

(D 1) El micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o "mole seca" del champiñón

Concepción García Mendoza

Académica Correspondiente

ANTECEDENTES

El cultivo comercial del champiñón constituye un proceso altamente especializado que, aunque incluido dentro de la horticultura, constituye una auténtica técnica microbiana, puesto que consta de un inóculo masivo de micelio vegetativo de *A. bisporus* crecido sobre semillas de gramíneas (de ahí el nombre de "semilla" utilizado por los cultivadores) en condiciones de esterilidad, sobre un sustrato compostado no estéril, aunque parcialmente controlado por pasteurización, que da lugar a lo que se denomina un cultivo axénico.

(D 2) Recipientes o sacos de plástico con el compost se inoculan con las semillas de cereal sobre las que se ha desarrollado previamente el micelio vegetativo de *A. bisporus*, para que colonice masivamente dicho sustrato, controlando adecuadamente las condiciones de humedad (80-90 %), temperatura (20-22°C) y CO₂ (0,10-0,50 %). Cuando después de 15-20 días de incubación dicho compost aparece bien colonizado por el micelio vegetativo, cubierto de un crecimiento blanquecino denominado por los cultivadores "blanco de hongo", se procede a agregar en su superficie la capa de cobertura, a base de tierra caliza y turba, manteniéndose en las mismas condiciones de incubación durante 10-12 días más, momento en que empiezan a aparecer los primordios en la superficie de la capa de cobertura. Es el momento de detener el crecimiento del micelio vegetativo, rebajando la temperatura a 15-18°C, eliminando la proporción de CO₂ y aumentando la de O₂, para que prospere el micelio agregado, lo que dará lugar, después de 12-15 días más de incubación, a la aparición de la primera florada u oleada de carpóforos o setas, que continuará en intervalos semanales, generalmente hasta la cuarta florada, en donde finalizará la producción por envejecimiento del micelio y agotamiento del sustrato. Gracias a esta tecnología e instalaciones hoy día se ha podido llegar a la producción de hasta cinco cosechas anuales.

(D 3) El cultivo del champiñón se inició en Francia de forma fortuita, y desde allí se extendió hacia Oriente y Occidente. Los primeros cultivos se realizaron en los suelos de cuevas, bodegas etc, donde se mantenía una temperatura más constante, y paulatinamente se fueron ideando diferentes instalaciones con control de humedad, temperatura y CO₂, con estanterías y recipientes para aprovechar mejor el espacio y llegar a mejorar los rendimientos, hasta llegar al máximo actual de cinco cosechas por año.

(D 4) El micoparasitismo verticiliosis o "mole seca" de los cultivos comerciales de champiñón es la micosis producida por el hongo Hifomiceto *Verticillium fungicola* sobre el micelio agregado de los carpóforos, cuerpos fructíferos o setas del hongo Basidiomiceto *Agaricus bisporus*. Esta enfermedad puede llegar a destruir una cosecha en dos o tres semanas, lo que representa un grave problema económico dentro del sector al producirse anualmente en el mundo pérdidas millonarias, de varios cientos de millones de € o \$. La micosis que nos ocupa ha tratado de controlarse introduciendo medidas de higiene tanto en las instalaciones como en el personal cultivador, así como mediante la aplicación rutinaria de fungicidas, como hoy día el Procloraz-Mn, pero es difícil encontrar sustancias químicas selectivas que destruyan o inhiban al micopatógeno sin afectar al menos en parte al hospedador, dada la circunstancia de que, en este particular cultivo, ambos organismos pertenecen al reino de los hongos. A lo largo de esta última década se ha podido observar una mayor incidencia de verticiliosis en los cultivos comerciales de champiñón, a pesar del consiguiente uso preventivo del Procloraz-Mn, lo que sugiere el desarrollo de resistencia por parte del micopatógeno frente al fungicida.

