

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA
VERTICILIOSIS (PRODUCIDA POR VERTICILLIUM
FUNGICOLA) DE LOS CULTIVOS INDUSTRIALES DE
CHAMPIÑÓN (AGARICUS BISPORUS) Y EFECTO DEL
FUNGICIDA PROCLORAZ-MN**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

María Dolores Bernardo López

Bajo la dirección de la Doctora:

Concepción García Mendoza

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1859-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA VERTICILIOSIS
(producida por *Verticillium fungicola*) DE LOS CULTIVOS
INDUSTRIALES DE CHAMPIÑÓN (*Agaricus bisporus*) Y
EFFECTO DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn

TESIS DOCTORAL

M^a Dolores Bernardo López
Madrid, 2003



Tesis presentada por M^a Dolores Bernardo López, Licenciada en Ciencias Biológicas, realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, para optar al grado de doctor.

V^oB^o del Director

V^oB^o del Tutor

Fdo: Concepción García Mendoza

Fdo: Susana Serrano Barrero

La Doctoranda

Fdo: M^a Dolores Bernardo López

A mi familia

Quisiera expresar mi gratitud a todas las personas, que, de alguna forma u otra, me han ayudado en la realización de esta tesis.

De manera especial quiero agradecer a Dra. Concepción García Mendoza directora de esta tesis, la formación científica recibida, así como su gran dedicación e infinita paciencia durante la realización de este trabajo. Asimismo le agradezco el apoyo prestado en los momentos difíciles por los que he atravesado.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Monique Novaes-Ledieu por sus constantes consejos y enseñanzas en el campo de la investigación, así como por querer compartir sus experiencias conmigo. Gracias también por las largas conversaciones mantenidas a lo largo de todos estos años.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a la Dra. Amelia Pérez por la ayuda desinteresada que me ha prestado siempre, así como de hacerme hecho participar de sus grandes dotes didácticos, y por compartir las alegrías y tristezas del día a día. También quiero agradecer a Eloy Blanco su gran amabilidad y su valiosa ayuda en el campo de la Microscopía electrónica, y a Rosa Martínez Dalmau por su colaboración muy efectiva.

Quiero dar las gracias al Departamento de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Biológicas por su gentileza, y particularmente a la Dra. Josefina Rodríguez Lecea por su amabilidad a la hora de ayudarme a resolver todos los trámites necesarios para la realización de esta tesis.

Mi agradecimiento sincero al Dr. J. Antonio Leal y a la Dra. Alicia Prieto por su apoyo moral y su comprensión a lo largo de todos estos años, así como por su amistad ofrecida durante todo este tiempo. Gracias Oussama por estar siempre dispuesto a echarme una mano, y por animarme en los momentos difíciles, pero sobre todo por tú amistad incondicional.

A las Dras. Isabel Barasoin y M^a Jesús Martínez por sus asesoramientos tanto en los ensayos inmunológicos como en las técnicas de cromatografía.

A los investigadores del Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES) José Pardo y Francisco José Gea y por su colaboración y amabilidad al aportar los dos organismos objeto de este estudio.

Gracias a todas las personas que trabajan en los Servicios del CIB, Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (Alicia), Química de Proteínas (Javier), Fotografía (Monika, Israel y Vicky), y Servicio Técnico (Aurelio, Mikel ...), por haberme facilitado en todo momento su ayuda, y por ser siempre tan amables conmigo. En especial a Mónica por su disponibilidad sobradamente demostrada, así como por escucharme y transmitirme parte de su energía.

Por supuesto a Ramón Toro le agradezco toda la ayuda prestada, con el ordenador, con los aparatos..., pero especialmente, por escucharme y compartir mis problemas del día a día, así como por los momentos, alegres y a veces tristes, que hemos pasado juntos, por todo ello, gracias amigo.

También quiero mostrar mi gratitud a todos mis "vecinos" (Vicky, Fernando, David, Bea, Gemilla, Javier...) con los que he tenido la suerte de compartir pasillo, gracias por vuestra ayuda desinteresada y por todos los ratos que hemos disfrutado juntos, pero principalmente por vuestra amistad.

Tampoco me gustaría olvidarme de todas aquellas personas con las que he coincidido en el CIB, que aunque no han participado directamente en este trabajo conmigo, siempre me han tratado con mucha amabilidad.

A todos mis amigos, con los que he compartido y espero seguir haciéndolo, mis alegrías y preocupaciones de la vida. Gracias por haber sido capaces de soportarme durante todo el tiempo que ha durado dicho trabajo.

Gracias a mi hermano y a mi cuñada por su cariño y apoyo en todo momento, y por supuesto a la alegría de la familia, mi sobrino Enrique, al que quiero muchísimo.

Por último, quiero agradecer y dedicar este trabajo a mis padres, por la comprensión y el apoyo que me han ofrecido siempre, por su confianza en mí, por su esfuerzo, por estar ahí cuando les necesito..., pero sobre todo muchísimas gracias por vuestro amor incondicional.

A todos vosotros, de todo corazón, muchas gracias.

Creo que no me he olvidado de nadie, si es así, espero que me perdonen.

ABREVIATURAS

BSA: seroalbúmina bovina

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

CGL: cromatografía de gas líquido

CGL-EM: cromatografía de gas líquido y espectrometría de masas

CIES: Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón

DMSO: dimetilsulfóxido

DL: Dosis Letal

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

F: fungicida

Fp: fracción proteica

Ka: constante de ionización

MALFI-TOF: ionización/deserción por láser asistida por matriz-espectroscopía de masas de tiempo de vuelo.

NaBD₄: borohidruro sódico deuterado

PAS: ácido periódico-Schiff

PBS: tampón fosfato salino

PDAB: N-N-dimetil-p-aminobenzaldehido

PMAAs: acetatos de alditol parcialmente metilados

OsO₄: tetróxido de osmio

TCA: ácido tricloroacético

TFA: ácido trifluoroacético

SDS: dodecil sulfato sódico

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	11

INTRODUCCIÓN	13
EL CHAMPIÑÓN (<i>Agaricus bisporus</i>) Y SU PRODUCCIÓN COMERCIAL.....	15
EL MICOPARASITISMO Y LA VERTICILIOSIS O “MOLE SECA” DEL CHAMPIÑÓN	23
IMPLICACIÓN DE LAS PAREDES CELULARES DEL HOSPEDADOR (<i>A. bisporus</i>) Y DEL PARÁSITO (<i>V. fungicola</i>) EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA MICOSIS.....	27
EMPLEO RUTINARIO DE FUNGICIDAS EN EL CULTIVO INDUSTRIAL DE CHAMPIÑÓN	30

OBJETIVOS	35
------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. ESTUDIO DEL MODO DE ACCIÓN DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn SOBRE LAS PAREDES CELULARES DE <i>V. fungicola</i> Y <i>A. bisporus</i>	39
1.1. MEDIOS DE CULTIVO	41
1.2. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	42
1.3. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL ₅₀ DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn EN AMBOS ORGANISMOS.....	42
1.4. CONDICIONES DE CULTIVO	43
1.5. OBTENCIÓN DE LAS PAREDES CELULARES.....	44
1.5.1. Rotura celular	44
1.5.2. Purificación de las paredes celulares	44
1.6. ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS PAREDES CELULARES SIN Y CON PRETRATAMIENTO DE FUNGICIDA	44
1.6.1. Valoración de azúcares neutros totales	44
1.6.2. Valoración de proteínas.....	45
1.6.2.1. Método de Lowry.....	45

1.6.2.2. Método de Bradford	46
1.6.3. Valoración de aminoazúcares totales	46
1.6.4. Valoración de lípidos totales.....	47
1.6.5. Calcinación para la obtención de cenizas.....	47
1.7. FRACCIONAMIENTO DE LAS PAREDES CELULARES.....	47
1.7.1. Fraccionamiento de las paredes celulares de <i>V. fungicola</i> obtenidas en ausencia y presencia del procloraz-Mn.....	47
1.7.1.1. Extracción de los polisacáridos solubles en agua.....	48
1.7.1.2. Extracción de los polisacáridos solubles en KOH	48
1.7.2. Fraccionamiento de las paredes celulares de <i>A. bisporus</i> obtenidas sin y con procloraz-Mn	49
1.7.2.1. Extracción de los polisacáridos solubles en agua.....	50
1.7.2.2. Extracción de los polisacáridos solubles en KOH	50
1.8. PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	51
1.9. ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS DE <i>V. fungicola</i> Y <i>A. bisporus</i>.....	52
1.10. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS DISTINTAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS DE <i>V. fungicola</i> Y <i>A. bisporus</i>.....	53
1.10.1. Análisis de metilación.....	53
1.10.2. Espectrofotometría de infrarrojo	55
1.11. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE <i>V. fungicola</i> Y <i>A. bisporus</i>.....	55
1.12. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN: TÉCNICA DE SOMBREADO	57
1.13. EFECTO DE DIFERENTES CEPAS DE <i>V. fungicola</i> SIN O CON PRETRATAMIENTO DEL PROCLORAZ-Mn SOBRE CULTIVOS COMERCIALES DE <i>A. bisporus</i>.....	57
2. BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA VERTICILIOSIS DE LOS CULTIVOS INDUSTRIALES DE CHAMPIÑÓN (<i>A. bisporus</i>).....	59
2.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN <i>V. fungicola</i>-<i>A. bisporus</i> MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....	61
2.1.1. Microscopía óptica	61
2.1.2. Microscopía electrónica de transmisión	61
2.1.3. Microscopía electrónica de barrido	62
2.2. ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN.....	63

2.3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	63
2.4. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE <i>V. fungicola</i> IMPLICADA EN EL CONTACTO CON <i>A. bisporus</i>.....	64
2.4.1. Purificación de la proteína del medio de cultivo	65
2.4.1.1. Cromatografía de exclusión molecular	65
2.4.1.2. Cromatografía de adsorción sobre hidroxiapatito.....	66
2.4.2. Purificación de la proteína del micelio de <i>V. fungicola</i>	66
2.4.2.1. Cromatografía hidrofóbica	66
2.5. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE <i>A. bisporus</i> IMPLICADA EN EL MECANISMO DE RECONOCIMIENTO	67
2.5.1. Cromatografía de intercambio iónico	67
2.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS	68
2.6.1. Cromatografía de filtración molecular	68
2.6.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	68
2.6.2.1. Electroforesis en condiciones no disociantes	68
2.6.2.2. Electroforesis en condiciones disociantes	68
2.6.3. Tinciones específicas de proteínas en geles de poliacrilamida.....	68
2.6.3.1. Tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250.....	68
2.6.3.2. Tinción de plata	69
2.6.3.3. Tinción con ácido periódico-Schiff (PAS)	69
2.6.4. Ionización/desorción por láser asistida por matriz-espectrometría de masas de tiempo de vuelo: MALDI-TOF	69
2.6.5. Deglicosilación de la proteína.....	70
2.6.6. Análisis de aminoácidos y secuencia N-terminal.....	70
2.6.7. Espectros de absorción y de fluorescencia	71
2.6.8. Microscopía electrónica de transmisión de la proteína purificada mediante la técnica de sombreado	71
2.6.9. Ensayos de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación.....	71
3. APARATOS Y MATERIALES EMPLEADOS.....	73
RESULTADOS	77

1. ESTUDIO DEL MODO DE ACCIÓN DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn SOBRE LAS PAREDES CELULARES DE <i>V. fungicola</i> Y <i>A. bisporus</i>.	79
1.1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS.....	81
1.2. EVALUACIÓN DE LA DOSIS LETAL ₅₀ DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn EN AMBOS ORGANISMOS	81
1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA GLOBAL DE LAS PAREDES CELULARES DE <i>V. fungicola</i> Y <i>A. bisporus</i>	91
1.4. FRACCIONAMIENTO DE LAS PAREDES CELULARES	93
1.4.1. Fraccionamiento de las paredes celulares de <i>V. fungicola</i> sin tratar y tratadas con procloraz-Mn	93
1.4.2. Fraccionamiento de las paredes celulares de <i>A. bisporus</i> obtenidas en ausencia y presencia del procloraz-Mn.....	95
1.5. PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES AISLADAS DE LAS PAREDES CELULARES	97
1.6. ANÁLISIS QUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE <i>V. fungicola</i> SIN Y CON PROCLORAZ-Mn.....	98
1.6.1. Análisis químico.....	98
1.6.2. Análisis estructural.....	101
1.7. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE <i>V. fungicola</i>	105
1.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE SOMBREADO	106
1.9. ANÁLISIS QUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE <i>A. bisporus</i> SIN Y CON TRATAMIENTO DE PROCLORAZ-Mn.....	109
1.9.1. Análisis químico.....	109
1.9.2. Análisis estructural.....	111
1.10. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE <i>A. bisporus</i>	116
1.11. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE SOMBREADO	117
1.12. EFECTO DE DIFERENTES CEPAS DE <i>V. fungicola</i> SIN O CON PRETRATAMIENTO DEL PROCLORAZ-Mn SOBRE CULTIVOS COMERCIALES DE <i>A. bisporus</i>	117
2. BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA VERTICILIOSIS DE LOS CULTIVOS INDUSTRIALES DE CHAMPIÑÓN (<i>A. bisporus</i>)	123

2.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE <i>V. fungicola</i> Y <i>A. bisporus</i> MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	125
2.2. ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN	131
2.3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	135
<hr/>	
2.4. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE <i>V. fungicola</i> IMPLICADA EN EL CONTACTO CON <i>A. bisporus</i>	135
2.4.1. Purificación de la proteína del medio de cultivo	135
2.4.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	141
2.4.1.2. Técnica de MALDI-TOF.....	141
2.4.1.3. Deglicosilación de la proteína.....	142
2.4.1.4. Análisis de aminoácidos y secuencia N-terminal	142
2.4.1.5. Espectros de absorción y de fluorescencia	144
2.4.1.6. Microscopia electrónica de transmisión según la técnica de sombreado.....	144
2.4.2. Purificación de la proteína del micelio de <i>V. fungicola</i>	147
2.5. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE <i>A. bisporus</i> IMPLICADA EN EL MECANISMO DE RECONOCIMIENTO	148
2.5.1. Determinación del peso molecular de la proteína purificada	150
2.5.2. Determinación de la proporción de carbohidratos de la proteína purificada.....	151
2.5.3. Análisis de aminoácidos y secuencia N-terminal	151
2.5.4. Ensayos de inhibición de la hemoaglutinación	152
2.5.5. Intentos de localización de la lectina en el micelio vegetativo de <i>A. bisporus</i>	153
<hr/>	
DISCUSIÓN	155
1.- EFECTO DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS PAREDES CELULARES DEL MICOPATÓGENO <i>V. fungicola</i> Y DE SU HOSPEDADOR <i>A. bisporus</i>.....	158
2.- BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA VERTICILIOSIS (PRODUCIDA POR <i>V. fungicola</i>) DE LOS CULTIVOS COMERCIALES DE CHAMPIÑÓN (<i>A. bisporus</i>)	165

CONCLUSIONES.....175

BIBLIOGRAFÍA179

INTRODUCCIÓN

EL CHAMPIÑÓN (*Agaricus bisporus*) Y SU PRODUCCIÓN COMERCIAL

El Basidiomiceto superior *Agaricus bisporus*, cuyo cuerpo fructífero constituye el champiñón, es el principal hongo comestible cultivado a gran escala en occidente lo que le confiere una indudable importancia económica. Se calcula que la producción industrial de champiñón en el mundo a finales del siglo XX ha alcanzado la cantidad de 1.900 millones de Kg frente a los 2.500 millones de Kg que suman las producciones mundiales de los demás hongos cultivados (Chang, 1996). Pero para llegar a esta cifra se ha tenido que recorrer un arduo camino de cerca de cuatrocientos años de duración.

Todas las fuentes bibliográficas de que se dispone en la actualidad muestran práctica unanimidad en que el cultivo de champiñón nació por casualidad en Francia en el siglo XVII. Alrededor del año 1650 unos cultivadores de melones de la región de París observaron que, habiendo abonado sus cultivos con estiércol de caballo y regado a continuación con el agua en la que previamente habían lavado champiñones silvestres, se desarrollaban nuevos champiñones. En este caso habían coincidido los tres componentes básicos para la producción de hongos comestibles cultivados: un sustrato orgánico como medio de cultivo del hongo (el estiércol de caballo, rico en los nutrientes necesarios), un inóculo (el agua de lavado de los champiñones portando abundantes esporas y pequeños trozos de tejido de champiñones) y un microclima adecuado (temperatura, humedad y aireación).

Iniciado así el cultivo de champiñón en Francia, en 1651 aparece el primer documento escrito por el jardinero Bonnefons, y en 1670 el agrónomo La Quintinie empieza a cultivarlo sobre mantos de paja y heno en los jardines del rey Luis XIV (Labarère, 1994). El primer artículo científico sobre el cultivo de champiñón se debe a Pitton de Tournefort, publicado en las Memorias de la Real Academia de las Ciencias de Francia en 1707.

En 1780 el jardinero Chambry comenzó a cultivarlo en galerías y cuevas subterráneas que reunían condiciones muy favorables para su cultivo. Un poco más adelante, alrededor de 1810, los cultivadores corroboraron que el champiñón fructificaba en ausencia de luz, por lo que su cultivo se realizó a partir de este momento en cuevas en la mayoría de los países europeos (Labarère, 1994).

Desde Francia el cultivo se expandió por algunos países de Europa, siendo Miller quien en 1731 lo introdujo en Inglaterra, pasando seguidamente a Alemania, gracias a su Diccionario de la Jardinería traducido al idioma de este país en 1769 (Van Griensven, 1988). Los primeros datos de la introducción del cultivo de champiñón en Estados Unidos por emigrantes europeos aparecen en 1880 en la región de Nueva York y Long Island, pasando seguidamente a Pennsylvania donde, hoy día, se ha conseguido la mayor concentración de producción de champiñón del mundo.

Un avance significativo para el desarrollo del cultivo de champiñón fue la preparación de la "semilla" o inóculo obtenido a partir de cultivos puros de *A. bisporus*, conseguido por Costantin y Matruchot en 1893 (Van Griensven, 1988), pues anteriormente el cultivador fabricaba y multiplicaba su propia "semilla" favoreciendo la propagación de numerosas enfermedades. La "semilla" o micelio vegetativo de champiñón exento de patógenos, empezó a obtenerse sobre compost esterilizado, sustituyendo así a la efectuada con compost invadido de micelio procedente de un cultivo previo. En 1932 Sinden patentó la "semilla" crecida sobre grano de cereal, dedicándose también a la producción de nuevas variedades de *A. bisporus*, y en 1971 Miller (Van Griensven, 1988) desarrolló un método para la hibridación de este organismo, basado en el aislamiento de esporas de basidios tetraesporados, iniciándose así el estudio de la mejora genética de variedades.

En el año 1817 Abercrombie describió el primer compostaje del sustrato, apilando el estiércol de caballo en cordones, asemejándose en parte al compostaje actual. Aunque en sus comienzos se elaboraba únicamente con estiércol de caballo humedecido y fermentado espontáneamente hasta la pérdida del olor a amoníaco, cuando este material empezó a escasear al ser desplazados estos animales por la aparición del maquinismo, paulatinamente fueron añadiéndose otras sustancias suplementarias y

materiales de desecho: pajas, salvados, restos de molinería, yeso, sangre seca etc. A la vista de los excelentes resultados obtenidos se demostró que el estiércol de caballo no era la materia prima esencial para lograr un buen sustrato para el cultivo de champiñón. En este sentido fueron muy determinantes los trabajos desarrollados por Waksman en los años treinta sobre el papel de los microorganismos en la descomposición de los residuos vegetales, concluyendo que el champiñón requería como nutrientes esenciales lignina, celulosa, hemicelulosa y proteínas (Hayes, 1977). En la actualidad el método del compostaje "corto" de dos fases, utilizado a lo largo de la segunda mitad del siglo XX, está siendo substituido por el compostaje "indoor" cuyo proceso fermentativo es más rápido que el anterior por su régimen más controlado (Pardo, 1994).

De todo lo que antecede se deduce que el cultivo comercial de champiñón requiere un manejo extremadamente cuidadoso en cada una de las etapas del ciclo vital del hongo. *A. bisporus* presenta un ciclo biológico característico que le diferencia de otras especies de *Agaricus* y del resto de los hongos basidiomicetos por su condición de homotálico secundario (Raper *et al.*, 1972), a diferencia de los anteriores que son heterotálicos (Fig. 1). Por esta razón sus basidios producen principalmente dos esporas binucleadas fértiles que desarrollan directamente micelio secundario capaz por sí mismo de fructificar, para lo cual hará su aparición el micelio agregado terciario en forma de aparato fructífero (carpóforo, esporocarpo, basidiocarpo o seta), portador de las esporas para su posterior diseminación.

El hecho de formar sólo excepcionalmente esporas mononucleadas haploides, productoras de micelios homocarióticos, confiere a este organismo una muy baja variabilidad genética, dificultando su posible hibridación con objeto de obtener nuevas cepas con características preseleccionadas. Para la obtención de dichos micelios homocarióticos se ha recurrido a la obtención de protoplastos mononucleados (Sonnemberg *et al.*, 1988; García Mendoza *et al.*, 1991). Estudios recientes de transformación genética en este organismo no han suministrado todavía cepas suficientemente estables.

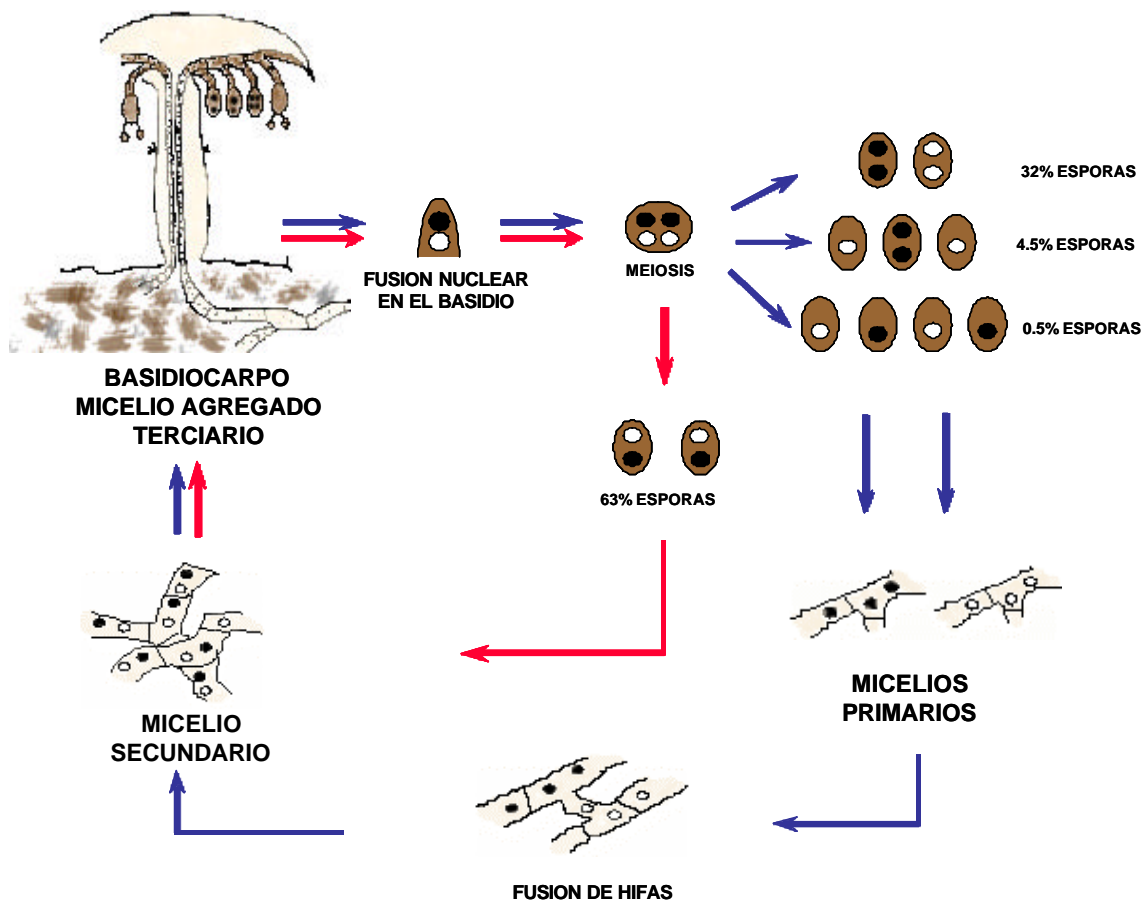


Fig. 1. Representación esquemática del ciclo biológico de *Agaricus bisporus* (García Mendoza, 2000)

La obtención de los cuerpos fructíferos a escala industrial, se consigue después de un período de desarrollo del micelio vegetativo secundario de 25-33 días de duración, seguido del período propiamente dicho de fructificación, que a su vez abarca entre 40 y 52 días. El primer período incluye la colonización del compost por el micelio inoculado, que supone entre 15 y 20 días a una temperatura ambiente de 20-22°C, alcanzando 25°C dentro de las bolsas o recipientes. Cuando el micelio ha colonizado todo el sustrato aparece un color blanquecino tanto en el interior como en la superficie, y es el momento en que se procede a cubrir el compost con la capa de cobertura, a base de tierra caliza y

turba, incubando esta prefructificación o colonización de la capa de cobertura durante 10-12 días a 25°C. El período de fructificación se inicia variando las condiciones climáticas del local, bajando la temperatura a 16°C y aumentando la ventilación, durante 5-7 días, con lo que se detiene el crecimiento vegetativo del micelio y tiene lugar la aparición de los primordios, seguida de los cuerpos fructíferos en "floradas" u oleadas con intervalos aproximadamente semanales. La cosecha de la primera y segunda "floradas" alcanza el 60-70% de la producción total y supone entre 12 y 15 días, mientras que en el resto de las "floradas", entre 25 y 30 días, va decreciendo la productividad, hasta que finaliza el cultivo por agotamiento del sustrato y envejecimiento del micelio (Fig. 2). Rutinariamente y a modo preventivo se sigue un riguroso programa de tratamientos de las principales plagas y enfermedades del champiñón.

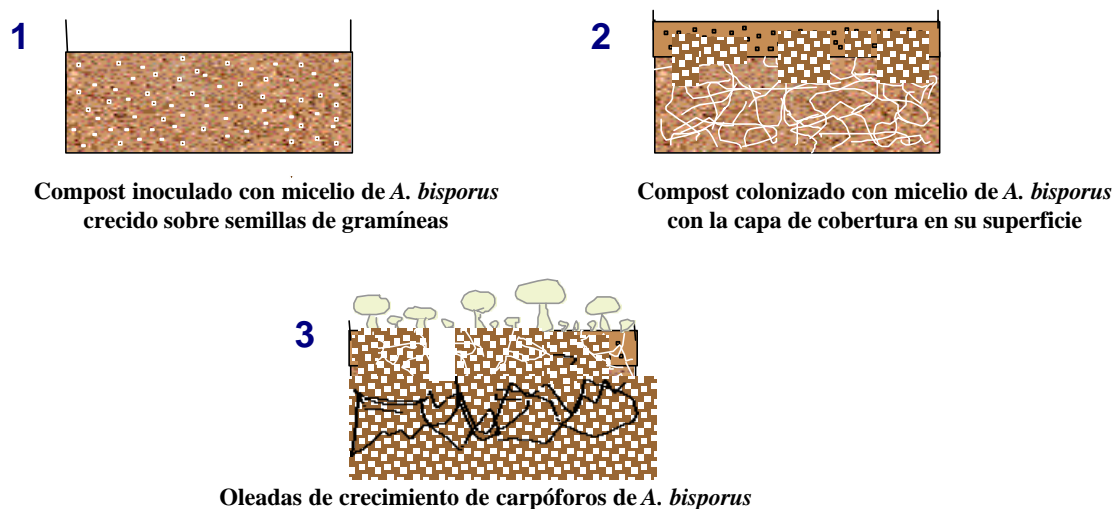


Fig. 2. Esquema de las principales etapas del cultivo industrial de *A. bisporus* (García Mendoza, 2000)

El cultivo de champiñón en España comienza a principios de los años cincuenta, de forma completamente artesanal, principalmente en cuevas, bodegas u otras dependencias semejantes, en las comarcas de Navarra, La Rioja, Aragón, Valencia, Baleares y Castilla-La Mancha. Con la instalación de la primera planta de preparación de

sustrato pasteurizado o compost en Villanueva de la Jara (Cuenca) en 1974 se inicia un cultivo importante en esta provincia, de forma que actualmente la comarca de La Manchuela (Sureste de Cuenca y Noreste de Albacete) se ha colocado en el primer lugar de la producción nacional de champiñón (Fig. 3).



*Cámara de cultivo industrial
(CIES, Quintanar del Rey, Cuenca)*



*Champiñones
(CIES, Quintanar del Rey, Cuenca)*

*Fig. 3. Producción industrial de *A. bisporus**

EL MICOPARASITISMO Y LA VERTICILIOSIS O "MOLE SECA" DEL CHAMPIÑÓN

El parasitismo es el proceso por el cual un organismo vive a expensas de otro organismo vivo, bien sea animal o vegetal, produciéndole un perjuicio más o menos acusado. Dentro de los hongos existen numerosos parásitos animales y vegetales, e incluso algunas especies son capaces de parasitar a otros hongos, proceso conocido como micoparasitismo o parasitismo de un hongo.

Desde que en 1973 Barnett y Binder describieran dos grandes grupos de micoparásitos, los necrotróficos y los biotróficos, según su mayor o menor grado de agresión al hongo hospedador, se han ido describiendo sucesivamente distintos casos de micoparasitismo, siendo de destacar los de *Piptocephalis virginiana* sobre diferentes especies de hongos Mucorales (Manocha y Sahai, 1993), *Schizophyllum commune* sobre *Rhizoctonia solani* (Chiu y Tzean, 1995), *Verticillium lecanii* y *Sporothrix rugulosa*, ambos sobre *Sphaerotheca fuliginea* (Verhaar *et al.*, 1996) y el primero de ellos, *V. lecanii* también sobre *Pythium ultimum* (Benhamou y Brodeur, 2001), *Trichoderma harzianum* sobre *R. solani* y *Sclerotium rolfii* (Elad *et al.*, 1983), *Lasiodiplodia theobromae* (Golam Mortuza y Ilag, 1999), *T. virens* y *T. viride*, sobre *Sclerotinia sclerotium* (Huang *et al.*, 2000), así como otras cepas de *T. harzianum* genéticamente transformadas con fines de biocontrol sobre *R. solani* (Zeilinger *et al.*, 1998). El hecho de que los hongos hospedadores de los micoparásitos citados sean a su vez hongos fitopatógenos ha conducido a que las investigaciones más recientes sobre este tema se dirijan hacia el posible control biológico mediante tratamiento de la micosis primaria con su correspondiente micoparásito, o con su respectivo equipo enzimático aislado, con el fin de conseguir en un futuro próximo la erradicación de las infecciones vegetales causadas por los fitopatógenos en cuestión.

El micoparasitismo, verticiliosis o "mole seca" del champiñón, tema de la presente tesis doctoral, es la micosis producida por el hongo Hifomiceto *Verticillium fungicola* sobre los cultivos comerciales del hongo Basidiomiceto superior *Agaricus bisporus* o champiñón. La primera descripción de esta micosis fue realizada por Constantin y Dufour en 1892, y *V. fungicola* ha sido considerado como el hongo más destructivo y ubícuo de todos los patógenos del champiñón por Sinden (1971), pudiendo

llegar a destruir una cosecha en dos o tres semanas (Fletcher *et al.*, 1986). Igualmente se han descrito los daños causados en los cultivos comerciales de España, Holanda, Suiza, Francia, Reino Unido, Norteamérica, India y Taiwan (Gea Alegría, 1995).

La denominación de "mole seca" o "bolas" por los cultivadores, alude a que si los champiñones son infectados en una etapa temprana de su desarrollo, como es la fase de primordios, aparecen una pequeñas masas esféricas esclerodermoides o "bolas" de tejido de color blanco-grisáceo correspondiente a la proliferación del micopatógeno, en las que no existe diferenciación de pie, sombrerillo y laminillas. Si los champiñones son afectados en una fase más avanzada de su desarrollo, cuando ya se han diferenciado estípite y píleo, aparecen imperfectamente formados al arquearse el pie provocando una inclinación del sombrerillo, de color semejante a la fase anterior, siendo denominados como "pie o labio de liebre", en donde las células afectadas detienen su crecimiento mientras que las no infectadas continúan alargándose. Finalmente cuando la infección tiene lugar sobre los carpóforos casi completamente diferenciados, aparecen sobre ellos manchas de color pardo que evolucionan hacia el grisáceo, debido a la progresión de la micosis, con la correspondiente esporulación del *Verticillium* denominándose "moteado del sombrerillo" (Fig.4).

Diversos estudios sobre la interacción de los micelios de ambos hongos, realizados mediante microscopía óptica y electrónica tanto *in vivo* como *in vitro* (Ware, 1933; Matthews, 1983; Gandy, 1985; North y Wuest, 1993) mostraron que aunque no se llegaron a observar estructuras especializadas de penetración por parte de *V. fungicola* en el interior de las hifas de *A. bisporus*, sí se hacía patente la destrucción parcial de dichas hifas, probablemente debido a la acción de algunas enzimas líticas (Michaels, 1973; Trigiano y Fergus, 1979; Kalberer, 1984). Recientemente Dragt *et al.* (1996) pudieron demostrar la presencia del micopatógeno dentro de las hifas del carpóforo, así como Calonje *et al.* (1997), quienes también pusieron de manifiesto la necrosis celular de dichas hifas producida por la digestión de sus correspondientes paredes celulares, identificando las enzimas hidrolíticas secretadas por el *Verticillium*.

En los procesos de micoparasitismo estudiados hasta el presente (Manocha y Chen, 1990) el micoparásito necesita primeramente contactar con la superficie celular del hospedador. A continuación debe producirse un reconocimiento de la topografía de



Champiñones presentado todos los síntomas típicos de la mole seca: "bolas", "labio de liebre" y "moteado"



"Bolas esclerodermoides"



"Pie o labio de liebre"



"Moteado del sombrero"

Fig. 4. Verticiliosis del champiñón (Fotografías cedidas por el Dr. Gea Alegría, CIES)

la superficie de dicho hospedador por parte del micoparásito que parece consistir en la unión de moléculas complementarias presentes en las superficies de ambos organismos, como ocurre entre la lectina de las hifas del hospedador *R. solani* y ciertos carbohidratos de las paredes celulares del micoparásito *T. harzianum* (Elad *et al.*, 1983). Tal grado de especificidad en la unión o interacción entre el parásito y el hospedador debe producirse igualmente en la verticiliosis, y el estudio de ambas posibles etapas de adhesión y reconocimiento entre *V. fungicola* y *A. bisporus*, este último a su vez en sus dos fases de micelio vegetativo y agregado, constituyen uno de los dos macro-objetivos del presente trabajo.

El hecho de que el micelio vegetativo de *A. bisporus* no sea necrosado por el de *V. fungicola* y que las paredes celulares de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* presenten diferencias estructurales considerables (García Mendoza *et al.*, 1987; Calonje *et al.*, 1996) demuestra el importante papel que desempeñan dichas paredes celulares en los procesos de micoparasitismo. El estudio de la interacción del micelio vegetativo de *A. bisporus* con el del micopatógeno *V. fungicola* en cultivos experimentales (Calonje *et al.*, 2000a) ha mostrado que entre ambos micelios tiene lugar una aparente adhesión, sin que se produzca la necrosis del micelio del hospedador a pesar de la secreción de los enzimas hidrolíticos del *Verticillium*, hecho probablemente debido a la falta de un reconocimiento específico posterior a la citada adhesión.

IMPLICACIÓN DE LAS PAREDES CELULARES DEL HOSPEDADOR (*A. bisporus*) Y DEL PARÁSITO (*V. fungicola*) EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA MICOSIS

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 intercelulares 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 que la conforman que, correctamente ensamblados, proporcionan a la misma su organización característica.

Estas paredes celulares presentan un alto porcentaje de azúcares estructurados como polisacáridos (alrededor del 80% del peso seco de la pared), a los que siguen en proporción proteínas, lípidos, pigmentos y sales minerales (Bartnicki-García, 1968). La glucosa es el azúcar más abundante de dichos polisacáridos, encontrándose en todos los grupos taxonómicos, seguida por la manosa y la galactosa, que se encuentran igualmente en la mayoría de las especies fúngicas (Gorin y Spencer, 1968). Menos representados y con un ámbito de distribución más restringido se encuentran la glucosamina, la xilosa, la ramnosa y el ácido glucurónico, y en cantidades mínimas y solo en determinados grupos taxonómicos aparecen la arabinosa, la fucosa, la ribosa y la galactosamina (Rosemberger, 1976; Bartnicki-García *et al.*, 1982; Peberdy, 1990). Tales polisacáridos, para proteger la integridad celular, se presentan en forma microfibrilar, o en estado amorfo cementantes de los fibrilares.

