

El micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o «mole seca» del champiñón

CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA
*Académica Correspondiente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

RESUMEN

La presente revisión contempla diferentes aspectos de la micosis producida por *Verticillium fungicola* en los cultivos comerciales de *Agaricus bisporus* o champiñón. Las diferentes interacciones producidas por la estructura química característica de las paredes celulares de ambos organismos: a) la adhesión inespecífica debida a la presencia de la proteína hidrofobina en las tres clases de paredes celulares estudiadas (micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* y micelio de *V. fungicola*), b) el reconocimiento y unión específicos entre el polisacárido glucogalactomanano de las paredes celulares de *V. fungicola* y la glicoproteína lectina del micelio agregado de *A. bisporus*, y c) finalmente la degradación enzimática selectiva de las paredes celulares del micelio agregado o carpóforos de este último organismo por las enzimas líticas de *V. fungicola*, constituyen los puntos desarrollados.

Palabras clave: Micoparasitismo.—*Verticillium fungicola*.—*Agaricus bisporus*.—Pared celular.—Polisacáridos.—Glucogalactomanano.—Proteínas.—Hidrofobina.—Lectina.—Enzimas líticas.

SUMMARY

The *Verticillium fungicola* mycoparasitism on the *Agaricus bisporus* fruit bodies: the *Verticillium* disease or «dry bubble» of mushrooms

The present review describes different aspects of the mycosis produced by *Verticillium fungicola* on the industrial cultures of *Agaricus bisporus* or common white button mushroom. The different interactions produced by the characteristic chemical structure of the cell walls of both organisms: a) the unspecific adhesion due to the presence of the protein hydrophobin in the three kinds of cell walls studied (*A. bisporus* vegetative and aggregated mycelia and *V. fungicola* mycelium), b) the specific recognition and binding between the polysaccharide glucogalactomannan from the *V. fungicola* cell walls with the *A. bisporus* aggregated mycelium glycoprotein lectin, and c) finally the selective enzymatic degradation of the fruit body cell walls of this last organism by the *V. fungicola* lytic enzymes, constitute the points developed.

Key words: Mycoparasitism.—*Verticillium fungicola*.—*Agaricus bisporus*.—Cell wall.—Polysaccharides.—Glucogalactomannan.—Proteins.—Hydrophobin.—Lectin.—Lytic enzymes.

INTRODUCCIÓN

El micoparasitismo verticiliosis o «mole seca» de los cultivos industriales de champiñón es la micosis producida por el hongo Hifomiceto *Verticillium fungicola* (Preuss, Hassebrauk) sobre el micelio agregado de los carpóforos (cuerpos fructíferos o setas) del hongo Basidiomiceto *Agaricus bisporus* (Lange, Imbach).

Esta enfermedad puede llegar a destruir una cosecha en dos o tres semanas, lo que representa un grave problema económico dentro del sector, alcanzándose anualmente en el mundo pérdidas de varios cientos de millones de euros. La micosis que nos ocupa ha tratado de controlarse introduciendo medidas de higiene tanto en las instalaciones como en el personal cultivador, así como mediante la aplicación rutinaria de fungicidas como el Procloraz-Mn, pero es difícil encontrar sustancias químicas selectivas que destruyan o inhiban al micopatógeno sin afectar al menos en parte al hospedador, dada la circunstancia de que ambos organismos pertenecen al reino de los hongos. A lo largo de la última década se ha podido observar una mayor incidencia de verticiliosis en los cultivos industriales de

champiñón en España, a pesar del consiguiente uso preventivo del Procloraz-Mn, lo que sugiere el desarrollo de una posible resistencia por parte del micopatógeno frente al fungicida (1).

El síndrome de la micosis en los cultivos industriales de champiñón se asocia a tres tipos de síntomas dependiendo de la etapa de desarrollo del carpóforo en que se produzca la infección (2, 3). Cuando los cultivos se infectan en una etapa temprana de su desarrollo, en la fase de primordio, en lugar de champiñones aparecen unas masas esféricas de tejido micelial donde no existe diferenciación entre pie, sombrerillo y laminillas, que se denominan «bolas o mole seca». Si los cultivos son afectados en una fase más avanzada de dicho desarrollo de los champiñones, cuando ya existe diferenciación entre estúpite y píleo, aparecen claras deformaciones al arquearse primeramente el pie, lo que se conoce con el nombre de «pie o labio de liebre», debido a que las hifas afectadas han detenido su crecimiento mientras que las no infectadas continúan su crecimiento apical. Finalmente cuando se infectan los carpóforos completamente diferenciados aparecen en su superficie unas «manchas o moteado» de color pardo junto con lesiones necróticas, debido a la penetración del parásito dentro de la masa micelial de los carpóforos (Fig. 1).

