

UCH-FC
MAG-B
5586i

INTERACCIONES GENICAS
EN LA DIFERENCIACION DE LA
PARED CELULAR
DE
Neurospora crassa

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS CON MENCIÓN EN
GENÉTICA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Tesista : MARCELA S. SILVA T.
Tutor : PROF. DR. GUIDO PINCHEIRA V.
Año : 1982

Facultad de Ciencias
Básicas y Farmacéuticas

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N

T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa a la Comisión de Post Grado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

Marcela S. Silva Tapia

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de Septiembre de 1982.

Tutor de Tesis

Prof. Guido Pincheira



Comisión Informante de Tesis

Prof. Luis Corcuera

Prof. María Antonieta Valenzuela

Prof. Carlos Valenzuela



*A mi padre,
un hombre sin igual.*

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo
me ha devuelto la confianza en este mundo
pues me ha demostrado que lo bajo
queda empañado y profundo
por personas extraordinarias y gentiles
que dan al quehacer científico
sus mejores impulsos y abriles.

Gracias Mariano Castillo, por tu ayuda de lazarillo.
Gracias Cecilia Labbé, por tu amistad e interés.
Gracias Lilibiana Cardemil, por tu confianza gentil.
Gracias Guido Pincheira, por tu estímulo que no quiebra.
Gracias Luis Villarroel, por la disposición propia de él.
Gracias a mi esposo e hijas, por mi ausencia y sus pacien-
cias.
Gracias a Dios por haber conocido y hecho tan valiosos
amigos.

INDICE DE MATERIAS

	Página
INDICE DE TABLAS.....	iv
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- PROPOSITO DE LA TESIS.....	5
3.- MATERIALES.....	7
3.1.- Cepas analizadas de <u>Neurospora crassa</u> ...	7
3.2.- Reactivos.....	8
4.- METODOS.....	10
4.1.- Obtención de mutantes dobles.....	10
4.2.- Crecimiento de diferentes cepas.....	10
4.3.- Obtención de la pared celular.....	11

	Página
4.4.- Obtención de la fracción I de la pared celular.....	13
4.5.- Reconocimiento de azúcares.....	14
4.6.- Métodos analíticos.....	14
4.7.- Evaluación de la cromatografía de gases...	17
4.8.- Identificación de los enlaces glicosídicos.....	19
4.9.- Metilación exhaustiva de la fracción I....	19
4.10- Solvólisis del polisacárido metilado.....	21
5.- RESULTADOS.....	23
5.1.- Experimentos genéticos.....	23
A.- Cruzamientos.....	23
B.- Caracterización morfológica de la doble mutante peak-2; scumbo.....	23
5.2.- Resultados del análisis químico.....	29
A.- Cuantificación de la fracción I.....	29

	Página
B.- Alditoles acetilados.....	32
C.- Alditoles acetilados parcialmente metilados.....	36
D.- Grado de metilación.....	42
6.- DISCUSION.....	43
B I B L I O G R A F I A.....	56

I N D I C E D E T A B L A S

Página

I.- Cepas silvestres y mutantes morfológicas de <u>N. crassa</u> , analizadas en este trabajo.....	7
II.- Porcentaje de fracción I con respecto al peso de la pared celular de cepas silvestres y mutantes de <u>N. crassa</u>	30
III.- Test de Antrona para azúcares totales de la fracción I.....	31
IV.- Composición porcentual de azúcares de la fracción I de cepas silvestres y mutantes de <u>Neurospora crassa</u>	35

V.-	Porcentaje molar de la composición de derivados alditoles acetilados parcialmente metilados de la fracción I de la pared celular de <u>Neurospora crassa</u>	39
VI.-	Porcentajes relativos de los derivados de alditoles acetilados de glucosa y manosa.....	52

INDICE DE ILUSTRACIONES

	Página
1.- Cepas de <u>Neurospora crassa</u> analizadas en este trabajo.....	24
2.- Germinación de ascosporas provenientes de un asco en el cruzamiento <u>pk-2</u> ; <u>sc</u> x <u>77a</u> . Disposición de ascosporas 4 silvestres: 4 mutantes.....	25
3.- Germinación de ascosporas provenientes de un asco en el cruzamiento entre <u>pk-2</u> ; <u>sc</u> x <u>77a</u> . Disposición de ascosporas 2:2:2:2.....	26
4.- Hifas observadas con el microscopio de contraste de fases.....	28

5.- Cromatogramas obtenidos de los derivados de alditoles acetilados de la fracción I de la pared celular de <u>Neurospora crassa</u>	33
6.- Cromatogramas de derivados de alditoles acetilados parcialmente metilados.....	37
7.- Espectro de absorción al infrarrojo del polisacárido de la cepa silvestre 74-A.....	42
8.- Posible esquema de la organización del heteropolímero de la fracción I.....	47

R E S U M E N

En el presente trabajo se investigan posibles relaciones entre factores genéticos, componentes químicos de la pared celular y la morfología del hongo Neurospora crassa.

Para ello se utilizan cepas silvestres y mutantes morfológicas simples y dobles, realizando estudios comparativos de la composición y estructura de polímeros que constituyen la fracción I de la pared celular de N. crassa.

Mediante cromatografía de gases de derivados en forma de alditoles acetilados de los azúcares constituyentes de tales polímeros, se demuestra que dicha fracción está constituida esencialmente por: Glucosa, manosa y galactosa.

El análisis de los derivados de alditoles acetilados parcialmente metilados indica que el heteropolímero que constituye la fracción I de la pared celular de N. crassa es un glucano con enlaces 1-3 y que intercala manosa en su estructura lineal. Además, posee ramificaciones originadas en manosa y que poseen galactosa como azúcar terminal en cada rama.

Las cepas mutantes analizadas muestran un incremento de 2-6 manosa, 4-glucosa y T-galactosa en desmedro de 3-glucosa, variación que, al parecer, está correlacionada con la morfología del hongo.

El análisis de dos cepas dobles mutantes sugiere la existencia de interacciones génicas, ya sea del tipo de complementación y/o intensificación de los efectos de diferentes genes para determinar alteraciones en la composición química de la pared celular y el fenotipo del hongo.

A B S T R A C T

This research work concerns the study of possible correlations between genes, chemical composition of the cell wall and the morphology of the fungus Neurospora crassa.

The material studied has been wild type, single and double morphological mutant strains of N. crassa. A comparative analytical study of the composition and structure of polymers as constituents of fraction I of the cell wall has been made.

Gas liquid chromatography of derivatives of the sugars that constitute such polymers indicates, that fraction I of the cell wall is essentially formed by: glucose, mannose and galactose.

The analysis of derivatives of acetate alditols partially methylated indicates that the heteropolymer in fraction I is a 1-3 glucan, that incorporates mannose in its lineal structure. Besides, it has branches originated in mannose with galactose as a terminal sugar.

The mutant strains analyzed exhibit an increase of 2-6 mannose, 4-glucose and T-galactose and, at the same time, a decrease of 3-glucose. This type of variation seems to be correlated with alterations of the morphology of the fungus.

The analysis of fraction I components in the double mutants, suggests the existence of genetic interactions, such as complementation or additive effect of the mutations of different genes affecting the chemical composition of the cell wall and the morphology of N. crassa.

1.- I N T R O D U C C I O N

La pared celular es un factor importante en la morfogénesis de Neurospora crassa (1,2), pues cambios en la composición de sus constituyentes químicos pueden conducir a alteraciones de la morfología del hongo.

Esta idea es sustentada además, por el hecho que la pared celular de mutantes morfológicas de Neurospora crassa presenta alteraciones, tanto cualitativas como cuantitativas, en sus componentes químicos, al ser comparada con similar carácter de algunas cepas silvestres. En algunas cepas, las alteraciones morfológicas pueden aparecer correlacionadas con variaciones en la modalidad de crecimiento del hongo, como ser su velocidad de extensión, ramificación, grado de conidiación, dicotomía de hifas, etc. Todo ello sugiere, de algún modo, la importancia de la pared celular como factor morfogenético en Neurospora.

Además de los efectos de alteraciones genéticas, se conoce también la obtención de fenocopias de mutantes morfológicas de Neurospora crassa, inducidas químicamente (3). Tales fenocopias, también exhiben cambios en los componentes químicos de la pared celular.

Se puede agregar, además, que la obtención de protoplastos de Neurospora, mediante la digestión de su pared celular con enzimas líticas como helicasa (conjunto de carbohidrasas), glucanasas (enzimas que hidrolizan glucanos), laminarinasa (enzima que hidroliza los enlaces glicosídicos β 1 \rightarrow 3, propios del laminarín), etc, alteran drásticamente la morfología del hongo. Concomitantemente, se puede indicar que algunas mutantes morfológicas del mismo organismo tienen una pared celular con diferente grado de resistencia a la acción de dichas enzimas, lo que, es reflejo de variaciones en su composición química.

Estas observaciones, sugieren que la morfología de Neurospora, depende de algún modo, de la composición química de su pared celular.

