

Metabolismo de la urea en líquenes

POR

M.^a ESTRELLA LEGAZ, BLANCA CIFUENTES Y C. VICENTE

I N T R O D U C C I Ó N

El origen de la urea en plantas superiores y bacterias es diverso en cuanto a la utilización de distintos precursores se refiere. Entre éstos, el más importante es L-arginina, que puede ser metabolizado hasta urea mediante distintos mecanismos enzimáticos:

— El aminoácido puede ser hidrolizado por una arginasa para dar ornitina y urea como productos. El enzima se revela como constitutivo para *Neurospora crassa* (WEISS y DAVID, 1977), mientras que es inducido por L-arginina en *Escherichia coli* (CRABEEL et al., 1975), levaduras (HOLZER, 1968) y líquenes (LEGAZ y VICENTE, 1980).

— L-arginina puede ser descarboxilada por una L-arginina descarboxilasa, para dar argatina, la cual es posteriormente hidrolizada por una agmatina: ureo hidrolasa, dando como productos putrescina y urea (COHEN, 1967; ROSENFELD y ROBERTS, 1976).

— En *Pseudomonas putida* creciendo sobre L-arginina, el aminoácido sufre una desaminación oxidativa, FAD dependiente, para dar α -cetoarginina, que es posteriormente descarboxilada en una reacción que requiere Mg^{2+} y tiamina pirofosfato, para producir γ -guanidinobutiraldehído. Este es, a su vez, oxidado mediante una deshidrogenasa ligada a NAD^+ para dar γ -guanidinobutirato que es posteriormente hidrolizado en γ -aminobutirato y urea (VANDERBILT et al. 1975).

Estas tres rutas metabólicas han sido resumidas en la figura 1.

Sin embargo, la urea es producida por otras plantas a partir de substratos distintos de L-arginina. *Pseudomonas* RF contiene un sistema enzimático soluble que cataliza la descomposición oxidativa de la riboflavina para producir urea, CO_2 y 1-ribitil-2,3-diceto-1,2,3,4-tetra-

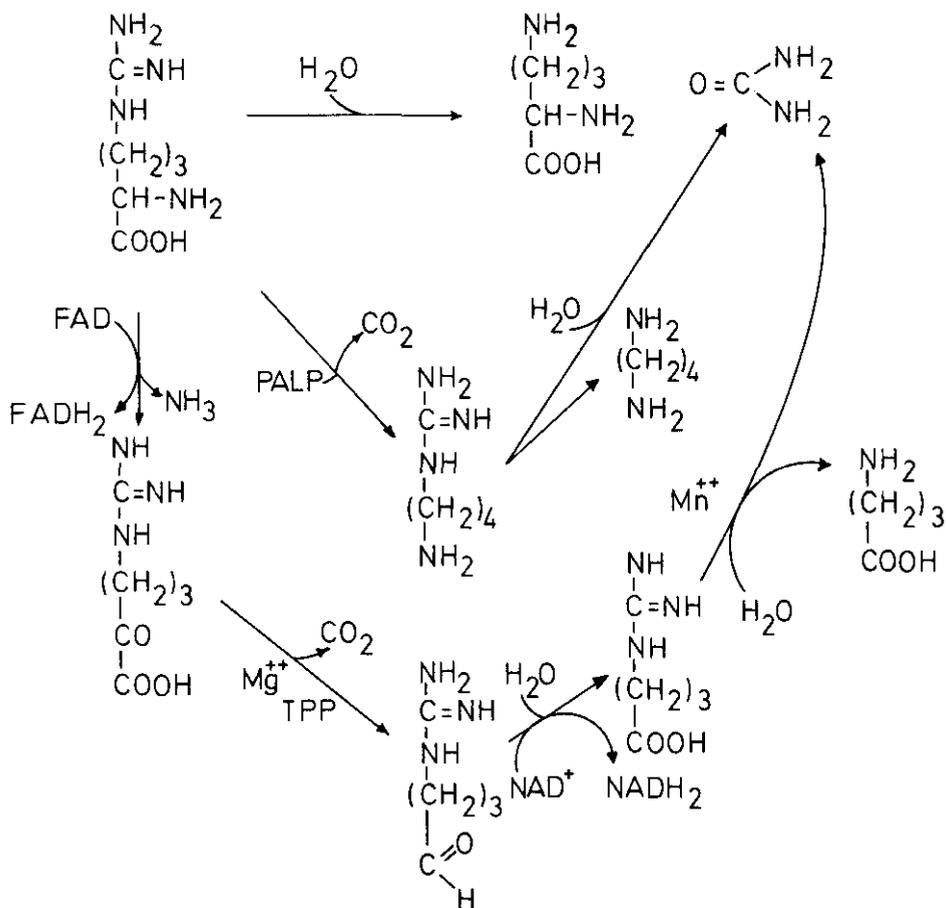


FIG. 1.—Rutas biosintéticas de urea que derivan de L-arginina.

hidro-6,7-dimetilquinoxalina (HARKNESS y STADMAN, 1965). Esta ruptura enzimática requiere oxígeno molecular y NADH.

Por otra parte, muchas bacterias y plantas superiores producen urea a partir del ácido úrico a través de una ruta enzimática que incluye uricasa, alantoinasa, alantoato amidohidrolasa y S(-)-ureidoglicolasa (BONGAERTS y VOGELS, 1976). Esta vía ha sido también descrita en algunos líquenes ornitocoprófilos, como *Candelariella* (MASSE, 1969).

Agmatina y putrescina se han revelado también como importantes productos de acumulación en líquenes como *Platismatia glauca*, *Hypogimnia physodes* y *Pseudoevernia furfuracea*. En éstos son tam-

bién acumulables en concentraciones moderadas cadaverina y espermina (JAGERS y WEIGEL, 1978). Otras poliaminas, como metil-, dimetil- y trimetilamina han sido encontradas como metabolitos derivados de la glicina en varias especies de *Stictaceae* (GOAS y BERNARD, 1967; BERNARD y GOAS, 1968, 1971, 1977).

