

**Implication de la Glutamate deshydrogénase et la
Glutamine synthétase/Glutamate synthase dans la formation du
glutamate chez le champignon ectomycorhizien *Cenococcum
geophilum*.**

**KHALID A., EL AMRANI A., SERGHINI CAID H., BOUKROUTE A., &
ZEGAYE F.**

**Laboratoire de biologie des plantes et des microorganismes, Faculté des sciences –
Oujda (Maroc)**

Résumé :

Afin de préciser les voies d'assimilation de l'ammonium chez le champignon ectomycohyzien *Cenococcum geophilum*, les activités des enzymes impliquées dans l'assimilation primaire de l'azote ainsi que la teneur des acides aminés libres ont été déterminées, en présence ou en absence des inhibiteurs spécifiques de ces enzymes. Le transfert du mycélium carencé, sur milieu de culture contenant comme seule source d'azote les nitrates en présence de methionine sulfoximine ou d'albizine, a montré une inhibition des activités enzymatiques des aminotransférases. Ceci indique la dépendance de ces enzymes de l'activité du cycle glutamine synthétase / glutamate synthase. L'accumulation des acides aminés a été inhibée par la méthionine sulfoximine, l'albizine et l'acide aminooxyacétate. L'inhibition très marquée de l'accumulation du glutamate et de la glutamine dans les cellules fongiques par l'albizine montre clairement le rôle majeur de la glutamate synthase dans la synthèse du glutamate. Il est donc clair que l'assimilation de l'ammonium peut se faire par les deux voies : la voie glutamate déshydrogénés à NADP et la voie glutamine synthétase / glutamate synthase et que le passage de l'azote par le cycle glutamine synthétase / glutamate synthase est une étape

importante dans la synthèse des acides aminés chez *Cenococcum geophilum*.

Mots clés : Assimilation de l'ammonium, Aspartate aminotransférase, *Cenococcum geophilum*., Ectomycorhizes, Glutamate deshydrogénase, Glutamate pyruvate transaminase, Glutamine synthétase, métabolisme azoté.

INTRODUCTION

L'incorporation de l'ion ammonium dans un composé carboné (acide organique ou acide aminé), donnant naissance à une fonction amine ou amide, constitue l'assimilation primaire de l'azote, qui est une fonction essentielle à la croissance et au fonctionnement cellulaire.

Si chez les plantes supérieures, il est admis que l'assimilation de l'ammonium suit préférentiellement la voie glutamine synthétase/glutamate synthase (GS/GOGAT) (MIFLIN et LEA, 1980 ; MIFLIN et al., 1980 ; OAKS et HIREL, 1985 ; LEA et al., 1989 ; IRELAND et LEA, 1999 ; LEA et IRELAND, 1999 ; LANCIEN et al., 2000), chez les microorganismes de nombreuses études ont démontré l'existence des deux voies d'assimilation de l'ammonium : La voie glutamate déshydrogénase (GDH) à NADP et la voie GS/GOGAT.

Chez un grand nombre de champignons, la voie GDH à NADP semble prédominante (MIFLIN et LEA, 1980 ; BOTTON et MSATEF, 1983 ; GENETET et al., 1984). Cependant, récemment il a été montré, chez les champignons, que l'assimilation de l'ammonium est assurée à la fois par la voie GDH à NADP et la voie GS/GOGAT (KUSNAN et al., 1987 ; WAGNER et DEBAUD, 1988 ; MARTIN et al., 1988 ; KERSHAW et STEWART, 1989 ; AHMAD et al., 1990 ; CHALOT et al., 1991 a ; SCHWARTZ et al., 1991 ; KERSHAW et STEWART, 1992 ; MARZLUF, 1997). Les études effectuées sur le métabolisme azoté chez *Aspurgillus nidulans* ont montré que la GDH à NADP, la GS et La GOGAT participent simultanément à la synthèse du

glutamate (KUSNAN et al., 1987 ; KUSNAN et al.,1989). Chez les champignons mycorrhiziens, deux groupes ont été identifiés ; un groupe avec une GS et une GDH à NADP et l'autre groupe ne présentant qu'une GS, la GDH à NADP étant absente (MOREL et al., 2006) . L'emploi de l'azote ¹⁵N ainsi que l'étude de la cinétique de marquage chez le champignon éctomycorrhizien *Pisolithus tinctorius* ont montré que l'assimilation de l'ammonium se fait principalement par la voie GS/GOGAT et que la GDH n'y joue qu'un rôle mineur (KERSHAW et STEWART, 1992).

