



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**SOBREVIVENCIA DE MICELIO Y GENES ASOCIADOS A LA  
GERMINACIÓN NO ERRUMPENTE DE *Sclerotium cepivorum* BERK.**

**YOLANDA RODRÍGUEZ PAGAZA**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MEXICO

2009

La presente tesis, titulada: **Sobrevivencia de micelio y genes asociados a la germinación no errumpente de *Sclerotium cepivorum* Berk.**, realizada por la alumna: **Yolanda Rodríguez Pagaza**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: \_\_\_\_\_  
DRA. REYNA I. ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DRA. EMMA ZAVALETA MEJÍA

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. LORENZO GUEVARA OLVERA

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. MARIO ROCHA SOSA

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DRA. JUNE K. SIMPSON WILLIAMSON

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2009

SOBREVIVENCIA DE MICELIO Y GENES ASOCIADOS A LA GERMINACIÓN NO  
ERRUMPENTE DE *Sclerotium cepivorum* BERK.

Yolanda Rodríguez Pagaza, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2009

Se determinó el tiempo que el micelio de *Sclerotium cepivorum* Berk. puede permanecer viable tanto en condiciones de estrés por falta de humedad *in vitro*, como en suelo en ausencia del hospedante. El micelio permaneció viable hasta por 123 días en cajas Petri conteniendo papa-dextrosa-agar visiblemente seco. En suelo tratado a 15 lb de presión y 120°C por 4h, en dos días consecutivos y en el tratado a 2.5 lb durante 20 min a 65°C, una sola vez, los fragmentos de micelio de *S. cepivorum* permanecieron viables hasta 12 y 10 días posteriores a la incorporación del mismo al suelo, respectivamente; en contraste con suelo no esterilizado ya no se detectó la presencia del patógeno en este lapso. Los resultados sugieren que el micelio de *S. cepivorum* posee la capacidad de sobrevivir bajo estrés por falta de humedad en condiciones *in vitro*, en suelo no esterilizado es incapaz de competir con la biota del suelo. Se generó una biblioteca sustractiva con los genes asociados a la germinación no errumpente de *Sclerotium cepivorum*. Para generar la biblioteca sustractiva se determinaron las condiciones óptimas para obtener germinación errumpente y no errumpente de esclerocios de *S. cepivorum*. A 22° C, el 96.7% de los esclerocios germinaron de forma no errumpente en presencia de agua, y el 91.67% de los esclerocios germinó de forma errumpente en presencia de disulfuro de alilo (DAS) al 2%. En la biblioteca sustractiva se obtuvieron 23 fragmentos de genes asociados a la germinación no errumpente de *S. cepivorum*. Estos genes tuvieron similitudes significativas con 15 proteínas diferentes, las cuales participan en los procesos de respiración, transcripción, traducción, transducción de señales y síntesis de aminoácidos y proteínas. Los resultados sugieren que la germinación no errumpente es más rápida que la germinación errumpente debido a un incremento en los procesos metabólicos de los esclerocios de *S. cepivorum* germinados de forma no errumpente.

## MICELIUM SURVIVOR AND GENES ASOCIATED TO HYPHAL GERMINATION OF

*Sclerotium cepivorum* BERK.

Yolanda Rodríguez Pagaza, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2009

The time that mycelium of *Sclerotium cepivorum* Berk. can remain viable under stress by the lack of moisture both *in vitro* conditions and in soil in absence of the host, was determined. Mycelium remained viable by 123 days in Petri dishes containing potato-dextrose-agar completely dehydrated. In soil treated at 15 lb pressure and 120°C for 4h, in two consecutive days (double sterilization) and in soil treated to 2.5 lb for 20 min at 65°C once (single sterilization) the fragments of mycelia of *Sclerotium cepivorum* Berk. remained viable for 12 and 10 days after the incorporation of the mycelia to the soil, respectively; but in non-sterilized soil the pathogen was not detected in this lapse. The results suggest that the mycelium of *Sclerotium cepivorum* Berk. has the capacity to survive under moisture stress *in vitro* conditions, but in non-sterilized soil apparently it was unable to compete with the soil biota. A subtractive library of genes associated to hyphal type of *Sclerotium cepivorum* was generated. In order to generate the subtractive library, optimum conditions to have eruptive and hyphal germination of *S. cepivorum* sclerotia were determined. At 22° C, 96.7% of sclerotia germinated hyphally in water presence and 91.67% of sclerotia germinated eruptively in presence of 2% allyl disulfide (DAS). 23 fragments of genes associated to hyphal germination of *S. cepivorum* were obtained in the subtractive library. Those genes had significant similarity to 15 different proteins that participate in respiration, transcription, translate, signal transduction and amino acid and protein synthesis process. The results suggest that hyphal germination is faster than eruptive germination because have an increment in the metabolic process in sclerotia of *S. cepivorum* germinated hyphally.

## DEDICATORIA

A mi pequeña Yolanda Monserrat

Por quien todo imposible vale la pena intentarlo.

A mi esposo Manuel

Mi ejemplo de que todo sueño y meta es alcanzable. Pilar en mi vida personal y emocional. Mi fuente de inspiración, admiración y amor.

A mamá Yola y papá Rodrigo

Pilares en mi vida intelectual y profesional. Sin ustedes no seria quien soy.

A mamá Paqui y papá Jesús

Por que me abrieron sus almas y corazones recibíendome como una más de sus hijas.

## AGRADECIMIENTOS

A mi esposo Manuel, gracias por todo tu amor, tu apoyo, tu comprensión. Por estar allí cuando te he necesitado. Esta tesis también es tuya.

A mi consejo particular: Dra. Reyna I. Rojas Martínez, Dra. Emma Zavaleta Mejía, gracias por su apoyo, por su paciencia, por creer en mí. Gracias por ser un apoyo y guía profesional y emocional. Dr. Lorenzo Guevara Olvera, gracias por su dirección, por recibirme y permitirme llevar a cabo gran parte del trabajo en su laboratorio. Dra. June K. Simpson Williamson y Dr. Mario Rocha Sosa, gracias por los comentarios siempre oportunos y valiosos para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorios, tanto del Colegio como de Celaya, gracias por todos los momentos vividos dentro y fuera de los laboratorios: Ruth, Martha, Margarita, Iobana, Celia, Diana, Ernesto Medel, Ernesto Fernández, Damaris, Maribel, María Esther, Magaña, Félix, Guadalupe, Paulina, María Elena. Agradezco especialmente a María Isabel Hernández Álvarez, gracias por todo el apoyo y la paciencia que me tuviste para realizar este trabajo.

A mis compañeras de casa en Celaya: Lauris y Maribel, gracias por hacer mi estancia tan agradable. Teresita Luna Mirus, gracias por recibirme en tu casa y ser como una hermana mayor para nosotros, siempre atenta, siempre preocupada por nuestro bienestar. Dios te bendiga.

Al pueblo de México que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología permitió la culminación de esta tesis de Doctorado.

## Bosque de niebla

Tus pies descalzos sentí sobre mi tierra,  
explorador osado, descubridor de mis praderas,  
para ti son mis manantiales, mi color y mi maleza.

Adéntrate en mi follaje,  
báñate en mis ríos,  
contempla mis paisajes,  
respira mi aliento tibio.

¿Quieres descansar de tu largo viaje?  
Te daré mis hojas cubiertas de musgo fino;  
mis diez brisas arrullarán tu cabeza oscura;  
mis dos estrellas iluminarán tu cuerpo tendido;  
mientras mis dos pétalos delgados y rosáceos,  
te embriagarán con su suave y dulce vino...

¿Quieres reír y no dormirte?  
la algarabía de mi canto te hará sentirte vivo;  
brillará para ti mi sol o mi media luna en lo alto;  
mis luciérnagas te divertirán como a un niño.  
Y cuando las noches sean húmedas y siniestras,  
extenderé la calidez de mi verde abrigo;  
mi lucero te guiará donde tus pasos vayan;  
mi naturaleza toda te acompañará en tu camino...

Cuando la nieve haya cubierto nuestras dos cimas,  
en el ocaso de nuestras vidas, Amor mío,  
descubrirás que en alta y fuerte montaña te has convertido,  
y que abrazando fuertemente tus laderas  
continúa junto a ti ésta,  
tu fiel bosque de niebla...

*Yolanda Rodríguez Pagaza  
04 abril 2005*

Para mi esposo,  
pensando en nuestra pequeña Yolanda Monserrat.

Hija mía: mucho antes de que fueras concebida físicamente,

Ya estabas concebida mentalmente en nuestras vidas

## **Geografía**

Beso tus planicies con la dulzura de mi geografía desnuda, libando el néctar de tus colinas y encendiendo el fuego de tu volcán dormido, mas nunca inactivo, para que tú, fértil padre suelo, con besos, caricias y juegos, apagues nuestro deseo y siembres vida bajo este cielo, haciendo erupción en mí...

Yolanda Rodríguez Pagaza

22 febrero 2007

## **CONTENIDO**

<b>CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>1</b>
--	----------



<b>CONDICIONES DE DESARROLLO DE <i>S. cepivorum</i></b> .....	<b>2</b>
<b>FUENTES DE INÓCULO DE <i>S. cepivorum</i> EN EL SUELO</b> .....	<b>3</b>
<b>GERMINACIÓN DE ESCLEROCIOS DE <i>S. cepivorum</i></b> .....	<b>4</b>
<b>GERMINACIÓN DE PROPAGULOS EN OTRAS ESPECIES</b> .....	<b>5</b>
<b>CAMBIOS METABÓLICOS DURANTE LA GERMINACIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>EXPRESIÓN DE GENES EN LOS ORGANISMOS</b> .....	<b>8</b>
Información genética .....	8
Hibridación Sustractiva bajo Supresión .....	9
<b>JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>10</b>
<b>CAPITULO II. SOBREVIVENCIA DEL MICELIO DE SCLEROTIUM CEPIVORUM BERK. ...</b>	<b>15</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>15</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
Sobrevivencia de <i>Sclerotium cepivorum</i> in vitro. ....	18
Sobrevivencia de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk. en suelo.....	18
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
Sobrevivencia de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk. en medio deshidratado.....	20
Sobrevivencia de <i>Sclerotium cepivorum</i> en suelo.....	21
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>24</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>24</b>

<b>CAPITULO III. GENES ASOCIADOS A LA GERMINACIÓN NO ERRUMPENTE DE <i>SCLEROTIUM CEPIVORUM</i> BERK.</b>	<b>27</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>27</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>28</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
Determinación de condiciones óptimas para inducir la germinación errumpente y no errumpente	30
Material biológico	30
Tratamientos	30
Generación de la biblioteca sustractiva de genes asociados en la germinación no errumpente	31
Germinación de esclerocios	31
Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión	32
Transformación, extracción de DNA plasmídico y verificación de inserto	33
Análisis tipo Southern	34
Secuenciación	34
Comparación en el GenBank	34
Registro en el GenBank	35
<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
Condiciones óptimas para inducir la germinación errumpente y no errumpente	35
Generación de la biblioteca sustractiva	41
Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión	41
Transformación, extracción de DNA plasmídico y verificación de inserto	41
Análisis tipo Southern	42
Registro en el Gene Bank	44
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>50</b>
<b>CAPITULO IV. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>53</b>

<b>ANEXO I.....</b>	<b>54</b>
<b>Extracción de RNA total (Kit RNeasy. QIAGEN) .....</b>	<b>54</b>
<b>Síntesis de cDNA (Kit Super SMARTTM PCR cDNA Síntesis Kit, Biosciences, Clontech) .....</b>	<b>54</b>
Protocolo para la síntesis de primera cadena de DNA a partir de RNA .....	54
Protocolo para purificación de primera cadena (PCR clean-up Gel extraction, Macherey-Nagel) .....	55
Protocolo para la determinación del número de ciclos óptimos para la segunda cadena de DNA .....	55
Protocolo para la síntesis de la segunda cadena de DNA .....	56
Protocolo para la purificación de cDNA .....	56
<b>Validación de banco .....</b>	<b>57</b>
<b>Hibridación Sustractiva bajo Supresión (Kit PCR-Select cDNA Sustraction, Clontech) .....</b>	<b>57</b>
Protocolo para la digestión del cDNA con Rsa I .....	57
Protocolo para purificar el cDNA digerido (NucleoTraP <sup>®</sup> CR, Macherey-Nagel) .....	58
Protocolo para ligar con adaptadores.....	58
Protocolo para primera hibridación.....	59
Protocolo para segunda hibridación.....	59
Protocolo para primera PCR .....	59
Protocolo para segunda PCR.....	60
<b>Protocolo para extracción de DNA de geles de agarosa (Kit QUIAEX II, Quiagen) .....</b>	<b>60</b>
<b>Transformación (Kit TOPO TA Cloning para secuenciación, Invitrogen).....</b>	<b>61</b>
Protocolo para ligación con TOPO .....	61
Protocolo para transformación de células competentes.....	61
<b>Extracción de DNA plasmídico de células transformantes (Kit Plasmid or cosmid DNA Purification, Quiagen), y verificación de la presencia del inserto.....</b>	<b>62</b>
Protocolo para multiplicación de células transformantes .....	62
Protocolo para mini preparación .....	62
Protocolo para digestión con EcoRI .....	63
<b>Hibridación tipo Southern (Kit Gene Images Random Primer Labeling, Amersham Biosciences) .....</b>	<b>63</b>
Protocolo para la separación de plásmidos con inserto y preparación de controles positivos .....	63
Protocolo para marcado de sonda.....	63
Protocolo para verificación de marcaje de la sonda .....	64

Protocolo para la preparación del arreglo comprobatorio .....	64
Protocolo para lavados de astringencia .....	65
Protocolo para detección y revelado de las membranas.....	65
<b>Secuenciación (Kit QIAprep Miniprep para purificación de DNA grado biología molecular, Qiagen).....</b>	<b>66</b>
Protocolo para purificación de ADN plasmídico de clonas para enviar a secuenciación.....	66
<b>ANEXO II .....</b>	<b>67</b>
<b>Medios.....</b>	<b>67</b>
Medio de cultivo LB .....	67
Agar LB .....	67
<b>Soluciones.....</b>	<b>67</b>
Buffer TNE 1X.....	67
Buffer A.....	67
Solución TAE 50X .....	67