1. Síntesis de la urea en *Evernia prunastri*. Hidrólisis de L-arginina.

El enzima arginasa puede ser sintetizado por discos de talo de *Evernia prunastri* flotando sobre L-arginina 40 mM. La síntesis progresa preferentemente en oscuridad, a una temperatura de 26° C, aunque a partir de las seis horas de cultivo la actividad enzimática decrece hasta anularse. La síntesis del enzima es impedido por actinomicina D y cicloheximida, lo que indica que el aumento de actividad es la respuesta a un proceso de inducción por L-arginina (LEGAZ y VICENTE, 1980). Bajo condiciones de iluminación, con una densidad de flujo de $12.000 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, el desarrollo de la actividad enzimática se ve fuertemente restringido a las cuatro primeras horas de cultivo para anularse después (figura 2). En condiciones de oscuridad la actividad arginasa decrece grandemente si la L-arginina es sustituida por urea o agmatina 40 mM. Purificado el enzima, ambos compuestos se revelan como potentes inhibidores de éste, siendo la urea un inhibidor competitivo ($K_i = 2,58 \text{ mM}$), mientras que la agmatina se comporta como inhibidor no competitivo ($K_i = 21,54 \text{ mM}$). Otras características del enzima se dan en la tabla I.

2. Síntesis de urea por descarboxilación de L-arginina.

Siendo la vía hidrolítica descrita altamente eficiente, la incubación de discos de talo de *Evernia prunastri* desarrolla también una moderada actividad descarboxilante del aminoácido. Como sucedía para la arginasa, la actividad arginina descarboxilasa decae al cabo de un cierto tiempo de incubación en oscuridad (cuatro horas), aunque esta pérdida puede evitarse por inclusión de ditiotreitól 1 mM en los medios de cultivo (VICENTE y LEGAZ, 1981). Las características de esta L-arginina descarboxilasa, que presenta dimorfismo a semejanza de lo descrito para el mismo enzima de *E. coli* (WU y MORRIS, 1973), como se demuestra en la figura 3, se resumen en la tabla I. Se ha de notar, no obstante, que la ornitina (el otro producto de hidrólisis de arginina), así como putrescina y urea, a una concentración 40 mM inhiben completamente la actividad descarboxilante, mientras que agmatina se comporta como un débil inhibidor. Siendo la K_m del enzima para L-arginina de 12,5 mM, mientras que la descrita para arginasa (LEGAZ y VICENTE, 1980) era 0,2 mM, es fácilmente compren-

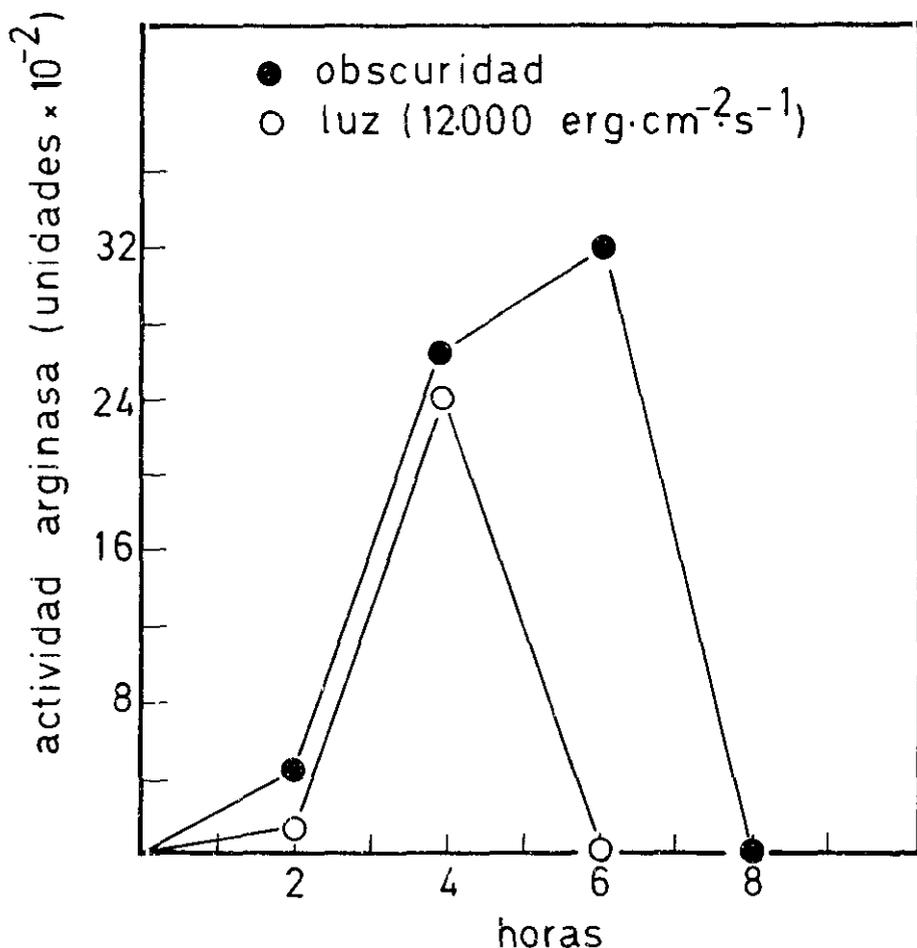


FIG. 2.—Síntesis de arginasa en talo de *Evernia prunastri*, flotando sobre *L*-arginina 40 mM.

sible que la vía descarboxilante deba ser considerada como subsidiaria.