Los polisacáridos más importantes descritos hasta ahora son la quitina, presente en la mayoría de los hongos como en los critidomicetos, zigomicetos, ascomicetos y basidiomicetos, la celulosa, que está restringida a los oomicetos, y los α - y/o β -glucanos, distribuidos en todos ellos. Dicha quitina se encuentra covalentemente unida a un β -glucano constituyendo un complejo fibrilar insoluble en álcali, mientras que los lípidos y las proteínas junto con otros homo- y/o hetero-polisacáridos constituyen mayoritariamente el material cementante amorfo, excepto el 1,3- α -glucano igualmente fibrilar, proporcionando resistencia a la pared celular así como una organización característica.

Concretándonos a las paredes celulares de los dos hongos motivo de esta tesis doctoral, *A. bisporus* y *V. fungicola*, ambas envolturas celulares han sido previamente estudiadas en cuanto a su composición, estructura química y ultraestructura (Michalenko *et al.*, 1976; García Mendoza *et al.*, 1987a; Mol y Wessels, 1990; Calonje *et al.*, 1996; Calonje *et al.*, 2000b) y difieren considerablemente entre sí correspondiendo el primero

a un hongo Basidiomiceto superior más evolucionado, y el segundo a un hongo imperfecto Hifomiceto. La arquitectura molecular de la pared celular de *A. bisporus* consta esencialmente una malla microfibrilar de quitina unida covalentemente a un 1,3-1,6- β -glucano, a la que se asocian pequeñas proporciones de glicanos y más superficialmente otros componentes de naturaleza fibrilar como el mucílago y el 1,3- α -glucano (García Mendoza *et al.*, 1987b), aunque diferencias cuali y cuantitativas se han podido demostrar entre las paredes del micelio vegetativo y las del micelio agregado (Calonje, 1998). Por su parte las paredes de *V. fungicola* presentan una malla microfibrilar de quitina, semejante a la anterior, pero en este caso unida covalentemente a un 1,3-1,4- β -glucano, a la que se superponen 1,4- y 1,3-1,4- α -glucogalactomananos (Calonje, 1998).

Además de los polisacáridos, como componentes estructurales mayoritarios, ciertas proteínas también juegan un importante papel estructural en las paredes celulares, pero a la vez, otras presentan funciones claramente plásticas, entre las que se encuentran las enzimas degradativas y biosintéticas necesarias para los procesos de crecimiento y morfogénesis. Dentro de las proteínas no enzimáticas de las paredes celulares fúngicas descritas hasta la fecha, las hidrofobinas son las proteínas que forman las capas superficiales hidrofóbicas de todas las estructuras fúngicas aéreas, por agregación de las correspondientes moléculas monoméricas secretadas como respuesta a las condiciones medioambientales, interviniendo en el contacto de las hifas con las superficies hidrofóbicas. Aunque las hidrofobinas parecen estar presentes en todos los hongos, hasta la fecha sólo se han descrito en alrededor de veinte especies fúngicas (Wessels, 1997), y concretando, en relación con el presente trabajo, se han aislado y purificado hidrofobinas tanto en el micelio vegetativo como en el agregado de los carpóforos de *A. bisporus* (Lugones *et al.*, 1996, 1998). Recientemente en nuestro laboratorio ha sido demostrada también la presencia de hidrofobina en el medio de cultivo y en las hifas de *V. fungicola* (Calonje *et al.*, 2002), constituyendo su estudio más detallado uno de los objetivos del presente trabajo.

Otras proteínas asociadas con la superficie celular fúngica son las lectinas. Estas proteínas o glicoproteínas, de naturaleza no inmunológica, se caracterizan por su reconocimiento específico a carbohidratos complejos sin alterar la estructura de los

ligandos glicosídicos reconocidos, aglutinando células y/o precipitando glicoconjugados (Goldstein *et al.*, 1980). Las lectinas fueron descubiertas inicialmente en plantas y posteriormente en otros seres vivos como los hongos, habiéndose descrito su presencia en diferentes especies fitopatógenas, como la ya citada *R. solani* sobre la que se asienta el micoparasitismo de *T. harzianum*, así como en los carpóforos de diferentes hongos comestibles y entre ellos *A. bisporus* (Presant y Kornfeld, 1972).

Todos los componentes polisacáridicos y proteicos de las paredes celulares fúngicas a los que acabamos de hacer referencia, son digeridos por sus correspondientes enzimas degradativas específicas, tanto en los necesarios cambios morfogénicos de la pared a lo largo del ciclo biológico, como en los casos de parasitismo. En el micoparasitismo de *V. fungicola* sobre los carpóforos de *A. bisporus* ha podido ser demostrada la presencia de diferentes glucanasas, quitinasa y proteasas (Calonje *et al.*, 1997) secretadas por *V. fungicola* y necesarias para la digestión de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus* y producir la posterior necrosis de dichos cuerpos fructíferos como etapa final de dicho parasitismo. En la interacción de *V. fungicola* sobre el micelio vegetativo de *A. bisporus*, aunque se secreten las enzimas líticas del *Verticillium* en presencia de las paredes celulares de dicho micelio vegetativo (Calonje *et al.*, 2000a), sin embargo no tiene lugar la digestión de las mismas con la posterior necrosis del micelio, probablemente debido a la falta de alguna de las etapas previas imprescindibles para la consecución del micoparasitismo.

EMPLEO RUTINARIO DE FUNGICIDAS EN EL CULTIVO INDUSTRIAL DE CHAMPIÑÓN

La importancia de los daños ocasionados por la verticiliosis o "mole seca" de los cultivos comerciales de champiñón ha hecho que, desde los primeros vestigios de su aparición, los cultivadores hayan intentado su control mediante el empleo de fungicidas, a la vez que practicando diferentes condiciones de asepsia para su prevención. Pero el uso continuado de agentes químicos fungicidas, durante los últimos veinticinco años, ha dado lugar a la aparición de resistencias en el agente causal de la infección, *V. fungicola*, con lo que el problema se ha ido complicando paulatinamente.

Los primeros fungicidas empleados para combatir la verticiliosis fueron los ditiocarbamatos como el zineb y el mancozeb, cuyo modo de acción era multipuntual y con efectividad muy variable (Fekete y Kuhn, 1967), por lo que se llegaron a emplear dosis muy elevadas con el consiguiente problema de toxicidad para animales y humanos. La aparición entonces de los fungicidas benzimidazoles como el benomilo y el tiabendazol, con un modo de acción unipuntual, supuso, en un principio, un claro avance en el control de esta infección, hasta que la formación de resistencias en el *Verticillium* (Wuest *et al.*, 1974) hizo necesaria la búsqueda de un nuevo producto, utilizándose entonces el clorotalonil (Gandy y Spencer, 1976), que tampoco llegó a ser totalmente efectivo. La introducción del procloraz en 1983 para combatir *V. fungicola* aportó no solo un buen control de la verticiliosis sino también un aumento significativo de la cosecha de champiñones sanos (Fletcher, 1981; Gandy y Spencer, 1981), de ahí que su utilización se generalizara con los consiguientes perjuicios de futuras nuevas resistencias y posible aumento de la dosis a utilizar, aunque en la actualidad siga siendo todavía el producto más efectivo para el control de *V. fungicola* (Fletcher, 1992).

El procloraz-Mn, carbamoil-imidazol (N-propil-N(2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil)-imidazol-1-carboxamida) en forma de complejo de manganeso, ha sido incluido, por su modo de acción, dentro de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (Siegel, 1981; Leroux, 1991), y más concretamente inhibiendo la desmetilación del C-14 del lanosterol para su paso a ergosterol (Barbera, 1994), aunque sin descartar otros posibles lugares de actuación (fungicidas multipuntuales). Este fungicida, bajo la denominación de Sporgon, ha sido autorizado en España para su aplicación en el cultivo de champiñón, con una dosis recomendada de 0,03-0,05 % en pulverización, diluyendo la cantidad recomendada en un litro de agua por metro cuadrado y realizando 2-3 aplicaciones preventivas, la primera de ellas a los 3-5 días después de la cobertura, la segunda aplicación después de la primera florada y la tercera dosis después de la tercer florada, dejando un plazo de seguridad de dos días para la recolección del champiñón.

El hecho de que su utilización se haya hecho rutinaria como preventivo de la verticiliosis y que, desde 1992, se haya observado una mayor incidencia de la enfermedad que nos ocupa, ha llevado a diferentes investigadores a considerar la posible aparición de cepas de *V. fungicola* resistentes al procloraz (Gea *et al.*, 1996).

A la vista de todos estos antecedentes, el estudio más completo del modo de acción del fungicida procloraz sobre las paredes celulares del micoparásito *V. fungicola* constituye el otro objetivo de la presente tesis doctoral, sin olvidar además que, en este caso concreto, el hospedador de este patógeno se trata también de otro hongo, *A. bisporus*, sobre el cual el fungicida tiene que mostrar igualmente algún efecto, por lo cual el estudio de la actuación del fungicida sobre el propio *A. bisporus* complementaría el objetivo anterior relativo al mecanismo celular y molecular de la verticiliosis del champiñón.

OBJETIVOS

La presente tesis doctoral presenta dos macro-objetivos, que a su vez incluyen otros objetivos menores, más concretos y con importantes implicaciones económicas, por tratarse del estudio de una plaga de los cultivos industriales de un alimento para la especie humana:

1.- Estudio del modo de acción del fungicida procloraz-Mn sobre las paredes celulares de *Verticillium fungicola* y *Agaricus bisporus*

1a.- Valoración del efecto del fungicida sobre las paredes celulares del micopatógeno *V. fungicola* en un intento de comprobar si el actual control de la verticiliosis del champiñón es dependiente de las transformaciones sufridas por las citadas paredes celulares.

1b.- Estudio comparativo del efecto del procloraz-Mn sobre tres cepas de *V. fungicola*, aisladas de los cultivos de champiñón en diferentes tiempos, dos de las cuales han sufrido un pretratamiento incontrolado del fungicida, tratando además de estimar el efecto de dicho pretratamiento que implica el riesgo de creación de posibles resistencias.

1c.- Consecuencias del uso rutinario del procloraz-Mn, como preventivo de la micosis, sobre las paredes celulares de *A. bisporus*, estudio que complementa los dos objetivos anteriores.

2.- Bases celulares y moleculares de la verticiliosis de los cultivos industriales de champiñón (*Agaricus bisporus*)

2a.- Estudio de los mecanismos celulares y moleculares del micoparasitismo de *V. fungicola* sobre los carpóforos de *A. bisporus* cuyo conocimiento es el objetivo básico de esta tesis y posteriormente puede conducir a controlar la micosis eliminando la utilización de pesticidas.

2b.- Desentrañar los pasos previos al desencadenamiento de la micosis: a) el contacto

superficial inespecífico entre *V. fungicola* y *A. bisporus*, y b) el reconocimiento y/o unión entre ambos organismos a través de ligandos específicos.

3c.- Explicar el diferente comportamiento de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* (carpóforos) frente al micoparásito *V. fungicola*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DEL MODO DE ACCIÓN DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn SOBRE LAS PAREDES CELULARES DE *V. fungicola* Y *A. bisporus*.

1.1.- MEDIOS DE CULTIVO

➤ **Medio compost**

Tabla 1.

Compost	50 g/l
Agar	20 g/l

➤ **Medio Raper**

(Raper *et al.*, 1972)

Tabla 2.

Glucosa	20 g/l
Peptona	2 g/l
Extracto de levadura	2 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,46 g/l
K ₂ HPO ₄	1 g/l

➤ **Medio Mínimo Sintético (MMS)**

Tabla 3.

NaNO ₃	1 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/l
K ₂ HPO ₄	0,9 g/l
KCl	0,2 g/l
MnSO ₄	2 mg/l
Fe SO ₄ .7H ₂ O	2 mg/l
Zn SO ₄	2 mg/l

el pH se ajustó a 6,3 con KOH

1.2.- MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los carpóforos de *A. bisporus* (cepa comercial Fungisem H₂₅), fueron suministrados por el Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES, Quintanar del Rey, Cuenca), y su correspondiente micelio vegetativo se obtuvo, bien mediante el cultivo de pequeños fragmentos de tejido del micelio agregado de los carpóforos (cultivos de tejido o cultivos clónicos), o bien cultivando las esporas aisladas de dichos carpóforos sobre el medio sólido de compost durante 15-20 días a 25 °C (Calonje *et al.*, 2000a).

En el caso de *V. fungicola* se trabajó con tres cepas diferentes aisladas en distintos periodos de tiempo (Tabla 4). La cepa CBS 992.69 fue proporcionada por el Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda), y las cepas CIES 210 y CIES 100 fueron aportadas por el CIES, aisladas de varias granjas de cultivo de champiñón situadas en la Comunidad de Castilla-La Mancha.

Tabla 4. Año de aislamiento de las tres cepas de *V. fungicola*

CEPA	AÑO
CBS	1969
CIES 210	1992
CIES 100	2000

1.3.- DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL₅₀ DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn EN AMBOS ORGANISMOS

El fungicida utilizado en este trabajo fue el procloraz-Mn-complex al 46%, y el principal parámetro que estima la actividad *in vitro* del fungicida es la Dosis Letal 50 (DL₅₀), que se define como la dosis o concentración de producto fungicida que inhibe el desarrollo del hongo en un 50%.

La evaluación de la DL₅₀ fue realizada cultivando, independientemente, tanto el micelio de *V. fungicola* como de *A. bisporus* en frascos Roux con medio líquido Raper,

al cual se adicionaron suspensiones acuosas del fungicida procloraz-Mn, a distintas concentraciones.

Las diluciones del fungicida se prepararon disolviendo la cantidad apropiada en agua destilada estéril, y a continuación se añadieron al medio autoclavado, agitando con el fin de conseguir una suspensión homogénea del producto. Después el medio de cultivo se inoculó (estandarizando el inoculo con un disco de agar de 8 mm de diámetro obtenido con el consiguiente sacabocados) con micelio de cada organismo crecido sobre medio sólido sin fungicida.

Después de diferentes tiempos de incubación, los cultivos se filtraron con papel de filtro Whatman 3MM, se pesaron los micelios obtenidos, calculando en cada caso la DL₅₀ de procloraz-Mn.

Paralelamente a estos experimentos se prepararon series de placas con medio Raper sembradas con ambos hongos en presencia de cantidades crecientes de procloraz-Mn, con objeto de poder observar el límite de inhibición producida por dicho fungicida sobre cada micelio.

1.4.- CONDICIONES DE CULTIVO

El micelio vegetativo de *A. bisporus* se creció en frascos Roux con 100 ml de medio líquido Raper, de forma estática a 25 °C durante 15-20 días, en ausencia y presencia de su correspondiente DL₅₀ de fungicida procloraz-Mn.

En cuanto a las diferentes cepas de *V. fungicola* se cultivaron paralelamente también en medio Raper, adicionando sus respectivas DL₅₀ de fungicida al medio de cultivo, a 25 °C durante 5 días, junto con su control en ausencia de fungicida.

Transcurrido el tiempo correspondiente, los micelios obtenidos se recogieron por filtración, se lavaron con H₂O destilada y se liofilizaron.

El medio de compost se utiliza preferentemente para el mantenimiento de las cepas de *A. bisporus* y evitar posibles degeneraciones de las mismas.

1.5.- OBTENCIÓN DE LAS PAREDES CELULARES

1.5.1.- Rotura celular

Para obtener las respectivas paredes celulares, se procedió a la ruptura de los correspondientes micelios liofilizados en un mortero con nitrógeno líquido. Se resuspendieron los diferentes materiales en agua destilada y se recogieron las paredes celulares por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min, desechando el sobrenadante en el que se encuentra el material citoplasmático. A los carpóforos o micelio agregado de *A. bisporus*, previamente se les había desprovisto de las lamelas y las esporas. Una vez liofilizados, se sometieron al mismo procedimiento de rotura seguido de centrifugación.

1.5.2.- Purificación de las paredes celulares

Las paredes celulares obtenidas, se purificaron mediante varios lavados con H₂O destilada y centrifugaciones sucesivas. La pureza de dichas paredes se evaluó mediante la observación de las preparaciones en un microscopio de contraste de fase junto con la valoración de la ausencia de proteínas contaminantes en las últimas aguas de lavados midiendo la absorbancia a 280 nm (Dawson *et al.*, 1986). Una vez purificadas se liofilizaron y se conservaron para su posterior análisis.

1.6.- ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS PAREDES CELULARES SIN Y CON PRETRATAMIENTO DE FUNGICIDA

1.6.1.- Valoración de azúcares neutros totales

El método utilizado fue el de la antrona descrito por Chung y Nickerson (1954). El reactivo es una solución de antrona (compuesto orgánico con grupos fenólicos) al 0,2 % (p/v) en ácido sulfúrico concentrado. El ácido caliente hidroliza los polímeros sacarídicos dando monómeros y produciendo además deshidratación intramolecular de los monosacáridos formados. Las pentosas dan lugar, en estas condiciones a furfural y las hexosas a 5-hidroximetil-2-furfural. La antrona reacciona con dichos derivados

formando complejos coloreados cuya intensidad es proporcional a la concentración del azúcar.

Las muestras a analizar conteniendo de 20 a 100 μg de azúcares se enrasaron hasta 1 ml con agua destilada. El reactivo se añadió en proporción 2:1 a la muestra previamente enfriada en hielo. La mezcla de reacción se calentó en un baño de agua en ebullición durante 10 min, tras lo cual se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 540 nm. Paralelamente se realizó una curva patrón utilizando glucosa (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como estándar.

1.6.2.- Valoración de proteínas

1.6.2.1.- Método de Lowry

Para valorar las proteínas totales tanto en las paredes completas como en las diferentes fracciones aisladas de tales paredes celulares se empleó el método de Lowry *et al.* (1951). Este método se fundamenta en la reacción de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano con el reactivo de Folin-Ciocalteu de tipo heteropolifosfato. Como las proteínas problema y las utilizadas como patrones tienen proporciones distintas de estos aminoácidos aromáticos, es obvio que los resultados obtenidos son solamente relativos.

Las muestras a analizar se sometieron a una digestión previa con 1 ml de NaOH 1 N durante 2 h en un baño de agua a 100 °C. Seguidamente se centrifugaron y se tomaron alícuotas que contenían entre 5-15 μg de proteínas. Las alícuotas se completaron hasta 0,3 ml con NaOH 1 N y se les añadió 0,3 ml de H₂O destilada. A continuación se añadieron a cada tubo 3 ml de reactivo A (50 ml de Na₂CO₃ al 2 % mezclados con 0,5 ml de CuSO₄ al 1 % y con 0,5 ml de tartrato sódico-potásico al 2 %), agitando y esperando durante 10 min a 20 °C. Pasado el tiempo, se añadieron 0,3 ml de reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % en H₂O destilada), dejando las muestras de nuevo durante 30 min y leyendo sus absorbancias a 750 nm. La curva de calibrado se llevó a cabo con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) en NaOH 1 N de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

1.6.2.2.- Método de Bradford

La cuantificación de las proteínas en las muestras para electroforesis se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford (1976), basado en la absorción específica a 595 nm de las proteínas unidas a Azul de Coomassie G-250 en medio ácido, empleando el reactivo comercial de Bio-Rad Protein Assay.

Se tomaron alícuotas que contenían entre 1–25 µg de proteínas y se completaron hasta 0,8 ml con H₂O destilada, añadiendo posteriormente 0,2 ml del reactivo comercial. Se agitaron para conseguir la formación de complejos entre el Azul de Coomassie y las proteínas presentes.

El color desarrollado es estable entre 5 min y 1 h después de la adición del reactivo, en cuyo intervalo se leyeron las densidades ópticas a una longitud de onda de 595 nm.

Las lecturas obtenidas se refirieron a la curva patrón realizada simultáneamente con la proteína seroalbúmina bovina (1,25-25 µg/ml), intervalo para el que existe una relación lineal entre densidad óptica y concentración de proteína.

1.6.3.- Valoración de aminoazúcares totales

Se empleó el método de Chen y Johnson (1983) que se basa en la formación de un material cromogénico cuando los aminoazúcares se calientan en un baño a 90 °C, en presencia de acetilacetona en solución alcalina. El cromógeno produce un cromóforo al tratarlo con una solución ácida de N-N-dimetil-p-aminobenzaldehído (PDAB).

La muestra a estudiar se hidrolizó previamente con 1 ml de HCl 6 N durante 4 h a 100 °C. Pasado el tiempo se diluyó con 9 volúmenes de H₂O destilada, filtrando después con filtros Millipore (0,45 µm), y tomando muestras que contuvieran 5-15 µg de aminoazúcares. Se añadieron 0,25 ml del reactivo acetilacetona (acetilacetona al 4 % en Na₂CO₃ 1,25 N) a las alícuotas, los tubos se cerraron con tapones esmerilados, y se calentaron en un baño de agua a 90 °C durante 1h. Una vez enfriados, se añadieron 2 ml de etanol y se agitaron, para adicionar posteriormente 0,25 ml del reactivo de Ehrlich (1,6 g de PDAB disuelto en una mezcla de 30 ml de HCl concentrado y 30 ml de etanol)

esperando 15-20 min a temperatura ambiente. La lectura se efectuó a 530 nm, y la curva patrón se realizó con una solución de glucosamina (100 µg/ml).

1.6.4.- Valoración de lípidos totales

Para valorar el contenido de lípidos que se estructuran en las paredes celulares se empleó el método gravimétrico. La muestra (100 mg) se hidrolizó con 3 ml de HCl 6 N a temperatura ambiente durante 4 h y se realizaron sucesivas extracciones con 1 ml de éter. Los lípidos así obtenidos se llevaron a sequedad en el rotavapor pesándose a continuación.

1.6.5.- Calcinación para la obtención de cenizas

La calcinación de las muestras se efectuó, empleando crisoles de porcelana, en un horno WC Heraeus Hanau Typ. KR 170, a una temperatura de 800 °C durante media hora. La valoración de las cenizas se realizó gravimétricamente.

1.7.- FRACCIONAMIENTO DE LAS PAREDES CELULARES

Las paredes liofilizadas de *V. fungicola* y *A. bisporus*, tanto las controles como las obtenidas del tratamiento con el fungicida procloraz-Mn, se fraccionaron de forma diferente: las primeras según el procedimiento descrito por Calonje *et al.* (2000b), y las segundas por el procedimiento de Calonje *et al.* (1996). Este distinto fraccionamiento es debido a que la composición de ambas paredes celulares es muy diferente, como se podrá comprobar a lo largo de esta tesis.

1.7.1.- Fraccionamiento de las paredes celulares de *V. fungicola* obtenidas en ausencia y presencia del procloraz-Mn

Se realizó una primera extracción con H₂O destilada a 60 °C, seguida de una segunda con KOH 1 N a la misma temperatura, obteniéndose diferentes fracciones según se resume en la Fig. 5.

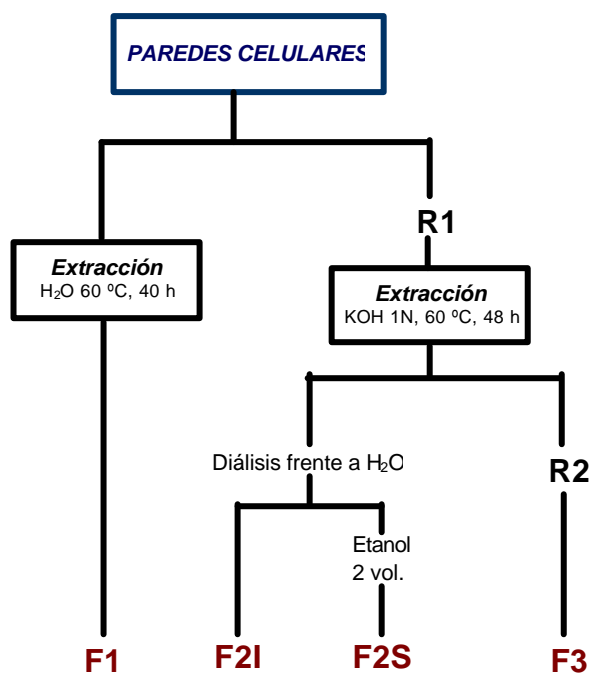


Fig 5. Representación esquemática de la extracción de las fracciones de la pared celular de *V. fungicola*

1.7.1.1.- Extracción de los polisacáridos solubles en agua

Las paredes de *V. fungicola* se resuspendieron en H₂O destilada (2,5 g en 350 ml) y se incubaron en un baño a 60 °C durante 40 h. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min, concentrando el sobrenadante 10 veces con la ayuda del rotavapor, y seguidamente liofilizándose, con lo que se obtuvo así la fracción **F1**.

1.7.1.2.- Extracción de los polisacáridos solubles en KOH

El sedimento de la extracción anterior se sometió a un tratamiento con 350 ml de KOH 1 N durante 48 h a 60 °C, centrifugándose después y obteniéndose un residuo final insoluble y un sobrenadante soluble en KOH. El residuo se sometió a sucesivos lavados hasta alcanzar la neutralidad, lo que dio lugar a la fracción **F3**. El sobrenadante, se dializó frente a H₂O durante toda la noche, tras lo que, mediante centrifugación, se obtuvo una fracción insoluble en H₂O que llamamos fracción **F2I**, y una soluble, a la cual se le añadieron 2 volúmenes de etanol 96 °, dejándola durante una noche a 4 °C. Seguidamente se centrifugó para separar el precipitado con lo que se obtuvo la fracción

denominada **F2S**. Las tres fracciones se congelaron y se liofilizaron para su posterior análisis.

1.7.2.- Fraccionamiento de las paredes celulares de *A. bisporus* obtenidas sin y con procloraz-Mn

Para solubilizar las diferentes fracciones sacarídicas, se trataron las paredes celulares de *A. bisporus* en primer lugar con agua destilada a 60 °C con el fin de extraer la fracción mucilaginoso, y posteriormente con KOH 1 N en diferentes condiciones de temperatura y tiempo, con lo que se obtuvieron las demás fracciones sacarídicas y un residuo final insoluble (Fig. 6).

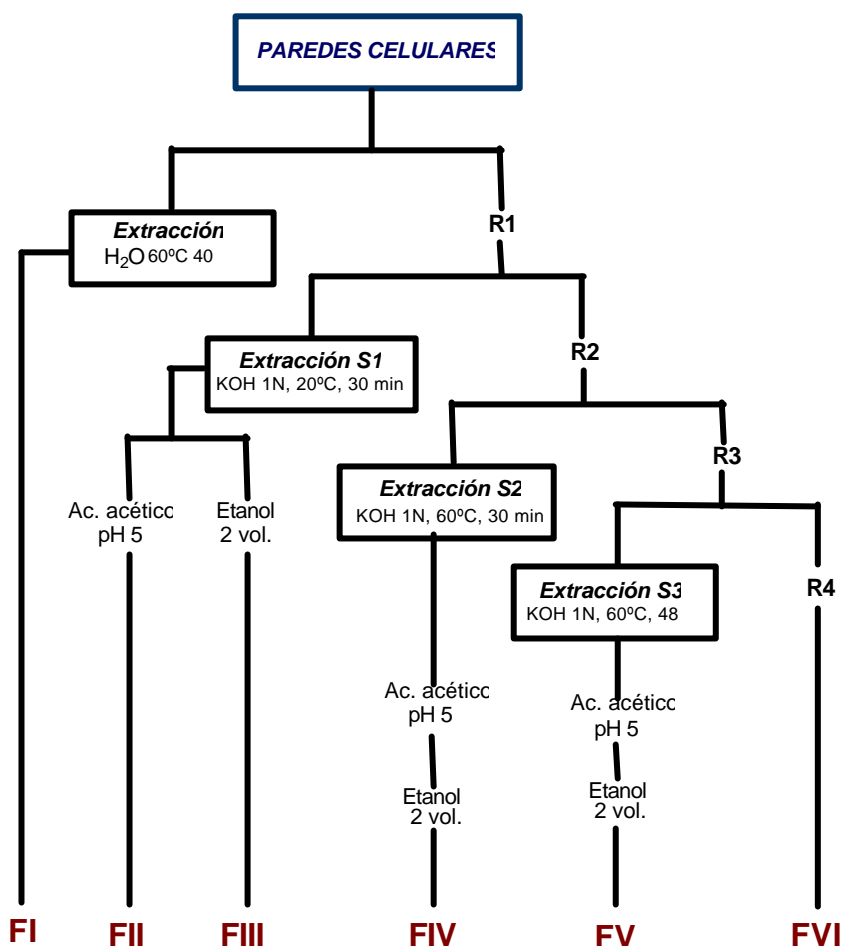


Fig. 6. Representación esquemática de la extracción de las fracciones de la pared celular de *A. bisporus*

1.7.2.1.- Extracción de los polisacáridos solubles en agua

Las paredes celulares fueron resuspendidas en H₂O (2,5 g en 350 ml) sometiéndolas a la acción de un homogeneizador Potter con el fin de conseguir una suspensión perfecta, y se incubaron en un baño de agua a 60 °C durante 40 h. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. El sedimento se lavó con 100 ml de H₂O destilada y se volvió a centrifugar. Los sobrenadantes se mezclaron obteniéndose la fracción **FI** o mucílago, la cual se concentró 10 veces en el rotavapor y se liofilizó.

1.7.2.2.- Extracción de los polisacáridos solubles en KOH

El sedimento obtenido en el tratamiento anterior se resuspendió en 350 ml de KOH 1 N, se sometió de nuevo a la acción del homogeneizador Potter y se incubó a 20 °C durante 30 min en agitación. Pasado este tiempo se centrifugó (12.000 rpm, 10 min) y se reservó el sobrenadante. El sedimento lavado con 100 ml de KOH 1 N, se volvió a centrifugar. Los sobrenadantes combinados dieron lugar al extracto S1.

El sedimento resultante se sometió a una segunda extracción con KOH 1 N a 60 °C durante 30 min, centrifugándose en las condiciones anteriormente descritas y recogiendo el sobrenadante. El sedimento resultante se lavó con 100 ml de KOH 1N y también se centrifugó. Se mezclaron ambos sobrenadantes constituyéndose el extracto S2.

Por último, se realizó una tercera extracción con KOH 1 N a 60 °C durante 48 h, obteniéndose el extracto S3 y un residuo final resistente a dicho tratamiento.

Los extractos S1, S2 y S3 se concentraron a 1/3 del volumen inicial y se ajustaron separadamente a pH 5,0 con ácido acético glacial dejando que precipitasen durante una noche a 4 °C. El precipitado así obtenido (fracción **FII** procedente de S1, puesto que al neutralizar S2 y S3 no se obtuvo precipitado), se recogió por centrifugación (10.000 rpm, 10 min), se dializó frente a H₂O y se liofilizó. A los sobrenadantes se les añadieron 2 volúmenes de etanol de 96 °, dejándolos igualmente una noche a 4 °C con objeto de precipitar los polisacáridos que no lo hicieron a pH 5,0.

Los precipitados obtenidos por efecto del etanol (fracciones **FIII**, **FIV** y **FV**) se recogieron por centrifugación y se liofilizaron.

El residuo final insoluble (fracción **FVI**) se lavó con H₂O destilada hasta dejarlo a pH neutro y se liofilizó reservándose para su posterior análisis.

1.8.- PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Se utilizó el gel Sepharose CL-6B que retiene los polisacáridos con pesos moleculares inferiores a 10³ kDa, para comprobar si las fracciones polisacáridicas obtenidas de *V. fungicola* y *A. bisporus* estaban constituidas por un solo polisacárido o si eran una mezcla de varios, para en tal caso, separar dichos componentes. La columna empleada fue de 1,5 x 90 cm, y se equilibró utilizando NaOH 0,3 M. La muestra se aplicó a la columna depositándola cuidadosamente en la superficie del lecho y a continuación se eluyó con NaOH 0,3 M.

El calibrado de la columna se realizó cargando previamente una mezcla de azul dextrano (2.10³ kDa) así como diferentes dextranos patrones (500, 110 y 40 kDa).

Las muestras se resuspendieron en NaOH 0,3 M y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min para eliminar el material insoluble, utilizándose el sobrenadante para cargar la columna. Las muestras bien disueltas fueron cargadas separadamente en la columna, y recogándose fracciones en un colector.

A continuación se determinó el contenido en carbohidratos por el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), para lo cual se tomaron 50 µl de muestra y se añadieron 250 µl de fenol al 5% en H₂O y 1,25 ml de H₂SO₄, midiendo el valor de la absorbancia a 485 nm.

Las fracciones comprendidas en un pico bien delimitado se reunieron, dializaron y liofilizaron para su posterior análisis.

1.9.- ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS DE *V. fungicola* Y *A. bisporus*

Se realizaron los procesos que se detallan a continuación:

1.- Hidrólisis ácidas

Muestras de fracciones polisacarídicas (5 mg) se hidrolizaron con 1 ml de ácido en distintas condiciones:

- Hidrólisis con H₂SO₄ 4 N durante 5 h a 100 °C
- Hidrólisis con TFA (ácido trifluoroacético) 5 M durante 1 h a 120 °C
- Hidrólisis con TFA 5 M durante 16 h a 100 °C

2.- Derivatización de los azúcares neutros en acetatos de alditol

Después de hidrolizar, se añadió a cada muestra 1 mg de inositol a modo de patrón interno y se procedió a la eliminación del ácido, neutralizando con exceso de BaCO₃ en el caso del H₂SO₄, o por evaporación en rotavapor en el caso del TFA.

Los productos de la hidrólisis de los polisacáridos son sustancias no volátiles, por ello fue necesario derivatizarlos para su posterior identificación por cromatografía gas-líquido (CGL). El proceso de derivatización se realizó según el procedimiento descrito por Laine *et al.* (1972). Después de eliminar el BaCO₃ insoluble por centrifugación, la muestra se desecó en una estufa de aireación resuspendiéndola en 1 ml de H₂O_d. Se añadieron entre 1-10 mg de NaBD₄, dejando reducir durante la noche los monosacáridos formados. Posteriormente, el exceso de borohidruro se eliminó, acidificando con HCl concentrado, desecando en rotavapor y lavando 3 veces con 2 ml de metanol. Se eligieron los acetatos de alditol por producir un único derivado volátil de cada monosacárido, dando lugar a cromatogramas más simples. Para ello se adicionaron 500 µl de (CH₃CO)₂O y 500 µl de piridina, calentando las muestras 1h a 100 °C y desecándolas después en el rotavapor. Los acetatos de alditol fueron identificados mediante CGL de acuerdo con el método utilizado por Gómez-Miranda *et al.* (1981).

3.- Cromatografía gas-líquido (CGL)

Se empleó un equipo de la casa Perkin Elmer, modelo Autosystem, con detector de ionización de llama, utilizándose una columna de sílice fundida SBP-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μm de espesor de la película). El gas portador fue Helio a una presión de 30 psi. Inyector y detector se programaron a una temperatura de 250 °C. Los distintos componentes de la muestra se separaron mediante un programa de temperaturas que comienza isotérmicamente a 180 °C manteniéndose durante 4 min para luego subir a razón de 15 °C min^{-1} hasta los 240 °C, temperatura que se mantiene durante 8 min. El tiempo total del análisis fue de 16 min. El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con los de los patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta de los azúcares.

1.10.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS DISTINTAS FRACCIONES POLISACARÍDICAS DE *V. fungicola* Y *A. bisporus*

1.10.1.- Análisis de metilación

Este tipo de análisis se efectuó para conocer los tipos de unión glicosídica que presentan los polisacáridos de las distintas fracciones sacarídicas.

➤ Obtención de acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAAs)

La metilación efectiva del polisacárido depende del grado de ionización de los hidroxilos libres, por tanto, es fundamental efectuar la reacción en un medio básico con el fin de conseguir que dichos grupos hidroxilo se transformen en alcoxilos. Se utilizó el método de Ciucanu y Kerek (1984) modificado por Needs y Selvendran (1993).

El polisacárido (1-5 mg) se disolvió completamente en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) en un baño ultrasónico. Cuando la solubilización de la muestra fue completa, se utilizó NaOH (50-100 mg) para ionizar los grupos hidroxilos libres, sonicando durante 25 min. A continuación, se enfrió el tubo y se añadieron 0,75 ml de CH_3I ,

sometiendo la muestra de nuevo a sonicación durante 2 horas. Los productos de la reacción se dializaron frente a H₂O durante 48 h, seguidamente frente a etanol-agua (1:1) durante 24 h, y finalmente se evaporaron a sequedad.

El polisacárido metilado se hidrolizó a 100 °C con TFA 5 M durante 1h o 16 h según el caso. La preparación de los acetatos de alditol de los monosacáridos parcialmente metilados se llevó a cabo según el método de Laine *et al.* (1972), con la diferencia de que la reducción de los productos se realizó con NaBD₄, con el fin de introducir un átomo de deuterio en el carbono 1 de cada monómero. Este hecho permite analizar con mayor facilidad los iones presentes en el espectro de masas, ya que todos los fragmentos iónicos que contengan dicho carbono presentarán una unidad de masa más que los que no lo contengan.

