto del cultivo líquido se tomaron volúmenes de 100 ml para hacer matas miceliales que se colocaron en condiciones de crecimiento de micelio aéreo. A distintos tiempos se separaron los micelios y se trataron de la forma descrita para las alicuotas de 10 ml de cultivo iniciales. En algunos casos se usó la cepa 74-A y dado que esta cepa no requiere glutamina para crecer se uso Metionina-Sulfoximina - (inhibidor específico de la enzima glutamino-sintetasa; Ronzio y Meister, 1968) a una concentración final de 2mM durante 30 min. antes de proceder a palicar la Gln-14C (0.6 ml, 0.05 mCi/ml).

En condiciones similares se administró ácido α -aminoisobutírico, (0.12 ml: metil-3H, 0.1 mCi/ml) a un cultivo de 14 h.

de crecimiento y se incubó durante 1.5 h más. Después se dividió el cultivo en 6 fracciones de 30 ml cada una, se lavaron para quitar el exceso de marca y se llevaron a formar micelio aéreo. A 1,3,6,12 y 22 h de aerealogénesis se separaron los estratos inferior, superior y el micelio aéreo en los cultivos de 6 o más horas de incubación. Las distintas fracciones miceliales se colocaron en etanol al 80% para realizar una extracción de aminoácidos (ver más adelante).

b) DURANTE LA FORMACION DEL MICELIO AEREO.

A matas miceliales de aproximadamente 75 mg de proteína se les adicionarán Gln-14C (0.05ml, 0.1mCi/ml), serina (Ser-14C 1ml, 0.01mCi/ml) y arginina (Arg-14C, 1ml, 0.01mCi/ml) junto con el aminoácido correspondiente no marcado a una concentración de 5 mM, en la solución amortiguadora de fosfatos 0.03 M, pH 6.1.

Una vez eliminado el exceso de ésta solución los cultivos se incubaron en condiciones de aerealogénesis y a las 9, 12 y 15 h después se separaron los distintos estratos, se lavaron y se homogenizaron en TCA al 5%. De éstos homogeneizados se tomaron muestras de 0.1ml, se secaron en papel Whatman 540 y se contaron en un espectrofotometro de centelleo líquido Beckman LS 7500, usando PPO-tolueno (4 g/l) como mezcla de centelleo.

Un experimento similar se llevó a cabo pero seguido desde tiempos más cortos durante la aerealogénesis (3,6,9,12 y 15 h), donde se separaron las fracciones soluble y precipitable en etanol-ácido perclórico (80% v/v y 3% v/v respectivamente). La

fracción precipitable se resuspendió en NaOH 0.4 N y se le determinó su radioactividad por mg de proteína. En la fracción soluble se analizó el contenido de aminoácidos radioactivos.

En otro tipo de experimentos, matas miceliales a las 3.5 h - de haber sido inducidas a la aerealogénesis, se incubaron con 5 - ml de una solución de amortiguador fosfatos 0.03 M, pH 6.1 y 0.143 ml de Gln-14C (0.05 mCi/ml) junto con glutamina fría a una concentración de 0.05 mM. Después cada cultivo se lavó 2 minutos cada vez en 7 baños sucesivos de 40 ml de amortiguador fosfatos (en condiciones estériles). A continuación uno de los cultivos se separó inmediatamente en los micelios superior e inferior y se lavaron y procesaron conforme a lo descrito en extracción de aminoácidos; los otros cultivos se reincubaron en una cámara ambiental en condiciones de crecimiento de micelio aéreo y a distintos tiempos se separaron y se trataron como el primer cultivo (incluso el micelio aéreo). Se cuantificó la marca en los lavados como marca externa.

En idénticas condiciones se realizó un experimento usando glutamato (Glu-³H, 0.1 mCi/ml), excepto que a las 14 h de crecimiento en líquido, el cultivo fué incubado con Metionina-Sulfoximina 2 mM por 30 minutos y a continuación durante 20 min con glutamina 5 mM en medio fresco.

EXTRACCION Y ANALISIS DE AMINOACIDOS.

Las muestras colocadas en etanol al 80% (v/v) se hirvieron

a 78 °C, se homogenizaron y filtraron a través de filtros Millipore 0.43 μ m. Los filtrados se liofilizaron, se resuspendieron en 0.5 ml de agua fría, y se centrifugaron en una microfuga Eppendorf, durante 2 min. Al sobrenadante se le cuantificó la radioactividad total y se aplicaron en papel para cromatografía Whatman 3MM alicuotas de 0.01 a 0.1 ml. Las cromatografías se corrieron durante 8 h en una cámara de vidrio sellada, con el sistema de solventes butanol-agua-acético (5:4:1). Después de evaporarse los solventes, los aminoácidos fueron revelados con ninhidrina al 1% (p/v) en etanol absoluto y una vez identificada la posición de los estándares, cada carril fue cortado en fracciones de 1 ó 0.5 cm que, después de desteñir con peróxido de hidrógeno al 3% (v/v), se contaron en un espectrofotometro de centelleo líquido.

DETERMINACION DE PROTEINA.

Todas las determinaciones se hicieron de acuerdo con el método de Lowry (Lowry, et col 1951), usando albúmina como estándar.

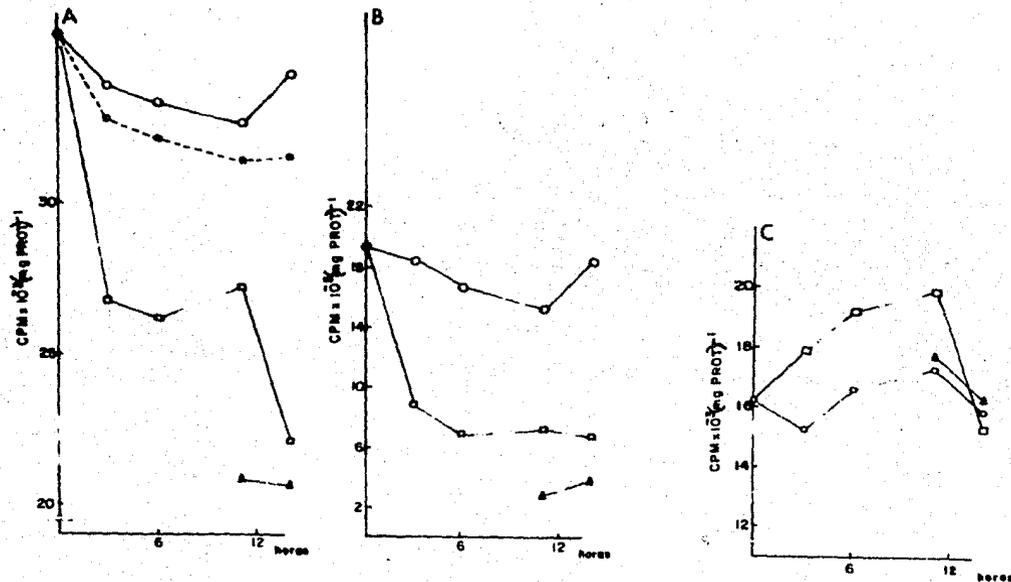
RESULTADOS.

I -DISTRIBUCION DE LA GLUTAMINA RADIOACTIVA INCORPORADA ANTES DE LA AEREALOGENESIS.