La aparición de la actividad descarboxilasa va acompañada del desarrollo de actividad agmatina: ureo hidrolasa, cuyo incremento, como en el caso anterior, se ve mantenido por la inclusión de ditioneitol 1 mM en los medios. La síntesis de esta hidrolasa no es inhibida por actinomicina D, pero sí lo es por cicloheximida y por urea, que sería considerada como represor. Sin embargo, hay una característica de síntesis que separa a esta hidrolasa, tanto de arginasa como de *L*-arginina descarboxilasa: su inducción por putrescina, que alcanza

TABLA I
 CARACTERISTICAS DE LOS ENZIMAS DEL METABOLISMO
 DE LA UREA EN EVERNIA PRUNASTRI

Enzima	Substrato	K_m (mM)	pH óptimo	T óptima (°C)	Peso molec.	Inhibido por
Arginasa	L-arginina	0,2	9,1	37	180.000	Agmatina Urea
L-arginina descarboxilasa	L-arginina	12,5	7,1	26	300.000	Putrescina Ornitina Urea
Agmatina: ureo hidrolasa	Agmatina	8,93	6,9	37	450.000	Putrescina Ornitina Urea

niveles tres veces superiores a los logrados cuando el líquen utiliza L-arginina del medio. También en este caso la cicloheximida impide completamente el desarrollo de la actividad enzimática. No obstante, la putrescina inhibe totalmente la actividad del enzima purificado, al igual que ornitina y urea.

Pequeñas concentraciones de producto (putrescina) pueden, por tanto, aumentar la importancia de esta vía al incrementar la cantidad del enzima activo, que sería, sin embargo, retroinhibido, si los niveles de tal producto, de naturaleza acumulable, sobrepasan los límites requeridos. El esquema de regulación de ambas vías puede ser, entonces, resumido según la figura 4.

3. Hidrólisis de la urea.

Sea cual sea la vía utilizada para su síntesis, la urea va a ser rápidamente hidrolizada por acción de una ureasa, que cataliza la reacción:



La ureasa es inducible por urea en varias especies líquénicas, como *Avernia prunastri* (ESTÉVEZ y VICENTE, 1976), *Lobaria pulmonaria* (VICENTE et al., 1978a), *Parmelia roystonea* (XAVIER FILHO y VICENTE, 1978) y *Cladonia verticillaris* (VICENTE y XAVIER FILHO, 1979a).

El sentido fisiológico de esta ruta parece evidente, aunque no se posean pruebas experimentales ni valoraciones cuantitativas de la presencia de urea en líquenes. Sin embargo, como ha demostrado

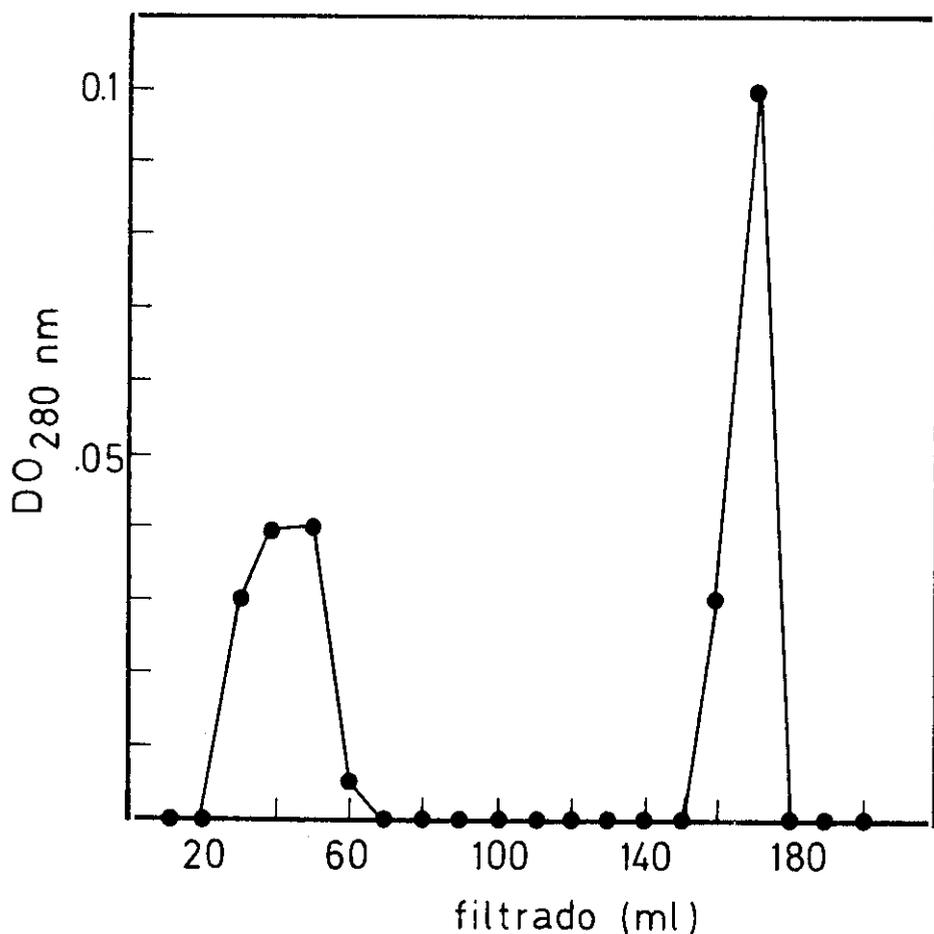


FIG. 3.—Dimorfismo de *L-arginina descarboxilasa* de *Evernia prunastri*. El pico eluido a los 170 ml de la columna de *Sepharosa 6B* tiene un peso molecular de 300.000.

SOLBERG (1969, 1970), la *L-arginina* es un aminoácido abundantemente acumulado como especie química libre, por lo que su catabolismo hasta urea y la hidrólisis de ésta subiría la tensión del CO_2 en el talo y proporcionaría amoníaco, que podría ser utilizado en la síntesis de nuevos aminoácidos.