Al respecto, se conoce que uno de los principales constituyentes de la pared celular de organismos procariontes es un péptido-glucano, el cual, según sea su composición química, le confiere mayor ó menor resistencia osmótica a la célula (4). En las bacterias Gram (+), éste péptido-glucano, constituye un 40-90 % del peso seco de la pared celular y su composición química puede variar en diferentes cepas de una misma especie.

Se puede sugerir que el rol morfológico del péptido-glucano de la pared celular de procariontes es de

importancia similar en organismos eucariontes inferiores. Al respecto, hay buena evidencia de homologías morfológica y morfogénética entre procariontes y eucariontes (5). Así, se pueden mencionar similitudes de algunos aspectos regulatorios del crecimiento celular, lugares de síntesis y/o degradación de la pared celular, los cuales, desde luego, se desarrollan generalmente en interdependencia dinámica con el medio en el que el organismo se desarrolla.

El análisis químico de los componentes de la pared celular de Neurospora crassa ha revelado la existencia de cuatro fracciones, designadas como: I, II, III y IV (6). La fracción I es un péptido-glucano, soluble en álcali, y que ha sido caracterizado parcialmente (7,8,9). La fracción II es un glucán, insoluble en álcali y soluble en ácido, sin mayor caracterización aún. La fracción III es un glucano β 1-3, el cual es fácilmente digerido por laminarinasa. La fracción IV está compuesta por quitina.

Estas cuatro fracciones de la pared celular no tienen una distribución uniforme en las diferentes regiones de las hifas.

La región apical es pobre en los glucanos (10) que constituyen las fracciones I, II y III de la pared celular. En cambio éstos glucanos serían los responsables de la mayor rigidez de la región sub-apical de las hifas (11,12).

El estudio del comportamiento de la región apical de las hifas de Neurospora crassa durante el crecimiento del hongo indica que dicha zona es el lugar que experimenta los procesos de elongación de la hifa. Para ello, debe poseer una gran elasticidad.

Motivados por estos antecedentes, el presente trabajo, tiene por objetivo la caracterización de la composición química de la fracción I de la pared celular de Neurospora crassa, por ser ella una de sus fracciones cuantitativamente más importante (13) y, además por que parece desarrollar un rol clave en los procesos morfogénéticos, como es la ramificación de las hifas, la conidiación ó la formación de protoperitecios.

2.- PROPOSITO DE LA TESIS

El propósito de ésta tesis es investigar la relación existente entre ciertos genes y los cambios en la composición química de la pared celular, la organización de ésta y las alteraciones que estos cambios pueden determinar en la morfología de algunas cepas de Neurospora crassa.

Específicamente, se trata de determinar como mutaciones de ciertos genes conducen a alteraciones en la fracción I de la pared celular y éstas a su vez, se traducen en cambios de la velocidad de crecimiento y la morfología de las hifas del hongo.

Dado que la fracción I de la pared celular de Neurospora está constituida por un péptido-glucano, en este trabajo se pretende identificar los genes que controlan las características químicas y estructurales de dicho polímero y entender su rol morfogenético.

El análisis comparativo de la fracción I de la pared celular de mutantes dobles de Neurospora crassa con los resultados obtenidos en las mutantes simples que las

constituyen, ofrece, además la posibilidad de investigar el tipo de interacciones genéticas para el control de la composición de macromoléculas importantes para la estructura de la pared celular. Esta posibilidad surge por el hecho que Neurospora crassa es haploide, de modo que el análisis de las dobles mutantes y las simples que las constituyen nos permiten detectar posibles efectos génicos cuando los genes están en organismos separados (mutantes simples) y cuando ellos coexisten en un mismo individuo (dobles mutantes).

3.- M A T E R I A L E S.

3.1.- Cepas analizadas de Neurospora crassa.

Las cepas de Neurospora crassa utilizadas en éste trabajo son presentadas en la Tabla I.

T A B L A I

CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES MORFOLOGICAS DE N. crassa, ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO.

		NUMERO FUNGAL GENETICS STOCK CENTER	G. L.	ALTERACION ENZIMATICA
CEPAS SILVESTRES	LINDEGREN	353—1A		
	74-A	987		
MUTANTES SIMPLES	PEAK-2a (pk-2a)	alélica de biscuit	V	L-glutamina-D-fructosa- 6-fosfato aminotransfe- rasa (14)
	SCUMBO (sc)	49	III	
	CRISP-1a (cr)	488	I	Adenil-ciclasa (15)
MUTANTES DOBLES	RAGGED; CRISP-1a (rg; cr-1a)	418	I	Fosfoglucomutasa ; adenilciclasa (15,16)
	PEAK-2; SCUMBO (pk-2; sc) -	STOCK U. de CHILE	V; III	

Todas las cepas, a excepción de pk-2a y pk-2 ; sc, fueron obtenidas del Fungal Genetics Stock Center, Humboldt State University, Arcata California.

3.2.- Reactivos.

Los reactivos empleados fueron obtenidos:

A) Merck p.a.

D(-) Arabinosa

D(+) Galactosa

D(+) Manosa

D(+) Rhamnosa monohidrato

D(-) Fucosa

Metanol

Etanol

Ac. acético glacial

Anhidrido acético

Cloroformo

Acido Sulfúrico

Ioduro de metilo

Acido trifluoroacético

Hidruro de Boro y Sodio

Dimetil sulfóxido

B) Sigma.

D(+)
Glucosa anhidra

Meso-Inositol

Dodecilsulfato de sodio

D(+)
Xilosa

Antrona

C) Riedel-De-Haën

Hidróxido de sodio

D) Sintetizado

Dimetil-sulfinilo de sodio

4.- M E T O D O S

4.1.- Obtención de mutantes dobles.

La obtención de mutantes dobles se realizó mediante cruzamientos entre las cepas mutantes simples de Neurospora crassa, realizados en medio sólido Westergaard (17), a 25 °C. Una vez que los cruzamientos fructifican, se aíslan ascosporas al azar. Algunas de ellas son portadoras de ambas mutantes. Después de germinadas, las posibles dobles mutantes fueron analizadas genéticamente, mediante cruzamientos con las cepas silvestres 77a ó 74A. A través del análisis de ascos disectados en orden, es posible comprobar la segregación de las mutantes simples que componen la doble mutante.

4.2.- Crecimiento de las diferentes cepas.

Para obtener material de pared celular y su fracción I, las diferentes cepas utilizadas en éste trabajo

fueron crecidas en medio mínimo líquido Vogel (18), suplementado con sacarosa al 1,5%, a 25 °C y con agitación continua de 130 rpm. por un período de tres días.

Debido al lento crecimiento de las cepas de bles mutantes (peak-2; scumbo y ragged; crisp-la) fue necesario replicar sus cultivos una y otra vez, obteniéndose de ésta manera material suficiente para el análisis de la pared celular.

4.3.- Obtención de la pared celular.

Después de tres días de cultivo, el micelio de las diferentes cepas fué colectado por filtración. En seguida fue lavado con suficiente agua destilada, para arrastrar los componentes del medio que pudieran estar adheridos a las hifas. Luego el micelio fue liofilizado y mantenido al vacío en el desecador, para su uso posterior.

La obtención de pared celular, propiamente tal, se hizo tratando el micelio, desmenuzado y liofilizado, con una solución acuosa de dodecil sulfato de sodio (S.D.S.) al 1%, en una proporción de 100 ml. por cada gramo de micelio seco, en continua agitación a 4 °C. Al cabo de 16 horas, para las cepas silvestres, y de 20-24 horas para las cepas mutantes, el micelio fue lavado con agua destilada y centrifugado a 6.000 x g por 15 minutos. Esta operación es repetida un mínimo de 6 veces.

Finalmente se procede a la deshidratación del micelio, suspendiéndolo en un gradiente de alcohol que va de 10% a 100%, variando un 10% cada vez. Cada paso fue acompañado de centrifugación de la suspensión de micelio, a 6.000 x g por 10 minutos.

El último pella obtenido, de color blanquizo, se seca a 37 °C por 24 horas y se liofiliza. Este material liofilizado constituye la pared celular seca de Neurospora crassa.

4.4.- Obtención de la fracción I de la pared celular.

La fracción I fue obtenida mediante la hidrólisis de 200 miligramos de pared celular liofilizada con 20 ml. de NaOH 2N, durante 16-18 horas, a temperatura ambiente y con agitación.

El material soluble en álcali se recuperó por centrifugación con 6.000 x g por 15 minutos. El sobrenadante fue precipitado con 2,5 volúmenes de alcohol etílico y posteriormente suspendido en 1,5 ml. de una solución de NaOH 1N (modificación de la técnica de Mahadevan y Tatum(6)).

El material en suspensión fue dializado contra agua destilada por 24-36 horas, con el fin de eliminar el sodio. Luego de la diálisis, la muestra fue liofilizada por 6 horas. Dicho preparado constituye la fracción I de la pared celular de Neurospora crassa, la cual se guardó en un desecador. La fracción I fue cuantificada como porcentaje del peso seco de la pared celular.

aire a 60 °C por 9 horas. Luego se dejaron en desecador por un período de 18-20 horas.