A fin de demostrar el transporte de una parte de la poza de glutamina de los estratos inferiores hacia el micelio aéreo, se sustituyó parcialmente la poza interna de glutamina de la cepa gln^{-1b} por Gln-14C. Para ello se procedió a disminuir la poza interna de glutamina privando a éste auxótrofo por un tiempo, de su requerimiento. Luego se le dió un pulso de Gln-14C y se restuyó la poza con glutamina fría, dado que N. crassa requiere una poza alta de glutamina para esporular (Cárdenas y Hansberg sometido ~~para~~ para publicación). El cultivo marcado se llevó a formar micelio aéreo y a distintos tiempos durante la aerealogénesis se analizó en los distintos estratos, la marca precipitable y soluble y los aminoácidos marcados.

La cantidad de marca incorporada fué suficiente para poderla seguir durante la aerealogénesis. En adelante se hará referen-
cia a la radioactividad específica como las cpm en una fracción entre los mg de proteína de la misma.

El comportamiento de la marca incorporada se muestra en la figura 3A para todo el sistema (Suma de la radioactividad espe-
cífica total del micelio inferior, micelio superior y micelio aéreo), el micelio inferior y el micelio superior. Se destaca en és-
ta figura la tendencia a la disminución en la radioactividad
específica durante la aerealogénesis. La velocidad con que di-
cha radioactividad específica disminuye es mayor en el micelio su



FIGURAS 3A, B Y C. COMPORTAMIENTO DE LA RADIOACTIVIDAD ESPECIFICA DURANTE LA FORMACION DE MICELIO AEREO, A PARTIR DE LA MARCA INCORPORADA INICIALMENTE (0 H) EN UN PULSO DE GLN-14C.
 A) RADIOACTIVIDAD TOTAL, B) RADIOACTIVIDAD ETANOL SOLUBLE Y C) RADIOACTIVIDAD ETANOL PRECIPITABLE.
 ► SIMBOLOGIA GENERAL: (EXCEPTO CUANDO SE INDIQUE OTRA COSA).
 ○ MICELIO INFERIOR, □ MICELIO SUPERIOR, ▲ MICELIO AEREO y ● M. INFERIOR + M. SUPERIOR + M. AEREO.

perior que en el inferior. También se detectó radioactividad en el micelio aéreo.

La marca total incorporada a la fracción soluble en etanol y a la fracción precipitable en etanol y ácido perclórico se muestran en las figuras 3B y 3C respectivamente. En ellas destaca la rápida disminución de la radioactividad específica soluble en el micelio superior, en correspondencia con un aumento en la radioactividad específica de la fracción precipitable. En el micelio inferior la radioactividad específica soluble disminuye más lentamente, y no hay incorporación apreciable en la fracción precipitable. En el micelio aéreo el 86% de la marca se encuentra en forma precipitable (éstos resultados fueron reproducibles en experimentos similares).

Cuando las fracciones solubles se analizaron por cromatografía en papel, se observó que inmediatamente después del pulso inicial de Gln-14C cerca del 54% de la marca correspondió con la posición del glutamato y solamente el 15% con la de la glutamina (fig. 4, donde puede apreciarse también un pico que corresponde con la posición de arginina). Del análisis del resto de las muestras únicamente se destaca la disminución progresiva del pico de glutamato con una cinética parecida a la de la marca soluble total (no se muestra). La poca marca soluble del micelio aéreo se encuentra distribuida en varios compuestos, no todos identificados, ésta distribución en varios compuestos es mayor en el micelio aéreo comparada con el resto de los estratos de la mata micelial.

Dado que el interés de éste experimento residía en el estudio

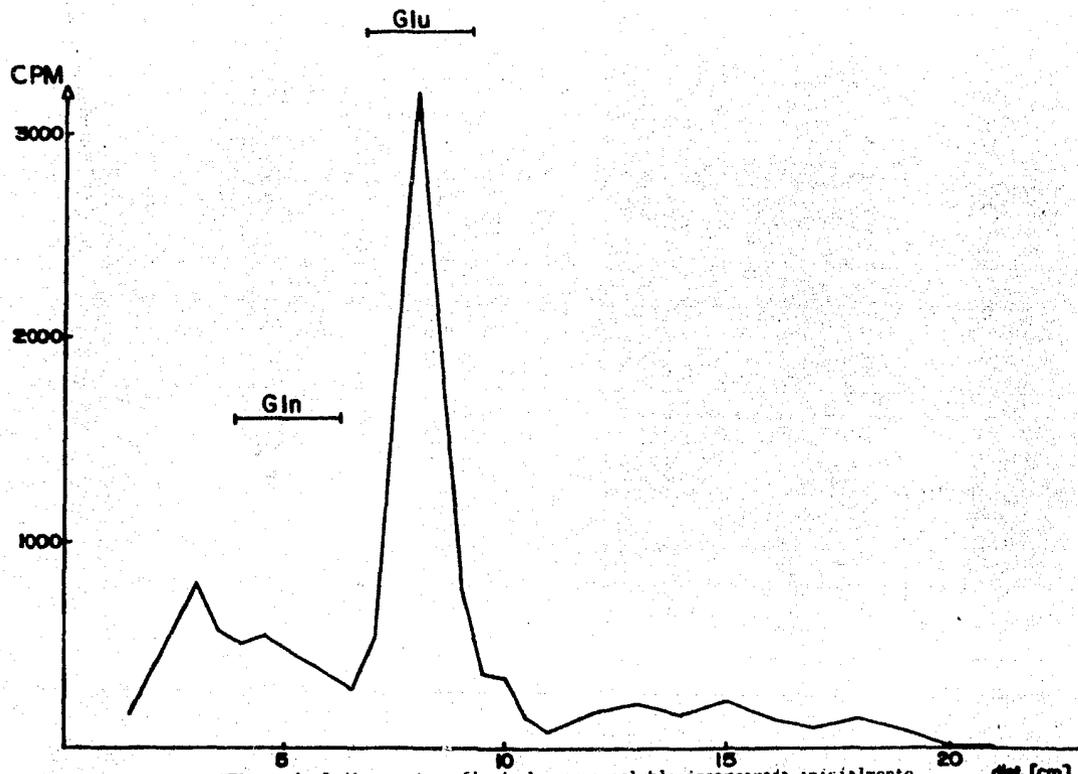


Figura 4. Radiocromatografía de la marca soluble incorporada inicialmente después de un pulso de Gln-14C. (glutamina (Gln) y glutamato (Glu)).

del comportamiento de la poza de glutamina durante la aereologénesis, se procedió a usar las cepa silvestre 74-A de N. crassa, suponiendo que el catabolismo de glutamina observado en la cepa gln-1b, estaba relacionado con la inducción de enzimas capaces de degradarla (glutamino transaminasa y transamidasa; ya que no se ha encontrado glutaminasa en Neurospora, Cárdenas, 1983) ya que dicha cepa crece en glutamina como única fuente de nitrógeno.

Así, se usó la cepa 74-A en un experimento muy similar al recién descrito, excepto que se usó Metionina-Sulfoximina para disminuir la poza interna de glutamina. En éste experimento después del pulso se observó que cerca del 27% de la marca soluble comigró como glutamina y cerca del 50% como glutamato. El posterior análisis del experimento arrojó resultados muy semejantes a los del anterior.

Recientemente, estudiando las vías de degradación de glutamina en N. crassa se han obtenido resultados similares y aparentemente la principal vía de degradación de glutamina es por transaminación (Calderon y Mora, manuscrito en preparación) Debido a lo anterior, se decidió abandonar éste enfoque para el estudio del transporte de glutamina.

II -DISTRIBUCION DE LA GLUTAMINA RADIOACTIVA INCORPORADA DURANTE LA AEREOLOGENESIS.