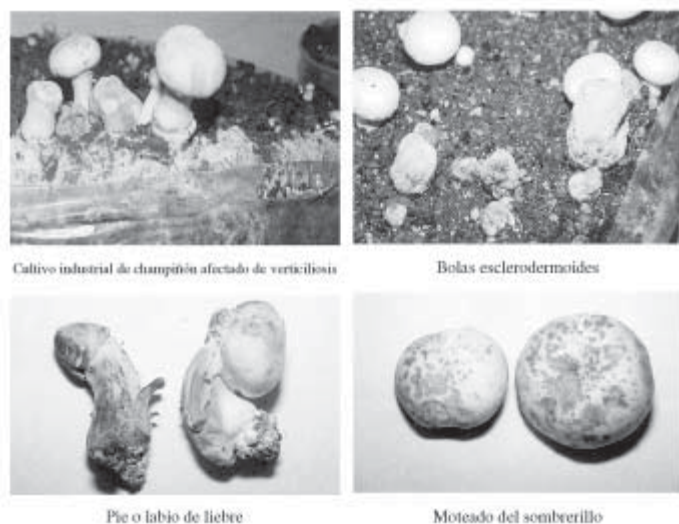


FIGURA 1. Síntomas de la verticiliosis o «mole seca» de los cultivos industriales de champiñón. Fuente: Ref. 3.

Gracias a los estudios realizados mediante microscopía electrónica se ha podido demostrar recientemente que el micopatógeno se desarrolla tanto inter- como intracelularmente (Fig. 2) en las hifas del micelio agregado de dichos carpóforos de *A. bisporus* (4-6). La fase visible del proceso infectivo se debe a la secreción de enzimas extracelulares por parte de *V. fungicola* que conduce finalmente a la necrosis de los citados carpóforos de *A. bisporus* (7-9). Estas enzimas han sido estudiadas por Calonje et al. (5) y entre ellas se han identificado exo- y endopolisacaridasas y proteasas, algunas de las cuales incrementan su producción en presencia de las paredes celulares del micelio agregado del hospedador *A. bisporus* (5).

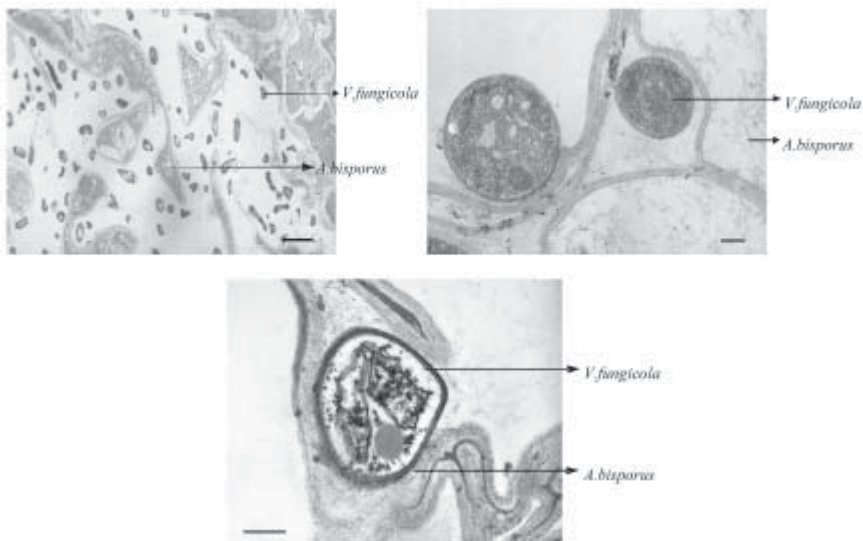


FIGURA 2. Interacción entre el micopatógeno *V. fungicola* y su hospedador *A. bisporus* observada en el microscopio electrónico de transmisión. Las barras corresponden a 2 μm , 0,5 μm y 0,5 μm respectivamente. Fuente: Ref. 6.

Pero antes de que aparezcan los síntomas evidentes de la infección, parecen existir interacciones celulares y moleculares específicas entre el micopatógeno y el hospedador, de forma semejante a como ha sido descrito en otros casos de micoparasitismo (10), de tal manera que primero se produciría una adhesión más o menos inespecífica entre ellos, a la que seguiría un reconocimiento y/o unión específicos, cuando se trata de organismos compatibles.

