

————— *Artículo original* —————

Influencia de la temperatura sobre las curvas de calibración en IRMA de IGF I. Interpretación mediante dos modelos no excluyentes

Recibido el 22 de marzo de 2008

PERIS CONEJERO, T.¹; OLIVARES PALLEROLS, R.¹ y MORENO FRIGOLS, J. L.^{1, 2*}

¹*Servicio de Radioisótopos.*

Hospital Clínico Universitario de Valencia.

²*Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.*

RESUMEN

Se estudia la influencia de la temperatura sobre las gráficas de calibración utilizadas en la determinación analítica de IGF I mediante IRMA. Los resultados se analizan mediante la ecuación de los cuatro parámetros y una modificación de la isoterma B.E.T. Tales ecuaciones corresponden, respectivamente, a los modelos de interacción ligando (antígeno)-receptor (anticuerpo) y adsorción del antígeno sobre la pared del tubo recubierta de anticuerpo. Los ajustes a ambas ecuaciones son satisfactorios con algunas ventajas para el modelo de absorción que lo hacen preferible en cuanto a la interpretación de los resultados. Se determinan también los parámetros termodinámicos para la disociación del inmunocomplejo.

Palabras clave: Ecuación cuatro parámetros.—Isoterma B.E.T.—Reacción antígeno-anticuerpo.

*** Correspondencia:**

Doctor José Luis Moreno Frigols.
Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.
Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot (Valencia).
email: Jose.L.Moreno@uv.es

ABSTRACT**Influence of the temperature on calibration curves of IGF I in IRMA.
Interpretation by two models non excluding**

The influence of temperature on the calibration graphs used in the analytical determination of IGF I by IRMA has been studied. The results were analyzed using the equation of the four parameters and a modification of the isotherm BET. Such equations correspond, respectively, to the models of interaction ligand (antigen)-receiver (antibody) and adsorption antigen on the wall of the tube coated antibody. The adjustments to both equations are satisfactory with some advantages for the adsorption model that make it preferable in the interpretation of results. It also determine thermodynamic parameters for the immunocomplex dissociation.

Keywords: Four parameters equation.—B.E.T. isotherm.—Antigen-antibody reaction.

INTRODUCCIÓN

El Radioinmunoanálisis (RIA) fue diseñado por Yallow y Berson (1) como consecuencia de la necesidad de desarrollar métodos capaces de combinar la sensibilidad de las técnicas radioquímicas con la selectividad de las inmunológicas. Esta técnica mide la concentración de diversas sustancias en fluidos biológicos, basándose en la competición de un antígeno presente en la muestra (analito) con otro antígeno marcado radiactivamente (trazador) por unirse a un anticuerpo. La determinación se realiza a través de gráficas de calibración que representan la radiactividad unida al anticuerpo frente a concentraciones conocidas del analito. Tales gráficas son siempre decrecientes (una radiactividad alta indica una concentración baja, y viceversa), lo cual es una característica de la técnica que en principio puede chocar con la mentalidad de los analistas acostumbrados a trabajar sobre gráficas crecientes (Ley de Lambert-Beer y similares). Con este motivo, Miles y Hales (2) presentaron algunas consideraciones críticas que constituyen el punto de arranque de la modificación conocida como Análisis Inmuno Radiométrico (IRMA). En ella se hace reaccionar el antígeno presente en la muestra (analito) con un anticuerpo generalmente inmovilizado, y con un segundo anticuerpo marcado radiactivamente (trazador). A continuación se mide la radiactividad del complejo anticuerpo inmovilizado-antí-

geno-anticuerpo marcado («sandwich»), que, lógicamente, aumenta con la concentración de antígeno. Como puede verse, la diferencia fundamental entre RIA e IRMA consiste en que el trazador radiactivo es el antígeno en el primero y el anticuerpo en el segundo, con el resultado ya señalado de que las gráficas de calibración son decrecientes en el primer caso y crecientes en el segundo. Dichas gráficas necesitan un método de ajuste de cuya bondad depende la exactitud del valor de la concentración problema.

La **Ec. 1** puede justificarse a partir del modelo teórico de interacción ligando-receptor y se llama Ecuación de los Cuatro Parámetros (3):

$$y = (A-D)/(1+(x/C)^B) + D \quad \text{Ec. 1}$$

Los términos de esta ecuación representan:

x: Concentración de una muestra.

y: Radiactividad correspondiente a dicha muestra.

