

ULTRAESTRUCTURA DE LAS PAREDES CELULARES DE BASIDIOCARPOS DE *Agaricus bisporus* (CHAMPIÑÓN COMÚN).

Concepción García Mendoza, Juan I. Corujo¹, Eloy Blanco y Monique Novaes-Ledieu.
Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Velázquez 144, 28006 Madrid, España.

RESUMEN.

Preparaciones purificadas de paredes celulares de basidiocarpos de *Agaricus bisporus* fueron estudiadas mediante microscopía óptica (contraste de fases) y electrónica (técnicas de cortes finos y sombreado). Gracias a la solubilización gradual de los componentes sacarídicos de dichas paredes ha sido posible la ubicación de los mismos dentro de estas estructuras celulares. Así, se ha podido comprobar que la capa externa corresponde al polisacárido mucílago diferente de una zona fibrosa de α glucano, debajo de la cual se sitúa la capa interna fibrilar de quitina, ambas cementadas por β glucanos y a las que se asocian las proteínas.

INTRODUCCIÓN.

Los hongos son organismos eucarióticos cuyas células contienen su material genético encerrado en núcleos separados del citoplasma por una membrana, distinta de la plasmática que recubre a la célula entera. Esta pared celular tiene dos funciones principales: proteger al protoplasto y suministrar la forma característica a la célula.

La pared celular está constituida por dos tipos de componentes: los estructurales o fibrilares y los componentes amorfos. Los primeros son los responsables de la forma y rigidez de la pared y están constituidos mayoritariamente por glucanos y quitina. Glucanos del tipo α y β han sido encontrados en las paredes celulares de varios grupos de hongos junto con quitina, esta última en forma de microfibrillas. Los componentes amorfos (lípidos, proteínas y diferentes tipos de polisacáridos) constituyen el material cementante que permite la organización de la pared celular y que proporcionan mayor resistencia a la célula.

Una determinada clase de hongos, los basidiomicetos superiores, producen en el momento de su reproducción sexual un tipo de estructura aparente o basidiocarpo, de textura generalmente carnosa y que posee un olor y un sabor muy característicos.

El consumo de setas, nombre vulgar dado a los basidiocarpos, está asentado en todas las latitudes y su valor alimenticio es mundialmente reconocido. En el género *Agaricus* encontramos la mayor parte de las especies comestibles. En Europa la explotación comercial está casi completamente dedicada al *Agaricus bisporus* (champiñón común), lo que le da una gran importancia económica.

El *A. bisporus* tiene además la característica de formar basidios con sólo dos esporas, cada una de ellas con dos núcleos complementarios. Por lo tanto, cada una de estas esporas puede desarrollar directamente un micelio secundario fértil, capaz por sí mismo de producir setas, pero el hecho de no disponer de esporas haploides que desarrollen micelios monocarióticos impide en principio efectuar hibridaciones con el fin de conseguir cepas nuevas con características combinadas.

¹Investigador adjunto, Centro de Investigación, Universidad La Salle



El interés del estudio de la composición y estructura de la pared celular de *A. bisporus* por la razón recién apuntada de ser un modelo de basidiomiceto excepcional en cuanto a su ciclo biológico, estriba en la posibilidad de obtener protoplastos con los cuales ya se pueden separar los micelos homocarióticos y por tanto, proceder a la mejora genética de las cepas comerciales. Paralelamente, el conocimiento de la arquitectura molecular detallada de la pared celular de cada cepa comercial suministrará una información muy precisa de cada una, lo que dará lugar a la confección de una ficha de identidad y la futura protección legal de las cepas comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Obtención y purificación de paredes celulares.

Para este trabajo de investigación hemos utilizado esporocarpos jóvenes de *Agaricus bisporus*, habiendo eliminado previamente las lamelas.

