

ANORMALIDADES DE LOS CUERPOS FRUCTIFEROS DE *Schizophyllum commune* Fr. EN MEDIOS CON METILXANTINAS

Celia Dubovoy † y
Alfredo Muños *

INTRODUCCION

Los factores genéticos son los más importantes para la presencia de la fructificación en *Schizophyllum commune* (Raper y Krongelb, 1958). Uno de los requerimientos más importantes para la fructificación es el entrecruzamiento de cepas sexuales compatibles y el establecimiento de un micelio dicariótico.

Los cuerpos fructíferos, se inician como pequeñas masas de hifas indiferenciadas, en las que se realiza una especialización anatómica de las hifas para formar pseudotejidos y otros cambios que finalmente conducen al desarrollo de una estructura multicelular en forma de abánico. En la superficie inferior de esta estructura, se forman normalmente láminas radiales bifurcadas que llevan los basidios, en los cuales ocurre la cariogamia y la meiosis, produciéndose finalmente esporas haploides. Los eventos morfológicos que conducen a la formación de cuerpos fructíferos en *S. commune* han sido divididos por Leonard y Dick (1968) en cinco estadios:

1. Se forman masas de células agregadas que no poseen una forma regular definida.

2. Las masas agregadas de células se hacen regulares subesféricas o cilíndricas, pero aún no se ve el punto de apertura apical.

3. Igual que el anterior, pero con un poro de apertura apical, las láminas aún no son visibles.

4. Las láminas empiezan a hacerse visibles.

5. Se desarrolla la expansión de la superficie laminar. La esporulación puede iniciarse en estadios tempranos de desarrollo como el 3.

† Recién fallecida.

* Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.

Aunque se ha visto que los factores genéticos son primordiales en la presencia o ausencia de la fructificación, se ha observado que algunos factores ambientales influyen fuertemente en ésta (Raper y Krongelb, 1958; Niederpruem, 1963).

Entre la gran variedad de efectos que se atribuyen al AMPC (Adenosin-3'-5' Monofosfato Cíclico), se encuentra la inducción de cuerpos fructíferos monocarióticos de *Coprinus macrorhizus* (Uno e Ishikawa, 1971).

En el presente estudio, indicamos el efecto de la cafeína y de la teofilina (dos inhibidores de la fosfodiesterasa) en el desarrollo normal de la fructificación en *S. commune*.

MATERIALES Y METODOS

Se hicieron varios entrecruzamientos en medio mínimo (que está compuesto de 20 gr. de glucosa, 2 gr. de asparagina, 0.5 gr. de $MgSO_4$, 0.46 gr. de KH_2PO_4 , 1.0 gr. de K_2HPO_4 , 120 mg tiamina y 20 gr. de Agar en 1 lt. de H_2O destilada) + 1 mg/ml cafeína y medio mínimo + 1 mg/ml de teofilina. Para el efecto, se utilizaron varios homocariones compatibles, algunos procedentes de la colección que se encuentra en Harvard y otros de la colección de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los entrecruzamientos de las cepas, en cafeína, fueron los siguientes:*

1-42 × 2-2	1-41 × 1-86	1-42 × 1-86
1-42 × 1-60	1-86 × 2-3	2-2 × 2-3
1-41 × 1-42	1-60 × 2-2	118 × 1-42
		118 × 1-60

En medio con teofilina, se hicieron además los entrecruzamientos siguientes:

1-60 × 3-2
1-60 × 1-86

Los entrecruzamientos fueron incubados a 30°C por tres días, después de los cuales, se les colocó a la luz a temperatura ambiente. Se comprobó que todos los micelios obtenidos fueran dicarióticos por medio del fenómeno hemicompatible de Buller y se esperó a que los micelios fructificaran, anotando el tipo de fructificación final, al mes de iniciada ésta.