➤ **Análisis de espectrometría de masas**

Los acetatos de alditol parcialmente metilados se analizaron mediante cromatografía gas líquido-espectrometría de masas (CGL-EM), en un cromatógrafo de gases con una columna capilar de sílice modelo en Autosystem de Perkin-Elmer, con una columna capilar de sílice fundida SPB-1 (30 m × 0,22 mm; espesor de la película 0,25 μm), y con Helio como gas portador. Se utilizó un programa de temperaturas que comenzaba con 160 °C durante 1 min para luego subir, a razón de 2 °C/min, hasta 200 °C y los compuestos eluidos se detectaron con un detector de masas Q-Mass de Perkin Elmer. La ionización se llevó a cabo por impacto electrónico.

La fragmentación que experimentan los PMAAs mediante impacto electrónico ha sido estudiada con gran detalle por Jansson *et al.* (1976). A partir de los fragmentos primarios y secundarios obtenidos en el espectro de masas se deduce el tipo de sustitución de los monómeros en la mayoría de los casos, excepto en el caso de las furanosas sustituidas en O-5 y las piranosas sustituidas en O-4 (Latgé *et al.*, 1994; Mischnick y De Ruiter, 1994).

La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos en los cromatogramas obtenidos por CGL-EM.

1.10.2.- Espectrofotometría de infrarrojo

La configuración α o β de los monómeros que forman un polisacárido, así como la presencia de grupos de tipo N-acetilo, carboxilo o sulfato pueden ser reconocidas a partir de las bandas de absorción características de su espectro infrarrojo (Barker *et al.*, 1956).

Entre 1 a 3 mg de muestra se pulverizaron, mezclándose seguidamente con 300 mg de KBr para formar una pastilla en una prensa Perkin Elmer. El espectro se analizó en un espectrofotómetro modelo Broker IFS 28 Equinox.

1.11.- ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE *V. fungicola* Y *A. bisporus*

Para analizar las proteínas presentes tanto en las paredes celulares de *V. fungicola* como de *A. bisporus* obtenidas sin y con tratamiento previo con procloraz-Mn, se utilizó la técnica de electroforesis en condiciones disociantes, según el sistema original descrito por Laemmli (1970).

Para extraer las proteínas de las paredes celulares de *V. fungicola* se sometieron a la acción del TFA al 100% (2 ml/100 mg micelio seco) durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 10.000 g durante 15 min, y el TFA fue eliminado del sobrenadante por evaporación en el rotavapor.

Para analizar las proteínas de las paredes celulares de *A. bisporus* se realizaron dos extracciones con tampón PBS pH 6,8 conteniendo 0,2 M de NaCl durante 24 h a 4 °C. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min, y los sobrenadantes obtenidos se precipitaron en ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, se lavaron en etanol frío, y se secaron en una Speedvac.

A continuación, los extractos proteicos se resuspendieron en una mezcla de tampón Tris-HCl 60 mM pH 6,8, 30% de Glicerol, 2 % de SDS, 10 mM de β -mercapto-

etanol y 0,01% de Azul de Bromofenol, calentándolo durante 5 min en un baño de agua a 100 °C y centrifugando para eliminar el material insoluble.

La separación de las proteínas se realizó a pH 8,9 de acuerdo con el método de Davis (1964). Se utilizaron geles de 1 mm de espesor, con un gradiente de concentración de poliacrilamida entre el 7 y el 14 % para el gel de resolución y del 5% para el gel de empaquetamiento. Las electroforesis se realizaron en una cubeta vertical refrigerada a corriente constante de 50 mA para la entrada de la muestra en el gel de empaquetamiento, manteniendo después un voltaje constante de 120 V.

Una vez terminada la electroforesis se procedió a la fijación de las proteínas introduciendo el gel en una solución de etanol, ácido acético, agua destilada (20:10:70) donde se mantuvo al menos 10 min en agitación.

Pasado dicho tiempo, se llevó a cabo la tinción de las proteínas con una solución compuesta por Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0,3 % en metanol, ácido acético, agua destilada (50:10:40) durante 40 min según se describe en Swank y Munkres (1971). Después se decoloró el gel con una solución de metanol, ácido acético, agua destilada (25:10:65).

El gel se equilibró con agua Milli Q y unas gotas de glicerol para proceder a su secado, para lo que se colocó sobre un fragmento de papel de filtro Whatman 3 MM, se cubrió con una lámina de celofán y se introdujo en un secador de geles aplicando calor y vacío para eliminar el agua.

A continuación, se utilizó el densitómetro de Bio-Rad (programa “Image Quant”) para obtener imágenes digitalizadas de dichos geles de poliacrilamida, por lo que, mediante el escaneo del gel se adquirieron unas imágenes de gran exactitud.

Las proteínas empleadas como marcadores de masa molecular fueron: Fosforilasa b (97,4 kDa); Seroalbúmina bovina (66,2 kDa); Ovoalbúmina (45,0 kDa); Anhidrasa carbónica (31,0 kDa); Inhibidor de tripsina (21,5 kDa); Lisozima (14,4 kDa); Aprotinina (6,5 kDa).

1.12.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN: TÉCNICA DE SOMBREADO

Las paredes celulares de las diferentes cepas de *V. fungicola* sin tratar y tratadas con procloraz-Mn se suspendieron en agua destilada, y mediante tratamiento con el desintegrador de Potter se obtuvieron unas suspensiones muy homogéneas. A continuación se colocaron las muestras, en forma de pequeñas gotas, sobre rejillas de Cu previamente cubiertas con una película de Formvar y vaporizadas con carbón.

Una vez evaporada el agua de las muestras, las rejillas se introdujeron en el vaporizador en el que, sobre un filamento de wolframio en forma de ángulo agudo, se colocó el filamento de la aleación Au-Pd a vaporizar. En condiciones de alto vacío se hizo pasar una corriente eléctrica, con lo cual se desprendieron del filamento incandescente partículas finísimas de la aleación que cayeron a modo de lluvia sobre la rejilla con la muestra a un determinado ángulo (15°), consiguiendo un sombreado perfecto. Seguidamente se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 300.

1.13.- EFECTO DE DIFERENTES CEPAS DE *V. fungicola* SIN O CON PRETRATAMIENTO DEL PROCLORAZ-Mn SOBRE CULTIVOS COMERCIALES DE *A. bisporus*

Este estudio fue realizado en colaboración con el CIES, en sus instalaciones de cultivos comerciales y en condiciones de máxima asepsia. Las cepas de *V. fungicola* (CBS, CIES 210 y CIES 100), tanto las controles como las crecidas en presencia de su correspondiente DL₅₀ de procloraz-Mn, fueron utilizadas para inocular cubetas de compost sembradas previamente con *A. bisporus* (cuatro cubetas para cada muestra). La inoculación se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Mamoun *et al.* (1995) que consiste en pulverizar los cultivos de champiñón en el momento que alcanzan la superficie de la capa de cobertura, (aproximadamente seis días después de añadir la citada capa) con suspensiones de esporas de *Verticillium* en agua a una concentración de 10⁶ esporas por metro cuadrado de superficie de cultivo. Paralelamente se prepararon

una serie de testigos, a los que únicamente se les pulverizó con agua, y en ningún momento los cultivos fueron sometidos, como suele ser habitual, al tratamiento rutinario con procloraz-Mn.

La evaluación de los resultados se realizó por contaje del número de champiñones sanos obtenidos en las diferentes cubetas y floradas, recontando paralelamente el número de ejemplares enfermos.

**2. BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA
VERTICILIOSIS DE LOS CULTIVOS INDUSTRIALES
DE CHAMPIÑÓN (*A. bisporus*).**

2.1.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN *V. fungicola*-*A. bisporus* MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Se infectaron experimentalmente carpóforos de *A. bisporus* mediante una suspensión de esporas de *V. fungicola*, la cual, fue obtenida mediante el lavado, con H₂O estéril, de cultivos en placa del patógeno en medio Raper. Dichos carpóforos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 días. Transcurrido este tiempo se tomaron muestras del sombrerillo, y se realizaron diferentes estudios que detallamos a continuación. Como control se utilizaron muestras de carpóforos sanos.

2.1.1.- Microscopía óptica

Para la observación mediante microscopía óptica se prepararon suspensiones en agua del organismo objeto de estudio. Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio de contraste de fase.

2.1.2.- Microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio mediante microscopía electrónica de transmisión se procedió en primer lugar a la fijación, deshidratación, inclusión y polimerización de las muestras.

Las muestras fueron tratadas con glutaraldehído al 2 % en tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 durante 4 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados de 15 min con el mismo tampón. La post-fijación se llevó a cabo con OsO₄ al 2 % en tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 durante 1 h a temperatura ambiente. Tras realizar 4 lavados de 15 min en el mismo tampón, se procedió a la deshidratación de las muestras mediante tratamiento con concentraciones crecientes de acetona (30 % durante 15 min, 50 % durante 15 min, 70 % durante 15 min, 70 % más acetato de uranilo a saturación durante 12 h, seguido de acetona al 90 % durante 15 min y 100 %, 30 min). Posteriormente, las muestras se sumergieron en óxido de propileno durante 1 h, seguido de óxido de propileno más Vestopal 310 W en distintas concentraciones (3:1 durante 1 h, 1:1 durante

1 h, 1:3 durante 12 h) dejando al final las muestras en la estufa a 30 °C, 1 h, para eliminar el óxido de propileno.

La inclusión se realizó con Vestopal W en cápsulas de gelatina, colocando 1 gota de Vestopal en el fondo, y después con la ayuda de una aguja histológica se situó la muestra en el centro de la cápsula, para seguidamente rellenarla de resina. La polimerización se llevó a cabo en una estufa a 30-40 °C durante 12 h y luego a 70 °C durante 12 h.

El tallado del bloque conteniendo la muestra se realizó en una fresadora. Los cortes semifinos de 0,5 a 1 μm de espesor fueron obtenidos mediante un ultramicrotomo con una cuchilla de vidrio. Posteriormente se procedió a la tinción de los cortes con una solución de azul de toluidina al 0,1 %. Dichos cortes se observaron en un microscopio de contraste de fase y se seleccionaron las zonas donde se encontraban los puntos de interés.

Por lo tanto, una vez realizado el estudio de la muestra en el microscopio óptico se procedió a obtener los correspondientes cortes ultrafinos de 300-500 Å de espesor en un ultramicrotomo con cuchilla de diamante. Los cortes obtenidos se depositaron sobre rejillas de cobre de 200 mesh recubiertas con una película de Formvar al 2 % en dicloroetano y se tiñeron con citrato de plomo (Reynolds, 1963).

Las rejillas con las muestras teñidas se observaron y se fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 300.

2.1.3.- Microscopía electrónica de barrido

Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 durante 12 h. La postfijación se hizo con OsO_4 al 2% en tampón fosfato durante 1h. La deshidratación de las muestras se llevó a cabo con cambios, cada 15 min, de acetona al 30%, 50 %, 70 %, y 90 %, y un último cambio con acetona al 100 % durante 8 h. A continuación, las muestras fueron secadas en el punto crítico con CO_2 y cubiertas por una capa de oro de 20 nm. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Philips XL 20.

2.2.-ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN

Se llevaron a cabo ensayos de aglutinación de esporas germinadas de *V. fungicola* con la fracción proteica (**Fp**) extraída de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus*. Para ello se realizaron dos extracciones con tampón PBS pH 6,8 conteniendo 0,2 M de NaCl, a 4°C con agitación magnética, la primera durante 24 h y la segunda durante 1h. Una vez centrifugada la mezcla, durante 20 min a 10.000 rpm, los sobrenadantes se dializaron frente a H₂O_d durante 24 h y se liofilizaron.

La fracción **Fp** se resuspendió en tampón PBS pH 6,8 a una concentración de 1 mg/ml. La incubación de 50 µl de **Fp** con 50 µl de la suspensión de esporas germinadas, se mantuvo a temperatura ambiente en un agitador de balanceo durante 1 h. Transcurrido este tiempo, la muestra se examinó en un microscopio de contraste de fase.

2.3.-INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se realizó para determinar si, el glucogalactomanano extraído de las paredes celulares de *V. fungicola*, estaba implicado en el proceso de unión y/o reconocimiento a *A. bisporus*. Para ello, se emplearon anticuerpos policlonales frente a un polisacárido aislado de las paredes celulares de *Paecilomyces fumosoroseus* que presenta una estructura similar al polisacárido de *V. fungicola*, preparados por Domenech *et al.* (1996). El título del antisuero se determinó mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y correspondió a 1/8000.

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo con el antisuero de *P. fumosoroseus* frente al micelio de *V. fungicola*. Una gota de una suspensión de esporas de *V. fungicola* se depositó sobre una serie de cubreobjetos (10 x 10 mm), y se incubaron seguidamente a 25 °C hasta que las esporas germinasen. Las preparaciones una vez secas, fueron fijadas en una estufa de aireación a 60 °C durante 72 h. El micelio fijado se lavó tres veces con tampón PBS durante 5 min cada vez y con agitación intensa. Después para evitar uniones inespecíficas, se realizó una incubación con PBS-BSA al 3 % durante 30 min a 37 °C en una cámara húmeda. Tras realizar dos lavados, se incubó 1 h con

20 µl del anticuerpo obtenido frente al polisacárido correspondiente, diluido 1/100 en PBS-BSA al 3 %. Las preparaciones se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 45 min en oscuridad con 20 µl de un anticuerpo de cabra rodaminado anti-IgG de conejo diluido 1/50 en PBS-BSA al 3 %. Por último, el micelio se lavó tres veces con PBS en la oscuridad. Las preparaciones montadas sobre un portaobjetos se sellaron con esmalte. El correspondiente control se realizó con suero preinmune.

En segundo lugar, tanto el micelio agregado como el micelio vegetativo de *A. bisporus* se disgregaron en H₂O con la ayuda de un homogeneizador Potter. Después de realizar varios lavados para eliminar el contenido citoplasmático, que pudiera haberse liberado al romper alguna hifa, se tomaron gotas de la suspensión de las hifas, tanto del micelio agregado como del vegetativo, colocándolas en cubreobjetos (10 x 10 mm). Las preparaciones después de secas, se fijaron en una estufa de aireación a 60 °C durante 72 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se incubaron durante 1 h con 20 µl de una solución de la fracción polisacáridica del glucogalactomanano purificado de las paredes celulares de *V. fungicola* en tampón PBS (1 mg/ml). Después de la incubación y de realizar dos lavados con PBS, las preparaciones se volvieron a desecar en la estufa de aireación a 60 °C durante una noche. Seguidamente se llevó a cabo el ensayo de inmunofluorescencia en las mismas condiciones que hemos descrito para el ensayo con el micelio de *V. fungicola*. Como control negativo se utilizaron preparaciones que no habían sido tratadas con la fracción polisacáridica en PBS.

Las fotografías se realizaron con película Kodak TriX en un microscopio Zeiss Axioplan equipado para epifluorescencia. Se utilizó un objetivo de inmersión Plan Achromat de 63 aumentos con los filtros apropiados para la rodamina.

2.4.- PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE *V. fungicola* IMPLICADA EN EL CONTACTO CON *A. bisporus*

La proteína implicada en el mecanismo de contacto del patógeno *V. fungicola* fue purificada tanto a partir del medio de cultivo como del micelio vegetativo de dicho microorganismo. La purificación de la proteína secretada por *V. fungicola* al medio se

llevó a cabo según Calonje *et al.* (2002), y la del micelio fue solubilizada siguiendo el procedimiento descrito por Askolin *et al.* (2001). Las correspondientes proteínas del hospedador *A. bisporus* fueron purificadas y caracterizadas previamente tanto en micelio vegetativo como agregado por Lugones *et al.* (1996,1998).

2.4.1.- Purificación de la proteína del medio de cultivo

V. fungicola se cultivó estáticamente en medio mínimo sintético durante 7 días a 25 °C. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos se filtraron con filtros Millipore de tamaño de poro de 0,8 µm. La concentración de las muestras se llevó a cabo precipitando las proteínas con sulfato amónico al 80% de saturación. Para ello se añadió lentamente y en frío la cantidad de (NH₄)₂SO₄ necesaria para conseguir el grado de saturación deseado (Englard y Seifter, 1990). Una vez disuelta la sal, la solución se dejó toda la noche a 4°C, y transcurrido dicho tiempo se centrifugó a 10.000 g durante 30 min, obteniéndose un precipitado que se resuspendió en tampón acetato sódico 50 mM pH 5,0 conteniendo 0,1 M NaCl y que se dializó frente al mismo tampón.

La purificación se llevó a cabo mediante sucesivas técnicas cromatográficas que se describen a continuación.

2.4.1.1.- Cromatografía de exclusión molecular

Primeramente se realizó una columna de filtración molecular, en este caso, con el gel Sephadex G100 que se empaquetó en una columna (90 x 1,5 cm) y se equilibró utilizando el tampón acetato sódico 50 mM pH 5,0 con 0,1 M NaCl. La muestra se aplicó cuidadosamente en la superficie del lecho y se eluyó con dicho tampón. La determinación de la concentración de proteínas de cada fracción se realizó mediante la medida de la absorbancia a 280 nm, que se basa en la capacidad que tienen los aminoácidos aromáticos, presentes en las proteínas en solución, de absorber luz ultravioleta con dicha longitud de onda.

Las fracciones donde se eluyó la proteína de interés, que se detecta, a su vez, por la formación de un precipitado lechoso después de la agitación de cada tubo, se combinaron y se concentraron por diálisis inversa (30% polietilenglicol 20.000), y seguidamente se dializaron frente a tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,7.

2.4.1.2.- Cromatografía de adsorción sobre hidroxiapatito

Posteriormente, se llevó a cabo dicha cromatografía de adsorción. El hidroxiapatito es una forma cristalina de fosfato cálcico que, convenientemente pulverizada, puede emplearse como fase estacionaria. La adsorción se basa en la interacción entre los iones Ca^{+2} del hidroxiapatito y las cargas negativas de las proteínas.

El hidroxiapatito se empaquetó en una columna de 0,9 x 15 cm y se equilibró con tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,7. La muestra se eluyó con el mismo tampón ya que los iones fosfato compiten con los ligandos carboxílicos para unirse al Ca^{+2} , produciéndose así la elución deseada. Se midió la absorbancia a 280 nm, y aquellas fracciones con la proteína objeto de estudio se recogieron, se concentraron y fueron dializadas frente a tampón acetato sódico 50 mM pH 5,0.

La membrana de diálisis que se utilizó a lo largo de este experimento fue de 3500 Da.

2.4.2.- Purificación de la proteína del micelio de *V. fungicola*

El micelio fresco de *V. fungicola* fue extraído con tampón Tris-HCl 100 mM pH 9,0 conteniendo 1% de SDS, a temperatura ambiente durante 1h. Pasado dicho tiempo, el micelio se centrifugó a 8.000 rpm durante 25 min. El SDS fue eliminado del sobrenadante por precipitación con 2M KCl. Los extractos proteicos obtenidos se dializaron frente a H_2O , utilizándose también en este caso membrana de diálisis de 3500 Da. La concentración del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el pH de la muestra se ajustaron a 0,6 M y pH 7,5 respectivamente. A continuación, se llevó a cabo la purificación mediante la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica.

2.4.2.1.- Cromatografía hidrofóbica

La interacción hidrofóbica se emplea cuando la adsorción de los solutos se debe a interacciones hidrofóbicas, o mejor, a la asociación entre compuestos hidrofóbicos, promovida por un entorno acuoso, para disminuir los contactos agua-soluto apolar.

Esta cromatografía de interacción se llevó a cabo en una columna de Phenyl Sepharose 6 FF (0,9 x 30 cm), y se equilibró con tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5 con 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se eluyó una fracción con H_2O y otra al aplicar un gradiente de 20 mM a 100 mM en el mencionado tampón. Una vez leída la absorbancia a 280 nm, la muestra de interés se congeló y se liofilizó para su posterior estudio.

2.5.- PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE *A. bisporus* IMPLICADA EN EL MECANISMO DE RECONOCIMIENTO

La proteína implicada en el proceso de reconocimiento entre los dos organismos fue purificada de los carpóforos o micelio agregado de *A. bisporus* siguiendo el procedimiento descrito por Wang *et al.* (2002), ligeramente modificado.

Aproximadamente 1000 g de cuerpos fructíferos frescos de *A. bisporus* se homogeneizaron con el Polytron en tampón PBS pH 6,8 conteniendo 0,15 M NaCl. La mezcla se mantuvo en constante agitación durante toda la noche, y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min. Después se llevó a cabo la precipitación de las proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre el 30-100% de saturación. La solución se dejó toda la noche a 4°C, y transcurrido este tiempo se centrifugó a 7.000 rpm durante 15 min, obteniéndose un precipitado que se resuspendió y se dializó extensamente frente a tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Posteriormente se llevó a cabo la purificación mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular.

2.5.1.- Cromatografía de intercambio iónico

Esta cromatografía es un método de separación de sustancias basado en las diferencias de carga eléctrica y de la K_a de los grupos ionizables de las mismas. Para este estudio se han utilizado los dos tipos de intercambiadores iónicos.

La muestra dializada se aplicó a una columna de intercambio aniónico (High Q Support) (1,5x30 cm), que se equilibró con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,4. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente continuo de NaCl (de 50 mM a 1M) en el mismo tampón. Una vez que la muestra eluida fue concentrada y dializada frente a tampón acetato sódico 10 mM pH 4,5, se aplicó a una columna de

intercambio catiónico (High S Support) (0,9x30cm) equilibrada con dicho tampón. A continuación, la columna se lavó con el tampón acetato sódico 10 mM pH 4,5 comprobando si la proteína de interés se quedaba o no retenida en la matriz, para aplicar en caso afirmativo un gradiente continuo de 0-1M NaCl en el mismo tampón.

2.6.- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

2.6.1.- Cromatografía de filtración molecular

Se realizó una cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100, calibrando la columna con proteínas de peso molecular conocido (seroalbúmina bovina 66 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y lisozima 14,3 kDa), con objeto de conocer el peso molecular aproximado de la proteína.

2.6.2.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

2.6.2.1.- Electroforesis en condiciones no disociantes

Las muestras se resuspendieron en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, Glicerol al 10 % y 0,002 % de Azul de Bromofenol. La separación de proteínas se realizó en una cubeta refrigerada de acuerdo con el método de Davis (1964).

2.6.2.2.- Electroforesis en condiciones disociantes

Para este tipo de electroforesis se añade SDS al 1 % en la preparación del gel y del tampón de electroforesis, según se ha descrito anteriormente.

2.6.3.- Tinciones específicas de proteínas en geles de poliacrilamida

2.6.3.1.- Tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250

Este tipo de tinción, al ser la más común de ellas, fue descrito previamente para detectar las proteínas extraídas de las paredes celulares de *V. fungicola* y *A. bisporus*.

2.6.3.2.- Tinción de plata

La tinción de plata se llevó a cabo siguiendo el método de Heukeshoven y Dernick (1988) ligeramente modificado.

Las proteínas se fijaron en una solución de etanol, ácido acético, agua destilada (50:10:40) durante 45 min y en etanol, ácido acético, agua destilada (5:1:94) durante 30 min. Después de realizar 3 lavados con H₂O_d (5 min cada uno), el gel se introdujo en una solución de Na₂S₂O₃ (0,2 g/l) durante 1 min y se lavó con H₂O_d 3 veces (30 segundos cada vez). La tinción propiamente dicha se llevó a cabo incubando el gel en una solución de nitrato de plata 12 mM con 3ml/l de formaldehído al 37 %, en la oscuridad durante 20 min, al cabo de los cuales se realizaron 2 lavados con H₂O_d, revelándose con una solución de Na₂CO₃ (0,2g/l) y 0,5 ml/l de formaldehído al 37 %. Este paso requiere al menos dos cambios rápidos de la solución para prevenir la precipitación de las sales de plata en la superficie del gel. Cuando las bandas de proteína fueron visibles, se paró la reacción con una solución de ácido acético al 5 %.

2.6.3.3.- Tinción con ácido periódico-Schiff (PAS)

Para la identificación de glicoproteínas se utilizó el método de Segrest *et al.* (1971) ligeramente modificado.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se fijaron en una solución de etanol, ácido acético, H₂O_d (40:5:55) durante toda la noche a temperatura ambiente, y seguidamente se hicieron dos incubaciones consecutivas, una de 2 a 3 h con H₅IO₆ al 0,7%, y otra con Na₂S₂O₅ al 0,2% durante el mismo tiempo. Después de realizar dos lavados con H₂O_d, se llevó a cabo la tinción de las glicoproteínas con el reactivo Schiff comercial durante 12 h a temperatura ambiente, y a continuación el gel se introdujo en ácido acético al 7,5%.

2.6.4.- Ionización/desorción por láser asistida por matriz-espectrometría de masas de tiempo de vuelo: MALDI-TOF

Esta técnica se utiliza para la determinación de la masa molecular de proteínas mediante la ionización correspondiente (Karas y Hillenkamp, 1988). Para obtener la

señal, la muestra en solución se mezcló con un exceso de la “matriz” adecuada (aproximadamente 10^4 veces), y se dejó cristalizar sobre un portamuestras para bombardearla con un láser. Los compuestos empleados como matrices son moléculas orgánicas de pequeño tamaño (las más corrientes son el ácido α -ciano-hidroxicinámico, el ácido sináptico y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico). Su función es diluir la muestra y absorber la mayor parte de la radiación del láser, consiguiéndose así el paso de la muestra sólida a la fase gaseosa, produciendo iones de la proteína intacta. La masa de estos iones se mide mediante un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF).

La matriz utilizada fue una solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico a una concentración de 10 mg/ ml en agua: acetonitrilo (2: 1 v/v) con un 0,1 % de TFA. 2 μ l de esta disolución se mezclaron con 2 μ l de muestra (50-100 pmoles/ μ l). Los espectros de masas se recogieron en un equipo modelo Biflex, calibrado con insulina antes del análisis.

La elevada sensibilidad de la técnica de MALDI-TOF, unida a su simpleza y flexibilidad la hacen idónea para el análisis de la masa no solo de péptidos y proteínas, sino también de otros biopolímeros como oligonucleótidos, oligosacáridos, etc.

2.6.5.- Deglicosilación de la proteína

Para comprobar la posible glicosilación de la proteína se sometió la muestra purificada a la acción de la endo- β -N-acetilglucosaminidasa H según el método de Pastor *et al.* (1948). Seguidamente se efectuó la electroforesis en condiciones disociantes y la banda polipeptídica obtenida se tiñó tanto con el reactivo de ácido periódico-Schiff, como con Coomassie y/o plata.

2.6.6.- Análisis de aminoácidos y secuencia N-terminal

La composición de aminoácidos de la diferentes muestras se determinó según el método de Bidlingmeyer *et al.* (1984). Primeramente se hidrolizó la muestra con HCl 6N en fase gaseosa a 110 °C durante 24 h, y luego los aminoácidos se detectaron mediante derivatización postcolumna con ninhidrina usando un analizador Biochrom 20.

Por otro lado, se procedió a analizar la secuencia N-terminal mediante la reacción denominada degradación de Edman en un secuenciador automático de pulso líquido Modelo 494 (Applied Biosystems Procise).

2.6.7.- Espectros de absorción y de fluorescencia

Los espectros de absorción de la proteína purificada fueron realizados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 330, con una concentración de 0,45 mg/ml en tampón acetato sódico 50mM, pH 5,0.

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, con sensibilidad alta y velocidad media de registro, con cortes de excitación de 5 nm y de emisión de 10 nm. La longitud de onda para los espectros de excitación fue de 342 nm, mientras que, la de emisión fue de 280 nm. El tampón utilizado fue el mismo que en los espectros de absorción.

2.6.8.- Microscopía electrónica de transmisión de la proteína purificada mediante la técnica de sombreado

Se realizó sobre las muestras de la proteína purificada, según expusimos anteriormente para detectar las estructuras en la superficie de las paredes celulares de *V. fungicola* y *A. bisporus*.

2.6.9.- Ensayos de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación

Los ensayos de hemoaglutinación se llevaron a cabo mezclando 50 µl de una dilución seriada de la proteína con 50 µl de una suspensión al 2% de eritrocitos de carnero en tampón PBS pH 7,2 a 20 °C. La mezcla se mantuvo durante 4 h a temperatura ambiente, y transcurrido este tiempo, se analizaron los resultados obtenidos.

Una unidad de hemoaglutinación se define como la dilución más alta que muestra

hemoaglutinación. La actividad específica se expresa como el número de unidades de hemoaglutinación por mg de proteína.

Los ensayos de inhibición de la hemoaglutinación se hicieron de manera análoga a los test de aglutinación. Primeramente, se mezclaron 25 μ l de una dilución seriada de diferentes azúcares en tampón PBS pH 7,2 a 20 °C con 25 μ l de la solución problema con 8 unidades de hemoaglutinación. La mezcla se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente, y entonces se mezcló con 50 μ l de una suspensión al 2% de eritrocitos de carnero en tampón PBS pH 7,2 durante 4 h, observándose posteriormente cual es la concentración mínima del azúcar capaz de inhibir completamente las 8 unidades de hemoaglutinación.

Tanto los ensayos de hemoaglutinación como de inhibición se realizaron en placas de microtitulación en forma de U.

APARATOS Y MATERIALES EMPLEADOS

Agitador de tubos Bortimixer 68

Analizador Biochrom 20 (Amersham Pharmacia Biotech)

Balanza analítica Mettler AE 100

Balanza eléctrica Oertling TP 41

Baño estático Memmert Mod. 845

Baño estático Memmert Mod. WB 22

Baño estático Büchi B-480

Baño ultrasónico Selecta

Batidora Braun Minipimer MR-63

Bomba de membrana Vacuumbrand MZ 2C

Bomba peristáltica Econo-Column (Bio-Rad)

Cámara digital Olympus Camedia E-10

Centrífuga Microfuge

Centrífuga Sorvall con rotores GSA y SS34

Centrífuga EBA 12R

Colector LKB Bio-Rad

Columna de cromatografía K(9/15) de Pharmacia

Columna de cromatografía K(9/30) de Pharmacia

Columna de cromatografía K(15/30) de Pharmacia

Columna de cromatografía K(15/90) de Pharmacia

Cromatógrafo de gases modelo Perkin-Elmer Autosystem

Cubeta de electroforesis Mini-Protean II Electrophoresis Cell de Bio-Rad.

Densitómetro Bio-Rad (Modelo GS-800)

Desecador de geles Hoefer SE 540

Espectrómetro de masas modelo Biflex de la casa Bruker

Espectrofotómetro de infrarrojo Perkin-Elmer 457

Espectrofotómetro ultravioleta-visible Perkin-Elmer Lambda-1

Espectrofotómetro modelo Broker IFS 28 Equinox

Espectrofotómetro de fluorescencia Shimadzu-RF

Estufa Kowel C2-I

Estufa Memmert

Fuente de alimentación para electroforesis Bio-Rad 1000/500

Homogeneizador Polytron PCU 8-EU

Horno WC Herau Hanau Typ KR 170

Liofilizador New Brunswick Scientific Co.

Microscopio electrónico de barrido Philips XL20

Microscopio electrónico de transmisión Philips EM 300

Microscopio óptico de contraste de fase Olympus modelo BX 50

Microscopio Zeiss Axioplan

pH-metro Radiometer 62 Standar

Rotavapor Büchi w. R7661

Speedvac Savant (SC 100)

Ultramicrotomo Reichert Ultracut-E

Ultramicrotomo Reichert MU 3

Todos los reactivos, salvo los que se menciona aquí, son de grado analítico y proceden de la firma Merk.

Acrilamida y bisacrilamida (Bio-Rad)

Agar (Pronadisa)

Anticuerpo de cabra rodaminado anti-IgG de conejo (Sigma)

Antrona (Sigma)

Azul de Coomassie R-250 y G-250 (Bio-Rad)

Borohidruro sódico (Sigma)

Borohidruro sódico deuterado (Sigma)

Eritrocitos de carnero (Biomedics)

Endo-H (Sigma)

Phenyl Sepharose 6 FF (Pharmacia)

Formvar (Serva)

Hidroxiapatito (Bio-Rad)

High Q Support (Bio-Rad)

High S Support (Bio-Rad)

Membrana de diálisis (Spectrum) (3500 Da)

Membrana de diálisis (Medicell Internacional Ltd.) (12-14000 Da)

Patrones de peso molecular para electroforesis nativa y desnaturalizante (Sigma)

Patrones de peso molecular para gel de filtración (Pharmacia)

Reactivo de Schiff (Bio-Rad)

SDS (Bio-Rad)

Seroalbúmina bovina (Sigma)

Sepharose CL-6B (Pharmacia)

Sephadex G-100 (Pharmacia)

Tetróxido de osmio (Polysciences)

Temed y persulfato amónico (Bio-Rad)

Vestopal W

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL MODO DE ACCIÓN DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn SOBRE LAS PAREDES CELULARES DE *V. fungicola* Y *A. bisporus*.

1.1.- MICROORGANISMOS EMPLEADOS

El estudio de la morfología del micoparásito *V. fungicola* (Fig. 7) se llevó a cabo mediante la observación al microscopio óptico y electrónico de barrido, para lo cual se tomó muestra del microorganismo crecido en medio Raper. Las colonias de *V. fungicola* crecidas en placa muestran, como casi todos los hongos, forma redondeada debido al crecimiento radiado, de un color blanco o crema pálido. Mediante microscopía óptica se observó que el micelio presenta verticilos característicos con conidios de forma elipsoidal a cilíndrica.

Las colonias de *A. bisporus* crecidas en placa muestran igualmente crecimiento radial y son de color blanco. Mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido se observaron las hifas, tanto del micelio vegetativo como del agregado, presentando las primeras unos característicos cristales de oxalato cálcico cuando crecen en el medio de compost, mientras que las segundas son de mayor grosor y forman bloques de hifas agregadas. Finalmente los basidios situados en la superficie de las lamelas ostentan las dos esporas características de la especie (Fig. 8).

1.2.- EVALUACIÓN DE LA DOSIS LETAL₅₀ DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn EN AMBOS ORGANISMOS

Durante los últimos años, en los cultivos industriales de champiñón se viene realizando un tratamiento preventivo con el fungicida procloraz-Mn para controlar la verticiliosis, por lo que, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido estudiar el efecto producido por el fungicida sobre el micelio del micopatógeno y a la vez también sobre el hospedador al tratarse también de un hongo.

En el caso del patógeno *V. fungicola* el estudio se realizó sobre las tres cepas ya citadas y aisladas en diferentes periodos de tiempo: *V. fungicola* CBS fue aislada en 1969 antes de la utilización de los fungicidas, por lo que, se puede considerar como control, y *V. fungicola* CIES 210 y 100 corresponden a aislamientos realizados en los

años 1992 y 2000 respectivamente, cuando se sospechaba y después se comprobaba la posible resistencia del patógeno al procloraz-Mn. En cuanto al hospedador *A. bisporus* solamente se utilizó la cepa Fungisem H₂₅, que es una de las más cultivadas comercialmente para su consumo en España.

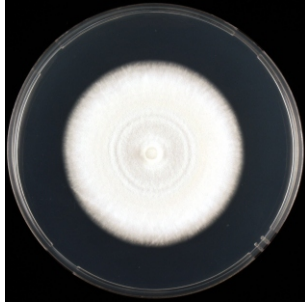
Tanto *V. fungicola* como *A. bisporus* se cultivaron en medio Raper con diferentes concentraciones de procloraz-Mn (como ha sido descrito en Materiales y Métodos), para determinar sus respectivas DL₅₀. En las Fig. 9 y 10 se observan una serie de cultivos en frascos Roux y en placa de los dos organismos frente a diversas concentraciones del fungicida.

Como ya se ha mencionado anteriormente la cantidad de procloraz-Mn necesaria para alcanzar el 50% de inhibición del crecimiento micelial (DL₅₀) de cada organismo se calculó a partir de los valores del peso seco del micelio obtenido en medio líquido con diferentes concentraciones de fungicida durante el mismo periodo de tiempo, puesto que la evaluación a partir de las medidas de crecimiento en placa es menos exacta.

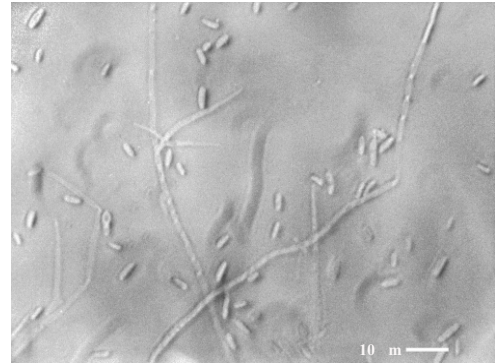
En la Tabla 5 se muestran las DL₅₀ estimadas tanto para el micelio vegetativo de *A. bisporus* como para las distintas cepas de *V. fungicola*, apreciándose claramente el incremento sufrido por la DL₅₀ correspondiente a *V. fungicola* a lo largo del tiempo de utilización rutinaria de fungicidas.