Chez *Paxillus involutus*, CHALOT et al. (1994) ont montré par l'utilisation de la glutamine marquée au carbone ¹⁴C, le rôle clef joué par la GOGAT dans la dégradation de la glutamine. Cependant la GOGAT NAD-dépendante n'a été mise en évidence que chez très peu d'espèces fongiques *Saccharomyces cerevisiae* (ROON et al., 1974), *Neurospora crassa* (HUMMELT et MORA, 1980) et *Laccaria bicolor* (VEZINA et al.,1989). Chez *Neurospora crassa* (CALDERON et al., 1985 ; MORA, 1990) et chez *Saccharomyces cerevisiae* (SOBERON et al., 1989), la glutamine peut être utilisée par le cycle glutamine transaminase/ ω -amidase pour former de l' α -cétoglutarate et de l'ammonium.

L'importance relative des deux voies d'assimilation d'ammonium semble dépendre du milieu de culture. Ainsi chez *Neurospora crassa*, cultivée sur milieu riche en azote, les deux voies (la voie GDH à NADP et la voie GS/GOGAT) sont impliquées (HERNANDEZ et al., 1983). Tandis que sur milieu pauvre en azote seule la voie GS/GOGAT semble être mise en jeu (LARA et al., 1982). Chez *laccaria laccata* l'assimilation de l'ammonium se fait par la GS en milieu pauvre en azote et par la GDH à NADP en milieu riche en cet élément (BRUN et al., 1992).

Les études préliminaires des voies métaboliques d'assimilation de l'ammonium chez le champignon éctomycorrhizien *Cenococcum geophilum* par la méthode de marquage à

l'azote ¹⁵N ont montré l'implication des deux enzymes : GDH à NADP et GS. En phase stationnaire de croissance, l'assimilation de l'ammonium suit principalement la voie GDH à NADP (GENETET et al., 1984). En revanche, en phase rapide de croissance c'est la GS qui prédomine (MARTIN et al., 1988). Chez *Debaromyces hansenii*, en milieu hypertonique, la GDH à NADP est cinq fois plus active et semble ainsi remplacer ; dans l'assimilation de l'ammonium ; la GS inhibée par la force ionique dû à l'accumulation des ions (ALBA-LOIS et al., 2004)

Afin de mieux préciser l'intervention simultanée de la GDH à NADP, la GS et la GOGAT dans la synthèse du glutamate chez *Cenococcum geophilum*, nous avons entrepris, au cours de ce travail, la détermination de l'activité de diverses enzymes impliquées dans le métabolisme azoté (GDH à NADP, GS, GPT, AAT). Le champignon, préalablement carencé en azote, est transféré sur milieu nitrates en présence ou en absence des inhibiteurs spécifiques de ces enzymes. Nous avons également identifié et quantifié les différents métabolites du métabolisme azoté.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Conditions de culture :

Le champignon *Cenococcum geophilum* (Sowerby) Ferd et Winge souche Kiffer 1973 a été cultivé sur milieu Pachlewski modifié (Martin et al., 1983). La culture du champignon a été réalisée sur milieu liquide en fiole Erlenmeyer de 250 ml contenant 125 ml de milieu à l'obscurité, à 25 °C et sur un agitateur rotatif à 120 rpm/min.. Après 9 jours de culture, le champignon est carencé en azote pendant 2 jours, avant d'être transféré sur un milieu Pachlewski frais contenant des nitrates, comme source d'azote, en absence ou en présence de différents inhibiteurs : méthionine sulfoximine (MSX), inhibiteur de la GS ; albazine (Albiz) inhibiteur de la GOGAT ou l'acide amino-oxyacétate (AOA) inhibiteur des transaminases. Le mycélium a été ensuite récolté après

24 heures, 48 heures et 72 heures.

Préparation de l'extrait enzymatique brut :

Le mycélium fongique (entre 50 et 500 mg de poids frais) est broyé au mortier dans le tampon Tris-HCl, pH 7,6 contenant : MgSO_4 (5 mM), glycerol(10%), polyvinylpyrrolidone (PVP-2%), Na-EDTA (5 mM), Na-glutamate(10 mM), 2-mercaptoéthanol(14 mM) et polyvinylpolypyrrolidone (PVPP-10%). Le broyat est centrifugé à 40 000g pendant 25min. Le surnageant est utilisé comme extrait brut pour le dosage des activités enzymatiques.