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO I. VIABILIDAD DEL MICELIO DE <i>SCLEROTIUM CEPIVORUM</i> DESPUÉS DE PERMANECER POR VARIOS MESES EN MEDIO PDA SECO. ....</b>	<b>20</b>
---	-----------

<b>CUADRO 2. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS CON PROTEÍNAS EN EL GENBANK Y SUS VALORES DE EXPECTANCIA.....</b>	<b>43</b>
<b>CUADRO 3. SECUENCIAS REGISTRADAS EN EL GENBANK.....</b>	<b>44</b>

INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. CICLO DE VIDA DE SCLEROTIUM CEPIVORUM.....</b>	<b>2</b>
---	----------

<b>FIGURA 2. INCIDENCIA DE DIENTES DE AJO INFECTADOS CON <i>SCLEROTIUM CEPIVORUM</i> DESPUÉS DE HABER ESTADO EXPUESTOS POR DIFERENTES TIEMPOS EN SUELO INFESTADO CON MICELIO O ESCLEROCIOS DEL HONGO.....</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 3. CAJA PETRI CON MEDIO PDA, TELA DE TUL Y ALGODÓN, PREPARADA PARA EL ENSAYO.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 4. GERMINACIÓN ERRUMPENTE DE ESCLEROCIO DE <i>S. CEPIVORUM</i> EXPUESTO A 2% DE DAS.....</b>	<b>36</b>
<b>FIGURA 5. GERMINACIÓN ERRUMPENTE DE ESCLEROCIO DE <i>S. CEPIVORUM</i> EXPUESTO A 2% DE DAS.....</b>	<b>37</b>
<b>FIGURA 6. GERMINACIÓN NO ERRUMPENTE DE ESCLEROCIO DE <i>S. CEPIVORUM</i> EXPUESTO A 0% DE DAS.....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA. 7. PORCIENTO DE GERMINACIÓN ERRUMPENTE Y NO ERRUMPENTE POR TRATAMIENTO.....</b>	<b>39</b>
<b>FIGURA 8. GERMINACIÓN ACUMULADA DE ESCLEROCIOS EXPUESTOS A DISULFURO DE ALILO (DAS) E INCUBADOS A 17º Y 22º C. ....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA 9. BANDAS OBTENIDAS DE LA HIBRIDACIÓN SUSTRATIVA.....</b>	<b>41</b>
<b>FIGURA 10. GEL PARA REALIZAR CORTE DE BANDAS. ....</b>	<b>42</b>

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

La enfermedad conocida como pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* disminuye drásticamente la producción y calidad del cultivo de ajo y cebolla en México y en el ámbito mundial (Entwistle, 1990a). Actualmente, ésta enfermedad se encuentra en los estados de Puebla, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Chihuahua, Morelos, Aguascalientes, Querétaro, Zacatecas y Guanajuato (Pérez, 2002). Las áreas más afectadas en éste ultimo estado son los municipios de Celaya, Comonfort, Apaseo el Grande, Juventino Rosas, San Miguel de Allende y Villagrán (Pérez, 2002; Pérez *et al.* 1998a). Los suelos de Guanajuato pueden tener de 50 a 700 esclerocios por kg de suelo, reportándose pérdidas de hasta el 100% de los cultivos (Pérez *et al.*, 1998a).

El ciclo de vida de *S. cepivorum* puede resumirse en cuatro etapas principales (Fig. 1):

1. *S. cepivorum* se localiza en el suelo en forma de esclerocios que pueden sobrevivir en dormancia por más de 18 años mientras no se den las condiciones favorables para su desarrollo (Entwistle, 1990a).
2. Los exudados de las plantas del género *Allium* contienen precursores de n-propil cisteína, y sus sulfóxidos, que son metabolizados por la microbiota del suelo y transformados en mercaptanos, monosulfuros o disulfuros de n-prop (en) il cisteína, los cuales promueven la germinación de los esclerocios (Banks y Edgington, 1989; Entwistle, 1990b; Esler y Coley-Smith, 1983). El mayor porcentaje de germinación se observa en la zona apical de la raíz, donde es más activa la exudación (Garrett, 1970). Si el hospedante no se encuentra presente, las hifas de *S. cepivorum* mueren después de la germinación (Entwistle, 1990a).
3. Las hifas forman un apresorio que les facilita la fijación y penetración en los tejidos de su hospedante (De la Garza, 1997). Posteriormente degradan éstos tejidos al secretar ácido oxálico y al menos dos tipos de enzimas poligalacturonasas, dos pectinesterasas, y algunas celulasas, arabanasas y xilanasas (Favaron, *et al.* 1997; Metcalf y Wilson, 1999).

4. El micelio se desarrolla en la raíz y prolifera a la base del tallo, donde produce esclerocios y puede infectar a las plantas vecinas (Entwistle, 1998a).

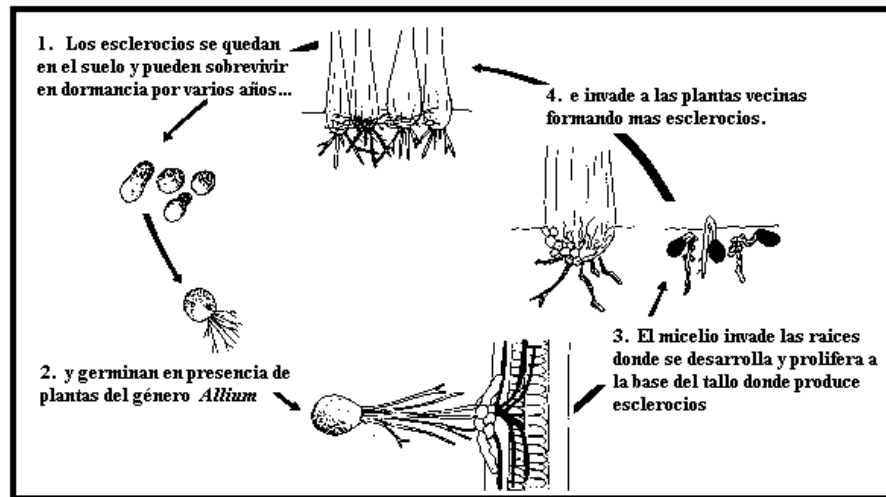


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Sclerotium cepivorum*  
(Modificado de Entwistle, 1998a).

Coley-Smith *et al.* (1987) mencionan que virtualmente nada se conoce sobre la fisiología y los factores bioquímicos que involucran la dormancia constitutiva de los esclerocios de *S. cepivorum* o la manera en que los monosulfuros o disulfuros de n-prop(en)il cisteína estimulan su germinación. El conocimiento del proceso de germinación de organismos patógenos es importante pues da elementos para desarrollar nuevas estrategias de control basadas en la manipulación de los procesos bioquímicos y fisiológicos involucrados (Gárriz *et al.*, 2003).

### CONDICIONES DE DESARROLLO DE *S. cepivorum*

Stewart (1990) reporta que la temperatura a la que se puede desarrollar *S. cepivorum* oscila entre 4 y 30° C, con un óptimo de 15 a 20° C, pero para la infección requiere de 10 a 24 °C. El pH óptimo es de 4 a 5; en pH menores de 3 y mayores a 8.5 el crecimiento del hongo es lento. Los niveles de humedad que favorecen su crecimiento son del 15%, y niveles más altos pueden inhibirlo (Mendoza, 1992).



## FUENTES DE INÓCULO DE *S. cepivorum* EN EL SUELO

La mayor parte de los autores reportan al tejido del hospedante infectado y a los esclerocios de *S. cepivorum* como la principal fuente de inóculo primario en el suelo (Crowe, 1995; Entwistle, 1990a; Redondo, 1984). Con base en este hecho, la mayor parte de las investigaciones que buscan controlar la enfermedad afectan directamente la cantidad de esclerocios en el suelo mediante control químico, cultural, físico (Granados, 2005), integrado (Dennis, 2001; Granados, 2005) o biológico (Granados, 2005; Torres-Barragan *et al.*, 1996).

Scout (1956) considera que el micelio de *S. cepivorum* no juega un papel importante en los mecanismos de dispersión de la enfermedad, mientras que Mordue (1976) apoya esta aseveración debido a la limitada capacidad saprofítica del micelio en el suelo. Aun no se ha determinado la capacidad del micelio de *S. cepivorum* para sobrevivir en suelo, lo cual es importante ya que existen reportes de microorganismos que pueden jugar un papel importante en la dispersión del micelio, como es el caso de *Rhizoglyphus robustus*, un ácaro que puede estar involucrado en la diseminación de la enfermedad ya que al alimentarse de micelio puede transportar fragmentos de éste sobre su cuerpo, o el micelio puede permanecer viable al atravesar su tracto digestivo (Ramírez *et al.*, 2002).

Varios autores también reportan la formación de microconidios en *S. cepivorum* (Brix y Zinkernagel, 1992; Gindro y L'Hoste, 1997; New *et al.* 1984). En cuanto al papel de los microconidios en la diseminación de la enfermedad las opiniones están divididas. Así, Brix y Zinkernagel (1992) y New *et al.* (1984) reportan que los microconidios son estructuras estériles, mientras que Gindro y L'Hoste (1997) reportan que los microconidios tienen la capacidad de infectar al hospedante, sobretodo en condiciones de alta humedad o inundación del suelo.

## GERMINACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *S. cepivorum*

Respecto a la germinación de *S. cepivorum* se conoce que es de tipo miceliogénica. Los esclerocios tienen una cubierta de una o dos capas de células redondas, gruesas y pigmentadas que rodean al tejido medular formado de hifas elongadas y empaquetadas de manera compacta (Coley-Smith y Cooke, 1971). El principal material citoplasmático que funciona como material de reserva en el esclerocio son las proteínas, que de acuerdo con Backhouse y Stewart (1987) son de naturaleza ácida. Otros compuestos que podrían proveer de energía al esclerocio son los ácidos palmítico, esteárico y oleico (Bishy *et al.*, 1981). Al parecer, el esclerocio mantiene una actividad fisiológica muy baja mientras no se presenten las condiciones adecuadas para germinar. Esta actividad fisiológica baja se deduce de dos características observadas: por un lado, se aprecia una pérdida de material medular a lo largo de su dormancia, y por otro, en la cubierta de los esclerocios se encuentra al menos una capa de células vivas y, si alguna de ellas muere o es dañada, es sustituida mediante la diferenciación de las células de la médula.

Cuando la corteza del esclerocio es dañada o rota, la germinación ocurre más rápidamente (Coley-Smith y Cooke, 1971). Los esclerocios presentan dos tipos de germinación. Uno que está vinculado a la presencia de exudados radicales del hospedante y que se caracteriza por la aparición de protuberancias en la superficie del esclerocio; en dichas protuberancias, la cubierta se abre y sale una porción de micelio. Después de esta germinación, denominada “errumpente”, las hifas crecen fuera de la protuberancia alcanzando de 1 a 2 cm de longitud (New *et al.*, 1984).

El otro tipo de germinación ocurre generalmente en ausencia del hospedante y se manifiesta por la producción de hifas individuales que emergen atravesando la cubierta ilesa (Backhouse y Stewart, 1987; New *et al.*, 1984). Este tipo de germinación gasta solamente una pequeña cantidad de los materiales de reserva por lo que el esclerocio es capaz de germinar otra vez (New *et al.* 1984).

Coley-Smith *et al.* (1987), reportan que los esclerocios requieren de un tiempo mínimo de dormancia en el que estos no germinan aún en presencia de exudados

radicales del género *Allium* o aceites sintéticos; el mecanismo mediante el cual la dormancia es interrumpida se desconoce. El que los esclerocios germinen en presencia de los exudados radicales del género *Allium*, sugiere que los volátiles generados a partir de éstos actúan en la capa de células próxima a la cubierta del esclerocio (Backhouse y Stewart, 1987). Se ha propuesto que los compuestos volátiles promueven el crecimiento de hifas que pueden abrir la cubierta mediante presión, secreción de enzimas o ambas (Crowe y Bafus, 2002). Previamente Punja *et al.* (1984), habían propuesto que la estimulación de la germinación r en *S. rolfsii* por la presencia de los alcoholes butílico e isopropílico se debe a que éstos compuestos i) alteran o incrementan ciertas enzimas, o ii) actúan como un regulador metabólico. Cooke y Whipps (1993) proponen que, desde el punto de vista ecológico y evolutivo, la germinación de esporas que es inducida por compuestos específicos de una planta o un microorganismo, debe tener uno o más sitios blanco en o dentro de las esporas.

## **GERMINACIÓN DE PROPAGULOS EN OTRAS ESPECIES**

En la mayor parte de los hongos, la germinación comprende tres fases: 1) incremento en el diámetro de las esporas al doble o al triple debido a la absorción de agua y al consecuente aumento de su actividad metabólica, (Garraway y Evans, 1991; Hardham, 2001; Jennings y Lysek, 1999); 2) incremento de la tasa de respiración, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; y 3) germinación de la espora mediante un crecimiento localizado en la célula (Garraway y Evans, 1991; Hardham, 2001; Jennings y Lysek, 1999). El máximo porcentaje de esporas germinadas en el menor tiempo se puede obtener cuando los factores que influyen en la germinación (temperatura, oxígeno, nutrimentos, viabilidad de las esporas) se encuentran en o cerca del nivel óptimo (Lilly y Barnett, 1951) La germinación generalmente ocurre en un lapso de 3 a 8 horas después de la hidratación (Hardham, 2001).

## CAMBIOS METABÓLICOS DURANTE LA GERMINACIÓN

La utilización gradual de los compuestos de reserva, así como el aumento en la tasa de respiración de las esporas son las primeras señales metabólicas de la germinación (Carlile *et al.*, 2001; Cooke y Whips, 1993). Se ha demostrado consistentemente que la síntesis *de novo* de proteínas es un prerrequisito para que las esporas germinen (Griffin, 1994). La mayor parte de los hongos requieren también de la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos, a excepción de especies como *Blastocladiella emersonii*, *Allomyces arbuscula*, *Botryodiplodia theobromae*, *Mucor racemosus*, *Alternaria solani*, *Peronospora tabacina*, *Uromyces phaseoli*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Lenzites sepiariae* y *Rhizopus stolonifer*, donde se ha detectado síntesis de proteínas pero no síntesis de RNA durante los primeros minutos de germinación (Griffin, 1994; Hardham, 2001; Moore, 1996; Sussman y Douthit, 1973). En las esporas dormantes de estos hongos se detectan todos los tipos de RNA, lo que sugiere que la traducción no requiere necesariamente de transcripción (Garraway y Evans, 1991; Griffin, 1994). Así, Griffin (1994) sugiere que todos los genes requeridos durante el proceso de germinación de una espora, y que se expresan activamente, son también requeridos para el continuo crecimiento de sus hifas.