El síndrome de la micosis en los cultivos comerciales de champiñón se asocia a tres tipos de síntomas dependiendo de la etapa de desarrollo del carpóforo en que se inicie la infección. Cuando los cultivos se infectan en una etapa temprana de su desarrollo, en la fase de primordio, en lugar de champiñones aparecen unas masas esféricas de tejido micelial donde no existe diferenciación entre pie, sombrerillo y láminillas, denominadas por los cultivadores "bolas o mole seca". Si los cultivos son afectados en una fase más avanzada del desarrollo de los champiñones, cuando ya existe diferenciación entre estípe y píleo, aparecen claras deformaciones al arquearse primeramente el pie, lo que se conoce con el nombre de formas en "pie o labio de liebre", debido a que las hifas afectadas han detenido su crecimiento mientras que las no infectadas continúan su crecimiento apical. Finalmente cuando la infección tiene lugar sobre los carpóforos completamente diferenciados aparecen en su superficie unas "manchas o moteado" de color pardo junto con lesiones necróticas, debido a la penetración del parásito dentro de la masa micelial de los mismos.

(D 5) El control de la micosis se realiza como hemos indicado anteriormente mediante la higiene de las instalaciones y del personal, junto con la aplicación rutinaria de fungicidas como preventivos, en la actualidad el Procloraz-Mn sobre la capa de cobertura, pero el uso continuado del citado fungicida está produciendo la aparición de cepas resistentes de *V. fungicola*.

(D 6) En el momento de iniciar nuestros estudios se había podido constatar que el micopatógeno invadía el micelio agregado de los carpóforos del hospedador *A. bisporus* produciendo la necrosis o lisis de sus hifas. Gracias a los estudios realizados mediante microscopía electrónica de transmisión se ha podido demostrar que el micopatógeno se desarrolla tanto inter- como intracelularmente en las hifas del micelio agregado de dichos carpóforos, y que la fase final evidente del proceso infectivo parece deberse a la secreción de enzimas extracelulares por parte de *V. fungicola* que conduce finalmente a la necrosis de los citados carpóforos.

Pero antes de que aparezcan los síntomas evidentes de la infección que acabamos de mostrar, parecen existir interacciones celulares y moleculares específicas entre el micoparásito y el hospedador, de forma semejante a como ha sido descrito en ciertos

casos de micoparasitismo vegetal, de tal manera que primero se ha postulado una adhesión o contacto más o menos inespecíficos entre ambos organismos, a los que seguiría un reconocimiento y/o unión específicos, si se tratara de organismos compatibles.

En el caso del micelio vegetativo de *A. bisporus* sin embargo no se produce la degradación enzimática evidente, por lo que dicho micelio vegetativo se comporta como no compatible frente a *V. fungicola*, y debido a ello finalmente no desarrolla la enfermedad.

Este diferente comportamiento de ambos micelios, vegetativo y agregado de *A. bisporus*, frente al micoparasitismo de *V. fungicola*, y que las paredes celulares de ambos micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* presenten diferencias químicas estructurales considerables, demuestra el importante papel que desempeñan las envolturas celulares en la micosis que nos ocupa, y al estudio de los tres tipos de paredes celulares implicados en ella vamos a referirnos a continuación.

ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS PAREDES CELULARES DEL MICOPARASITO *Verticillium fungicola* Y DEL HOSPEDADOR *Agaricus bisporus*

La pared celular fúngica es la estructura externa y rígida de la célula, situada a continuación de la membrana plasmática, cuya función principal es mantener la forma de los organismos que la poseen, protegiéndola de los posibles daños mecánicos, químicos y osmóticos. Dicha estructura no se comporta de forma inerte sino que participa en fenómenos activos de superficie, interacciones celulares e inmunidad, mostrando además una significativa actividad enzimática que se manifiesta durante el crecimiento celular al presentar tal pared claras modificaciones tanto en su composición química como en su arquitectura molecular, para lo que intervienen enzimas biosintéticas y degradativas de los polímeros polisacáridicos que la conforman que, correctamente ensamblados, proporcionan a la misma su organización característica.

Los principales componentes de estas paredes celulares son homopolisacáridos, como glucanos α -(1-3), α -(1-4), β -(1-3) y β -(1-3)(1-6), mananos, quitina, quitosano o celulosa, así como heteropolisacáridos como manoglucogalactanos, glucogalactomananos, galactomanoglucanos etc. El esqueleto microfibrilar está constituido generalmente por quitina y en unos pocos casos por celulosa, ambas embebidas en otros polímeros y proteínas, formando la capa matriz más interna, mientras que la(s) capa(s) más externa(s) contiene(n) diferentes tipos de polisacáridos. La mezcla de fibrillas y polímeros matrices que rellenan la malla fibrilar confieren características mecánicas especiales a la pared, que la célula puede controlar y modificar durante su crecimiento y diferenciación.