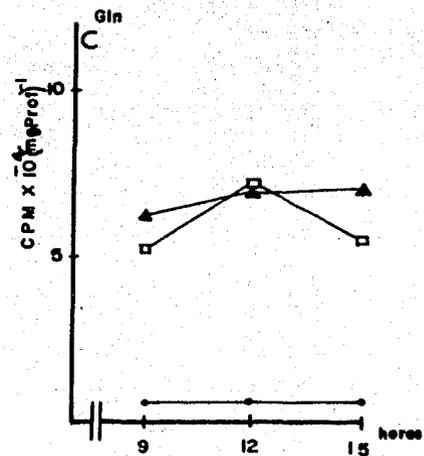
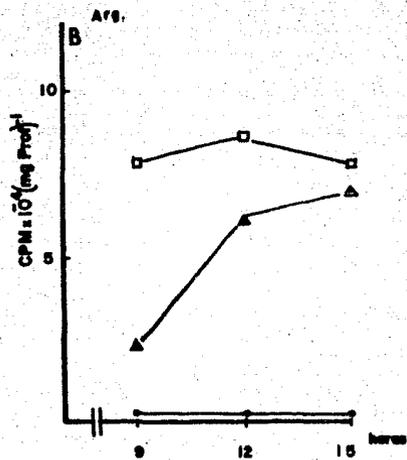
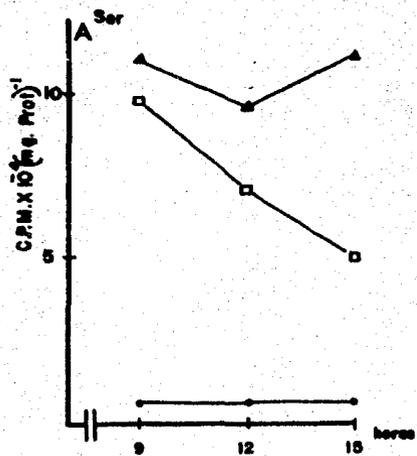
En vista de que la glutamina administrada antes de la formación del micelio aéreo es degradada, se pensó que éste efecto se vería reducido al administrar Gln-14C durante la aereolo

génesis. Sin embargo no habiendo datos previos de si en éstas condiciones experimentales el micelio era capaz de incorporar aminoácidos, se procedió a realizar el siguiente escrutinio. Se incubaron matas miceliales con cantidades equivalentes en cuentas por minuto (cpm), de arginina, serina y glutamina marcados radioactivamente, y a las 9, 12 y 15 h de aerealogénesis se separaron las distintas estructuras, se homogeneizaron y se les cuantificó su radioactividad total por mg de proteína. Los resultados se muestran en las figuras 5A, B y C donde se observa que el micelio si es capaz de incorporar aminoácidos en éstas condiciones y que dicha marca se acumuló preferentemente en el micelio superior y en el micelio aéreo.

Un experimento similar usando Gln-14C se repitió y analizó en detalle como se describe enseguida: A varias matas miceliales se les administraron cantidades equivalentes de Gln-14C y se llevaron a formar micelio aéreo. A distintos tiempos se separaron las distintas estructuras y se analizaron según se ha descrito.

En la figura 6A se muestran los comportamientos generales tanto del sistema (m. inf., m. sup. aéreo) como de cada estrato por separado, expresados como radioactividad específica a lo largo de la aerealogénesis. Es notable la gran diferencia entre los valores del micelio inferior y el micelio superior. Durante las primeras 9 h la radioactividad específica en el micelio superior aumenta considerablemente para luego disminuir en las 6 h subsecuentes. Esta disminución coincide con el aumento en la radioactividad específica del micelio aéreo.

Las figuras 6B y 6C muestran los comportamientos de las -

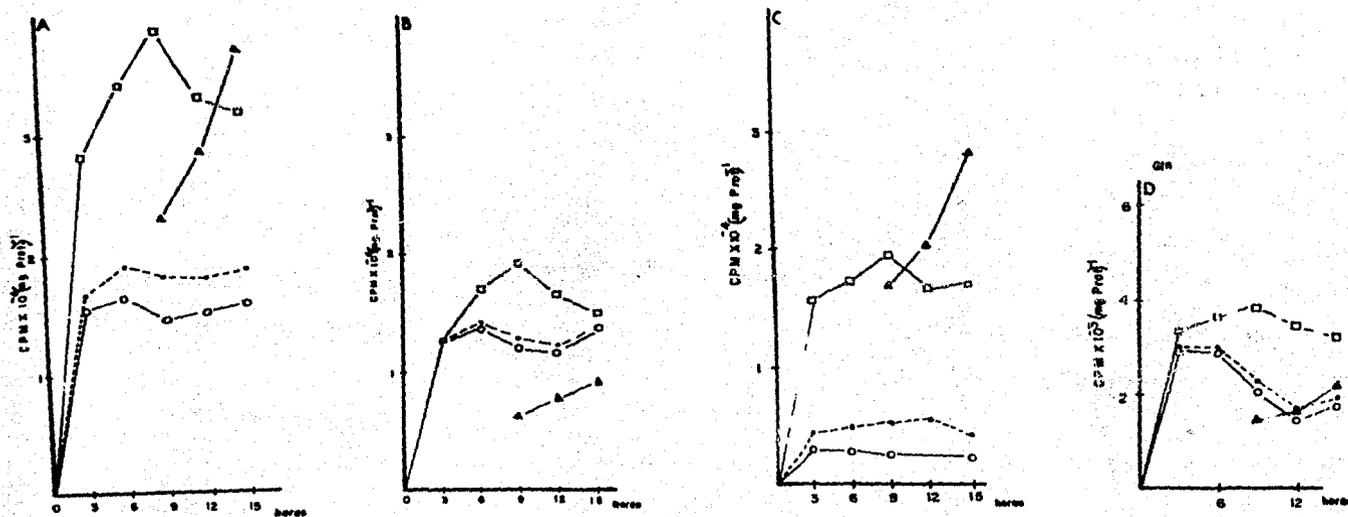


Figuras 5A, B, y C. Acumulación de aminoácidos marcados-¹⁴C cuando se incubó el micelio en presencia de estos durante la aereotogénesis. A) serina (Ser), B) Arginina (Arg) y glutamina (Gln).

fracciones soluble y precipitable, respectivamente, en los tres estratos. En 6C se observa que el micelio inferior prácticamente no incorpora marca en macromoléculas, contrariamente al micelio superior y al micelio aéreo. Este último acumula al final más marca precipitable que las otras dos estructuras. En 6B las fracciones solubles del micelio superior a inferior difieren menos entre sí en cuanto a valores absolutos, sin embargo, el micelio superior tiende a aumentar y después a disminuir. La disminución coincide con el aumento de marca soluble en el micelio aéreo sin embargo, la mayor parte de la marca en esta estructura se encuentra en forma precipitable (fig. 6C, 6B).

El análisis por radiocromatografía de la glutamina en la fracción soluble se muestra en 6D. La tendencia de la marca asociada a glutamina en el estrato inferior es a disminuir en el superior aumenta un poco y después disminuye, coincidiendo con el ligero aumento en el micelio aéreo. Estos resultados son congruentes con un transporte de glutamina hacia el micelio aéreo e incluso del micelio inferior hacia el micelio superior, Sin embargo, para poder afirmar lo anterior es preciso conocer el flujo de entrada y/o salida de marca en cada estructura.