En todas las especies líquénicas citadas, las mayores actividades del enzima se logran en condiciones de oscuridad, aunque la ureasa se inactiva después de un cierto tiempo de incubación de los talos o bajo condiciones de iluminación. En este caso, el grado de inactiva-

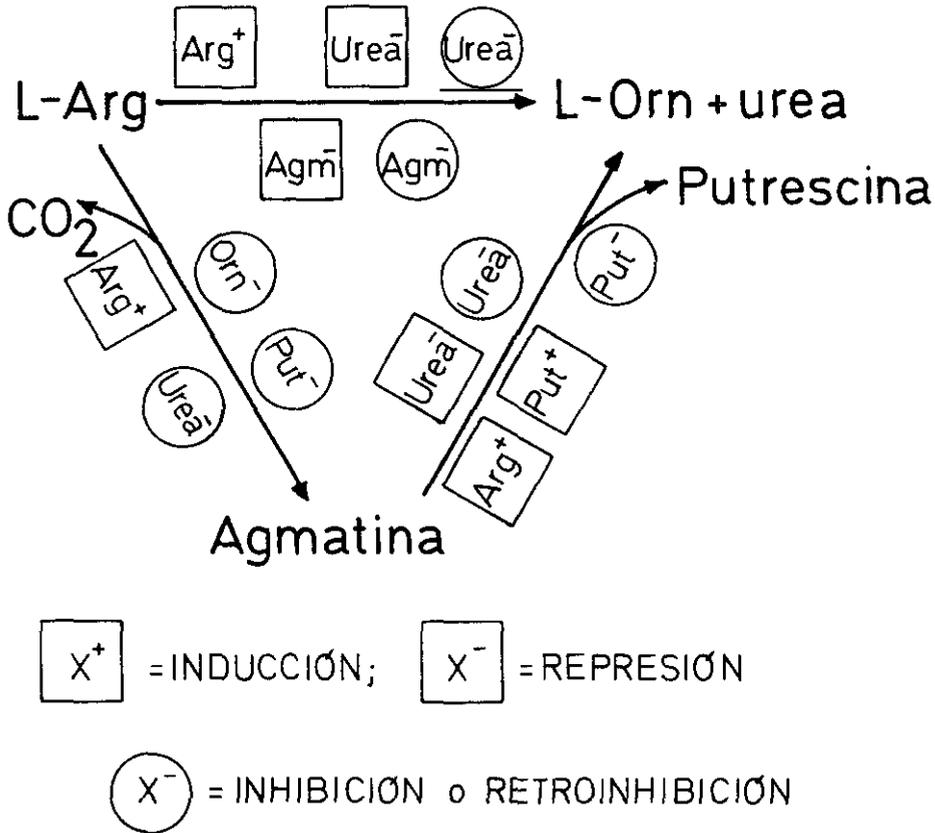


FIG. 4.—Esquema de regulación de arginasa, L-arginina descarboxilasa y agmatina: ureo hidrolasa en *Evernia prunastri*.

ción alcanzado es dependiente de la densidad de flujo de la radiación utilizada (figura 5).

Tanto la inactivación encontrada para largos tiempos de incubación en oscuridad o para incubaciones en luz son parcialmente revertidas o el enzima es parcialmente protegido, cuando ditiotreitol 1 mM o L-cisteina 50 mM se incluyen en el medio de cultivo de *E. prunastri*.

4. Centros de producción e hidrólisis de urea.

Si el destino fisiológico de los productos de hidrólisis de la urea es el indicado, los diferentes enzimas involucrados en el proceso deben tener una localización precisa dentro del talo liquénico. La separación de ambos simbiontes no es difícil. El talo humedecido puede romperse