En el caso del micelio vegetativo de *A. bisporus*, aunque se produzca un aparente contacto entre el hospedador y el micopatógeno (11), sin embargo no tiene lugar la posterior degradación enzimática *in vivo* (11), por lo que dicho micelio vegetativo se comporta como no compatible frente a *V. fungicola*, y debido a ello finalmente no desarrolla la enfermedad.

El hecho de que dicho micelio vegetativo no sea digerido por las enzimas de *V. fungicola*, y que las paredes celulares de ambos micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* presenten diferencias estructurales considerables (12, 13) demuestra el importante papel que desempeñan las paredes celulares de ambos organismos en la micosis que nos ocupa.

Todos los aspectos que acabamos de reseñar van a ser tratados más detalladamente a lo largo del presente trabajo.

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PAREDES CELULARES DE *AGARICUS BISPORUS* Y *VERTICILLIUM FUNGICOLA*

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

Sus principales componentes son homopolisacáridos, como glucanos α -(1-3), α -(1-4), β -(1-3) y β -(1-3) (1-6), mananos, quitina, quitosano, celulosa y ácido poliglucurónico (14-16), así como heteropolisacáridos como manoglucogalactanos (17), glucogalactomananos (18), galactomanoglucanos (19), etc. El esqueleto microfibrilar

está constituido generalmente por quitina y en unos pocos casos por celulosa, ambas embebidas en otros polímeros y proteínas, formando la capa más interna, mientras que la(s) capa(s) más externa(s) contiene(n) diferentes tipos de polisacáridos (20, 21). La mezcla de fibrillas y polímeros matrices que rellenan la malla fibrilar confieren características especiales a la pared, que la célula puede controlar y modificar durante el crecimiento y diferenciación.

Las paredes celulares de los dos hongos que nos ocupan pertenecen al modelo con quitina, y existe amplia bibliografía acerca de su composición y estructura químicas (12, 13, 22-25).

El análisis químico global de las paredes de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* muestra diferencias significativas que se ven claramente incrementadas después de los estudios de estructura química. Mediante solubilización química gradual de los polisacáridos seguida de análisis estructurales (cromatografía gas-líquido, CGL, y después de metilación, CGL asociada a espectrometría de masas, EM) ha sido posible describir la complejidad de las fracciones aisladas. Así la fracción F I o mucílago es muy similar en ambos micelios y corresponde esencialmente a un (1-4) glucano con bajo porcentaje de ramificaciones. La fracción F II está constituida por residuos de (1-3) glucosa y (1-3) manosa, ambos ramificados parcialmente, junto con xilosa principalmente como residuo terminal, mostrando este azúcar una mayor proporción en las paredes del micelio vegetativo, e igualmente mayor porcentaje de las ramificaciones de manosa que en el micelio agregado. La fracción F III presenta grandes diferencias en ambos tipos de micelios, mostrando en el micelio vegetativo una mayoría de residuos de (1-4) glucosa junto con (1-4) xilosa, mientras que en el agregado esta compuesta por residuos de (1-6) glucosa y menor proporción de glucosa en (1-3) y (1-3, 6) glucosa. La fracción F IV continúa enriqueciéndose en los enlaces (1-6) glucosa en el micelio agregado frente a los (1-4) glucosa en el micelio vegetativo y finalmente las fracciones F V y F VI muestran igualmente mayor proporción de residuos de (1-4) glucosa en las paredes del micelio vegetativo y de (1-6) glucosa en las del micelio agregado.

Comparando las cantidades obtenidas de cada una de las fracciones aisladas, se observa que las paredes del micelio vegetativo

presentan mayor porcentaje de las fracciones más externas I y II, mientras que en el micelio agregado dichas fracciones descienden, aumentando sin embargo las fracciones más internas IV, V y VI. Este hecho junto con la mayor proporción de quitina en las paredes de micelio agregado, y la presencia de mayores cantidades de xilosa, manosa y galactosa en las paredes del micelio vegetativo nos demuestran una naturaleza más heteropolisacarídica de estas últimas paredes. También conviene destacar el mayor porcentaje de enlaces de (1-6) glucosa en las paredes de micelio agregado con el incremento correspondiente de los enlaces de glucosa en (1-3, 6), variaciones que pueden ser necesarias para la movilización y posterior reorganización de los polisacáridos en la consiguiente diferenciación celular.