El micelio terciario que compone el carpóforo disgregado mediante una batidora "Braun" se sometió a una ruptura mecánica en un Omnimixer "Sorval" modelo 17220, método que preserva casi totalmente la fracción sacarídica superficial denominada mucilago (1) realizando todo el proceso en frío. Cuando la ruptura es total, las paredes obtenidas se purificaron mediante lavados con NaCl al 1% para eliminar los ácidos nucleicos que podrían contaminar dichas paredes y seguidamente se sometieron a varios lavados en agua destilada.

Se comprobó la limpieza de las paredes mediante su observación al microscopio de contraste de fases. Las paredes celulares purificadas fueron desecadas en un liofilizador para posteriores análisis.

Fraccionamiento de la pared celular.

Los diferentes componentes sacarídicos de las paredes celulares purificadas se solubilizaron de forma progresiva con el objeto de ubicar los mismos dentro de la estructura de la pared, por lo cual se siguió el esquema que se describe en la Figura No.1 (2,3).

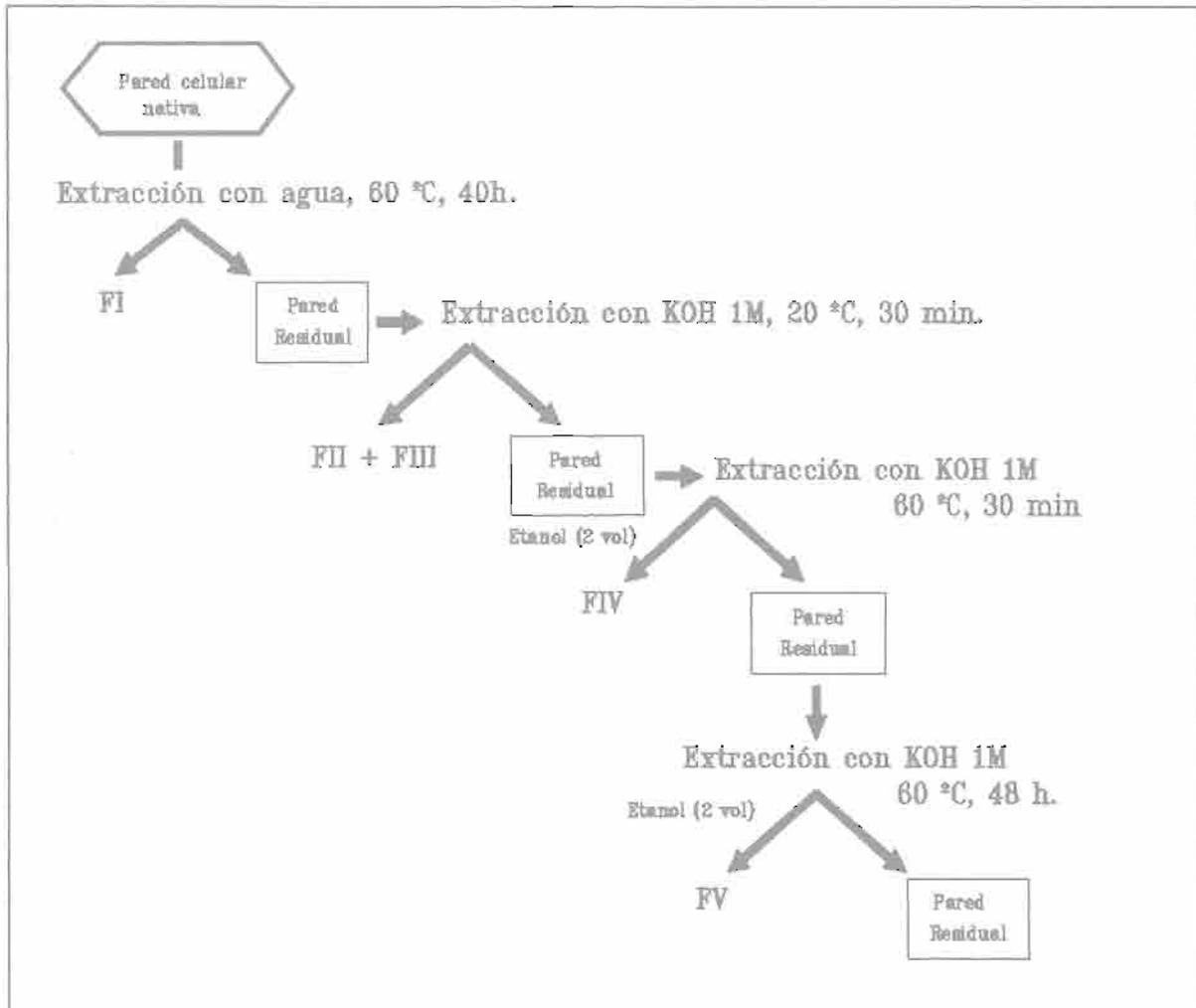
Microscopía electrónica.