Tabla 5. Valores de la DL₅₀ obtenidos en ambos organismos

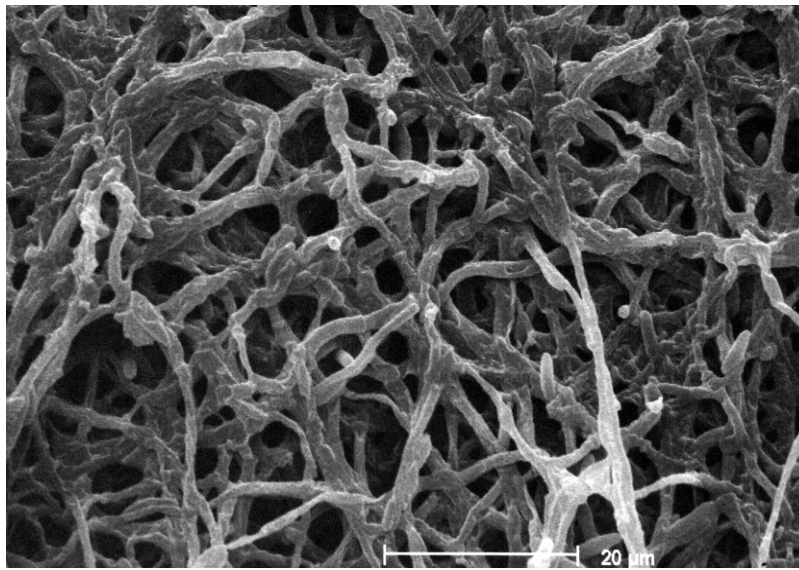
		DL ₅₀ (ppm)	DL ₅₀ (mg/l)
<i>A. bisporus</i>	Fungisem H ₂₅	0,3	0,34
<i>V. fungicola</i>	CBS	0,5	0,57
	CIES 210	1,5	1,71
	CIES 100	3,5	3,99



Micelio vegetativo



Verticilos y conidios en el microscopio óptico

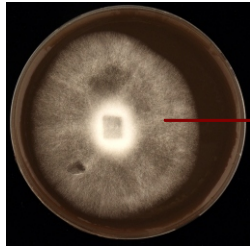


Hifas en el microscopio electrónico de barrido

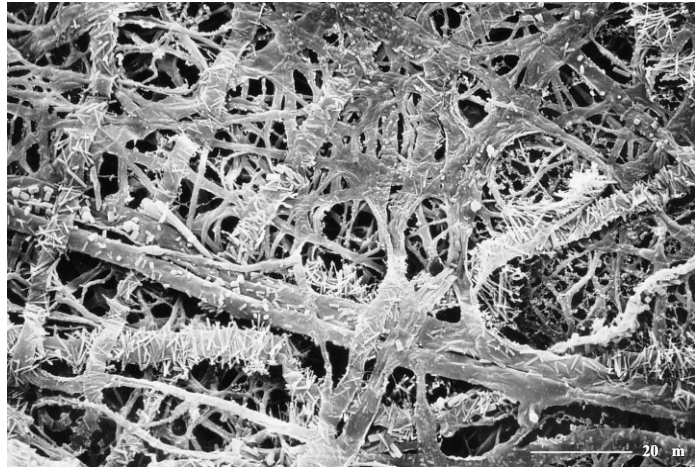


Conidióforos en el microscopio electrónico de barrido

Fig.7. Verticillium fungicola



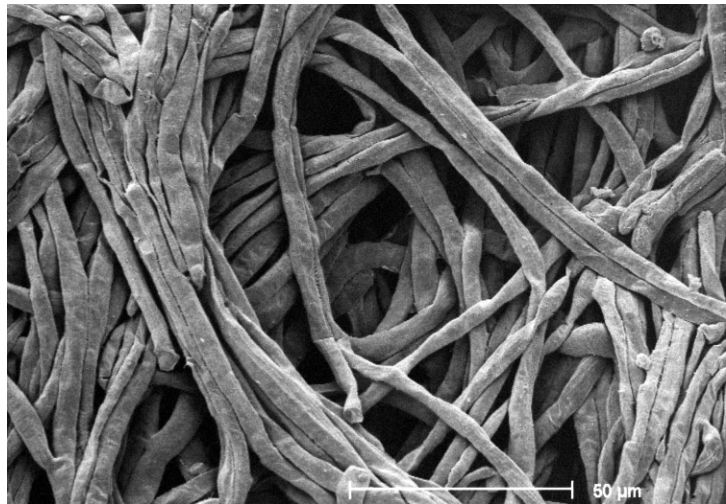
Micelio vegetativo



Cristales de oxalato



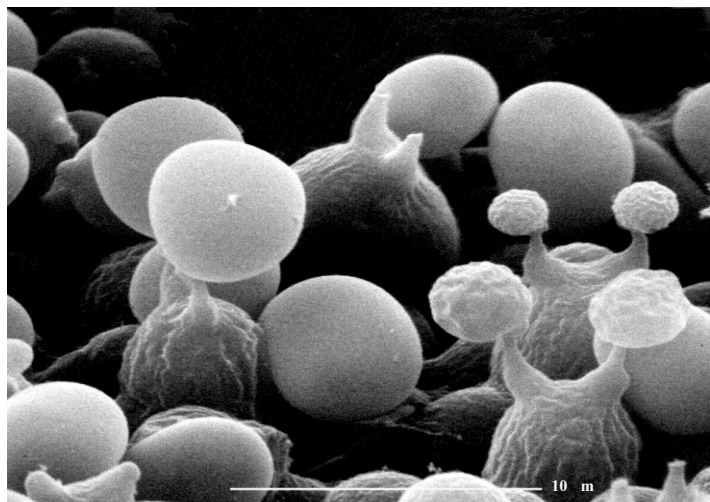
Carpóforo



Hifas del carpóforo

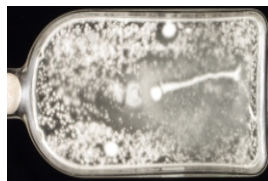


Lamelas



Basidios y basidiosporas

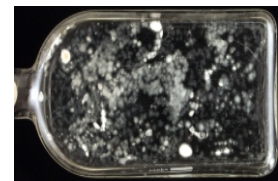
Fig. 8. Agaricus bisporus



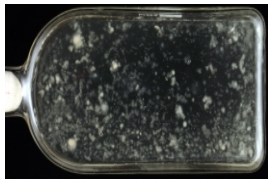
0 ppm
(0 mg/L)



0,1 ppm
(0,11 mg/L)



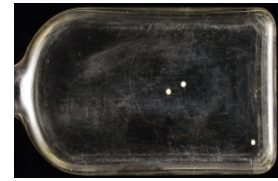
0,5 ppm
(0,57 mg/L)



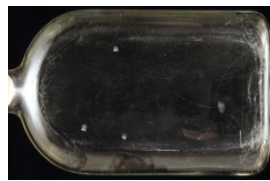
1 ppm
(1,14 mg/L)



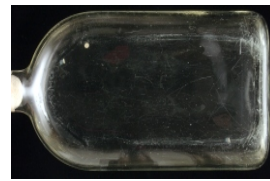
2,5 ppm
(2,85 mg/L)



5 ppm
(5,7 mg/L)



10 ppm
(11,4 mg/L)

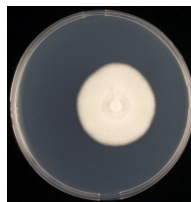


20 ppm
(22,8 mg/L)

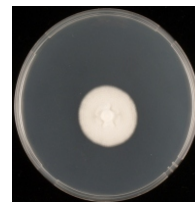
Medio líquido



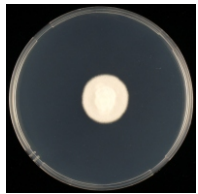
0 ppm



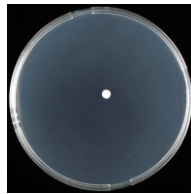
0,1 ppm



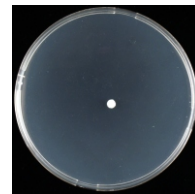
0,5 ppm



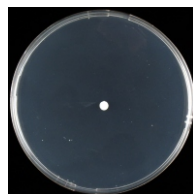
1 ppm



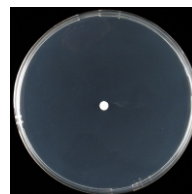
5 ppm



2,5 ppm



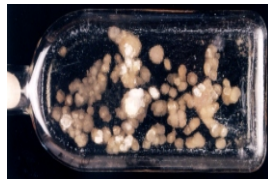
10 ppm



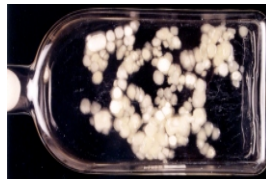
20 ppm

Medio sólido

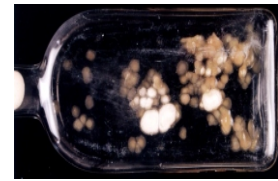
Fig. 9. DL₅₀ de *V. fungicola* CBS



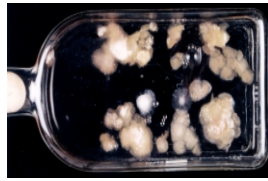
0 ppm
(0 mg/L)



0,1 ppm
(0,11 mg/L)



0,5 ppm
(0,57 mg/L)



1 ppm
(1,14 mg/L)



2,5 ppm
(2,85 mg/L)



5 ppm
(5,7 mg/L)



10 ppm
(11,4 mg/L)

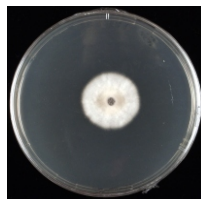


20 ppm
(22,8 mg/L)

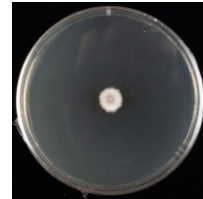
Medio líquido



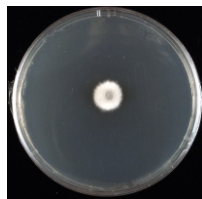
0 ppm



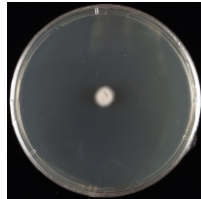
0,1 ppm



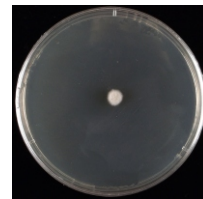
0,5 ppm



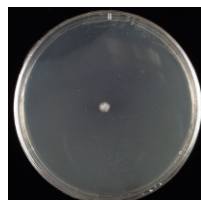
1 ppm



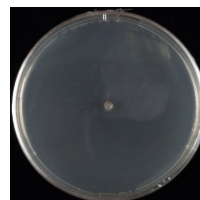
5 ppm



2,5 ppm



10 ppm



20 ppm

Medio sólido

Fig. 10. DL₅₀ de *A.bisporus*

1.3.- COMPOSICIÓN QUÍMICA GLOBAL DE LAS PAREDES CELULARES DE *V. fungicola* Y *A. bisporus*

De forma general, podemos señalar que las paredes celulares de *V. fungicola* y de *A. bisporus*, tanto sin tratar como tratadas con el fungicida, están constituidas por carbohidratos neutros y en menor proporción por proteínas, lípidos y aminoazúcares, como en la mayoría de los hongos.

La composición química global de las paredes celulares de las cepas (CBS, CIES 210 y CIES 100) de *V. fungicola* sin y con fungicida se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición química global de las paredes celulares de las tres cepas de *V. fungicola* sin tratar y tratadas con procloraz-Mn

COMPONENTES Peso seco (%)	CBS		CIES 210		CIES 100	
		+F		+F		+F
Azúcares neutros	45,1	49,5	50,5	53,1	50,6	53,7
Proteínas	25,1	21,0	18,0	9,9	17,8	16,5
Hexosaminas	15,2	14,5	13,9	20,9	14,7	14,2
Lípidos	12,0	12,6	14,1	11,9	13,8	13,0
Cenizas	0,5	0,6	0,4	1,3	0,5	0,4
Recuperación	97,9	98,2	96,9	97,1	97,4	97,8

Las cifras son la media de, al menos, cuatro determinaciones

El componente mayoritario de las paredes celulares de las tres cepas de *V. fungicola* en ausencia de procloraz-Mn, corresponde a los azúcares neutros que representan entre 45-51% del peso seco de la pared. Las proteínas muestran un porcentaje muy alto (25%) en la cepa CBS (cepa control), siendo éste menor en las cepas CIES 210 (18%) y CIES 100 (17,8%). En cuanto al resto de los componentes, aminoazúcares, lípidos y cenizas no se han encontrado diferencias reseñables entre las cepas de *V. fungicola*.

Con respecto al análisis químico de las paredes celulares de las diferentes cepas de *V. fungicola* en presencia de procloraz-Mn, podemos apreciar que los carbohidratos neutros se mantienen dentro del mismo rango del peso seco de la pared (50-54%). Las proteínas muestran un porcentaje todavía relativamente alto en la cepa CBS (21%), que disminuye en las otras dos cepas estudiadas (9,9% y 16,5%, respectivamente), mientras que los demás componentes (hexosaminas, lípidos y cenizas) no presentan ninguna variación significativa.

A la vista a todos estos resultados, se puede decir, que en las paredes celulares de las cepas CIES 210 y CIES 100 observamos una disminución en el porcentaje de proteínas con respecto a la cepa control (CBS), que se acentúa algo más cuando las paredes de las distintas cepas son tratadas con procloraz-Mn, y dicha inhibición se compensa con un ligero aumento en los polisacáridos neutros. En cuanto a los otros componentes no se observan variaciones apreciables con excepción de las hexosaminas de la cepa CIES 210.

El análisis químico global de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A.bisporus* sin tratar y tratado con procloraz-Mn se observa en la Tabla 7. En ella se aprecia, que casi el 60% del peso seco de las paredes celulares sin tratar con fungicida corresponde a los carbohidratos neutros, en menor proporción a los aminoazúcares, proteínas, lípidos y por último a las cenizas.

Cuando las paredes celulares han sido tratadas con el fungicida, observamos que también están constituidas principalmente por azúcares neutros (alrededor del 58%), pero muestran una disminución en el porcentaje de las proteínas (7,5%) con respecto a las paredes sin fungicida, que se compensa con el aumento en la proporción de los aminoazúcares (18,9%), manteniéndose prácticamente igual el porcentaje de los lípidos y de las cenizas.

Tabla 7. Composición química global de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* sin y con procloraz-Mn

COMPONENTES Peso seco (%)	<i>A. bisporus</i>	<i>A. bisporus</i> + F
Azúcares neutros	59,5	57,8
Proteínas	11,4	7,5
Hexosaminas	14,3	18,9
Lípidos	8,6	8,7
Cenizas	4,4	4,2
Recuperación	98,2	97,1

Las cifras son la media de, al menos, cuatro determinaciones

1.4.- FRACCIONAMIENTO DE LAS PAREDES CELULARES

Con la finalidad de solubilizar lo más selectivamente posible los polisacáridos neutros que forman la estructura de las paredes celulares de ambos organismos, se sometieron éstas a la serie de extracciones ya descritas, obteniéndose al final una fracción residual insoluble.

1.4.1.- Fraccionamiento de las paredes celulares de *V. fungicola* sin tratar y tratadas con procloraz-Mn

Las paredes celulares de *V. fungicola* sometidas a su correspondiente extracción, dio lugar a cuatro fracciones sacarídicas (**F1**, **F2S**, **F2I**, y **F3**). Los porcentajes en peso seco y azúcares neutros de cada una de las fracciones obtenidas de las paredes celulares de las diferentes cepas de *V. fungicola* se especifican en la Tabla 8.

Tabla 8 Porcentaje en peso seco y azúcares neutros de las fracciones obtenidas a partir de las paredes celulares de las tres cepas de *V. fungicola* en ausencia y presencia de fungicida

Fracciones	Cepas	% peso seco	% azúcares neutros
F1	CBS	12,5	66,4
	+ <i>F</i>	11,4	67,2
	CIES 210	9,5	65,7
	+ <i>F</i>	7,4	66,4
	CIES 100	8,8	65,6
	+ <i>F</i>	6,7	66,7
F2S	CBS	14,1	60,2
	+ <i>F</i>	13,3	59,9
	CIES 210	12,4	59,7
	+ <i>F</i>	13,4	59,4
	CIES 100	13,9	59,2
	+ <i>F</i>	14,4	60,3
F2I	CBS	15,9	6,3
	+ <i>F</i>	16,1	5,9
	CIES 210	16,4	5,7
	+ <i>F</i>	15,1	5,9
	CIES 100	15,0	6,0
	+ <i>F</i>	13,8	5,9
F3	CBS	27,5	51,6
	+ <i>F</i>	29,3	50,2
	CIES 210	33,5	49,0
	+ <i>F</i>	35,3	48,3
	CIES 100	35,5	50,0
	+ <i>F</i>	36,1	49,5

Los datos son la media de, al menos, cuatro determinaciones

Se puede ver que la fracción aparentemente más afectada por la acción del procloraz-Mn corresponde a la fracción **F1**, puesto que presenta una disminución significativa en el peso seco de la pared en todas las cepas. Las fracciones **F2S** y **F2I** presentan un porcentaje similar del peso seco (alrededor de un 12-15 %), mientras que la fracción mayoritaria, **F3** representa entre un 27-36 % del peso de la pared.

La suma de dichos porcentajes proporciona una recuperación entre un 70-72% sobre el peso seco inicial de las paredes, y esta recuperación se debe a la dificultad de eliminar completamente el contenido citoplasmático al tener *V. fungicola* unas hifas muy finas. Esta circunstancia hace que se produzca un pequeño error en el peso seco de partida por contaminantes, que luego serán eliminados al no precipitar durante el proceso de extracción de las fracciones.

La composición de las fracciones de las paredes celulares de las tres cepas de *V. fungicola* sin o con fungicida no presentan diferencias apreciables. Las fracciones **F1** y **F2S** contienen un porcentaje de azúcares entre un 59-67 % y el resto está constituido por proteínas. La fracción **F2I** es fundamentalmente una fracción lipídica (alrededor de un 88 %), por lo que, presenta un muy bajo porcentaje de azúcares neutros. Y por último, la fracción **F3** está constituida por carbohidratos neutros (50%) y por aminoazúcares (que forman parte del complejo glucano-quitina).

1.4.2.- Fraccionamiento de las paredes celulares de *A. bisporus* obtenidas en ausencia y presencia del procloraz-Mn

Según se describe en el apartado de materiales y métodos, las paredes celulares de *A. bisporus* fueron sometidas a una serie de extracciones específicas sucesivas, obteniéndose así seis fracciones sacarídicas (**FI, FII, FIII, FIV, FV** y **FVI**).

En la Tabla 9 se especifican los porcentajes en peso seco y azúcares neutros de cada una de las fracciones de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* sin tratar y tratado con fungicida.

Tabla 9. Porcentaje en peso seco y azúcares neutros de las fracciones obtenidas a partir de paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* sin tratar y tratadas con fungicida

Fracciones	Micelio vegetativo	% peso seco	% azúcares neutros
FI	<i>A. bisporus</i>	27,4	61,9
	+ <i>F</i>	28,3	61,4
FII	<i>A. bisporus</i>	11,2	69,7
	+ <i>F</i>	9,5	68,2
FIII	<i>A. bisporus</i>	3,6	69,5
	+ <i>F</i>	3,1	68,3
FIV	<i>A. bisporus</i>	7,5	70,7
	+ <i>F</i>	8,2	72,4
FV	<i>A. bisporus</i>	7,2	86,8
	+ <i>F</i>	6,7	88,3
FVI	<i>A. bisporus</i>	25,3	51,7
	+ <i>F</i>	24,9	50,5

Los datos son la media de, al menos, cuatro determinaciones

En el estudio del porcentaje en peso seco de cada una de las fracciones de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* sin y con fungicida no se observaron diferencias significativas. Se puede destacar que las fracciones más representadas son las fracciones **FI**, **FII** y **FVI**.

La suma de los porcentajes obtenidos en cada fracción, proporciona una recuperación sobre el peso seco inicial de aproximadamente un 80% en ambos casos, lo que se considera un rendimiento muy aceptable, si se tienen en cuenta las pérdidas debidas al proceso de extracción y además que una parte del material solubilizado no precipita posteriormente.

En el análisis químico se observa que todas las fracciones sin y con fungicida están formadas principalmente por un alto porcentaje en carbohidratos neutros, y dicho porcentaje se complementa con proteínas en el caso de las fracciones más accesibles a la

extracción (**F1** a **FIV**) y con aminopolisacáridos (quitina) en las fracciones más inaccesibles o profundas (**FV** y **FVI**).

1.5.- PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES AISLADAS DE LAS PAREDES CELULARES

Para comprobar si las distintas fracciones obtenidas de las paredes celulares de *V. fungicola* y *A. bisporus* estaban constituidas por un solo polisacárido o si eran una mezcla de varios polisacáridos y, en tal caso, separar dichos polímeros, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular, para la cual, se empleó el gel de Sepharosa CL-6B.

La cromatografía de las fracciones obtenidas a partir de paredes celulares de *V. fungicola* puso de manifiesto que tanto la fracción **F1** como la fracción **F2S** estaban constituidas por dos subfracciones que presentaron componentes de naturaleza polisacáridica de distinto peso molecular.

Así tenemos que la fracción **F1** está formada por un componente de peso molecular comprendido entre 2×10^3 y 500 kDa al que denominamos **F1a**, y por un segundo componente, llamado **F1b**, de un peso molecular entre 500 y 70 kDa. La fracción **F2S**, a su vez está constituida por dos componentes polisacáridicos, de pesos moleculares similares a los de la fracción anterior, denominados **F2Sa** y **F2Sb**.

Sin embargo, en el caso de *A. bisporus*, la cromatografía de cada una de las fracciones sobre Sepharosa CL-6B dio como resultado, en cada caso, un único pico muy ensanchado, debido a la naturaleza polidispersa de los polisacáridos, por lo que no se pudo llegar a una mayor purificación de las mismas.

1.6.- ANÁLISIS QUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE *V.fungicola* SIN Y CON PROCLORAZ-Mn

Para identificar y cuantificar los azúcares neutros de las diferentes fracciones polisacáridicas de las paredes celulares de *V. fungicola* obtenidas en ausencia y presencia de procloraz-Mn, se efectuaron distintas hidrólisis ácidas con diferentes ácidos y condiciones, como ya expusimos anteriormente, y se analizaron los monómeros liberados por cromatografía de gas-líquido.

Una vez analizados los monosacáridos que forman parte de las distintas fracciones, se llevaron a cabo estudios tanto de metilación, para determinar los diferentes tipos de enlaces glicosídicos presentes en las correspondientes fracciones polisacáridicas, y paralelamente, de espectrofotometría infrarrojo, con el fin de determinar la configuración (α o β) de los polisacáridos de las distintas fracciones.

Los PMAAs se analizaron por CGL en las condiciones descritas anteriormente. La cuantificación se realizó teniendo en cuenta el área de los picos del cromatograma y la identificación de los iones mediante espectrometría de masas, considerando que el espectro de masas es característico de cada PMAA dependiendo de los átomos de carbono en los cuales se han incorporado los metilos, y que todos ellos llevan un átomo de deuterio en el carbono 1.

Una vez establecidos los enlaces glicosídicos presentes en cada fracción, la determinación de los sucesivos espectros de infrarrojo permitió obtener un conocimiento más completo de cada una de las fracciones extraídas de las paredes de los dos organismos.

1.6.1.- Análisis químico

Los monosacáridos de las fracciones obtenidas a partir de las paredes celulares de

V. fungicola se muestran en la Tabla 10, observándose que presentan una composición de azúcares neutros característica, siendo los azúcares mayoritarios la glucosa y la manosa seguidos por la galactosa.

En dicha tabla aparecen analizadas las fracciones **F1a**, **F1b**, **F2Sa**, **F2Sb** y **F3**, ya que los azúcares de la fracción **F2I** no se determinan debido a que, como ya dijimos anteriormente, se trata de una fracción eminentemente lipídica con un porcentaje muy bajo en azúcares totales.

Las fracciones **F1a**, **F2Sa** y **F3** de las tres cepas sin o con fungicida presentan la misma composición en azúcares neutros, es decir, se tratan de glucanos al estar constituidas exclusivamente por glucosa, y que no varían aparentemente en presencia de procloraz-Mn.

Las fracciones **F1b** y **F2Sb** muestran por su parte una composición bastante similar siendo la manosa el azúcar mayoritario, seguido de galactosa y en menor proporción de glucosa, por lo que nos encontramos con heteropolisacáridos glucogalactomananos. En dichas fracciones se aprecia una disminución significativa de la glucosa en las cepas CIES 210 y CIES 100 con respecto a la cepa control (CBS), y tal disminución se produce aún más acusadamente cuando las tres cepas son tratadas con procloraz-Mn. Por su parte la galactosa presenta un incremento progresivo en las tres cepas, tanto sin tratar como con el tratamiento con fungicida, y sin embargo, la manosa permanece prácticamente constante en todos los casos, lo que nos empieza a sugerir que el fungicida procloraz-Mn está produciendo reestructuraciones en estos heteropolisacáridos glucogalactomananos.

Tabla 10. Porcentaje molar de los azúcares detectados como acetatos de alditol de las fracciones aisladas de las paredes celulares de *V. fungicola* sin tratar y tratadas con procloraz-Mn

Fracciones	Cepas	Glucitol	Galactitol	Manitol
F1a	CBS	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0
	CIES 210	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0
	CIES 100	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0
F1b	CBS	23,1	25,9	51,0
	+ <i>F</i>	12,4	35,6	52,0
	CIES 210	17,3	29,4	53,3
	+ <i>F</i>	13,5	32,4	54,1
	CIES 100	10,2	32,7	57,1
	+ <i>F</i>	9,5	33,9	56,6
F2Sa	CBS	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0
	CIES 210	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0
	CIES 100	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0
F2Sb	CBS	15,6	28,6	55,8
	+ <i>F</i>	7,6	36,3	56,1
	CIES 210	11,1	36,1	52,8
	+ <i>F</i>	7,1	39,1	53,8
	CIES 100	6,9	37,1	56,0
	+ <i>F</i>	5,4	40,1	54,5
F3	CBS	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0
	CIES 210	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0
	CIES 100	100,0	0	0
	+ <i>F</i>	100,0	0	0

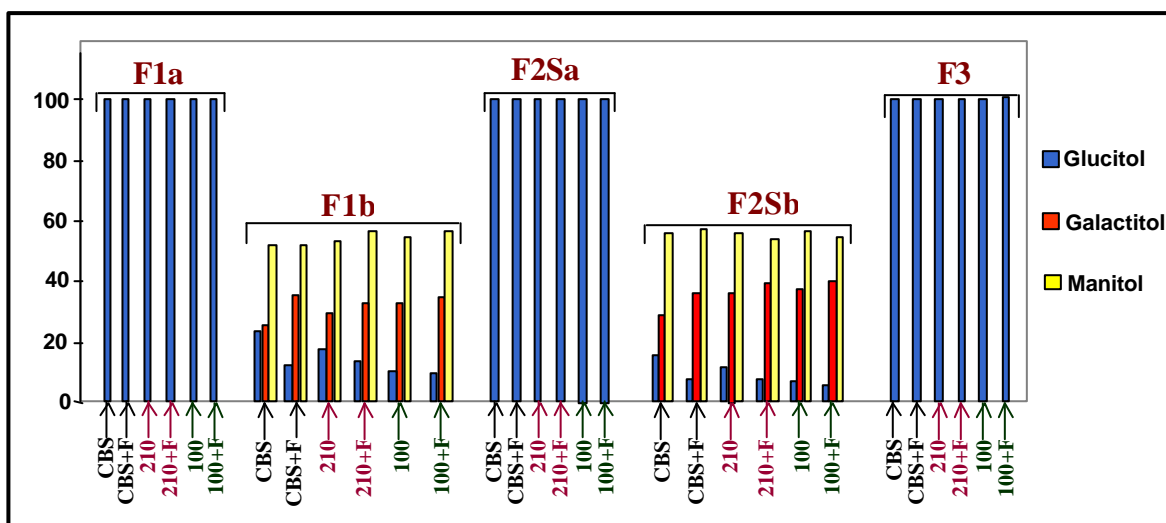


Diagrama complementario de la Tabla 10

1.6.2.- Análisis estructural

El análisis estructural de estas fracciones se muestra en la Tablas 11 y 12. Las fracciones **F1a** y **F2Sa** correspondientes a glucanos con uniones en (1-4) y puntos de ramificación en C-6, pierden parte de estas ramificaciones por efecto del procloraz-Mn haciéndose más lineales.

La fracción **F3** formada por cadenas de glucosa con uniones (1-3) y (1-4) y algunas ramificaciones en C-6, por efecto del fungicida aumentan los enlaces en (1-4) a expensas de la disminución de los (1-3).

Las fracciones más afectadas por el efecto del procloraz-Mn corresponden a los glucogalactomananos de las fracciones **F1b** y **F2Sb**, como ya se había hecho patente en el análisis de los monosacáridos. Estas cadenas de manosa con uniones en (1-6) y altamente ramificadas en el C-4, presentan un drástico descenso de la glucosa en (1-4) a la vez que aumenta la galactosa terminal por efecto del fungicida.

Tabla 11. Porcentaje molar de los PMAAs detectados por CGL-EM de las fracciones (F1a, F2Sa y F3, **glucanos**) de las paredes celulares de las diferentes cepas de *V. fungicola* en ausencia y presencia de procloraz-Mn

Fracciones	Tipo de unión	CEPAS					
		CBS	CBS+F	CIES 210	CIES 210+F	CIES 100	CIES 100+F
F1a	Hexp-(1	5,1	4,6	5,1	3,8	5,3	4,9
	4)-Glup-(1	88,9	91,2	89,9	92,6	88,5	90,7
	4,6)-Glup-(1	5,5	4,2	5,0	3,6	5,2	4,4
F2Sa	Hexp-(1	4,4	4,6	4,5	3,8	5,4	3,9
	4)-Glup-(1	92,1	94,2	91,8	93,0	89,5	92,7
	4,6)-Glup-(1	3,5	4,2	3,7	3,2	5,1	3,4
F3	Hexp-(1	1,5	1,7	1,9	1,6	1,5	1,5
	3)-Glup-(1	58,1	55,5	56,7	54,4	56,5	55,3
	4)-Glup-(1	38,7	40,5	39,3	41,6	39,7	41,1
	4,6)-Glup-(1	0,8	1,2	1,0	1,1	1,1	1,0
	3,6)-Glup-(1	0,9	1,1	1,1	1,3	1,2	1,1

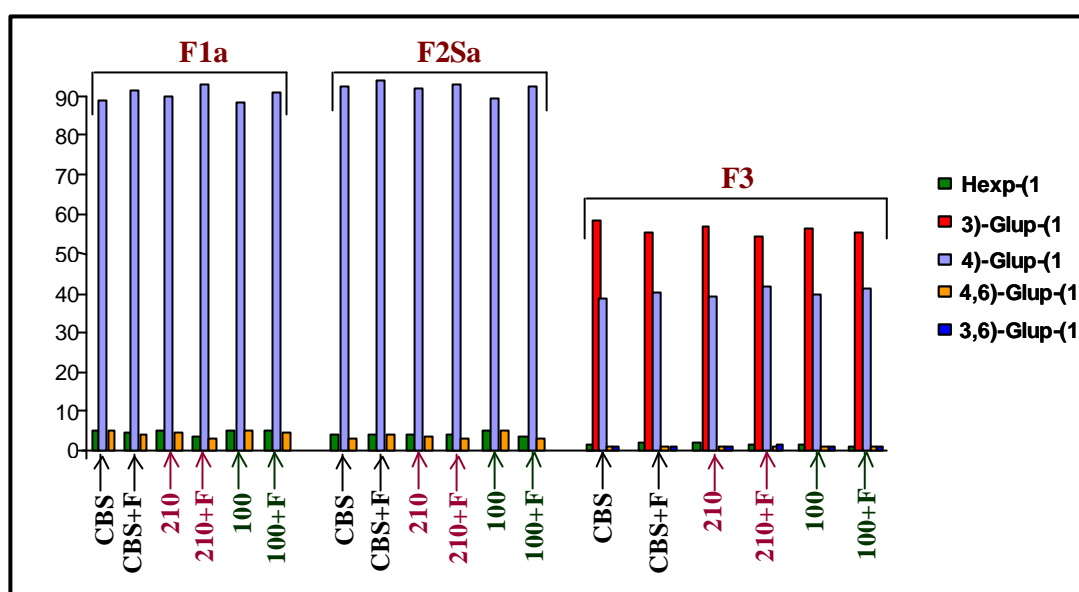


Diagrama complementario de la Tabla 11

Tabla 12. Porcentaje molar de los PMAAs detectados por CGL-EM de las fracciones (F1b, F2Sb, **glucogalactomananos**) de las paredes celulares de las diferentes cepas de *V. fungicola* en ausencia y presencia de procloraz-Mn

FRACCIONES	TIPO DE UNIÓN	CEPAS					
		CBS	CBS +F	CIES 210	CIES 210+F	CIES 100	CIES 100+F
F1b	Hexp-(1)	2,6	4,0	5,1	5,2	2,7	2,4
	Galp-(1)	26,5	34,0	31,3	32,3	33,9	35,2
	2)-Manp-(1)	15,3	12,8	5,4	5,5	7,7	5,9
	4)-Glup-(1)	17,5	8,3	8,8	7,9	6,4	5,6
	6)-Manp-(1)	2,0	4,8	12,1	10,5	2,3	2,5
	2,4)-Hexp-(1)	0,7	1,2	0,5	0,4	0,9	0,9
	4,6)-Manp-(1)	33,2	29,9	34,2	36,2	43,7	48,1
	2,6)-Manp-(1)	2,0	5,0	3,9	4,0	2,6	2,5
F2Sb	Hexp-(1)	3,4	1,8	2,4	1,9	1,8	1,7
	Galp-(1)	26,3	34,2	33,5	38,5	38,7	39,3
	3)-Glup-(1)	5,1	2,4	3,1	2,7	2,1	1,9
	5)-Galp-(1)	1,5	1,3	1,4	1,1	1,3	1,1
	4)-Glup-(1)	6,4	3,1	5,2	3,0	2,7	2,2
	3)-Manp-(1)	2,5	2,6	2,9	3,0	2,9	2,7
	6)-Manp-(1)	6,3	7,6	5,6	5,4	3,0	2,9
	4,6)-Manp-(1)	45,9	46,3	42,6	42,2	47,1	45,2
	2,6)-Manp-(1)	3,3	3,0	3,5	3,1	2,9	2,7

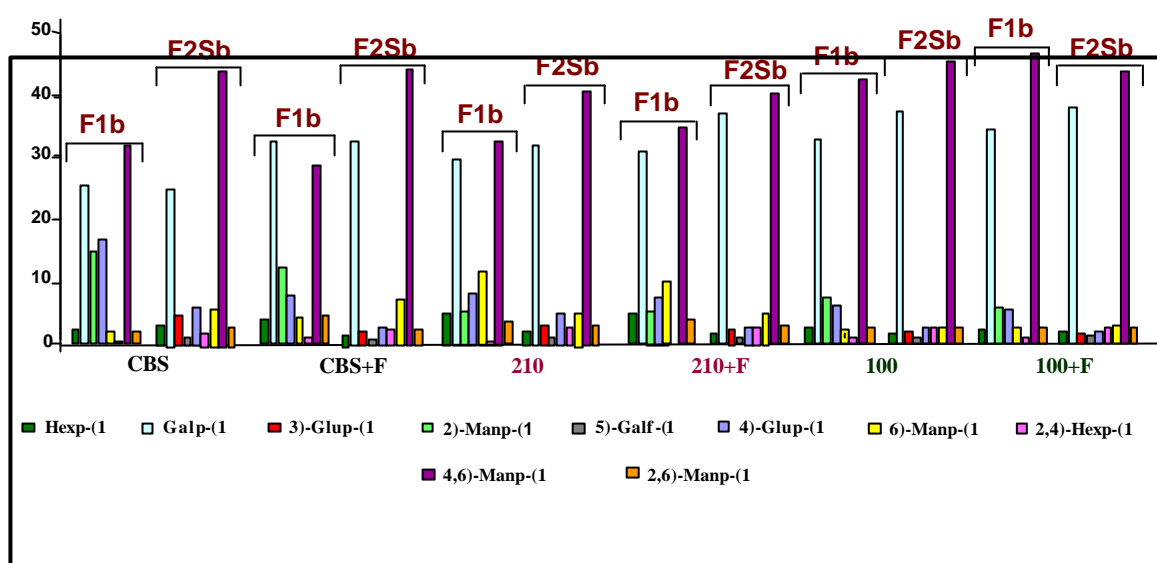


Diagrama complementario de la Tabla 12

Los espectros de infrarrojo de las fracciones extraídas de las paredes celulares de la cepa control de *V. fungicola* sin tratar y tratada con fungicida se muestran en la Fig. 11. Las fracciones **F1a** y **F2Sa** muestran picos de absorción a 930, 870, 780 y 710 cm^{-1} , por lo que se asemejan al espectro de un α -(1,4-glucano) excepto en la existencia del pico a 870 cm^{-1} . Las fracciones **F1b** y **F2Sb** presentan picos a 810 y 870 cm^{-1} (característicos de los mananos). Por último, en la fracción **F3** se pueden observar el espectro típico de β -glucano asociado a quitina.