Los cambios citológicos observados en la germinación de esporas incluyen el aumento del retículo endoplásmico, el aumento en el tamaño y/o número de mitocondrias, núcleos y ribosomas, y la desaparición de estructuras que contienen lípidos (Carlile *et al.*, 2001; Garraway y Evans, 1991; Moore, 1996), ya que éstos, junto con los carbohidratos, son los compuestos de reserva comúnmente encontrados en las esporas. Moore (1996) reporta también excreción de metabolitos, enzimas y vitaminas. En otras estructuras como picnidios de *Botryodiplodia theobromae*, esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* y de *S. minor*, y en zoosporas y quistes de *Phytophthora cinnamomi*, también se han detectado proteínas como reservas de energía (Hardham, 2001). En muchas esporas los lípidos utilizados durante su germinación están contenidos en los microcuerpos, que son estructuras dentro de la célula cuya función parece ser similar a la de los glioxisomas en las semillas de las plantas (Maxwell *et al.*, 1977).

Los procesos fisiológicos detallados que se llevan a cabo en la germinación de las esporas no se conocen con exactitud. Sin embargo, hay evidencia de la importancia del ciclo del glioxilato en la germinación de algunas esporas. La actividad de isocitrato liasa y malato sintetasa ha sido reportada en uredosporas de *Uromyces phaseoli*, *Puccinia graminis* f. *sp. tritici* y *Melampsora lini*. También hay evidencia de que la oxidación  $\beta$  de los ácidos grasos (un paso necesario para la utilización de lípidos vía el ciclo del glioxilato) ocurre en *P. graminis* f. *sp. tritici*, en *Cunninghamella echinulata* y en *Botryodiplodia theobromae* (Maxwell *et al.*, 1977).

De los transcritos vinculados al aumento en la tasa de respiración de las esporas en germinación, Lammers *et al.* (2001), reportan un aumento en las secuencias de nucleótidos que codifican para las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa en el hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*. De manera similar, en conidios de *Pyrenophora teres* se han detectado secuencias de mRNA homólogas al citocromo C; genes que codifican secuencias de aminoácidos homólogas al dominio CorA de las proteínas transportadoras de cationes ALR2 y ALR1 de *Saccharomyces cerevisiae*; ATP sintasa en la vacuola; algunos genes que codifican para productos con el dominio OXA1, el cual interviene en la inserción de proteínas en la membrana interna de la mitocondria; y otros probablemente involucrados en la síntesis de proteínas como la fenilalanina sintetasa y la treonina sintetasa (Dilger *et al.*, 2003). La modulación del AMP cíclico se asocia con la germinación de varios hongos filamentosos (Bagga y Straney, 2000).

En el caso de *S. rolfsii* y *S. cepivorum*, se ha reportado el aumento de la actividad del gen ornitina descarboxilasa (ODC) en la germinación de sus esclerocios (Hermosillo *et al.*, 2003; Shapira *et al.*, 1989). La ODC participa en la biosíntesis de poliaminas como putrescina, espermidina y espermina (Galston y Kaur-Sawhney, 1995; Teixeira *et al.*, 2003). En el caso de *S. rolfsii*, se observa un aumento en el contenido de putrescina y espermidina, y un descenso en espermina (Shapira *et al.*, 1989). Estudios hechos *in vitro* muestran que estas tres poliaminas pueden afectar la síntesis y actividad de macromoléculas, la permeabilidad de las membranas y, parcialmente, procesos de mitosis y meiosis (Galston y Kaur-Sawhney, 1995; Hopkins, 1995). En *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, las poliaminas son necesarias

para un crecimiento óptimo de estos microorganismos, siendo necesarias también para la esporulación en *S. cerevisiae* (Hopkins, 1995; Tabor y Tabor, 1984). En plantas, las poliaminas están ligadas a procesos de división celular, diferenciación vascular, formación de embriones en cultivo de tejidos, formación de raíces adventicias, iniciación de la floración, así como el desarrollo, caída y senescencia de frutos (Galston y Kaur-Sawhney, 1995; Tabor y Tabor, 1984). Muchos de los estudios que han demostrado el papel de las poliaminas en el ciclo celular se basan en el uso de compuestos que inhiben las enzimas ornitina descarboxilasa y/o arginina descarboxilasa (Galston y Kaur-Sawhney, 1995; Hermosillo *et al.*, 2003).

Durante la germinación en hongos patógenos también es necesaria la síntesis de toxinas o enzimas para la invasión de las células hospedantes, como en el caso de la toxina HC en conidios de *Cochliobolus carbonum* (Jones y Dunkle, 1995) o de celulasas en esporas de *Dictyostelium discoideum* (Blume y Ennis, 1991).

En *Blastocladiella* se ha detectado la pérdida de un inhibidor de la traducción cuando la zoospora empieza su germinación. (Carlile *et al.*, 2001)

## **EXPRESIÓN DE GENES EN LOS ORGANISMOS**

### **Información genética**

El dogma central de la biología molecular indica que los genes son perpetuados de generación en generación mediante la replicación de los ácidos nucleicos, y que su función es expresada en forma de proteínas mediante la transcripción y la traducción (Lewin, 2000; Stryes, 1995).

En la transcripción de la información genética en eucariotes, se sintetizan cadenas de RNA mensajero (mRNA) a partir de la cadena molde de un gen de ADN. El mRNA sintetizado pasa por un proceso de maduración y es transportado al citoplasma donde es traducido en proteínas por los ribosomas (Lewin, 2000).

## Hibridación Sustractiva bajo Supresión

La técnica de hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (HSS) permite comparar el RNA mensajero de dos poblaciones y obtener clonas de genes que son expresados en una de las poblaciones pero no en la otra (Diatchenko *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1998). La técnica de hibridación sustractiva bajo supresión se basa en técnicas usadas comúnmente en la biología molecular. Primero, ambas muestras de mRNA a contrastar se convierten en DNA complementario. Una de las muestras (de la que se quieren obtener los genes expresados diferencialmente) es denominada como muestra problema, mientras que la otra es denominada muestra control. Tanto el problema como el control son hibridados, y las secuencias híbridas son removidas. Por consecuencia, el cDNA que permanece representa los genes que se expresan en la muestra problema pero que no se encuentra en la muestra control (Clontech, 2004). Dentro de las ventajas que posee esta técnica respecto a otras, están la rapidez para obtener resultados confiables y la baja cantidad de cDNA que se necesita, que es de 0.5 a 2 µg (Diatchenko *et al.*, 1998).

## JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

*S. cepivorum* es un patógeno cuya principal fuente de inóculo primario son los esclerocios, estructuras de resistencia que forma y que pueden durar en el suelo varios años en latencia. La mayor parte de los esfuerzos para controlar esta enfermedad están dirigidos a disminuir de una u otra forma la cantidad de esclerocios en el suelo. Se ha reportado que en ausencia del hospedante el micelio de *S. cepivorum* no sobrevive por largos periodos en el suelo y que por tanto no tiene un papel importante como fuente de inóculo primario en la epidemiología de la enfermedad, aunque poco se ha investigado acerca de la sobrevivencia del micelio en el suelo. En campo el micelio puede ser diseminado mediante las labores culturales, ácaros y otros integrantes de la microfauna del suelo, por lo tanto, el conocer que tanta capacidad de sobrevivencia tiene éste bajo condiciones de estrés ayudará a tener un mejor entendimiento de la epidemiología de la pudrición blanca. Por lo anterior, el

primer objetivo del presente estudio fue determinar la viabilidad de las hifas de *Sclerotium cepivorum* tanto en condiciones de estrés por falta de humedad *in vitro*, como en suelo en ausencia del hospedante.

Por otro lado, la fisiología y bioquímica del proceso de germinación de los esclerocios de *S. cepivorum* se desconoce, a pesar de que se sabe que este hongo ataca solo a plantas del género *Allium* debido a que los exudados radicales de estas plantas promueven la germinación de los esclerocios. Estudios realizados *in vitro* han mostrado que los esclerocios de *S. cepivorum* presentan dos tipos de germinación: errumpente y no errumpente, estando cada una de éstas estrechamente relacionada con la presencia o ausencia de los estimuladores de la germinación. En ambos tipos de germinación las hifas crecen, pudiendo romper la corteza del esclerocio en la germinación errumpente por la presión que ejercen, pero además, existe la posibilidad de que las hifas además sinteticen enzimas que degraden la corteza del esclerocio. El determinar qué genes son los que se expresan durante la germinación de los esclerocios ayudará a dilucidar los procesos bioquímicos y fisiológicos responsables de la germinación. Cuando logremos tener un mejor conocimiento de este proceso podremos contar con más elementos para diseñar mejores estrategias de manejo de la enfermedad. Así, el segundo objetivo del presente estudio fue determinar qué genes se expresan diferencialmente durante la germinación no errumpente de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G., N. 2002. Fitopatología. UTEHA. México.
- Gárriz A., M. C. Dalmasso, M. Marina, E. Rivas, O. A. Ruiz y F. L. Pieckenstain. 2003. Inhibición de la biosíntesis de control de las enfermedades causadas por ascoporas de *Sclerotinia sclerotiorum*. Reporte de investigación. Asociación Argentina del Girasol. Argentina.
- Backhouse, D. y A. Stewart. 1987. Anatomy and histochemistry of resting and germinating sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Trans. Br. mycol. Soc. 89(4):561-567.
- Bagga, S. y D. Straney. 2000. Modulation of cAMP and phosphodiesterase activity by flavonoids which induce spore germination of *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani*). Physiol. Mol. Plant Pathol. 56:51-61.



- Banks, E. y L. V. Edgington 1989. Effect of integrated control practices on the onion white rot pathogen in organic soil. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 268-272.
- Bartnicki-García, S. 1986. The cell wall: a crucial structure in fungal evolution. *In: Rayner, A. D. M.; C. M. Brasier y D. Moore. Evolutionary biology of the fungi.* Pp. 389-400
- Bishy, D. W., S. E. Megalla, M. M. Soliman y H. M. Abdel-Fattah. 1981. Comparative studies on simple lipids of *Sclerotium cepivorum*, the causal agent of white rot of onion, and other fungi of the class deuteromycetes. *Plant and Soil* 60:301-307.
- Blume, J. E. y H. L. Ennis. 1991. A *Dictyostelium discoideum* cellulase is a member of a spore germination-specific gene family. *J. Biol. Chem.* 266(23):15432-15437.
- Brix, H. D, y V. Zinkernagel. 1992. Effects of cultivation, conditioning and isolate on sclerotia germination in *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathol.* 41: 13-19.
- Carlile, M. J.; S. C. Watkinson y G. W. Gooday. 2001. *The Fungi.* Academic Press. England.
- Clontech. 2004. BD PCR-Select cDNA Subtraction Kit. User Manual. BD Biosciences, Clontech. E. U. A.
- Coley-Smith, J. R. y R. C. Cooke. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9:65-92.
- Coley-Smith, J. R. 1985. Methods for the production and use of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in field germination studies. *Plant Pathol.* 34:380-384.
- Coley-Smith, J. R.; D. Parfitt; I. M. Taylor y R. A. Reese. 1987. Studies of dormancy in sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathology* 36:594-599.
- Coley-Smith, J. R. 1990. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. *Plant Pathol.* 39:214-222.
- Crowe, F. J. 1995. White Rot. *In: Compendium of onion and garlic diseases.* H.F. Schwartz y S. K. Mohan (eds.) Minnesota. APS. Press. P. 14-16.
- Crowe, F., y R. Bafus. 2002. A model for direct stimulated germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Resumen de ponencias de la 7<sup>th</sup>. International Workshop on Allium White Rot. Harris Ranch, California. E. U. A. (Disponible en: <http://www.cps-scp.ca/abstractslist.rtf>)
- Cooke, R. C. y J. M. Whipps. 1993. *Ecophysiology of fungi.* Blackwell Scientific Publications. Australia.
- De la Garza, G., J. L. 1997. *Fitopatología General.* UANL. México.
- Dennis, J. J. 2001. Progress towards an integrated control strategy for onion White root rot disease, including the use of artificial germination stimulants. *Acta Hort.* 555:117-121.
- Diatchenko, L., Y. F. C. Lau, A. P. Campbell. A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gursaya, E. D. Sverdlov y P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(12):6025-6030.
- Diatchenko, L., A. Chenchik y P. Siebert. 1998. Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A+) or total RNA. *En: RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis.* P. Siebert y J. Larrick. BioTechniques Books, MA. Pp. 213-239.