1- Détermination des activités enzymatiques :

L'aspartate aminotransférase (AAT, EC 2.6.1.1) :

Pour le transfert du groupement aminé $-\text{NH}_2$ du L-aspartate vers l' α -cétoglutarate, l'activité AAT est suivie à 340 nm par couplage avec la malate déshydrogénase à NAD (MDH) qui catalyse la transformation de l'oxaloacétate en malate. La diminution de la densité optique à 340 nm due à l'oxydation du NADH est suivie en cellule thermostatée à 30°C au spectrophotomètre (Shimadzu, UV-160). Le milieu réactionnel est composé de : L-aspartate (20 mM), α -cétoglutarate (10 mM), pyridoxal 5'-phosphate (80 μM), NADH (0,2 mM), MDH (1 unité/ml), tampon Tris-HCl (0,1 M) pH 8 et l'extrait enzymatique pour avoir un volume total de 1,15 ml.

La glutamate pyruvate aminotransférase (GPT, EC 2.6.1.2) :

Pour le transfert du groupement aminé $-\text{NH}_2$ de la L-alanine vers l' α -cétoglutarate, l'activité GPT est suivie à 340 nm par couplage avec la lactate déshydrogénase à NAD (LDH) qui catalyse la transformation du pyruvate en lactate. La diminution de la densité optique à 340 nm due à l'oxydation du NADH est suivie en

cellule thermostatée à 30°C au spectrophotomètre (Shimadzu, UV-160). Le milieu réactionnel est composé de : L-alanine (10 mM), α -cétoglutarate (10 mM), pyridoxal 5'-phosphate (80 μ M), NADH (0,2 mM), LDH (1 unité/ml), tampon Tris-HCl (0,1 M) pH 8 et l'extrait enzymatique pour avoir un volume total de 1,15 ml.

La glutamate déshydrogénase (GDH à NADP, EC 1.4.1.4) :

L'activité enzymatique de la GDH à NADP est suivie par son activité aminatrice de l' α -cétoglutarate. L'extrait enzymatique est incubé à 30°C dans un mélange réactionnel total de 1,15 ml et composé de : tampon phosphate (100 mM) pH 7, α -cétoglutarate (8,7 mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (122 mM) et NADPH (0,18 mM). L'activité GDH à NADP est déterminée au spectrophotomètre (Shimadzu, UV-160) en suivant l'oxydation du NADPH à 340 nm.

La glutamate synthétase (GS, EC 6.3.1.2) :

La méthode utilisée pour mesurer l'activité GS est la méthode de RHEE et al. (1976).

2- Extraction et dosage des acides aminés libres :

L'extraction des acides aminés est réalisée à l'aide d'un mélange méthanol - eau (70/30,v/v). Le matériel fongique (environ 10 mg de matière fraîche) est broyé et centrifugé à 14 000g pendant 10min à trois reprises. Les surnageants sont ensuite rassemblés puis séchés. Après ajout de la norleucine comme étalon interne, les extraits sont dérivatisés au phénylthiocyanate (PITC) et analysés par HPLC (HPLC Waters, munie de deux pompes à haute performance (Model 501), d'un régulateur de température (TCM), d'un spectrophotomètre (Model 810) et d'une colonne Novapak C18 (3,9 x 300mm) en utilisant la méthode PICO-TAG (BOTTON et CHALOT, 1991).

RESULTATS

Aminotransférases :

Les activités AAT et GPT augmentent de façon sensiblement linéaire au cours du temps avec une diminution de l'activité GPT après 48 heures sur les deux milieux ammonium et nitrate (Fig. 1a et b). Ces deux enzymes sont complètement inhibées par l'aminooxyacétate (ce qui est tout à fait normal puisque l'AOA est un inhibiteur spécifique des aminotransférases) et la méthionine sulfoximine (inhibiteur spécifique de la GS) (Fig. 1a et b). En présence d'albizine les activités AAT et GPT sont partiellement inhibées. Par ailleurs sur milieu où la glutamine constitue la seule source d'azote, la MSX, n'a aucun effet sur les activités AAT et GPT (résultat non montré).

L'inhibition par la MSX des aminotransférases sur nitrate ainsi que l'action nulle de ce même inhibiteur sur glutamine (résultat non montré) semble indiquer que l'activité des aminotransférases est dépendante de l'activité GS. En outre l'inhibition partielle des aminotransférases par l'albizine montre qu'elles sont dépendantes de l'activité GOGAT. Ces résultats, ensemble, montrent la dépendance de l'activité des transaminases de celle du cycle GS/GOGAT.