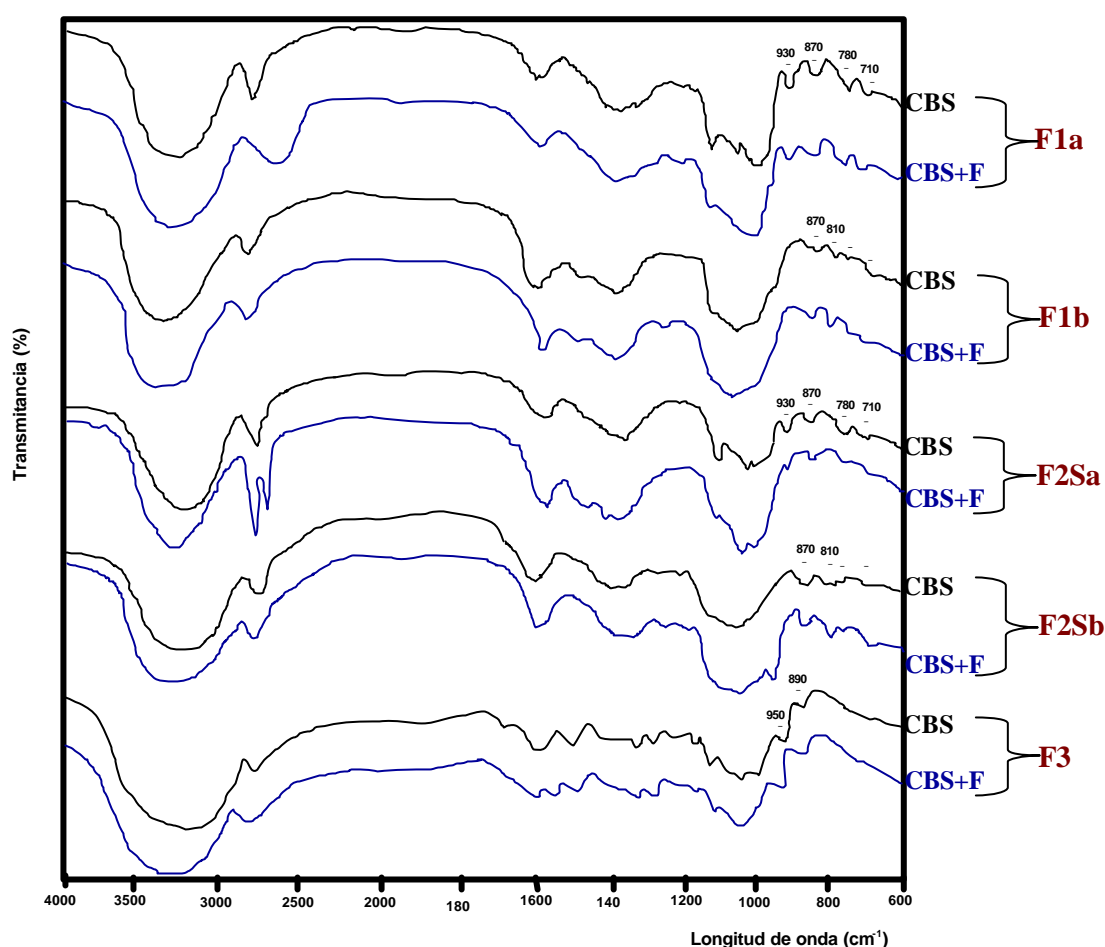


Fig. 11. Espectros de infrarrojo de las diferentes fracciones obtenidas de las paredes celulares de *V. fungicola* (cepa CBS) en ausencia y presencia de Prochloraz-Mn

No se muestran los correspondientes espectros de infrarrojo de las cepas CIES 210 y 100, dada su semejanza con la cepa control (CBS).

De todos estos resultados se deduce que el fungicida no afecta a la configuración de los polisacáridos de las paredes celulares de *V. fungicola* a pesar de producir claras modificaciones cuali y cuantitativas en sus respectivos enlaces glicosídicos.

1.7.- ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE *V. fungicola*

Las proteínas solubilizadas a partir de las paredes celulares de la cepa CBS de *V. fungicola* sin y con procloraz-Mn se muestran en la Fig. 12. Dicha solubilización se llevó a cabo gracias a la acción del TFA al 100%, como ya ha sido descrito en Materiales y Métodos.

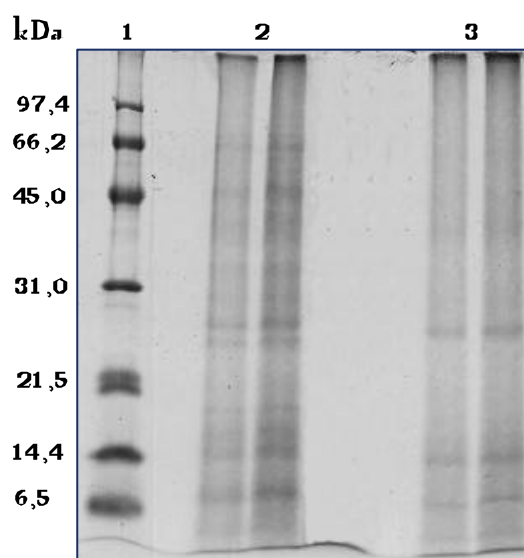


Fig. 12. Electroforesis en condiciones disociantes (14% de poliacrilamida)

1. Patrones de peso molecular en kDa
2. Cepa CBS
3. Cepa CBS tratada con procloraz-Mn

El análisis electroforético en condiciones disociantes mostró en la cepa CBS sin tratar con el fungicida la presencia de varias bandas polipeptídicas con masas moleculares en un rango aproximado de 7-70 kDa. Sin embargo cuando dicha cepa se trató con fungicida se pudo comprobar una inhibición parcial de determinadas bandas (particularmente las de alrededor de 7 ± 3 kDa), por lo que, este análisis coincide y complementa los resultados del análisis químico global descrito anteriormente.

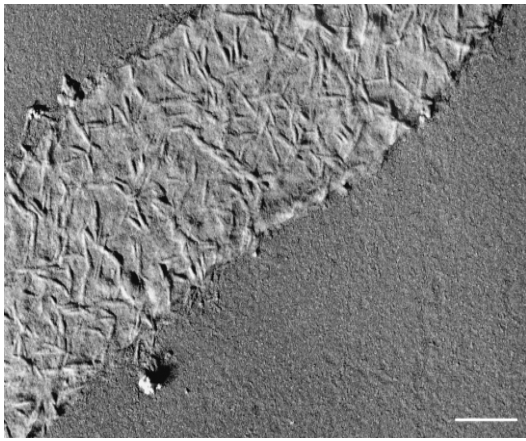
Las otras dos cepas de *V. fungicola*, CIES 210 y CIES 100, también fueron objeto del presente estudio, pero los resultados fueron semejantes a la cepa CBS, por lo que no se muestran específicamente.

1.8.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE SOMBREADO

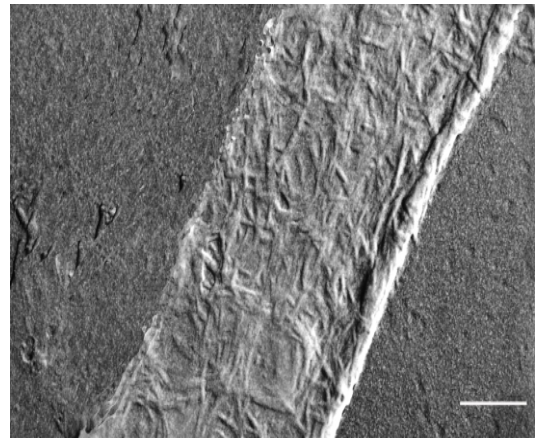
El sombreado de las paredes celulares aisladas de las cepas estudiadas de *V. fungicola*, sin o con procloraz-Mn, muestra la diferente presencia de estructuras características en forma de pequeñas varillas asociadas en manojos, que se asemejan a la estructura descrita en otros hongos para la proteína hidrofobina.

En la Fig. 13, se aprecia cómo la superficie de la cepa *V. fungicola* CBS es la que muestra mayor cantidad de dichas varillas que van disminuyendo en las cepas CIES 210 y CIES 100, descenso que se hace más acentuado cuando tales paredes han sido tratadas con el fungicida.

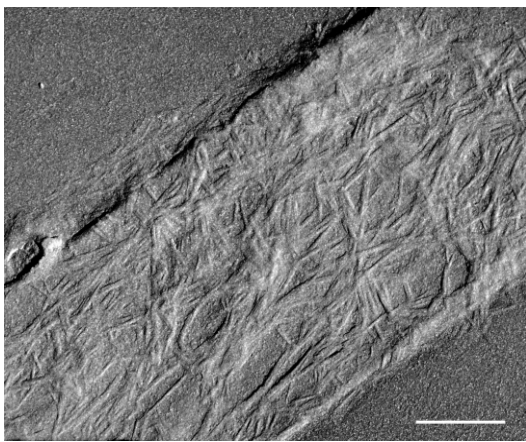
Este descenso de la posible proteína hidrofobina coincide con los resultados obtenidos en la composición química global y en la electroforesis de proteínas de las paredes celulares sin o con tratamiento previo con el fungicida.



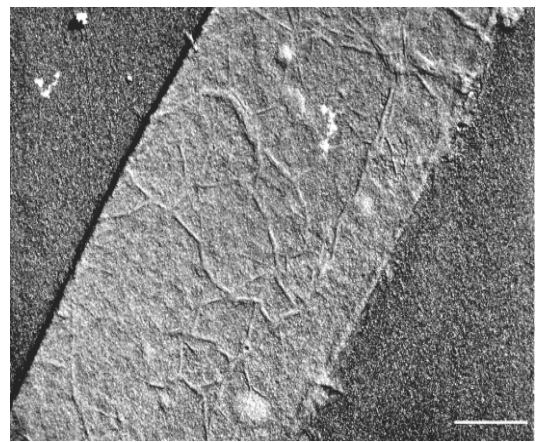
CBS



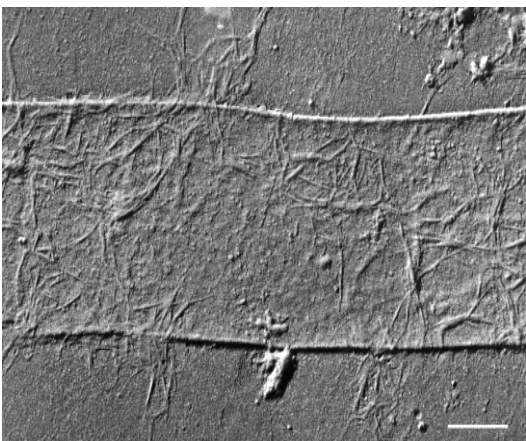
CBS + F



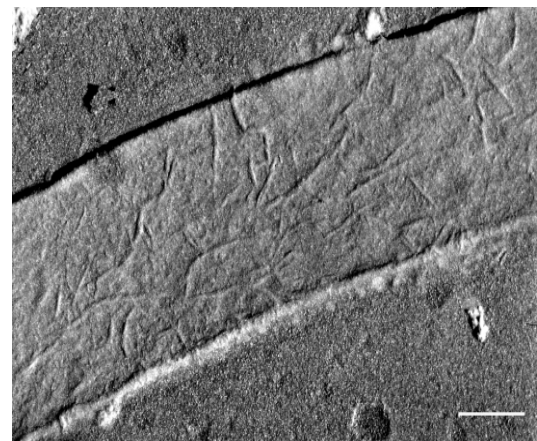
CIES 210



CIES 210 + F



CIES 100



CIES 100 + F

(Barra=1 μ m)

Fig. 13. Sombreado de las paredes celulares de *V. fungicola* sin y con tratamiento de procloraz-Mn

1.9.- ANÁLISIS QUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE *A. bisporus* SIN Y CON TRATAMIENTO DE PROCLORAZ-Mn

1.9.1.- Análisis químico

La Tabla 13 muestra los porcentajes molares de los monosacáridos presentes en las distintas fracciones de las paredes celulares, sin tratar y tratadas, de *A. bisporus*. En ambos casos apreciamos que el azúcar mayoritario corresponde a la glucosa, acompañada de menores proporciones de galactosa, manosa y xilosa.

El efecto del fungicida procloraz-Mn sobre la fracción **FI** es poco significativo presentando en ambos casos una composición similar en los monosacáridos, glucosa y galactosa, mientras que la manosa aumenta claramente.

En cambio, las fracciones **FII** y **FIII** se ven bastante afectadas por la acción del procloraz-Mn. Por un lado, encontramos que la fracción **FII** obtenida de paredes no tratadas con fungicida, presenta principalmente glucosa seguida de manosa y xilosa en cantidades similares, y en cambio, al ser tratada con fungicida, esta fracción no presenta ni manosa ni xilosa compensándose con un aumento significativo de la glucosa. En cuanto a la fracción **FIII** observamos que las paredes sin fungicida presentan mayoritariamente glucosa seguida de xilosa y en menor proporción galactosa, y sin embargo, en dicha fracción con fungicida no está presente la xilosa, siendo reemplazada por un alto porcentaje de glucosa, manteniéndose las proporciones de galactosa y manosa.

En las restantes fracciones **FIV**, **FV** y **FVI** no se aprecian diferencias significativas tanto, si fueron o no tratadas con fungicida, y en general, se comprueba que el porcentaje de los azúcares distintos a la glucosa va disminuyendo progresivamente.

Tabla 13. Porcentaje molar de los azúcares detectados como acetatos de alditol de las fracciones aisladas de las paredes celulares de *A. bisporus* sin tratar y tratadas con procloraz-Mn

Fracciones	Muestra	Glucitol	Galactitol	Manitol	Xilitol
FI	<i>A. bisporus</i>	93,0	4,7	2,3	0
	+ F	88,1	5,4	6,5	0
FII	<i>A. bisporus</i>	70,2	2,3	13,0	14,5
	+ F	95,8	4,2	0	0
FIII	<i>A. bisporus</i>	77,4	5,8	1,9	14,9
	+ F	92,1	5,9	2,0	0
FIV	<i>A. bisporus</i>	58,8	19,2	9,8	12,2
	+ F	60,9	20,3	6,7	12,1
FV	<i>A. bisporus</i>	95,1	2,4	1,0	1,5
	+ F	95,0	2,8	2,2	0
FVI	<i>A. bisporus</i>	96,8	0	3,2	tr
	+ F	95,3	2,5	3,1	0

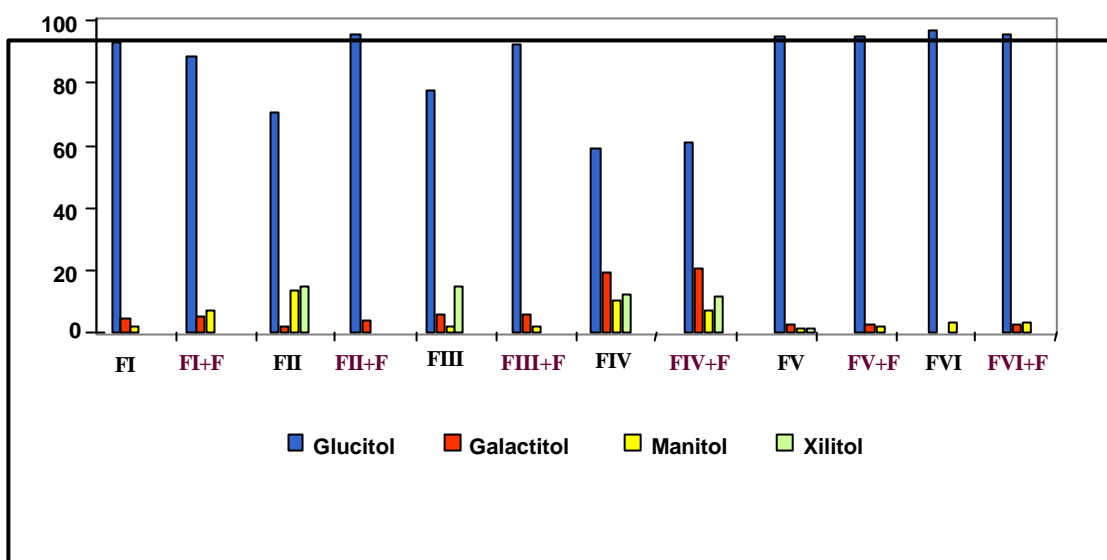


Diagrama complementario de la Tabla 13

1.9.2.- Análisis estructural

Los resultados del análisis por metilación de las fracciones de *A. bisporus* sin y con tratamiento con fungicida se muestran en las Tablas 14 y 15.

La fracción **FI** o mucílago, en la que se apreciaban pocas diferencias en sus monosacáridos por efecto del fungicida, muestra estar compuesta esencialmente por glucosa unida en α -(1-4), con unos bajos porcentajes de manosa en (1-3) y de galactosa en (1-6), y estructurándose como un polisacárido bastante lineal con pocas ramificaciones de glucosa. Sin embargo esta misma fracción en presencia del fungicida se hace más ramificada por aumento de los enlaces de glucosa en (1-3,4) y en (1-4,6).

La fracción **FII** como ya se hizo patente en el análisis de monosacáridos es claramente afectada por el fungicida de forma que le inhibe la incorporación de xilosa y manosa, manteniéndose la cadena principal de glucano α -(1-3), aumentando considerablemente las ramificaciones de glucosa en (1,3-6), y apareciendo una ligera proporción de galactosa únicamente en su forma furanosa. Paralelamente la fracción **FIII** constituida por una cadena de glucano con uniones (1-4), en presencia de procloraz-Mn pierde la xilosa pero no la manosa, por lo que en este caso se incrementan las ramificaciones de glucosa en (1-3,4) y (1-4,6) apareciendo nuevamente la galactofuranosa, como en la fracción anterior.

La fracción **FIV** en presencia de fungicida no experimenta cambios significativos salvo en el incremento de las ramificaciones de la glucosa (1-3,6) y de los terminales correspondientes. Las fracciones **FV** y **FVI** prácticamente no están afectadas por el procloraz-Mn dadas las mínimas diferencias detectadas en el análisis de sus enlaces glicosídicos, aunque muestran la tendencia a hacerse más ramificadas.

Tabla 14. Porcentaje molar de los PMAAs detectados por CGL-EM de las fracciones de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* en **ausencia** de procloraz-Mn

Tipo de unión	FRACCIONES					
	FI	FII	FIII	FIV	FV	FVI
Xilp-(1	0	9,6	0,4	3,5	1,5	0
4)-Xilp-(1	0	0,4	12,5	11,0	2,6	0
Hexp-(1	9,4	2,8	8,2	4,6	10,4	13,4
3)-Glup-(1	0	61,2	1,0	24,1	7,0	9,9
5)-Galp-(1	0	0	0	0	0	0
4)-Glup-(1	76,5	0	61,3	19,3	62,0	55,6
3)-Manp-(1	1,7	7,0	1,8	5,3	1,5	3,2
3)-Galp-(1	0	0	0	9,4	0	0
6)-Glup-(1	0	0	0,5	1,0	5,4	4,0
6)-Galp-(1	2,4	1,9	5,8	9,2	2,0	0
3,4)-Manp-(1	0	7,1	0	4,3	0	0
3,4)-Glup-(1	5,1	4,7	1,4	1,2	0	1,4
2,3)-Glup-(1	0	2,0	0	0	0	1,3
4,6)-Glup-(1	4,9	0	5,0	1,4	2,8	2,2
3,6)-Glup-(1	0	3,3	2,1	5,7	4,8	9,0

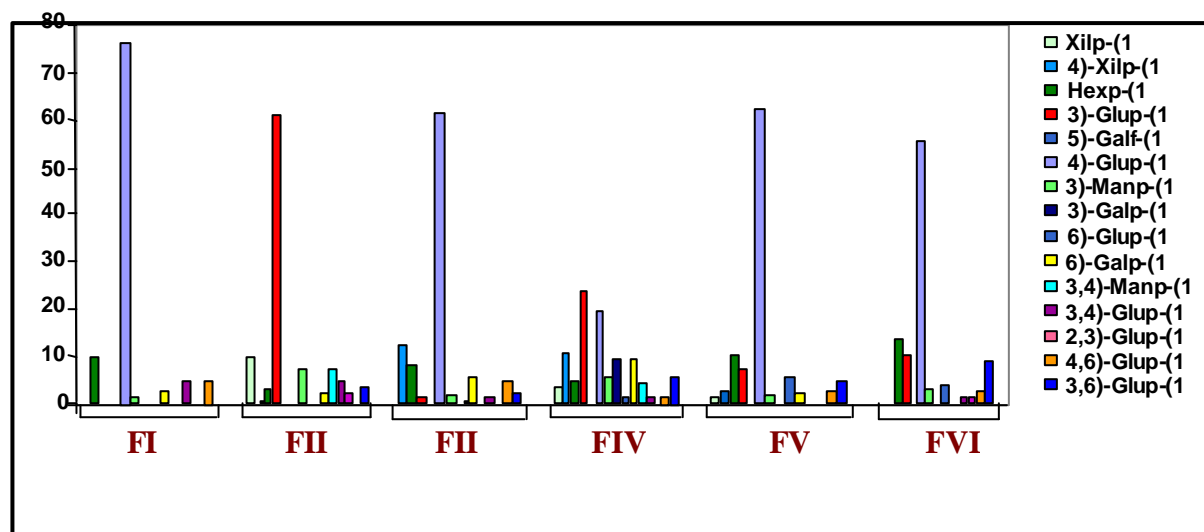


Tabla 15. Porcentaje molar de los PMAAs detectados por CGL-EM de las fracciones de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* en presencia de procloraz-Mn

Tipo de unión	FRACCIONES					
	FI	FII	FIII	FIV	FV	FVI
Xilp-(1)	0	0	0	2,5	0,6	0
4)-Xilp-(1)	0	0	0	12,3	1,3	0
Hexp-(1)	10,6	14,0	17,0	4,2	12,8	14,0
3)-Glup-(1)	0	55,8	4,3	19,4	6,2	8,7
5)-Galp-(1)	0	2,1	0,5	0	0	0
4)-Glup-(1)	64,8	0	53,4	22,6	59,6	53,4
3)-Manp-(1)	3,1	0	1,3	4,6	1,9	3,0
3)-Galp-(1)	0	0	0	8,7	0	0
6)-Glup-(1)	0	0	0	0	3,9	3,8
6)-Galp-(1)	2,7	1,5	4,3	9,1	2,4	0
3,4)-Manp-(1)	0	0	0	3,8	0	0
3,4)-Glup-(1)	12,6	4,8	4,9	2,6	1,7	1,6
2,3)-Glup-(1)	0	1,4	0	0	0	1,5
4,6)-Glup-(1)	6,2	0	11,7	0,9	4,3	2,4
3,6)-Glup-(1)	0	20,4	2,6	9,3	5,3	11,6

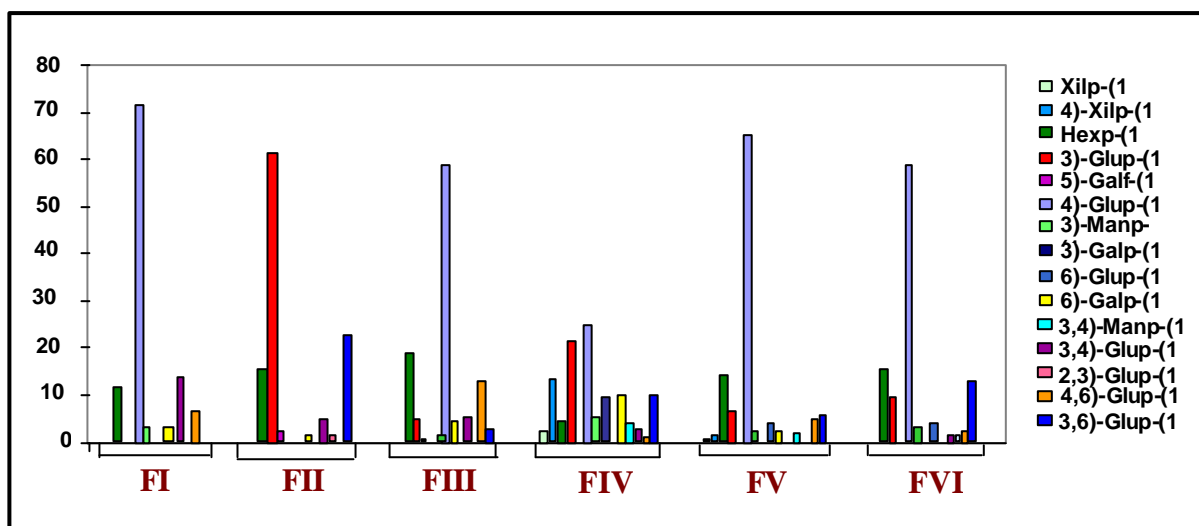


Diagrama complementario de la Tabla 15

Los espectros de infrarrojo de las fracciones de las paredes celulares de *A. bisporus* sin y con fungicida se muestran en la Fig. 14.

Las fracciones **FI** y **FI+F** presentan picos de absorción a 930, 850, 760 y 705 cm^{-1} que son característicos de α -1,4-glucanos, puesto que este mismo espectro es característico del polisacárido α -amilosa.

La fracción **FII** muestra picos de absorción a 930, 850 y 820 cm^{-1} , que coinciden con los que aparecen en el α -1,3-glucano de *Aspergillus nidulans* (Calonje, 1998), y la zona de absorción entre 810-820 cm^{-1} que ha sido descrita como específica de los mananos. También aparece un pico a 890 cm^{-1} que indica la presencia de enlaces en configuración β posiblemente debido a las uniones de xilosa. La fracción **FII+F** no presenta la zona de absorción a 820 cm^{-1} característica de mananos, y el pico a 890 cm^{-1} que corresponden con la presencia de uniones de xilosa.

La fracción **FIII** presenta los picos específicos de un α -glucano junto a un porcentaje menor de enlaces en configuración β que corresponden seguramente a las uniones entre xilosas. La fracción **FIII + F** no muestra el pico de absorción característico de uniones entre xilosas.

Las fracciones **FIV** y **FIV+F** presentan un espectro que indica una mezcla de enlaces en configuración α y β .

Las fracciones **FV** y **FV+F** presentan el pico a 890 cm^{-1} característico de los enlaces en configuración β .

Las fracciones **FVI** y **FVI+F** muestran el espectro típico de β -glucano y quitina (890 y 950 cm^{-1}).

Los espectros de infrarrojo de las diferentes fracciones polisacáridicas procedentes de las paredes celulares de *A. bisporus* complementan el estudio estructural realizado sobre las mismas, poniéndose de manifiesto cómo las fracciones **FII** y **FIII** no solo son afectadas por el fungicida en cuanto a sus proporciones de monosacáridos y enlaces glicosídicos, sino también en su correspondiente configuración.

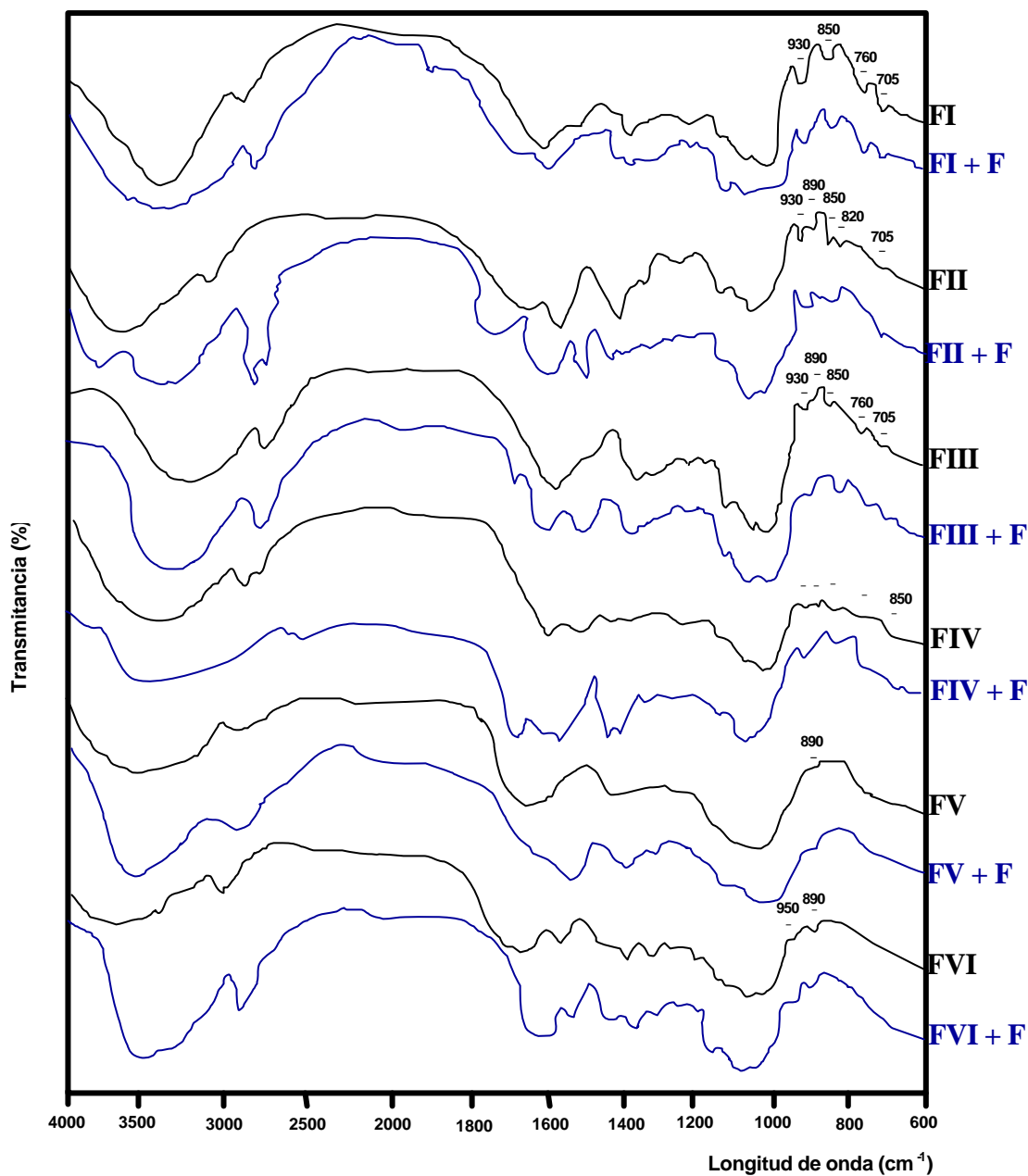


Fig.14. Espectros de infrarrojo de las diferentes fracciones obtenidas de las paredes celulares de *A. bisporus* en ausencia y presencia de prochloraz-Mn

1.10.- ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE LAS PAREDES CELULARES DE *A. bisporus*

Las proteínas extraídas de las paredes celulares del micelio vegetativo sin tratar y tratadas con procloraz-Mn se muestran en la Fig. 15. Como ya ha sido descrito, las proteínas fueron solublizadas con tampón PBS pH 6,8 conteniendo 0,2 M de NaCl

Mediante electroforesis disociantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se pudo comprobar que el micelio vegetativo sin tratar con el fungicida presenta una serie de bandas polipeptídicas en un rango aproximado de 15-110 kDa. Sin embargo cuando se trató con fungicida dio como resultado un patrón electroforético diferente, presentando mayoritariamente bandas polipeptídicas entre 35-120 kDa y la inhibición parcial y/o total de determinadas bandas entre 15-35 kDa.

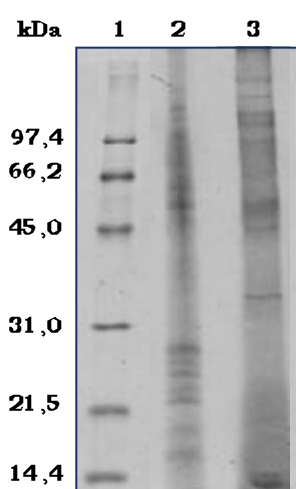


Fig. 15. Electroforesis en condiciones disociantes (14% de poliacrilamida)

1. Patrones de peso molecular en kDa
2. *A. bisporus*
3. *A. bisporus* tratado con fungicida

1.11.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE SOMBREADO

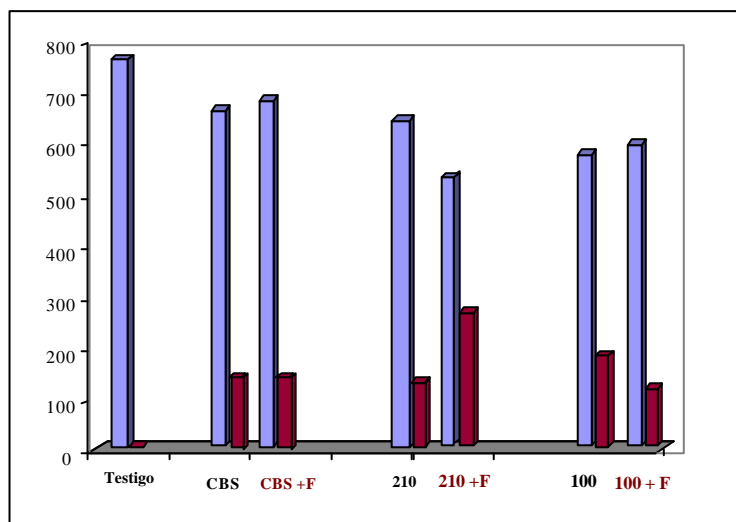
El sombreado con Au/Pd de las paredes celulares de *A. bisporus* (Fig. 16), sin y con fungicida, muestra una superficie granulosa, muy semejante en ambos casos, que corresponde a la capa mucilaginosa poco alterada estructuralmente por efecto del procloraz-Mn, lo que está totalmente en consonancia con los resultados químicos anteriormente descritos.

1.12.- EFECTO DE DIFERENTES CEPAS DE *V. fungicola* SIN O CON PRETRATAMIENTO DEL PROCLORAZ-Mn SOBRE CULTIVOS COMERCIALES DE *A. bisporus*

Los resultados obtenidos de los experimentos en explotaciones comerciales a escala industrial se muestran en la Tabla 16.

Tabla.16. Champiñones sanos y enfermos recolectados después de la inoculación experimental de cultivos industriales de *A. bisporus* con las tres cepas de *V. fungicola* sin tratar o tratadas con procloraz-Mn

	Testigo	CBS	CBS + F	210	210 + F	100	100 + F
Nº ejemplares sanos	759	655	677	636	525	569	592
Nº ejemplares enfermos	1	140	140	125	260	178	112
Ejemplares totales recolectados	760	795	817	761	785	747	704



En dicha tabla se aprecia cómo en condiciones de máxima higiene se produce una contaminación mínima con *V. fungicola*, es decir un solo ejemplar enfermo frente a 759 sanos.

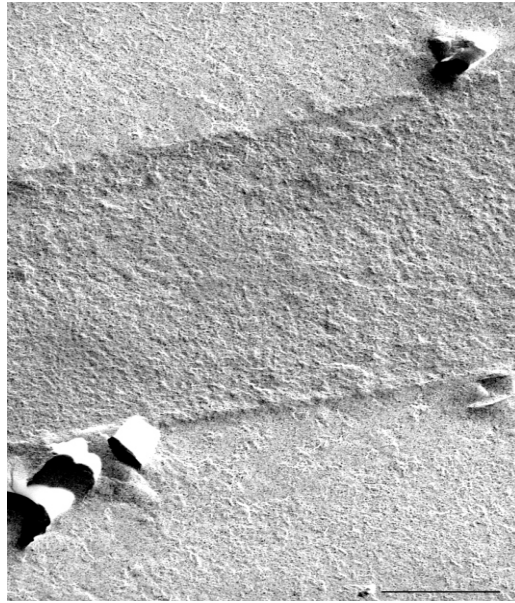
Cuando tales cultivos se inoculan experimentalmente con las cepas CBS control y CBS crecida en presencia del procloraz-Mn, la producción de ejemplares sanos y enfermos es muy semejante en número, y en todo caso es algo menos infectiva la cepa CBS+F, pues se tiene un ligero incremento en este caso en el número de ejemplares sanos (677 frente 655).

Un resultado intermedio se aprecia con la cepa CIES 100 no tratada y tratada con el fungicida, pues se produce un número menor de ejemplares sanos en los dos casos, con un mayor número de piezas enfermas por efecto de la cepa CIES 100 (178 carpóforos), y a la vez una disminución de ejemplares enfermos cuando se trata de *V. fungicola* CIES 100 tratada con el fungicida (112 carpóforos). Todo ello parece significar menor infectividad por efecto del fungicida, compensado con un ligero incremento en el número de ejemplares sanos (592 carpóforos).