A: Valor de y para $x = 0$ (Blanco).

D: Valor de y para x muy grande.

C: Valor de x para el que $y = (A+D)/2$.

La **Ec. 2** se dedujo en principio para describir los procesos de quimisorción y fisisorción de gases sobre sólidos (4), y es conocida como isoterma B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller):

$$(P)/(V \cdot (P^0 - P)) = 1/V_m \cdot C + ((C-1)/V_m \cdot C) \cdot (P/P^0) \quad \text{Ec. 2}$$

Los términos de esta ecuación representan:

P: Presión del gas.

P^0 : Presión de saturación del gas.

V: Cantidad gas adsorbido expresada como volumen.

V_m : Máximo volumen de gas que satura la capa quimisorbida directamente sobre la superficie del sólido.

C: Constante de equilibrio para la quimisorción de la capa adsorbida directamente sobre la superficie del sólido.

OBJETIVO

En trabajos anteriores (5-10) hemos estudiado la influencia de algunos factores fisicoquímicos sobre la cinética de las reacciones implicadas en las técnicas inmunoanalíticas, así como una justificación teórica de la ecuación de cuatro parámetros (11). En este caso pretendemos analizar la influencia de la temperatura sobre las gráficas de calibración obtenidas en el caso concreto de la IGF I, tratando de utilizar **Ec. 1** y **Ec. 2** para justificar y asignar un sentido fisicoquímico a las variaciones encontradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

1. Tubos recubiertos de anticuerpos frente a IGF-I.
2. Disoluciones patrones de IGF-I.
3. Disolución de anticuerpos frente a IGF-I marcados con ^{125}I .

Todos los reactivos usados estaban incluidos en el kit IGF-I IRMA DSL 2800 suministrado por DSL.

Instrumentos

LKB Gammamaster Automatic Gamma Counter.

Procedimiento Experimental

A cada tubo recubierto se añadieron 50 μL de disolución patrón y 200 μL de anticuerpo marcado, y se dejaron en reposo durante dos horas en baño termostático a distintas temperaturas. Transcurrido este tiempo, los tubos se lavaron y se midió su actividad en el contador.

Análisis de los resultados

Se usó el programa Statistica (Copyright © StatSoft, Inc., 1993) con ecuaciones específicas para regresión no lineal. Para la elección entre diferentes ecuaciones se usa el GraphPad Software Quick Calcs (12), que utiliza el Corrected Akaike’s Information Criterion (AIC_c), expresado como $AIC_c = N \cdot \ln(SS/N) + 2 \cdot P + 2 \cdot P \cdot (P+1) / (N-P-1)$ donde N es el número de puntos, SS la suma de cuadrados de residuales, y P el número de parámetros en la ecuación, debiendo elegirse el modelo que dé un AICc más bajo. También se utiliza el ANOVA (F test).

RESULTADOS

Los resultados se muestran en la Figura 1.

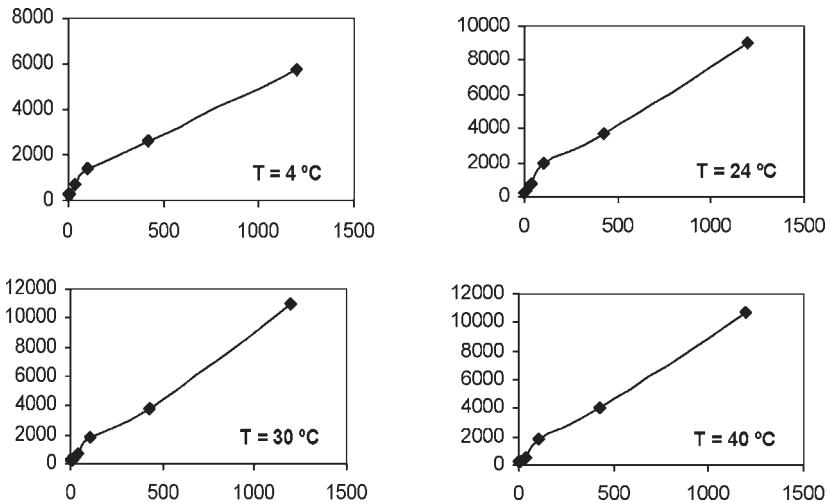


FIGURA 1. *Gráficas de calibración para el IRMA de IGF I a las cuatro temperaturas estudiadas.*