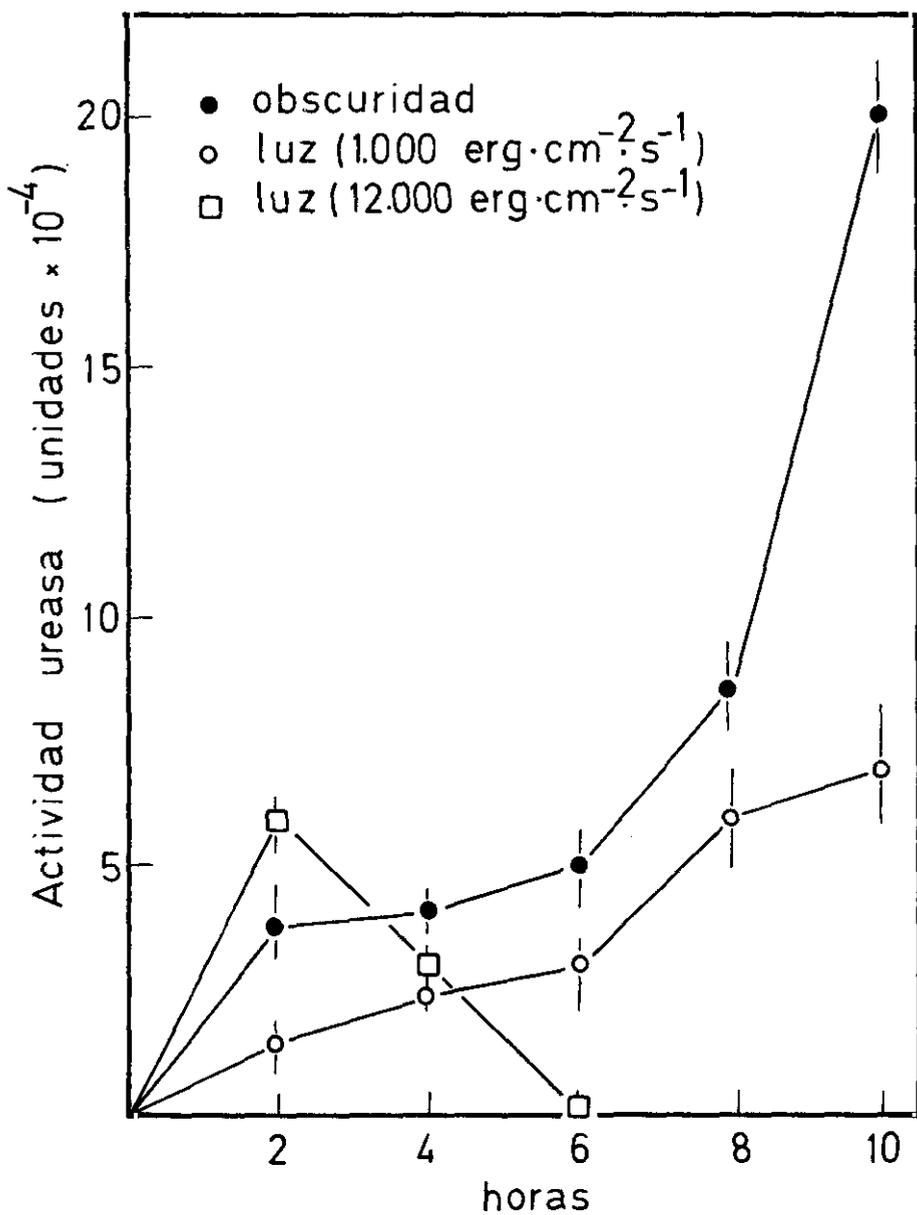


FIG. 5.—Síntesis de ureasa por talo de *Lobaria pulmonaria* flotando sobre urea 40 mM. Figura reproducida de Vicente, C., Palasí, M., Estévez, M. P. (1978a): *Rev. Bryol. Lichénol.*, 44, 83.

por una fuerte presión entre dos portaobjetos y todas las células del ficobionte separadas con ayuda de una lupa binocular y una micropipeta (AHMADJIAN, 1973). También pueden lograrse aceptables preparaciones por sucesivas centrifugaciones de macerados de talo (RICHARDSON, 1971). Mediante la utilización de estas técnicas (LEGAZ y VICENTE, 1981) se ha demostrado que el 92,48 por 100 de la actividad ureasa y el 93,75 por 100 de agmatina ureo hidrolasa están localizados en células del ficobionte. Arginasa y L-arginina descarboxilasa están repartidos, encontrándose ligado al ficobionte el 67,08 por 100 de actividad específica de la primera y el 76,39 por 100 de la segunda. No obstante, las actividades totales son generalmente más altas en el micobionte, dado que su contenido proteico representa cerca del 90 por 100 de las proteínas totales del talo.

De todas formas, puede considerarse al ficobionte como el más eficiente productor de CO₂ en la asociación, lo que induciría a pensar que el aumento en la tensión del gas en el componente algal de la planta puede traducirse en una mayor eficacia fotosintética.

5. La teoría de AHMADJIAN acerca del intercambio de nutrientes.

Sobre el terreno de la hipótesis puede relacionarse el esquema metabólico hasta aquí descrito con los sistemas de transferencia de nutrientes entre los simbioses líquénicos mediante la hipótesis formulada por AHMADJIAN (1966) sobre la base de resultados preliminares obtenidos por él mismo y por SCHOFIELD (1964). La teoría puede resumirse de la siguiente manera: en el supuesto que pueda darse un déficit en el aporte de sustancias nitrogenadas al talo líquénico, éste se vería obligado a movilizar sus reservas, entre las que, como se ha visto, cuentan L-arginina y diversas poliaminas. En este caso, la ureasa hidrolizaría la urea produciendo CO₂ y amoníaco, con lo que la tasa de fotosíntesis incrementaría. Por su parte, el amoníaco no solamente daría lugar a nuevos aminoácidos, sino también podría modificar la permeabilidad celular del alga, de una manera análoga a lo descrito por SYRET (1962) para *Chlorella* de vida libre. Si esto sucediera, el flujo de fotosintetizados aumentaría, con lo que el hongo podría disponer de un suplemento de energía y esqueletos carbonados para llevar a cabo sus procesos de síntesis. En adición a esto, BEKHEET y SYRETT (1979) demuestran incorporación de ¹⁴C-urea por células de *Chlorella*, incorporación que se ve impedida por DCMU, un conocido inhibidor fotolítico, así como acumulación de ¹⁴C-tiourea (SYRETT y BEKHEET, 1977), que puede ser moderadamente metabolizada.

No obstante lo atractivo de la hipótesis, puede ser duramente criticada sobre la base de falta de pruebas circunstanciales concluyentes, como serían, según SMITH (1980), la falta de datos sobre contenido

de urea en líquenes y la falta de evidencias de que las hifas fúngicas puedan ser deficitarias en nitrógeno.

Efectivamente, no hay datos sobre deficiencias en nitrógeno, pero sí suficientes sobre variaciones estacionales de muchas funciones vitales liquénicas, con mínimos durante ciertas épocas del año, que hacen que la hipótesis no deba, en principio, desecharse. Variaciones estacionales en el contenido de glucosa han sido demostradas para muchos líquenes (HALE, 1974), así como para la reacción de Hill en *Ramaliña calicularis* (VICENTE y VALLE, 1979), relaciones estructurales entre alga y hongo en *Cladonia aurantia* (BEN-SAHUL et al., 1969) y *Lecanora radiosa* (GALUN et al., 1970) y presencia o ausencia de pire-noglóbulos en *Parmelia conspersa* (ASCASO y GALVÁN, 1977). En líquenes epifíticos, las relaciones ultraestructurales entre el micelio fúngico y los vasos xilemáticos del forofito (ESTÉVEZ et al., 1980; ASCASO et al., 1980) hacen sospechar una dependencia entre las disponibilidades nutritivas del líquen y los déficit invernales en árboles de hoja caduca. No sería imposible, con estos presupuestos, que ciertos ecotipos de líquenes puedan sufrir regímenes deficitarios estacionales en el aporte de sustancias nitrogenadas desde sus substratos de crecimiento. Las posibilidades enzimáticas de movilizar L-arginina, sintetizar urea y posteriormente degradarla, están suficientemente demostradas.