Las paredes celulares sin tratar, así como las paredes residuales se observaron en el microscopio electrónico mediante las técnicas de cortes ultrafinos y de sombreado.

En el primer caso, las muestras se fijan y tñen con permanganato potásico al 2% durante 2.5 h. Seguidamente se lavan y se someten a deshidratación con acetonas de concentraciones crecientes, utilizando como contraste una solución de acetato de uranilo en acetona. Posteriormente se incluyen las muestras deshidratadas en una resina epoxi Araldita y se cortan en un microtomo Reichert Ultracut-E mediante cuchilla de vidrio. Por último, los cortes obtenidos se tñen con citrato de plomo y se observan en el microscopio electrónico.

En el segundo caso, se coloca una suspensión homogénea de las muestras sobre unas rejillas cubiertas con una película de soporte y vaporizadas con carbón. Evaporada el agua de éstas, se introducen las rejillas en el vaporizador, donde en condiciones de alto vacío se hace pasar una corriente eléctrica con la que se desprenden de un filamento incandescente de la aleación Au-Pd partículas finísimas que caen sobre la muestra con un determinado ángulo, consiguiendo un sombreado perfecto.

Figura No.1
Fraccionamiento de pared celular



FI: β -glucano mucilaginoso
 FII: α -glucano estructural
 FIII, FIV, FV: β -glucanos cementantes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

La Figura No.2 muestra una panorámica de la preparación de paredes celulares de basidiocarpos de *A. bisporus* en el microscopio de contraste de fases.

Los cortes finos realizados en las preparaciones previamente fijadas con permanganato potásico de las paredes celulares totales y de las sucesivas paredes residuales después de las extracciones descritas anteriormente se muestran en la Figura No.3.



Figura No.2
Preparación de paredes celulares de basidiocarpos de *A. bisporus* en el microscopio de contraste de fases (x 1,600).



Las paredes celulares totales (Figura No. 3a) muestran aparentemente tres regiones diferentes: una zona externa a veces algo discontinua y más densa al flujo de electrones; una capa interna igualmente densa separada por una región intermedia menos densa a dicho flujo. Las dimensiones de estas regiones pueden variar entre las distintas hifas, pero el grosor medio de la pared se encuentra entre 80-100 nm. La superficie externa es discontinua y corresponde al mucílago, polisacárido lábil poco ligado a dicha superficie (1).