(D 7) Las paredes celulares de los dos hongos que nos ocupan pertenecen al modelo con quitina, y a ellas nos vamos a referir a continuación. Después de su obtención mediante rotura mecánica y posterior purificación mediante diferentes lavados, el análisis químico global de las tres clases de paredes celulares (micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* y de *V. fungicola*) muestra su composición mayoritaria en carbohidratos neutros y aaminados (61,9-87,5 %), siendo la cantidad de glucosamina, en forma de quitina, particularmente elevada en las paredes del micelio agregado (43,6 %). Por el

contrario la proteína, presente en pequeñas cantidades en ambos micelios de *A. bisporus* (4,8-7,3 %), se eleva significativamente en las paredes de *V. fungicola* (24,5%), y finalmente la cantidad de cenizas alcanza un 4,4 % en las paredes del micelio vegetativo de *A. bisporus* debido a la presencia de cristales de oxalato en este último.

(D 8, D 9) Mediante solubilización química gradual de los polisacáridos de las tres clases de paredes celulares (H_2O a $60^\circ C$, KOH N a temperatura ambiente y a $60^\circ C$ durante distintos tiempos) se obtiene un diferente número de fracciones sacarídicas para cada hongo, cinco para *V. fungicola*, F1a, F1b, F2Sa, F2Sb y F3 (después de la purificación mediante filtración molecular de las fracciones solubles F1 y F2S), y seis para *A. bisporus*, FI, FII, FIII, FIV, FV y FVI (en este caso sin posibilidad de purificación por tratarse de fracciones polidispersas).

(D 10) Comparando los pesos secos obtenidos de cada una de las fracciones solubilizadas se observa que las paredes del micelio vegetativo de *A. bisporus* presentan mayor porcentaje de las dos fracciones más solubles o externas I y II junto con la VI o residuo, mientras que en el micelio agregado el porcentaje de peso seco de las fracciones más solubles o externas desciende, aumentando sin embargo el de las fracciones más insolubles o internas, IV, V y VI, mostrando todas ellas una alta proporción de azúcares neutros totales (61,9-86,8 %), excepto en las FVI o residuos que su menor proporción se compensa con una mayor proporción de glucosamina en forma de quitina. En cuanto a las paredes celulares del micelio de *V. fungicola*, después de su correspondiente fraccionamiento químico nos encontramos con tres fracciones mayoritariamente sacarídicas, F1, F2S y F3 o residuo (48,3 67,0 % de azúcares neutros), y una fracción F2I que se descarta por su insolubilidad y carácter lipídico. A su vez las dos primeras fracciones solubles, F1 y F2S, se someten a filtración molecular, como ya describimos anteriormente, obteniéndose dos fracciones de cada una, F1a y F1b, y F2Sa y F2Sb respectivamente.

(D 11) El análisis mediante cromatografía gas-líquido (CGL) de las fracciones aisladas muestra que las paredes celulares de *A. bisporus* contienen mayoritariamente fracciones de glucanos, más heteropolisacáridicos en el caso del micelio vegetativo (con mayores proporciones de xilosa, manosa y galactosa) que en el agregado (con menor proporción de estos azúcares). Por su parte las paredes celulares de *V. fungicola* muestran como componentes polisacáridicos, glucanos y glucogalactomananos separados cromatográficamente a partir de las Fracciones F1 y F2S, así como también glucanos asociados con quitina en la Fracción 3 o residuo.

(D 12) El análisis de metilación de las fracciones aisladas mediante CGL y espectrometría de masas (EM) da como resultado la complejidad estructural de las mismas. A grandes rasgos, en el micelio vegetativo de *A. bisporus* las fracciones están compuestas mayoritariamente por glucanos lineales, más heteropolisacáridicos que en el micelio agregado, como acabamos de exponer, y con bajo porcentaje de ramificaciones (8-15 %). La fracción FI o mucílago corresponde esencialmente a un (1-4) glucano. La fracción FII está constituida mayoritariamente por un (1-3) glucano al que se asocia una pequeña proporción de (1-3) manano. La fracción FIII responde principalmente a un (1-4) glucano asociado igualmente a un también posible (1-4) xilano. La Fracción FIV está formada mayoritariamente por la mezcla de los glucanos en (1-3) y (1-4), y finalmente las fracciones FV y FVI muestran mayoritariamente la presencia de (1-4) glucano.