- Dilger, M.; F. G. Felsenstein y G. Schwarz. 2003. Identification and quantitative expression analysis of genes that are differentially expressed during conidial germination in *Pyrenophora teres*. *Mol. Gen. Genomics* 270:147-155.
- Entwistle, A. R. 1990a. Allium white rot and its control. *Soil Use and Management* 6: 201-209.
- Entwistle, A. R. 1990b. Root diseases. En: H. D. Rabinowitch, y J. L. Brewster. (eds) *Onions and Allied crops*. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. Vol. II.
- Entwistle, A. R. 1998a. Opportunities for the integrated control of Allium. En: A. R. Entwistle, y L. Pérez M. *Proceedings of the Sixth International Workshop on Allium White Rot*. Irapuato Guanajuato, México.
- Entwistle, A. R. 1998b. A review of the geographic distribution of Allium white rot (*Sclerotium cepivorum*) En: A. R. Entwistle, y L. Pérez M. *Proceedings of the Sixth International Workshop on Allium White Rot*. Irapuato Guanajuato, México.
- Esler, G. y J. R. Coley-Smith. 1983. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant pathol.* 32:13-22.
- Esser, K. y R. Kuenen. 1967. *Genetics of fungi*. Springer Verlag. New York. E. U. A. Pp. 362-375.
- Favaron, F., C. Castiglioni, R. Dovidio, y P. Alghisi 1997. Polygalacturonase inhibiting proteins from *Allium porrum* L. and their role in plant tissue against fungal endopoligalacturonases. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 50: 403-407.
- Galston A. W. y R. Kaur-Sawhney. 1995. C. Other hormonal compounds. C1. Polyamines as endogenous growth regulators. *In: P. J. Davies (Ed.) Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*. Pp. 158-178.
- Garraway, M. O., y R. C. Evans. 1991. *Fungal nutrition and physiology*. Krieger Publishing Company. Florida. E. U. A.
- Garrett, S. D. 1970. *Pathogenic root infection fungi*. Cambridge at the University Press. England.
- Gindro, C.; L'Hoste, G. 1997. Germination and infectious potential of microconidia of *Sclerotium cepivorum*. *J. Phytopathol.* 145:171-175.
- Granados, M. M. 2005. Pudrición blanca de la cebolla. Una enfermedad difícil de combatir. *Agron. Costarricense* 29(2): 143-156.
- Griffin, D. H. 1994. *Fungal Physiology*. Wiley-Liss. E. U. A.
- Hermosillo G., A. E.; S. Pérez A.; M. I. Hernández A.; F. Delgadollo S.; C. I. Muñoz S.; R. G. Guevara G. y L. Guevara O. 2003. El gen ornitonina descarboxilasa (ScODC) de *Sclerotium cepivorum* Berk. es necesario para la patogénesis en ajo (*Allium sativum* L). *In: Pan American Disease Conference*. South Padre Island, Texas. April 6-10, 2003. pp. 57
- Hardham, A. R. 2001. 5: Cell biology of fungal infection of plants. *In: R. J. Howard y N. A. R. Gow. The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Vol. VIII. *Biology of the fungal cell*. Springer. Germany.
- Hopkins, W. G. 1995. *Introduction to plant physiology*. John Wiley & Sons. Canadá.
- INIFAP, 1998. *Guía para la asistencia técnica agrícola*. Área de influencia del campo experimental Pabellón. SAGAR.

- Jennings, D. H. y G. Lyses. 1999. Fungal Biology: understanding the fungal lifestyle. Springer. E. U. A.
- Jones, M. J., y L. D. Dunkley. 1995. Virulence gene expression during conidial germination in *Cochliobolus carbonum*. MPMI. 8(3):476-479.
- Lammers, P. J.; J. Jun; J. Abubaker; R. Arreola; A. Gopalan; B. Bago; C. Hernandez S.; J. W. Allen; D. D. Douds; P. E. Pfeffer y Y. Shachar H. 2001. The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon flux and gene expression. Plant Physiology 127:1287-1298.
- Lewin, B. 2000. Genes VII. Oxford University Press. USA.
- Lilly, V. G. y H. L. Barnett. 1951. Spore germination. *In: Physiology of the fungi*. McGraw-Hill. New York, E. U. A. Pp. 355-371.
- Maxwell, D. P., V. N. Armentrout y L. B. Graves, Jr. 1977. Microbodies in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15:119-134.
- Mayer A. M. y A. Poljakoff-Mayber. 1978. Metabolism of germinating seeds. *In: The germination of seeds. International series of pure and applied biology: Division, plant physiology; v.5.* Pp. 76-123.
- Mendoza, P. C. 1992. Enfermedades fungosas de hortalizas y fresas. En: S. Anaya, M. Bautista y B. Domínguez (eds.) Manejo fitosanitario de hortalizas en México. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Metcalfe D. A. y C. R. Wilson. 1999. Histology of *Sclerotium cepivorum* of onion roots and the spatial relationships of pectinases in the infection process. *Plant pathol.* 48:445-452.
- Moore L., E. 1996. Fundamentals of the fungi. Prentice Hall. E. U. A.
- Mordue, J. E. M. 1976. *Sclerotium cepivorum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. 512
- New, C. M.; J. R. Coley-Smith y N. I. Georgy. 1984. Scanning electron microscopy of sclerotial germination in *Sclerotium cepivorum*. *Trans. Br. micol. Soc.* 83(4):690-693.
- Pérez M. L. 2002. Current know distribution of white rot *Sclerotium cepivorum* Berk. in Mexico. Resumen de ponencias de la 7<sup>th</sup>. International Workshop on Allium White Rot. Harris Ranch, California. E. U. A. (Disponible en: <http://www.cps-scp.ca/abstractslist.rtf>)
- Pérez M., L., V. Olalde P., J. G. Salinas G., J. R. Sánchez P. y A. R. Entwistle 1998a. Current know distribution of white rot *Sclerotium cepivorum* Berk. In México. En: A. R. Entwistle, y L. Pérez M. Proceedings of the Sixth International Workshop on Allium White Rot. Irapuato Guanajuato, México.
- Punja, Z. K.; S. F. Jenkins y R. G. Grogan. 1984. Effect of volatile compounds, nutrients and source of sclerotia on eruptive sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* 74(11):1290-1295.
- Ramírez-Suárez, A.; Zavaleta-Mejía, E.; Osada-Kawasoe, S.; Sánchez-Gálvez, M.C.; Valdéz-Carrasco, J. 2002 A possible role for *Rhizoglyphus robustus* Nesbitt (Astigmata: Acaridae) in transmission of *Sclerotium cepivorum* Berk. (Deuteromycetes: Mycelia-Sterilia). *App. Ent. Zool.* 37:663-669.
- Redondo, J. E. 1984. Informe de labores INIA. UNPH. SARH. México

- Rodomanski, W. 1990. Pathogenicity of *Sclerotium cepivorum* in several kinds of soils. In: Proceedings of the Fourth International Workshop on Allium White Rot, 5-7 June, 1990. Neustandt/Weinstrasse, Federal Republic of Germany.
- Sánchez P., J. R. 1998. Variabilidad morfológica, fisiológica y patogénica de cuatro aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Texcoco. México.
- Scout, M.R. 1956. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. I. Growth of the mycelium in soil. *Annals App. Biol.* 44(4):576-583.
- Shapira, R., A. Altman, Y. Henis e I. Chet. 1989. Polyamines and Ornithine Decarboxylase activity during growth and differentiation in *Sclerotium rolfsii*. *J. General Microbiol.* 135:1361-1367.
- Somerville, P. A. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation, and germination stimulants to reduce inoculum density. *Plant Disease* 71(3):229-233.
- Stewart, A. 1990. Isolate Variation in *Sclerotium cepivorum*. In: Proceedings of the Fourth International Workshop on Allium White Rot, 5-7 June, 1990. Neustandt/Weinstrasse, Federal Republic of Germany.
- Stryes, L. 1995. Bioquímica. Reverté. Bilbao, España.
- Sussman, A. S. y H. A. Douthit, 1973. Dormancy in microbial spores. *Ann. Rev. Physiol.* 24:311-352.
- Tabor, C. W. y H. Tabor. 1984. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53:749-790.
- Texeira A., D., M. L. Santaolara A. y E. Alonso I. 2003. La arginina en su contexto metabólico y fisiológico. *Acta bioquim. clin. latinoam.* 37(2):165-179.
- Torres-Barragán, A.; Zavaleta-Mejía, E.; González-Chávez, C. y Ferrera-Cerrato, R. 1996. The use of arbuscular mycorrhizae to control onion White rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) under field conditions. *Mycorrhiza* 6:253-257.

## **CAPITULO II. SOBREVIVENCIA DEL MICELIO DE *Sclerotium cepivorum* BERK.**

### **RESUMEN**

Se determinó el tiempo que el micelio de *Sclerotium cepivorum* Berk. puede permanecer viable tanto en condiciones de estrés por falta de humedad *in vitro*, como en suelo en ausencia del hospedante. El micelio permaneció viable hasta por 123 días en cajas Petri conteniendo papa-dextrosa-agar visiblemente seco. En suelo tratado a 15 lb de presión y 120°C por 4h, en dos días consecutivos y en el tratado a 2.5 lb durante 20 min a 65°C, una sola vez, los fragmentos de micelio de *S. cepivorum* permanecieron viables hasta 12 y 10 días posteriores a la incorporación del mismo al suelo, respectivamente; en contraste con suelo no esterilizado ya no se detectó la presencia del patógeno en este lapso. Los resultados sugieren que el micelio de *S. cepivorum* posee la capacidad de sobrevivir bajo estrés por falta de humedad en condiciones *in vitro*, en suelo no esterilizado es incapaz de competir con la biota del suelo.

Palabras clave adicionales: *Allium sativum*, Ecología de Fitopatógenos del suelo, Micelio, Pudrición Blanca, Estrés por falta de humedad.

### **SUMMARY**

The time that mycelium of *Sclerotium cepivorum* Berk. can remain viable under stress by the lack of moisture both *in vitro* conditions and in soil in absence of the host, was determined. Mycelium remained viable by 123 days in Petri dishes containing potato-dextrose-agar completely dehydrated. In soil treated at 15 lb pressure and 120°C for 4h, in two consecutive days (double sterilization) and in soil treated to 2.5 lb for 20 min at 65°C once (single sterilization) the fragments of mycelia of *Sclerotium cepivorum* Berk. remained viable for 12 and 10 days after the incorporation of the mycelia to the soil, respectively; but in non-sterilized soil the pathogen was not detected in this lapse. The results suggest that the mycelium of *Sclerotium cepivorum* Berk. has the capacity

to survive under moisture stress *in vitro* conditions, but in non-sterilized soil apparently it was unable to compete with the soil biota.

Additional Keywords: *Allium sativum*, ecology of soil microorganisms, Micelium, White rot, dry stress.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* Berk. disminuye drásticamente la producción y calidad del cultivo de especies de *Allium* en el mundo (Entwistle, 1990). En México, esta enfermedad se encuentra diseminada en 10 estados de la república (Pérez, 2002) afectando a los principales productores de ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.) (INEGI, 2005) donde se han reportado pérdidas de hasta el 100% de los cultivos (Pérez *et al.*, 1998).

Los esclerocios de *S. cepivorum* son la principal forma de diseminación de la enfermedad, ya que pueden sobrevivir en el suelo en estado de dormancia por más de 18 años en ausencia del hospedante (Entwistle, 1990). Se ha consignado que este hongo es capaz de formar microconidios 10 días después de que el micelio se mantiene sumergido en agua. Algunos autores indican que los microconidios formados por éste patógeno son estériles (Brix y Zinkernagel, 1992; New *et al.*, 1984), mientras que Gindro y L'Hoste (1997) demostraron que estas estructuras tienen la capacidad de infectar al hospedante y proponen que podría representar una estructura especializada y adaptada a dispersar al hongo en condiciones de alta humedad o inundación del suelo. En experimentos donde se ha registrado la incidencia de *S. cepivorum* en cebolla después de haber sometido el suelo a inundación, se han encontrado resultados contradictorios, ya que mientras Ali (1976) reporta que la incidencia no fue afectada después de 60 días de inundación, Banks y Edgington (1989) encontraron que en suelo inundado por 23 días, ésta fue significativamente menor que en suelo no inundado, con una diferencia en la enfermedad del 30%; tal reducción fue atribuida a la pérdida de viabilidad de los esclerocios. Lo anterior está en concordancia con los

resultados de algunos investigadores que han reportado que la viabilidad de los esclerocios disminuye en función del tiempo que el suelo permanece inundado; por ejemplo, Crowe *et al.*, (2006) y Redondo y Hernández (1985) encontraron un cero por ciento de viabilidad entre los ocho y nueve meses de inundación. La epidemiología de las enfermedades radicales puede también ser afectada significativamente por la microfauna del suelo, dado que se ha documentado su contribución en la diseminación de fitopatógenos con origen en el suelo (Beute y Benson, 1979, Kalb y Millar, 1986; Huang *et al.*, 1981; Yang *et al.*, 1981). Para *S. cepivorum* se conoce poco sobre el efecto de la microfauna en su diseminación, Ramírez *et al.* (2002), mostraron que el ácaro *Rhizoglyphus robustus* Nesbitt, al alimentarse de micelio, transporta fragmentos de éste sobre su cuerpo y que el micelio permanece viable al pasar a través de su tracto digestivo, sugiriendo que el ácaro podría estar involucrado en la diseminación de la enfermedad. En general se ha considerado a *S. cepivorum* como un hongo con limitada capacidad saprofítica (Crowe y Hall, 1980; Scout, 1956; Somerville, 1987) y por tanto su micelio en el suelo puede no tener un papel importante como fuente de inóculo primario en la epidemiología de la enfermedad. Scout (1956) reportó que el micelio de *S. cepivorum* no creció en suelo no estéril y desapareció al cabo de 10 días en ausencia de tejido del hospedante, por lo que el autor concluye que esto puede deberse a una pobre capacidad saprofítica de *S. cepivorum* y a que existen microorganismos antagonistas a *S. cepivorum* en el suelo.

Dado que el impacto de la diseminación del micelio de *S. cepivorum*, por ácaros y otros integrantes de la microfauna del suelo, en la epidemiología de la pudrición blanca estará en gran medida determinado por la capacidad de sobrevivencia del micelio de *S. cepivorum* en el cuerpo del ácaro y en el suelo, es relevante determinar su capacidad de sobrevivencia bajo condiciones de estrés. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la viabilidad de las hifas de *Sclerotium cepivorum* tanto en condiciones de estrés por falta de humedad *in vitro*, como en suelo en ausencia del hospedante.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Sobrevivencia de *Sclerotium cepivorum* in vitro.**

Esclerocios de *S. cepivorum* provenientes del estado de Guanajuato se pusieron a crecer en cajas Petri conteniendo medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Una vez colonizadas se tomaron cilindros con micelio que se transfirieron a nueve cajas Petri de 5 cm de diámetro con PDA (un cilindro por caja) y se incubaron a temperatura ambiente (20°C). Un mes después de la transferencia, se verificó de manera visual, que el medio de cultivo estuviera seco. A los 62, 93 y 123 días después de que el medio de cultivo se encontraba en apariencia completamente deshidratado, se removieron los esclerocios con un pincel, del medio seco conteniendo hifas deshidratadas se obtuvieron nueve segmentos de aproximadamente 2 x 7 mm de cada caja y se transfirieron a cajas Petri de 5 cm con PDA fresco, colocando tres muestras por caja. Se revisó cada una de las muestras cada tercer día por 40 días bajo el microscopio estereoscópico para observar el crecimiento de hifas y la formación de esclerocios, y corroborar así la viabilidad del micelio de *Sclerotium cepivorum* Berk. A los datos obtenidos se les realizó análisis de varianza (P=95%) usando el paquete estadístico SAS (1996).

