

Algunos aspectos estructurales y funcionales de la pared celular de *Agaricus bisporus* y sus aplicaciones más inmediatas*

CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA

Centro de Investigaciones Biológicas.- CSIC.- Madrid.

RESUMEN

Después de una breve introducción en la que se describe la trayectoria científica de la autora, previa a su presentación en esta Academia, se abordan algunos aspectos de la estructura y función de la pared celular de *Agaricus bisporus*, hongo Basidiomiceto superior cultivado industrialmente para la alimentación humana, más conocido como champiñón común. Se resalta la importancia de ciertos componentes estructurales de esta envoltura celular externa, por sus aplicaciones como marcadores bioquímicos para la protección legal de cepas de interés comercial, y como barrera a vencer previamente a la necesaria mejora genética de este organismo, e igualmente por su papel no sólo estructural sino también funcional en el control de la verticiliosis, la enfermedad más dañina en los cultivos industriales del champiñón.

Palabras clave: *Agaricus bisporus*.- Cultivo industrial.- Pared celular.- Marcadores bioquímicos.- Mejora genética.- Verticiliosis.

SUMMARY

Some structural and functional aspects on *Agaricus bisporus* cell wall and their more immediate applications

* Conferencia pronunciada en su toma de posesión como Académica Correspondiente el día 13 de mayo de 1999

After an introduction describing the scientific experience of the author, before her presentation in this Academy, different aspects on the cell wall structure and function of *Agaricus bisporus* were approached. This fungus, being a higher Basidiomycete cultivated for human nutrition, is better known as the common mushroom. The importance of some structural components of this outer cellular envelope is stressed for the legal protection of those strains with industrial interest, and as a barrier to be overcome before the genetic improvement, as well as the structural and functional role in the verticillium disease control which is the most injurious plague of the commercial mushroom cultures.

Key words: *Agaricus bisporus*.- Industrial Culture.- Cell wall.- Biochemical markers.- Genetic improvement.- Verticillium disease.

Constituye un gran honor para mí ser admitida como Académica Correspondiente de esta Real Academia de Farmacia a propuesta del Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva, Académico Director de esta Real Corporación, cuya propuesta ha sido avalada por los Excmos. Sres. Académicos Profs. D. Manuel Ruiz Amil y D. Antonio Portolés Alonso, a los que deseo manifestar mi más profundo agradecimiento. Con los tres he compartido horas de trabajo en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pero más intensamente con el primero, D. Julio Rodríguez Villanueva. En su laboratorio realicé mi Tesis Doctoral, introduciéndome en el campo de la Bioquímica de los Hongos. Seguidamente continué mis estudios en la Universidad de Cambridge (Inglaterra) bajo la dirección del Prof. Ernest Frederic Gale, en el mismo laboratorio donde anteriormente el Prof. Villanueva había trabajado, para reincorporarme después en el CIB, donde he permanecido a lo largo de toda mi carrera científica.

En resumen tres etapas fundamentales en mi vida: una, como estudiante en la Facultad de Farmacia de Madrid; la segunda, de formación científica como postgraduada en el CSIC y en la Universidad de Cambridge y ayudante de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Madrid, y la última como Investigadora Científica del CSIC con destino en el citado CIB. Durante los años de Facultad encontré grandes profesores, algunos ya desaparecidos, D. José M^a Albareda, D. Avelino Pérez Geijo, D. Gregorio Fraile, D. Antonio Doadrio, D. Ángel Santos Ruiz, D. Federico Mayor Zaragoza y tantos otros que encauzaron mi profesión. A lo largo de mi carrera investigadora he tenido relación

científica con los anteriormente citados Profs. Ruiz Amil y Portolés, con los también Académicos D. Manuel Losada, D. Román de Vicente, D. Miguel Rubio, D. Vicente Vilas, D. Bernabé Sanz, D. Guillermo Giménez, y muy especialmente con el ya citado D. Julio R. Villanueva, actual Director de esta Real Academia, maestro y amigo. Gracias Julio, y a todos los demás por haber contribuido en mayor o menor grado a mi presentación de hoy en esta Corporación.

La exposición que voy a realizar a continuación versa sobre algunos aspectos estructurales y funcionales de la pared celular de *Agaricus bisporus* y sus aplicaciones más inmediatas, tema que hemos desarrollado durante los últimos veinte años en nuestro laboratorio del CIB, dentro de la línea común de investigación que, sobre envolturas celulares fúngicas, iniciamos en el laboratorio del Prof. Villanueva en el mismo CIB a principios de los años sesenta, primeramente sobre hongos unicelulares (levaduras), a continuación sobre hongos multicelulares filamentosos y finalmente sobre hongos superiores, con objeto de comprobar la transformación de la pared celular fúngica a lo largo de la evolución de las especies. Este tema ha sido objeto de numerosas publicaciones en revistas de prestigio internacional junto con varias Tesis Doctorales y Tesinas de Licenciatura presentadas en diversas Universidades Españolas, y en él han participado muy especialmente la Dra. Monique Novaes-Ledieu, irremplazable compañera durante tres décadas de colaboración científica, así como todos los que han compartido el día a día en el laboratorio. Gracias a todos ellos por su colaboración y amistad. No puedo dejar de mencionar a mi familia, tanto los presentes como los que ya no están aquí, que con su apoyo también han contribuido al desarrollo de mi carrera.