Con el objeto de obtener información acerca de las entradas y salidas en el sistema, se pensó en dar un pulso corto de Gln-14C después de que el proceso de aereologénesis hubiese comenzado. Se incubaron matas miceliales con distintos tiempos de formación de micelio aéreo (1 a 4 h) en un baño con Gln-14C durante 10 min. A continuación las matas miceliales se sumergieron en baños sucesivos de amortiguador fosfatos, con el objeto de remover el exceso -



FIGURAS 6A, B, C y D. COMPORTAMIENTO DE LA RADIOACTIVIDAD ESPECIFICA EN LOS DIFERENTES ESTRATOS, CUANDO SE INCUBA EL MICELIO EN DIFERENCIACION EN PRESENCIA DE GLN-14C. A) RADIOACTIVIDAD TOTAL, B) RADIOACTIVIDAD ETANOL-SOLUBLE C) RADIOACTIVIDAD ETANOL-PRECIPITABLE Y D) GLUTAMINA RADIOACTIVA.

de marca externa. Después de éste proceso, algunas matas miceliales se separaron en los estratos superior e inferior, se lavaron para cuantificar la marca externa, y se analizó la cantidad de marca y su distribución en cada estrato. El micelio superior transportó más activamente la Gln-14C externa que el micelio inferior; después de 10 minutos de pulso de glutamina y 10 minutos aproximados de lavado, la radioactividad específica del micelio superior es de 5 a 10 veces mayor que la del micelio inferior (no se muestra).

Con éste resultado fue necesario replantear si el transporte ocurría solamente del micelio superior al aéreo y si la formación de éste solo dependía de la biomasa del micelio superior. Para probar esta posibilidad se diseñó el experimento que a continuación se describe.

III -PARTICIPACION DEL MICELIO SUPERIOR EN LA FORMACION DEL MICELIO AEREO.

Se hicieron matas miceliales con cantidades crecientes de micelio (5 a 70 mg de proteína) y se incubaron en condiciones de formación de micelio aéreo. A las 15 h de incubación se separaron las tres estructuras, se precipitaron con TCA y se les midió el contenido de proteína.

Los resultados se muestran en la figura 7 en donde se relaciona la cantidad de micelio aéreo formado a las 15 h de aerealogénesis con la biomasa inicial. Puede notarse que después de cierto valor de biomasa inicial (15 mg aprox.), un incremento en dicha biomasa ya no aumenta la cantidad de micelio aéreo

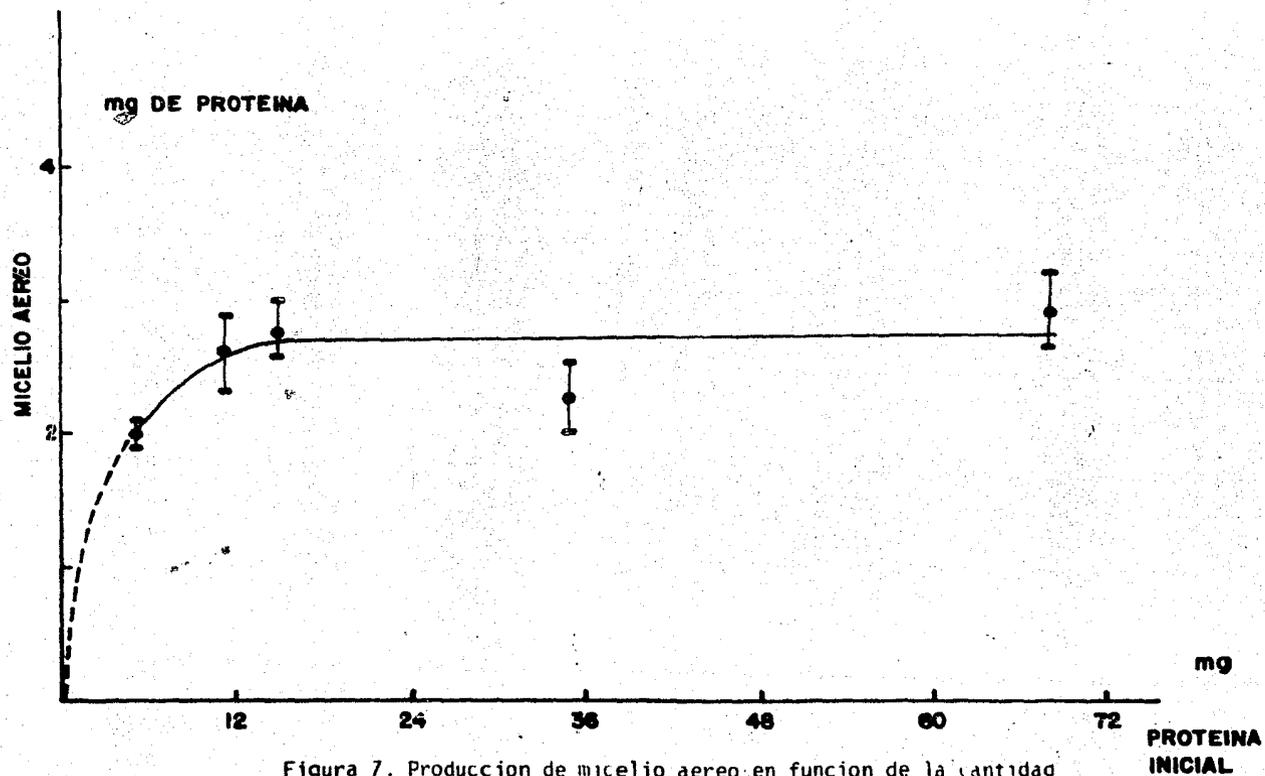


Figura 7. Produccion de micelio aereo en funcion de la cantidad de micelio sustrato.

producido.

Con base en lo anterior los experimentos que se reportan a continuación fueron realizados usando una cantidad de biomasa aproximadamente 4 veces inferior a la que se usó en los experimentos antes descritos.

IV --PULSO DE GLN-14C DURANTE LA AEREOLOGENESIS.

Matas miceliales de 20 mg de proteína inicial se incubaron en condiciones de formación de micelio aéreo y 3.5 h después se sumergieron durante 10 minutos en una solución con Gln-14C. Después de éste pulso, se lavó el exceso de marca con amortiguador de fosfatos y los cultivos se colocaron nuevamente en condiciones de formación del micelio aéreo, excepto uno, que fué separado inmediatamente en los estratos superior e inferior para analizar la marca inicial interna y externa. El resto de los cultivos se analizaron a 1, 3, 6, 12 y 20 h después de haber sido colocados nuevamente en condiciones de aereologénesis.

Los resultados se muestran en la figura 8A para la marca total en el sistema (m. inf., m. sup, m. aéreo) así como para cada estrato por separado. Los resultados indican:

- a) - Que nuevamente el micelio superior incorporó mucho más radioactividad que el micelio inferior, aproximadamente 12 veces.
- b) - Que la tendencia en todos los estratos es a la disminución en la radioactividad específica.
- c) - Que tal disminución es mucho más rápida en el micelio superior que en el inferior.