Los azúcares liberados por la hidrólisis fueron reducidos a sus alditoles correspondientes, mediante el agregado de 1 ml. de una solución de 5 mg/ml de NaBH_4 en NH_4OH 1 N. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante una hora para su reducción. Luego se eliminó el posible exceso de agente reductor con 3-4 gotas de ácido acético glacial, hasta que los tubos, sometidos a agitación, dejaron de burbujear. Los alditoles formados fueron transferidos, a tubos nuevos para su evaporación con aire a 60 °C, durante 7 horas, hasta secar la muestra.

El agua que pudieran tener las muestras, fue extraída agregando, a cada tubo, 5 ml. de alcohol metílico, en cantidades de 1 ml. cada vez. Para lograr una buena mezcla de la muestra con el alcohol, se succionó, varias veces, con pipeta Pasteur.

Cada vez que se agregó el alcohol metílico, se evaporó a sequedad con aire a 60 °C. Los alditoles desecados se dejaron en tubos destapados, en un desecador, durante toda la noche.

Para la acetilación de los alditoles, se les agregó 0,5 ml. de anhídrido acético. Este procedimiento es necesario para volatilizar la muestra y su posterior uso en el análisis en el cromatógrafo de gases. Los tubos con anhídrido acético fueron sellados y sometidos a 121 °C por 90 minutos en autoclave. Los derivados de azúcares acetilados presentan un color café, proporcional a la concentración de azúcares. Esta muestra fue transferida a frascos pequeños, taponados con goma blanda, para impedir su evaporación.

Si los cristales de acetato de Na formados son numerosos, es necesario hacer la reducción de los azúcares con una menor cantidad de NaBH_4 .

Para el análisis cromatográfico, la muestra fué extraída usando jeringas Hamilton, modelo 70081, de 1 μl .

Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, modelo Sigma 3B, con una columna OV-225, al 3% que contiene como soporte una mezcla de etilenglicol succinato : etilenglicol adipato: silicona de 1:1:2 (9).

Para el análisis, en el cromatógrafo de gases, el programa optimizado fué de una temperatura de 180°C, por un tiempo de 2 minutos, para llegar, posteriormente, a

210 °C, con una variación de 0,7 °C por minuto y un flujo de nitrógeno de 30 ml/min. La temperatura del inyector y detector de ionización de llama, fue programada a 300 °C.

Los patrones usados y sometidos al mismo procedimiento que las muestras, fueron: glucosa 1 mg/ml, manosa 1 mg/ml, galactosa 1 mg/ml, rhamnosa 1 mg/ml, xilosa 1 mg/ml, arabinosa 1 mg/ml, fucosa 1 mg/ml, y meso inositol 1 mg/ml.

4.7.- Evaluación de la cromatografía de gases.

Como la cantidad de alditoles acetilados inyectados al cromatógrafo de gases, es directamente proporcional al área de los picos de las muestras y como la sensibilidad del detector a los diferentes alditoles es distinta, es necesario obtener las constantes de detección para cada alditol presente en las muestras estudiadas.

Para éste efecto se usó la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{l} \mu\text{g inositol} \times 1000 \\ \text{agregados a la} \\ \text{muestra} \end{array} \times \frac{\begin{array}{l} \text{Area del pico} \\ \text{del azucar en} \\ \text{la muestra} \end{array}}{\begin{array}{l} \text{Area del pico} \\ \text{del inositol de} \\ \text{la muestra} \end{array}} \times \frac{\begin{array}{l} \text{Area del pico} \\ \text{del inositol del} \\ \text{estandar} \end{array}}{\begin{array}{l} \text{Area del pico} \\ \text{del azucar del} \\ \text{estandar.} \end{array}}$$

De ésta manera, las constantes (K) obtenidas fueron:

$$K_{\text{glucosa}} = \frac{(A) \text{ inos. st.}}{(A) \text{ glu. st.}} = 1,6785$$

$$K_{\text{galactosa}} = \frac{(A) \text{ inos. st.}}{(A) \text{ gal. st.}} = 2,0394$$

$$K_{\text{manosa}} = \frac{(A) \text{ inos. st.}}{(A) \text{ man. st.}} = 1,97281$$

Con éstos valores, las áreas de los picos de las muestras, obtenidas por el cromatógrafo y las integrales respectivas, fue posible obtener los resultados que se muestran en la Tabla IV.

4.8.- Identificación de los enlaces glicosídicos.

El estudio de la organización de los monosacáridos en el heteropolímero de la fracción I se hizo mediante la preparación de las muestras por permetilación del polisacárido, catalizada por el carbanión dimetil-sulfinilo en dimetilsulfóxido, según el método de Hakomori (21). Tales muestras fueron analizadas en el cromatógrafo de gases.

4.9.- Metilación exhaustiva de la fracción I.

Este es uno de los métodos más importantes en el estudio de la estructura de polisacáridos. Se inicia con la metilación del polisacárido y se continúa con la hidrólisis de los enlaces glicosídicos. Los azúcares parcialmente metilados fueron separados e identificados con la técnica de cromatografía de gases descrita anteriormente.

Cinco miligramos de fracción I de la pared celular de cada cepa en estudio, se dejaron durante toda la noche al vacío, a 60 °C, para lograr su sequedad. En seguida se les agregó 1 ml de dimetilsulfóxido (DMS), recién destilado a 189 °C, por una hora a 60 °C, en baño de aceite y con agitación. Para completar la disolución del polisacárido, las muestras se sonicaron a 50 °C.

Bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó lentamente 500 µl. de dimetilsulfínilo de sodio y se lo mantiene por 4 horas en baño de aceite a 60 °C, con agitación. Luego, se agregó 80 µl. de yoduro de metilo, gota a gota y a temperatura ambiente. Habitualmente una metilación completa se obtiene al cabo de dos horas, con agitación lo que se traduce en una menor viscosidad de las muestras.

Los polisacáridos metilados, se purificaron en 3 ml de cloroformo y luego se agregó, durante 5 veces, 10 ml. de agua destilada. La emulsión se centrifugó a 12.800 x g por 20 minutos, descartando cada vez, la fase acuosa(22).

Un criterio bastante confiable para juzgar el grado de metilación es la ausencia de la banda de

absorción del grupo hidróxido, entre los 3.400 - 3.600 cm^{-1} , analizada con espectroscopía de rayos infrarrojos.

Para ésto es necesario concentrar la muestra en cloroformo hasta 0,3 ml mediante flujo de nitrógeno.

4.10.- Solvólisis del polisacárido metilado.

Las uniones glicosídicas del derivado permetilado se pueden escindir completamente mediante: hidrólisis ácida ó alcalina, metanólisis, acetólisis ó hidrólisis enzimática.

En esta oportunidad la solvólisis fue realizada por hidrólisis con ácido trifluoroacético a 121 °C por 75 minutos.

Para la identificación de los azúcares parcialmente metilados, es necesario derivatizarlos.

En éste procedimiento, los azúcares parcialmente metilados, fueron reducidos y acetilados, obteniéndose, de ésta manera, alditoles acetilados parcialmente metilados y correspondientes a cada monosacárido constituyente del polisacárido.

Los alditoles fueron obtenidos usando una solución de 6 mg de NaBD_4 en 1 ml de NH_4OH 1N, por una hora a temperatura ambiente. La reducción es detenida con 2 ó 3 gotas de ácido acético glacial y evaporándose en seguida a sequedad con aire a 30 °C.

El agua fue removida utilizando 1 ml de metanol durante 5 veces consecutivas y evaporando cada vez a sequedad a 30 °C, con aire.

Los alditoles acetilados y parcialmente metilados fueron identificados por cromatografía de gases, usando la columna OV-225 y con un programa de 130 °C, a 230 °C, con una variación de 2,5 grados por minuto.

S.- R E S U L T A D O S

5.1.- Experimentos genéticos.

Las cepas de Neurospora crassa estudiadas se presentan en la Figura 1.

A.- Cruzamientos.

El análisis de cruzamientos realizados entre la cepa peak-2; scumbo y la cepa silvestre 77a, mostró, una segregación de las mutantes simples que constituyen la doble mutante. Fue posible obtener ascos con una disposición de ascosporas mutantes y silvestres en relación de 4:4 ó tam**bién** de 2:2:2:2 (Figuras 2 y 3).