Continuando con la exposición que nos ocupa, podemos decir que los hongos constituyen el segundo grupo más numeroso de organismos de la biosfera después de los artrópodos. Se puede calcular que en el mundo existen 1.500.000 especies de hongos de las cuales sólo 5% han sido descritas y clasificadas, por lo que nuestro actual conocimiento sobre aquellos es muy limitado. De las cerca de 70.000 especies descritas, unas 10.000 son productoras de cuerpos fructíferos, más vulgarmente denominados setas, de las que alrededor de 2.000 son comestibles y sus

respectivas especies se encajan dentro de unos 30 géneros, aunque apenas una docena de ellas llegan a cultivarse.

Hoy día el consumo de setas está asentado en todo el mundo y su valor alimenticio reconocido, dado su alto contenido en proteínas, que supera al de verduras y legumbres, sus elevados niveles de vitaminas B y C y su escaso contenido en grasas. En muchos países en desarrollo, cuya dieta a base de productos vegetales es pobre en los aminoácidos esenciales lisina, metionina, triptófano y treonina, las setas constituyen un importante suplemento proteico junto con las otras sustancias vitales ya citadas, las vitaminas. Por si fuera poco, las maravillosas propiedades atribuidas antiguamente a ciertas setas, a medio camino entre la magia y la medicina, parecen confirmarse en la actualidad al haberse descrito recientemente en algunas especies la capacidad de reducir los niveles de colesterol, regular la presión sanguínea, producir sustancias antitumorales y antivirales y estimular la producción de interferón (Homuro et al., 1976; Amar et al., 1976; Fujii et al., 1987; Yang et al., 1992).

Los hongos, en su mayoría, son organismos multicelulares con mecanismos de crecimiento y desarrollo completamente distintos a los de plantas y animales, y están constituidos por conjuntos de filamentos denominados hifas con crecimiento únicamente apical. Estos filamentos contienen todos los componentes de las células eucarióticas y están recubiertos por una característica pared celular, y en ciertos grupos más evolucionados, como los Basidiomicetos, aparecen también tabiques transversales o septos que dividen las hifas en compartimentos separados. Además este mismo grupo de hongos, en el momento de su reproducción sexual, produce un tipo de macroestructura o fructificación aparente, en el que las hifas se ramifican y se agregan más o menos paralelamente produciendo un pseudo tejido parenquimatoso, denominado plectenquima, que muestra, pero únicamente en los Agaricales, un crecimiento tanto apical como expansivo.

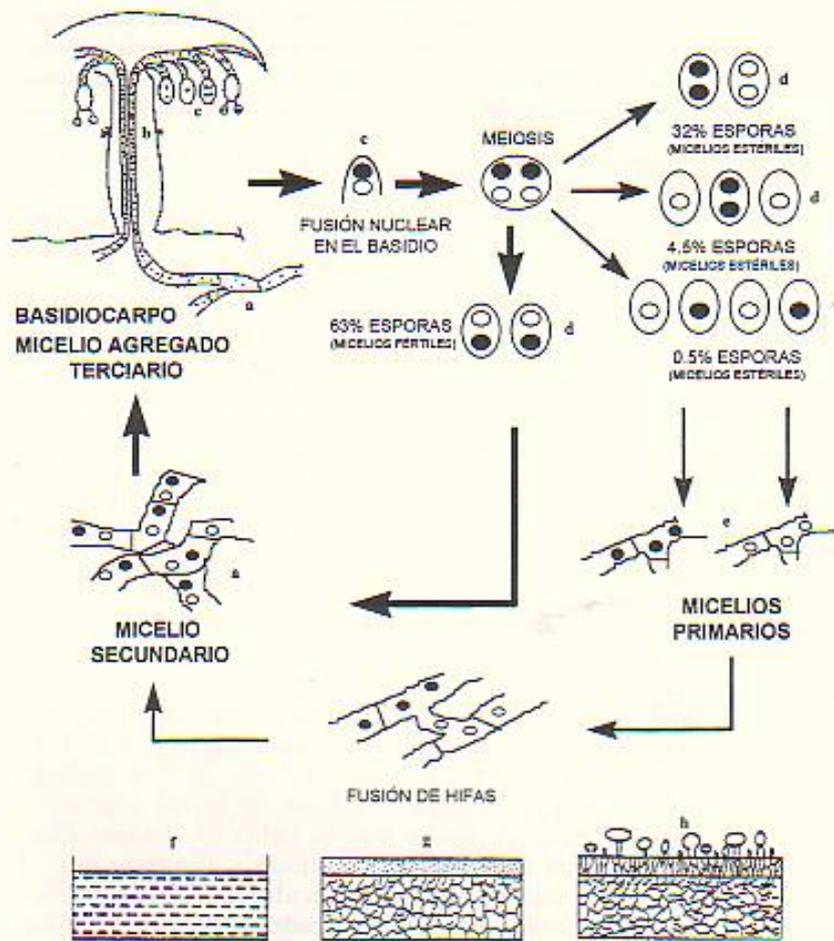
Agaricus bisporus (Lange) Imbach es un hongo Basidiomiceto superior homotálico secundario (Raper et al., 1972) que produce cuerpos fructíferos también denominados carpóforos, esporocarpos, basidiocarpos o setas carnosas comestibles que constituyen el champiñón común, cuyo papel, en términos evolutivos, es simplemente la diseminación de las esporas y así perpetuar la especie. Estas esporas como su nombre indica

se producen en este organismo en parejas, portando cada una dos núcleos compatibles, por lo que son fértiles (Callac et al., 1993), dando lugar tras su germinación, a micelios dicarióticos secundarios capaces de fructificar. *A. bisporus* constituye el hongo cultivado por excelencia en el hemisferio norte, alcanzándose una producción anual de más de 700.000 toneladas de tales cuerpos fructíferos, que se traduce en cifras de billones de pesetas.