(D 13) En el micelio agregado de *A. bisporus* encontramos prácticamente los mismos glucanos que en el micelio vegetativo en las fracciones FI y FII, es decir un (1-4) glucano en la FI y un (1-3) glucano asociado ahora con xilomanano en la fracción FII, mientras que en las sucesivas fracciones se van encontrando nuevas estructuras, y así las fracciones FIII y FIV consisten mayoritariamente en la mezcla de (1-3) y (1-6) glucanos, y las fracciones FV y FVI son principalmente (1-6) glucanos.

Conviene resaltar este mayor porcentaje de enlaces de (1-6) glucosa en las paredes de micelio agregado con una significativa representación de ramificaciones en (1-3,6), estructura a las que se ha atribuido la movilización y posterior reorganización de los polisacáridos para la consiguiente diferenciación celular.

(D 14) Las paredes celulares de *V. fungicola*, por su parte, muestran glucanos mayoritariamente lineales y glucogalactomananos altamente ramificados. Los glucanos de la fracción F1a presentan principalmente el enlace (1-4), mientras que los correspondientes a la fracción F2Sa contienen los enlaces (1-3) y (1-4), e igualmente en la fracción F3, pero en este caso invertidas las proporciones de los mismos. Las fracciones F1b y F2Sb están constituidas por glucogalactomananos formados por un esqueleto de (1-6) manosa altamente ramificado en posición -C4, con galactopiranosas principalmente como residuos terminales.

(D 15) Para facilitar la ubicación de los polisacáridos descritos hemos diseñado unos esquemas de las tres clases de paredes celulares, deducidos de los estudios de estructura química que acabamos de describir, junto con la microscopía electrónica de cortes ultrafinos y sombreados, y de la degradación enzimática secuencial, así como de la espectrometría de infrarrojo de cada fracción para determinar la correspondiente configuración α o β .

La presencia de proteína en las paredes celulares fúngicas es un hecho demostrado. En las tres clases de paredes objeto de estudio una cantidad significativa de proteína es solubilizada junto con los polisacáridos a lo largo del fraccionamiento a que acabamos de hacer referencia, pero sin embargo la proteína hidrofóbica, descrita en ambos tipos de paredes de *A. bisporus* requiere un tratamiento de solubilización especial, por lo que los perfiles electroforéticos obtenidos en cada caso dependen de las condiciones de solubilización utilizadas.

(D 16) Gracias a la microscopía electrónica de transmisión con la técnica de sombreado se han podido visualizar en la superficie de las paredes celulares de *V. fungicola* unas estructuras semejantes a unos manojos de varillas, que permanecen después del tratamiento con agua caliente, pero que se solubilizan mediante KOH M en caliente, y que sugieren la presencia de la proteína hidrofóbica, pero que sin embargo, aunque no se aprecian en la superficie de las paredes de los dos micelios de *A. bisporus*, su presencia está descrita en ambos, debido a la superposición del polisacárido mucílago en ambas paredes, lo que les confiere una superficie granulosa.

RECONOCIMIENTO Y UNION DEL GLUCOGALACTOMANANO DE LAS PAREDES CELULARES DE *Verticillium. fungicola* CON LA LECTINA DEL MICELIO AGREGADO DE *Agaricus bisporus*

(D 17) La importancia de la estructura química de las paredes celulares de los organismos involucrados en un fenómeno de micoparasitismo es una consecuencia del hecho de que dicho parasitismo es un proceso complejo en el que tienen lugar sucesivas etapas en las que se encuentran claramente implicadas dichas paredes celulares. Tratando de demostrar la hipótesis formulada previamente para otros casos de micoparasitismo vegetal acerca de interacciones más o menos específicas entre moléculas complementarias presentes en las paredes celulares de ambos organismos, micopatógeno y hospedador, se realizaron experimentos de aglutinación e inmunofluorescencia.