Las figuras 8B y 8C muestran el análisis de la marca soluble

y precipitable para cada estrato. Es particularmente notorio:

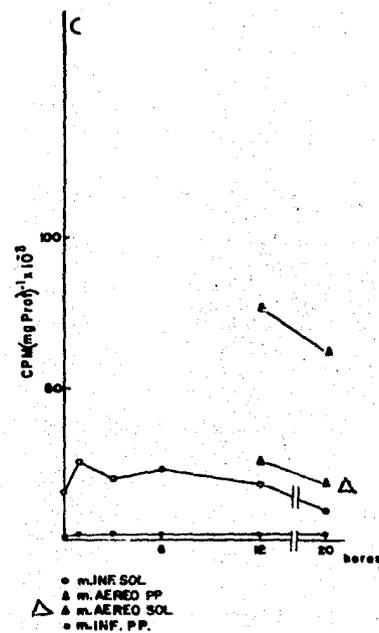
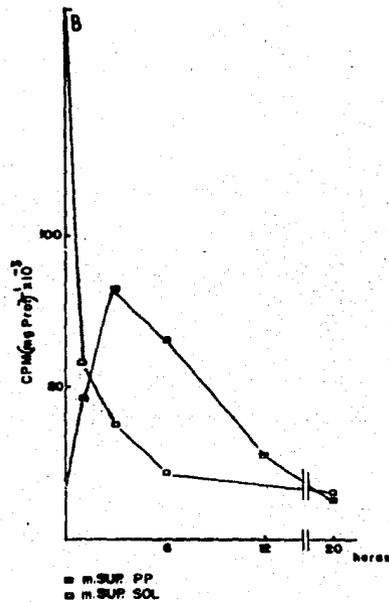
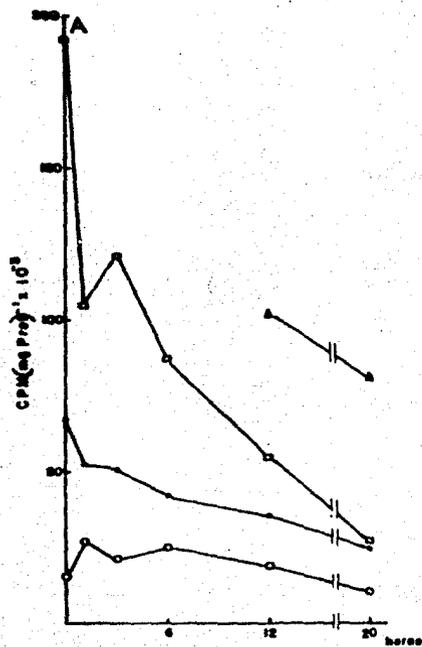
a) - Que la rápida disminución de marca soluble en el micelio superior esta acompañada de un aumento en la marca precipitable

y

b) - Que el micelio inferior no incorpora marca en macromoléculas.

Finalmente es necesario decir que en éste tipo de experimentos no fue posible remover totalmente la marca fuera de las células (marca externa). Sin embargo, después de la primera hora de haber colocado nuevamente los cultivos en condiciones de aereologénesis la marca externa se mantiene constante a lo largo del tiempo por lo que no parece participar significativamente la distribución de marca en la distintas estructuras. El análisis de la marca soluble revela que al tiempo inicial de la reincubación, cerca del 30% de la marca soluble se encuentra como glutamina y cerca del 28% como glutamato. Los compuestos que migran en las posiciones de α -cetoglutaramato y α -cetogluturato comprenden el 15 y 3% respectivamente de la marca soluble, estos resultados no se muestran. Las muestras de 1, 3, 6, 12 y 20 h del micelio superior tienen valores semejantes a los mencionados. Tal vez lo más notable es que proporcionalmente el pico de glutamina disminuye más entre las 12 y 20 h. Por otra parte, el micelio aéreo tiene el 76% de su marca en forma precipitable y la marca soluble en ésta estructura está más distribuida en otros compuestos, diferentes de los antes mencionados.

En vista de que el micelio inferior presenta pocos cambios en su radioactividad específica a lo largo del tiempo (fig. 3E) no se -



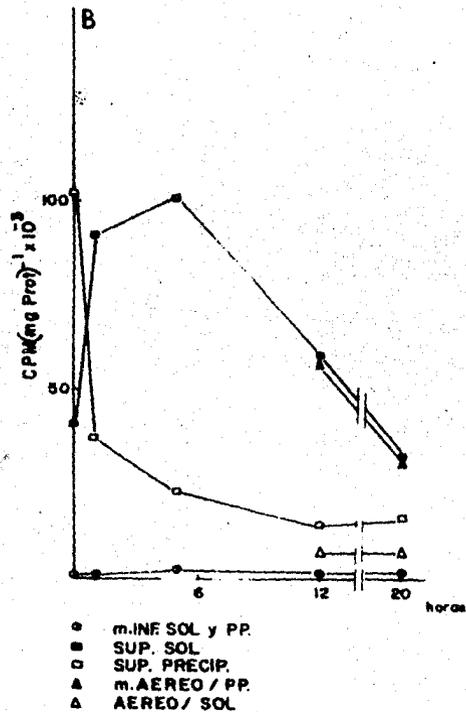
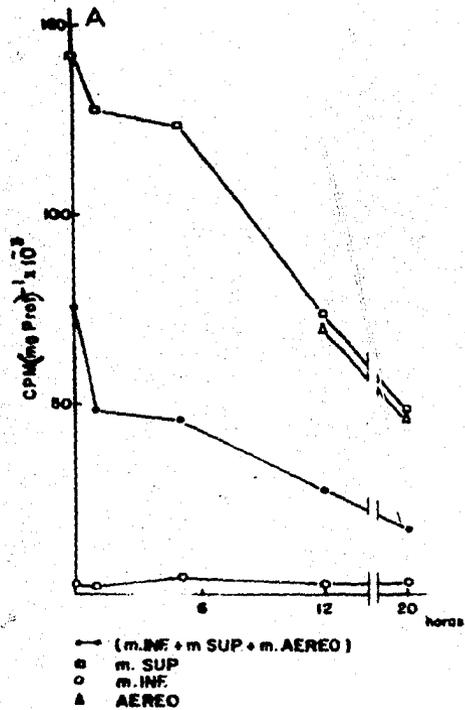
FIGURAS 8A, B Y C. COMPORTAMIENTO DE LA RADIOACTIVIDAD ESPECIFICA INCORPORADA EN UN PULSO DE GLM-14C A 3.5 H DE AEREALOGENESIS. A) RADIOACTIVIDAD TOTAL, B) RADIOACTIVIDAD ETANOL-SOLUBLE (SOL) Y ETANOL-PRECIPITABLE (PP) EN EL MICELIO SUPERIOR Y C) RADIOACTIVIDAD ETANOL-SOLUBLE Y PRECIPITABLE EN EL RESTO DE LOS ESTRATOS MICELIALES.

muestra el análisis detallado.

Los resultados hasta aquí presentados apoyan la idea de un transporte de marca del micelio superior hacia el micelio aéreo, presumiblemente de glutamina. Sin embargo es preciso distinguir entre un transporte preferencial de glutamina y un transporte pasivo de cualquier metabolito. Para poder distinguir entre estas posibilidades se decidió realizar los siguientes experimentos.

V -PULSO DE GLU-3H DURANTE LA AEREALOGENESIS.