El hecho de que haciendo crecer estérilmente pequeños fragmentos de dichos carpóforos sobre medios de cultivo (cultivos de tejido) se obtenga el correspondiente micelio vegetativo secundario ha dado lugar a una explotación incontrolada de las cepas comercializadas. Esta circunstancia, junto a la muy baja variabilidad genética por su directa fructificación en condiciones adecuadas, ha hecho necesario profundizar en el estudio de las diferentes fases morfogenéticas de su ciclo celular para determinar diferentes parámetros bioquímicos y genéticos con objeto de poder controlar su industrialización dotándola con la debida protección legal.

A. bisporus presenta un ciclo biológico característico que le diferencia del resto de los Basidiomicetos (Fig. 1), con dos diferentes rutas en las que se encuentran tanto la fase de crecimiento vegetativo como la fase reproductiva donde se producen las estructuras sexuales típicas, carpóforos o setas. En los Basidiomicetos, de forma general, a partir de una basidiospora mononucleada (espora producida en un basidio dentro de un basidiocarpo) se produce el denominado **micelio primario** monocariótico haploide. Este micelio crece durante un tiempo indefinido hasta encontrarse con otro micelio igualmente primario que resulte ser compatible con él, fundiéndose ambos por anastomosis y dando lugar al denominado **micelio secundario**, que continuará creciendo de forma vegetativa sin existir fusión de núcleos, por lo que se habla de micelio dicariótico, que presenta un desarrollo más rápido y vigoroso que el primario. Cuando este micelio alcanza su madurez inicia la formación de primordios, **micelio terciario** agregado y reproductivo que da lugar, en su desarrollo final, al basidiocarpo. En los basidios, células especializadas de los cuerpos fructíferos, se produce la fusión de núcleos o cariogamia seguida de meiosis, originándose dos, cuatro y muy especialmente hasta ocho basidiosporas hijas haploides (Fig. 1).

Figura 1.- Representación esquemática de las principales etapas del ciclo celular y cultivo industrial de *Agaricus bisporus*-. a) micelio secundario multinucleado; b) micelio agregado; c) basidios en diferentes estadios de madurez; d) distintas clases de esporas; e) micelios primarios; f) recipiente de compost inoculado con *A. bisporus*; g) compost colonizado con micelio, provisto de capa de cobertura; h) primordios y setas de una florada



Sin embargo *A. bisporus*, como ya hemos indicado anteriormente, produce mayoritariamente sólo dos esporas binucleadas fértiles, desarrollando directamente micelio secundario, capaz por sí mismo de

fructificar. El hecho de no producirse, salvo muy excepcionalmente esporas mononucleadas haploides capaces de originar micelios monocarióticos supone, en principio, una muy baja variabilidad genética en este importante organismo, dificultando su posible hibridación y mejora genética con objeto de obtener nuevas cepas con características preseleccionadas.

El cultivo del champiñón de París, nombre con el que se denomina vulgarmente al *A. bisporus* puede decirse que comenzó durante el reinado de Luis XIV de Francia (1643-1715) cuando se habilitaron con estos fines las cuevas de los subterráneos de París, que aún siguen utilizándose en nuestros días. El compost obtenido de los establos de los caballos era el medio de cultivo, que, distribuido sobre los suelos formando hileras, se inoculaba con suelo mezclado con micelio procedente de los lugares donde crecían champiñones salvajes.

Esta rara habilidad fue pronto explotada por los ingleses y Abercrombie en 1779 describió por primera vez las tremendas variaciones del cultivo del champiñón durante el siglo XVIII. Para ello utilizaron cobertizos o graneros aireados y cubiertos por toldos, invernaderos e incluso cultivos en la tierra al aire libre, hasta llegar a los cultivos protegidos en construcciones especiales.

La importancia del champiñón como una delicadeza de la aristocracia del siglo XIX fue citada por Calow en 1831, donde describía la utilización de instalaciones con calefacción para obtener champiñones durante todo el año, así como el sistema de estanterías sobre las que se disponían los lechos de compost para cultivar los champiñones, que todavía hoy perduran.

Después de la Guerra Civil Norteamericana el cultivo del champiñón se introdujo en el Nuevo Mundo por medio de agricultores emigrantes ingleses, franceses y escandinavos, desarrollándose diferentes métodos, sistemas y escalas para su producción industrial, que en la segunda mitad de nuestro siglo han dado lugar a una sofisticada tecnología dentro de las actividades agrícolas. El método de obtención de cultivos puros de *A. bisporus* como inóculos fue definitivo para el desarrollo de esta tecnología (Sinden, 1932), junto con las condiciones de aireación y concentración de CO₂ (Lambert, 1938) y los requerimientos específicos en la preparación del compost. Este aumento en la eficiencia

de su cultivo ha dado lugar a la expansión mundial del cultivo de champiñón con un coste relativamente bajo, incrementándose su consumo.