La glutamine synthétase GS :

L'activité GS croît de façon continue au cours du temps. (Fig.2 a). Cette activité enzymatique est totalement inhibée par la MSX (Fig. 2 a). L'AOA ainsi que l'albizine semblent n'avoir aucun effet sur la GS quand le champignon est cultivé sur nitrate (Fig.2 a).

La glutamate déshydrogénase à NADP :

L'activité GDH à NADP croît au cours du temps, atteint un maximum de 993 nkat/ g de M.F., puis diminue par la suite (Fig. 2 b). Cette activité est complètement inhibée par la MSX (Fig. 2 b) ; sans doute par ce que le glutamate s'accumule et il y a une

rétroinhibition de l'enzyme. Ce même inhibiteur n'a aucun effet sur la GDH à NADP quand le champignon est cultivé sur glutamate (résultat non montré).

Sur nitrate, la GDH à NADP est fortement inhibée après 24 heures par l'albizine et l'aminooxyacétate. Les pourcentages d'inhibition relevés pour l'albizine et l'AOA sont 65% et 81% respectivement (Fig. 2 b). Mais cette inhibition s'atténue à 48 et 72 heures.

Ainsi l'inhibition totale de la GDH à NADP par la MSX et l'inhibition partielle de cette même enzyme par l'albizine, montrent que le glutamate formé par la GDH à NADP ne passe pas entièrement par les transaminases. Une grande partie de ce glutamate emprunte le cycle GS/GOGAT avant d'arriver aux aminotransférases.

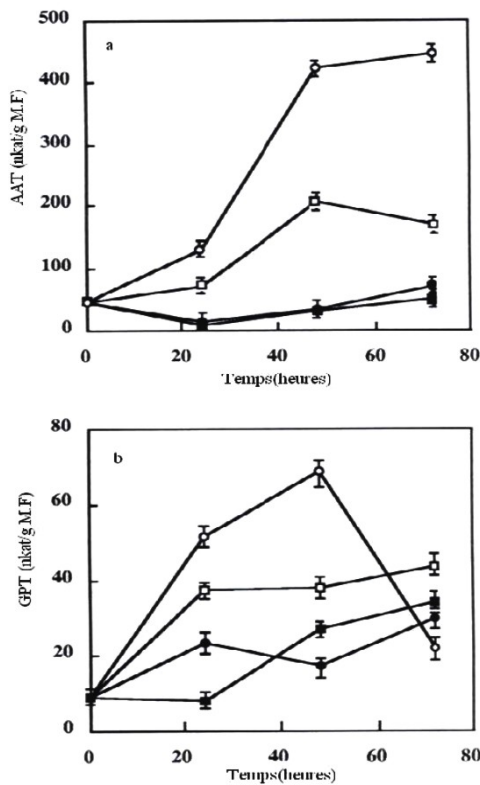


Figure 1 : Activités AAT (a) et GPT (b) après transfert du mycélium de *Cenococcum geophilum* sur milieu nitrates: ○ Témoin; ● MSX; □ Albiz; ■ AOA

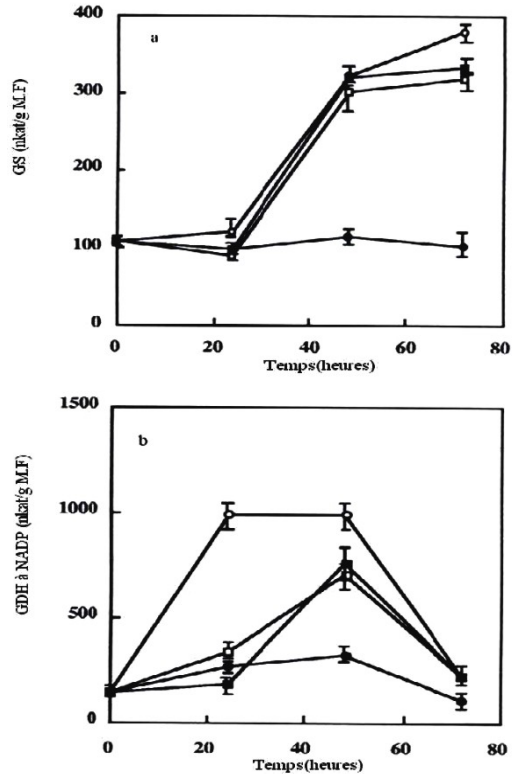


Figure 2 : Activités GS (a) et GDH à NADP (b) après transfert du mycélium de *Cenococcum geophilum* sur milieu nitrates: ○ Témoin; ● MSX; □ Albiz; ■ AOA