(D 18) Los experimentos de aglutinación de esporas germinadas de *V. fungicola* en presencia de extractos proteicos de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus* indicaron la presencia de cierta(s) proteína(s) en las paredes de este último organismo con una alta actividad aglutinante hacia el organismo micopatógeno. La electroforesis disociante sobre geles de poli(acrilamida) de dicho extracto proteico muestra la presencia de varias bandas de proteína de masa molecular superior a 15 ± 3 k Da.

(D 19) Paralelamente estudios precedentes de inmunofluorescencia microscópica habían mostrado que el micelio de *V. fungicola* presentaba fuerte fluorescencia después de su reacción con anticuerpos policlonales preparados contra el polisacárido glucogalactomanano, habiendo acoplado a la reacción un anticuerpo de cabra rodaminado anti-IgG de conejo para poder visualizarla, demostrando de esta forma la ubicación del glucogalactomanano en la superficie de las paredes celulares de *V. fungicola*.

(D 20) Como consecuencia de este hallazgo la incubación del glucogalactomanano de *V. fungicola* aislado y purificado, junto con las hifas de micelio vegetativo o agregado de *A. bisporus*, efectuando a continuación la inmunofluorescencia indirecta microscópica, sirvió para clarificar el proceso. Los resultados de estos experimentos mostraron que mientras las hifas del micelio agregado de *A. bisporus* en presencia del glucogalactomanano de tres diferentes cepas de *V. fungicola* y efectuada la reacción inmunológica mostraban fluorescencia positiva, las correspondientes del micelio vegetativo permanecían sin desarrollar fluorescencia, como también ocurría con los controles, conteniendo suero preinmune o sin glucogalactomanano, lo que sugería un reconocimiento y/o unión específicos entre el carbohidrato glucogalactomanano de las paredes celulares de *V. fungicola* y una proteína presente en las hifas del micelio agregado de *A. bisporus*, posiblemente una interacción del tipo carbohidrato-lectina, proteína esta última, sin embargo, que estaría ausente en el micelio vegetativo del hospedador donde no se produce el citado reconocimiento y unión.

(D 21) A la vista de los resultados precedentes, la primera hipótesis de trabajo que nos planteamos fue tratar de demostrar la existencia de una primera etapa de adhesión o contacto inespecífico, gracias a interacciones hidrofóbicas, ya que este extremo había sido sugerido previamente entre el micoparásito *Mycogone perniciosa* y *A. bisporus* como hospedador. También la presencia de dos distintas proteínas hidrofobinas había sido demostrada en las paredes de ambos micelios de *A. bisporus*, quedando enmascaradas por la capa más externa de mucílago. Finalmente el hecho de que las paredes celulares de *V. fungicola* hubieran mostrado unas ultraestructuras semejantes a la hidrofobina en su superficie, apoyaba la hipótesis de un posible contacto inespecífico

entre ambos organismos debido a dichas interacciones hidrofóbicas, siempre que se demostrara la presencia de otra hidrofobina en las paredes celulares de *V. fungicola*. Por lo tanto en la micosis que nos ocupa, el primer paso de contacto o adhesión inespecífica tendría lugar entre la superficie hidrofílica del mucilago de ambos micelios, vegetativo y agregado, de *A. bisporus* asociado a sus correspondientes hidrofobinas, con la superficie hidrofóbica de *V. fungicola*, mientras que el paso siguiente podría deberse a un reconocimiento y/o unión específicos entre las superficies celulares de ambos organismos involucrando interacciones entre moléculas complementarias.

(D 22) Tratando de corroborar la existencia de este primer paso de contacto inespecífico mediante interacciones hidrofóbicas entre ambos organismos y ya demostrada previamente la existencia de dos diferentes hidrofobinas en ambas clases de paredes de *A. bisporus*, se intentó comprobar la presencia de una hidrofobina en el micelio de *V. fungicola*, así como también en los caldos de cultivo del mismo organismo, habiéndose podido aislar, purificar y caracterizar a partir de ambos materiales mediante diferentes técnicas cromatográficas en cada caso.