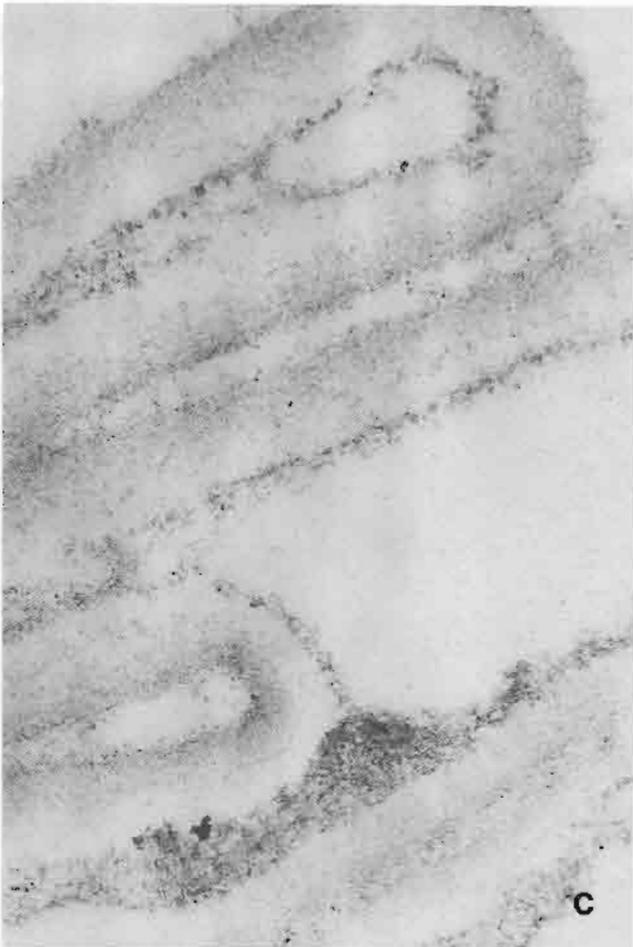
El tratamiento de las paredes celulares con agua destilada a 60 °C durante 40 h solubiliza el polisacárido mucílago (2). Cortes finos de estas preparaciones muestran cómo desaparece prácticamente toda la capa externa densa a los electrones (Figura No. 3b).

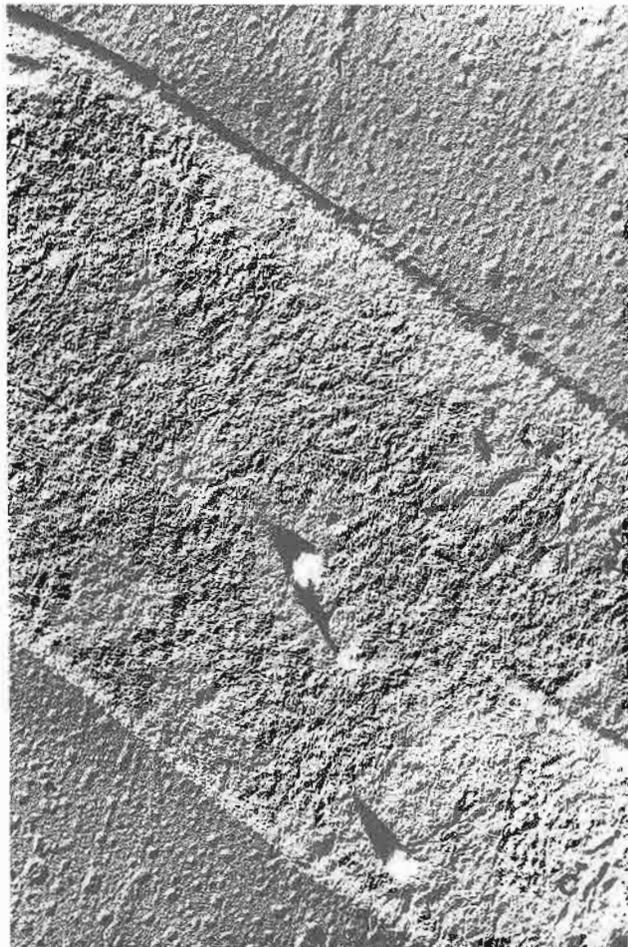
Cuando las paredes celulares pretratadas se extraen con KOH 1N a 20°C durante 30 min y a continuación a 60°C igualmente por 30 min, se van produciendo variaciones en el grosor y apariencia de dichas paredes celulares (Figura No. 3c), de tal forma que se han extraído progresivamente α y β glucanos ubicados desde la parte externa hacia la zona media de la pared celular (3).

El tratamiento final de las paredes residuales con KOH 1N a 60°C durante 48 h solubiliza la mayor parte del β glucano cementante (Figura No. 3d), dejando un residuo final de pared compuesto por quitina y un remanente de β glucano insoluble (2).