Otro inconveniente surgiría de la estimación resumida por RICHARDSON (1973) sobre la baja capacidad de asimilación de carbohidratos por parte del micobionte, lo que en muchas ocasiones se traduce en muy pocas horas diarias de fotosíntesis efectiva e incluso en una alta capacidad de excreción de fotoasimilados o sus derivados. Por esta razón, VICENTE et al. (1978b) estimaron que el micobionte tenía que ejercer alguna suerte de regulación para evitar un flujo excesivo de carbohidratos. Basándose en estudios previos (VICENTE et al., 1974) en los que se demostraba que la ureasa era inactivada por ácido L-usnico, VICENTE et al. (1978b) demostraron que tal inactivación procedía mediante un sistema de polimerización, según el cual el polímero nativo, denominado α -ureasa, de peso molecular 480.000, incrementaba éste hasta 700.000 según las condiciones experimentales del trabajo citado, pareciendo este incremento paralelo a la pérdida de actividad. El substrato, urea, no actuaba como protector del enzima al formarse el complejo ES, ya que la formación de éste parece involucrar el establecimiento de un dímero transitorio que no sería disociado, o sólo parcialmente, en presencia de ácido L-úsico.

No parecía ésta una inactivación convencional, ya que ciertos protectores de grupos -SH, como el 2-mercaptoetanol, no protegían al enzima. Sin embargo, un moderado efecto protector se demostró cuando las incubaciones del enzima con el inactivador se llevaban a

cabo en presencia de L-cisteína 50 mM. Este hecho reveló que la polimerización no era la única vía de inactivación, ya que, en ciertas condiciones, se obtenían polímeros de pesos moleculares 630.000, 670.000, 780.000, 820.000 y 880.000, salvo que estas formas eran activas a diferencia de las encontradas cuando la L-cisteína estaba ausente de las mezclas de incubación (VICENTE y CIFUENTES, 1979). Podría concluirse, por tanto, que en el proceso de inactivación de ureasa por ácido L-úsnico jugaban dos hechos distintos, un bloqueo de grupos -SH integrados en el centro activo del enzima y una polimerización que posiblemente afectaría a otros aminoácidos distintos de la L-cisteína. Un doble proceso de este tipo puede ser cinéticamente demostrado. En efecto, incubando la misma concentración de enzima con diferentes concentraciones del inactivador se puede estimar la relación de ligando unido al enzima frente a ligando libre. Una representación de SCATCHARD, como la mostrada en la figura 6, debe ser interpretada como prueba de la existencia de dos clases de puntos de unión para el ligando: una de centros de alta afinidad para él, representados por la zona ascendente de la gráfica, y otra de baja afinidad, representada por la zona paralela al eje de abscisas (GARCÍA et al., 1980). Esta última zona no muestra decaimiento, posiblemente debido a la baja solubilidad del ligando. Una cinética bifásica como la descrita está de acuerdo con el doble mecanismo simultáneo de inactivación propuesto.

La identidad de los centros de alta afinidad con los grupos -SH ha podido ser dilucidada al demostrarse que concentraciones de L-cisteína 10, 30 y 60 mM disminuyeron notablemente la afinidad del enzima por el ligando (figura 6). La naturaleza de los centros de baja afinidad también ha podido ser establecida. VICENTE et al. (1974), demostraron que entre los aminoácidos liberados de una ureasa cristalina por hidrólisis ácida, sólo L-alanina y L-prolina se mostraban, juntos, pero no individualmente, como protectores frente a la inactivación por ácido L-úsnico. CIFUENTES et al. (1981) demostraron que ambos aminoácidos, a una concentración de 15 mM para cada uno de ellos, aumentan los requerimientos en la concentración de ligando para la saturación de los centros de baja afinidad. Es altamente significativo que la L-prolina sea uno de los aminoácidos involucrados en el proceso de polimerización, dado que, como molécula plana, puede cambiar la estructura secundaria de la proteína, por lo que L-alanina y L-prolina pueden quedar orientados según los planos perpendiculares que conforman los dos anillos en la forma L- del ácido úsnico (CIFUENTES y VICENTE, 1978).

Uniones del ácido L-úsnico por medio de dos centros de afinidades distintos han sido demostrados para otros enzimas, como la fructuosa-6-P aminotransferasa (CIFUENTES y VICENTE, 1980), aunque