Un cultivo de 14 h de crecimiento se incubó durante 30 min. en presencia de Metionina-Sulfoximina 2 mM con el objeto de inhibir la glutamina sintetasa y evitar la conversión del glutamato en glutamina. Después de esta incubación se creció 20 minutos más en glutamina 5 mM sin metionina-Sulfoximina, para asegurar una poza interna alta de este aminoácido (Cárdenas y Hansberg, sometido para publicación). Enseguida el cultivo fue dividido en cantidades equivalentes de micelio y colocado en condiciones de aerealogénesis. A las 3.5 h se administró un pulso de 10 min. de Glu-3H y después de lavar la marca externa se volvió a incubar en condiciones de aerealogénesis. El experimento fue analizado a 1, 5, 12 y 20 h de la segunda incubación. Los resultados se muestran en las figuras 9A y 9B, en donde puede apreciarse un comportamiento muy parecido al experimento inmediato anterior; por un lado el m. superior incorporó inicialmente más marca que el m. inferior y por otro, la marca tiende a disminuir en todos los estratos (aunque más lentamente que para el experimento con glutamina) y la disminución es más rápida en el m. superior. El comportamiento de la marca soluble y precipitable puede --

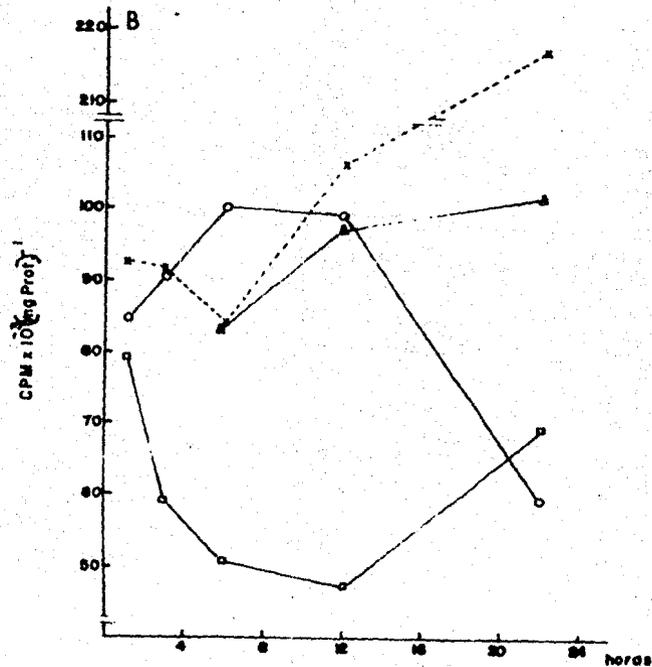
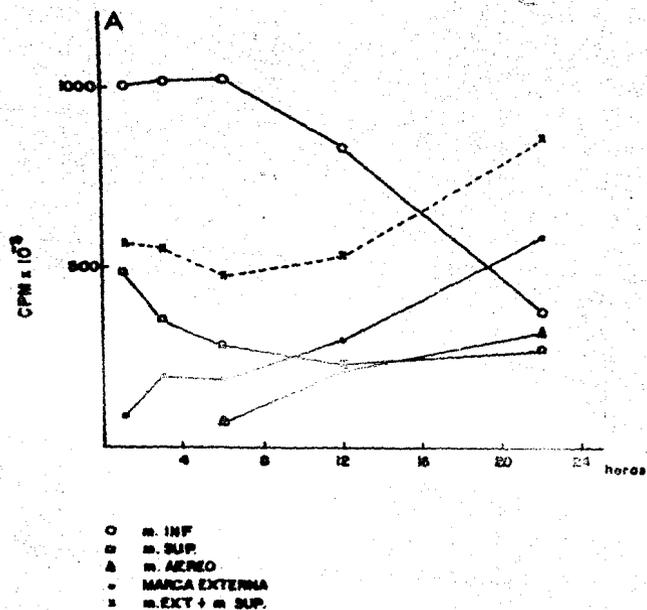


FIGURAS 9A Y B. COMPORTAMIENTO DE LA RADIOACTIVIDAD ESPECIFICA INCORPORADA EN UN PULSO DE GLU-3H A 3.5 H DE AEREALOGENESIS. A) RADIOACTIVIDAD TOTAL Y B) RADIOACTIVIDAD ETANOL-SOLUBLE Y PRECIPITABLE EN CADA ESTRATO MICELIAL.

apreciarse en la figura 9B, donde se nota que la disminución de la marca soluble en el m. superior es acompañada de un aumento inicial en la marca precipitable. Nuevamente la mayor parte de marca (cerca del 85%) que se localiza en el micelio aéreo se encuentra en forma precipitable. El micelio inferior prácticamente no sufre ningún cambio. La marca soluble en el micelio superior inicialmente se encontró en un 50% como glutamato y un 20% como un compuesto que migra en la posición de arginina. Del análisis del resto de las muestras únicamente se aprecia la disminución progresiva del pico de glutamato.

VI -PULSO DE ACIDO α -AMINOISOBUTIRICO-3H DURANTE LA AEREOLOGENESIS.

Se incubó un cultivo de 14 h de crecimiento durante 1.5 h en presencia de ácido α -aminoisobutírico-3H (compuesto no metabolizable) y a continuación se hicieron matas miceliales que se baron en condiciones de crecimiento de micelio aéreo. A los 1, 3, 6, 12 y 22 h de incubación se separaron las distintas estructuras y se cuantificó las marcas interna y externa. En vista de que la suma de cpm totales (incluyendo la marca externa al micelio) permanece aproximadamente constante a lo largo del tiempo; los resultados se muestran, normalizados de acuerdo al promedio de cpm totales de cada tiempo, como radioactividad total en cada estrato en la figura 10A. En ésta figura se puede apreciar que el micelio aéreo incorpore una cantidad considerable de marca soluble (21% de la marca total). Por otra parte, la radioactividad disminuye en el micelio superior durante las primeras 12 h



FIGURAS 10A y B. COMPORTAMIENTO DE LA MARCA INCORPORADA EN UN PULSO DE ACIDO α -AMINISOBTIRICO PREVIO A LA FORMACION DE MICELIO AEREO. A) RADICATIVIDAD TOTAL EN CADA ESTRUCTURA POR CPM TOTALES (INCLUIDA LA MARCA EXTERNA) Y B) RADIOACTIVIDAD ESPECIFICA EN CADA ESTRATO.

coincidiendo con el aumento de la radioactividad excretada al medio (marca externa) y con la incorporación de marca en el micelio aéreo. En el micelio inferior la radioactividad comienza a disminuir a partir de las 6 h.

Si se considera la marca externa como marca dentro del micelio superior, aún es notable una disminución en la radioactividad de éste durante las primeras 6 h, en una cantidad equivalente a la radiactividad ganada por el micelio aéreo, el aumento posterior a las 6 h es debido al incremento en la marca externa lo cual coincide con una disminución en la radioactividad del micelio inferior.

Cuando estos resultados se expresan como radioactividad específica (fig. 10B), se observa una acentuación del comportamiento de la figura 10A, debido a la disminución de proteína durante la aerealogénesis. Esta misma disminución de proteína provoca un aumento en la radioactividad específica del micelio inferior durante las primeras 6 h ya que en la figura 10A en el mismo intervalo de tiempo, el micelio inferior permanece relativamente constante.

DISCUSION CONCLUSIONES.

En términos generales, se ha comparado el comportamiento de diversos compuestos radioactivos respecto a su capacidad para ser transportados hacia el micelio aéreo durante la aerealogénesis - de *N. crassa*. Tal comparación pretendió demostrar que glutamina es la fuente del glutamato altamente acumulado en el micelio aéreo -- (Cárdenas y Hansberg, sometido para publicación) y las conidias - (Schmith y Brody, 1975), al ser transportada preferencialmente - del micelio en diferenciación hacia las hifas aéreas. (El mecanismo propuesto para producir glutamato ya ha sido mencionado).