DISCUSIÓN

La forma de las gráficas recuerda la de las isothermas tipo II de la clasificación de Brunauer, que se ajustan a la ecuación conocida como isoterma B.E.T. (**Ec. 2**). La unión del antígeno libre en disolución sobre el anticuerpo inmovilizado en la pared del tubo es un proceso comparable a la adsorción, por lo que puede establecerse un paralelismo entre ambos fenómenos. Sustituyendo en **Ec. 2** los términos expuestos en la columna izquierda de la Tabla 1 por los de la columna derecha y reordenando, se obtiene:

$$y = y_m \cdot S \cdot x / ((S-x) \cdot (K \cdot S + (1-K) \cdot x)) \quad (\text{Ecuación B.E.T. modificada}) \quad \mathbf{Ec. 3}$$

TABLA 1. *Paralelismo entre los términos de Ec. 2. y Ec. 3*

$(P)/(V(P^0-P)) = 1/V_m C + ((C-1)/V_m C)(P/P^0)$ (Ec. 2)	$y = y_m \cdot S \cdot x / ((S-x) \cdot (K \cdot S + (1-K) \cdot x))$ (Ec. 3)
P = Presión del gas.	x = Concentración del antígeno.
P ⁰ = Presión de saturación del gas.	S = Concentración de saturación (solubilidad) del antígeno.
V = Cantidad gas adsorbido expresada como volumen.	y = Cantidad de antígeno unido al tubo expresada como actividad (cpm).
V = Máxima cantidad de gas que satura la capa quimisorbida directamente sobre la superficie del sólido.	y _m = Máxima cantidad de antígeno que satura los sitios de unión de mayor afinidad en el anticuerpo (cpm).
C = Constante de equilibrio para la quimisorción de la capa adsorbida directamente sobre la superficie del sólido.	K' = Constante de equilibrio para la formación del inmunocomplejo radiactivo.
	K = 1/K' = Constante de equilibrio para la disociación del inmunocomplejo radiactivo.

Según puede verse en la Tabla 2, los resultados se ajustan razonablemente bien a la ecuación de cuatro parámetros (**Ec. 1**).

TABLA 2. Ajustes de los resultados para Ec. 1. y Ec. 3.

T(K)	$y = D+(A-D)/(1+(x/C)^B)$ (Ec. 1)					$y = y_m \cdot S \cdot x / ((S-x) \cdot (K \cdot S + (1-K) \cdot x))$ (Ec. 3)			
	A	B	C	D	r	y_m	S	K	r
277	246	0,732	640643	546563	0,997	2384	2014	0,042	0,999
297	333	0,820	442856	1111632	0,997	3417	1895	0,051	0,999
303	454	1,062	300024	3700846	0,997	3528	1744	0,070	1,000
313	280	0,930	355630	2064825	0,997	3997	1868	0,085	0,999

El parámetro A (**Ec. 1**) es aparentemente independiente de la temperatura, lo cual era de esperar, ya que dicho parámetro representa la actividad unida inespecíficamente al tubo. B se relaciona con el exponente de la ecuación de Hill (13), y se mantiene en todos los casos en valores próximos a uno, lo cual indica que la unión del antígeno al anticuerpo presenta un bajo grado de cooperatividad con una cierta tendencia a aumentar con la temperatura. Se observa también una disminución de C con la temperatura, que puede explicarse porque dicho parámetro contiene el valor de la constante de equilibrio para la formación del inmunocomplejo. Ello indica que tal formación es un proceso exotérmico. D representa la máxima cantidad unida, y también aumenta con la temperatura, lo cual puede explicarse admitiendo que la reacción no había llegado al equilibrio a temperaturas bajas a causa de su mayor lentitud.