El cultivo del champiñón en España se inicia a principios de los años cincuenta de manera individual y artesanal, principalmente en Navarra y La Rioja, utilizando cuevas naturales, bodegas antiguas u otras dependencias semejantes, con lo que los resultados eran francamente pobres (entre un 5-10% de cosecha respecto al peso del sustrato utilizado, prolongándose hasta cinco o seis meses cada ciclo de cultivo). A estas comarcas siguieron Zaragoza, Valencia, Granada, Islas Baleares, y algo después Huesca, Albacete, Barcelona y Cuenca, pero continuando como núcleos aislados.

En 1974 con la instalación en Villanueva de la Jara (Cuenca) de la primera planta de preparación de sustrato pasteurizado o compost, inoculado con micelio crecido previamente sobre granos de cereal, el cultivo de champiñón sufrió un cambio radical. Rápidamente fue extendiéndose su cultivo en locales construidos al efecto con control de temperatura y humedad, haciéndose más industrializado, aumentando los rendimientos y disminuyendo la duración de los ciclos, dando lugar a que Castilla-La Mancha, y concretamente la comarca de la Manchuela, se haya colocado en el primer puesto de la producción nacional.

El cultivo industrial de *A. bisporus* se realiza en recipientes adecuados conteniendo compost que se inoculan con granos de cereal sobre los que se ha hecho crecer previamente micelio vegetativo (Fig. 1) y se incuban en locales acondicionados durante 10-14 días a 25° C hasta que se coloniza totalmente el sustrato con el micelio vegetativo. A continuación se cubre la superficie del compost colonizado con una capa de suelo poroso y absorbente, generalmente turba, y se incuba durante otros 7-10 días a 25° C, después de los cuales se rebaja la temperatura a 16° C con aireación y se mantienen los cultivos durante unos 10 días más. La aparición de primordios seguida de cuerpos fructíferos tendrá lugar en oleadas, con intervalos de aproximadamente una semana, hasta que después de cuatro o cinco oleadas el cultivo finaliza por agotamiento del sustrato y envejecimiento del micelio.

Todas las fases de diferenciación y morfogénesis descritas a lo largo del ciclo celular de *A. bisporus* implican unos cambios de estructura

química y ultraestructura específicos en las correspondientes paredes celulares. La pared celular, en los comienzos de su estudio, se definió como una estructura externa y rígida (exoesqueleto) determinante de la forma fúngica con funciones exclusivamente protectoras. Gracias a todos los estudios realizados posteriormente se ha podido constatar que es una estructura altamente dinámica con funciones claramente definidas y mucho más amplias que las de simple protección del protoplasto, pudiéndose concluir que una morfología dada es dependiente de una determinada estructura química y ultraestructura.

El estudio de la composición y estructura químicas de la pared celular fúngica ha sido realizado por numerosos investigadores (Rosenberger, 1976; Peberdy, 1990) y aunque particularmente la de los Basidiomicetos ha sido poco estudiada, en *A. bisporus* ha sido abordada por Michalenko et al. (1976), Novaes-Ledieu y García Mendoza (1981), Avellán et al. (1986), García Mendoza et al. (1987a), Mol y Wessels (1990), Calonje et al. (1995b, 1996) y García Mendoza et al. (1996). Básicamente la pared celular de *A. bisporus* está constituida mayoritariamente por polisacáridos neutros (formados principalmente por glucosa y en un porcentaje menor por galactosa, manosa y xilosa) y aminados (N-acetilglucosamina en forma de quitina), con una menor proporción de proteínas y lípidos, en cantidades que difieren significativamente según se trate del micelio vegetativo o agregado. Los polisacáridos formados son principalmente glucanos junto con galactanos, mananos y xilanos y con frecuencia polisacáridos mixtos (heteropolisacáridos) como manoxilanos, glucoxilanos etc., con diferentes tipos de enlaces, relativamente ramificados y con ambas configuraciones α o β con lo que la estructura química se complica en grado sumo.

Mediante diferentes estudios físicos, químicos y bioquímicos, como metilación seguida de cromatografía de gases-espectroscopía de masas, espectrometría de infrarrojo, resonancia magnética nuclear, degradaciones enzimáticas totales o parciales etc., de tales polisacáridos solubilizados paulatinamente de las correspondientes paredes celulares, se ha podido ubicar dentro de la misma pared, un complejo de quitina embebida en una matriz de β -glucano, a la que se superpone un $\alpha(1-3)$ -glucano también cementado por α y/o β -glucanos y heteropolisacáridos, situándose más externamente un $\alpha(1-4)$ -glucano mucilaginoso (Fig. 2).