Dado que se observó que la cafeína producía grandes anomalías en el desarrollo de los cuerpos fructíferos, particularmente cuerpos fructíferos en forma cilíndrica que no abrían ni esporulaban, se intentó obtener por medio de radiación ultravioleta a diferentes dosis, la apertura de los cuerpos fructíferos, considerando que éstos serían resistentes a la cafeína. La irradiación

* Los números de las cepas corresponden a los registros de las mismas en la Universidad de Harvard y en la Universidad Nacional Autónoma de México.

se hizo directa sobre las cajas con micelio en medio de cafeína. Se irradió una caja con 500 ergios, 2 con 1000, una con 2500 y 3 con 3000 ergios.

RESULTADOS Y DISCUSION

En general, el patrón morfogenético de formación de cuerpos fructíferos fue muy anormal en medio con cafeína. En medio con teofilina, los cuerpos fructíferos fueron más grandes que los normales, pero con desarrollo y expansión laminar así como la esporulación normal.

En medio con teofilina, todas las cepas se comportaron en la misma forma, pero en medio con cafeína los resultados variaron según las cepas incluidas en el entrecruzamiento, con una tendencia de la mayoría de los cuerpos fructíferos a cesar el desarrollo en el estadio 2, o sea, formándose cuerpos fructíferos diferenciados, cilíndricos, sin poro apical.

En cafeína, algunos cuerpos fructíferos abrían pero carecían de láminas o bien tenían láminas parciales. Por lo tanto algunos de los cuerpos fructíferos tratados con esta sustancia tenían una similitud muy grande a los cuerpos fructíferos llamados "bug's ear", que son mutaciones dominantes (Raper y Krongelb, 1958). Se decidió entrecruzar un homocarión que llevaba la mutación "bug's ear" con otro en cafeína con la esperanza de que si los cuerpos fructíferos obtenidos en cafeína eran "bug's ear" se obtuvieran puros cuerpos fructíferos sin láminas. Esto no sucedió y lo que se formó fue una capa himenial sobre una masa dura de hifas fuertemente entrelazadas.

Lo importante de los cuerpos fructíferos sin láminas que se formaron en medio con cafeína, fue que todos esporularon y la cosecha de esporas estudiada en medio sin cafeína, dio una relación 1:1 de cuerpos fructíferos normales contra cuerpos fructíferos sin láminas. Lo cual indica que la cafeína en este caso había producido una mutación nuclear.

Los cuerpos fructíferos que llegaron al estado 2 de desarrollo fueron transferidos a un medio completo (que consta de 20 gr. de glucosa, 2 gr. de peptonina, 2 gr. de extracto de levadura, 0.5 gr. de $MgSO_4$, 0.46 gr. de KH_2PO_4 , 1.0 gr. de K_2HPO_4 y 20 gr. de Agar en 1 lt. de H_2O destilada) sin cafeína y desarrollaron un micelio dicariótico con cuerpos fructíferos totalmente normales, indicando que en este caso, la actividad de la cafeína fue transitoria por lo que al evitar esta sustancia bloqueadora, el desarrollo sigue su normalidad. También esto nos indica que aún en el estadio 2 de fructificación no hay completa diferenciación.

Como un tercer tipo de tendencia a cierta organización, fueron encontradas masas de hifas compactas, que semejaban tumoraciones formadas por hifas paralelas compactas. Estas masas son muy similares a las encontradas por Leonard (1975); sin embargo, difieren en características fundamentales. Leonard denomina a estas masas "mound" y encuentra que son persistentes y heredables como un carácter recesivo. Las masas que nosotros encontramos no son heredables y al ser transferidas a medio completo sin cafeína, originan fructificaciones normales, indicando que dichas masas están en un estadio muy indife-

renciado. Sin embargo, lo que llama la atención es que realmente estas masas semejan grandes tumoraciones fúngicas que perturban transitoriamente el desarrollo normal. Las bases de este cambio reversible, tienen implicaciones en los problemas de crecimiento anormal. Esto, aunque en apariencia muy simple, reviste gran importancia en el estudio del cáncer. Mac Manus y Whitfield (1969, 1970) sugieren que los niveles excesivos de AMPC son un posible factor que origina el crecimiento maligno de las células.