La presencia de proteína en las paredes celulares fúngicas es un hecho demostrado. En ambas clases de paredes de *A. bisporus* una cantidad significativa de proteína es solubilizada junto con los polisacáridos a lo largo del fraccionamiento a que acabamos de hacer referencia, pero sin embargo las proteínas hidrofobinas, presentes en ambos tipos de paredes (26, 27), requieren un tratamiento de solubilización especial, por lo que los perfiles electroforéticos obtenidos en cada caso dependen de las condiciones de solubilización utilizadas. De todo ello se deduce que tanto los enlaces de hidrógeno como los puentes disulfuro están presentes en la fracción proteica de estas paredes.

Las paredes celulares miceliales de *V. fungicola* requieren igualmente un fraccionamiento específico para poder estudiar su estructura química. Los componentes polisacarídicos mayoritarios son glucanos y glucogalactomananos asociados ambos en las fracciones F1 y F2S, así como también los glucanos con quitina en la fracción F 3. Estos glucanos muestran diferentes tipos de enlaces (1-3), (1-4) y (1-6) con ramificaciones en algunas unidades en posición C-6 para las dos primeras fracciones glucánicas y con un menor porcentaje de ramificaciones en posición C-2 para el glucano de la fracción F 3. Las fracciones F1b y F2Sb están constituidas por glucogalactomanano formado por un esqueleto de (1-6) manosa altamente ramificado en los puntos C-4 y con galactopiranososa y glucopiranososa como residuos terminales (25, 28).

Las proteínas también están bien representadas en las paredes celulares de *V. fungicola*, e igualmente se solubilizan parcialmente

con el proceso de fraccionamiento de los polisacáridos. Recientemente Calonje et al. (29) han demostrado la existencia de otra proteína hidrofobina en estas paredes celulares así como también en los caldos de cultivo de este organismo y, la presencia de al menos seis puentes disulfuro en su reducida masa molecular, justifica en parte sus propiedades de resistencia e insolubilidad.

La disposición de los polisacáridos dentro de las tres clases de paredes celulares estudiadas (Fig. 3) ha podido ser deducida gracias al fraccionamiento químico progresivo seguido de análisis estructural (CGL y CGL-EM), microscopía electrónica de transmisión (cortes finos y sombreados) y degradación enzimática secuencial (30).

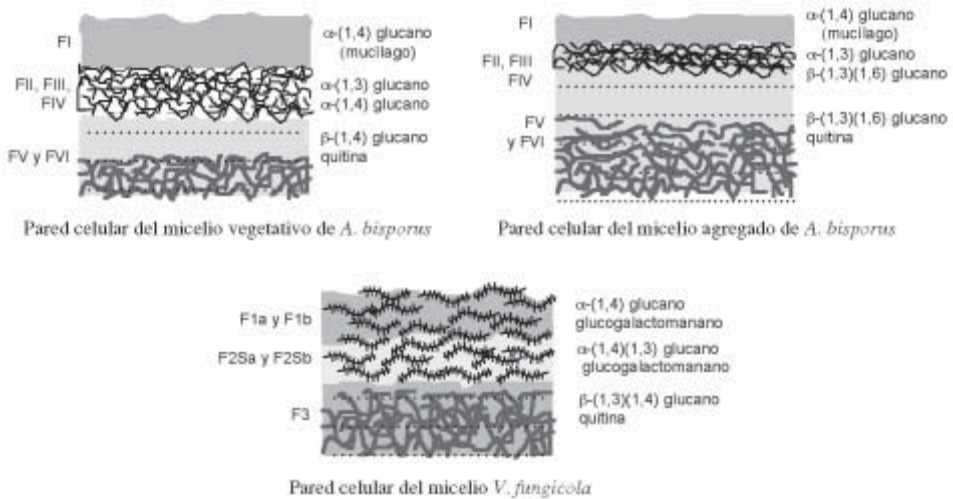


FIGURA 3. Distribución comparativa de los componentes polisacáridicos de las tres clases de paredes celulares deducida del fraccionamiento químico progresivo seguido de análisis estructural (CGL y CGL-EM), de la microscopía electrónica con cortes ultrafinos y sombreados, y de la degradación enzimática secuencial. Fuente: Refs. 30 y 40.