### **Sobrevivencia de *Sclerotium cepivorum* Berk. en suelo.**

Suelo obtenido de una parcela del campo Experimental Montecillo del Colegio de Postgraduados se sometió a los siguientes tratamientos: 1) suelo tratado a 15 lb de presión y 120°C por 4h, en dos días consecutivos (doble esterilización) e infestado con micelio (DE+M); 2) suelo tratado a 2.5 lb durante 20 min a 65°C, una sola vez (una sola esterilización) e infestado con micelio (UE+M); 3) suelo no esterilizado infestado con micelio (NE+M); y 4) suelo no esterilizado infestado con 0.05 g de esclerocios (NE+Ecl). Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Las unidades experimentales



consistieron de un frasco de vidrio con 50 g de suelo. El micelio usado como inóculo se preparó en condiciones estériles de la siguiente manera. Se sembraron cinco cajas Petri con medio PDA con al menos siete esclerocios cada una. Una vez crecido el micelio, se cortaron tres cilindros de medio de cada caja y se transfirieron a cajas Petri conteniendo medio líquido (cebolla- dextrosa- agua), con la finalidad de favorecer el crecimiento micelial y evitar al máximo la presencia de medio de cultivo sólido. El micelio de estas cajas se cosechó antes de que se formaran los esclerocios, se colocó en un círculo de papel filtro estéril y se lavó tres veces con agua destilada estéril para eliminar la mayor cantidad de medio y productos metabólicos presentes. El micelio lavado se licuó en 300 ml de agua destilada estéril. Esta suspensión de micelio se pasó a través de un tamiz estéril de 80 mallas para eliminar conglomerados de hifas de tamaño mayor a 0.18 mm (Papavizas, 1972; Utkhede y Rahe, 1979) y primordios de esclerocio. Se agregó 1 ml de Tween 20 a la suspensión y se determinó la concentración de unidades formadoras de colonia (ufc) mediante conteo en hematócítmetro (237 500 ufc /ml). El suelo de cada unidad experimental de los tratamientos DE+M, UE+M y NE+M; fue infestado con 4 ml de suspensión de micelio (950 000 ufc) mezclándose uniformemente con el suelo. Los frascos se guardaron a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en bolsas de plástico negro y en la oscuridad. Para determinar la viabilidad del hongo, se abrieron cuatro frascos por tratamiento a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días después de la infestación, y en cada uno se colocó semienterrado un diente-semilla de ajo previamente desinfestado con hipoclorito de sodio al 2%. Además, alrededor del diente y equidistante se semienterraron tres rodajas delgadas de ajo desinfestadas también con hipoclorito de sodio al 2%, con la finalidad de aumentar la probabilidad de detectar a *Sclerotium cepivorum* Berk. en el suelo. Las rodajas y los dientes de ajo de cada frasco se examinaron diariamente retirando aquellos que mostraban síntomas de descomposición o presencia de micelio. El material vegetal retirado se desinfestó en hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min, se lavó dos veces con agua destilada estéril, se secó en papel estéril y se sembró en cajas Petri con medio PDA. Las cajas se revisaron diariamente para determinar el tipo de patógeno presente en el material vegetal. Cabe aclarar que con los tratamientos DE+M y UE+M siempre se trabajó en campana de flujo laminar tratando de evitar contaminación por otros microorganismos.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (P=95%) y se estimó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (Madden y Campbell, 1990) usando el paquete estadístico SAS (1996).

## RESULTADOS

### Sobrevivencia de *Sclerotium cepivorum* Berk. en medio deshidratado.

El micelio de *S. cepivorum* fue viable después de permanecer 62, 93 y 123 días en cajas Petri con medio PDA seco (Cuadro I). El porcentaje de viabilidad fue mayor a los 62 días que a los 93 y 123 días aunque las diferencias no fueron significativas (P=95%). Una vez que las muestras de micelio en PDA seco se transfirieron a cajas Petri con medio fresco, el tiempo requerido para la reactivación del micelio y su crecimiento hasta la formación de esclerocios fue mayor cuanto más tiempo permaneció el micelio en medio seco. El micelio que estuvo 62 días en medio seco, tardó 6 días en crecer en medio fresco y formar esclerocios, mientras que el que permaneció 123 días en el medio seco tardó 39 días en crecer y formar esclerocios.

Cuadro I. Viabilidad del micelio de *Sclerotium cepivorum* después de permanecer por varios meses en medio PDA seco.

Días que permaneció el micelio en medio seco	Porcentaje <sup>z</sup>	Desviación estándar
62	62.96	39.02
93	22.22	11.11
123	22.22	19.24

<sup>z</sup>Cada cifra representa el promedio de tres repeticiones. Diferencias no significativas (P=95%)

## **Sobrevivencia de *Sclerotium cepivorum* en suelo.**

En ausencia de tejido hospedante el micelio de *S. cepivorum* del tratamiento DE+M sobrevivió y se mantuvo viable hasta por 12 días después de la infestación del suelo con doble esterilización, como lo indicó el hecho de que el patógeno se detectó en las rodajas de ajo utilizadas como trampa. Mientras que en el suelo esterilizado en una sola ocasión (UE+M), el micelio sobrevivió y se mantuvo viable hasta por 10 días posteriores a la infestación, pues el patógeno se detectó tanto en las rodajas como en los dientes de ajo; en contraste, en el suelo no esterilizado (NE+M), el patógeno no se detectó ni en los dientes de ajo ni en las rodajas en ninguna de las fechas de muestreo. En el tratamiento infestado con esclerocios (NE+Ecl), la presencia del patógeno se detectó solo en el diente de ajo, pero no en las rodajas, hasta los 12 días después de la inoculación, lo que sugiere que las condiciones bajo las cuales se desarrolló el ensayo fueron adecuadas para que *S. cepivorum* se desarrollara e infectara.

Para todas las fechas (2, 4, 6, 8, 10 y 12 días después de la inoculación) se registró mayor porcentaje de rodajas de ajo infectadas en el tratamiento de suelo con doble esterilización (DE+M) que en el suelo esterilizado una sola vez (UE+M) 55.5, 88.8, 66.6, 91.6, 50.0 y 66.6%, y 0.0, 77.7, 50.0, 75.0, 66.6 y 0.0%, respectivamente; aunque las diferencias entre tratamientos no fueron significativas ( $P=95\%$ ). Tampoco las diferencias entre tiempos de un mismo tratamiento fueron significativas. El área bajo la curva del progreso de la enfermedad estimada fue mayor en el tratamiento DE+M (589.277) que en el tratamiento UE+M (520.834), aunque las diferencias tampoco fueron significativas ( $P=95\%$ ).

El porcentaje de dientes de ajo infectados (Figura 2) fue mayor en el suelo DE+M que en el suelo UE+M en tres fechas (25, 75 y 75% para DE+M; 0, 50 y 50% para UE+M a los 2, 4 y 8 días después de la infestación, respectivamente); no obstante el análisis estadístico indicó que las diferencias no fueron significativas ( $P=95\%$ ). En las demás fechas, el porcentaje de dientes de ajo infectados fue igual (25, 25 y 0% para DE+M y UE+M a los 6, 10 y 12 días después de la inoculación, respectivamente).

El tiempo que le llevó a *S. cepivorum* para crecer y formar esclerocios en las rodajas y dientes de ajo fue variable, tardando entre 11 y 35 días después de que el material vegetal se sembró en el suelo.

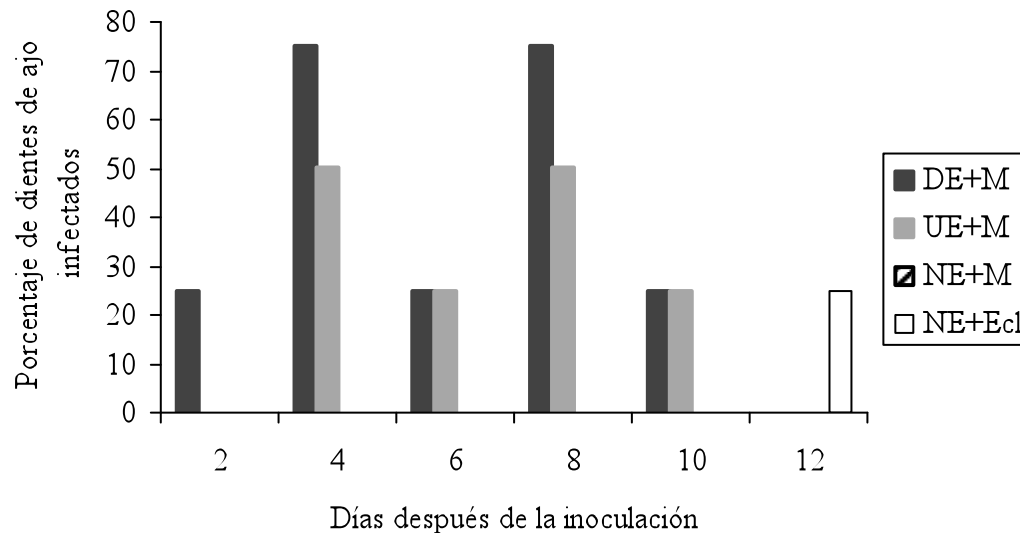


Figura 2. Incidencia de dientes de ajo infectados con *Sclerotium cepivorum* después de haber estado expuestos por diferentes tiempos en suelo infestado con micelio o esclerocios del hongo.

DE+M= Suelo estéril inoculado con micelio. UE+M= Suelo semiestéril inoculado con micelio. NE+M= Suelo no estéril inoculado con micelio. NE+Ecl= Suelo no estéril, inoculado con esclerocios. Diferencias no significativas (P=95%)

## DISCUSIÓN

Es conocido que los propágulos de diferentes hongos pueden sobrevivir en condiciones ambientales adversas por largos periodos de tiempo. Esporas de varias especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, entre otros, pueden sobrevivir por varios años en ambientes con potenciales hídricos de -75 MPa (Carlile *et al.*, 2001) mientras que en forma de micelio es capaz de crecer en medios con

potenciales hídricos que van de los -30 a los -40 MPa, aunque su actividad fisiológica y tasa de crecimiento disminuyen (Carlile *et al.*, 2001; Hockin, 1993). Los resultados obtenidos sugieren un comportamiento similar en *S. cepivorum*. Sus esclerocios pueden sobrevivir por más de 15 años en estado de dormancia, estado en el cual la actividad fisiológica es muy baja y el esclerocio no germina aún cuando el hospedante se encuentra presente (Coley-Smith *et al.*, 1987; Coley-Smith *et al.*, 1990). Los resultados de viabilidad del micelio en cajas Petri con medio deshidratado, indican que la baja actividad también puede expresarse en el micelio, permitiéndole sobrevivir al menos hasta por 3 meses en condiciones de déficit de agua; aunque fue evidente que a mayor tiempo de exposición al estrés por falta de humedad, mayor fue el tiempo requerido para la reactivación de su crecimiento cuando las condiciones se tornaron favorables. En condiciones naturales, las variaciones hídricas en el suelo también afectan el crecimiento de los hongos, como en el caso del crecimiento de rizomorfos de *Armillaria luteobalina*, que en el suroeste de Australia solo crece a 12 cm de profundidad al inicio del verano y a finales del otoño; mientras que a mediados del verano el suelo es demasiado seco para que el crecimiento sea significativo (Pearce y Maljezuc, 1990).

*S. cepivorum* sobrevivió por un tiempo mayor (hasta 12 días) en suelo con doble esterilización (DE+M), en comparación con el suelo tratado una sola vez a 2.5 lb durante 20 min y 65°C; sugiriendo que en el primer caso pudo haber existido una menor cantidad y/o variabilidad de la biota que permitió que las hifas del hongo permanecieran viables por más tiempo; ya que las condiciones y tiempo de esterilización (tratado a 15 lb de presión y 120°C por 4h , en 2 días consecutivos) muy probablemente resultaron letales para prácticamente toda la biota del suelo. El hecho de que en el suelo no estéril (NE+M) no se haya detectado a *S. cepivorum* confirma los resultados de Scott (1956). Su incapacidad de sobrevivir pudo deberse a las poblaciones microbianas antagonistas presentes en el suelo (Coley-Smith y Cooke, 1971; Jackson *et al.*, 1991) que suprimen el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* (Dhyani y Chauhan, 1976) *Glomus sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma sp.* y *Chaetomium globosum*, entre otros, y que se han consignado como antagonistas capaces de disminuir la incidencia de la pudrición

blanca en campo (Clarkson *et al.*, 2001; Clarkson *et al.*, 2002; Kay y Stewart, 1994; Metcalf y Wilson, 2001; Torres *et al.*, 1996). *T. harzianum* es capaz de controlar el crecimiento del micelio y la formación de esclerocios de *S. cepivorum* mediante la excreción de metabolitos secundarios como las tricozianinas (Correa *et al.*, 1996), mientras que *T. viridae* y *Trichoderma pseudokoningii* pueden degradar esclerocios (Clarkson *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el micelio de *Sclerotium cepivorum* permaneció viable por 123 días bajo condiciones de estrés por falta de humedad *in vitro*, pero en suelo no esterilizado no fue posible reaislarlo, aún en un periodo tan corto de solo 2 días posteriores a la infestación del suelo con hifas de *S. cepivorum*.