De los ajustes para la **Ec. 3** se observa un aumento de y_m que se explica admitiendo que tal parámetro representa aquí la máxima cantidad adsorbida sobre los sitios de mayor afinidad. Ello es concordante con el aumento de la cooperatividad señalado anteriormente. La solubilidad permanece razonablemente constante con un valor promedio de $S = 1880$ ng/mL, $SD = 111$ ng/mL (5,9%). K representa, en este caso, la constante de equilibrio para la disociación del inmunocomplejo, y se observa que aumenta con la temperatura, lo cual nos indica que dicho proceso es endotérmico, hecho concordante con el carácter exotérmico señalado anteriormente para su

formación. Ello es lógico, pues la ruptura de los enlaces necesita, por lo general, un aporte energético. Los valores de K se ajustan a: $K = 35,8 \cdot \exp(-1899/T)$ con una desviación cuadrática media de

TABLA 3. *Parámetros termodinámicos para la disociación del inmunocomplejo formado por la IGF-I sobre la pared de un tubo recubierto de anticuerpo*

T (K)	ΔG^0 (J/mol)	ΔH^0 (J/mol)	ΔS^0 (J/K·mol)
277	7275	15781	21,7
297	7345	15781	20,0
303	6689	15781	21,8
313	6406	15781	22,0

$5 \cdot 10^{-3}$ ($\approx 10\%$). Los valores de ΔG^0 , ΔH^0 y ΔS^0 para la disociación del inmunocomplejo radiactivo se expresan en la Tabla 3.

El valor relativamente alto de ΔG^0 , que corresponde a los valores bajos de K mostrados en la Tabla 3, indica que el inmunocomplejo es apreciablemente estable. La variación de entropía es positiva, como corresponde a un proceso en el que aumenta el desorden del sistema y aparentemente independiente de la temperatura, con un valor medio de $\Delta S^0 = 21,4$ J/K·mol, $SD = 0,9$ J/K·mol (4,2%).

CONCLUSIÓN GENERAL

Los modelos teóricos de interacción ligando-receptor, que se plasma en la ecuación de los cuatro parámetros (**Ec. 1**) y quimisorción-fisorción, que da lugar a la isoterma B.E.T. modificada (**Ec. 3**), son dos aproximaciones alternativas y compatibles para explicar la influencia de la temperatura sobre las gráficas de calibración obtenidas en el IRMA de IGF-I. A nuestro juicio, en este caso el modelo de adsorción presenta tres ventajas significativas:

- Es más simple, pues la **Ec. 3** contiene solamente tres parámetros frente a los cuatro de la **Ec. 1**.

- No obstante su mayor simplicidad, los ajustes a **Ec. 3** son mejores (coeficientes de correlación más altos) que los correspondientes a **Ec. 1**.
- El significado físico de la **Ec. 3** es más claro que el de la **Ec. 1**.

Desde el punto de vista práctico, puede decirse que la temperatura más ventajosa para la realización de la técnica es la de 30° C, por ser la que proporciona una mayor rapidez en la obtención de resultados. No es recomendable operar a 40° C, pues los resultados parecen indicar alguna degradación de los reactivos a esta temperatura.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) YALOW, R. S. and BERSON, S. A. (1970): General aspects of radioimmunoassay procedures. En: *In vitro procedures with radioisotopes in medicine*. 455-482. Viena.
- (2) MILES, L. E. M. and HALES, C. N. (1970): Immunoradiometric assay procedures: New developments. En: *In vitro procedures with radioisotopes in medicine*. 483-490. Viena.
- (3) CHAN, D. W. (1987): *Immunoassay: A Practical Guide*. Academic Press, Inc., 129-147.
- (4) WALLBORK, S. C. and GRANT, D. J. W. (1987): Interfase gas-líquido, en *Química Física para estudiantes de Farmacia y Biología*. Edición española 1987 (Editorial Alhambra, Madrid), pp. 412-415.
- (5) OLIVAS ARROYO, C. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2001): Influence of viscosity and ionic strength on the reaction kinetics of aldosterone and androstendione and their specific antibodies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26: 547-562.
- (6) GARCÍA GÓMEZ, J.; PORCAR PONS, M. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Some kinetic aspects in the immunoradiometric assay of insulin-like growth factor binding protein-3. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 307-315.
- (7) GARCÍA GÓMEZ, J. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Kinetics and equilibrium in the immunoradiometric assay (IRMA) of Thyroglobuline. *J. Immunoassay & Immunochemistry*. 23(3): 347-367.
- (8) OLIVAS ARROYO, C.; DUART DUART, M. J. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Kinetics and equilibrium in insulin radioimmunoassay. *J. Immunoassay & Immunochemistry*. 23(4): 407-428.
- (9) GARCÍA GÓMEZ, J.; PORCAR PONS, M. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2004): Kinetics aspects in the immunoradiometric assay (IRMA) of human Interleukin-1b (Il-1b). *Chemistry: An Indian Journal*. 1(6): 451-457.