La importancia de la estructura química de las paredes celulares de los organismos involucrados en un fenómeno de micoparasitismo es un hecho demostrado, toda vez que dicho parasitismo parece ser un proceso complejo en el que tienen lugar sucesivos pasos en los que se encuentran claramente implicadas las citadas paredes celulares.

res (31, 32). Un primer paso de contacto por interacciones hidrofóbicas ha sido sugerido por Umar et al. (33) entre el micoparásito *Mycogone pernicioso* y el hospedador *A. bisporus*. En este sentido el hecho de que nuestros dos organismos objeto de estudio posean la proteína hidrofobina en su superficie celular corrobora dicha hipótesis, ya que las hidrofobinas han mostrado su propiedad de adhesión entre superficies hidrofílicas e hidrofóbicas (34). Así, el primer paso de adhesión inespecífica tendría lugar entre las superficies hidrofílicas del mucílago asociado a hidrofobina en ambos micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* con la superficie hidrofóbica de *V. fungicola* (29), mientras que el paso subsiguiente debería ser el reconocimiento y unión específicos entre las superficies celulares de ambos organismos involucrando interacciones entre moléculas complementarias.

RECONOCIMIENTO Y UNIÓN DEL GLUCOGALACTOMANANO DE LAS PAREDES CELULARES DE *VERTICILLIUM FUNGICOLA* CON LA LECTINA DEL MICELIO AGREGADO DE *AGARICUS BISPORUS*

La hipótesis formulada en relación con el citado paso de reconocimiento y unión específicos entre moléculas complementarias presentes en *V. fungicola* y *A. bisporus* ha podido ser demostrada recientemente (35). Experimentos preliminares de aglutinación de esporas germinadas de *V. fungicola* en presencia de extractos proteicos de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus* indicaron la presencia de alguna proteína en este último organismo con una alta actividad aglutinante hacia el organismo micopatógeno (36).

Por otra parte, experimentos previos de inmunofluorescencia microscópica (25) habían mostrado que el micelio de *V. fungicola* presentaba fuerte fluorescencia después de su reacción con anticuerpos policlonales preparados contra el glucogalactomanano de *Penicillium fumosoroseus* (37), cuya estructura química es similar a la del glucogalactomanano de *V. fungicola*, habiendo acoplado a la reacción un anticuerpo de cabra rodaminado anti-IgG de conejo para poder visualizarla. Como consecuencia de este hallazgo la incubación del glucogalactomanano de *V. fungicola* purificado (25) junto

con las hifas de micelio vegetativo o agregado de *A. bisporus*, efectuando a continuación la inmunofluorescencia indirecta, sirvió para desentrañar el proceso (36). Los resultados de estos experimentos mostraron que mientras las hifas del micelio agregado de *A. bisporus* así tratadas mostraban fluorescencia positiva, las correspondientes del micelio vegetativo permanecían sin desarrollar fluorescencia como también ocurría con los controles adicionados con suero preinmune, lo que sugería el reconocimiento y unión específicos entre el carbohidrato glucogalactomanano de *V. fungicola* y una proteína de las hifas del micelio agregado de *A. bisporus*, posiblemente una interacción del tipo carbohidrato-lectina, proteína sin embargo ausente en el micelio vegetativo del hospedador donde no se produce el citado reconocimiento y unión (36).

Los estudios subsiguientes se enfocaron hacia el aislamiento, purificación y caracterización de una proteína lectina de *A. bisporus* que corroborara nuestros resultados de aglutinación e inmunofluorescencia indirecta precedentes. Como resultado de los mismos y después de su caracterización mediante hemaglutinación se pudo demostrar la presencia de una glicoproteína lectina en el micelio agregado del hospedador (35), lectina que no se expresa en el correspondiente micelio vegetativo, y que muestra una alta afinidad hacia el glucogalactomanano de las paredes celulares de *V. fungicola*, con lo que quedan confirmados todos los pasos del proceso que se habían supuesto previamente (Fig. 4).

DEGRADACIÓN DE LAS PAREDES CELULARES DEL MICELIO AGREGADO DE *AGARICUS BISPORUS* POR LAS ENZIMAS LÍTICAS DE *VERTICILLIUM FUNGICOLA*

Los hongos patógenos penetran en las células de los tejidos de sus correspondientes hospedadores para poder establecer la infección. En muchos casos la penetración tiene lugar a través de orificios naturales, heridas, o mediante la formación de estructuras especializadas junto con fuerzas mecánicas, seguidas de degradación enzimática, etc., o la combinación de varias de estas posibilidades, dando lugar a la colonización de las células del hospedador por el patógeno.