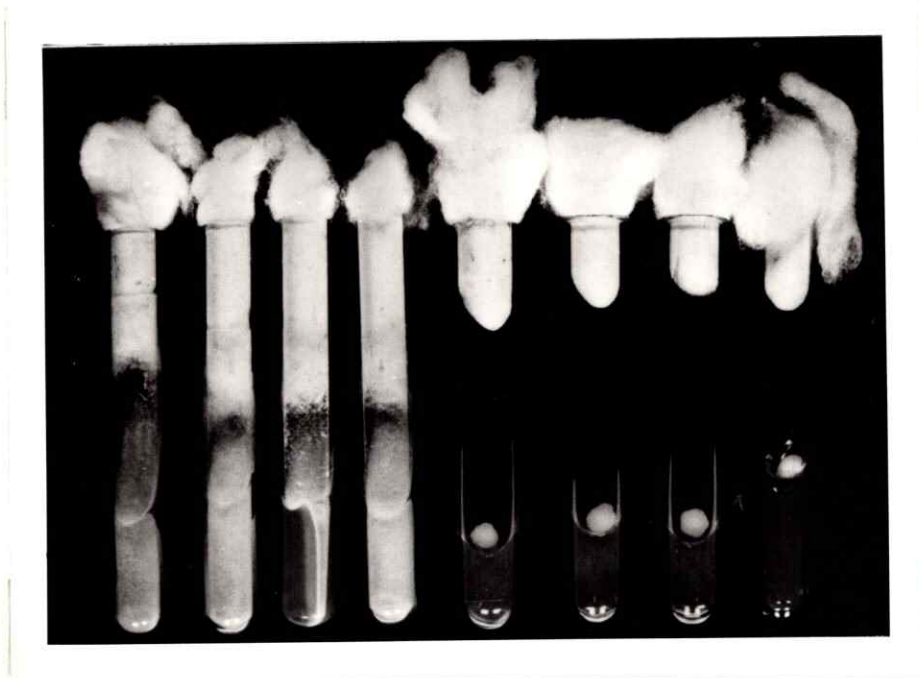
B.- Caracterización morfológica de la doble mutante peak-2; scumbo.

La doble mutante peak-2; scumbo posee un fe**notipo** colonial mucho más compacto que cada una de las mutan**tes** simples que la constituyen. Su velocidad de crecimiento es de 1/10 la velocidad de la cepa scumbo-49 y 1/5 de la ve**locidad** de crecimiento de la cepa peak-2a.



Lindegren 74 - A scumbo peak-2 pk-2;sc cr-1 rg;cr-1

FIGURA 1: Cepas de Neurospora crassa analizadas en éste trabajo.



74-A

Mutantes

FIGURA 2: Germinación de ascosporas provenientes de un asco en el cruzamiento pk-2; sc x 77a. Disposición de ascosporas 4 silvestres : 4 mutantes.

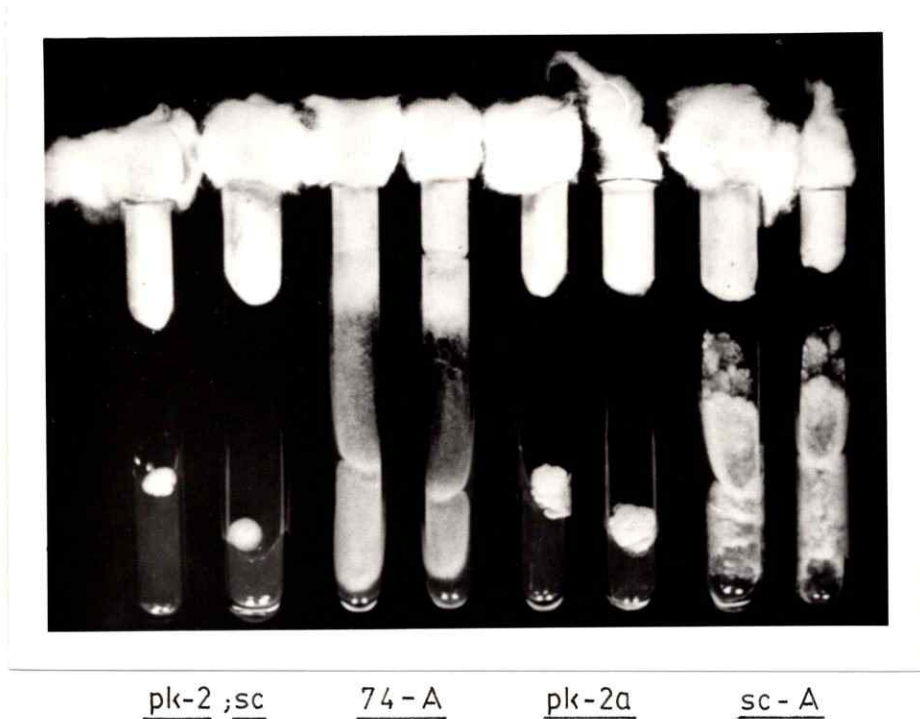


FIGURA 3: Germinación de ascosporas provenientes de un asco en el cruzamiento entre pk-2; sc x 77a. Disposición de ascosporas 2:2:2:2.

Del mismo modo, el grado de ramificación apical de las hifas de peak-2; scumbo es elevado, lo cual da a la colonia un aspecto de una esfera maciza y compacta. Esto dificulta su transferencia, mantención y la observación de sus hifas al microscópio (Figura 4).

La doble mutante peak-2; scumbo, confiere, además, al medio de cultivo un color café intenso. Su grado de conidiación es menor que el de las cepas silvestres y que las mutantes simples que la forman. También forma pocos protoperitecios, lo cual dificulta los cruzamientos en que interviene.

La modalidad de crecimiento de la doble mutante en medio líquido es totalmente diferente al de las cepas parentales, mostrando un crecimiento más restringido, que se manifiesta en esferas pequeñas y muy compactas de gran densidad y con ausencia de hifas aéreas.

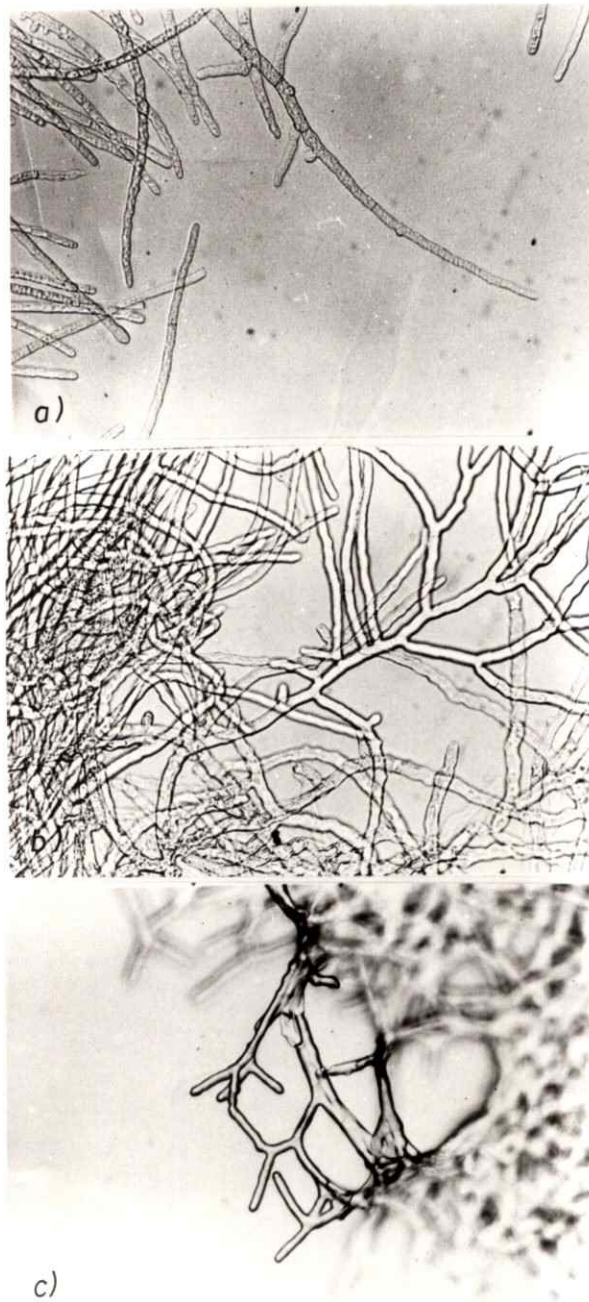


FIGURA 4: Hifas observadas con el microscopio de contraste de fases: a) Cepa scumbo - 49
b) Cepa peak-2a
c) Cepa pk-2; sc

5.2.- Resultados del análisis químicos.

A.- Cuantificación de la fracción I.

Las cantidades de fracción I aislada de la pared celular de las diferentes cepas se indican en la Tabla II.

Al ordenar las cepas en la Tabla II de acuerdo a su mayor grado de morfología colonial, es posible notar una relación entre la cantidad de fracción I de la pared celular y el mayor grado de fenotipo colonial de Neurospora crassa.

La cantidad de azúcares totales presentes, en la fracción I de las diferentes cepas, determinadas por el test de antrona, se presenta en la Tabla III.

T A B L A II

PORCENTAJE DE FRACCION I CON RESPECTO AL PESO DE LA PARED CE
LULAR DE CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES DE N. crassa.