Las mismas preparaciones descritas observadas mediante la técnica de sombreado se muestran en la Figura No. 4. Las paredes celulares completas exhiben una superficie granulosa que corresponde al mucílago (Figura No. 4a) en la que en algunas preparaciones se vislumbran unas fibras subyacentes que corresponden al α glucano (4). Cuando se elimina esta capa de fibras grandes, en general orientadas a lo largo de la hifa (Figura No. 4b), se observa la aparición de fibrillas de menor tamaño orientadas al azar, entrelazadas y con tendencia transversal que corresponden a la quitina cementada con mayor o menor porcentaje de β glucano (Figuras No. 4c-d).

Figura No.3. Cortes finos de las paredes celulares completas y sucesivas paredes residuales de *A. bisporus* (a x 30,000; b x 40,000; c x 50,000; d x 40,000)





La ultraestructura general de las paredes celulares de basidiocarpos de *A. bisporus* que acabamos de describir se corresponde en gran manera con la de otros basidiomicetos estudiados (5,6,7) y corrobora las observaciones de Mol et al (8) realizadas en paredes de estípite de *A. bisporus*, así como las de micelio vegetativo del mismo organismo (4,9).

Esta particular arquitectura de las paredes celulares de basidiomicetos superiores comprendiendo una serie de capas más o menos definidas de mucilago externo, seguida de α glucano y β glucanos y quitina (incluyendo entre ellas las proteínas) se corresponde de alguna forma con las bandas detectadas en los cortes teñidos con $KMnO_4$ y se comprueba gracias a las preparaciones de paredes totales y sus diferentes paredes residuales mediante la técnica de sombreado.

La diferente orientación de las fibras y su interacción con el material cementante confiere a la pared celular un amplio margen de propiedades mecánicas y plásticas necesarias para su diferenciación y morfogénesis a lo largo del complejo ciclo biológico de *A. bisporus*.

CONCLUSIONES.

La ultraestructura de las paredes celulares de basidiocarpos de *Agaricus bisporus* que acabamos de describir se organiza de forma prácticamente semejante a la de otros basidiomicetos superiores estudiados; es decir, en una sucesión de capas de polisacáridos fibrilares y cementantes que le confieren propiedades específicas.

La particular ultraestructura de los componentes polisacáridicos, junto con la estructura química de cada uno de ellos, permitirá la confección de una ficha de identidad de las distintas cepas comerciales, base documental para su posterior protección legal.

REFERENCIAS.

1. Avellan, M.A., García Mendoza, C. y 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.
2. García Mendoza, C., Avellan, M.A., Sánchez, E. y Novaes-Ledieu, M. (1987). "Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia". Arch. Microbiol. 148: 68-71.
3. Novaes-Ledieu, M., Martínez Cobo, J.A. y García Mendoza, C. (1987). "The structure of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*". Microbiología SEM. 3: 13-23.
4. García Mendoza, C., Sánchez, E. y Novaes-Ledieu, M. (1987). "Differences in microfibrils in the walls of *Agaricus bisporus* secondary mycelium". FEMS Microbiol. Lett. 44: 161-165.
5. Carbonell, L.M., Kanetsuna, F. y Gil, F. (1970). "Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*". J. Bacteriol. 101: 636-642.
6. Hunsley, D. y Burnett, J.H. (1970). "The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi". J. Gen. Microbiol. 62: 203-218.

Figura No.4. Sombreados de las paredes celulares completas y sucesivas paredes residuales de *A. bisporus* (a x 12,000; b x 16,000; c x 12,000; d x 16,000).



7. Kamada, T., Hamada, Y., y Takemaru, T. (1982). "Autolysis *in vitro* of the stipe cell in *Coprinus macrorhizus*". J. Gen. Microbiol. 128: 1041-1046.
8. Mol, P.C., Vermeulen, C.A. y 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.
9. Michalenko, G.O., Hohl, H.R. y Rast, D. (1976). "Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*". J. Gen. Microbiol. 92: 251-262.