## LITERATURA CITADA

- Ali, A.A. 1976. The effect of certain environmental factors and varietal test trials on the incidence of white rot disease of onions caused by *Sclerotium cepivorum* Berk., in A. R. E. Agricult. Res. Rev. 54(2):43-51.
- Banks, E.; Edgington, L.V. 1989. Effect of integrated control practices on the onion white rot pathogen in organic soil. Can. J. Plant Path. 11:268-272
- Beute, K.; Benson, D.M. 1979. Relation of small soil fauna to plant disease. Ann. Rev. of Phytopath. 17:485-502.
- Brix, H.D.; Zinkernagel, V. 1992. Effects of cultivation, conditioning and isolate on sclerotia germination in *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathol. 41:13-19.
- Carlile, M.J.; Watkinson, S.C.; Gooday, G.W. 2001. The fungi. Ed. Elsevier. England. 588 p.
- Clarkson, J.P.; Payne, T.; Whipps, J.M. 2001. A screening system for identifying biological control agents of *Sclerotium cepivorum*. Bull. OILB/SROP 24:71-74.
- Clarkson, J.P.; Payne, T.; Mead, A.; Whipps, J.M. 2002. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. Plant Pathol. 51:735-745.

- Clarkson, J.P.; Mead, A.; Payne, T.; Whipps, J.M. 2004. Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathol.* 53:353-362.
- Coley-Smith, J.R.; Cooke, R.C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9:65-92.
- Coley-Smith, J.R.; Parfitt, D.; Taylor, I.M.; Reese, R.A. 1987. Studies of dormancy in sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathol.* 39:214-222.
- Coley-Smith, J.R.; Mitchell, C.M.; Sansford, C.E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathol.* 39:58-69.
- Correa, A.; Roquebert, M.F.; Bettucci, L. 1996. Trichorzianins activity on mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* under laboratory conditions *in vitro*. *Criptogamie Mycol.* 17(2):123-128.
- Crowe, F.J.; Hall, D.H. 1980. Vertical distribution of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and host root systems relative to white rot of onion and garlic. *Phytopathol.* 70:70-73.
- Crowe, F.J.; Carlson, H.; Kirby, D.; Simmons, R.B.; Farris, N. 2006. Effect of flooding on sclerotia of the allium white rot fungus (*Sclerotium cepivorum*). Final Report from experimental field trials 1992-1993 and 2004-2005. 2006 Annual Report Research from 2005. Central Oregon Agricultural Research Center. p.23-34.
- Dhyani, S.C.; Chauhan, S.K. 1976. Survival of *Sclerotium cepivorum* Berk. as competitive saprophyte on agar plate. *J. Indian Bot. Soc.* 55:197-200.
- Entwistle, A.R. 1990. *Allium* white rot and its control. *Soil Use and Manag.* 6:201-209.
- Gindro, C.; L'Hoste, G. 1997. Germination and infectious potential of microconidia of *Sclerotium cepivorum*. *J. Phytopathol.* 145:171-175.
- Hockin, A.D. 1993. Responses of Xerophilic Fungi to Changes in Water Activity, pp. 233-256. *In: Stress Tolerance of Fungi.* Jennings DH (ed). Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. E.U.A.
- Huang, H.C.; Harper, A.M.; Kokko, E.G.; Howard, R.J. 1981. Aphid transmission of *Verticillium albo-atrum* to alfalfa. *Canadian J. Plant. Pathol.* 5:141-147.
- INEGI. 2005. Perspectiva estadística. Estados de Aguascalientes, Zacatecas y Guanajuato. Disponible en [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).
- Jackson, A.M.; Whipps, J.M.; Lynch, J.M. 1991. *In vitro* screening for the identification of potential biocontrol agents of *Allium* white rot. *Mycol. Res.* 95:430-434.
- Kalb, D.W.; Millar, R.L. 1986. Dispersal of *Verticillium albo-atrum* by Fungus Gnat (*Bradysia impatiens*). *Plant Disease* 70:752-753.
- Kay, S.J.; Stewart, A. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathol.* 43:371-377.
- Madden, L.V.; Campbell, C.L. 1990. Nonlinear disease progress curves. Pp. 181-229. *In: Epidemics of plant diseases. Mathemat. analysis and model.* Kranz, J. (ed). Ed. Springer. E.U.A.
- Metcalf, D.A.; Wilson, C.R. 2001. Progress toward a biological control system for onion white root rot in Tasmania. *Acta Hort.* 555:123-127.
- New, C.M.; Coley-Smith, J.R.; Georgy, N.I. 1984. Scanning electron microscopy of sclerotial germination in *Sclerotium cepivorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83(4):690-693.

- Papavizas, G.C. 1972. Isolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil. *Phytopathol.* 62:545-549.
- Pearce, M.H.; Malajezuc, N. 1990. Factors affecting growth of *Armillaria luteobubalina* rizomorphs in soil. *Mycol. Res.* 94:1081-1085.
- Pérez-Moreno, L.; Olalde-Portugal, V.; Salinas-Gonzalez, J.G.; Sánchez-Pale, J.R.; Entwistle, A.R. 1998. Current known distribution of white rot *Sclerotium cepivorum* Berk. In México. pp. 1-6. *In: Proceedings of the Sixth International Workshop on Allium White Rot.* Entwistle, A.R.; Pérez M., L. (eds.) Irapuato Guanajuato, México.
- Pérez-Moreno, L. 2002. Current know distribution of white rot *Sclerotium cepivorum* Berk. in Mexico. (resumen) *In: 7<sup>th</sup>. International Workshop on Allium White Rot.* Harris Ranch, California. E. U. A.
- Ramírez-Suárez, A.; Zavaleta-Mejía, E.; Osada-Kawasoe, S.; Sánchez-Gálvez, M.C.; Valdéz-Carrasco, J. 2002 A possible role for *Rhizoglyphus robustus* Nesbitt (Astigmata: Acaridae) in transmission of *Sclerotium cepivorum* Berk. (Deuteromycetes: Mycelia-Sterilia). *App. Ent. Zool.* 37:663-669.
- Redondo, J.E.; Hernández, A. 1985. Disminución de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* B. en el suelo por inundación. pp. 39. *In: Memorias del XII Congreso Nacional de Fitopatología.* Guanajuato. México.
- Scout, M.R. 1956. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. I. Growth of the mycelium in soil. *Annals App. Biol.* 44(4):576-583.
- Somerville, P.A. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation, and germination stimulants to reduce inoculum density. *Plant Disease.* 71(3):229-233.
- Torres-Barragán, A.; Zavaleta-Mejía, E.; González-Chávez, C.; Ferrera-Cerrato, R. 1996. The use of arbuscular mycorrhizae to control onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) under field conditions. *Mycorrhiza* 6:253-257.
- Utkhede, R.S.; Rahe, J.E. 1979. Wet sieving flotation technique for isolation of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from muck soil. *Phytopathol.* 69:295-297.
- Yang, S.M.; Rogers, C.E.; Luciani, N.D. 1981. Transmission of *Macrophomina phaseolina* in sunflower by *Cylindrocopturus adspersus*. *Phytopathol.* 73:1467-1469.



### **CAPITULO III. GENES ASOCIADOS A LA GERMINACIÓN NO ERRUMPENTE DE *Sclerotium cepivorum* BERK.**

#### **RESUMEN**

Se generó una biblioteca sustractiva con los genes asociados a la germinación no errumpente de *Sclerotium cepivorum*. Para generar la biblioteca sustractiva se determinaron las condiciones óptimas para obtener germinación errumpente y no errumpente de esclerocios de *S. cepivorum*. A 22° C, el 96.7% de los esclerocios germinaron de forma no errumpente en presencia de agua, y el 91.67% de los esclerocios germinó de forma errumpente en presencia de disulfuro de alilo (DAS) al 2%. En la biblioteca sustractiva se obtuvieron 23 fragmentos de genes asociados a la germinación no errumpente de *S. cepivorum*. Estos genes tuvieron similitudes significativas con 15 proteínas diferentes, las cuales participan en los procesos de respiración, transcripción, traducción, transducción de señales y síntesis de aminoácidos y proteínas. Los resultados sugieren que la germinación no errumpente es más rápida que la germinación errumpente debido a un incremento en los procesos metabólicos de los esclerocios de *S. cepivorum* germinados de forma no errumpente.

Palabras clave adicionales: Hibridación sustractiva, germinación errumpente, disulfuro de alilo, GenBank.

#### **SUMMARY**

A subtractive library of genes associated to hyphal type of *Sclerotium cepivorum* was generated. In order to generate the subtractive library, optimum conditions to have eruptive and hyphal germination of *S. cepivorum* sclerotia were determined. At 22° C, 96.7% of sclerotia germinated hyphally in water presence and 91.67% of sclerotia germinated eruptively in presence of 2% allyl disulfide (DAS). 23 fragments of genes associated to hyphal germination of *S. cepivorum* were obtained in the subtractive library. Those genes had significant similarity to 15 different proteins that participate in respiration, transcription, translate, signal transduction and amino acid and protein synthesis process. The results suggest that hyphal germination is faster than eruptive

germination because have an increment in the metabolic process in sclerotia of *S. cepivorum* germinated hyphally.

Additional Keywords: subtractive hybridization, eruptive germination, allyl disulfide, GenBank.

## INTRODUCCIÓN

*Sclerotium cepivorum* es el agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanca, que disminuye drásticamente la producción y calidad del cultivo de ajo y cebolla en México y en el mundo (Entwistle, 1990a). Este patógeno ataca solo a plantas del género *Allium* ya que los exudados radicales de estas plantas son transformados por la microbiota produciendo monosulfuros o disulfuros de n-prop(en)il cisteína, los cuales promueven la germinación de los esclerocios (Banks y Edgington, 1989; Entwistle, 1990b; Esler y Coley-Smith, 1983). Sin embargo, la fisiología y bioquímica del proceso se desconoce (Coley-Smith *et al.*, 1987).

Estudios realizados *in vitro* han mostrado que los esclerocios de *S. cepivorum* presentan dos tipos de germinación: errumpente y no errumpente. La germinación errumpente está vinculada a la presencia de exudados radicales del hospedante (Coley-Smith, 1960; New *et al.*, 1984; Backhouse y Stewart, 1987; Somerville y Hall, 1987) y se caracteriza por la aparición de protuberancias en la superficie del esclerocio; en dichas protuberancias, la cubierta se abre y sale una porción de micelio. Después de esta germinación, denominada “errumpente”, las hifas crecen fuera de la protuberancia alcanzando de 1 a 2 cm de longitud (New *et al.*, 1984).

El otro tipo de germinación ocurre generalmente en ausencia del hospedante (New *et al.*, 1984; Backhouse y Stewart, 1987; Somerville y Hall, 1987) y se manifiesta por la producción de numerosas hifas individuales que emergen atravesando la cubierta ilesa (Backhouse y Stewart, 1987; New *et al.*, 1984). Este tipo de germinación gasta solamente una pequeña cantidad de los materiales de reserva por

lo que el esclerocio es capaz de germinar otra vez (New *et al.* 1984), manteniéndose como fuente de inóculo primario en el suelo.

El que los esclerocios germinen en presencia de los exudados radicales del género *Allium*, sugiere que los volátiles generados a partir de éstos actúan en la capa de células próxima a la cubierta del esclerocio (Backhouse y Stewart, 1987). Se ha propuesto que los compuestos volátiles promueven el crecimiento de hifas que pueden abrir la cubierta mediante presión, secreción de enzimas o ambas (Crowe y Bafus, 2002).

El determinar qué genes son los que se expresan durante la germinación de los esclerocios ayudará a dilucidar los procesos bioquímicos y fisiológicos entre los dos tipos de germinación. Cuando se logre elucidar los factores involucrados en este proceso podremos contar con más elementos para diseñar mejores estrategias de manejo de la enfermedad. Por esta razón, uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar qué genes se expresan de forma diferencial en la germinación no errumpente de *S. cepivorum* mediante hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (HSS). En esta técnica, se compara el RNA mensajero de dos poblaciones y se obtienen fragmentos de genes que se expresan en una de las poblaciones pero no en la otra (Diatchenko *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1998). Para obtener los fragmentos de genes asociados en la germinación no errumpente mediante esta técnica, es necesario obtener el mRNA de los esclerocios que en su mayoría germinen de forma errumpente y de forma no errumpente, a las pocas horas en que este proceso halla comenzado. Los estudios sobre germinación de *S. cepivorum* (Backhouse y Stewart, 1987; New *et al.*, 1984; Somerville y Hall, 1987) reportan el porcentaje de esclerocios germinados de forma errumpente y no errumpente como resultado de una sola observación hecha después de varios días (de 2 a 20) de someter a los esclerocios a disulfuro de alilo (DAS), pero no hay datos del comportamiento de ambos tipos de germinación a las pocas horas de comenzado el proceso, por lo que en el presente trabajo también se determinaron las condiciones óptimas para inducir la germinación errumpente y no errumpente de *S. cepivorum*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Determinación de condiciones óptimas para inducir la germinación errumpente y no errumpente**

#### Material biológico

Con el objeto de generar un cultivo monoesclerótico se tomó al azar un esclerocio de entre varios obtenidos de suelo infestado naturalmente del rancho “El Colorado”, ubicado en el municipio de Cortázar, Guanajuato.

#### Tratamientos

Para poder dar seguimiento al tipo de germinación de cada uno de los esclerocios, se llevaron a cabo 5 tratamientos: esclerocios germinados en presencia de agua (DAS 0%) a 17° y 22° C, esclerocios germinados en presencia de 1% de disulfuro de alilo (DAS 1%) a 17° y 22° C; y esclerocios germinados en 2% de disulfuro de alilo (DAS 2%) a 22°C .

Para cada uno de los tratamientos los esclerocios se sembraron de la siguiente forma. En una caja Petri de 10 cm. de diámetro se colocaron 10 gotas de PDA. Una vez solidificado el medio, se colocó un esclerocio por gota de agar. Los esclerocios sembrados previamente fueron desinfectados 2 min en hipoclorito de sodio al 1%, enjuagados dos veces en agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel absorbente estéril. Para sembrar cada uno de los esclerocios sin dañar mecánicamente la corteza se usó un pincel estéril. Una vez sembrados los esclerocios, se colocó en medio de la caja Petri un trozo de algodón estéril de 1x1cm impregnado con 1mL de agua destilada estéril o 1mL de disulfuro de alilo a la concentración correspondiente. La caja fue sellada con película autoadherente, colocada en una bolsa con cierre marca Ziploc® y esta a su vez dentro de un recipiente tupper de plástico. Los esclerocios se incubaron a 17° y a 22°C y se revisaron cada 24 horas usando un microscopio estereoscópico (Zeiss®) durante 16 días. Se catalogó como

germinación errumpente cuando se apreciaba un daño mecánico en la corteza del esclerocio y se observaban emerger a través de la apertura del esclerocio las hifas; se catalogó como germinación no errumpente cuando no se apreciaba un daño mecánico pero sí el crecimiento de hifas al exterior del esclerocio. Cada tratamiento constó de un total de 10 cajas Petri.