Cepas	FGSC	% *
<u>Lindegreen</u>	353 - A	17,05 ± 1,01
<u>74 - A</u>	OR 23 - 987 A	18,01 ± 1,70
<u>crisp-1</u>	488 a	13,90 ± 0,85
<u>peak - 2a</u>	(alélica de biscuit)	13,40 ± 0,58
<u>scumbo</u>	49 A	12,60 ± 2,13
<u>ragged; crisp-1</u>	418 a	10,76 ± 0,61
<u>peak; scumbo</u>		10,68 ± 0,67

* Cada valor corresponde al promedio ± la desviación estandar de tres preparaciones diferentes de fracción I, expresadas como porcentaje de mg de fraccion I/mg de pa red celular liofilizada

Como se puede apreciar en la Tabla II, hay una tendencia a presentar una menor cantidad de fracción I en la pared celu lar, desde las cepas silvestres hacia las dobles mutantes.

T A B L A I I I

TEST DE ANTRONA PARA AZUCARES TOTALES DE LA FRACCION I.

CEPAS	FGSC	* mg azúcar/mg fracción I
<u>Lindegreen</u>	353 - A	0,860 ± 0,001
<u>74 - A</u>	OR 23 - 987 A	0,866 ± 0,009
<u>scumbo</u>	49 A	0,754 ± 0,008
<u>peak - 2a</u>	(alélica de biscuit)	0,730 ± 0,018
<u>crisp-la</u>	488 a	0,838 ± 0,012
<u>ragged; crisp-la</u>	418 a	0,878 ± 0,044
<u>peak; scumbo</u>		0,913 ± 0,008
* Cada valor corresponde al promedio ± la desviación estándar de tres cuantificaciones de diferentes extracciones de fracción I.		

En la pared celular de las dobles mutantes hay un cierto incremento de azúcar en la fracción I de la pared celular.

B.- Alditales acetilados.

Los azúcares constituyentes de la fracción I de la pared celular de N. crassa, liberados en la hidrólisis de este polímero, son reducidos a sus alditales acetilados correspondientes para su identificación por tiempo de retención mediante cromatografía de gases.

Los cromatogramas obtenidos de los derivados de alditales acetilados del polisacárido que constituye la fracción I de la pared celular de las cepas analizadas, son mostrados en la Figura 5.

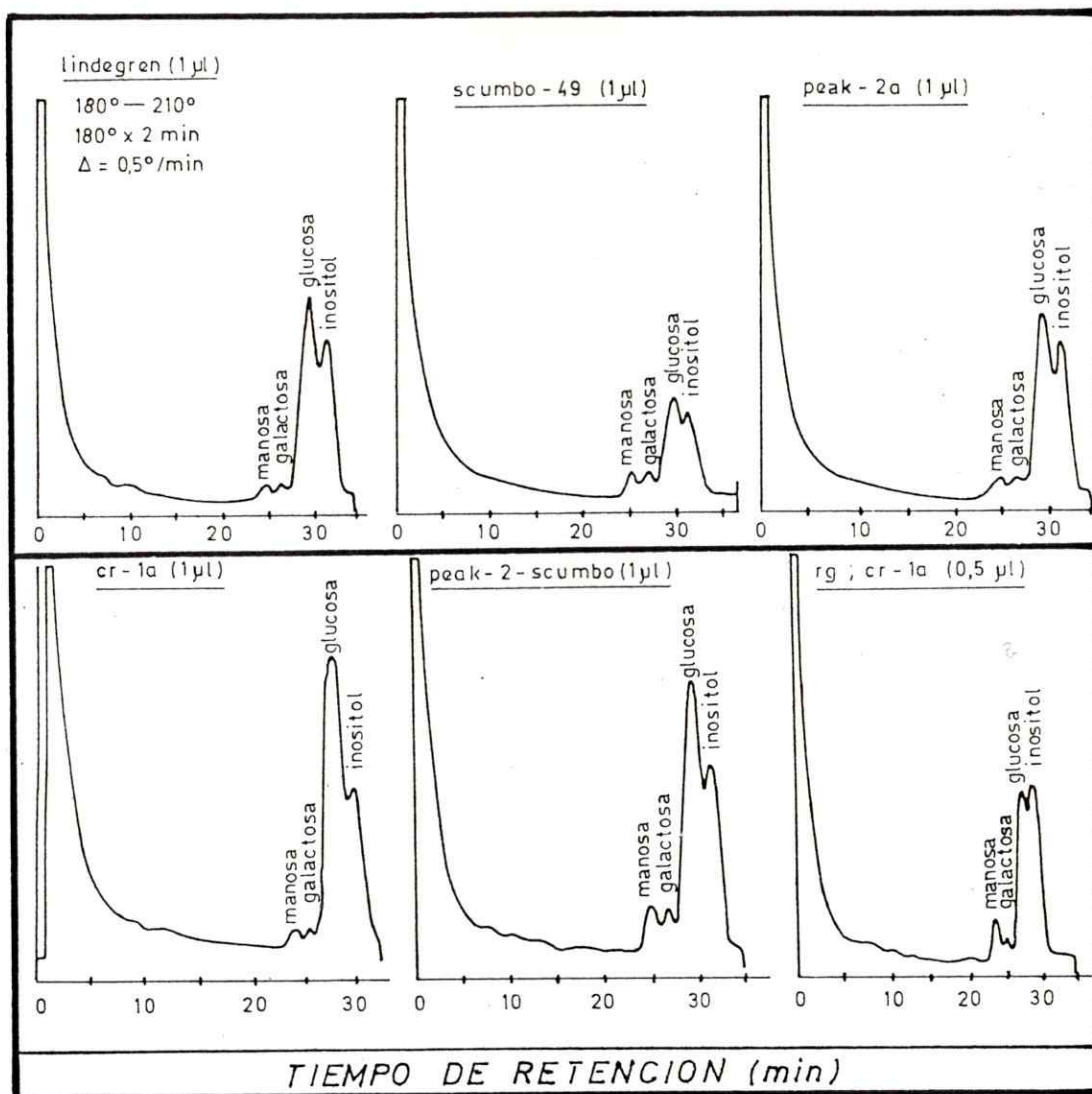


FIGURA 5: Cromatogramas obtenidos de los derivados de alditolos acetilados, de la fracción I de la pared celular de Neurospora crassa.

Los azúcares reducidos a sus alditoles que conforman el polisacárido de la fracción I, fueron identificados cualitativamente por cromatografía de gases.

Sus cromatogramas demostraron que, esencialmente, la fracción I de las cepas analizadas, está compuesta por: Glucosa, manosa y galactosa, siendo la glucosa el azúcar mayoritario.

La cuantificación de la composición de azúcares de la fracción I de las cepas silvestres y de las cepas mutantes, derivatizados a sus alditoles acetilados correspondientes, se ilustra en la Tabla IV.

T A B L A IV

COMPOSICION PORCENTUAL DE AZUCARES DE LA FRACCION I DE CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES DE Neurospora crassa.

CEPAS	(% de peso de derivados alditoles acetilados)*.		
	GLU	MAN	GAL
<u>Lindgreen</u> FGSC-353 A	53,43 ± 1,72	7,19 ± 0,48	6,03 ± 0,47
<u>74-A</u> FGSC OR 23-987 A	53,34 ± 0,75	6,09 ± 2,00	5,90 ± 2,09
<u>crisp-la</u> FGSC 488 a	71,74 ± 1,08	11,85 ± 1,34	8,48 ± 0,28
<u>peak-2a</u> (alélica de biscuit)	50,38 ± 1,53	11,77 ± 1,90	9,90 ± 2,56
<u>scumbo</u> FGSC-49 A	50,06 ± 2,14	6,83 ± 2,08	7,71 ± 1,15
<u>ragged;crisp-la</u> FGSC 418 a	44,04 ± 5,08	16,22 ± 1,58	7,43 ± 0,45
<u>peak; scumbo</u>	45,02 ± 2,59	17,20 ± 0,84	17,34 ± 0,86

* Cada valor corresponde al promedio ± la desviación estandar de tres preparaciones diferentes de fracción I de pared celular de Neurospora crassa.

El porcentaje de peso de cada alditol, fue calculado a través del producto de las integrales de los cromatogramas por las constantes de detección calculadas para cada alditol, por milígramo de fracción I.

Observando comparativamente las columnas de los porcentajes de cada derivado de alditol acetilado, se muestra un aumento de manosa y galactosa, en desmedro de glucosa, a medida que el fenotipo del hongo es más restringido.

C.- Alditoles acetilados parcialmente metilados.

Los azúcares que constituyen el heteropolímero, fueron metilados para determinar el tipo de enlace glicosídico que los une.