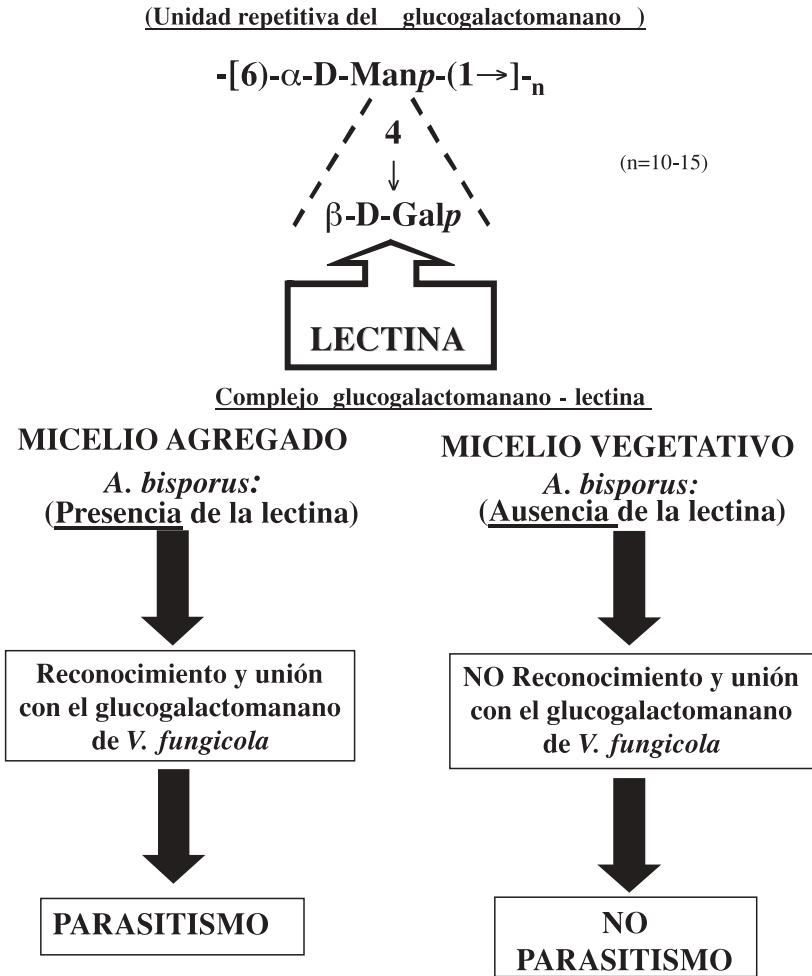


FIGURA 4. Esquema resumen del diferente comportamiento de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* frente al micoparasitismo de *V. fungicola*.

Los primeros estudios realizados sobre el parasitismo de *V. fungicola* sobre los carpóforos de *A. bisporus* mostraron el desarrollo de una digestión enzimática localizada que finalmente conducía a la necrosis de tales cuerpos fructíferos (7-9). Seguidamente Dragt et al. (4) pusieron de manifiesto la presencia en el parásito de ciertas estructuras del tipo de apresorios, sugiriendo un efecto combinado de degradación enzimática junto con presión mecánica. Finalmen-

te Calonje et al. (5) describieron que las enzimas secretadas *in vivo* por *V. fungicola* creciendo sobre paredes celulares aisladas del micelio agregado de *A. bisporus* podrían servir como indicadores de las enzimas que el patógeno produce durante su parasitismo, identificando en tales caldos metabólicos endopolisacaridasas como α -(1-3)-, α -(1-4)-, β -(1-3)-, β -(1-4)-, β -(1-6)-glucanasas, β -(1-4)-xilanasas y quitinasas, disacaridasas como quitobiosidasas, exopolisacaridasas como α -D- y β -D-glucosidasas, β -D-xilosidasas, β -D-manosidasas y N-acetil- β -D-glucosaminidasas, junto con proteasas. Algunas de estas enzimas que son claves en la lisis de las paredes celulares de los hongos superiores son también producidas por otros microorganismos descritos como parásitos fúngicos (38, 39).

La digestión *in vitro* de las paredes celulares aisladas del micelio agregado de *A. bisporus* con las enzimas producidas por *V. fungicola* estudiada mediante microscopía electrónica ha mostrado que tal degradación no ocurre simultáneamente y con la misma intensidad en la capa externa que en la interna de dichas paredes celulares (5), aunque al final del proceso aparezcan zonas completamente lisadas, lo que permite que el micopatógeno *in vivo* se pueda encontrar tanto inter- como intracelularmente de las hifas de los carpóforos.