De los resultados puede notarse que arginina, serina, - glutamina, glutamato y el ácido α -aminoisobutírico al ser administrados en forma radioactiva, tienen comportamientos semejantes en cuanto a la proporción de marca que es transportada al micelio aéreo. Esto sugiere que el transporte observado es un fenómeno inespecífico, relacionado probablemente con la disponibilidad de metabolitos en el micelio sustrato. Esta idea también se apoya en que la mayor parte de la marca del micelio aéreo se encontró en forma precipitable, excepto cuando se usó - el compuesto no metabolizable. Este resultado es contrario a la hipótesis de que la glutamina es la fuente del glutamato acumulado en el micelio aéreo y las conidias.

Sin embargo, si existen diferencias entre la cantidad de - marca que se encuentra soluble en el micelio aéreo cuando se

administran Gln-14C o Glu-3H en experimentos comparables, siendo el 24% de la radioactividad específica total para el caso de glutamina y el 14% el del glutámico. Aún así, la radioactividad encontrada en el micelio aéreo cuando se administra glutamina radioactiva explica menos del 10% de la glutamina o el glutámico que normalmente se acumulan en ésta estructura. No obstante, la posibilidad de que glutamina sea fuente del glutamato en el micelio aéreo no ha sido excluida por completo, principalmente porque en ningún caso pudo lograrse una proporción alta de marca inicial (mayor del 40% del total) como glutamina en el interior de la célula debido a que el recambio de la glutamina parece ser muy alto. La continua degradación de glutamina y su posible síntesis, conduce a la distribución de la radioactividad proveniente de glutamina en otros compuestos, lo cual disminuye la radioactividad específica de la poza total de glutamina en las tres estructuras miceliales. Para poder contender con estos problemas, posiblemente sea necesario hacer experimentos que incorporen rápidamente al micelio aéreo glutamina de una alta radioactividad específica es decir radioactividad por molécula, y analizar a tiempos muy cortos (minutos) los metabolitos resultantes de su degradación.

Entre los posibles candidatos para explicar el glutamato de las conidias se encuentra el glutamato mismo, si éste se transporta hacia el micelio aéreo. Tal posibilidad parece poco probable ya que la mutante am-1;en(am)-2 (sin actividad de las enzimas DHG y GOGAT) tiene capacidad de acumular glutamato en

el micelio aéreo aún cuando se depleta la poza de glutamato del micelio sustrato previamente a la aerealogénesis (Cárdenas y Hansberg, sometido para publicación). Además, como se observa en los experimentos últimos descritos en este trabajo, glutamato no parece ser transportado en forma preferencial.

La generación de glutamato podría provenir del catabolismo de aminoácidos como arginina, ornitina, histidina, glutamina y prolina, o por transaminación de α -cetoglutarato con otros aminoácidos en el micelio aéreo. Histidina y prolina difícilmente pueden genera mucho glutamato, ya que se encuentran en cantidades muy pequeñas en Neurospora.

Dado que el catabolismo de proteínas en el micelio sustrato es muy acentuado durante la esporulación de Neurospora (Cárdenas, 1983), podría constituir también una fuente de glutamato para el micelio aéreo. En un experimento similar a los descritos en este trabajo (Hansberg, datos no publicados) se administró a un cultivo de 11 h de crecimiento un pulso de 15 min. de una mezcla de aminoácidos radioactivos en condiciones en que se marca preferencialmente la proteína y después de 1 h más de crecimiento se llevó este cultivo a formar micelio aéreo. A las 15 h de aerealogénesis cerca del 15% de la marca se localizó en el micelio aéreo, de la cual mas del 80% se encontró incorporada en proteína y pared celular y sólo cerca del 20% en el citosol. Si bien es cierto que se ignora la naturaleza de la marca que fue transportada e incorporada al micelio aéreo, es notable la similitud con los resultados de los experimentos descritos en este trabajo, indicando que el catabolismo proteico en el micelio -

sustrato difícilmente puede proveer la glutamina y el glutamato acumulado en el micelio aéreo.

Una hipótesis alternativa a la planteada sobre el " arrastre " de metabolitos presentes en el citosol del micelio sustrato durante la aerealogénesis es considerar que no existen diferencias en la distribución de los compuestos probados porque, siendo todos aminoácidos poseen un mecanismo de transporte común. Aún asumiendo éstos dichos compuestos no parecen tener relación directa con el fenómeno de acumulación de glutamato en el micelio aéreo y las colonias.

A lo largo del trabajo pudo detectarse que el micelio inferior y el micelio superior son estructuras claramente diferentes - y que muy probablemente el micelio inferior no participa en la formación del micelio aéreo. Estas conclusiones surgen de los datos sobre el rápido consumo de glutamina y glutamato en el micelio superior en comparación con el micelio inferior. Parte de éste consumo se explica por oxidación de éstos aminoácidos a través del ciclo de Krebs : pérdida de marca en forma de CO₂ radioactivo cuando se uso Gln-14C y en forma de agua tritiada, NADH y FADH₂ cuando se uso Gln-3H (Umbarger, 1978). Relacionado con esto, también se observó un notable recambio de macromoléculas en el micelio superior en contraste con un recambio muy bajo en el micelio inferior (experimentos IV y V). Finalmente está el hecho de que una biomasa mínima, semejante a la biomasa,

del micelio superior es capaz de formar micelio aéreo y el incremento de la biomasa del micelio inferior practicamente no contribuye a aumentar la producción de micelio aéreo (experimento III).

Los tres últimos experimentos descritos en resultados fueron realizados usando 3-4 veces menos biomasa que la usada en los experimentos anteriores. Aún puede usarse menos biomasa, de tal forma que el micelio superior sea muy delgado y el micelio inferior no exista. Esta condición tal vez no sea del todo deseable en casos en que se requiera hacer referencia a condiciones experimentales - similares a las de la aerealogénesis, es decir, como una forma de disectar los fenómenos asociados a la esporulación de los exclusivamente relacionados a la limitación de nutrientes.

Las perspectivas de este trabajo se encuentran en la adopción de los siguientes enfoques generales:

1) - Revisión de los antecedentes de éste trabajo a la luz del nuevo concepto de micelio superior, estudiando que tan real es la disminución, durante la aerealogénesis, de las pozas de aminoácidos acumulados en la fase preestacionaria de crecimiento. Si se siguen verificando los fenómenos antes descritos para el micelio inferior y el micelio superior tomados en conjunto, entonces es preciso preguntarse si la glutamina administrada exógenamente es un pulso corto es metabólicamente equivalente a la glutamina sintetizada y acumulada durante el crecimiento celular problema que únicamente puede ser resuelto en función del avance del conocimiento en la regulación del metabolismo nitrogenado de

Neurospora.

Las posibilidades finales dentro de esta misma línea son:

a) Usar la cepa doble mutante am-1;en(am)-2 (auxótrofa de glutamato) en experimentos similares a los tres últimos descritos en éste trabajo, ya que en dicha mutante el catabolismo de glutamina parece disminuir en cerca de un 80% (Calderón y Mora, manuscrito en preparación).

b) Lograr evitar la acumulación de glutamato usando inhibidores en algún punto del ciclo propuesto para generar glutamato a partir de glutamina (v. gr. inhibidores de transaminasas, fig. 2).

2) Si glutamina es descartada definitivamente como generadora del glutamato en el micelio aéreo y las conidias, entonces se planterían otras posibilidades; considerando que la arginina acumulada en las vesículas capaz de ser movilizada ante la privación de nitrógeno (Legerton y Weiss, 1978), pudiera ser la fuente de glutamato durante la esporulación (Brody, 1981).