La electroforesis de la proteína purificada mostró en condiciones disociantes la presencia de una única banda de unos 7 ± 3 kDa. Para determinar el peso molecular más exacto de la proteína se utilizó la técnica de MALDI-TOF, obteniéndose un valor de 7563,9 Da, y dada la forma de un pico muy fino obtenido por la citada técnica de MALDI-TOF se pudo presuponer que se trataba de una proteína no glicosilada, puesto que además había dado negativa su tinción con el reactivo de Schiff. Para la comprobación de este último extremo la muestra se sometió a la acción de la endo- β -N-acetil-glucosaminidasa para su deglicosilación, seguida de electroforesis en condiciones disociantes, demostrándose, al no existir ningún cambio en su movilidad electroforética, que no se trata de una glicoproteína.

(D 23) El análisis de aminoácidos mostró la presencia de alrededor de un 50% de residuos hidrofóbicos, un 21,8% de aminoácidos de bajo peso molecular (Alanina y Glicina), un 20,1% de aminoácidos ácidos (Aspártico y Glutámico), un 5,5% de aminoácidos básicos (Arginina y Lisina), un 4,6% de residuos aromáticos con un solo residuo de Tirosina. Los aminoácidos Histidina y Metionina no se identificaron, detectando al menos seis Cisteinas identificadas como Cistinas. Del estudio de los espectros de absorción y fluorescencia de la hidrofobina se pudo comprobar la presencia de un residuo de Tirosina, dos de Fenilalanina y seis de Cisteína junto con la ausencia de Triptófano. Todas las características estructurales descritas junto con las propiedades de solubilidad y la facultad de formar agregados en agua debido a su hidrofobicidad indican que se trata de un nuevo miembro de la Clase II de las hidrofobinas, habiéndose podido visualizar la ultraestructura característica de la misma al ser observada dicha hidrofobina purificada en el microscopio electrónico, formando igualmente los manojos de varillas anteriormente descritos en la superficie de la pared celular de *V. fungicola*.

(D 24) Demostrada la presencia de la proteína hidrofobina en las paredes celulares de *V. fungicola* junto con las hidrofobinas del micelio vegetativo y agregado de *A. bisporus* previamente descritas y asociadas al mucilago, queda corroborada la existencia del primer paso de adhesión inespecífica entre ambos organismos.

(D 25) Los siguientes estudios se enfocaron hacia el aislamiento, purificación y caracterización de una proteína lectina de *A. bisporus* que demostrara nuestros resultados de aglutinación e inmunofluorescencia indirecta previamente descritos, para

lo cual se investigó la presencia de una lectina en ambos micelios de *A. bisporus*. Estos estudios dieron como resultado el aislamiento y purificación de una proteína con actividad hemaglutinante, característica de las lectinas, a partir de los carpóforos de *A. bisporus*, proteína que conforme se avanza en su purificación, precipitando primeramente con $\text{SO}_4(\text{NH})_4$ y continuando con cromatografía sobre columnas de intercambio aniónico y catiónico, va aumentando su actividad hemaglutinante. La electroforesis en condiciones disociantes mostró una banda de peso molecular de 16 ± 3 kDa, positiva frente al reactivo de Schiff, que en condiciones nativas alcanza un valor en torno a 60 ± 4 kDa después de su filtración molecular sobre Sephadex G-100. El pico obtenido mediante la técnica de MALDI-TOF equivale a 16014,6 Da, y al mostrar una forma más ensanchada en su base, y habiendo dado positiva su tinción con el reactivo de Schiff nos sugirió la presencia de carbohidratos. La correspondiente evaluación dio como resultado un porcentaje de 5,6% de azúcares, lo que nos indica que se trata de una glicoproteína tetramérica, constituida por cuatro monómeros de un peso molecular de 16 kDa cada uno.

(D 26) El correspondiente análisis de aminoácidos muestra una proporción relativamente alta de residuos ácidos e hidroxílicos, caracteres semejantes a otras lectinas fúngicas descritas, dentro de su individualidad más o menos variable.

(D 27) La especificidad de la unión de la lectina purificada al interactuar con determinados receptores polisacáridicos de eritrocitos se estudió mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación. Diferentes monosacáridos y la N-acetil-glucosamina no inhiben la hemaglutinación, la fructosa y la galactosa presentan trazas de aglutinación a concentraciones muy elevadas e inespecíficas, y la N-acetil-galactosamina muestra inhibición a partir de 50 mmol/L. Sin embargo el glucogalactomanano de *V. fungicola* tiene efecto inhibitorio en muy bajas concentraciones, a partir de 6,25 mmol/L, lo que nos indica que dicha lectina muestra una fuerte afinidad por este polisacárido.