Los resultados del análisis de los alditoles acetilados parcialmente metilados, demuestra la presencia de seis picos mayoritarios (Figura 6): Pico N^o 1 y N^o 2 identificados como hexosas terminales (T-hexosas), siendo el N^o 1 T-glucosa y el N^o 2 T-galactosa. Esta última fué identificada por su tiempo de retención equivalente en arabinogalactano y T-glucosa por el tiempo de retención comparativamente

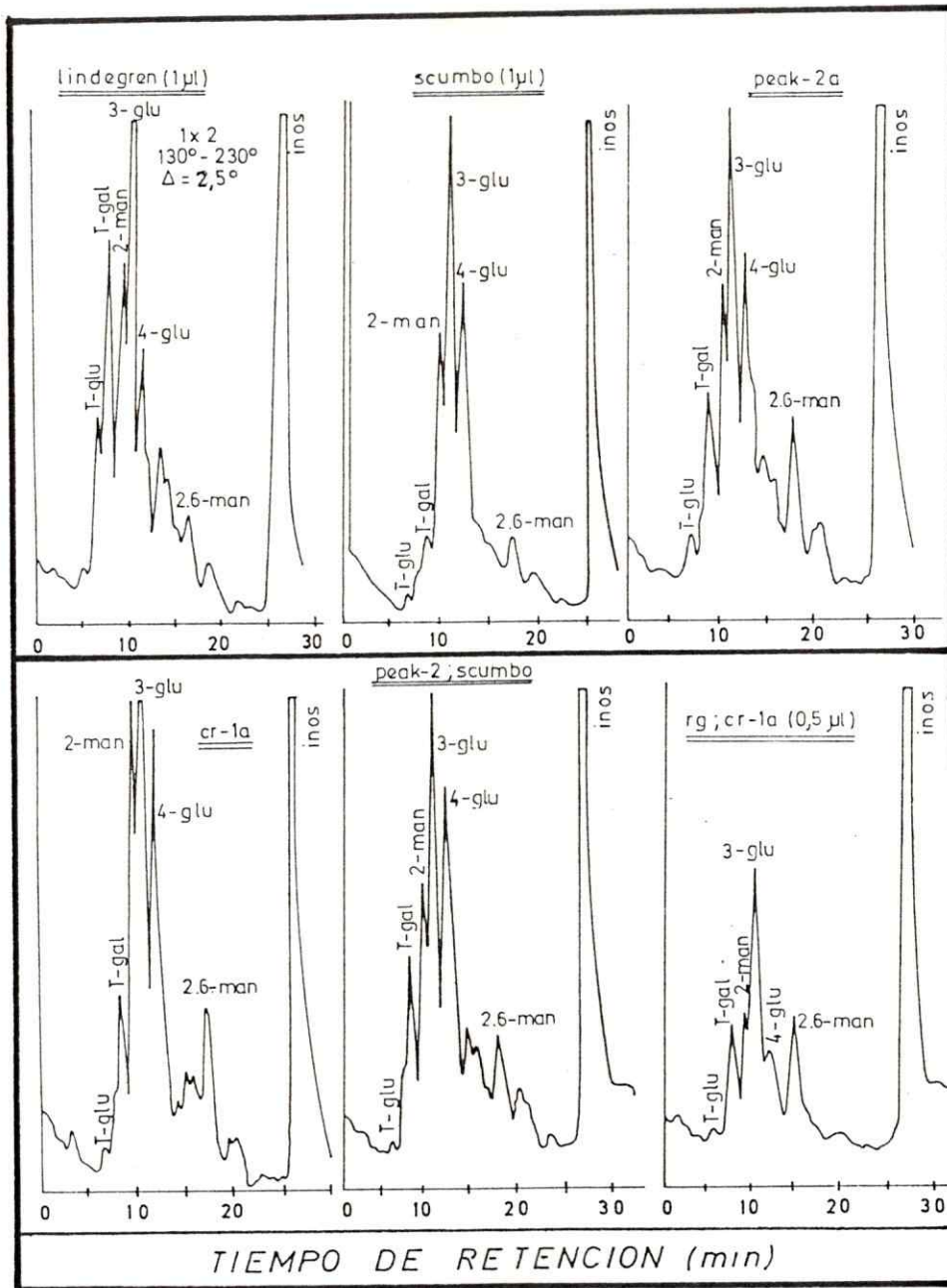


FIGURA 6: Cromatogramas de derivados de alditoles acetilados parcialmente metilados.

en laminarín. El pico Nº 3 fué identificado como una hexosa lineal, enlazada por su carbono anomérico y el carbono 2, la 2-manosa, en relación con el tiempo de retención relativo al de una T-glucosa. El pico Nº 4 fué identificado como hexosa lineal, enlazada por sus carbonos 1 y 3, (3-hexosa) que muestra una identidad en el tiempo de retención con la 3-glucosa del laminarín. El pico Nº 5 mostró ser una hexosa unida al polímero por sus carbonos 1 y 4 (4-hexosa) correspondiente a una 4-glucosa identificada por su presencia en maltosa. El pico Nº 6 fué identificado como una hexosa ramificada, una 2,6 manosa, con respecto al tiempo de retención relativo a la T-glucosa esperado para una 2,6 manosa con sus carbonos 1, 2 y 6 comprometidos en enlaces glicosídicos. (Tabla V).

T A B L A V

PORCENTAJE MOLAR^a DE LA COMPOSICION DE DERIVADOS ALDITOLES ACETILADOS PARCIALMENTE METILADOS DE LA FRACCION I DE LA PARED CELULAR DE Neurospora crassa.

Cepas	T-GLU	T-GAL	2-MAN	3-GLU	4-GLU	2,6 MAN
Líndegreen FGSC-353-A	3,80	9,65	13,37	53,86	4,95	5,42
74-A FGSC OR 23-987	3,70	11,21	13,01	53,58	6,05	5,38
scumbo FGSC 49-A	3,88	9,81	12,78	46,54	13,07	9,11
peak-2a (alélica de biscuit)	1,85	13,85	12,54	43,28	17,63	13,31
crisp-la FGSC 488 a	2,31	8,29	11,65	43,26	25,87	8,61
peak-2; scumbo	2,60	12,25	11,30	29,27	15,90	18,78
ragged; crisp-la FGSC 418 a	1,20	14,54	10,84	36,38	16,11	22,12
ragged FGSC 296 A ^b	3,50	28,70	8,50	19,10	10,10	30,00

a : Los porcentajes fueron obtenidos dividiendo el área de cada pico del cromatograma por el peso mole - cular correspondiente de cada derivado de alditol acetilado parcialmente metilado y normalizado a 100.

b : De Cardemil y Pincheira (9)

El porcentaje molar de los derivados de alditos acetilados parcialmente metilados nos mostró que el heteropolímero que constituye la fracción I de la pared celular de Neurospora crassa, está formado esencialmente, por glucosas enlazadas 1→3. Estas glucosas se ven disminuidas en las mutantes morfológicas simples y dobles analizadas, disminución que se acompaña de un incremento en 2,6 manosa, 4-glucosa y T-galactosa.

Al analizar comparativamente los contenidos de alditos acetilados y parcialmente metilados de la doble mutante peak-2; scumbo y las mutantes simples que la constituyen, se tiene el siguiente cuadro, en lo que a 3-glucosa y 2,6 manosa respecta:

Cepas	Porcentaje molar	
	3-Glucosa	2,6 manosa
<u>74 - A</u>	53,6	5,4
<u>scumbo</u>	46,5	9,0
<u>peak-2</u>	43,3	13,3
<u>peak-2; scumbo</u>	29,0	19,0

En la doble mutante peak-2; scumbo, la glucosa enlazada 1-3 en el heteropolímero de la fracción I, acusa

una importante disminución en relación a la situación de las mutantes simples que la conforman. En efecto, la doble mutante sólo posee un 64% del promedio de 3-glucosa presente en peak-2 y en scumbo.

Si la comparación de la expresión de ragged y de crisp-la se enfoca a los niveles de 3-glucosa, 4-glucosa y 2,6 manosa, existentes en la fracción I, se tiene el siguiente cuadro:

Cepas	Porcentaje molar		
	3-Glucosa	4-Glucosa	2,6 Manosa
<u>74 - A</u>	53,6	6,05	5,4
<u>crisp-la</u>	43,3	25,87	8,6
<u>ragged</u>	19,0	10,10	30,0
<u>ragged; crisp-la</u>	36,4	16,11	22,0

Tanto en el contenido de 3-glucosa, como también en el de 4-glucosa y de 2,6 manosa, se observa que ragged; crisp-l posee niveles intermedios a los niveles existentes en las mutantes simples que la forman.

D.- Grado de metilación.

La comprobación del grado de metilación del polisacárido en análisis realizado mediante espectroscopía I.R., juzgada por la ausencia de la banda de absorción del grupo hidroxilo, entre los $3.400-3.600 \text{ cm}^{-1}$, se ilustra, para una de las cepas analizadas en éste trabajo, en la Figura N° 7.