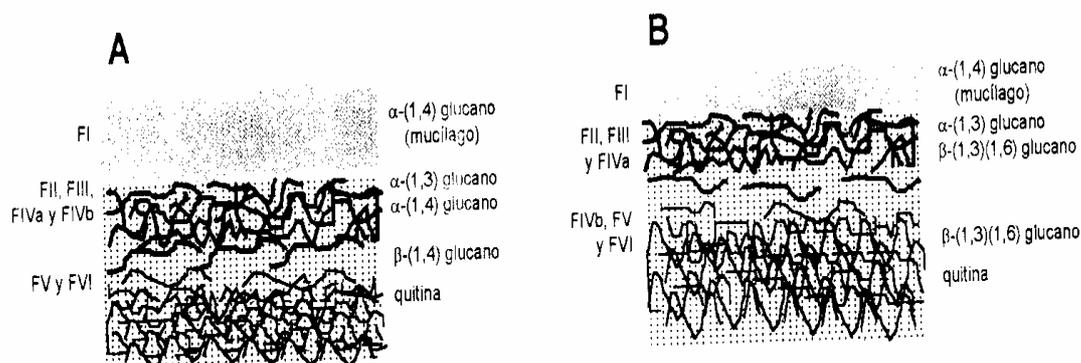


Fig. 2.- Esquema de la disposición de los componentes polisacáridicos en las paredes celulares de *A. bisporus*, deducido del fraccionamiento químico, de la microscopía electrónica (corte ultrafino sombreado) y de la degradación enzimática. A) pared celular del micelio vegetativo; B) pared celular del micelio agregado del carpóforo.

Este modelo general de la pared celular de *A. bisporus* está sujeto, como acabamos de mencionar, a variaciones características de los diferentes polisacáridos neutros citados a lo largo del ciclo celular, que confieren una clara especificidad a los diferentes estadios morfológicos anteriormente citados. Pero otras diferencias más puntuales también se detectan entre distintas cepas comerciales de este organismo cuando se analizan las paredes de sus respectivos micelios vegetativos en la misma fase de crecimiento.

Estudios ultraestructurales en el microscopio electrónico paralelos a los fraccionamientos químicos nos han suministrado resultados complementarios para las paredes de los dos bien diferenciados micelios de *A. bisporus* citados, vegetativo secundario con hifas más homogéneas y agregado terciario con hifas más heterogéneas, y confirman la hipótesis de ubicación de los componentes polisacáridicos obtenidos en base a los estudios químicos. En efecto, con diferencias claras de grosor entre unas paredes y las otras, como ocurre también con el diámetro de las respectivas hifas, los componentes de dichas envolturas, a pesar de las variaciones químicas detectadas, se estructuran en las mismas tres distintas capas que describimos anteriormente: una capa interna muy

densa a los electrones correspondiente al complejo fibrilar cementado de quitina-glucano, una capa media menos densa a los electrones, constituida por $\alpha(1-3)$ -glucano y componentes cementantes que conforman una estructura de fibras gruesas características y una capa externa difusa y lábil de material mucilaginoso (Hunsley y Burnett, 1970; García Mendoza et al., 1987b; Mol et al. 1990).

La solubilización química secuencial de los distintos componentes sacarídicos de la pared celular, paralela a su observación en el microscopio electrónico mediante la técnica de sombreado en superficie, confirma una vez más la ubicación de los distintos componentes sacarídicos dentro de la pared celular de *A. bisporus*.

Esta disposición ultraestructural se mantiene también en las tres entidades bien diferenciadas del micelio agregado del carpóforo –estípite o pie, píleo o sombrerillo y lamelas o laminillas- presentando cada una de ellas, a su vez, características químicas específicas, particularmente las últimas, con una mayor proporción de polifenoles precursores de melanina, dentro de la fracción lipídica, junto con un mucílago con carácter propio (Bernardo et al., 1999).

Por su parte las esporas formadas en los basidios presentan sobre la pared celular descrita, una cubierta adicional melaninizada en su superficie externa con objeto de preservarlas frente a las condiciones ambientales adversas (García Mendoza et al., 1979).

Habiendo podido constatar la importancia de las diferencias químicas estructurales de los polisacáridos de la pared celular entre diferentes variedades de la misma especie, se consideró necesario comprobar los citados resultados a nivel de biología molecular, para lo cual se estableció una colaboración con el Laboratorio de Genética Molecular y Mejora Genética de Hongos Cultivadas (INRA-Universidad de Burdeos, Francia). Estudios paralelos realizados sobre la estructura química de la pared celular de los micelios vegetativos de diferentes cepas comerciales de *A. bisporus*, por un lado, y de sus respectivos ADNs, por otro, han suministrado resultados totalmente concordantes (Calonje et al., 1995a), habiéndose llegado a concluir que tanto la estructura química de determinados componentes polisacáridicos de la pared celular como los polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial pueden ser utilizados como marcadores bioquímicos y

moleculares para la caracterización de cepas de organismos de interés industrial como *A. bisporus*. Así pues la confección de una carta de identidad específica para cada cepa servirá para su posterior protección legal, particularmente en este caso donde, como ya dijimos anteriormente, a partir de pequeños fragmentos de los carpóforos comerciales se obtienen fácilmente los correspondientes micelios vegetativos fértiles, lo que ha dado lugar en la actualidad a un total descontrol de cepas de explotación comercial.