En los entrecruzamientos $1-41 \times 1-86$ y $1-86 \times 2-3$ en medio con cafeína, se obtuvieron cuerpos fructíferos diversos: unos abiertos normales con bordes engrosado hacia adentro; otros en estadio 2 pero estipitados. Las esporas de los cuerpos fructíferos normales, al ser analizadas genéticamente, nos indicaron la presencia de un gene recesivo para resistencia a cafeína, presentándose una segregación con 1:1 ó cercana, de cuerpos fructíferos abiertos en relación a cuerpos fructíferos cerrados.

Por otro lado, se irradiaron todas las cepas con cuerpos fructíferos en estadio 2 de desarrollo y las masas compactas de hifas obtenidas en el medio con cafeína, con el objeto de ver si se obtenía la apertura de los cuerpos fructíferos, o bien, un desarrollo de las masas de hifas, lo cual indicaría cepas cafeína resistentes. No se obtuvieron cuerpos fructíferos resistentes, pero las masas tumorales de micelio se intensificaron particularmente en altas dosis.

En medio con teofilina, se presentaron cuerpos fructíferos grandes, con láminas algo más divididas que lo normal en todos los casos. Las diferencias obtenidas con cafeína y teofilina (teóricamente inhibidores de la fosfodiesterasa), nos condujeron a utilizar en el medio AMPC (que fue utilizado como sal sódica) en dosis de 10^{-3} M, en lugar de las metilxantinas. Entonces, se observaron resultados similares a los obtenidos con cafeína, lo que indica que las alteraciones observadas son debidas al aumento de AMPC, con consiguiente alteración en síntesis de proteínas y RNA (Putrament *et al.* 1972). La poca acción de la teofilina puede indicar menor especificidad para la fosfodiesterasa y que se necesiten concentraciones mayores para obtener un efecto similar al de la cafeína, lo cual no se probó.

Se conocen muy poco los mecanismos que regulan el desarrollo en los hongos superiores, pero nuestros resultados muestran que algunos de los elementos controladores son similares a los encontrados en otros organismos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean hacer patente su agradecimiento al Dr. Teófilo Herrera por la revisión y acertada crítica al presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- Leonard, T. 1975. An inherited 'neoplasm' in a fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 4626-4630.
- Leonard, T. y S. Dick, 1968. Chemical induction of haploid fruiting in *Schizophyllum commune*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 59: 745-751.

- Mac Manus, J. y J. Whitfield, 1969. Stimulation of DNA synthesis and mitotic activity of thymic lymphocytes by cyclic adenosine 3,5-monophosphate. *Exptl. Cell. Res.* 58: 188-191.
- Mac Manus, J. y J. Whitfield, 1970. Inhibition by thyrocalcitonin of the mitogen actions of parathyroid hormone and cyclic adenosine 3, 5 -- monophosphate on rat thymocytes. *Endocrinology* 86: 934-939.
- Niederpruem, D., 1963. Role of carbon dioxide in the control of fruiting of *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* 85: 1300-1308.
- Putrament, A., H. Barannowska, T. Bilinski y W. Prazmo, 1972. On the specificity of caffeine effects. Inhibition by caffeine of RNA and protein synthesis in yeast and *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet.* 118: 373-379.
- Raper, J. y G. Kröngelb, 1958. Genetic and environmental aspects of fruiting in *Schizophyllum commune* Fr. *Mycologia* 50: 707-740.
- Uno, I. y T. Ishikawa, 1971. Chemical and genetical control of induction of monokaryotic fruiting bodies in *Coprinus macrorhizus*. *Molec. Gen. Genet.* 113: 228-239.

SUMMARY

The action of methylxantines (caffeine and theopylline) produces anomalies and malformations in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* Fr. during their development. One type of the changes obtained was inheritable and codified by the nucleus. Some other transitory changes were found.

RESUMEN

La actividad de las metilxantinas (cafeína y teofilina) provoca anomalías y malformaciones en los cuerpos fructíferos de *Schizophyllum communes* Fr., durante su desarrollo. Uno de los cambios que se encontraron fue de carácter heredable codificado por el núcleo. Además se encontraron otros cambios producidos por las metilxantinas, que fueron transitorios.