Esta idea es congruente con la evidencia de que Gln esta implicada en la movilización de arginina acumulada (Vaca y Mora 1977; Drainas y Weiss 1982). Es posible que la relación entre glutamina y la arginina acumulada en las vesículas esté asociada con el requerimiento de una poza alta de glutamina para esporular; la disminución experimental de la poza de glutamina puede provocar una movilización prematura de arginina y de ésta manera afectar la disponibilidad de dicha arginina para la esporulación. En este sentido, la poza de glutamina serviría como una señal indicadora

del status metabólico de la célula y en consecuencia como un modulador de los eventos relacionados al cambio de programa metabólico que debe ocurrir al inicio de la aerealogénesis. Al respecto, glutamina esta involucrada en el control de vías alternas de utilización de fuentes de nitrógeno a través de la represión catabólica por nitrógeno (Marzluf, 1981). Aún cuando la caracterización de las vesículas que acumulas aminoácidos básicos se ha hecho en condiciones de cultivo líquido, es muy probable que el papel relevante de éstas ocurra durante los procesos de diferenciación. Inclusive, es posible que la regulación de flujos de entrada y salida de aminoácidos en las vesículas, y su capacidad de atrapar otros aminoácidos sea diferente durante tales procesos.

El seguimiento de éste enfoque implicaría en principio el aislamiento de vesículas de los micelios superior y aéreo (se desconoce si en tales estratos existen vesículas) y su caracterización en cuanto a su contenido. Posteriormente puede intentarse marcar la arginina acumulada en las vesículas y finalmente rastrear las vesículas marcadas a lo largo de la aerealogénesis. Comparando la cepa silvestre con mutantes alteradas en alguna enzima del catabolismo de arginina, por ejemplo la mutante ota alterada en la enzima ornitina aminotransferasa y que es incapaz de generar glutamato a partir de arginina- (Goodman y weiss, 1980), podría deducirse la función de la arginina acumulada en relación con la formación del micelio -- aéreo. Es interesante que la mutante mencionada produce con

días solamente 15 o 20% de lo normal (Brody, 1981). Relacionado con ésto último, recientemente se ha aislado una mutante de la bacteria Streptomyces fradiae afectada en la enzima ornitina carbamil transferasa (enzima que sintetiza citrulina a partir de ornitina - y carbamifosfato) que es incapaz de formar micelio aéreo. Este fenotipo revierte en presencia de citrulina pero no de ornitina -- (Vargha y col. 1983). Las mutantes mencionadas sugieren una posible conexión entre la síntesis de arginina y la formación del micelio aéreo en los microorganismos mencionados.

REFERENCIAS.

- 1.- Brody, S. (1981). Genetic and biochemical studies on Neurospora conidia germination and formation. EN: The fungal spore : Morphogenetic controls (Turian, G. y Hohl. HR. Eds.) Academic Press Inc. New York.
- 2.- Calderon, J y J. Mora, manuscrito en preparación.
- 3.- Cardenas. M. E. (1983). Papel de la glutamina sintetasa durante la formación del micelio aéreo en Neurospora crassa. Tesis de maestría en Investigación Biomédica Básica UACP y P. del C.C.H., - CIFN, U.N.A.M, México.
- 4.- a Cardenas M. E. y W. Hansberg. Glutamine requirement for aerial mycelium growth in Neurospora crassa. Sometido para publicación
b Cardenas, M. E y W. Hansberg. Glutamine metabolism during aerial mycelium growth of Neurospora crassa, sometido para publicación.
- 5.- Christensen, R.L. y J.C. Schmit (1980). Regulation of glutamic acid decarboxylase during Neurospora crassa, conidial germination. J. Bacteriol. 144;983 -990
- 6.- Cole, G. T. (1981). Conidiogénesis and conidiomatal ontogeny. EN: Biology of conidial fungi 2 (Cole, G.T. y B. Kendrick, Eds.) Academic Press Inc. New York.
- 7.- Davies, R. H. (1972). Metabolite distribution in cells. Science 178;835-840
- 8.- Drainas, C. y R.L. Weiss (1982 a). Energetics of vacuolar compartmentation of arginine in Neurospora crassa, J. Bacteriol 150 (2);770-778.

- 9.- Drainas, C. y R.L. Weiss (1982b) . Energy requirement for the mobilization of vacuolar arginine in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 150(2); 779-784.
- 10.- Goodman, I. y R.L. Weiss (1980). Control of arginine metabolism in Neurospora: Flux through the biosynthetic pathway. J. Bacteriol. 141(1); 227-234.
- 11.- Kendrick, B. (1971). Taxonomy of fungi imperfecti, 309 pp., Toronto: University of Toronto Press, Citado en Turian, G. (1976). Spores in Ascomycetes, their controlled differentiation. The fungal spore (form and function) (Weber, D. J. y M.H.Wilford Eds.).
- 12.- Lara, M. L. Blanco, M. Campomanes, E. Calva, R. Palacios y J. Mora (1982). Physiology of ammonium assimilation in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 150 (1); 105-112.
- 13.- Leef. J. L. y P. Mazur (1978). Physiological response of Neurospora conidia to freezing in the dehydrated, hydrated or germinated state. Appl. Envir. Microbiol. 35; 72-83.
- 14.- Legerton, T. L. y R. L. Weiss (1979). Mobilization of sequestered metabolites into degradative reactions by nutritional stress in Neurospora. J. Bacteriol. 138(3); 909-914.
- 15.- Lowry, O.H., N.H. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193;265-275.
- 16.- Marzluf, G. A. (1982). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiol. Rev. 45(3); 437-461.
- 17.- Metzemberg, R.L. (1979). Implications of some genetic control mechanisms in Neurospora. Microbiol. Rev. 43(3); 361-383.

- 18.- Mora, Y., G. Espin, K. Willms y J. Mora (1978). Nitrogen accumulation in mycelium of Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 104; 241-250
- 19.- Ronzio, R. A. y A. Meister (1968). Phosphorilation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59; 164-170.
- 20.- Schmith, J. C. y S. Brody (1976). Biochemical genetics of Neurospora crassa conidial germination. Bacteriol. Rev. 40(1); 1-41.
- 21.- Schimith, J. C. y S. Brody (1975). Neurospora crassa conidial germination: Role of endogenous amino acid pools. J. Bacteriol. 124(1);232-242.
- 22.- Scott, W.A. (1976). Biochemical genetics of morphogenesis in Neurospora . Ann. Rev. Microbiol. 30;85-104.
- 23.- Stine, G.J. y A.M. Clarck (1967). Synchronous production of conidiophores and conidia of Neurospora crassa, Can. J. Microbiol. 13;447-453.
- 24.- Umbarger H.E. (1978). Amino acid byosynthesis and its regulations. Ann. Rev. Biochem. 47;533-606.
- 25.- Vaca, G. y J. Mora (1977), Nitrogen regulation of arginase in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 131(3); 719-725.
- 26.- Vargha, G., T. Karsai, G. Szabo (1983). A conditional aerial mycelium-negative mutant of Streptomyces fradiae with deficient ornithine carbamoyltransferase activity. J. Gen. Microbiol. 129; 539-542.
- 27.- Vogel, H.J. (1964). Distribution of lisine pathways among fungi: Evolutionary implications. Amer. Nat. 98; 435-446.

**Esta Tesis se imprimió en Diciembre de 1988
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A.,
Av. Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-21-05 523-03-33 03100 México, D. F.**