Experimentos semejantes realizados con las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* han puesto de manifiesto que, aunque *in vitro* se consiga una degradación enzimática de tales paredes celulares aisladas con los enzimas producidos por *V. fungicola*, *in vivo* únicamente se produce un contacto aparente entre el micoparásito y el hospedador (11) gracias a las interacciones hidrofóbicas descritas, sin llegar a producirse la consiguiente degradación enzimática, por lo que este micelio no desarrolla la infección. Estos resultados corroboran la ausencia de la glicoproteína lectina en el micelio vegetativo de *A. bisporus* y por tanto la falta de reconocimiento y unión con el glucogalactomanano de *V. fungicola* en esta clase de micelio, lo que nos confirma una vez más la existencia de los pasos previos a la digestión enzimática necesarios para el desarrollo de la verticiliosis.

CONSIDERACIONES FINALES

Una vez desentrañados, a nivel bioquímico, los mecanismos celulares y moleculares necesarios entre el micoparásito y el hospedador para que se manifieste la verticiliosis o «mole seca» del champiñón, *a*) la adhesión inespecífica, *b*) el reconocimiento y unión específicos, y finalmente *c*) la digestión enzimática de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus* mediante las enzimas hidrolíticas de *V. fungicola*, se hace necesaria la aproximación experimental genética. La posible transformación genética de *A. bisporus* en su glicoproteína lectina con la construcción de cepas «no adherentes» a *V. fungicola*, supondría una vía alternativa de erradicación de la verticiliosis, sin el uso rutinario de fungicidas, cuya utilización continuada está produciendo microorganismos resistentes indeseados (1). La contribución científica propuesta repercutiría además en una mejora de la nutrición y consecuentemente de la salud humana.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos experimentales actuales de la autora de esta revisión y que forman parte de la misma han sido financiados por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, AGL 2001-1885) así como por la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (188/CH-51).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GEA, F. J.; TELLO, J. C.; HONRUBIA, M. (1996) *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia* 136: 133-137.
- (2) NORTH, L. H.; WUEST, P. (1993) The infection process and symptom of Verticillium disease of *Agaricus bisporus*. *Can. J. Plant Pathol.* 15: 74-80.
- (3) GEA ALEGRÍA, F. J. (1995) Micosis del cultivo del champiñón (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) en Castilla-La Mancha. Estudio de la verticiliosis (agente causal: *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk). Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, pp. 206-208.
- (4) DRAGT, J. W.; GELLS, F. P.; DE BRUIJN, C.; 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.

- (5) 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.
- (6) BERNARDO LÓPEZ, M. D. (2003) Bases celulares y moleculares de la verticiliosis (producida por *Verticillium fungicola*) de los cultivos industriales de champiñón (*Agaricus bisporus*) y efecto del fungicida Prochloraz-Mn. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, pp. 135.
- (7) 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.
- (8) THAPA, C. D.; JANDAİK, C. L. (1987) Physicochemical changes in *Agaricus bisporus* (Lange) Singer due to infection of *Verticillium fungicola* (Preuss) Hasseber. *Dev. Crop Science* 10: 411-417.
- (9) TRIGIANO, R. N.; FERGUS, C. L. (1979) Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. *Mycologia* 71: 908-917.
- (10) MANOCHA, M. S.; CHEN, Y.; RAO, N. (1990) Involvement of cell surface sugars in recognition, attachment, and appressorium formation by a mycoparasite. *Can. J. Microbiol.* 36: 771-778.
- (11) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; PÉREZ CABO, A.; BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M. (2000) Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 104: 988-992.
- (12) GARCÍA MENDOZA, C.; AVELLÁN, M. A.; SÁNCHEZ, E.; NOVAES-LEDIEU, M. (1987) Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia. *Arch. Microbiol.* 148: 68-71.
- (13) 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.
- (14) ROSEMBERGER, R. E. (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.
- (15) WESSELS, J. G. H.; SIETSMA, J. H. (1981) Fungal cell walls. En: *Plant Carbohydrates II. Extracellular Carbohydrates*, W. Tanner y F. A. Loewus (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y., pp. 352-394.
- (16) BARTNICKI-GARCÍA, S.; LIPPMAN, E. (1982) Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. En: *Handbook of Microbiology*, Vol. IV, A. I. Laskin y H. Lechevalier (eds.), CRC, pp. 229-252.
- (17) RUPÉREZ, P.; LEAL, J. A. (1987) Mannoglucogalactans from the cell walls of *Penicillium erythromellis*: isolation and partial characterization. *Carbohydr. Res.* 167: 269-278.
- (18) PRIETO, A.; RUPÉREZ, P.; HERNÁNDEZ BARRANCO, A.; LEAL, J. A. (1988) Partial characterization of galactofuranose-containing heteropolysaccharides from the cell walls of *Talaromyces helicus*. *Carbohydr. Res.* 177: 268-272.
- (19) GÓMEZ MIRANDA, B.; PRIETO, A.; LEAL, J. A. (1990) Chemical composition and characterization of a galactomannoglucan from *Gliocladium viride* wall material. *FEMS Microbiology Lett.* 70: 331-336.