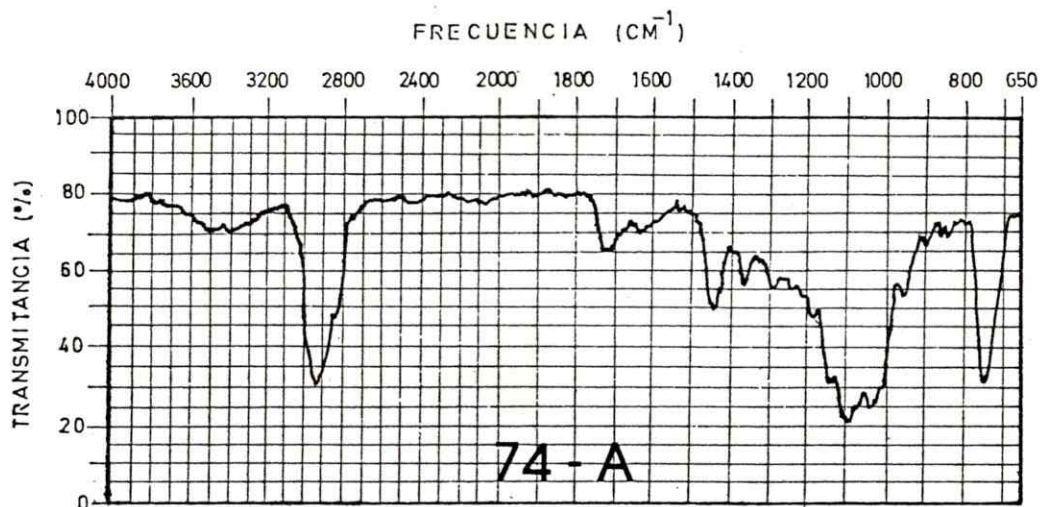


FIGURA 7 : Espectro de absorción al infrarrojo del polisacárido de la cepa silvestre 74-A.

6.- D I S C U S I O N

El procedimiento y la metodología empleados en éste trabajo, parecen adecuados y eficientes para la caracterización de heteropolímeros constituyentes de la pared celular de Neurospora crassa.

La cromatografía de gases permite, actualmente, detectar la existencia de otros azúcares neutros en la composición química de los polisacáridos constituyentes de la pared celular de dicho hongo (20,22,23).

Los datos obtenidos en algunas mutantes simples por Cardemil y Pincheira (9) han sido corroborados con la metodología usada en este trabajo, la cual ha permitido, obtener resultados precisos y altamente reproducibles.

Mahadevan y Tatum (6), pusieron de manifiesto la complejidad del polímero constituyente de la fracción I de la pared celular de Neurospora crassa y detectaron a glucosa como un azúcar neutro constituyente de ella.

Es evidente que la fracción I de la pared celular de todas las cepas analizadas, poseen: Glucosa, manosa y galactosa como principales azúcares neutros (Tabla IV), siendo la glucosa el azúcar mayoritario.

Si consideramos que la fracción I de la pared celular de Neurospora crassa, es un heteropolímero, éste tendría un esqueleto central constituido fundamentalmente por glucosa e intercalando manosa periódicamente. Además, existirían ramificaciones de la estructura del polímero, en las cuales la galactosa estaría en posición terminal.

Los enlaces entre las moléculas de glucosa serían, esencialmente, del tipo 1-3.

Los datos expuestos en la Tabla IV, sugieren una posible relación entre el grado de crecimiento colonial del hongo y las mayores cantidades de manosa y galactosa que encontramos en la fracción I de la pared celular de Neurospora crassa. Correlacionado a éstos aumentos de manosa y galactosa, se observa, además una menor cantidad de glucosa.

El análisis del porcentaje molar de alditoles acetilados parcialmente metilados, (Tabla V) de las cepas analizadas en éste trabajo, muestran que el glucano principal parece estar constituido por glucosas enlazadas 1-3 .

Sin embargo, a medida que el fenotipo, en algunas de las cepas del hongo, aparece como más colonial, la cantidad de glucosa 1-3 disminuye, llegando en ragged a un 36% de la cepa silvestre, aumentando la glucosa 1-4 5 veces en crisp-la y más considerablemente la 1,2,6 manosa y T-galactosa, 6 veces aumentada en ragged.

De ésta manera, el incremento de manosa, obtenida en los derivados de alditoles acetilados, provenientes de las cepas mutantes, se debe a un aumento de 2,6 manosa y no de 2-manosa.

La T-galactosa da cuenta de la cantidad de galactosa presente en la fracción I de las cepas analizadas.

Aunque puede ser prematuro, aún, establecer una correlación fina entre composición química y organización de los componentes de la pared celular y la morfología del hongo, se podría sugerir que un polisacárido más ramificado confiere un mayor grado de empaque y dicotomía a las

hifas del hongo. De ésta manera se podría inferir que un fenotipo más colonial, es reflejo del reemplazo de parte del polímero lineal, por epímeros en posición ramificada en el heteropolímero constituyente de la fracción I de la pared celular de Neurospora.

Dado que la manosa lineal es una 2-manosa, podríamos inferir que la 1-galactosa, que constituye el término de cada rama de la 2,6 manosa, está unida a dicha manosa, por su carbono Nº 6.

Con éstos datos, se puede sugerir un posible esquema de la organización del heteropolímero de la fracción I de la pared celular de Neurospora crassa. (Figura 8).

El hecho que 2,6 manosa y 4-glucosa varían en forma similar en las alteraciones que experimenta la composición química de la fracción I de casi todas las cepas estudiadas, permite inferir que, al menos, en la parte lineal del polímero que la constituye, la manosa estaría unida por su carbono anomérico al carbono 4 de la glucosa siguiente.

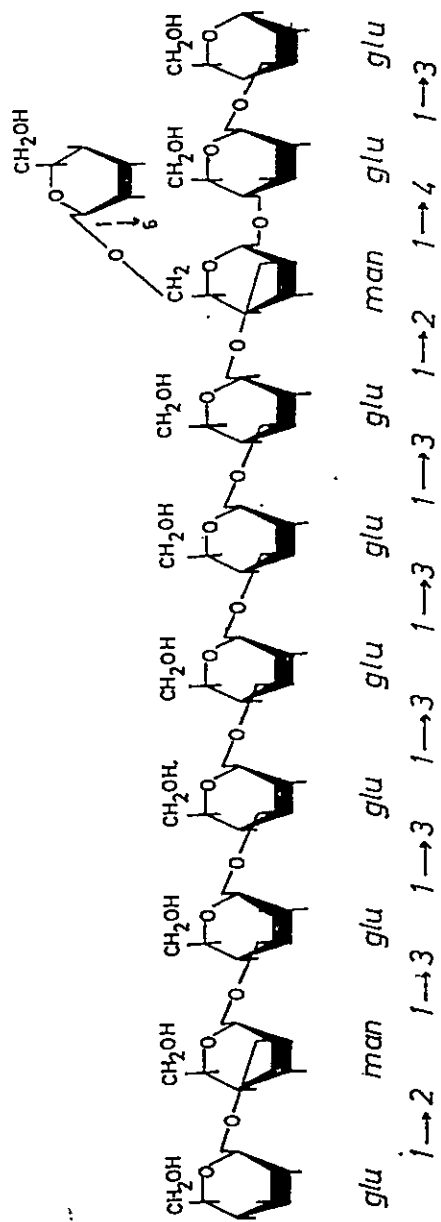


FIGURA 8 : Posible esquema de la organización del heteropolímero de la fracción I

En el caso de la mutante crisp-la, el alto contenido de glucosa en la fracción I de su pared celular, permite especular sobre la existencia de un segundo polímero estructural, formado sólomente por glucosa. La sensibilidad de la fracción I a la acción de glucoamilasas (Datos no presentados) sugiere que éste polímero estaría constituido por uniones α 1-4.

Este segundo polisacárido podría encontrarse regularmente en cepas, tanto silvestres como mutantes, de Neurospora crassa, en una baja proporción, y pasar casi desapercibido al estar enmascarado por una mayor cantidad del heteropolímero. Las alteraciones metabólicas que presentan algunas cepas mutantes, como crisp-la, harían posible ponerlo más en evidencia.

Las dobles mutantes analizadas en éste trabajo, como son: pk-2; sc y rg; cr-1, también mantienen un alto contenido de manosa en la fracción I de la pared celular (Tabla IV).

Esta condición, parece reflejarse en un fenotipo más intensamente colonial que el de las mutantes simples que las constituyen. Esto es especialmente notorio en

el, caso de pk-2; sc, la cual además, presenta un alto grado de ramificación (Figura 4).

En efecto, la observación de las hifas de peak-2; scumbo con el microscopio de contraste de fases, revela un mayor grado de ramificación. Además, el crecimiento de peak-2; scumbo es equivalente a 1/10 del crecimiento de la cepa scumbo y a 1/5 del crecimiento de la cepa peak-2a, lo que reflejado en velocidad de crecimiento es aproximadamente de 0,053 mm/hr para la doble mutante, de 0,095 mm/hr para peak-2 y de 0,49 mm/hr para scumbo.

A nivel morfológico, es indudable que la doble mutante peak-2; scumbo refleja una intensificación de los efectos determinados por cada una de las mutantes simples que la forman.

Es posible preguntarse de qué manera una mayor cantidad de manosa y los tipos de enlaces químicos que la unen en el heteropolímero, hacen posible una mayor ramificación de las hifas y un fenotipo colonial tan compacto.