Les acides aminés directement impliqués dans les voies d'assimilation primaire de l'azote :

L'accumulation de l'alanine et du glutamate est proportionnelle au temps (Fig. 4 a). Les teneurs en glutamate sont cependant inférieures à celles de l'alanine. A 72 heures, les teneurs en alanine et en glutamate sont respectivement 11 et 6 $\mu\text{moles/g}$ de M.F. (Fig. 4 a). La teneur en glutamine augmente, atteint un maximum de 7 $\mu\text{moles/g}$ de M.F. à 24 heures et reste sensiblement constante par la suite (Fig. 4 a). Le pool d'aspartate reste constant tout au long de l'expérience alors que celui du Gaba diminue légèrement (Fig. 4 a).

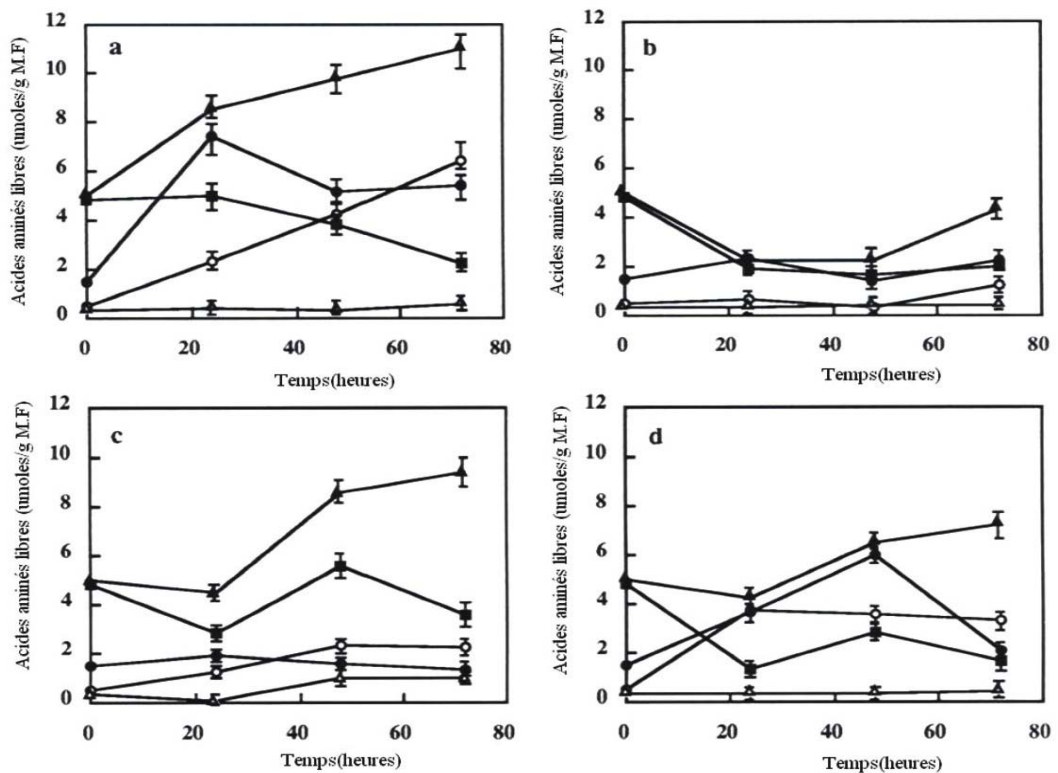


Figure 4 : Evolution des teneurs en acides aminés libres de *Cenococcum geophilum* après transfert sur milieu nitrates. a) Témoin; b) + Albiz; c) + MSX; d) + AOA : \circ Glu; \bullet Gln; \blacktriangle Asp; \blacktriangle Ala; \blacksquare Gaba.

En présence de la MSX, on note une inhibition quasi-totale de la synthèse de la glutamine et du glutamate (Fig. 4 a et c). Les teneurs en alanine, en Gaba et en aspartate restent comparables aux témoins (Fig. 4 a et b). Ce résultat peut être expliqué par le fait que quand le champignon est cultivé sur NO_3^- tout le glutamate synthétisé par la GDH à NADP passe forcément par le cycle GS/GOGAT pour être accessible, ensuite, aux aminotransférases. D'ailleurs quand le cycle GS/GOGAT est bloqué à son amont par la MSX, la GDH à NADP se trouve généralement inhibée (Cf. paragraphe GDH à NADP)(Fig. 2 b).