Otra forma de corroborar la estructura química de la pared celular de *A. bisporus* es mediante su correspondiente degradación enzimática total o parcial. En el caso del organismo que nos ocupa y dada la particular estructura química de su pared, para su degradación enzimática completa es necesario utilizar complejos enzimáticos que contengan conjuntamente α - y β -glucanasas asociadas con quitinasa, debido a la presencia de ambos tipos de glucanos y de quitina en dichas paredes. Gracias a la degradación enzimática específica de estos polisacáridos se ha podido comprobar ultraestructuralmente su localización dentro de la pared, corroborando los resultados obtenidos anteriormente. Mediante la degradación enzimática total de tales paredes ha sido posible la obtención de protoplastos mono-, di- y polinucleados de *A. bisporus* (Sonnemberg et al., 1988; García Mendoza et al., 1991), con la consiguiente ventaja de poder contar, tras la separación y posterior reversión de los protoplastos mononucleados, con micelios primarios monocarióticos, que no son nativos en este organismo, para posteriores cruzamientos mediante anastomosis entre cepas con características específicas (hibridación de cruce). Igualmente la hibridación somática o fusión controlada de protoplastos mononucleados compatibles ha dado lugar a la obtención de cepas de *A. bisporus* con propiedades preseleccionadas, y actualmente, gracias a la transformación genética en vías de consecución en este organismo (Van de Rhee et al., 1996), se espera obtener resultados prometedores, pero siempre condicionada a la imprescindible obtención previa y reversión posterior de protoplastos, cuya importancia cabe resaltar.

Hasta el momento hemos definido la pared celular de *A. bisporus* en relación con su estructura química y ultraestructura, pero dicha pared no es sólo un exoesqueleto estático, sino una entidad muy dinámica que

cambia a lo largo de todos los procesos morfogenéticos citados (Cid et al., 1995), gracias a la presencia de las correspondientes enzimas tanto de la degradación controlada como de la síntesis de los polisacáridos que la conforman, tal como ha propuesto Bartnicki-García (1973) para explicar el crecimiento de la pared celular fúngica. De este modo, primero actuarían las enzimas líticas secretadas desde vesículas citoplásmicas hasta el espacio periplásmico, rompiendo las uniones inter- o intramoleculares del esqueleto polisacárido de la pared y seguidamente intervendrían las enzimas biosintéticas formando nuevos polisacáridos o aumentando los ya existentes, dando lugar tanto al crecimiento apical de las hifas como al crecimiento expansivo en el caso del micelio agregado.

El hecho de que el complejo β -glucano-quitina y el $\alpha(1-3)$ -glucano sean los componentes esqueléticos de la pared celular de *A. bisporus* y responsables de su forma y solidez, conduce a que las α - y las β -glucanasas y la quitinasa constituyan el potencial autolítico de la pared interviniendo no sólo en los procesos morfogenéticos de crecimiento y desarrollo descritos, pero también en los de supervivencia celular en condiciones de ausencia de nutrientes en los cuales moviliza estos sustratos, e igualmente en los de parasitismo en donde se incrementa en gran manera la producción de todas estas enzimas. A este respecto la producción de $\beta(1-4)$ -glucanasa extracelular ha sido descrita y caracterizada en cultivos de micelios vegetativos de *A. bisporus* por distintos investigadores (Manning y Wood, 1983; Raguz et al., 1992) así como la de $\beta(1-3)$ -glucanasa con acción hidrolítica también para el enlace $\beta(1-6)$ -, por nuestro grupo de investigación (Galán et al., 1999), además de haber identificado igualmente la producción de $\beta(1-6)$ -, $\alpha(1-3)$ - y $\alpha(1-4)(1-6)$ -glucanasas y $\beta(1-4)$ -xilanasas, todas ellas enzimas cuyos sustratos específicos se encuentran como componentes de la pared celular de este organismo.

Estudios previos realizados también en nuestro laboratorio han mostrado, a partir de cultivos autolíticos de *A. bisporus*, la producción de las enzimas necesarias para degradar sus propias paredes celulares lo que corrobora una vez más la presencia de tales enzimas en todos los procesos morfogenéticos de su ciclo celular.

Otro aspecto funcional de la pared fúngica se relaciona con el parasitismo al cual acabamos de hacer referencia. En los cultivos industriales de *A. bisporus* se manifiesta con demasiada frecuencia la enfermedad denominada mole seca o verticiliosis del champiñón producida por el micoparasitismo del hongo Hifomiceto *Verticillium fungicola*, ocasionando pérdidas millonarias tanto en nuestro país como en todos los que se dedican a este cultivo. Se ha tratado de controlar la micosis introduciendo drásticas medidas de higiene en las instalaciones y en el personal cultivador del champiñón, además de la aplicación rutinaria de fungicidas, pero es difícil encontrar sustancias que específicamente actúen sobre el micopatógeno y no afecten, al menos parcialmente, al hospedador, y no se debe olvidar que el uso indiscriminado de dichos fungicidas está produciendo un incremento en la resistencia del micoparásito.

Dado que el parásito sólo es capaz de infectar los carpóforos (micelio agregado) del hospedador, y no el micelio vegetativo, cuyas paredes celulares según hemos visto anteriormente difieren entre sí significativamente, tenemos que considerar una vez más el importante papel que desempeña de forma general la pared celular, y en particular la de *A. bisporus*. El rasgo de individualidad característico de cada cepa de *A. bisporus*, conferido por los polisacáridos propios de su pared celular, puede tener relación con los distintos grados de resistencia manifestados por el micelio vegetativo a la enfermedad, puesto que algunos de estos polisacáridos son más resistentes al ataque enzimático de *V. fungicola* **in vitro**, como hemos podido comprobar experimentalmente.