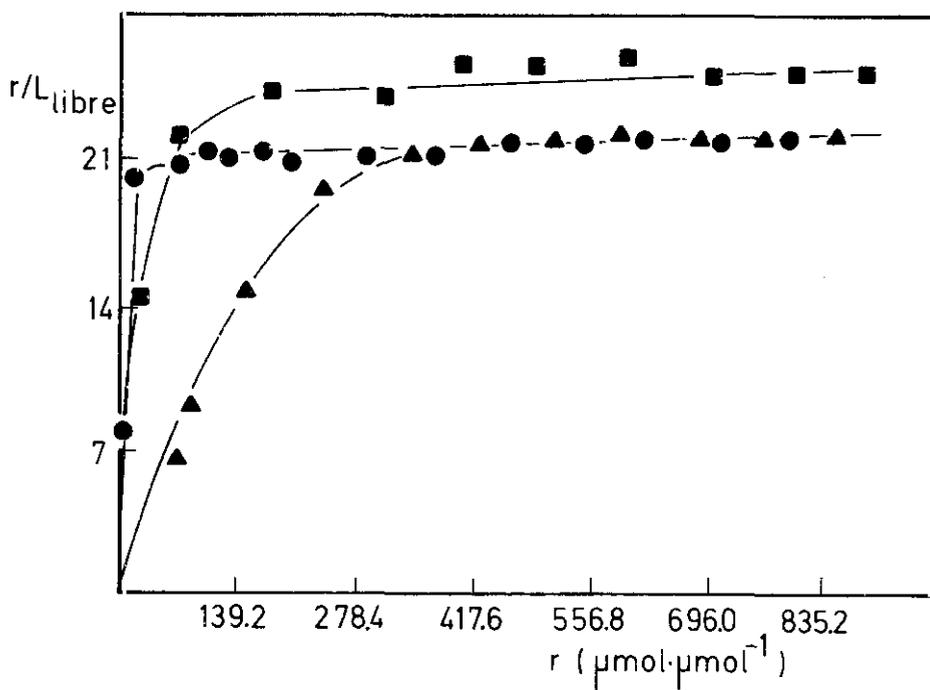


FIG. 6.—Cinéticas de Schatchard para la unión del ácido L-úsico sobre ureasa (●) en presencia de (Δ) L-cisteína 60 mM o de (■) L-alanina + L-prolina 15 mM. Datos tomados de García, M. I.; Cifuentes, B.; Vicente, C. (1980): *Z. Naturforsch.*, 35c, 1098.

en este caso el efecto final del ligando sea una activación.

Un sistema de inactivación como el descrito puede ser relacionado por vía de la hipótesis con las sugerencias de AHMADJIAN si se supone que:

a) Es necesario cortar el aporte de fotoasimilados al micobionte cuando aquél rebasa los límites tolerables.

b) La actividad ureasa, como las restantes descritas en este trabajo, decae tras un cierto tiempo de incubación de los talos sobre los distintos inductores, siendo este decaimiento mayor en luz que en oscuridad.

c) La luz estimula la síntesis de ácidos liquénicos en general, el ácido L-úsico entre ellos (RUNDELL, 1969, 1978).

De esta manera podría pensarse que si la actividad ureasa va dirigida a elevar la concentración de fotoasimilados e incrementar su flujo,

de la misma manera incrementará el conjunto de acetil-CoA, con lo que una parte sustancial de éste podrá ser dirigida a la síntesis de fenoles líquénicos. El resultado sería un proceso de retroinhibición, en el que participarían ambos simbioses.

Otro de los inconvenientes puestos por SMITH (1980) al desarrollo de esta teoría ha sido, por una parte, considerar que el ácido úsnico, en sus diferentes formas isoméricas, no es sintetizado por todos los líquenes, y por otra, la ausencia de datos sobre síntesis o presencia de fenoles líquénicos en la zona de contacto entre ambos simbioses. Los datos que se pueden aportar para, tanto satisfacer estas exigencias como para seguir investigando sobre estos aspectos, son los siguientes. *Parmelia raystonea* y *Cladonia verticillaris* son dos líquenes no productores de ácidos úsnicos. La primera especie está caracterizada por la presencia de atranorina y ácido lecanórico. La posesión del ácido caperático la separa, entre otras cosas, como especie distinta de *Parmelia subrudecta*, la más semejante a nivel morfológico (VICENTE y XAVIER FILHO, 1979b). Los tres compuestos, aun cuando el ácido caperático no es de naturaleza fenólica, inactivan ureasa purificada del talo líquénico y muestran, en talos incubados sobre urea, una evolución concordante con la pérdida de actividad ureásica. Otro tanto podría decirse del único fenol líquénico de *Cladonia verticillaris*, el ácido fumarprotocetrárico. Para mayor abundamiento ha sido descrito que el 11,6 por 100 del total del fenol en talo está precisamente en las células del ficobionte o asociado a ellas (VICENTE y XAVIER FILHO, 1979a).

Las dificultades en presentar pruebas experimentales concluyentes sobre estos puntos en particular son enormes por no haber dispuesto hasta hace muy poco de un método experimental fiable de valoración de los fenoles líquénicos. LEGAZ (1981) ha puesto muy recientemente a punto un sistema de estas características mediante cromatografía líquida de alta presión, por lo que, en breve, se podrá disponer de datos suficientemente demostrativos. También supone una grave dificultad la imposibilidad de cultivar líquenes en el laboratorio, por lo que, muchas veces, las interpretaciones que pueden ofrecerse tienen sólo el valor de lo inmediato. Se deben considerar los resultados expuestos aquí como un campo de investigación recién abierto, de consecuciones aún escasas y, en virtud de ello, criticables, por lo que, a nuestro juicio, tiene todo el valor que le concede su importancia y su futuro.

Estas líneas reflejan no sólo la aportación personal de los autores, sino también el trabajo y las constructivas discusiones de quienes con nosotros han colaborado, algunas de cuyas publicaciones están incluidas en la bibliografía. Queremos citar a A. Azpiroz, M. P. Estévez, M. I. García, M. L. González, C. González, M. I. Orús y J. L. Ruiz,

actualmente o por algún tiempo trabajando en nuestros laboratorios; H. Guerra y M. T. Valle, del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Salamanca; C. Ascaso, del CSIC; profesor Dennis H. Brown, del Departamento de Botánica de la Universidad de Bristol, y profesor L. Xavier Filho, del Instituto de Biología de la Universidad de Brasilia.