En présence d'albizine, on retrouve des résultats tout à fait cohérents avec ceux obtenus en présence de MSX : inhibition totale par l'albizine de l'accumulation des cinq acides aminés, en l'occurrence le glutamate et la glutamine (Fig. 4 a et b). A 48 heures, la réduction des teneurs en glutamine et glutamate est de 72 et 91% respectivement. Ce résultat rend compte, une fois de plus de l'importance du cycle GS/GOGAT dans la synthèse du glutamate et de l'alanine.

En présence d'AOA, L'évolution des teneurs des cinq acides aminés est sensiblement comparable au témoin, avec cependant, des teneurs en glutamate et glutamine plus faibles (Fig. 4 a et d).

DISCUSSION :

L'emploi des inhibiteurs spécifiques des enzymes impliquées dans l'assimilation primaire de l'azote sur les milieux NO_3^- montre que les aminotransférases (AAT et GPT) sont inhibées par la MSX. En revanche ce même inhibiteur n'a aucun effet sur ces enzymes lorsque le champignon est cultivé sur glutamine. Ceci semble indiquer que l'activité des aminotransférases est dépendante de l'activité GS. En outre, l'inhibition partielle des aminotransférases

par l'albizine montre qu'elles sont dépendantes de l'activité GOGAT (Donc de la synthèse du glutamate par la GOGAT). Ces résultats montrent clairement la dépendance de l'activité des aminotransférases de celle du cycle GS/GOGAT.

D'autre part, l'inhibition totale de la GDH à NADP par la MSX, ainsi que l'inhibition de cette même enzyme par l'albizine tendraient à montrer que le glutamate ne passe pas entièrement par les transaminases. Une grande partie de ce glutamate emprunte le cycle GS/GOGAT. En effet, en présence de MSX ou d'albizine, le glutamate a tendance à s'accumuler et entraîne ainsi une rétroinhibition de la GDH à NADP.

La convergence des résultats obtenus, par le dosage des enzymes du métabolisme primaire de l'azote en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques permet de souligner l'importance du cycle GS/GOGAT dans l'assimilation de l'azote chez *Cenococcum geophilum*.

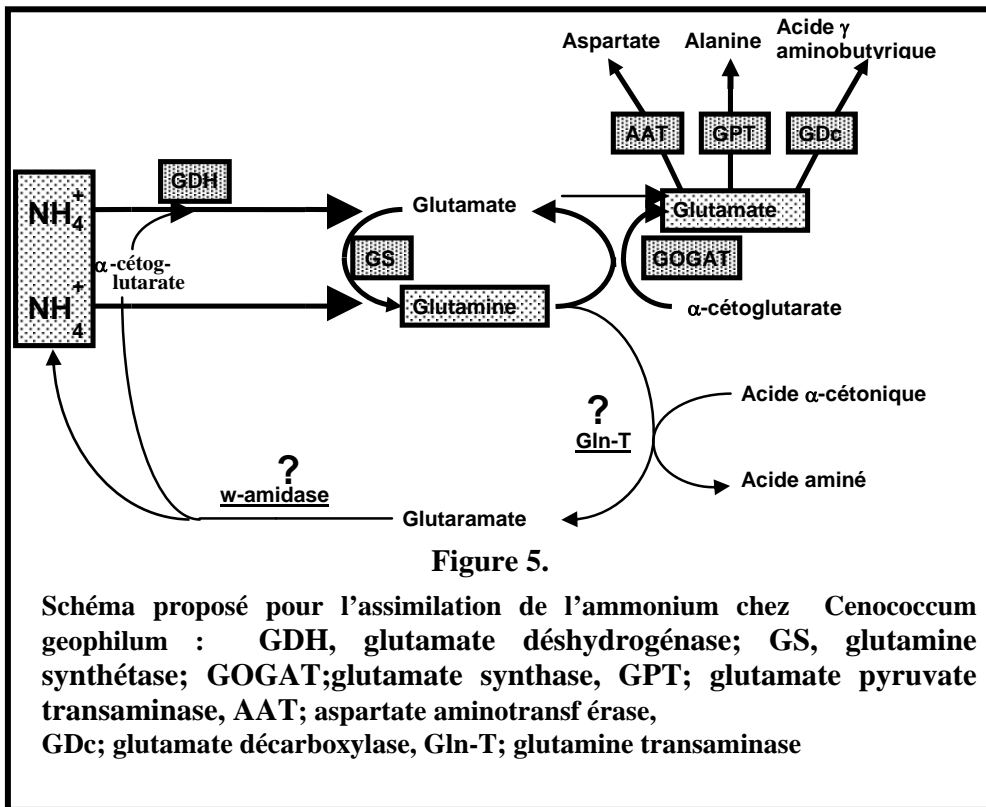
Par ailleurs, les taux des acides aminés dans le mycélium de *Cenococcum geophilum* cultivé sur NO_3^- , en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques des enzymes, ont été déterminés. Ainsi l'accumulation des acides aminés est inhibée de façon notable par les trois inhibiteurs utilisés ; MSX, Albizine et AOA. Cet effet est particulièrement important (inhibition totale) avec l'albizine.