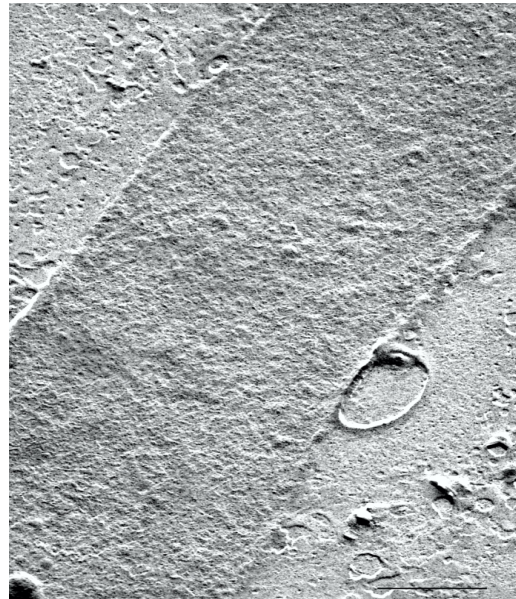
En el caso de la cepa CIES 210 no tratada y tratada con el fungicida los resultados son claramente desconcertantes, por producir un número intermedio de ejemplares sanos con la cepa CIES 210 (636 carpóforos), y el número más bajo de piezas sanas cuando la cepa infectiva es CIES 210 tratada (525 carpóforos) que se compensan con un bajo número de ejemplares enfermos producidos por la cepa 210 no tratada (125 carpóforos), y el más alto número de piezas enfermas ocasionado por la cepa 210 tratada (260 carpóforos), lo que la sitúa como la cepa más infectiva de las inoculadas a pesar de su pretratamiento con el fungicida procloraz-Mn.

De todos estos resultados se comprueba una vez más cómo el empleo del procloraz-Mn va produciendo modificaciones puntuales en las diferentes cepas de *V. fungicola*, que se traducen en una distinta infectividad en cada caso.

A pesar de tratarse de experimentos realizados en cuadruplicado, pueden ser menos significativos de lo que aparentan, si se consideran al mismo tiempo las variaciones obtenidas en los recuentos totales, que oscilan entre un incremento máximo de 7,5% (en el caso de CBS tratada +F con 817 carpóforos) y un descenso de 7,36% (para la cepa 100+F con 704 carpóforos) en relación con el testigo.



A. bisporus



A. bisporus + F

(Barra=1 μ m)

Fig. 16. Sombreado de las paredes celulares de *A. bisporus*

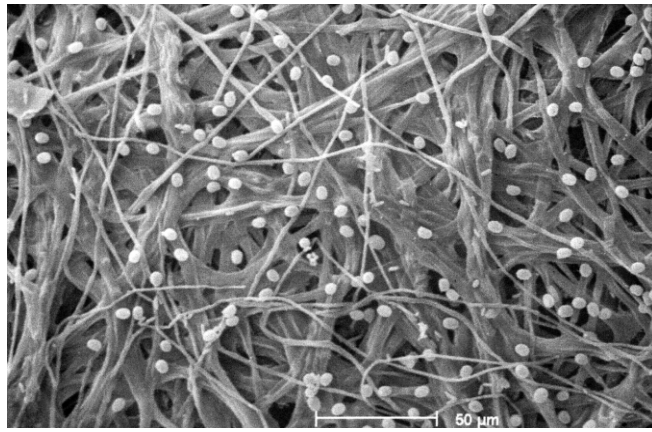
**2. BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA
VERTICILIOSIS DE LOS CULTIVOS INDUSTRIALES
DE CHAMPIÑÓN (*A. bisporus*).**

2.1.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE *V. fungicola* y *A. bisporus* MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

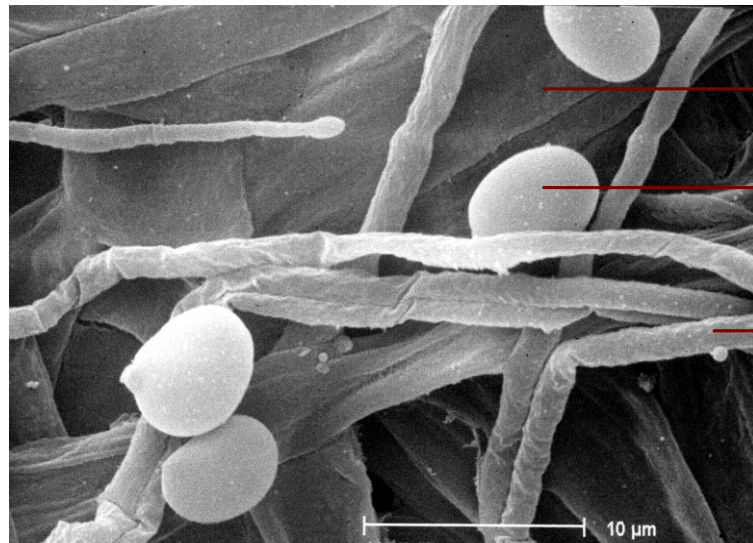
El estudio de la interacción entre las hifas de ambos organismos se realizó mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido, para lo que previamente se procedió en el laboratorio a inocular carpóforos de *A. bisporus* con una suspensión de conidios de *V. fungicola*. Cuando los cuerpos fructíferos presentaron síntomas visibles de la verticiliosis (al 4º día), se tomaron pequeños fragmentos del carpóforo, y se llevó a cabo dicho estudio.

En la Fig. 17 se muestran imágenes obtenidas al microscopio electrónico de barrido. Primeramente, en la Fig. 17A se presenta una panorámica de los dos organismos, donde apreciamos un conjunto de hifas de diferente tamaño y morfología, así como esporas. En la Fig. 17B distinguimos las hifas de *V. fungicola* (pequeño diámetro) de las hifas de *A. bisporus*. La Fig. 17C muestra con más detalle la zona de contacto entre los dos microorganismos, y se observa como las hifas del micopatógeno *V. fungicola* se enrollan alrededor de las hifas del hospedador *A. bisporus*.

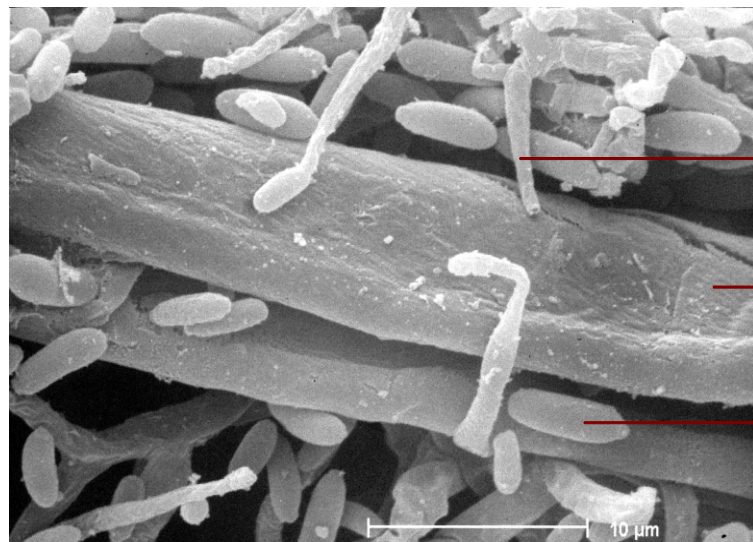
En las siguientes fotografías (Fig. 18) también se puede apreciar el mecanismo de interacción, pero esta vez mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión. En la Fig. 18A podemos distinguir fácilmente las hifas de *A. bisporus* de las hifas de *V. fungicola* en un corte transversal, ya que éstas últimas presentan un diámetro menor y su contenido citoplasmático es bastante más denso a los electrones. La Fig. 18B muestra con detalle el momento en que el micopatógeno entra en contacto con la pared celular del hospedador, y también se puede apreciar entre las paredes celulares de ambos organismos un material extracelular que podría ayudar al micopatógeno a mantenerse adherido a la superficie celular del hospedador. Por último, observamos claros signos de degradación de la pared celular del hospedador, lo que permitirá al patógeno penetrar dentro de la hifa de aquel (Fig. 18C).



A

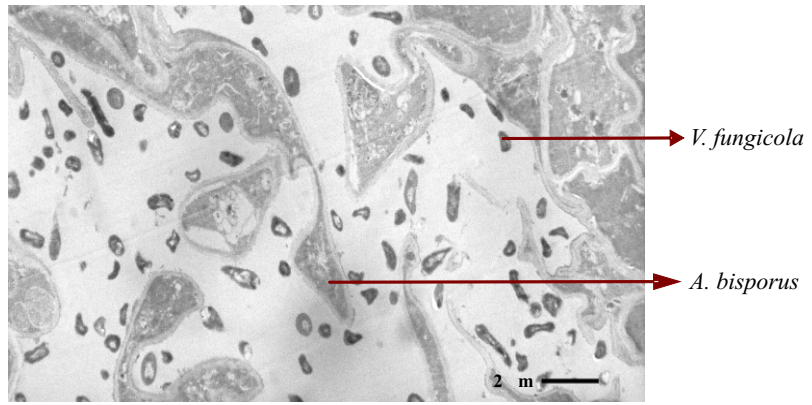


B



C

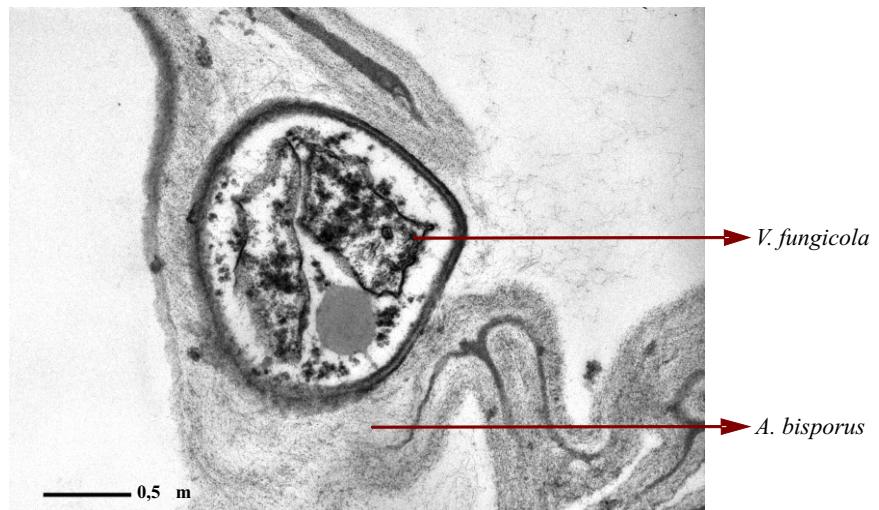
Fig. 17. Interacción entre *A. bisporus* y *V. fungicola* al microscopio electrónico de barrido



A



B



C

Fig. 18. Interacción entre el micopatógeno y su hospedador al microscopio electrónico de transmisión

2.2. ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN

La fracción (**Fp**) extraída de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus*, como ha sido descrito previamente, se incubó durante 1 h con esporas germinadas de *V. fungicola*. Transcurrido este tiempo, la preparación se observó al microscopio de contraste de fase apreciándose una aglutinación de las esporas (Fig. 19B).

Como control se empleó una suspensión de conidios no tratados con la fracción **Fp**, y como muestra la Fig. 19A los conidios aparecieron de forma dispersa.

Paralelamente, dicha fracción se analizó mediante electroforesis en condiciones disociantes, en la cual, se observaron diferentes bandas polipeptídicas comprendidas en un rango de 15-100 kDa (Fig. 20).

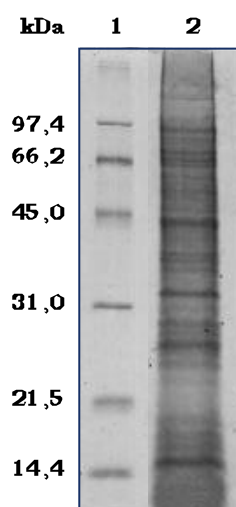
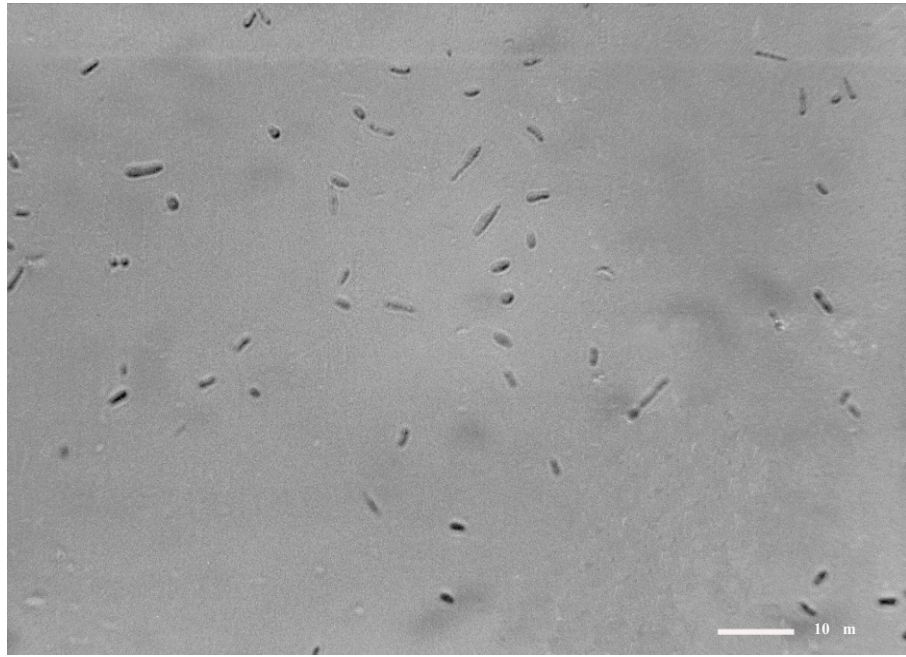
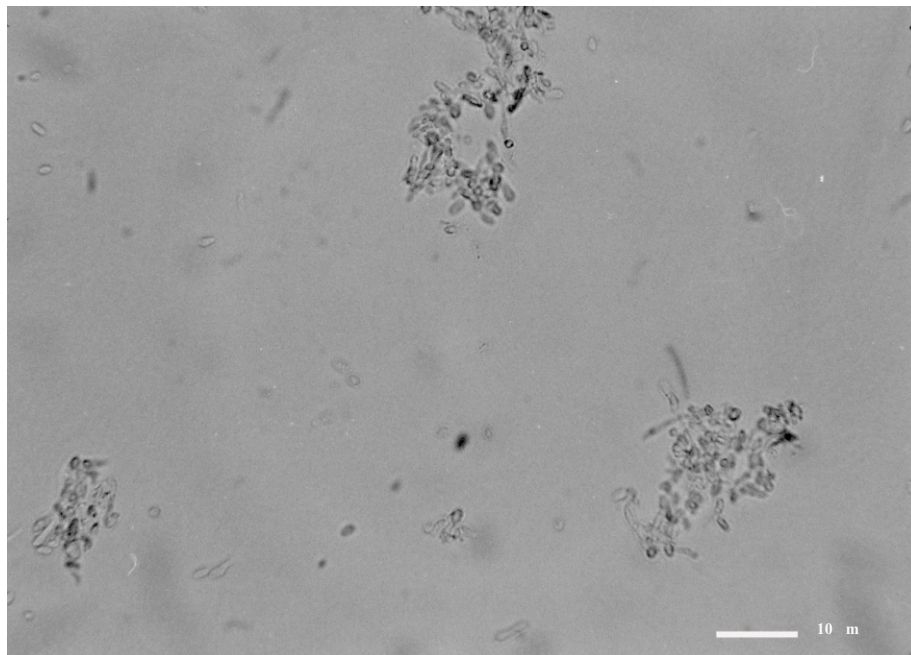


Fig. 20. Electroforesis en condiciones disociantes (14% de poliacrilamida)

1. Patrones de peso molecular en kDa
2. Paredes celulares de *A. bisporus*



A



B

Fig. 19. Ensayo de aglutinación al microscopio de contraste de fase
A. Control
B. Esporas aglutinadas

2.3.-INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Primeramente, se llevó a cabo el experimento de inmunofluorescencia para comprobar si el antisuero frente al glucogalactomanano de *Paecilomyces fumosoroseus* era capaz de reconocer el polisacárido de la pared celular de *V. fungicola* con estructura similar. Cuando los micelios de las diferentes cepas de *V. fungicola* sin y con procloraz-Mn se trataron con el antisuero se produjo inmunofluorescencia (Fig. 21B). En cambio, cuando se realizó el estudio con el suero preinmune los micelios no mostraron fluorescencia, por lo tanto, no hubo reconocimiento (Fig. 21A).

En segundo lugar, los ensayos de inmunofluorescencia indirecta consistieron en tratar el micelio vegetativo y agregado de *A. bisporus* con la fracción constituida por el glucogalactomanano (**F1b**) localizado mas externamente en la pared de *V. fungicola*. Cuando el micelio agregado fue tratado con la fracción polisacarídica extraída de las diferentes cepas de *V. fungicola* sin tratar y tratadas con procloraz-Mn, se observó en todos los casos que las hifas del micelio agregado mostraron fluorescencia (Fig. 22B).

En cambio, tanto las hifas agregadas no pretratadas (Fig. 22A) como las hifas del micelio vegetativo pretratado con dicho polisacárido (Fig. 22C) fueron en ambos casos controles negativos.

2.4.- PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE *V. fungicola* IMPLICADA EN EL CONTACTO CON *A. bisporus*

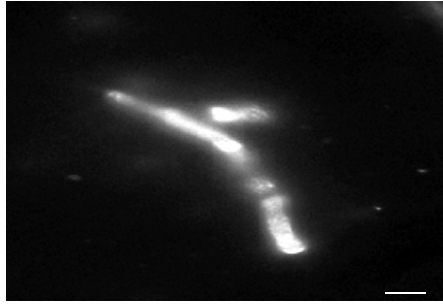
2.4.1. Purificación de la proteína presente en el medio de cultivo

El material de partida fue el caldo de cultivo de *V. fungicola* precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A continuación se realizó una columna de Sephadex G-100 seguida de otra columna de hidroxipatito con lo que se pudo separar una proteína que fue objeto de la siguiente caracterización.

A



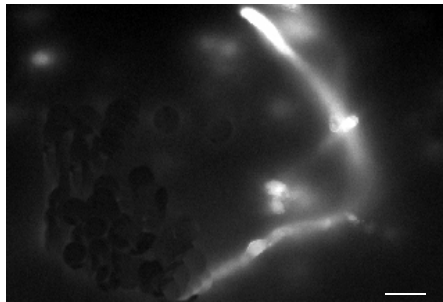
B



CBS



CBS+F



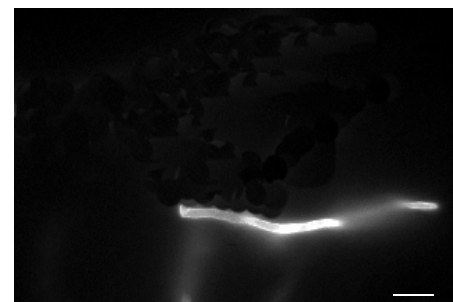
CIES 210



CIES 210+F



CIES 100



CIES 100+F

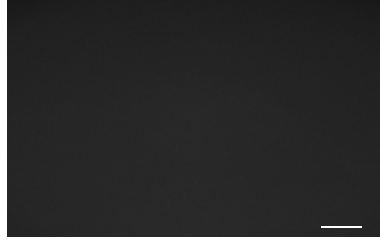
(Barra=1 μ m)

Fig. 21. Inmunofluorescencia

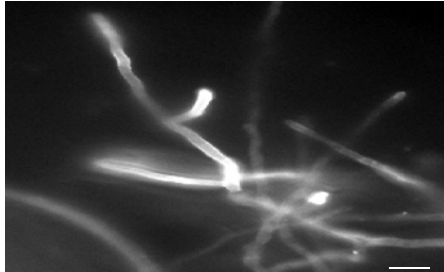
A. Control

B. Micelio de las tres cepas de *V. fungicola* sin o con pretratamiento con fungicida en presencia del antisuero de *P. fumosoroseus*

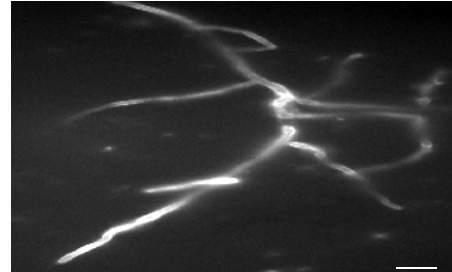
A



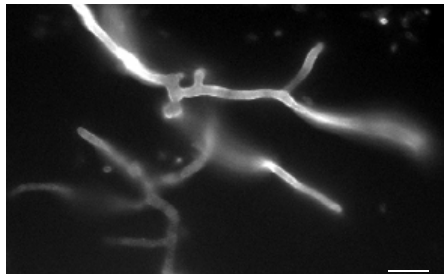
B



CBS



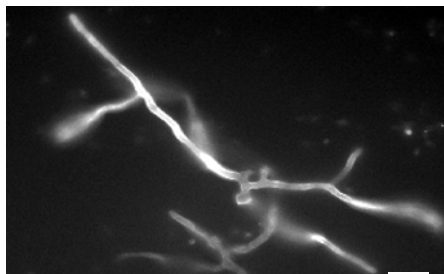
CBS+F



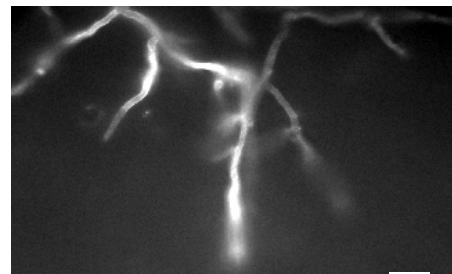
CIÉS 210



CIÉS 210+F

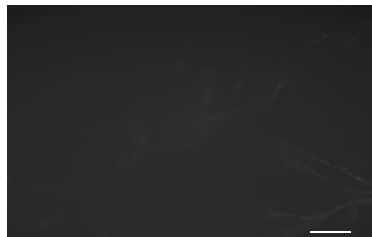


CIÉS 100



CIÉS 100+F

C



(Barra=1 μ m)

Fig. 22. Inmunofluorescencia indirecta

A. Control

B. Micelio agregado de *A. bisporus* + glucogalactomanano de *V. fungicola*

C. Micelio vegetativo de *A. bisporus* + glucogalactomanano de *V. fungicola*

2.4.1.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Mediante electroforesis en condiciones disociantes de la proteína de *V. fungicola* purificada a partir del medio de cultivo, se encontró una única banda de unos 7 ± 3 kDa (Fig. 23A). Al realizar la electroforesis en condiciones nativas se observó también una única banda pero en torno a los 70 ± 4 kDa, y el correspondiente gel se muestra en la Fig. 23B.

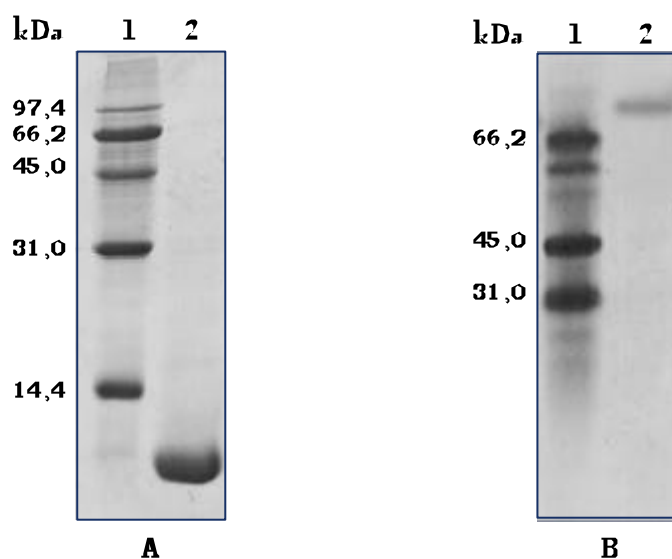


Fig.23. Electroforesis en condiciones disociantes (A, 15 % de poliacrilamida) y en condiciones nativas (B, 8 % de poliacrilamida)

1. Patrones de peso molecular en kDa
2. Proteína purificada

2.4.1.2.- Técnica MALDI-TOF

Para la determinación del peso molecular de nuestra proteína se empleó como matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico, como ya se ha descrito en Materiales y Métodos. El peso molecular de la proteína obtenido con esta técnica fue de 7563.9 Da (Fig. 24), que

se aproxima al encontrado mediante la electroforesis en condiciones disociantes (7 ± 3 kDa).

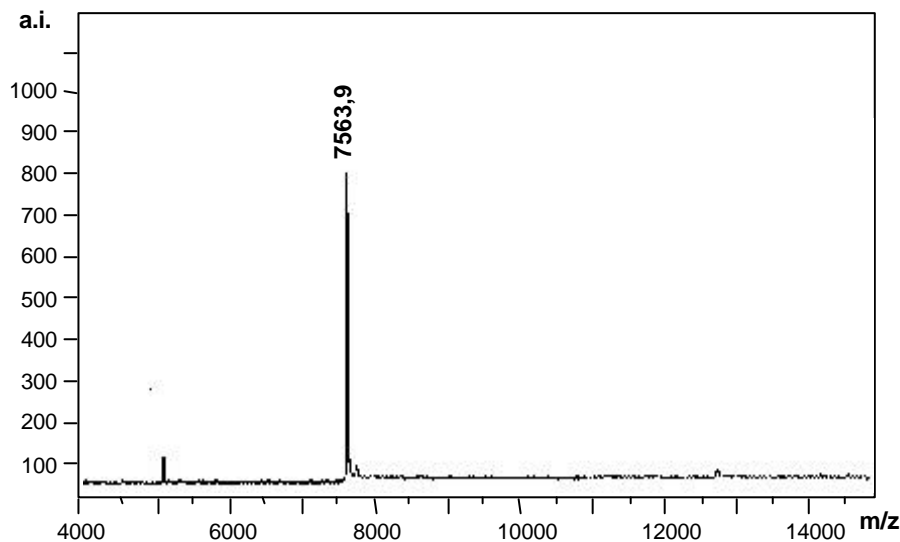


Fig.24. Espectro de masas de la proteína purificada de *V. fungicola* mediante la técnica de MALDI-TOF

2.4.1.3.- Deglicosilación de la proteína

El pico fino obtenido mediante la técnica de MALDI-TOF sugiere la ausencia de glicosilación, ya que las proteínas glicosiladas presentan un pico más ancho. Por otro lado, para comprobar la presencia o no de carbohidratos en la proteína purificada, la muestra se sometió a la acción de la endo- β -N-acetilglucosaminidasa H y con dicho tratamiento no se observó cambio en la movilidad electroforética de la proteína. Después se llevó a cabo la tinción con ácido periódico-Schiff tras la electroforesis en condiciones disociantes, y dicha tinción dio resultado negativo. De todo lo que antecede, se deduce que dicha proteína no es una glicoproteína.

2.4.1.4.- Análisis de aminoácidos y secuencia N-terminal

En la Tabla 17 se muestra el análisis de los aminoácidos de la proteína purificada, y en él se detectó la presencia de aproximadamente 50% de residuos

hidrofóbicos, un número relativamente alto (21,8%) de aminoácidos de bajo peso molecular (Ala y Gly) y aminoácidos ácidos (Asx y Glx, 20,1%), un número bajo (5,5%) de aminoácidos básicos (Arg y Lys), así como de residuos aromáticos (4,6%), con un sólo residuo de Tyr. Los aminoácidos His y Met no se encontraron, detectando al menos seis Cys, identificadas como cistinas.

Tabla 17. Análisis de aminoácidos de la proteína de *V. fungicola*

Residuo	nmol	Número de residuos
Ala	5,01	10
Arg	0,87	2
Asx	4,76	9
Cys	1,53	3
Glx	2,43	5
Gly	2,78	5
Ile	1,11	2
Leu	3,86	8
Lys	0,98	2
Phe	1,28	2
Pro	3,49	7
Ser	2,38	5
Thr	1,74	3
Tyr	0,36	1
Val	2,88	6
		Nº total de residuos 73*

*El número de residuos se calculó basándose en el peso molecular de 7563.9, obtenido en el MALDI-TOF.

Cys se detecta como cistina.

Se determinó la secuencia N-terminal de la muestra por degradación de Edman, los primeros cinco residuos de la proteína fueron Thr-Asn-Val-Asp-Val.

2.4.1.5.- Espectros de absorción y de fluorescencia

La Fig. 25A muestra el espectro de absorción de la proteína de *V. fungicola*, en donde no se observa un máximo claro de absorción en la región característica de los residuos aromáticos. La presencia de un residuo de Tyr, dos de Phe y seis de Cys da lugar a un espectro con absorción en la región 250-265, dominada por la Phe y Cys.

En la Figura 25B se observan los espectros de fluorescencia de la muestra proteica, los cuales presentan un máximo de excitación a 280 nm y un máximo de emisión a 342 nm. Cuando la longitud de onda de la excitación fue de 295 nm no se detectó ninguna fluorescencia, debido a que es en esta longitud de onda donde el aminoácido Trp presenta una fluorescencia significativa. Este hecho, junto con la forma del espectro de absorción apoya la ausencia del Trp en la proteína objeto de estudio.

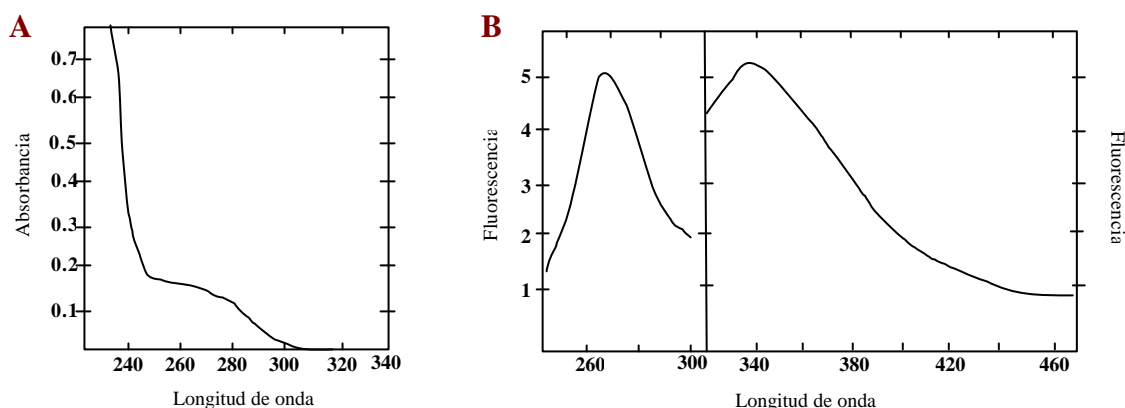


Fig. 25. Espectros de absorción (A) y de fluorescencia (B) de la proteína de *V. fungicola* purificada a partir del medio de cultivo

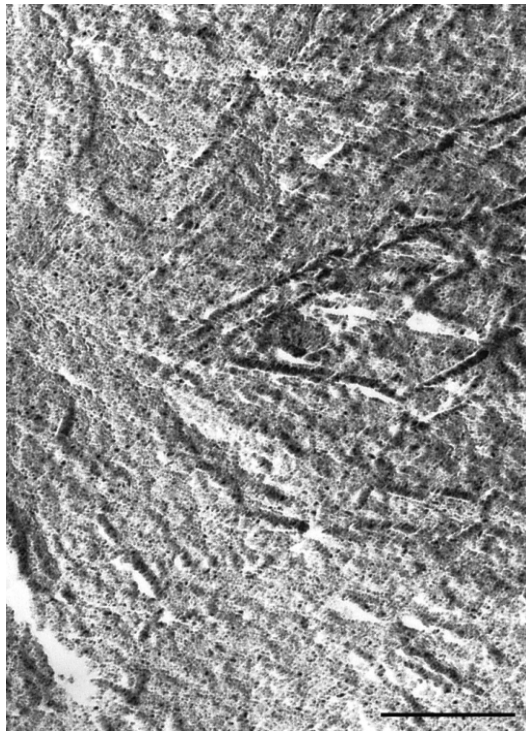
2.4.1.6.- Microscopía electrónica de transmisión según la técnica de sombreado

En la Fig. 26 se muestran imágenes obtenidas mediante la técnica de sombreado tanto de la superficie de la hifa de *V. fungicola* (Fig. 26A) como de la proteína purificada del medio de cultivo (Fig. 26B), en ellas se observaron unas estructuras en forma de pequeñas varillas que se disponen más o menos paralelamente y se asocian en

manojos. Dichas estructuras nos recuerdan a las descritas anteriormente en la superficie de las paredes celulares de las diferentes cepas de *V. fungicola*.



A



B

(Barra=0,5 μ m)

Fig. 26. Sombreado de la superficie de la hifa de *V. fungicola* (A) y de la proteína purificada del medio de cultivo (B)

2.4.2. Purificación de la proteína del micelio de *V. fungicola*

Para proceder a la purificación de la proteína del micelio de *V. fungicola* se realizó una extracción con 1% de SDS a pH 9,0, seguida de una cromatografía hidrofóbica, como ha sido descrito en Materiales y Métodos.

Mediante la electroforesis en condiciones disociantes de la proteína purificada de *V. fungicola* se encontró una banda de unos 7 ± 3 (Fig. 29), que coincide con la proteína aislada y purificada a partir del medio de cultivo de este mismo organismo.

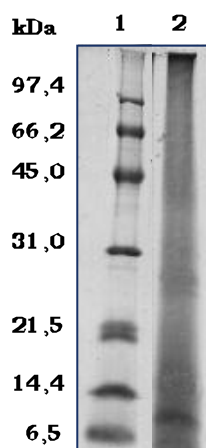


Fig.29. Electroforesis en condiciones disociantes (15 % de poliacrilamida)

1. Patrones de peso molecular en kDa
2. Proteína purificada

2.5.- PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE *A. bisporus* IMPLICADA EN EL MECANISMO DE RECONOCIMIENTO

Los experimentos previos de aglutinación nos sugirieron que la fracción **Fp** extraída de las paredes celulares de los carpóforos de *A. bisporus* contenía una proteína, aglutinina o lectina, capaz de aglutinar las esporas de *V. fungicola*. Este hecho nos condujo a tratar de profundizar más en el estudio de dicha fracción proteica implicada en el mecanismo de reconocimiento.

En este caso el material de partida fueron los carpóforos enteros de *A. bisporus*, que se sometieron a extracción seguida de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Para localizar la presencia de la proteína de interés se realizó un primer ensayo de hemoaglutinación sobre el material precipitado entre el 30-100% de saturación, así como después de cada una de las dos columnas de intercambio (aniónico y catiónico) realizadas para su purificación.

Igualmente tras cada uno de los pasos citados, la precipitación y las dos columnas citadas, se realizaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes, cuyos geles se muestran a continuación (Fig. 28).

En dichos geles podemos observar cómo va produciéndose paulatinamente la purificación de la proteína. Así tras la realización de la cromatografía de intercambio aniónico mediante la cual se eliminó todo el material pigmentado, que se quedó retenido en la columna, la fracción proteica con actividad de hemoaglutinación se pudo eluir con el correspondiente tampón.

Seguidamente la fracción de interés, es decir con actividad de hemoaglutinación, se pasó por una columna de intercambio catiónico, comprobándose mediante los ensayos de hemoaglutinación que dicha proteína quedaba retenida en la columna, eluyéndose con un gradiente continuo de 0-1M NaCl en el mismo tampón utilizado para la diálisis posterior a la precipitación así como para la cromatografía de intercambio aniónico. Posteriormente la muestra se dializó frente a H_2O y se procedió a su caracterización.

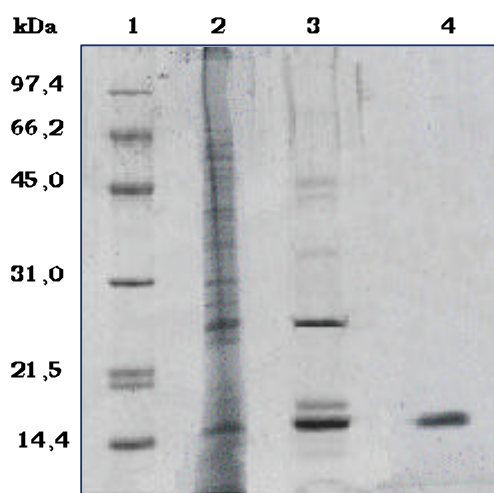


Fig.28. Electroforesis en condiciones disociantes (14 % de acrilamida)

1. Patrones de peso molecular en kDa
2. Extracto proteico
3. Muestra obtenida tras la cromatografía aniónica
4. Muestra purificada tras la cromatografía catiónica

En la Tabla 18 aparecen los resultados obtenidos en los sucesivos pasos de la purificación, así como la actividad de hemoaglutinación y el porcentaje de recuperación de la proteína purificada.