En la infección de los carpóforos de *A. bisporus*, el micoparásito *V. fungicola* secreta las enzimas hidrolíticas necesarias para digerir las paredes celulares de las hifas agregadas de *A. bisporus*, penetrando inter- e intracelularmente, hasta producir claras zonas de lisis en las hifas del hospedador y finalmente la muerte celular (Calonje et al., 1997). Pero para que este efecto enzimático final tenga lugar, es necesario un reconocimiento previo entre el hospedador y el parásito que se desprende de los estudios realizados mediante microscopía electrónica. Dicho reconocimiento parece ser debido a la presencia en la pared celular de *A. bisporus* de una(s) determinada(s) proteína(s) receptora(s) (proteína de unión, aglutinina, lectina) que se une(n) específicamente a determinados

residuos polisacáridicos de la pared celular del micoparásito. Estudios preliminares sobre la estructura polisacáridica de la pared celular de *V. fungicola* apuntan a la presencia de un glucogalactomanano que se une específicamente a cierta fracción glicoproteica de la pared celular de *A. bisporus*, como ha sido demostrado en nuestro laboratorio por estudios de aglutinación e inmunofluorescencia indirecta.

En el caso del micelio vegetativo de *A. bisporus* donde la enfermedad no se produce, aunque si existe el reconocimiento inicial entre el hospedador y el parásito, la degradación enzimática subsiguiente a dicho reconocimiento no tiene lugar, y por ello la infección no se manifiesta. Estudios posteriores sobre la caracterización de la(s) proteína(s) receptora(s) nos llevarán a dilucidar el mecanismo molecular de la enfermedad mole seca del champiñón, para en un futuro próximo tratar de controlar o erradicar tan costosa plaga.

De los estudios previamente expuestos podemos destacar varias aplicaciones inmediatas:

- Ciertos polisacáridos de las paredes celulares pueden ser específicos de una determinada cepa, y concretándonos a *A. bisporus*, de una variedad de explotación industrial, y utilizarse como marcadores bioquímicos quimiotaxonómicos que se expresen detalladamente en cartas de identidad características de cada cepa para asegurar una posterior protección legal, inexistente en la actualidad.
- La digestión enzimática controlada de los polisacáridos de la pared celular de *A. bisporus* da lugar a la consiguiente liberación de protoplastos, células desprovistas de pared celular que se mantienen viables debido a la isotonicidad del medio donde se originan. Gracias a la formación de protoplastos se pueden obtener micelios primarios susceptibles de anastomosis (hibridación de cruce), con la consiguiente obtención de micelios secundarios. Igualmente la fusión controlada de protoplastos (hibridación somática) conlleva a la formación de híbridos. Finalmente la obtención de protoplastos es imprescindible para la transformación genética. En todos los casos es igualmente imprescindible la posterior reversión de los citados protoplastos hasta la formación de las correspondientes hifas. Cualquiera de los

procedimientos expuestos constituye la base de la mejora genética en este organismo que, debido a su particular ciclo biológico, ha mostrado hasta el presente una muy baja variabilidad genética.

- La particular estructura química de su pared celular hace que un organismo pueda ser o no parasitado por otro, y concretándonos a *A. bisporus*, la diferente estructura de ciertos polisacáridos de las paredes de los micelios vegetativo y agregado podría ser la causa por la que esta última fase biológica de *A. bisporus* sea receptiva a la enfermedad verticiliosis y la primera no. Estudios adicionales nos llevarán a desentrañar los mecanismos moleculares del reconocimiento *A. bisporus-V. fungicola*, y posteriormente tratar de conseguir cepas resistentes a la citada enfermedad.

Los estudios expuestos son un ejemplo más de cómo la investigación básica da lugar a aplicaciones prácticas. En el caso de *A. bisporus*, al tratarse de un organismo de gran valor alimenticio, industrial y económico, estos estudios han adquirido gran importancia y de hecho están empezando a ser aplicados.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HOMURO, J.; MAEDA, Y.; FUKUOKA, F.; CHIAHARA, G. (1976) antitumour polysaccharide, Lentinan and Pachymaran as immunopotentiators. *Mushroom Sci.* 9: 477-487.
- (2) AMAR, C.; DELAUMENY, J.N. ; VILKAS, E. (1976) Chemical and biological properties of a peptido-glucan fraction from *Armillaria mellea* (basidiomycetes). *Biochim. Biophys. Acta* 421: 263-271.
- (3) FUJII, T.; MAEDA, H.; SUYUKI, F.; ISHIDA, N. (1987) Isolation and characterization of new anti-tumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics* 31: 1070-1090.
- (4) YANG, Q.Y.; JONG, S.C.; LI, X.Y.; ZHOU, J.X.; CHEN, R.T.; XU, L.Z.; XU, B. (1992) Anti-tumour and immunomodulating activities of the polysaccharide-peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*. *EOS-J. Immunol. Immunopharmacol.* 12: 29-34.
- (5) RAPER, C.A.; RAPER, J.R.; MILLER, R.E. (1972) Genetic analysis of the life-cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64: 1088-1117.
- (6) CALLAC, P.; BILLETTE, C.; IMBERNON, M.; KERRIGAN, R.W. (1993) Morphological, genetic and interfertility analyses reveal a novel, tetrasporic