BIBLIOGRAFÍA

- AHMADJIAN, V. —1966— En S. M. Henry: *Symbiosis*, pág. 35. Academic Press. New York.
- AHMADJIAN, V. —1973— En V. Ahmadjian, M. E. Hale (eds.): *The Lichens*, página 653. Academic Press. New York.
- ASCASO, C.; GALVÁN, J. —1977— *Anal. Edaf. Agrobiol.*, 36, 1157.
- ASCASO, C.; GONZÁLEZ, C.; VICENTE, C. —1980— *Cryptog. Bryol. Lichénol.*, 1, 43.
- BEKHEET, I. A.; SYRETT, P. J. —1979— *New Phytol.*, 82, 179.
- BEN-SAHUL, Y.; PARAN, N.; GALUN, M. —1969— *J. Microscop.*, 8, 415.
- BERNARD, T.; GOAS, G. —1968— *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris*, 267, 622.
- BERNARD, T.; LARHER, F. —1971— *Compt. Rend. Sc. Paris*, 272, 568.
- BERNARD, T.; GOAS, G. —1977— *The Bryologist*, 80, 354.
- BONGAERTS, G. P. A.; VOGELS, G. D. —1976— *J. Bacteriol.*, 125, 689.
- CIFUENTES, B.; VICENTE, C. —1978— *Anal. Inst. Bot. Cav.*, 35, 353.
- CIFUENTES, B.; VICENTE, C. —1980— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1550.
- CIFUENTES, B.; GARCÍA, I.; VICENTE, C. —1981— *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (en prensa).
- COHEN, G. —1967— *Le métabolisme cellulaire et sa régulation*, pág. 139. Hermann. París.
- CRABEEL, M.; CHARLIER, D.; CUNTIN, R.; BOYEN, A.; GALENSDORF, M; PIERRARD, A. —1975— *J. Bacteriol.*, 23, 898.
- ESTÉVEZ, M. P.; VICENTE, C. —1976— *I Reunión. Soc. Esp. Fisiol. Veg.* Tenerife.
- ESTÉVEZ, M. P.; ORUS, M. I.; VICENTE, C. —1980— *Cryptog. Bryol. Lichénol.*, 1, 33.
- GALUN, M.; PARAN, N.; BEN-SAHUL, Y. —1970— *J. Microscop.*, 9, 801.
- GARCÍA, M. I.; CIFUENTES, C.; VICENTE, C. —1980— *Z. Naturforsch.*, 35c, 1098.
- GOAS, G.; BERNARD, T. —1967— *Compt. Rend. Acad. Sc., Paris*, 265, 1187.
- HALE, M. E. —1974— *The Biology of Lichens*. E. Arnold. London.
- HARKNESS, D. R.; STADTMAN, E. R. —1965— *J. Biol. Chem.*, 240, 4089.
- HOLZER, H. —1968— En A. K. Mills: *Aspects of Yeast Metabolism*, pág. 155, Blackwell Sc. Publ. Oxford.
- JAGER, H. J.; WEIGEL, H. J. —1978— *The Bryologist*, 81, 107.
- LEGAZ, M. E. —1981— *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense.
- LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. —1980— *Cryptog. Bryol. Lichénol.*, 1, 407.
- LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. —1981— *Z. Naturforsch.*, 36c, 692.
- MASSE, L. C. —1969— *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris*, 268, 2896.
- RICHARDSON, D. H. J. —1971— En *Methods in Microbiology*, pág. 267. Academic Press. New York.
- RICHARDSON, D. H. J. —1973— En V. Ahmadjian, M. E. Hale (eds.): *The Lichens*, página 249. Academic Press. New York.
- RONSENFELD, H. J.; ROBERTS, J. —1976— *J. Bacteriol.*, 125, 601.
- RUNDEL, P. W. —1969— *The Bryologist*, 72, 40.
- RUNDEL, P. W. —1978— *Biochem. Syst. Ecol.*, 6, 157.
- SCHOFIELD, E. A. —1964— *Master of Arts Thesis*. Clark University. Worcester.

- SMITH, D. C. —1980— En C. B. Cook, P. V. Papas, E. D. Rudolph (eds.): *Cellular Interactions in Symbiosis and Parasitism*, pág. 197. Ohio State University Press. Columbus.
- SOLBERG, Y. J. —1969— *Z. Naturforsch.*, 24b, 447.
- SOLBERG, Y. J. —1970— *Lichenologist*, 4, 283.
- SYRETT, P. J. —1962— En R. A. Levin. *Physiology and Biochemistry of Algae*, página 171. Academic Press. New York.
- SYRETT, P. J.; BEKHEET, I. A. —1977— *New Phytol.*, 79, 291.
- VANDERBILT, A. S.; GABY, N. S.; RODWELL, V. W. —1975— *J. Biol. Chem.*, 250, 5322.
- VICENTE, C.; GUERRA, H.; VALLE, M. T. —1974— *Rev. Esp. Fisiol.*, 30, 1.
- VICENTE, C.; PALASÍ, M.; ESTÉVEZ, M. P. —1978a— *Rev. Bryol. Lichénol.*, 44, 83.
- VICENTE, C.; AZPIROZ, A.; ESTÉVEZ, M. P.; GONZÁLEZ, M. L. —1978b— *Plant, Cell & Environ.*, 1, 29.
- VICENTE, C.; CIFUENTES, B. —1979— *Plant Science Letter*, 15, 165.
- VICENTE, C.; VALLE, M. T. —1979— *Rev. Bryol. Lichénol.*, 45, 97.
- VICENTE, C.; XAVIER FILHO, L. —1979a— *Phyton*, 37, 137.
- VICENTE, C.; XAVIER FILHO, L. —1979b— *Rev. Bryol. Lichenol.*, 45, 471.
- VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. —1981— *Plant & Cell Physiol.*, 22, 838.
- WEISS, R. L.; DAVIES, R. H. —1977— *J. Bacteriol.*, 129, 866.
- XAVIER FILHO, L.; VICENTE, C. —1978— *Bol. Soc. Brot.*, 52, 55.

Cátedra de Fisiología Vegetal
Facultad de Biología
Universidad Complutense. Madrid-3