### **Generación de la biblioteca sustractiva de genes asociados en la germinación no errumpente**

Germinación de esclerocios.

Los esclerocios usados provinieron del cultivo monoesclerótico usado anteriormente. Se seleccionaron 2 tratamientos de acuerdo a los datos obtenidos en la determinación de las condiciones óptimas para inducir la germinación errumpente y no errumpente en esclerocios de *S. cepivorum*. El primer tratamiento fue esclerocios germinados en presencia de agua (DAS 0%) a 22° C y el segundo esclerocios germinados en presencia de 2% de disulfuro de alilo (DAS 2%) a 22° C.

Para cada uno de los tratamientos se pesaron 0.1 g de esclerocios (4794 esclerocios aproximadamente). Los esclerocios se desinfectaron 2 min en hipoclorito de sodio al 1%, y luego se enjuagaron 2 veces en agua destilada estéril. Se dejaron secar sobre papel absorbente estéril. Los tratamientos se prepararon de la siguiente forma. En una caja Petri de 10 cm. de diámetro con medio PDA, se colocó un círculo de tela de tul estéril con un agujero en medio. Con una aguja de disección se cortó del medio PDA un círculo que coincidiera con el círculo de la tela de tul. El círculo cortado de PDA se desechó. Finalmente, en medio del círculo de PDA se colocó un cuadrado de algodón compacto estéril y seco (Fig. 3).

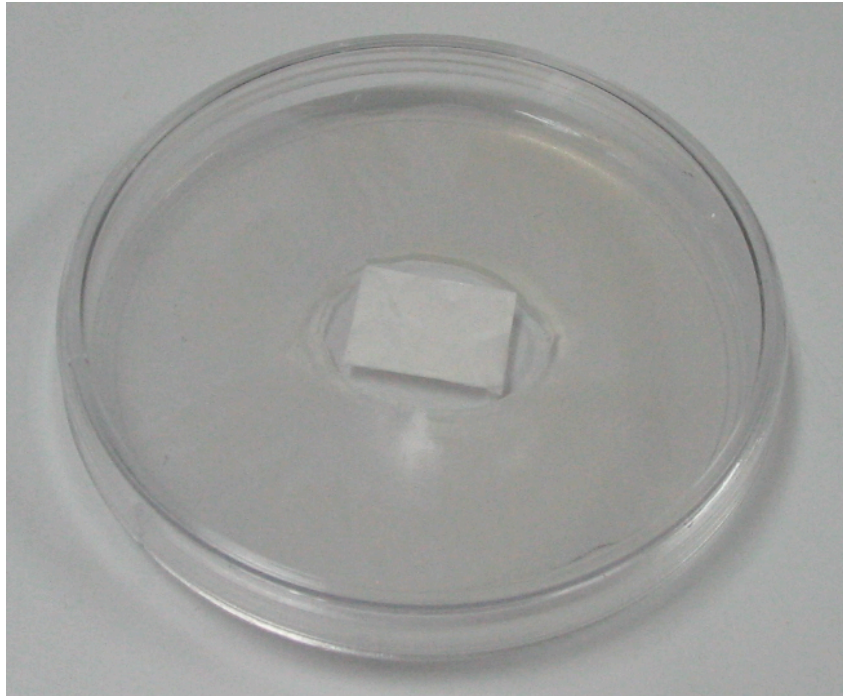


Figura 3. Caja Petri con medio PDA, tela de tul y algodón, preparada para el ensayo.

Sobre la tela de tul de cada caja se colocaron los 0.1 gramos de esclerocios desinfectados y secos. Una vez sembrados los esclerocios, se colocó 1mL de agua destilada estéril o 1mL de disulfuro de alilo al 2% sobre el algodón estéril. La caja fue sellada con película auto adherible, colocada en una bolsa con cierre Ziploc y esta a su vez dentro de una caja de plástico con tapa. Los tratamientos se incubaron a 22 °C. Cada uno de los tratamientos se cosechó a las 24 horas colocándolos en nitrógeno líquido y posteriormente se conservaron a -20 °C.

Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión.

La muestra de esclerocios se molió hasta obtener un polvo fino en un mortero previamente esterilizado y enfriado a -80 °C. Se usó nitrógeno líquido para mantener la muestra fría. La extracción de RNA total se hizo con el kit RNeasy® (QIAGEN).

Posteriormente se sintetizó el cDNA usando el kit BD SMART™ (Biosciences, Clontech). El cDNA se purificó usando las columnas Chroma Spin™ (Clontech). Se

validó el banco obtenido usando los primers 3'(GCGGACAGTCAAGTCAACAAC) y 5'(GGTGTCAACAACGAGACCTACA) para el gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Para las técnicas que incluyeron un paso de PCR se usó un termociclador Perkin-Elmer® 2400). Para corroborar la presencia de cDNA se corrió una PCR considerando el siguiente programa: una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C 4 min., seguido de 30 ciclos con temperaturas y tiempos de 94 °C 1min. (desnaturalización), 55 °C 1.5 min. (alineamiento) y 72 °C 1 min. (extensión). La extensión final fue de 72 °C 7 min.

La hibridación sustractiva se realizó usando el Kit PCR-Select™ cDNA subtraction (Clontech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como muestra problema se consideró el cDNA de los esclerocios germinados con agua y como control los esclerocios germinados con DAS 2%. Se realizó, junto con la hibridación sustractiva, un control no sustraído. El control no sustraído contiene todos los fragmentos de genes presentes tanto en la condición problema (esclerocios germinados con agua) como en la control (esclerocios germinados con DAS 2%). El control no sustraído sirve de referencia para corroborar que la hibridación sustractiva se ha llevado a cabo con éxito o no al comparar su patrón de bandeos con el de la muestra sustraída, que debe ser diferente en cada una de las muestras.

Transformación, extracción de DNA plasmídico y verificación de inserto.

El producto de la hibridación sustractiva se corrió en un gel de agarosa al 1.2%. De éste gel se cortaron las bandas de 250 pb y mayores, y se purificaron usando el kit QUIAEX II, (QIAGEN). El producto purificado se usó para transformar células competentes usando el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen), el vector pCR®4-TOPO®, y las células de *Escherichia coli* químicamente competentes TOP10.

Las clonas obtenidas se multiplicaron en tubos Falcon de 15 ml. Con medio Luria Bertani (LB, anexo II), ampicilina y kanamicina.

Para realizar la extracción de DNA plasmídico, se usó el kit QIAGEN® Plasmid Purification mini (QIAGEN) con las modificaciones al protocolo que se muestran en el

Anexo I. Para verificar el tamaño de inserto de cada uno de los DNAs plasmídicos se realizó una digestión con la enzima Eco RI de la marca Fermentas®.

Análisis tipo Southern.

Las sondas control y problema se marcaron con fluoresceína usando el kit Gene Images Random Primer Labeling (Amersham Biosciences). Un aparato Slot Blot Filtration Manifold fue usado para realizar la hibridación tipo Southern. Tanto de los plásmidos como de los controles positivos se usaron 2.6 µg de DNA. Al término del protocolo, las membranas se observaron con luz normal y se seleccionaron aquellas donde la intensidad fue mayor con la sonda problema que con la sonda control.

Secuenciación.

El ADN plasmídico de las muestras seleccionadas como diferenciales en el análisis tipo Southern se purificaron usando el kit QIAprep miniprep (QIAGEN). Posteriormente, estas muestras se mandaron a secuenciar al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) unidad Irapuato.

Comparación en el GenBank

Las secuencias obtenidas primero se revisaron en busca de contaminaciones con vector, con oligos o con adaptadores, usando el programa vecscreen del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>).

A las secuencias se le quitaron los nucleótidos pertenecientes a oligos y adaptadores. Una vez limpias, las secuencias se tradujeron a proteína y se compararon con la base de datos en línea usando el programa blastx ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Translations&PROGRAM=blastx&BLAST\\_PROGRAMS=blastx&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Translations&PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on)) del



NCBI. Con la información obtenida, se clasificaron las secuencias de acuerdo a los diferentes genes que probablemente pertenecían.

Registro en el GenBank

Las secuencias ya clasificadas se mandaron por correo electrónico al GenBank para su registro, de acuerdo al formato que exige el NCBI.

## **RESULTADOS**

### **Condiciones óptimas para inducir la germinación errumpente y no errumpente**

En la mayor parte de los esclerocios, la primera señal de germinación errumpente fue la aparición de una o más protuberancias en la corteza del esclerocio (Fig. 4 A, obsérvese la flecha), seguida generalmente de la ruptura de la corteza (Fig. 4 B) y la emergencia de un conglomerado de hifas (Fig. 4 C y D).

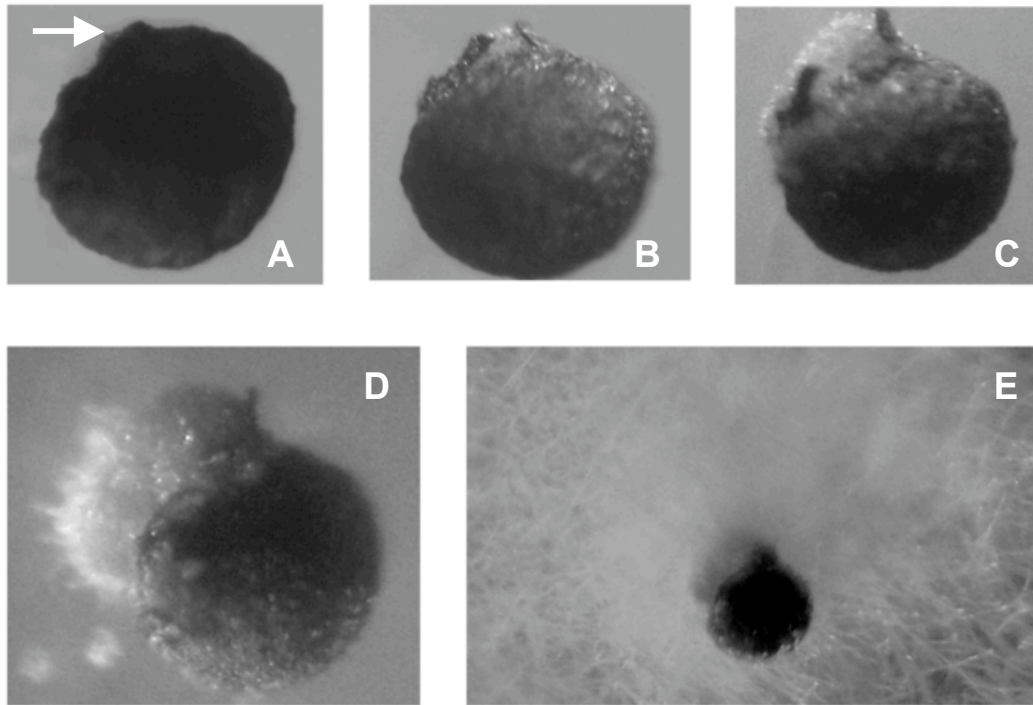


Figura 4. Germinación errumpente de esclerocio de *S. cepivorum* expuesto a 2% de DAS.

- A) La flecha indica la aparición de una protuberancia en el esclerocio a los 7 dds. B) Ruptura de la corteza y exposición del micelio a los 8 dds. C) Crecimiento del micelio hacia el medio de cultivo a los 9 dds. D) Crecimiento de micelio en el medio de cultivo a los 10 dds. y E) 12 dds.

En contados casos, las primeras protuberancias que se formaban en la corteza del esclerocio (Fig. 5 A, obsérvese la flecha) no siempre eran las primeras en mostrar daño mecánico de la corteza y micelio emergiendo de ellas, sino que aparecían otras protuberancias en la corteza (Fig. 5 C, obsérvese la flecha superior izquierda) y éstas eran las que mostraban daño mecánico, emergiendo posteriormente el mechón de hifas (Fig. 5 D).

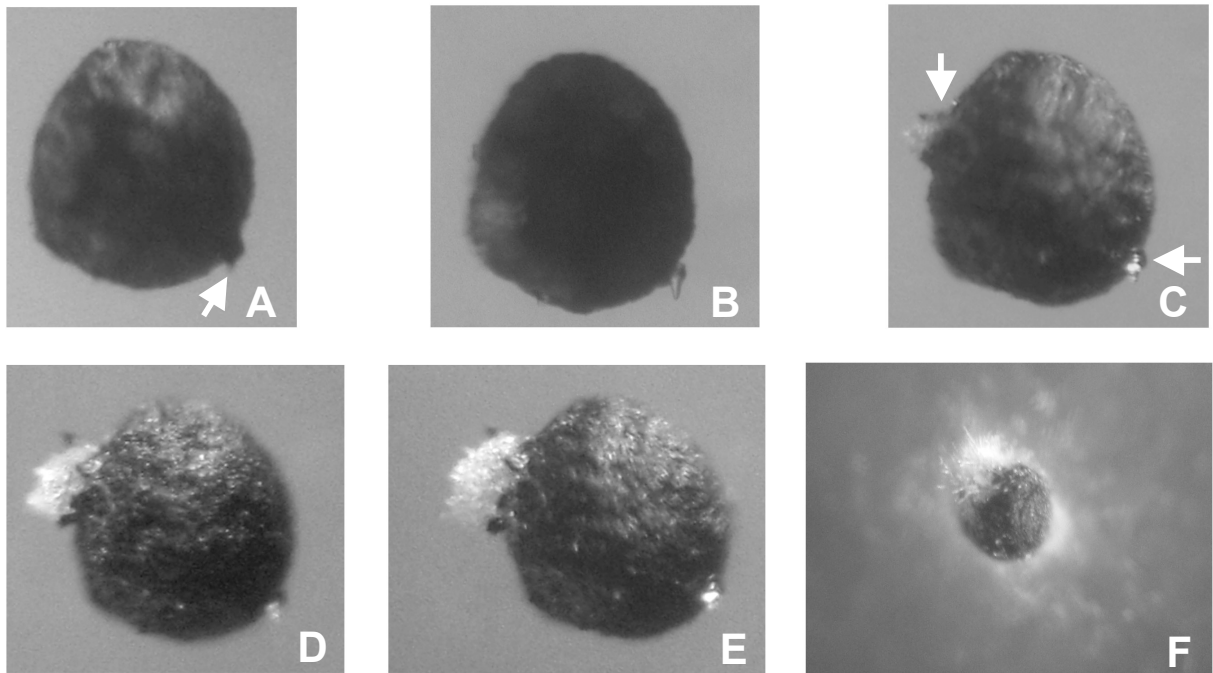


Figura 5. Germinación errumpente de esclerocio de *S. cepivorum* expuesto a 2% de DAS.