- (10) DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2007): The influence of reactant concentration and reaction medium ionic strength, viscosity, and temperature in the immunocomplex substitution reaction in the radioimmunoassay of aldosterone. *Labmedicine*. 38(1) 29-34 y 61-63.
- (11) DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T. y MORENO FRIGOLS, J. L. (2007): Modelo general y cuatro ecuaciones para el ajuste de curvas de calibración en RIA. Comparación de resultados. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73: 65-86.
- (12) MOTULSKY, H. J. and CRISTOPOULOS, A. (2003): Fitting models to biological data using lineal and nonlinear regression. In *A practical guide to curve fitting*. GraphPad Software Inc: San Diego CA, www.graphpad.com
- (13) VAN HOLDE, K. (1979): Unión altamente cooperativa. En: *Bioquímica Física*, edición española (Ed. Alambra, Madrid), pp. 78-80.

————— *Artículo original* —————

**Common mechanism of recognition
and binding of the complementary molecules,
carbohydrate-lectin, in the verticillium disease
of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*
cultivated mushrooms**

Recibido el 15 de abril de 2008

AMELIA PÉREZ CABO and CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA *
Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid

ABSTRACT

The carbohydrate-lectin interaction between the isolated glucogalactomannan of *Verticillium fungicola* cell walls, and lectins, either from *Agaricus bisporus* or *Pleurotus ostreatus* fruit bodies, was compared in order to establish the molecular mechanism of the «dry bubble» or verticillium disease exhibited in the commercial cultures of both edible mushrooms. This interaction between complementary molecules, «target molecules», appears to be due to the terminal galactose linked at (1-4) to the (1-6) mannose bone of the *V. fungicola* glucogalactomannan molecule.

Key words: «Dry bubble».—Verticillium disease.—*Verticillium fungicola* glucogalactomannan.—*Agaricus bisporus* lectin.—*Pleurotus ostreatus* lectin.

* Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC.
Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid (Spain).
Telf.: +34918373112. Fax: +34-915360432
E-mail: cgm@cib.csic.es

RESUMEN

Mecanismo común de reconocimiento y unión de las moléculas complementarias, carbohidrato-lectina, en la verticiliosis de las setas cultivadas *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*

Se compara la interacción carbohidrato-lectina entre el glucogalactomanano aislado de las paredes celulares de *Verticillium fungicola* y las lectinas de los carpóforos de *Agaricus bisporus* o de *Pleurotus ostreatus*, para establecer el mecanismo molecular de la «mole seca» o verticiliosis de los cultivos comerciales de ambas setas comestibles. La interacción entre las moléculas complementarias, «moléculas diana», parece ser debida a la galactosa terminal unida en (1-4) al esqueleto de manosa unido en (1-6) de la molécula del glucogalactomanano de *V. fungicola*.

Palabras clave: «Mole seca».—Verticiliosis.—Glucogalactomanano de *Verticillium fungicola*.—Lectina de *Agaricus bisporus*.—Lectina de *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUCTION

Verticillium fungicola (Preuss) Hassebrauk var. *fungicola* is a mycoparasite that causes dry bubbles, stipe blow-out and necrotic lesions («dry bubble» or verticillium disease) in the commercial cultures of white button mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (1, 2), the losses in the yield having been estimated at several hundred million dollars. Control of the disease has been partially achieved by the use of fungicides as well as cultural and sanitary practices, but resistance to the most effective chemical (prochloraz) is increasing (3). Therefore, to develop alternative strategies for its control, it has been necessary to elucidate the nature of the interaction between the mycoparasite and its host. Recently studies carried out in this laboratory have demonstrated by different approaches: i) agglutination of *V. fungicola* germinated spores by an *A. bisporus* extract from fruit body cell walls; ii) immunofluorescence microscopy of *A. bisporus* hyphae from fruit bodies and vegetative mycelia pretreated with purified *V. fungicola* cell wall glucogalactomannan (4), and iii) by hemagglutination experiments carried out with an *A. bisporus* fruit body glycoprotein lectin in the presence and absence of the same *V. fungicola* glucogalactomannan, that a specific recognition step is involved in this mycosis (5) before the development of the external symptoms of the disease. This mechanism of specific

recognition between complementary molecules, lectin-carbohydrate, which are present on both the host and the mycoparasite, is similar to those described in many other parasitic and symbiotic fungi (6-9).