Tabla.18. Purificación de la proteína de los carpóforos de *A. bisporus* implicada en el mecanismo de reconocimiento

Fracción	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad de hemoaglutinación		Recuperación (%)
			Total (unidades)	Específica (unidades/mg)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	280	663,6	17920	27,0	100
Intercambio aniónico	92	158,2	11776	74,4	65,7
Intercambio catiónico	25,3	20,0	6477	324,0	36,1

2.5.1.- Determinación del peso molecular de la proteína purificada

El peso molecular de la proteína purificada ha sido determinado mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100, electroforesis disociante y nativa, y técnica de MALDI-TOF.

El peso molecular de la proteína estimado mediante cromatografía de filtración molecular se encuentra en torno a 60 kDa y coincide con el obtenido de la electroforesis en condiciones nativas de 60 ± 4 kDa (Fig.29). Mediante electroforesis en condiciones disociantes encontramos una banda de peso molecular de 16 ± 3 kDa (Fig.28), y utilizando la técnica de MALDI-TOF obtenemos un pico de 16014,6 Da (Fig.30).

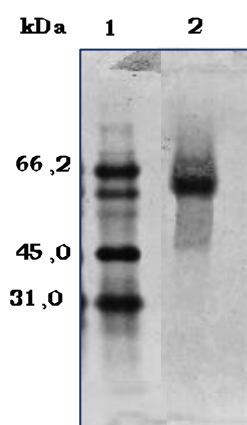


Fig.29. Electroforesis en condiciones nativas (7 % de acrilamida)

1. Patrones de peso molecular en kDa
2. Muestra purificada

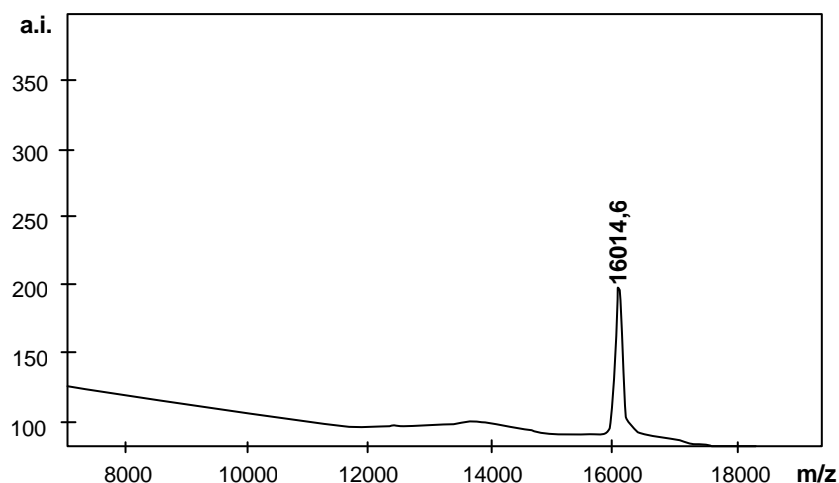


Fig.30. Espectro de masas de la proteína purificada de *A. bisporus* mediante la técnica de MALFI-TOF

2.5.2.- Determinación de la proporción de carbohidratos de la proteína purificada

Para comprobar si la proteína purificada era de naturaleza glicoprotéica se llevó a cabo primeramente la tinción específica con ácido periódico-Schiff, y al obtener resultado positivo pudimos deducir que se trataba de una proteína glicosilada.

La evaluación del contenido de carbohidratos total en la proteína purificada proporcionó un valor de 5,6%.

El conjunto de los resultados nos indica que la proteína purificada es una glicoproteína tetramérica constituida por 4 monómeros de un peso molecular de 16 kDa cada uno.

2.5.3.- Análisis de aminoácidos y secuencia N-terminal

En el análisis de aminoácidos de la proteína purificada se muestra en la Tabla 19, en él se detectó un número relativamente alto de aminoácidos ácidos e hidroxílicos.

Tabla 19. Análisis de aminoácidos de la proteína de *A. bisporus*

Residuo	nmol	Número de residuos
Ala	2,50	9
Arg	3,21	11
Asx	5,13	18
Cys	0,24	1
Glx	4,51	16
Gly	4,51	16
Ile	1,84	7
Leu	2,21	8
Lys	1,66	6
Phe	1,98	7
Met	0,40	1
Ser	2,62	9
Thr	4,86	18
Tyr	2,89	10
Val	3,61	13
His	0,26	1
		Nº total de residuos 151*

*El número de residuos se calculó basándose en el peso molecular de 16014,6, obtenido en el MALDI-TOF. Cys se detecta como cistina.

Se determinó la secuencia N-terminal de la muestra por degradación de Edman, los primeros cinco residuos de la proteína fueron Thr-Tyr-Thr-Ile-Ser.

2.5.4.- Ensayos de inhibición de la hemoaglutinación

La especificidad de unión de la proteína purificada a carbohidratos se determinó por ensayos de inhibición de hemoaglutinación. Como se muestra en la Tabla 20, la glucosa, manosa, lactosa, y N-acetil-glucosamina no inhiben la aglutinación, a

diferencia de la N-acetil-galactosamina que presenta inhibición a partir de 25 mmol/L así como la fructosa y la galactosa que inhiben dicha aglutinación a concentraciones más altas. Sin embargo, el glucogalactomanano de *V. fungicola* (CBS) tiene efecto inhibitorio a partir de 6,25 mmol/L, y el mismo glucogalactomanano pretratado con fungicida muestra inhibición a 3,12 mmol/L lo que nos indica que la lectina purificada tiene fuerte afinidad por ciertos residuos sacarídicos de este polisacárido. Los glucogalactomananos de las cepas CIES 210 y CIES 100 de *V. fungicola* sin y con tratamiento previo con procloraz-Mn mostraron una acción inhibitoria similar a la de la cepa CBS reseñada.

Tabla 20. Inhibición de la actividad de hemoaglutinación de la proteína de *A. bisporus* por varios carbohidratos

Carbohidratos	Concentraciones de carbohidratos (mmol/L)									
	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	200	PBS
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	±*	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	±*	+
N-acetil-D-glucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil-D-galactosamina	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Glucogalactomanano**	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Glucogalactomanano***	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

* ± 200 mmol/L

** Glucogalactomanano de *V. fungicola* CBS

*** Glucogalactomanano de *V. fungicola* CBS tratado con fungicida

+ (hemoaglutinación positiva)

- (hemoaglutinación negativa)

2.5.5.-Intentos de localización de la lectina en el micelio vegetativo de *A. bisporus*

El micelio vegetativo de *A. bisporus* se sometió al mismo tratamiento que el micelio agregado (carpóforos) de *A. bisporus*, para realizar el estudio de la proteína implicada en el mecanismo de reconocimiento.

Después de realizar la extracción con PBS seguida de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se realizó un primer ensayo de hemaglutinación así como un gel de electroforesis en condiciones disociantes para localizar la presencia de dicha proteína, observándose que en el micelio vegetativo de *A. bisporus* no se encontró la proteína de reconocimiento descrita para el micelio agregado de *A. bisporus*.

DISCUSIÓN

Los hongos objeto de estudio de esta tesis doctoral presentan unas paredes celulares con una composición y estructura químicas muy distintas, como corresponde a su diferente taxonomía y filogenia, al ser *V. fungicola* un Hongo Imperfecto y *A. bisporus* un Hongo Basidiomiceto muy evolucionado. Pero a pesar de las claras diferencias estructurales descritas entre ellos (Michalenko *et al.*, 1976; García Mendoza *et al.*, 1987a; Mol y Wessels, 1990; Calonje *et al.*, 1996; Calonje *et al.*, 2000b), la arquitectura molecular de ambos hongos, y en general la de todos los hongos, revela una cierta similitud en su organización al presentar una capa interna microfibrilar esquelética a la que se asocian una o más capas externas de estructura más o menos amorfa o reticulada.

En cuanto a las funciones que presenta la pared celular fúngica, su estudio constituye un tema de investigación más reciente que el de la composición y estructura químicas al que acabamos de hacer referencia. A las funciones más tradicionales asignadas a la pared celular, como su actuación a modo de barrera para el mantenimiento de la forma y prevenir la rotura del protoplasto, hay que añadir la presencia de numerosas enzimas encargadas tanto de la nutrición celular como de la diferenciación y morfogénesis, así como de las glicoproteínas de superficie involucradas en los sistemas de reconocimiento celular. De todo ello se puede concluir que la pared celular es una estructura muy dinámica y sujeta a diferentes modificaciones a lo largo del ciclo celular del hongo de que se trate.

La pared celular de los hongos *V. fungicola* y *A. bisporus* ha mostrado ser, a lo largo de todos los estudios aquí descritos, la estructura celular fundamental donde se desarrollan los mecanismos celulares y moleculares que dan lugar al desencadenamiento de la verticiliosis o "mole seca" de los cultivos comerciales de champiñón. Paralelamente tanto la estructura química como la ultraestructura de la pared celular de ambos hongos han resultado ser afectadas de alguna forma por la acción del fungicida procloraz-Mn, utilizado rutinariamente para prevenir y controlar la citada micosis.

Todos los resultados obtenidos sobre los conceptos que acabamos de exponer van a ser seguidamente objeto de discusión.

1. EFECTO DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-Mn SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS PAREDES CELULARES DEL MICOPATÓGENO *V. fungicola* Y DE SU HOSPEDADOR *A. bisporus*

El control de los hongos micoparásitos mediante productos químicos es un problema que entraña gran dificultad y envergadura debido a que los micelios fúngicos, de una manera general, presentan propiedades ilimitadas para regenerarse a partir del más pequeño fragmento de hifa superviviente después del tratamiento químico inhibitorio más drástico. El fungicida procloraz-Mn, que penetra en el interior celular del hongo micoparásito *V. fungicola*, ha sido descrito como inhibidor de la desmetilación del C-14 necesaria para la síntesis de ergosterol, efecto que presentan ciertos derivados pirimidínicos, triazólicos e imidazólicos (entre estos últimos se encuentra el procloraz-Mn), pero sin excluir otro posible modo de acción, como es la inhibición parcial de la síntesis de proteínas, sugerido primeramente por Siegel (1981).

Desde el punto de vista de protección de las cosechas vegetales, el procloraz-Mn ha sido clasificado como fungicida no-sistémico o pobremente sistémico, por su baja penetración en las células de los hospedadores vegetales tratados habitualmente (Hassall, 1990), y de ahí su uso tan extensivo. Pero al darse la circunstancia de que en el caso presente de la verticiliosis o "mole seca" del champiñón, el hospedador *A. bisporus*, no es un vegetal sino igualmente un hongo como el parásito *V. fungicola*, el efecto del fungicida sobre el organismo hospedador, que a su vez es objeto de cultivo para la alimentación humana, es completamente distinto que cuando se previene o controla una micosis sobre un organismo vegetal. De todo lo que antecede y concretamente en este caso particular, el fungicida procloraz-Mn se comporta como sistémico frente al hospedador.

El primer efecto que produce el fungicida procloraz-Mn sobre las paredes celulares del micopatógeno *V. fungicola*, en las tres cepas objeto de estudio, es una inhibición parcial de la síntesis de proteínas de dichas paredes, mostrando paralelamente un pequeño incremento de los carbohidratos neutros totales, compensado en parte por los correspondientes aminoazúcares, excepto en la cepa CIES 210 cuyas hexosaminas aumentan significativamente (Bernardo *et al.*, 2002). Estos resultados nos sugieren que, aunque el efecto del procloraz-Mn sobre los polisacáridos de tales paredes celulares no sea aparentemente muy significativo, deben producirse, sin embargo, unos cambios estructurales en dichos polisacáridos que se reflejan sólo ligeramente en las cifras de los componentes totales.

El estudio detallado de los monosacáridos que constituyen las fracciones polisacáridicas aisladas de las paredes celulares de *V. fungicola* (Calonje *et al.*, 2000b) ha mostrado la presencia de los homo- y heteropolisacáridos, glucanos y glucogalactomananos. Los glucanos han sido ampliamente descritos en los hongos (Gorin y Spencer, 1968; Duffus *et al.*, 1982) presentando diferentes tipos de enlaces, pero principalmente en (1-3), (1-4) y (1-6). Las tres fracciones de glucanos, **F1a**, **F2Sa** y **F3**, de las paredes celulares de *V. fungicola* tratadas con el fungicida procloraz-Mn no se ven afectadas en su composición. La fracción **F1a** de *V. fungicola* identificada como un α -(1-4)-glucano con algunas ramificaciones en posición C6, se asemeja totalmente al glucano presente en las paredes de *Paecilomyces fumosoroseus* (Domenech *et al.*, 1996), *Aphanoascus fulvescens* (Leal *et al.*, 1992), *Penicillium erythromellis* (Rupérez y Leal, 1987) y diferentes especies de *Talaromyces* (Prieto *et al.*, 1995). Esta fracción, sin embargo, por efecto del procloraz-Mn se va haciendo más lineal, en las tres cepas estudiadas, por pérdida parcial paulatina de los enlaces (1-4,6) así como de los correspondientes terminales. La fracción **F2Sa** correspondiente a otro α -(1-4)-glucano muy semejante al anterior, es decir también ramificado en (1-4,6), pierde, en presencia del fungicida, parte de estos últimos enlaces, principalmente en la cepa CIES 100, haciéndose progresivamente más lineal. Finalmente la fracción **F3**, identificada como el glucano que se asocia a la quitina, con enlaces en (1-3) y (1-4) y un bajo porcentaje de ramificaciones en C6, sufre por efecto del procloraz-Mn un aumento de los enlaces (1-4) a expensas de una disminución de los enlaces en (1-3), pero sin variaciones significativas en sus ramificaciones en ninguna de las tres cepas estudiadas. Una

estructura similar para un glucano igualmente insoluble in álcali fue descrita por Horikoshi y Hda (1964) en las cubiertas de las esporas de *Aspergillus oryzae*, en las paredes celulares de las formas de levadura de *Verticillium albo-atrum* (Wang y Bartnicki-García, 1970) así como en las paredes celulares de *Aspergillus niger* (Stagg y Feather, 1973).

En relación con los glucogalactomananos, el tratamiento con el fungicida procloraz-Mn produce primeramente una disminución de los porcentajes de glucosa que se compensa con un aumento de galactosa, permaneciendo la manosa prácticamente inalterada. En las fracciones **F1b** y **F2Sb**, constituidas ambas mayoritariamente por un esqueleto de manosa con enlaces α -(1-6) al que se unen en posición C4 numerosos residuos terminales de galactopiranososa y en menor proporción de hexopiranososa (seguramente glucosa), el tratamiento con fungicida da lugar en la fracción **F1b**, a una disminución de los enlaces de glucosa en (1-4) en *V. fungicola* CBS, mientras que en la fracción **F2Sb** descienden los enlaces (1-3) y (1-4) de glucosa en diferente proporción en las tres cepas estudiadas, por lo que los glucogalactomananos se van transformando en galactomananos. Glucogalactomananos semejantes han sido descritos en las paredes celulares de especies del género *Paecilomyces* (Leal, 1994; Domenech *et al.*, 1996).

Como complemento a estos estudios, los análisis de los espectros de infrarrojo han mostrado, sin embargo, que la configuración de dichos polisacáridos no presenta variación alguna, cuando se comparan las mismas fracciones polisacáridicas, sin y con pretratamiento con el procloraz-Mn, a pesar de estar claramente afectadas sus estructuras químicas.

Por otro lado, las proteínas de dichas paredes celulares también han sido objeto de estudio, por la circunstancia de estar igualmente afectadas por el fungicida, como se refleja en el análisis químico global. Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes de los extractos proteicos de dichas paredes celulares muestran cómo ciertas proteínas se ven parcialmente inhibidas por la acción del procloraz-Mn, y entre ellas, particularmente la banda de 7 ± 3 kDa, que podría corresponder a la proteína hidrofobina.

La presencia de proteína en las paredes celulares fúngicas es un hecho aceptado y demostrado. En las paredes celulares de *V. fungicola* una cantidad significativa de

material proteináceo es extraído por agua caliente y álcali, indicando que parte de este componente se encuentra asociado a las fracciones **F1** y **F2** (Calonje *et al.*, 2000b). Después de estos tratamientos las paredes celulares no pierden su morfología global, pero en ambos casos sus superficies muestran claras diferencias al no visualizarse progresivamente determinadas estructuras (Calonje *et al.*, 2000b). La microscopía electrónica de transmisión, utilizando la técnica de sombreado, ha puesto de manifiesto en las paredes celulares de *V. fungicola* pretratadas la desaparición paulatina de ciertas estructuras características, apareciendo manojos de varillas, semejantes a las exhibidas por la proteína hidrofobina. Estructuras semejantes compuestas en todos los casos por proteína han sido descritas en hifas de *Schizophyllum commune* (Wessels *et al.*, 1972), en conidios de *Trichophyton mentagrophytes* (Hasimoto *et al.*, 1976), *Neurospora crassa* (Beever *et al.*, 1979) *Aspergillus niger* (Cole *et al.*, 1979), *Syncephalastrum racemosus* (Hobot and Gull, 1981) y *Aspergillus nidulans* (Claverie-Martin *et al.*, 1986). Posteriormente de Vries *et al.* (1993) y Templeton *et al.* (1995) han identificado la citada proteína, que forma las estructuras de varillas en *N. crassa*, como hidrofobina.

Como primera deducción de estos estudios podemos anticipar que el procloraz-Mn induce a que la pared celular de *V. fungicola* reestructure químicamente sus dos primeras capas polisacáridicas formadas por un glucogalactomanano asociado a un α -(1-4)-glucano, introduciendo modificaciones puntuales en ambos componentes siendo particularmente más afectados los glucogalactomananos, e igualmente en la zona más interna de dicha pared, constituida por quitina cementada por un α -(1-3)(1-4)-glucano, modificando, en este caso, únicamente el componente de glucano.

Estas modificaciones químicas estructurales de los polisacáridos glucogalactomananos, junto con la inhibición parcial de determinadas proteínas, y concretamente la posible disminución de la proteína hidrofobina, podrían producir una interferencia, más o menos acusada, en los procesos de contacto y/o reconocimiento entre el hospedador y el patógeno previos al desarrollo de la infección, manifestándose con la tendencia a una menor infectividad por parte de las cepas CBS y CIES 100 de dicho patógeno debido al pretratamiento suministrado, como podremos comprobar más adelante, que en última instancia podría conducir al consiguiente control de la micosis. Por otra parte el diferente grado de modificaciones estructurales exhibido por cada una de las tres cepas de *V. fungicola* estudiadas, y más particularmente por parte de la cepa

CIES 210, como respuesta al fungicida, podría deberse a otro tipo de transformaciones moleculares adicionales relacionadas con sus distintos niveles de resistencia al procloraz-Mn.

En cuanto a las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus*, el primer efecto producido por el fungicida, que se detecta en el análisis químico global de las mismas es, como en caso de *V. fungicola*, una inhibición parcial de la síntesis de proteínas, pero aquí compensada por un ligero aumento de los azúcares aminados, manteniéndose los demás componentes prácticamente nivelados. Por otro lado, el análisis de los monosacáridos de las fracciones aisladas de las paredes celulares de *A. bisporus* muestra que el tratamiento con procloraz-Mn hace desaparecer los porcentajes de manosa y xilosa de la fracción **FII**, así como también de la xilosa en la fracción **FIII**, mientras que las demás fracciones son sólo afectadas ligeramente en su composición de monosacáridos.

Al estudiar el modo de acción del fungicida procloraz-Mn sobre la estructura química de las fracciones aisladas se observa que también se producen modificaciones significativas en determinados polisacáridos. Así la fracción **FI** o mucílago, que corresponde esencialmente a polisacáridos de glucosa unida en α -(1-4), con pequeñas proporciones de manosa en (1-3), galactosa en (1-6) y ramificaciones en (1-3,4) y (1-4,6) de glucosa, aunque no es de las fracciones más afectadas, se hace más ramificada por efecto del fungicida al aumentar la proporción de estos dos últimos enlaces. Polisacáridos semejantes han sido descritos en otras paredes celulares fúngicas como *Penicillium erythromellis* (Rúperez y Leal, 1987), *Aphanoascus fulvescens* (Leal *et al.*, 1992) y diferentes especies de *Talaromyces* (Prieto *et al.*, 1995). Los polisacáridos que conforman la fracción **FII**, constituidos principalmente por residuos de α -(1-3) glucosa, con un bajo porcentaje de (1-3) manosa, y ramificaciones en (1-3,4) de glucosa y (1-3,4) de manosa con terminales de xilosa sufren, por la acción del procloraz-Mn, la pérdida total de la manosa y la xilosa, dando lugar a un polisacárido mayoritario de α -(1-3) glucosa, más ramificado que anteriormente en su posición de glucosa (1-3,6) con terminales también de glucosa, y apareciendo un ligero porcentaje de galactosa furanosa. Este último monosacárido ha sido descrito en los homo- y heteropolisacáridos de diferentes especies de *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Talaromyces* y *Paecilomyces* (Leal, 1994). La asociación de xilosa y manosa formando el polisacárido xilomanano es

característica de las paredes celulares de los basidiomicetos *Armillaria mellea* (Bouveng *et al.*, 1967), *Polyporus tumulosus* (Angyal *et al.*, 1974) y *Coprinus cinereus* (Bottom y Siehr, 1979).

La fracción **FIII** también está claramente afectada por la acción del fungicida, desapareciendo la xilosa y aumentando las ramificaciones de glucosa en (1-4,6), junto con la presencia de una pequeña proporción de galactosa furanosa, como en el caso de la fracción **FII**. Las restantes fracciones de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus*, **FIV**, **FV** y **FVI**, están muy poco afectadas por la acción del procloraz-Mn, mostrando únicamente la tendencia a hacerse más ramificadas, y más concretamente la fracción **FIV** en sus enlaces de glucosa en posición (1-3,6).

Además de las modificaciones demostradas en los monosacáridos y en los enlaces glicosídicos de los polisacáridos de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus*, producidas por el pretratamiento con el fungicida, la configuración de dichos polisacáridos también se ve afectada por el procloraz-Mn, particularmente en las fracciones **FII** y **FIII**.

En cuanto a las proteínas de las paredes celulares de *A. bisporus* también hemos podido detectar modificaciones cuali- y cuantitativas en presencia de Procloraz-Mn, pero en este hongo, con una organización molecular de sus paredes celulares muy diferente a *V. fungicola*, no se pueden visualizar diferencias estructurales en su superficie, mediante la microscopía electrónica de transmisión. Paralelamente las diferencias más significativas en los polisacáridos de las paredes de *A. bisporus* producidas por el procloraz-Mn tienen lugar en los polisacáridos de las capas intermedias (fracciones **FII** y **FIII**) no visualizables en la superficie celular, donde únicamente se aprecia la estructura granulosa del mucílago, poco afectado por el fungicida.

De los estudios que acabamos de describir podemos deducir que las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus*, en presencia de la correspondiente DL₅₀ de procloraz-Mn, sufren igualmente modificaciones químicas estructurales en ciertos polisacáridos, particularmente en los α -glucanos de las fracciones **FII** y **FIII**, así como en determinadas proteínas, que pueden coadyuvar junto con las reestructuraciones producidas en las paredes celulares de *V. fungicola*, a un menor contacto y/o reconocimiento entre el micopatógeno y el hospedador, y contribuir al control de la

verticiliosis, que es en última instancia el objetivo perseguido con el uso rutinario del fungicida procloraz-Mn.

Las posibles consecuencias producidas por el efecto inhibitorio del fungicida sobre las diferentes cepas de *V. fungicola* han podido ser estudiadas sobre los carpóforos de *A. bisporus* cultivados comercialmente en los experimentos a escala industrial o realizados en las propias explotaciones comerciales. A este respecto la inoculación experimental de *V. fungicola* sobre cultivos comerciales de champiñón efectuados con los tres aislamientos del patógeno, sin tratar o tratados con fungicida, muestran la tendencia a ser algo menos infectivos, en el caso de las cepas CBS y CIES 100 (tratadas con procloraz-Mn), pero no cuando se trata de la cepa CIES 210 (igualmente tratada), probablemente debido a las distintas modificaciones experimentadas en la estructura química de la pared celular de cada uno de ellos. Además no debemos olvidar que las cepas CIES 210 y CIES 100, aunque los correspondientes controles no hayan sido pretratados por nosotros con el fungicida, de alguna forma sí han sufrido las consecuencias del procloraz-Mn durante un tiempo indefinido, pues cuando fueron aisladas de las granjas de explotación comercial ya se utilizaba rutinariamente el fungicida como preventivo, y lo que puede ser tanto o más importante, que a pesar de la normativa vigente sobre el uso de los fungicidas, en realidad no existe un auténtico control sobre su utilización. Por ello, el hecho de que una de las tres cepas de *V. fungicola* estudiadas (CIES 210 sin tratar o tratada) se haya comportado como más infectiva, nos hace pensar en el peligro potencial que representa en un futuro próximo el uso rutinario del fungicida como preventivo de la verticiliosis de los cultivos industriales de champiñón, por la posible resistencia adquirida al procloraz-Mn.

Estudios realizados en el Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES) por Gea Alegría (comunicación personal) demuestran cómo la producción total de champiñones para consumo se ve afectada numéricamente por el empleo rutinario del procloraz-Mn, (entre un 10-45 % de descenso en el número de carpóforos sanos recolectados, según el tratamiento efectuado) no pareciendo, sin embargo, influir en el peso de los carpóforos desarrollados pero, a pesar de dicho descenso, los resultados de la producción industrial son más rentables que cuando hace su aparición la verticiliosis en los cultivos comerciales, por ocasionar cuantiosas pérdidas económicas.

De todo lo que antecede se puede deducir que el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de la verticiliosis puede ser muy importante para desarrollar una vía alternativa en la lucha contra el *V. fungicola*, lucha en la que no sea necesario utilizar fungicidas, y por lo tanto ir a la raíz del problema sin provocar alteraciones que nos lleven a obtener microorganismos resistentes indeseados.

2. BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA VERTICILIOSIS (PRODUCIDA POR *V. fungicola*) DE LOS CULTIVOS COMERCIALES DE CHAMPIÑÓN (*A. bisporus*)

El punto de partida de esta investigación fue el trabajo realizado por Calonje (1998) después de demostrar la digestión enzimática producida por *V. fungicola* sobre las paredes celulares del micelio agregado de los carpóforos de *A. bisporus*, que tiene lugar durante la verticiliosis o "mole seca" de bs cultivos comerciales de champiñón. Por otra parte sugirió la posible existencia de dos etapas previas al desencadenamiento de la necrosis enzimática, una de "adhesión" más o menos inespecífica entre el hospedador y el parásito y otra de "reconocimiento" en la que ya deberían intervenir ligandos específicos de ambos organismos, demostrando paralelamente que *A. bisporus* en su fase de micelio vegetativo no desarrolla la micosis (Calonje *et al.*, 2000a).

A la vista de estos precedentes hemos realizado un estudio sobre la interacción de los micelios, vegetativo de *V. fungicola* y agregado de *A. bisporus*, mediante microscopía electrónica de cortes ultrafinos, que complementa en parte las observaciones descritas por Dragt *et al.* (1996) y Calonje *et al.* (1997). En dichos estudios comprobamos que se produce un contacto entre las hifas de ambos organismos, seguido de la formación de un material amorfo en la superficie del micoparásito en su proximidad a las hifas del hospedador, comenzando a continuación la digestión de las paredes celulares de las hifas de *A. bisporus* en el mismo lugar en que se localiza. El micopatógeno se desarrolla probablemente también a expensas del contenido citoplasmático de aquellas y finaliza con la destrucción celular y posterior necrosis total parcial de los carpóforos de *A. bisporus*. Un mecanismo semejante de parasitismo ha sido descrito para los también micoparásitos *Trichoderma harzianum*, *Stachybotrys*

elegans y *Verticillium viguttatum* en su infección a *Rhizoctonia solani* (Elad *et al.*, 1987; Benyagoub *et al.*, 1996; Van Den Boogert *et al.*, 1989) y *Talaromyces flavus* sobre *Verticillium dahliae* (Fahima *et al.*, 1992).

La microscopía de barrido realizada sobre muestras semejantes confirma dichos resultados, y solamente podemos añadir que las hifas del micoparásito van rodeando las del hospedador, entremezclándose ambas a la vez que sus respectivas esporas, y distinguiéndose unas hifas de otras fácilmente por su distinto grosor así como las esporas, entre sí por su diferente tamaño.

Pero, previamente al desarrollo de la infección claramente detectable o lo que es lo mismo la degradación enzimática del hospedador con necrosis aparente, existen cada vez más evidencias de la existencia de un mecanismo de reconocimiento y/o unión del micoparásito con el hospedador, en donde parece que interaccionan una aglutinina o lectina localizada en la superficie de este último y un polisacárido de la pared celular del micoparásito (Nordbring-Hertz y Chet, 1986; Manocha y Chen, 1991; Manocha y Sahai, 1993). Este hallazgo concuerda con la observación en el microscopio electrónico, anteriormente citada, relativa a la presencia de material amorfo en la zona de contacto de las hifas de *V. fungicola* y *A. bisporus*, igualmente descrita en el micoparasitismo de *T. harzianum* con *R. solani* (Elad *et al.*, 1987).

Los experimentos de aglutinación de esporas germinadas de *V. fungicola* en presencia de la fracción **Fp** de las paredes celulares de los carpóforos de *A. bisporus* pusieron de manifiesto cómo en la superficie de estas últimas paredes existe un componente que se une específicamente a las paredes celulares de las hifas del micoparásito. El estudio electroforético en condiciones disociantes de dicha fracción mostró, como ya expusimos anteriormente, estar constituido por distintas bandas polipeptídicas, que a su vez se veían diferentemente afectadas por la acción del procloraz-Mn. Como la zona más externa de la pared celular del micoparásito está constituida mayoritariamente por el polisacárido glucogalactomanano (fracción **F1b**) asociado a una menor proporción de glucano (fracción **F1a**) y proteínas, entre las que se pudo identificar una posible hidrofobina (Calonje *et al.*, 2000b), el siguiente objetivo a desarrollar fue comprobar si este polisacárido aislado estaba implicado en el reconocimiento y/o unión con el hospedador.

La inmunofluorescencia microscópica realizada con un antisuero preparado frente al glucogalactomanano de *Paecilomyces fumosoroseus*, muy similar al de *V. fungicola* (Domenech *et al.*, 1996) mostró que la fluorescencia se produce claramente en los micelios de las tres cepas del micopatógeno, sin y con el efecto previo del procloraz-Mn, a diferencia del control negativo que contiene suero preinmune y por tanto no puede desarrollar la fluorescencia. Cuando se realiza la inmunofluorescencia indirecta sobre el micelio agregado de los carpóforos de *A. bisporus* incubado con glucogalactomanano (**F1b**) procedente de las tres cepas de *V. fungicola*, sin y con tratamiento previo con el fungicida, se detecta siempre inmunofluorescencia positiva más o menos intensa, lo que nos indica, por una parte, que se produce un determinado reconocimiento y/o unión, entre un componente proteico de la pared del hospedador con el polisacárido glucogalactomanano del micoparásito, visualizable gracias a la reacción inmunológica acoplada del anticuerpo secundario rodaminado, y por otra que, aunque en presencia de procloraz-Mn se hayan producido modificaciones estructurales puntuales en el polisacárido glucogalactomanano de *V. fungicola*, así como inhibiciones parciales en determinadas proteínas de la paredes celulares de *A. bisporus*, el antisuero antiglucogalactomanano todavía es capaz de reconocer el glucogalactomanano y la inmunofluorescencia indirecta sigue siendo positiva. Sin embargo, cuando se realiza este mismo experimento con el micelio vegetativo de *A. bisporus*, la inmunofluorescencia indirecta no se produce en ningún caso, es decir, preincubando con cada uno de los glucogalactomananos de las cepas de *V. fungicola* estudiadas, lo que nos indica claramente la ausencia de la proteína ligando en la superficie del micelio vegetativo de *A. bisporus*.

A la vista de estos resultados en donde se ha demostrado la intervención directa del glucogalactomanano de *V. fungicola* en el reconocimiento y/o unión con el micelio agregado de *A. bisporus*, el siguiente objetivo a desarrollar fue iniciar el estudio de dicho reconocimiento y/o unión con las proteínas que pudieran estar implicadas en el proceso de contacto. Como se daba la circunstancia de haber podido intuir la presencia de una posible hidrofobina en las paredes celulares de *V. fungicola*, comenzamos primeramente por el aislamiento de dicha proteína, para a continuación proceder a su caracterización estructural y al estudio de sus propiedades y, de acuerdo con los resultados obtenidos,

intentar dilucidar el papel que juega en el citado proceso de reconocimiento y/o unión entre el micopatógeno y el hospedador.

La proteína hidrofobina ha sido ampliamente relacionada con todos los procesos de adhesión que realizan los hongos con las superficies hidrofóbicas de las plantas y los artrópodos (Nicholson y Epstein, 1991; Jones, 1994), y como factor promotor del establecimiento de ciertos micoparásitos sobre la superficie hidrofóbica de *A. bisporus* (Umar *et al.*, 2000). Las hidrofobinas son unas proteínas de bajo peso molecular (alrededor de 10 kDa) que pudieran estar presentes en la capa externa de la pared celular de todos los hongos (Wessels, 1996), aunque hasta el presente sólo se han descrito en alrededor de veinte especies fúngicas (Wessels, 1997), estructurándose en forma de varillas agrupadas en manojos muy característicos y a menudo secretándose al medio de cultivo (Wessels, 1994; Lugones *et al.*, 1996, 1998; Calonje *et al.*, 2000b, 2002).

Con el fin de aislar y purificar la hidrofobina de *V. fungicola* se cultivó el micoparásito en un medio mínimo sintético en el que, pasados siete días de incubación estática, pudimos aislar y purificar dicha proteína. La pureza de la preparación obtenida después de la purificación fue comprobada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, tanto en condiciones disociantes como en condiciones nativas, obteniéndose en el primer caso, una única banda polipeptídica con una masa molecular aparente de 7 ± 3 kDa, mientras que en el segundo, la única banda obtenida mostró una masa molecular de 70 ± 4 kDa, indicando que en solución acuosa la proteína forma un agregado estable debido a su carácter hidrofóbico. El espectro de masa mediante la técnica de MALDI-TOF reveló la presencia de un pico de 7563,9 m/z y, dada la forma tan aguda de dicho pico, se pudo presuponer la ausencia de glicosilación, posteriormente demostrada por electroforesis disociante después del tratamiento con endo- β -N-acetilglucosaminidasa H y su posterior tinción negativa con el reactivo de Schiff. Otras hidrofobinas previamente caracterizadas como la HFBI de *Trichoderma reesei* (Askolin *et al.*, 2001) así como la ABH3 secretada por el micelio vegetativo de *A. bisporus* (Lugones *et al.*, 1998) han mostrado ser igualmente deglicosiladas.

Paralelamente el micelio de *V. fungicola* también fue objeto de extracción y purificación de hidrofobina, obteniéndose una proteína con las mismas características

que la hidrofobina aislada del medio de cultivo, comprobándose de este modo su localización en dicho micelio y su secreción en el medio de cultivo.

Para la caracterización de la hidrofobina de *V. fungicola* se realizó el correspondiente análisis de aminoácidos que dio como resultado un número y porcentaje de residuos semejante al de otras hidrofobinas anteriormente caracterizadas, con un contenido muy elevado de aminoácidos hidrofóbicos, junto con, al menos, seis cisteínas identificadas como cistinas formando tres enlaces disulfuro y ningún grupo -SH libre. La secuencia de los cinco primeros residuos N-terminales no mostró homología con otras hidrofobinas, mientras que la falta de Trp, demostrada mediante espectrometría de absorción y emisión de fluorescencia, es una propiedad que sí la hace semejante a otras hidrofobinas anteriormente estudiadas.

Las hidrofobinas descritas hasta la fecha han sido agrupadas como pertenecientes a la Clase I o la Clase II, de acuerdo con sus características de solubilidad y dada su semejanza con los patrones de hidropatía mostrados por otras hidrofobinas. La hidrofobina objeto de estudio es soluble en etanol al 60 % y en ácido trifluoroacético al 100 % formando, después de su agitación vigorosa, agregados que pueden solubilizarse tanto en etanol al 60 % como en dodecil sulfato sódico al 2 %. Estas propiedades la hacen semejante a la cerato-ulmina (Takai y Richards, 1978; Bowden *et al.*, 1994), la criparina (Carpenter *et al.*, 1992) y la hidrofobina de *Trichoderma reesei* (Nakari-Setälä *et al.*, 1996), indicando que puede ser clasificada como un nuevo miembro de la Clase II de hidrofobinas.