L'albizine inhibe de façon très marquée l'accumulation du glutamate et de la glutamine dans les cellules fongiques de *Cenococcum geophilum*. Ceci montre sans équivoque, l'intervention de la GOGAT et par conséquent du cycle GS/GOGAT dans la synthèse du glutamate. Des résultats similaires ont été obtenus chez le champignon éctomycorrhizien *Pisolithus tinctorius* (KERSHAW et STEWART, 1989 ; KERSHAW et STEWART, 1992), chez *Aspegillus nidulans* (KUSNAN et al., 1987 ; KUSNAN et al., 1989) et le champignon basidiomycète *Stropharia*

semiglobata (SHWARTZ et al., 1991).

Chez *Paxillus involutus*, CHALOT et al.,(1994), ont montré, en utilisant la glutamine marquée au carbone ¹⁴C que la synthèse du glutamate est inhibée à 90 % par l'alzasérine (inhibiteur de la GOGAT), ce qui confirme le rôle majeur de la GOGAT dans la dégradation de la glutamine.

Ainsi, au terme de cette étude, on peut conclure que l'assimilation de l'ammonium chez *Cenococcum geophilum* peut se faire par les deux voies : la voie GDH à NADP et la voie GS/GOGAT. En outre, le glutamate formé par la GDH à NADP emprunte, en grande partie, la voie GS/GOGAT et devient ainsi accessible aux transaminases (Fig. 5). Ces résultats corroborent ceux de MARTIN et al., (1988 et 1994); CHALOT et al. (1991 b) ; VALLORANI et al. (2002) et MOREL et al. (2006)



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmad I., Carleton T.J., Malloch D.W., Hellebust J.A. (1990)** Nitrogen metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (R Mre) Orton. *New Phytol.* 116 : 431-441.
- Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdes-Lopez V, Deluna A, Cardenas R.- (2004)** - NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiology* 48: 68–72.
- Botton B., Msatef Y. (1983)** - Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Sphaerostilbe repens*. *Physiol.Plant* . 59 : 438-444.
- Botton B., Chalot M.(1991)** - Techniques for the study of nitrogen metabolism in mycorrhizas. In: *Methodes in microbiology*, “Experiments with Mycorrhizas” , Vol. 23, pp.203-252. (JR NORRIS, DJ READ & AK VARMA eds.), Academic Press, New York.
- Brun A, Chalot M, Botton B, Martin F. (1992).** - Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiology* 99: 938–944.
- Calderon J., Morret E., Mora J. (1985)** - ω -amidase pathway in degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 161 : 807-809.
- Chalot M., Brun A., Debaud J.C., Botton B. (1991 a)** - Ammonium-assimilating enzymes and their regulation in wild and NADP-glutamate dehydrogenase deficient strains of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*.. *Physiol. Plant.* 83 : 122-128.
- Chalot M, Stewart GR, Brun A, Martin F, Botton B. (1991 b)** - Ammonium assimilation by spruce-Hebeloma sp. ectomycorrhizas. *New Phytologist* 119: 541–550.
- Chalot M., Brun A., Finlay R.D., Söderström B. (1994)** - Metabolism of [14C] glutamate and [14C] glutamine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus*

involutus. Micobiol. 140 : 1641-1649.

Genetet I., Martin F., Stewart G.R. (1984) - Nitrogen assimilation in mycorrhizas. Ammonium assimilation in the N-starved ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *Plant Physiol.* 76 : 395-399.

Hernandez G., Sanchez-Pescador R., Palacios R., Mora J. (1983) - Nitrogen source regulates glutamate dehydrogenase NADP synthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 154 : 524-528.

Hummelt G., Mora J. (1980) - NADH-dependent glutamate synthase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92 : 127-133.