On the other hand, *P. ostreatus* (Jacq.: Fries) Kumm fruit bodies (oyster mushrooms) have also been described presenting the «dry bubble» disease in their commercial cultures (10). For this reason, parallel studies were carried out in order to purify and characterize another similar lectin in this fungus (11, 12). So the aim of the present work is to confirm that the same mechanism of recognition and binding of carbohydrate-lectin is the previous step to the mycosis symptoms development in both mushrooms, and to establish a common molecular basis between the complementary molecules, glucogalactomannan-lectin, in this verticillium disease.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and culture conditions

Fruit bodies of *Agaricus bisporus* (commercial strain Fungisem H 25) and *Pleurotus ostreatus* (commercial strain Amycel 3000) were grown in the CIES (Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, Quintanar del Rey, Cuenca, Spain). *Verticillium fungicola* var. *fungicola* (CBS 992.69) was grown on Raper medium (13).

Preparation of *V. fungicola* cell wall glucogalactomannan

The preparation of *V. fungicola* cell walls and the fractionation and purification procedure for obtaining the glucogalactomannan were performed as reported in earlier studies (14).

Purification, characterization and carbohydrate specificity of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins

The purification of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins from their corresponding mushrooms were carried out by ammonium sulfate

precipitation and ion-exchange chromatography and their respective characterizations performed as previously described (5, 12). Hemagglutination inhibition procedure was used for comparative carbohydrate specificity determination of both lectins (5).

RESULTS AND DISCUSSION

A. bisporus and *P. ostreatus* lectins purified and characterized as previously reported (5, 12) have shown that both molecules are structurally distinct glycoproteins, the former constituting a tetramer and the latter being dimeric in nature, accounting their respective monomer molecular masses for 16014 m/z and 44270 m/z. Comparison of the sugar binding specificities of the two lectins studied by hemagglutination inhibition assays is exhibited in Table I. Most of the neutral sugars tested had no effect, except for the galactose at different concentration in each case. N-acetylgalactosamine also showed a distinct degree of the hemagglutination inhibition, being more significant with the *P. ostreatus* lectin. However purified *V. fungicola* glucogalactomannan behaved rather similarly against both lectins, and was even a little more effective when the same glucogalactomannan was isolated from cell walls of phrocloraz-Mn pretreated *V. fungicola* mycelium. This effect can be explained by the increase of the terminal galactose residues of the molecule caused by the fungicide (14).

The carbohydrate-protein interaction appears to be due to the terminal galactose linked at (1-4) to the (1-6) mannose bone of the *V. fungicola* glucogalactomannan molecule (5) in which, the importance of the similar position of the axial C-3 and C-4 hydroxyl groups of the monosaccharide linked to the galactose molecule was previously demonstrated by conformational analysis (15). The fact that this glucogalactomannan behaves as a specific complementary molecule for both lectins could explain the same mechanism of recognition and binding of such specific molecules —«target molecules»— in this disease, as well as the absence of verticillium disease on the *A. bisporus* vegetative mycelial phase due to the lack of lectin (5).

TABLE I. Comparative inhibition of hemagglutinating activity of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins by specific carbohydrates

Carbohydrates	Carbohydrate concentration (mmol/L)									
	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	200	PBS	
<i>A. bisporus</i> lectin										
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
« N-acetyl galactosamine	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
« Glucogalactomannan*	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
« Glucogalactomannan+F**	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. ostreatus</i> lectin										
Galactose	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
« N-acetyl galactosamine	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
« Glucogalactomannan*	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
« Glucogalactomannan+F**	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+

*glucogalactomannan of *V. fungicola*; **glucogalactomannan of *V. fungicola* treated with the fungicide prochloraz-Mn; +, hemagglutination positive; -, hemagglutination negative; ±, 200 mmol.L⁻¹.

All these results suggest possible alternative strategies to overcome the verticillium disease without the routinary use of fungicides as could be, the production of *A. bisporus* and *P. ostreatus* genetically lectin transformants, or the use of analogous molecules to the *V. fungicola* glucogalactomannan ligand which can be recognized by the carbohydrate-binding site(s) of each lectin.