- variety of *Agaricus bisporus* from the sonoran desert of California. *Mycologia* 85: 835-851.
- (7) ABERCROMBIE, J. (1817) Abercrombie's practical gardener, or improved system of modern horticulture. 2nded. Revised by G. Mean. Cadell and Davies, London.
 - (8) CALLOW, E. (1831) Observations on the methods now in use for the artificial growth of mushrooms, with a full explanation of an improved mode of culture, by which a most abundant supply may be procured and continued throughout every month in the year, with a degree of certainty that has in no instance failed. Fellow. London.
 - (9) SINDEN, J.W. (1932) Mushroom spawn and method of making same. U.S. Patent 1, 869, 517.
 - (10) LAMBERT, E.B. (1938) Principles and problems of mushroom culture. *Botanical Reviews* 4: 397-426.
 - (11) ROSENBERGER, R.F. (1976) The cell wall. En: The filamentous fungi, Vol II, pp 328-344. J.E. Smith y D. R. Berry (eds.) Edward Arnold Publishers. Londres.
 - (12) PEBERDY, J.F. (1990) Fungal cell walls – A Review. En: Biochemistry of cell walls and membranes in fungi, pp 30. P.J. Kuhn, a.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey y L. G. Coppong (eds.) Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg.
 - (13) MICHALENKO, G.O.; HOHL, H.R.; RAST, D. (1986) Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 92: 251-262.
 - (14) NOVAES-LEDIEU, M.; GARCÍA MENDOZA, C. (1981) The cell wall of *Agaricus bisporus* and *Agaricus campestris* fruiting body hyphae. *Can. J. Microbiol.* 27:779-787.
 - (15) AVELLÁN, M.A.; GARCÍA MENDOZA, C.; NOVAES-LEDIEU, M. (1986) Relationship between the presence of wall mucilage and the cellular disruption method employed in *Agaricus bisporus* tertiary mycelium. *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 101-104.
 - (16) GARCÍA MENDOZA, C.; AVELLÁN, M.A.; SÁNCHEZ, E.; NOVAES-LEDIEU, M. (1987a) Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia. *Arch. Microbiol.* 148: 68-71.
 - (17) MOL. P.C.; WESSELS, J.G.H. (1990) Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipes in *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 94: 472-479.
 - (18) CALONJE M., GARCÍA MENDOZA, C.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. (1995b) Some significant differences in wall chemistry among four commercial *Agaricus bisporus* strains. *Current Microbiol.* 29: 111-115.
 - (19) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; 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.
- (20) GARCÍA MENDOZA, C.; PÉREZ CABO, A., CALONJE, M.; GALÁN, B.; NOVAES-LEDIEU, M. (1996) Chemical and structural differences in cell wall polysaccharides of two monokaryotic strains and their resulting dikaryon of *Agaricus bisporus*. *Current Microbiol.* 33: 211-215.
 - (21) HUNSLEY, D.; BURNETT, J.H. (1970) The structural architecture of the walls of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* 63: 75-94.
 - (22) GARCÍA MENDOZA, C.; LEAL, J.A.; NOVAES-LEDIEU, M. (1987b) differences in microfibrils in the walls of *Agaricus bisporus* secondary mycelium. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:161-165.
 - (23) MOL, P.C.; VERMEULEN, C.A.; WESSELS, J.G.H. (1990) Diffuse extension of hyphae in stipes of *Agaricus bisporus* may be based on a unique wall structure. *Mycol. Res.* 94: 480-488.
 - (24) BERNARDO, D.; GARCÍA MENDOZA, C.; CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M. (1999) Chemical analysis of the lamella walls of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Current Microbiol* 38: 364-367.
 - (25) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; NOVAES-LEDIEU, M.; LABARÈRE, J. (1995a) Characterization of two commercial *Agaricus bisporus* strains by cell-wall structure, isozyme patterns, nuclear and mitochondrial restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Mushroom Sci.* 14: 133-140.
 - (26) SONNEMBERG, A.S.M.; WESSELS, J.G.H.; VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. (1988) An efficient protoplasting/regeneration system for *Agaricus bisporus* and *A. bitorquis*. *Current Microbiol.* 17:285-291.
 - (27) GARCÍA MENDOZA, C.; PÉREZ CABO, A.; SÁNCHEZ GONZÁLEZ, M.L.; NOVAES-LEDIEU, M. (1991) Morphological and structural studies on protoplast production and reversion of the higher basidiomycete *Agaricus bisporus*. *Current Microbiol.* 22: 191-194.
 - (28) VAN DE RHEE, M.D.; GRAÇA, P.M.A.; HUIZING, H.K.; MOOIBROEK, H. (1996) Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Mol. Gen. Genetics* 250: 252-258.
 - (29) CID, V.J.; DURÁN, A.; DEL REY, F.; ZINDER, M.P.; NOMBELA, C.; SÁNCHEZ, M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 59: 345-386.
 - (30) BARTNICKI-GARCÍA, S. (1973) Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. En: *Microbial differentiation, 23rd Symp. Soc. Gen. Microbiol.* pp. 245-267. University Press. Cambridge.
 - (31) MANNING, K.; WOOD, D.A. (1983) Production and regulation of endocellulase by *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1839-1847.
 - (32) RAGUZ, S.; YAGÜE, E.; WOOD, D.A.; THURSTON, C.F. (1992) Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. *Gene* 119: 183-190.

- (33) GALÁN, B.; GARCÍA MENDOZA, C.; CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M. (1999) Production, purification and properties of an endo-1,3- β -glucanase from the basidiomycete *Agaricus bisporus*. *Current Microbiol.* 38: 190-193.
- (34) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; GALÁN, B.; NOVAES-LEDIEU, M. (1997) Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology* 143: 2999-3006.