La ultraestructura en el microscopio electrónico de las diferentes hidrofobinas descritas hasta el presente, ha mostrado ser en forma de varillas, agrupadas en manojos formando un mosaico característico (Wessels *et al.*, 1972; Hasimoto *et al.*, 1976; Beever *et al.*, 1979; Cole *et al.*, 1979; Hobot y Gull, 1981; Claverie-Martin *et al.*, 1986; de Vries *et al.*, 1993; Wösten *et al.*, 1994b; Templeton *et al.*, 1995; Lugones *et al.*, 1996). Tal ultraestructura ha sido igualmente detectada para la hidrofobina de *V. fungicola*, tanto en la superficie celular (Calonje *et al.*, 2000b) como en las preparaciones de hidrofobina purificada, a su vez muy semejantes a la hidrofobina secretada por *A. bisporus* (Lugones *et al.*, 1998). Estas estructuras, detectadas en la superficie de las tres cepas estudiadas de *V. fungicola*, disminuyen parcialmente por efecto del procloraz-Mn, como ya hemos

demostrado anteriormente. Este hallazgo, coincide también con la inhibición parcial de la banda de proteína de alrededor de 7 ± 3 kDa, presente en los extractos proteicos de las paredes celulares de *V. fungicola* analizados por cromatografía disociante en geles de poliacrilamida cuando el micopatógeno ha sido tratado con fungicida.

La adhesión de los hongos a las superficies hidrofóbicas de las plantas y de los artrópodos es un hecho bien estudiado (Nicholson y Epstein, 1991; Jones, 1994), favoreciendo el establecimiento de ciertos micoparásitos sobre la superficie hidrofóbica de *A. bisporus* (Umar *et al.* 2000). Wösten *et al.* (1994a) demostraron que un hongo patógeno se adhería a la superficie hidrofílica de una fina película hidrofóbica después de que tal superficie hubiera sido humidificada por la secreción de hidrofobina junto con mucílago hidrofílico. Las paredes celulares del micelio vegetativo y agregado de *A. bisporus* contienen hidrofobina como ha sido puesto de manifiesto por Lugones *et al.* (1996, 1998), e igualmente mucílago que forma parte de la capa externa de la pared (García Mendoza *et al.* 1987a, 1987b), por lo que la hidrofobina de *V. fungicola* contacta o se adhiere, no específicamente, a la superficie de las paredes celulares, tanto de las hifas de micelio vegetativo como de agregado de *A. bisporus*, aunque para el desarrollo de la micosis sea necesario un posterior reconocimiento mediado por ligandos más específicos. Un comportamiento semejante de la hidrofobina de *A. bisporus* ha sido descrito por Umar *et al.* (2000), frente al micoparasitismo producido por *Mycogone perniciosa*.

Después de la caracterización molecular de la hidrofobina de *V. fungicola*, y la valoración de su papel en el proceso de contacto o adhesión inespecífica entre el micopatógeno y el hospedador, el siguiente objetivo que nos propusimos abordar fue el aislamiento, purificación y caracterización de una proteína, aglutinina o lectina de la superficie celular de *A. bisporus* implicada, junto con el glucogalactomanano de *V. fungicola*, en el reconocimiento y/o unión de ambos hongos.

Las lectinas son proteínas, de naturaleza no inmunológica, capaces de un reconocimiento específico y una unión reversible con ciertos ligandos de carbohidratos complejos sin alterar la estructura covalente de ninguno de los ligandos glicosídicos reconocidos (Kocourek y Horejsi, 1983). Estas proteínas se encuentran ampliamente representadas en animales, plantas, bacterias, virus y hongos, y más particularmente en

estos últimos (Coulet *et al.*, 1970), siendo el ensayo de hemoaglutinación la forma más utilizada para caracterizar la presencia de una lectina en un material biológico (Lis y Sharon, 1986). La mayoría de los estudios sobre lectinas de hongos han sido efectuados sobre los carpóforos de algunos hongos superiores (Jeune *et al.*, 1990; Kaneko *et al.*, 1993), pero también han sido descritas en algunos cultivos de micelio vegetativo (Banerjee *et al.* 1982; Musilek *et al.* 1990).

La presencia de una lectina en los carpóforos de *A. bisporus* había sido descrita previamente por Presant y Kornfeld (1972), demostrando su propiedad de interactuar específicamente con un receptor de eritrocitos humanos. A la vista de estos precedentes comenzamos por aislar y purificar dicha lectina, para proceder seguidamente a su caracterización funcional. La pureza de la proteína purificada pudo ser comprobada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes, obteniéndose una banda polipeptídica de 16 ± 3 kDa. Una banda de este mismo peso molecular había sido detectada dentro de la fracción **Fp** extraída de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus*, fracción que aglutinaba las esporas germinadas de *V. fungicola*. El espectro de masa de la citada proteína, mediante la técnica de MALDI-TOF, reveló la presencia de un pico de 16.014,6 m/z, y dada la forma de este pico, algo más ensanchado en su base que el obtenido para la hidrofobina, y la posterior tinción de Schiff positiva sobre la misma banda detectada por electroforesis en los geles de poliacrilamida se pudo demostrar su naturaleza glicoproteica, igualmente demostrada por el correspondiente análisis químico. A partir de las electroforesis nativas y disociantes así como de la cromatografía de filtración molecular pudimos concluir que la lectina de *A. bisporus* es una glicoproteína tetramérica, constituida por cuatro monómeros de peso molecular 16 kDa.

Experimentos paralelos realizados para el aislamiento y purificación de la misma lectina a partir del micelio vegetativo de *A. bisporus*, dieron como resultado la ausencia de dicha proteína en esta fase del ciclo biológico del citado hongo. Este mismo hecho había sido demostrado previamente en los también basidiomicetos superiores *Flammulina velutipes* (Yatohgo *et al.*, 1988) y *Pleurotus cornucopiae* (Kaneko *et al.*, 1993), indicando que la síntesis de lectina es regulada a lo largo de la diferenciación y morfogénesis del micelio, expresándose a partir de la transición del micelio vegetativo al agregado de los carpóforos.

El ensayo de hemoaglutinación positiva efectuado a lo largo de los diferentes pasos de purificación de la proteína nos proporcionó su caracterización funcional, corroborando al mismo tiempo su calidad de lectina. Tanto los requerimientos estructurales de los polisacáridos específicos para su unión con la lectina de *A. bisporus*, descritos inicialmente por Presant y Kornfeld (1972), como los inhibidores de dicha hemoaglutinación están de acuerdo con nuestros resultados e igualmente con los de Guillot y Kanska (1997), Wang *et al.* (1998) e Irazoqui *et al.* (1999) relativos a otras lectinas fúngicas. Estos últimos investigadores, a partir de estudios conformacionales, han podido concretar que el ligando específico de la lectina de *A. bisporus* es **β -galp1-** que enlazada tanto en **-C3** como con **-C4** con un monosacárido neutro o aminado, dado que en ambos casos la posición axial del hidroxilo es la misma. Pero el hallazgo más interesante, en nuestro caso, fue conseguir la inhibición de tal aglutinación con el polisacárido glucogalactomanano de *V. fungicola*, que presenta repetidamente el mismo terminal que acabamos de indicar, de ahí su unión específica con la lectina purificada de *A. bisporus* y, por tanto, ambas moléculas complementarias glucogalactomanano y lectina, son responsables del renocimiento y/o unión entre el micopatógeno y el hospedador.

La mayor inhibición de la hemoaglutinación producida por el glucogalactomanano pretratado con el fungicida se debe a la modificación estructural sufrida por dicho polisacárido que aumenta el número de terminales de galactosa a expensas de la disminución de los terminales de glucosa, y por tanto presenta mayor afinidad por la lectina.

La estructura de la unidad repetitiva del glucogalactomanano de *V. fungicola* (cepa CIES 161) ha sido recientemente desentrañada mediante la técnica de resonancia magnética nuclear por Domenech *et al.* (2002), y en ella (Fig. 31) se señala la zona de la molécula que corresponde al ligando específico de la lectina de *A. bisporus*, que es el mismo para las cepas CBS, CIES 210 y CIES 100.

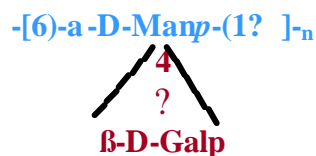


Fig. 31. Estructura de la unidad repetitiva del glucogalactomanano (n=10-15)

Esta unión específica debe ser, sin duda, la iniciadora de los mecanismos que darán lugar al desencadenamiento de la micosis verticiliosis o "mole seca" del champiñón. También, a partir de estos mismos experimentos, podemos explicar por qué no se produce el reconocimiento y/o unión entre el micopatógeno y el micelio vegetativo de *A. bisporus*, dado que este último micelio, como hemos descrito anteriormente, no presenta la lectina específica.

Los resultados relativos a la composición en aminoácidos de la lectina purificada, con un porcentaje significativo de aminoácidos ácidos, así como la secuencia N-terminal concuerdan bien con los descritos para alguna de las lectinas aisladas de otros basidiomicetos superiores, (Wang *et al.*, 1998; Kawagishi *et al.*, 2000), aunque se encuentran algunas diferencias entre ellas no solo en porcentaje de aminoácidos y secuencia N-terminal sino también en cuanto a la proporción de azúcares, peso molecular, número de subunidades y especificidad de los ligandos polisacarídicos.

De todos los estudios realizados en este segundo macro-objetivo de la presente tesis doctoral, podemos concluir la existencia de, al menos, dos posibles vías para tratar de erradicar, en un futuro próximo, la verticiliosis del champiñón, implicando ambas la transformación genética del organismo hospedador, con la construcción de cepas de *A. bisporus* "no adherentes" a *V. fungicola*, deficientes en sus dos proteínas implicadas, la hidrofobina y la lectina. La primera vía de transformación de *A. bisporus*, que implica a la hidrofobina, está siendo abordada en estos momentos por el grupo de investigación de Wessels (Lugones *et al.* 1996, 1998), mientras que la segunda, relativa a la lectina, esperamos poder iniciarla nosotros mismos en breve, confiando en que los resultados obtenidos nos lleven a la obtención de cepas suficientemente estables, extremo no totalmente conseguido con las transformaciones efectuadas hasta el presente.

CONCLUSIONES

1ª.- El fungicida procloraz-Mn produce sobre las paredes de *V. fungicola* una inhibición parcial de la síntesis de las proteínas junto con una redistribución del resto de los componentes y una reestructuración de los polisacáridos neutros.

2ª.- El efecto del fungicida sobre la estructura de los polisacáridos neutros de las tres cepas de *V. fungicola* es claramente diferente de una cepa a otra. En las cepas CBS y CIES 100 dicho tratamiento da lugar a una menor patogenicidad, lo que puede contribuir al control de la verticiliosis, mientras que la cepa CIES 210 se muestra más infectiva, lo que puede implicar diferentes niveles de resistencia debido a un grado de exposición al procloraz-Mn menos controlado.

3ª.- Las paredes celulares de *A. bisporus* sufren también, por efecto del fungicida, una reestructuración de sus carbohidratos junto con la inhibición parcial de la síntesis de sus proteínas, modificaciones que podrían contribuir al control de la micosis.

4ª.- Hemos podido comprobar que la utilización del procloraz-Mn, utilizado rutinariamente como preventivo de la verticiliosis en los cultivos industriales de champiñón, conlleva numerosos riesgos, por lo que el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares desencadenantes del micoparasitismo de *V. fungicola* constituye la vía más directa para conseguir el control de la infección.

5ª.- Mediante inmunofluorescencia indirecta hemos demostrado que el polisacárido glucogalactomanano de las paredes celulares de *V. fungicola*, aislado y purificado previamente, se une a la superficie de las hifas del micelio agregado de *A. bisporus*, pero no a la del correspondiente micelio vegetativo.

6ª.- Hemos podido aislar, purificar y caracterizar 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* anteriormente descritas, intervienen en el contacto inespecífico entre ambos organismos.

7^a.- Igualmente hemos aislado, purificado y caracterizado la lectina del micelio agregado de *A. bisporus* que constituye el ligando específico del glucogalactomanano de *V. fungicola*, con lo que se demuestra la existencia de la etapa de reconocimiento y/o unión, anteriormente supuesta.

8^a.- Hemos podido demostrar también que el micelio vegetativo de *A. bisporus* presenta únicamente la etapa de contacto inespecífico con *V. fungicola*, pues no es capaz del reconocimiento y/o unión posteriores al no poseer la lectina en esta fase de su ciclo biológico, y por ello no llega a contraer la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

Abercrombie, J. (1817).

Abercrombie's practical gardener, or improved system of modern horticulture .2nd ed.
Revised by G. Mean. Cadell and Davies, London.

Angyal, S. J., Bender, V. J. y Ralph, B. J. (1974).

Structure of polysaccharides from the *Polyporus tumulosus* cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **362**: 175-187.

Askolin, S. Nakari-Setälä, T. y Tenkanen, M. (2001).

Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl. Microbiol Biotechnol*, **57**:124-130

Banerjee, P. C., Ghosh, A. K. y Sengupta, S. (1982).

Hemagglutinating activity in extracts of mycelia from submerged mushroom cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1009-1011.

Barbera, C. (1994).

Principales grupos de fungicidas. Mecanismos de acción. *Phytoma España* **62**: 7-10.

Barker, S. A., Bourne, E. J. y Whiffen, D. H. (1956).

Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. *Methods in Biochemical Analysis*, **3**: 213-245.

Barnett, H. L. y Binder, F. L. (1973).

The fungal-host parasite relationship. *Ann. Rev. Phytopathol.* **11**: 273-292.

Bartnicki-García, S. (1968).

Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**: 87-108.

Bartnicki-García, S. y Lippman, E (1982).

Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. En: *CRC Handbook of Microbiology*, IV:229-252. A. I. Laskin y H. Lechevalier (Eds).

Beever, R. E., Redgewell, R. J. y Dempsey, G. (1979).

Purification and chemical characterization of the rodlet layer of *Neurospora crassa* conidia. *J. Bacteriol.* **140**: 1063-1070.

Benhamou, N. y Brodeur, J. (2001).

Pre-inoculation of Ri T-DNA transformed cucumber roots with the mycoparasite *Verticillium lecanii* induces host defense reaction against *Pythium ultimum* infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **58**: 133-146.

Benyagoub, M., Jabaji-Hare, S. H., Chamberland, H. y Charest, P. (1996).

Cytochemical and immunocytochemical investigation of the mycoparasitic interaction between *Stachybotrys elegans* and its host *Rhizoctonia solani*. *Mycol. Res.* **100**: 79-86.

Bernardo, D., Novaes-Ledieu, M., Pérez Cabo, A., Gea Alegría, F. J. y García Mendoza, C. (2002).

Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell wall structure of *Verticillium fungicola*. *Int. Microbiol.* **5**: 121-125.

Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., y Tarvin, T. L. (1984).

Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* **336**: 93-104.

Bottom, C. B. y Siehr, D. J. (1979).

Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the hyphal wall of the basidiomycete *Coprinus macrorhizus* var. *microsporus*. *Carbohydr. Res.* **77**: 169-181.

Bouveng, C. B., Fraser, R. N. y Lindberg, B. (1967).

Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholomataceae). Part II. Water soluble mycelium polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **4**: 20-31.

Bowden, C. G., Hintz, W. E., Jeng, R., Hubbes, M. y Horgen, P. A. (1994).

Isolation and characterization of the cerato-ulmin toxin gene of the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma ulmi*. *Curr. Genet.* **25**: 323-329.

Bradford, M. M. (1976).

A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.

Calonje, M., García Mendoza, C. y Novaes-Ledieu, M. (1996).

New contributions to the wall polysaccharide structure of vegetative mycelium and fruit body cell walls of *Agaricus bisporus*. *Microbiología SEM* **12**: 599-606.

Calonje, M., García Mendoza, C., Galán, B. y Novaes-Ledieu, M. (1997).

Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology* **143**: 2999-3006.

Calonje, M. (1998).

Mecanismo de acción del micoparásito Verticillium fungicola en la infección al basidiomiceto Agaricus bisporus. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, pp 72-73 y 137-139.

Calonje, M., Bernardo, D., Novaes-Ledieu, M. y García Mendoza, C. (2002).

Properties of a hydrophobin isolated from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can. J. Microbiol.* **48**: 1030-1034.

Calonje, M., García Mendoza, C., Pérez Cabo, A., Bernardo, D. y Novaes-Ledieu, M. (2000a).

Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* **104**: 988-992.

Calonje, M., Novaes-Ledieu, M., Bernardo, D., Ahrazem, O. y García Mendoza, C. (2000b).

Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* **46**: 101-109.

Carpenter, C. E., Mueller, R. J., Kazmierczak, P., Zang, L., Villalon, D. K. y Van Alfen, N. (1992).

Effect of a virus on accumulation of a tissue-specific cell-surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 55-61.

Claverie-Martin, F., Diaz Torres, M. R. y Geoghegan, M. G. (1986).

Chemical composition and electron microscopy of the rodlet layer of *Aspergillus nidulans* conidia. *Curr. Microbiol.* **14**: 221-225.

Ciucanu, I. y Kerek, F. (1984).

A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, **131**: 209-217.

Cole, G. T., Sekiya, M., Kasai, R. L., Yokoyama, T. y Nozawa, Y. (1979).

Surface ultrastructure and chemical composition of the cell walls of conidial fungi. *Exp. Mycol.* **3**: 132-156.

Constantin, J. y Dufour, L. (1892).

Recherches sur la môle, maladie du champignon de couche. *Revue Générale de Botanique* **4**: 401-406.

Coulet, M., Mustier, J. y Guillot, J. (1970).

Les hémagglutinines des Champignons. *Rev. Mycol.* **35**: 71-89.

Chang, S T. (1996).

Mushroom research and development- Equality and mutual benefit. En: *Mushroom Biology and Mushroom Products*, D. J. Royse (ed.), Penn State University, pp 1-10.

Chen, J. C. y Johnson, B. R. (1983).

Improved colorimetric determination of cell wall chitin in woodecay fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 13-16.

Chiu, S. C. y Tzean, S. S. (1995).

Glucanolytic enzyme production by *Schizophyllum commune* Fr. during mycoparasitism. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**: 83-94.

Chung, C. W. y Nickerson, W. J. (1954).

Polysaccharide synthesis in growing yeasts. *J. Biol. Chem.*, **208**: 395-407.

de Vries, O. M. H., Fekkes, M. P., Wösten, H. A. B. y Wessels, J. G. H. (1993).

Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* **159**: 330-335.

Davis, B. J. (1964).

Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404-427.

Dawson, R. M. C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. y Jones, K.M. (1986).

Methods of protein estimation. En: *Data for Biochemical Research*. Clarendon Press. Oxford. pp. 541-542

Domenech, J., Barasoain, I., Prieto, A., Gómez Miranda, B., Bernabé, M. y Leal, J. A. (1996).

An antigenic water-soluble glucogalactomannan extracted from cell walls of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces farinosus*. *Microbiology* **142**: 3497-3503.

Domenech, J., Prieto, A., Gómez Miranda, B., Leal, J. A., Ahrazem, O., Jiménez Barbero, J. y Bernabé, M. (2002).

Structure of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of three strains of *Verticillium fungicola*. *Carbohydr. Polymers* **50**: 209-212

Dragt, J. W., Gells, F. P., De Bruijn, C. y Van Griensven, L. J. L. D. (1996).

Intracellular infection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mycol. Res.* **100**: 1082-1086.

Dubois, M., Giller, K. A., Rebers, P. A. y Smith, F. A. (1956).

Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.

Duffus, J. H., Levi, C. y Manners, D. J. (1982).

Yeast cell-wall glucans. *Adv. Microb. Physiol.* **23**: 151-181.

Elad, Y., Barak, R. y Chet, I. (1983).

Possible role of lectins in mycoparasitism. *J. Bacteriol.* **154**: 1431-1435.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. y Henis, Y. (1983).

Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**: 85-88.

Elad, Y., Sadowsky, Z. y Chet, I. (1987).

Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **88**:259-263.

Englard, S y Seifter, S. (1990).

Precipitation Techniques. *Methods in Enzymology*, Vol. **182**. pp 285-306. M. P. Deutscher (ed). Academic Press. New York.

Fahima, T., Madi, L. y Henis, Y. (1992).

Ultrastructure and germinability of *Verticillium dahliae* microsclerotia parasitized by *Talaromyces flavus* on agar medium and in treated soil. *Biocontrol Sci. Technol.* **2**: 69-78.

Fekete, K. Y Kuhn, J. (1967).

Bekämpfung von *Verticillium* und *Mycogone* (vorläufige mitteilung). *Mushroom Sci.* **6**: 495-505.

Fletcher, J. T. (1981).

The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Mushroom Sci.* **11**: 597-604.

Fletcher, J. T. (1992).

Mushrooms-fungicides and disease control. *Mushroom J.* **506**: 19-21.

Fletcher, J. T., White, P. F. y Gaze, R. H. (1986).

Mushrooms: Pest and disease control. Intercept. Newcastle upon Tyne. pp 156.

Gandy, D. G. (1985).

Bacterial and fungal diseases. En: *The Biology and Technology of the Cultivated Mushrooms*, P. B. Flegg, D. M. Spencer y D. A. Wood (eds.) John Wiley & Sons Ltd. Chichester, pp 261-277.

Gandy, D. G. y Spencer, D. M. (1976).

The use of chlorothalonil for the control of benzimidazole tolerant strains of *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebr. on the cultivated mushroom. *Scientia Horticulturae* **8**: 307-313.

Gandy, D. G. y Spencer, D. M. (1981).

Fungicide evaluation for control of dry bubble, caused by *Verticillium fungicola*, on commercial mushroom strains. *Scientia Horticulturae* **14**: 107-115.

García Mendoza, C., Avellán, M. A., Sánchez, E. y Novaes-Ledieu, M. (1987a).

Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia. *Arch. Microbiol.* **148**: 68-71.

García Mendoza, C., Sánchez, E. y Novaes-Ledieu, M. (1987b).

Differences in microfibrils in the wall of *Agaricus bisporus* secondary mycelium. *FEMS Microbiol. Lett* **44**: 161-165.

García Mendoza, C., Pérez Cabo, A., Sánchez González, M. L. y Novaes-Ledieu, M. (1991).

Morphological and structural studies on protoplast production and reversion of the higher basidiomycete *Agaricus bisporus*. *Curr. Microbiol.* **22**: 191-194.

García Mendoza, C. (2000).

Algunos aspectos estructurales y funcionales de la pared celular de *Agaricus bisporus* y sus aplicaciones más inmediatas. *Anal. Real Acad. Farm.* **66**: 5-22.

Gea Alegría, F. J. (1995).

Micosis del cultivo del champiñón (Agaricus bisporus (Lange) Imbach) en Castilla-La Mancha. Estudio de la verticiliosis. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

Gea, F. J., Tello, J. C. y Honrubia, M. (1996).

In vitro sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia* **136**: 133-137.

Golam Mortuza, M. y Ilag, L. L. (1999).

Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. *Biol. Control* **15**: 235-240.

Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon, N. (1980).

What should be called a lectin?. *Nature (Lond.)* **285**: 66.

Gómez-Miranda, B., Rupérez, P. y Leal, J. A. (1981).

Changes in chemical composition during germination of *Botrytis cinerea* sclerotia. *Current Microbiol.*, **6**: 243-246.

Gorin, P. A. y Spencer, J. F. T. (1968).

Structural chemistry of fungal polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem.* **23**: 367-418.

Guillot, J. y Kanska, G. (1997).

Lectins in higher fungi. *Biochem. Systemat. Ecol.* **25**:203-230.

Hasimoto, T., Wu-Yuan, C. D. y Blumenthal, H. J. (1976).

Isolation and characterization of the rodlet layer of *Trichophyton mentagrophytes* microconidial wall. *J. Bacteriol.* **127**: 1543-1549.

Hassall, K. A. (1990).

The biochemistry and uses of pesticides. 2ª ed. VCH Weinheim: New York, Basle, Cambridge.

Hayes, W. A. (1977).

Mushroom nutrition and the role of micro-organisms in composting. En: *Composting*, W. A. Hayes (ed.), The Mushroom Growers' Association. Leeds, pp 1-20.

Heukeshoven, J. y Dernick, R. (1988).

Improved silver staining procedure for fast staining in Phast System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28:32

Hobot, J. A. y Gull, K. (1981).

Structure and biochemistry of the spore surface of *Syncephalastrum racemosum*. *Curr. Microbiol.* **5**: 183-185.

Horikoshi, K. y Hda, S. (1964).

Studies of the spore coats of fungi. Isolation and composition of the spore coats of *Aspergillus oryzae*. *Biochim Biophys. Acta* **83**: 197-203.

Huang, H. C., Bremer, E., Hynes, R. K. y Erickson, R. S. (2000).

Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold bean caused by *Sclerotinia sclerotium*. *Biol. Control* **18**: 270-276.

Irazoqui, F. J., Vides, M. A. y Nores, G. A. (1999).

Structural requirements of carbohydrates to bind *Agaricus bisporus* lectins. *Glycobiology* **9**: 59-64.

Jansson, P. E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B. y Lönngrén, J. (1976).

A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chemical Communications of the University of Stockholm*, **8**: 1-74a.

Jeune, K. H., Moon, I. J., Kim, M. K. y Chung, S. R. (1990).

Studies on lectins from Korean higher fungi: IV. A mitogenic lectin from the mushroom *Lentinus edodes*. *Planta Med.* **56**: 592.

Jones, E. B. G. (1994).

Fungal adhesion. *Mycol. Res.* **98**: 961-981.

Kalberer, P. (1984).

Some properties of extracellular proteolytic enzyme of *Verticillium fungicola*, a pathogen of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Phytopathol. Z.* **110**: 213-220.

Kaneko, T., Oguri, S., Kato, S. y Nagata, Y. (1993).

Developmental appearance of lectin during fruit body formation in *Pleurotus cornucopiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **39**: 83-90.

Karas, M. y Hillenkamp, F. (1988).

Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 kDa. *Anal. Chem.*, **60**: 2299-2301.

Kawagishi, H., Suzuki, H., Watanabe, H., Nakamura, H., Sekiguchi, T., Murata, T., Usui, T., Sugiyama, K., Suganuma, H., Inakuma, T., Ito, K., Hashimoto, Y., Ohnishi-Kameyama, M. y Nagata, T. (2000).

A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Biochim. Biophys. Acta* **1474**: 299-308.

Kocourek, J. y Horejsi, V. (1983)

A note on the recent discussion on definition of the term "lectin". En: *Lectins- biology, biochemistry, clinical biochemistry*. T. C. Bog-Hansen y G. A. Spengle (eds.), de Gruiter, Berlin, vol. **3**, pp3-6.

Labarère, J. (1994).

Métodos de la genética aplicados a la obtención y mejora de variedades comerciales de los hongos comestibles cultivados. En: *I Jornadas Técnicas del Champiñón y Otros*

Hongos Comestibles en Castilla-La Mancha, Patronato de Promoción Económica, Diputación Provincial de Cuenca, pp 9-36.

Laemmli, U.K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Laine, R. A., Esselman, W. J. Y Sweeley, C. C. (1972).

Gas-liquid chromatography of carbohydrates. *Methods in Enzymology* **28**: 159-167

Latgé, J. P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Sarfati, J., Wieruszeski, J. M., Parra, E., Bouchara, J. P. y Fournet, B. (1994).

Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus*. *Infection and Immunity*, **62**: 5424-5433.

Leal, J. A., Gómez Miranda, B., Bernabé, M., Cano, J. y Guarro, J. (1992).

The chemical composition of the wall of six species of *Aphanoascus*: the taxonomic significance of the presence of α -(1-4)-glucan. *Mycol. Res.* **96**:363-368.

Leal, J. A. (1994).

Water-soluble polysaccharides of fungal cell walls. En: *Microorganisms in ruminant nutrition*. R. A. Prins y C. S. Stewart (eds.), Nottingham University Press, pp153-165.

Leroux, P. (1991).

Résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides. *Phytoma* **434**: 20-26.

Lis, H. y Sharon, N. (1986).

Biological properties of lectins. En: *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. I. E. Liener, N. Sharon y I. J. Goldstein (eds.), Academic Press, Orlando, pp266-269.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951).

Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **106**: 195-199.

Lugones, L. G., Bosscher, J. S., Scholtmeyer, K., de Vries, O. M. y Wessels, J. G. H. (1996).

An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* **142**: 1321-1329.

Lugones, L. G., Wösten, H. A. B. and Wessels, J. G. H. (1998).

A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetative growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* **144**: 2345-2353.

Mamoun, M., Olivier, J. M. y Védie, R. (1995).

Discussions on assessment of artificial infections with *Verticillium fungicola* for breeding programmes. *Mushroom Sci.* **14**: 669-677.

Manocha, M. S. y Chen, Y. (1990).

Specificity of attachment of fungal parasites to their hosts. *Can. J. Microbiol.* **36**: 69-76.

Manocha, M. S. y Chen, Y. (1991).

Isolation and partial characterization of host cell surface agglutinin and its role in attachment of biotrophic mycoparasite. *Can. J. Microbiol.* **37**: 377-383.

Manocha, M. S. y Sahai, A. (1993).

Mechanisms of recognition in necrotrophic and biotrophic mycoparasites. *Can. J. Microbiol.* **39**: 269-275.

Mathews, C. T. (1983).

The pathology and ecology of Verticillium fungicola (Preuss) Hassebrauk, Ph. D. Thesis, University of Bath, pp 39-71 y 165-170.

Michaels, T. J. (1973).

Studies on the Verticillium disease of mushroom: extracellular hydrolases of Verticillium malthousei Ware and in vitro host-pathogen relationships. M. S Thesis, University Nevada, pp 52.

Michalenko, G. O., Hohl, H. R. y Rast, D. (1976).

Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 251-262.

Mischnick, P. y De Ruiter, G. A. (1994).

Application of reductive cleavage in the structural investigation of the antigenic polysaccharides of *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium digitatum* with respect to the determination of the ring size of the galactose moieties. *Carbohydr. Polymers*, **23**: 5-12.

Mol, P. C. y Wessels, J. G. H. (1990).

Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipe in *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* **94**: 472-479.

Musilek, M., Ticha, M., Volc, J. y Kokourek, J. (1990).

Studies on lectins. LXXI. Lectins in mycelial cultures of *Kuehneromyces mutabilis*, *Pholiota squarrosa*, and *Flammulina velutipes*. En: *Lectins- biology, biochemistry, clinical biochemistry*. J. Kokourek, D. L. J. Freed (eds.), Sigma, St. Louis, vol. **7**, pp53-56.

Nakari-Setälä, T., Aro, N., Kalkkinen, N., Alatalo, E. y Penttilä, M. (1996).

Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Eur. J. Biochem.* **235**:248-255.

Needs, P. W. y Selvendran, R. R. (1993).

Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodine-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydr. Res.*, **245**: 1-10.

Nicholson, R. L. y Epstein, L. (1991).

Adhesion of fungi to the plant surface. En: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. G. T. Cole y H. C. Hoch (eds.), Plenum Publishing Corporation, London, pp 3-23.

Nordbring-Hertz, B. N. y Chet, I. (1986).

Fungal lectins and agglutinins. En: *Microbial lectins and Agglutinins: Properties and Biological Activities*. D. Mirelman (ed.), John Wiley and Sons Inc.: New York, pp 393-408.

North, L. H. y Wuest, P. (1993).

The infection process and symptom expression of verticillium disease of *Agaricus bisporus*. *Can. J. Plant Pathol.* **15**: 74-80.

Pardo, J. (1994).

Productividad de un compost y economía de su elaboración: criterios de evaluación basados en una analítica sistemática. En: *I Jornadas Técnicas del Champiñón y Otros Hongos comestibles en Castilla-La Mancha*, Patronato de Promoción Económica, Diputación Provincial de Cuenca, pp 37-58.

Pastor, F. I.J., Valentí, E., Herrero, E., y Sentandreu, R. (1984).

Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Mannoproteins released by zymolyase and their contribution to wall architecture. *Biochim. Biophys. Acta* **802**:292-300

Peberdy, J. F. (1990).

Fungal Cell Wall. En: *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*, P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. W. Goosey y L. G. Copping (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp 5-24.

Presant, C. A. y Kornfeld, S. (1972).

Characterization of the cell surface receptor for the *Agaricus bisporus* hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **247**: 6937-6945.

Prieto, A. Bernabé, M. y Leal, J. A. (1995).

Isolation, purification and chemical characterization of alkali-extractable polysaccharides from the cell walls of *Talaromyces* species. *Mycol. Res.* **99**: 69-75.

Raper, C. A., Raper, J. R. y Miller, R. E. (1972).

Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **64**: 1088-1117.

Reynolds, E. S. (1963).

The use of lead at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. En: *Advances in Microbial Physiology*, **5**: 45-134. A. H. Rose y J. K. Wilkinson (Eds). New York, Academic Press.

Rosemberger, R. F. (1976).

The cell wall. En: *The filamentous fungi*, Vol. **II**, J. E. Smith y D. R. Berry (eds.), Edward Arnold Publishers, Londres, pp 328-344.

Rupérez, P. y Leal, J. A. (1987).

Mannoglucogalactans from the cell walls of *Penicillium erythromellis*: isolation and partial characterization. *Carbohydr. Res.* **167**: 269-278.

Segrest, J.P., Jackson, R.L, Andrews, E.P, y Marchesi, V.T. (1971).

Human erythrocyte membrane glycoprotein: a re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res. Commun.* **44** (2): 390-395

Siegel, M. R. (1981).

Sterol-inhibiting fungicides: Effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Dis.* **65**: 986-989.

Sinden, J. W. (1932).

Mushroom spawn and method of making same. U. S. Patent N° 2, 044, 861.

Sinden, J. W. (1971).

Ecological control of pathogens and weed moulds in mushroom culture. *Ann. Rev. Phytopathology* **9**: 411-432.

Sonnemberg, A. S. M., Wessels, J. G. H. y Van Griensven, L. J. L. D. (1988).

An efficient protoplasting/regeneration system for *Agaricus bisporus* and *A. bitorquis*. *Curr. Microbiol.* **17**: 285-291.

Stagg, C. M. y Feather, M. S. (1973).

The characterization of a chitin associated D-glucan from the cell walls of *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* **320**: 64-72.

Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971).

Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **39**: 462-477.

Takai, S. y Richards W. C. (1978).

Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi* isolation and some properties of cerato-ulmin from the culture of *C. ulmi*. *Phytopathol. Z.* **91**: 129-146.

Templeton, M. D., Greenwood, D. R. y Beaver, R. E. (1995).

Solubilization of *Neurospora crassa* rodlet proteins and identification of the predominant protein as the proteolytically processed *eas* (*ccg-2*) gene product. *Exp. Mycol.* **19**: 166-169.

Trigiano, R. N. y Fergus, C. L. (1979).

Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. *Mycologia* **71**: 908-917.

Umar, M. H., Geels, F. P. y Van Griensven, L. J. L. D. (2000).

Pathology and pathogenesis of *Mycogone pernicioso* infection of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.* **15**: 561-567.

Van Den Boogert, P. H. J. F., Reinartz, H., Sjollem, K. A. y Veenhuis, M. (1989).

Microscopic observations on the interaction of the mycoparasite *Verticillium viguttatum* with *Rhizoctonia solani* and other soil-borne fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **56**: 161-174.

Van Griensven, L. J. L. D. (1988).

History and development. En: *The cultivation of mushrooms*. L. J. L. D. Van Griensven (ed.), Interlingua, Sussex, pp 11-28.

Verhaar, M. A., Hijwegen, T. y Zadocks, J. C. (1996).

Glasshouse experiments on biocontrol of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by the mycoparasites *Verticillium lecanii* and *Sporothrix rugulosa*. *Biol. Control* **6**: 353-360.

Wang, H., Ng, T. B. y Ooi, V. E. (1998).

Lectins from mushrooms. *Mycol Res.* **102**: 897-906.

Wang, H., Ng, TB. y Liu, Q (2002).

Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Life Sciences* **70**: 877-885

Wang, M. C. y Bartnicki-García, S. (1970).

Structure and composition of walls of the yeast form of *Verticillium albo-atrum*. *J. Gen. Microbiol.* **64**: 41-54.

Ware, W. M. (1933).

A disease of cultivated mushrooms caused by *Verticillium malthousei* sp. nov. *Ann. Bot.* **47**: 763-784.

Wessels, J. G. H., Kreger, D. R., Marchant, R., Regensburg, B. A. y de Vries, O. H. M. (1972).

Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta* **273**: 346-358.

Wessels, J. G. H. (1994).

Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 413-437.

Wessels, J. G. H. (1996).

Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends Plant. Sci.* **1**: 9-15.

Wessels, J. G. H. (1997).

Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microb. Physiol.* **38**: 1-45.

Wösten, H. A. B., Schuren, F. H. J. and Wessels, J. G. H. (1994a).

Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipatic membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* **13**: 5848-5854.

Wösten, H. A. B., de Vries, O. M., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. y Wessels, J. G. H. (1994b).

Atomic composition of the hydrophobic and hydrophilic membrane sides of self-assembled SC3p hydrophobin. *J. Bacteriol.* **176**: 7085-7086.

Wuest, P. J., Cole, H. Jr. Y sanders, P. L. (1974).

Tolerance of *Verticillium malthousei* to benomyl. *Phytopathology* **64**: 331-334.

Yatohgo, T., Nakata, M., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y. y Yamamoto, S. (1988).

Purification and properties of a lectin from the fruitbodies of *Flammulina velutipes*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1485-1493.

Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M. y Kubicek, C. P. (1998).

Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol.* **26**: 131-140.