(D 28) La especificidad de la unión de la lectina de *A. bisporus* con su correspondiente ligando sacarídico, demostrada por otros investigadores mediante estudios conformacionales, había puesto de manifiesto que dicho ligando era β -Galp1-enlazada tanto en -C3 como en -C4 con otro monosacárido neutro o aminado, puesto que en ambos enlaces la posición axial del hidroxilo es la misma. El glucogalactomanano de *V. fungicola* al presentar en su unidad repetitiva como terminales de su molécula la galactosa así estructurada, se une específicamente con la lectina de *A. bisporus* y por tanto ambas moléculas complementarias son las responsables del reconocimiento y unión entre el micopatógeno y el hospedador.

(D 29) Sometido el micelio vegetativo de *A. bisporus* a los mismos estudios para comprobar la presencia de dicha lectina, se pudo demostrar su ausencia en dicho micelio, con lo que al encontrarse únicamente en el micelio agregado del hospedador, se trata de una proteína que solo se expresa en esta fase morfológica del ciclo vital de *A. bisporus*, corroborándose los resultados de aglutinación e inmunofluorescencia obtenidos previamente, y confirmando la existencia del segundo paso de reconocimiento y unión específicos del proceso, que se había supuesto al principio, aclarándose al mismo tiempo las razones por las cuales el micelio vegetativo de *A. bisporus* no desarrolla la micosis.

DEGRADACION SELECTIVA *in vivo* DE LAS PAREDES CELULARES DEL MICELIO AGREGADO DE *Agaricus bisporus* POR LAS ENZIMAS LITICAS DE *Verticillium fungicola*

Después de los dos pasos previos de adhesión inespecífica y reconocimiento y unión específicos demostrados en el micoparasitismo que nos ocupa, el micopatógeno *V. fungicola* penetra en las hifas de los carpóforos de su hospedador *A. bisporus* para poder establecer la infección. En otros casos de micoparasitismo vegetal descritos la penetración tiene lugar a través de orificios naturales, heridas, o mediante la formación de estructuras especializadas junto con fuerzas mecánicas seguidas de la degradación enzimática, o la combinación de varias de estas posibilidades, dando lugar a la invasión del hospedador por el patógeno.

(D 6, D 30) En nuestro caso concreto, gracias a la microscopía electrónica de transmisión (que ya mostramos anteriormente) y de barrido hemos podido observar claramente este fenómeno de invasión intercelular, junto con la intracelular, produciéndose la lisis de la pared celular del micelio agregado de *A. bisporus* probablemente debido a las enzimas secretadas por *V. fungicola*.

(D 31) Sin embargo cuando se trata de la interacción *in vivo* de *V. fungicola* con el micelio vegetativo de *A. bisporus*, estudiada exhaustivamente mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión, se demuestra que tal interacción no prospera más adelante después de que se produzca la adhesión inespecífica entre ambos organismos, debida a la interacciones hidrofóbicas antes descritas.

(D 32) Como acabamos de mostrar, los estudios realizados mediante microscopía electrónica de transmisión sobre el parasitismo de *V. fungicola* sobre los carpóforos de *A. bisporus* habían sugerido una digestión enzimática localizada que finalmente conducía a la necrosis de tales cuerpos fructíferos, combinada posiblemente con cierta presión mecánica por parte del micopatógeno, pero fueron los estudios realizados en nuestro laboratorio los que demostraron que las enzimas secretadas *in vivo* por *V. fungicola* crecido sobre un medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de carbono podrían servir como indicadores de las enzimas que el patógeno produce durante su parasitismo, identificando en tales caldos metabólicos, gracias a la utilización de sustratos específicos, la producción de endopolisacaridasas como α -(1-3)-, α -(1-4)-, β -(1-3)-, β -(1-6)-, β -(1-4)-glucanasas, β -(1-4)-xilanasas y quitinasas, disacaridasas como quitobiosidasas, exopolisacaridasas como α -D- y β -D-glucosidasas, β -D-xilosidasas, β -D-manosidasas y N-acetil- β -D-glucosaminidasas, junto con proteasas, en diferentes concentraciones según el suplemento carbonado utilizado (se utilizaron azúcares como glucosa o fructosa, produciendo esta última actividades enzimáticas superiores a la glucosa, y paredes de micelio vegetativo o paredes de micelio agregado según los casos). Algunas de estas enzimas, que son claves en la lisis de las paredes celulares de los hongos superiores, son también producidas por otros microorganismos descritos como parásitos fúngicos.