Los aspectos morfológicos indicados anteriormente, parecen guardar cierta relación con los datos obtenidos en el análisis de la composición del heteropolímero de

la fracción I de las cepas peak-2a y scumbo y la doble mutante que ellas forman.

Es así como, el contenido de 2,6 manosa en la fracción I de peak-2; scumbo es superior al doble del que se encuentra en scumbo y un 50 % mayor que el presente en peak-2. Los datos expuestos dejan pocas dudas sobre una interacción de los genes peak-2 y scumbo expresada en una intensificación de sus efectos aislados para determinar una disminución de 3-glucosa y un aumento de 2,6 manosa en el heteropolímero de la fracción I al ser comparados sus efectos con las acciones de los genes no mutados en la cepa normal ó silvestre.

Si quisiéramos interpretar los datos expuestos en términos de expresividad de los genes, podríamos decir que, con respecto a 2,6 manosa, hay un claro efecto epistático de la mutante peak-2 sobre scumbo.

Con respecto al contenido de 3-glucosa, es muy evidente el efecto intensificador de la expresión de peak-2 y de scumbo, al estar ambas mutantes presentes simultáneamente en una misma cepa.

Si se examinan estos mismos aspectos en la doble mutante: ragged; crisp-la se tiene, también interesantes indicaciones de interacciones génicas en el control de la estructura del heteropolímero de la pared celular.

Desde luego al comparar los contenidos totales de glucosa y manosa en la fracción I se obtiene la Tabla VI.

Tanto en el contenido de glucosa de la fracción I de la doble mutante ragged; crisp-la, como también en el de manosa, se puede apreciar la existencia de una interacción en la expresión de las mutantes ragged y crisp-la que puede ser interpretada como una complementación de sus efectos. No obstante, ragged aparece con una expresión epistática sobre crisp-la.

T A B L A VI

PORCENTAJES RELATIVOS DE LOS DERIVADOS DE ALDITOLES ACETILADOS DE GLUCOSA Y MANOSA.

Cepas	% Glucosa *	% Manosa *
<u>74 - A</u>	100	100
<u>crisp-la</u>	113	110
<u>ragged</u>	52	209
<u>ragged; crisp-la</u>	85	179

* VALORES OBTENIDOS DE TABLA IV.

Del mismo modo, se observa que en la doble mutante, de alguna manera, aparece más balanceados los excesos de 4-glucosa y 2,6 manosa que los que se observan en crisp-la y ragged, respectivamente.

Proyectados estos datos al crecimiento que exhibe ragged; crisp-la, aparecen concordantes con un fenotipo también intermedio entre el exhibido por las mutantes simples.

Si bien ragged; crisp-la tiene un crecimiento más restringido que crisp-la, su micelio es mucho menos ramificado que el de ragged.

Es evidente la conveniencia de Neurospora crassa para el estudio de interacciones genéticas en situaciones de haploidía, pues no se tiene la complicación que la diploidía determinada para la expresión total de diferentes alelos de un mismo gen.

Las interacciones en la expresión génica observadas en el presente trabajo afectan en un caso (peak-2; scumbo) a genes que se ubican en diferentes grupos de ligamiento, y que en éste caso intensifican su acción. En el

otro caso (ragged; crisp-la) afectan a genes ubicados en un mismo grupo de ligamiento, los cuales aparecen complementando su expresión para lograr un efecto más cercano a la situación de la cepa silvestre.

Los datos presentados, nos indican que la composición, distribución y organización de los componentes químicos de la pared celular de las hifas de las dobles mutantes, aquí analizadas, aparecen alteradas con respecto a los componentes químicos de las cepas silvestres y de las cepas mutantes simples parentales.

La metodología para el análisis de la pared celular, empleada en este trabajo, ha sido usada para los mismos fines, en una serie de otros organismos por diversos autores, entre ellos Lindberg (23) y Albersheim y colaboradores (20), demostrando una buena resolución y equivalencia con su corroboración con espectrometría de masas de impacto electrónico. Con éste método es posible identificar la totalidad de los diferentes tipos de sustituciones, mediante el uso de deuterio en la reducción. De esta manera se puede distinguir entre un 3-glucitol y un 4-glucitol, ó un 1,4,5 tri-0-acetil 2,3,6 metil glucitol y un 1,4,5 tri-0-acetil 2,3,6 metil galactitol, no obstante, no deja de ser deseable de realizar.

Los resultados obtenidos en éste trabajo, sugieren la conveniencia de buscar nuevas correlaciones genéticas y morfológicas a nivel de la composición química de los componentes de la pared celular en Neurospora crassa. Los resultados obtenidos, pueden ser ampliados mediante el análisis de mutantes triples ó cuádruples que permitan detectar interacciones genéticas más complejas en la determinación de la composición química de la pared celular de Neurospora y su correspondiente influencia morfogenética.

Otra interesante línea de investigación puede derivar del estudio comparativo de los niveles de actividad de epimerasas en diferentes mutantes, tanto simples como dobles, para comprender de qué manera la maquinaria metabólica de Neurospora afronta el reemplazo de glucosa por manosa en los polímeros estructurales de la pared celular.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- De Terra, N. y E. L. Tatum 1961 "Colonial growth of Neurospora" Science 134; 1066-1068.

- 2.- De Terra, N. y E. L. Tatum 1963 "A relationship between cell wall structure and colonial growth in Neurospora" Am. J. Bot. 50; 669-667.

- 3.- Tatum E. L., R. W. Barratt y V. M. Cutter. 1949.
"Chemical induction of colonial paramorphs in Neurospora and sycephalastrum". Science 109; 509-511.

- 4.- Sheri, J. y J. E. Gander 1979 "Biosynthesis of polysaccharides by prokariotes" Ann. Rev. Microbio. 33; 169-199.

- 5.- Osborn, M. J. 1969. "Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall" Ann. Rev. Biochem. 38; 501-537.

- 6.- Mahadevan, P.R. y E.L. Tatum. 1965 "Relationship of the major constituents of Neurospora crassa cell wall to wild type and colonial morphology" J.Bacteriol. 90; 1073-1081.

- 7.- Wrathal, R. y E. L. Tatum. 1973. "The peptides of the hyphal wall of Neurospora crassa" J. Gen. Microbiol. 78; 139-147.

- 8.- Wrathal, R. y E. L. Tatum. 1974. "Hyphal peptides and colonial morphology in Neurospora crassa Biochem. Genet. 21; 59-68.

- 9.- Cardemil, L. y G. Pincheira 1979 "Characterization of the carbohydrate component of fraction I in the Neurospora crassa cell wall" J. Bacteriol. 137 N° 3; 1067-1072.

- 10.- Robertson, N. F. 1965. "The fungal hypha". Trans. Br. mycol. Soc. 48; 1-8.

- 11.- Robertson, N. F. 1969. "Experimental control of hyphal branching and branch form in hypomycetous fungi" J. Linn. Soc. London 56; 207-211.

- 12.- Mahadevan, P. R. y E. L. Tatum 1967. "Localization of structural polymers in the cell wall of Neurospora crassa" J. Cell Biol. 35; 295-302.

- 13.- Mishra, N. C. 1977. "Genetics and biochemistry of morphogenesis in Neurospora" Adv. Genet. 19; 341-405.

- 14.- Russell, P. J. y A. M. Srb. 1974. "A study of L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amido transferase in certain developmental mutants of Neurospora crassa" Mol. Gen. Genet. 129; 77-86.

- 15.- Terenzi, H. F., M. M. Flavis y H. N. Torres. 1974. "A Neurospora crassa morphological mutant showing reduced adenylate cyclase activity". Biochem. Biophys. Res. Commun 58; 990-996.

- 16.- Mishra, N. C. y E. L. Tatum. 1970. "Phosphoglucomutase mutants of Neurospora sitophila and their relation to morphology". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60; 638-645.

- 17.- Westergaard, M. y H. K. Mitchell. 1947. *Neurospora* V
"A synthetic medium favouring sexual reproduction"
Am. J. Bot. 34; 573.

- 18.- Vogel, H. J. 1956 "A convenient growth medium for
Neurospora" *Microb. Genet. Bull.* 13; 42-43.

- 19.- Dische, Z. 1962 "Color reaction of carbohydrates".
Methods Carbohydr Chem. 1; 477.

- 20.- Albersheim, P., Nevis, P. D. English y A. Karr. 1967.
"A method for the analysis of sugar in plant cell
walls polysaccharides by gas-liquid-chromatography".
Carbohydr. Res. 5; 340.

- 21.- Hakomori, S. 1964. "A rapid permethylation of glyco
lipid and polysaccharide catalized by methyl-sulfinil-
carbanion in dimethylsulfoxide" *J. Biochem. (Tokio)*
55; 205-208.

- 22.- Gardemil, L. y P. Wolk. 1981. "Polysaccharides from the envelopes of heterocyts and spores of the blue-green algae Anabaena Variabilis and cylandrospermun Licheniforme". J. Phycol. 17; 234-240.
- 23.- Lindberg, B. 1972. "Methylation analysis of polysaccharides". Methods in Enzymol. 28; 178-195.