This report may be the first establishing a close relationship between the verticillium disease in *A. bisporus* and *P. ostreatus* fruit bodies, demonstrating that the glucogalactomannan of *V. fungicola* cell walls and a lectin from each mushroom behave as the «target molecules» initiators of the subsequent molecular signaling which, successively, will produce the respective «dry bubble» disease with the necrosis of the fruit bodies. The present studies suggest that the same glucogalactomannan-lectin interaction may occur in the *V. fungicola* mycoparasitism described in the «hot mushroom» *Agaricus bitorquis* also commercially grown (16) and, although up to now it has not been described the presence of any lectin in these fruit bodies, it presumably may exist.

Moreover, this article also suggests that other important verticillium wilt diseases described in several crop plants (olive, cotton etc.) could exhibit a rather similar mechanism of recognition and binding between determined cell wall polysaccharides from *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, etc. (17) and their specific complementary plant lectins, as the necessary step for the development of their corresponding mycosis processes. Further studies are required to prove whether this is a common phenomenon in the strategy of *Verticillium* infections or if it occurred only in the cases previously reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, AGL 2001-1885 and REN 2002-00660) and the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (188/CH-51) for financial support, and the Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES) for supplying the *A. bisporus* and *P. ostreatus* fruit bodies.

BIBLIOGRAPHY

- (1) SINDEN, J. W. (1971): Ecological control of pathogens and weed moulds in mushroom culture. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9: 411-432.
- (2) FLETCHER, J. T. (1981): The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Mushroom Sci.* 11: 597-604.
- (3) GEA, F. J.; NAVARRO, M. J. and TELLO, J. C. (2005): Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese *in vitro*. *Mycol. Res.* 109: 741-745.
- (4) CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M.; BERNARDO, D.; AHRAZEM, O. and GARCÍA MENDOZA, C. (2000): Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* 46: 101-109.
- (5) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. and GARCÍA MENDOZA, C. (2004): *Verticillium* disease or «dry bubble» of cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan. *Can. J. Microbiol.* 50: 729-735.
- (6) NORDBRING-HERTZ, B. and MATTIASSON, B. (1979): Action of a nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microorganism interaction. *Nature.* 281: 477-479.
- (7) BARAK, R.; ELAD, Y.; MIRELMAN, D. and CHET, I. (1985): Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology.* 75: 458-462.
- (8) INBAR, J. and CHET, I. (1994): A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. *Microbiology.* 140: 651-657.
- (9) INBAR, J. and CHET, I. (1996): The role of lectins in recognition and adhesion of mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408: 229-321.
- (10) MARLOWE, A. and ROMAINE, C. P. (1982): Dry bubble of oyster mushroom caused by *Verticillium fungicola*. *Plant Dis.* 66: 859-860.
- (11) KAWAGISHI, H.; SUZUKI, H.; WATANABE, H.; NAKAMURA, H.; SEKIGUCHI, T.; MURATA, T.; USUI, T.; SUGIYAMA, K.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; ITO, K.; HASIMOTO, Y.; OHNISHI-KAMEYAMA, M. and NAGATA, T. (2000): A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1474: 299-308.
- (12) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A. and GARCÍA MENDOZA, C. (2006): *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan-binding of the lectin from the *Pleurotus ostreatus* fruit bodies. In: *Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes VI* (Pisabarro, A. G. and Ramirez, L., Eds.), pp. 207-212. Universidad Pública de Navarra, Spain.
- (13) RAPER, C. A.; RAPER, J. R. and MILLER, R. E. (1972): Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia.* 64: 1088-1117.
- (14) BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M.; PÉREZ CABO, A.; GEA ALEGRÍA, F. J. and GARCÍA MENDOZA, C. (2002): Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell wall structure of *Verticillium fungicola*. *Int. Microbiol.* 5: 121-125.

- (15) IRAZOQUI, F. J.; VIDES, M. A. and NORES, G. A. (1999): Structural requirements of carbohydrates to bind *Agaricus bisporus* lectin. *Glycobiol.* 9: 59-64.
- (16) GEA, F. J.; TELLO, J. C. and NAVARRO, M. J. (2003): Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *fungicola* on *Agaricus bitorquis* mushroom crops in Spain. *J. Phytopathol.* 151: 98-100.
- (17) AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; JIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. and BERNABÉ, M. (2006): Structural elucidation of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of *Plectosphaerella cucumerina* and *Verticillium* spp. *Carbohydr. Res.* 341: 246-252.