(D 33) La digestión gradual *in vitro* de las paredes celulares aisladas del micelio agregado de *A. bisporus* con las enzimas producidas por *V. fungicola* en presencia de estas mismas paredes celulares, estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión, ha mostrado que la degradación no ocurre simultáneamente y con la misma

intensidad en la capa externa que en la interna de dichas paredes celulares, aunque al final del proceso aparezcan zonas de la pared completamente lisadas, lo que permite que el micopatógeno *in vivo* se pueda localizar tanto inter- como intracelularmente en las hifas de los carpóforos.

(D 34) Experimentos semejantes realizados con las paredes celulares aisladas del micelio vegetativo de *A. bisporus* y las enzimas producidas por *V. fungicola* con estas mismas paredes como fuente carbonada, han puesto de manifiesto que, también *in vitro* se consigue una clara degradación enzimática de tales paredes celulares aisladas, pero *in vivo*, como hemos podido demostrar anteriormente, solo se produce la adhesión inespecífica entre el micoparásito y el hospedador, y no se llegan a secretar las enzimas con la consiguiente degradación enzimática, por no tener lugar el reconocimiento y unión específicos, y por tanto este micelio no puede desarrollar la micosis.

Estos resultados son una confirmación más de nuestros anteriores estudios sobre la ausencia de la proteína lectina en el micelio vegetativo de *A. bisporus*, y nos corroboran la necesidad de la existencia de los dos pasos estudiados, para que la digestión enzimática *in vivo* pueda producirse y se manifieste la fase visible de la infección.

CONCLUSIONES FINALES

(D 35).-Las paredes celulares de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* presentan diferencias químicas estructurales características que inciden directamente en el distinto comportamiento que muestran los correspondientes micelios frente a la infección por *V. fungicola*. A su vez la también especial estructura química de las paredes celulares de *V. fungicola* incide igualmente en el desarrollo de la verticiliosis sobre los carpóforos del champiñón.

.-Mediante inmunofluorescencia indirecta se ha comprobado que el polisacárido glucogalactomanano de las paredes celulares de *V. fungicola* se une a la superficie de las hifas del micelio agregado de *A. bisporus*, pero no a la del correspondiente micelio vegetativo.

.-Se ha aislado, purificado y caracterizado la proteína hidrofobina de las paredes celulares de *V. fungicola* que, junto con las hidrofobinas de las paredes celulares de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus*, intervienen en la adhesión inespecífica entre ambos organismos.

(D 36) -Igualmente se ha aislado, purificado y caracterizado una proteína lectina del micelio agregado de *A. bisporus* que constituye el ligando específico del polisacárido glucogalactomanano de *V. fungicola*, con lo que se demuestra la existencia de la etapa siguiente de reconocimiento y unión.

.-Se ha podido demostrar que el micelio vegetativo de *A. bisporus* presenta únicamente la etapa de adhesión o contacto inespecífico con *V. fungicola*, ya que al no expresar dicho micelio la lectina, no tiene lugar el reconocimiento y unión posteriores con el glucogalactomanano, y por tanto no llega a desarrollar la micosis.

.-Una vez que tiene lugar la unión específica de los ligandos complementarios, glucogalactomanano y lectina, se debe producir una señalización molecular que da lugar a la secreción de las enzimas hidrolíticas por parte de *V. fungicola*, y la degradación,

selectiva de las paredes celulares de los carpóforos de *A. bisporus*, lo que constituye la fase evidente de la infección.

.-Desentrañados, a nivel bioquímico, los mecanismos celulares y moleculares sucesivos entre el micopatógeno y el hospedador para que se manifieste la verticiliosis, se hace necesaria su aproximación experimental genética. La transformación genética de *A. bisporus* en su glicoproteína lectina con la construcción de cepas “no adherentes” a *V. fungicola* supondría una vía alternativa de erradicación de la micosis sin el uso rutinario de fungicidas, contribuyendo de este modo a la mejora de la nutrición y la salud humanas.