- (20) HUNSLEY, D.; BURNETT, J. H. (1970) The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* 62: 203-218.
- (21) BURNETT, J. H. (1979) Aspects of the structure and growth of hyphal walls. En: *Fungal Walls and Hyphal Growth*. J. H. Burnett y A. P. J. Trinci (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-25.
- (22) MICHALENKO, G. O.; HOHL, H. R.; RAST, D. (1976) Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 92: 251-262.
- (23) GARCÍA MENDOZA, C.; SÁNCHEZ, E.; NOVAES-LEDIEU, M. (1987) Differences in microfibrils in the walls of *Agaricus bisporus* secondary mycelium. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 161-165.
- (24) 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.
- (25) CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M.; BERNARDO, D.; AHRAZEM, O.; GARCÍA MENDOZA, C. (2000) Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* 46: 101-109.
- (26) LUGONES, L. G.; BOSSCHER, J. S.; SCHOLTMAYER, K.; DE VRIES, O. M. H.; WESSELS, J. G. H. (1996) An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* 142: 1321-1329.
- (27) LUGONES, L. G.; WÖSTEN, H. A. B.; 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.
- (28) DOMENECH, J.; PRIETO, A.; GÓMEZ MIRANDA, B.; LEAL, J. A.; AHRAZEM, O.; JIMÉNEZ BARBERO, J.; BERNABÉ, M. (2002) Structure of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of three strains of *Verticillium fungicola*. *Carbohydr. Polymers* 50: 209-212.
- (29) CALONJE, M.; BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M.; GARCÍA MENDOZA, C. (2002) Properties of a hydrophobin isolated from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can. J. Microbiol.* 48: 1030-1034.
- (30) CALONJE MACAYA, M. (1998) Mecanismo de acción del micoparásito *Verticillium fungicola* en la infección al Basidiomiceto *Agaricus bisporus*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, pp. 137-139.
- (31) CHET, I. (1987) *Trichoderma*- applications, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En: *Innovative approaches to plant diseases*. I. Chet (ed.), John Wiley and Sons, New York, pp. 137-160.
- (32) MANOCHA, M. S.; CHEN, Y. (1990) Specificity of attachment of fungal parasites to their hosts. *Can. J. Microbiol.* 36: 69-76.
- (33) UMAR, M. H.; GEELS, F. P.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (2000) Pathology and pathogenesis of *Mycogone perniciosa* infection of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.* 15: 561-567.
- (34) WÖSTEN, H. A. B.; SCHUREN, F. H. J.; WESSELS, J. G. H. (1994) Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipatic membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* 13: 5848-5854.
- (35) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M.; GARCÍA MENDOZA, C. (2004) *Verticillium* disease or «dry bubble» of the cultivated mushrooms: the *Agari-*

- cus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* glucogalactomannan. *Can. J. Microbiol.* 50: 729-735.
- (36) GARCÍA MENDOZA, C.; BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. (2003) Mechanisms involved in the *Verticillium fungicola* mycoparasitism on *Agaricus bisporus* fruit bodies: *Verticillium* disease or «dry bubble» of cultivated mushrooms. En: Recent Research Developments in Microbiology, Vol. 7, Part I. S. G. Pandalai (ed.), Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 269-278.
- (37) DOMENECH, J.; BARASOAIN, I.; PRIETO, A.; GÓMEZ MIRANDA, B.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. (1996) An antigenic water soluble glucogalactomannan extracted from cell walls of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces farinosus*. *Microbiology* 142: 3497-3503.
- (38) ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28: 719-725.
- (39) ELAD, Y.; LIFSHITZ, R.; BAKER, R. (1985) Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 27: 131-148.
- (40) 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.