Ireland RJ, Lea PJ (1999) - The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In *BK Singh, ed, Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology. Marcel Dekker, New York*, pp 49–109

Kershaw J.L., Stewart G.R. (1989) - The role of glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in ammonium assimilation by the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker et Couch. *Mycorrhiza* 1 : 711-77.

Kershaw J.L., Stewart G.R. (1992) - Metabolism of ¹⁵N-Labelled ammonium by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker et Couch. *Mycorrhiza*. 1 : 71-77.

Kusnan M.B., Berger M.G., Fock H.P. (1987) - The involvement of glutamine synthetase /glutamate synthase in ammonium assimilation by *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 1235-1242.

Kusnan M.B., Klug K., Fock H.P. (1989) - Ammonia assimilation by *Aspergillus nidulans* : [¹⁵N] ammonia study. *J. Gen. Microbiol.* 135 : 729-738.

Lancien M., Gadal P., Hodges M. (2000) - Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation. *Plant Physiology*, 123 , 817– 824

Lara M., Blanco L., Campomanes M., Calva E., Palacio R., Mora J. (1982) - Physiology of ammonium assimilation in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 133 : 1235-1242.

- Lea P.J., Blanckwell R.D., Murray A.J.S., Joy K.M. (1989)** - The Universitas Sumatera Utara of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthase to study their role in plant nitrogen metabolism. In *Recent Advances in Phytochemistry, Plant Nitrogen Metabolism* (ed. Poulton J.E., Romeo J.T., Conn E.E.) Vol. 23, Plenum Press, New York, London, pp 157-189.
- Lea PJ, Ireland RJ (1999)** - Nitrogen metabolism in higher plants. In *BK Singh, ed, Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp 1-47
- Martin F., Msatef Y., Botton B. (1983)** - Nitrogen assimilation in mycorrhizas. I. purification and properties of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* - *New phytol.* 93: 415-422.
- Martin F., Stewart G.R., Genetet I., Mourot B. (1988)** - The involvement of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in ammonium assimilation by the rapidly growing ectomycorrhizal ascomycete, *Cenococcum geophilum*. *New Phytol.* 110 : 541-550.Fr
- Martin F, Côté R, Canet D. (1994).** - NH_4^+ assimilation in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, a ^{15}N -NMR study. *New Phytologist* 128: 479-485.
- Marzluf GA. 1997.** - Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 17-32.
- Mifflin B.J., Lea P.J. (1980)** - Ammonia assimilation. In the *Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise* (ed. Mifflin B.J.) Vol. 5, Academic Press, New York, pp 169- 202.
- Mifflin B.J., Wallsgrove R.M., Lea P.J. (1980)** - Glutamine metabolism in higher plants. *Curr. Top. Cell. Regul.* 20 : 1-43.
- Mora J. (1990)** - Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev.* 54: 293-304.

- Morel M., Buée M., Chalot M., Brun A. (2006)** - NADP-dependent glutamate dehydrogenase: a dispensable function in ectomycorrhizal fungi *New Phytologist* 169: 179–190.
- Oaks A., Hirel B. (1985)** - Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 36 : 345-365.
- Rhee S.G., Chlock P.B.; Stadman E.R. (1976)** – Mechanistic studies of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Biochimie* 58: 35-49.
- Roon R.J., Even H.L., Larimor F. (1974)** - Glutamate synthase : properties of the reduced nicotinamide dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 118 : 89-95.
- Schwartz T., Kusnan M.B., Fock H.P. (1991)** - The involvement of glutamine synthetase /glutamate synthase in ammonia assimilation by the basidiomycete fungus *Stropharia semiglobata*. *J. Gen. Microbiol.* 126 : 289-295.
- Soberon M., Olamendi J., Rodriguez L., Gonzales A. (1989)** - Role of glutamine aminotransferase in glutamine catabolism by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic condition. *J. Gen. Microbiol.* 135 : 2693-2697.
- Vallorani L., Polidori E, Sacconi C, Agostini D, Pierleoni R, Piccoli G, Zeppa S, Stocchi V. (2002).** - Biochemical and molecular characterization of NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *New Phytologist* 154: 779–790.
- Vesina L.P., Margolis H.A., McAfee B.J., Delaney S. (1989)** - Changes in the activity of enzymes involved with primary nitrogen metabolism due to ectomycorrhizal symbiosis on jack pine seedlings. *Physiol. Plant.* 75 : 55-62.
- Wagner F., Gay G., Debaud J.C. (1988)** - Genetic variability of glutamate dehydrogenase activity in monocaryotic and dicaryotic mycelia of the actomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Appl. Micro. Biotech.* 28: 566-571.