- A) La flecha indica la aparición de una protuberancia a los 3 dds. B) La protuberancia no ha sufrido cambios a los 7 dds. C) La flecha superior izquierda muestra ruptura de la corteza del esclerocio y emergencia de hifas en un punto diferente al de la primera protuberancia indicada por la flecha inferior derecha a los 8 dds. D) Emergencia de hifas a través de la ruptura de la corteza a los 9 dds. y E) 10 dds. F) Crecimiento de micelio en el medio de cultivo a los 11dds.

En la mayor parte de los esclerocios germinados de forma no errumpente, se apreciaron hifas que emergían a través de la corteza del esclerocio (Fig. 6A, obsérvese la flecha) pero no se observó daño mecánico en la corteza en el momento de que las hifas emergieron del esclerocio ni en días posteriores (Obsérvese la Fig. 6 de A a F).

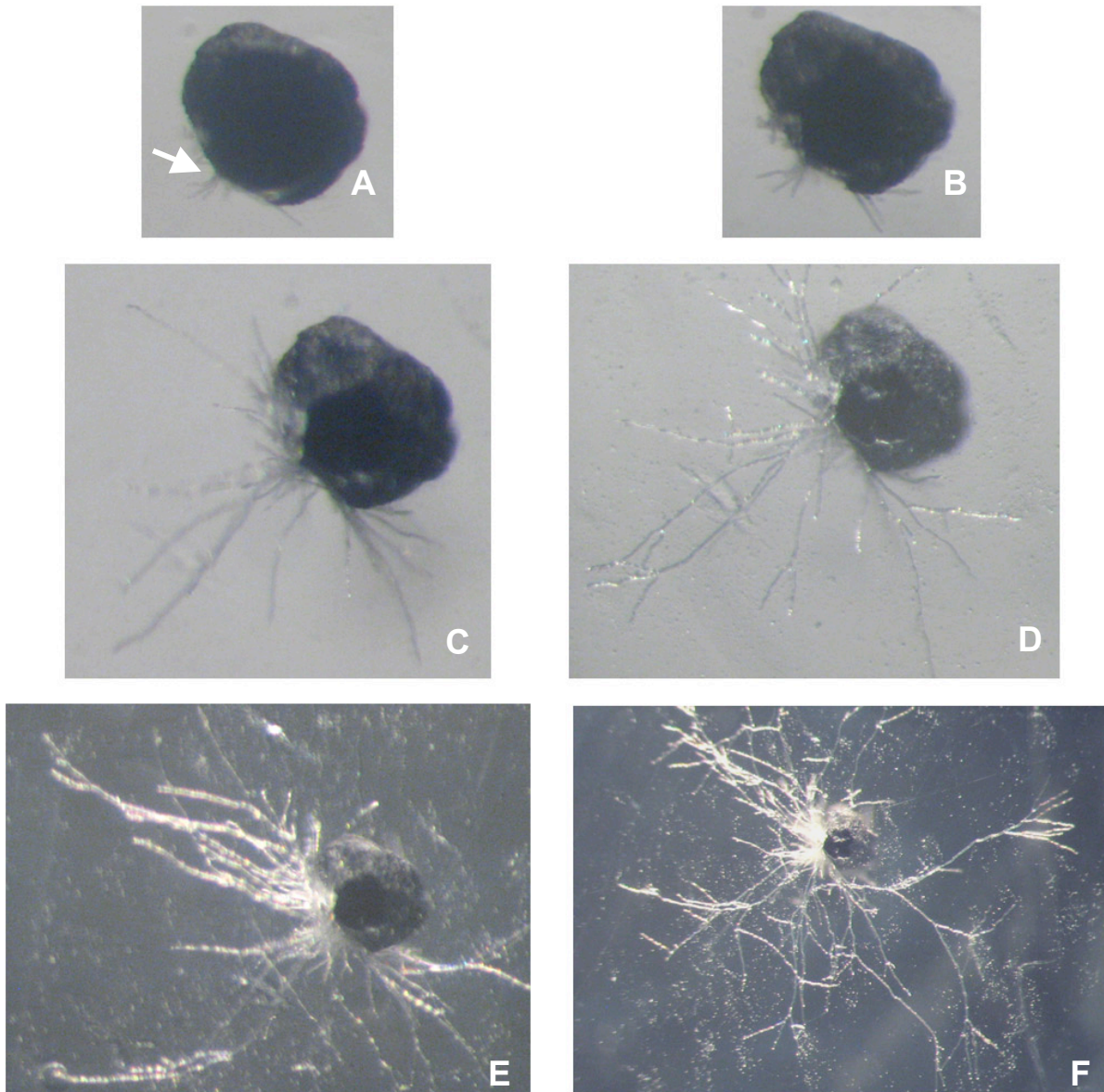


Figura 6. Germinación no errumpente de esclerocio de *S. cepivorum* expuesto a 0% de DAS. A) La flecha indica el crecimiento de hifas a través de la corteza intacta a los 3 dds. B) Emergencia de varias hifas a través de la corteza a los 4 dds. C) Crecimiento de micelio en el medio de cultivo a los 6 dds., D) 7 dds., E) 8 dds. y F) 10 dds.

El total de esclerocios germinados por tratamiento fue mayor en los esclerocios expuestos al agua que en los esclerocios expuestos a DAS, observándose a 22° C un porcentaje de germinación de 91, 85 y 60% con 0, 1 y 2% de DAS respectivamente. A 17°C, se observó una germinación de 90 y 64% con 0 y 1% de DAS respectivamente.

Solo en dos de los 91 esclerocios expuestos a 22° C y 0% DAS (agua estéril) se apreciaron los dos tipos de germinación. En el primero, se observó el surgimiento de una o más hifas a través de la corteza (como en la germinación no errumpente) y dos días después, la ruptura de la corteza y la emergencia de muchas hifas a través de ella. En la corteza nunca se formó una protuberancia (característica de la germinación errumpente). En el segundo esclerocio, se observó la emergencia de una hifa a través de un lado de la corteza (germinación no errumpente), un día después se observó del otro lado de la corteza la formación de una protuberancia de la cual emergieron muchas hifas y también se observó daño mecánico de la corteza al cabo de un par de días. Cabe mencionar que en ambos esclerocios se clasificó la germinación como no errumpente ya que las características de la primera forma de germinar correspondieron a este tipo.

Un mayor porcentaje de germinación errumpente estuvo relacionado con una mayor concentración de DAS, mientras que un mayor porcentaje de germinación no errumpente se encontró en los tratamientos con agua (Figura 7). Solo en el tratamiento de agua a 17° C. se observó que el 100% de los esclerocios germinados lo hizo de forma no errumpente. En los demás tratamientos, siempre hubo germinación de los dos tipos pero en diferente porcentaje.

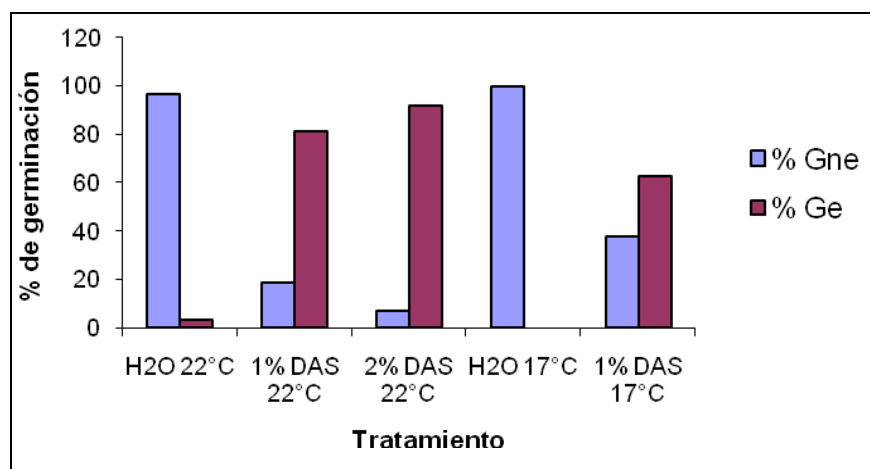


Figura. 7. Porcentaje de germinación errumpente y no errumpente por tratamiento.

Gne = Germinación no errumpente. Ge = Germinación errumpente.

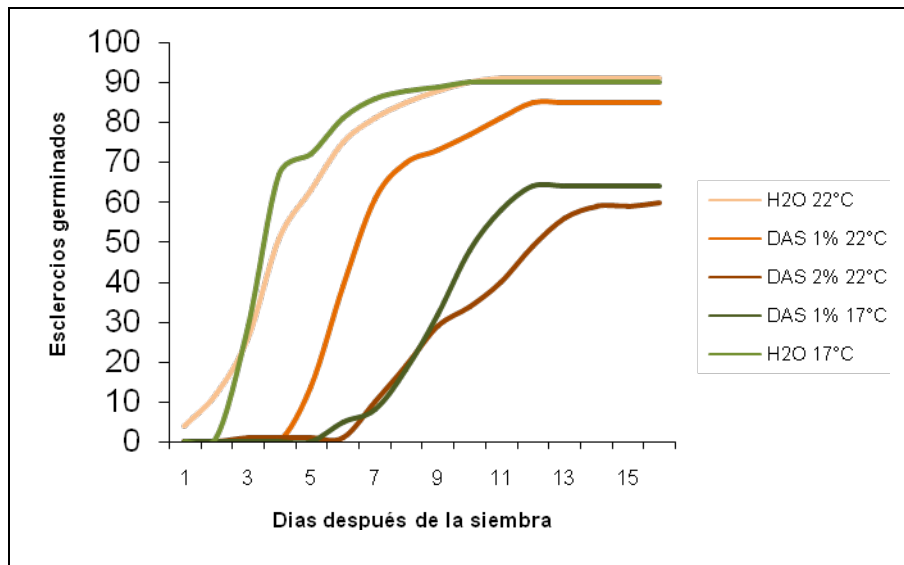


Figura 8. Germinación acumulada de esclerocios expuestos a disulfuro de alilo (DAS) e incubados a 17° y 22° C.

De forma general, los esclerocios con 0% de DAS germinaron más rápido que los expuestos a 1 y 2% de DAS, observándose 4 esclerocios ya germinados el primer día a 22° C y uno el segundo día a 17° C (Figura 8). En las cajas Petra expuestas a DAS se observaron los primeros esclerocios germinados hasta los 5 (22° C, 1% DAS), 3 (22° C, 2% DAS) y 6 días (17°C, 1% DAS) después de la siembra. La mayoría de los esclerocios expuestos a 0% de DAS germinaron entre los 3 y 7 dds en ambas temperaturas (81 y 86 esclerocios a 22° y 17° C respectivamente), la mayoría de los expuestos a 1% de DAS y 22° C lo hicieron entre los 5 y 11 dds, y los expuestos a 1% y 2% de DAS a 17° y 22° C respectivamente, lo hicieron entre los 8 y 13 dds (Figura 8).

En la germinación no errumpente, las hifas crecieron de forma más larga y delgada que en la germinación errumpente (compárense las figuras 3 y 4 con la 5). No se observó relación entre la dirección del crecimiento de las hifas y el lugar donde se encontraba la fuente de estímulo (agua o DAS). También se observó en el caso de los esclerocios germinados de forma errumpente que, cuando las hifas emergían del esclerocio y tocaban la superficie de la gota de medio PDA, el crecimiento del micelio era rápido y de forma compacta, formándose esclerocios entre los 15 y 17 dds,

mientras que en la germinación no errumpente, el crecimiento de las hifas fue menos compacto y los esclerocios se formaron entre los 17 y 20 dds.

### **Generación de la biblioteca sustractiva.**

Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión

En la figura 9 se muestra el patrón de bandeado obtenido entre la muestra sustraída y la no sustraída, tanto en número de bandas presentes como en su intensidad.

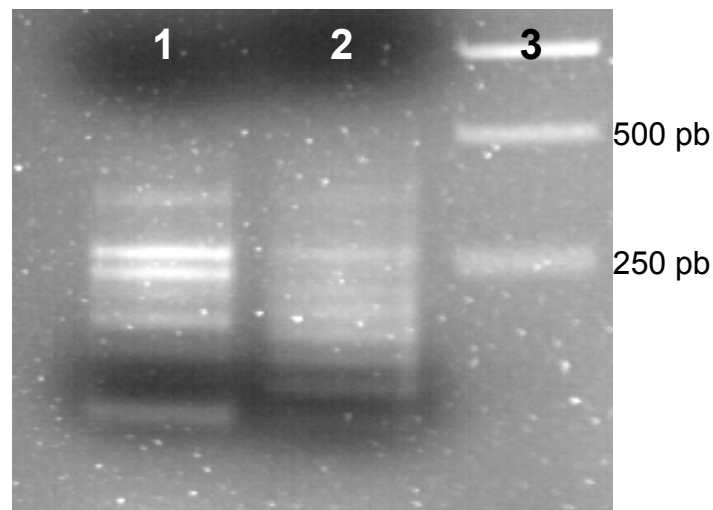


Figura 9. Bandas obtenidas de la hibridación sustractiva.

Carril 1: Hibridación sustractiva para obtener los genes asociados a la germinación no errumpente;  
carril 2: Control no sustraído como referencia para verificar que la sustracción se ha realizado con éxito;  
carril 3: marcador de peso molecular 1kb.

Transformación, extracción de DNA plasmídico y verificación de inserto.

Se realizaron 2 cortes en el gel de agarosa como se muestra en la figura 10. El primer corte incluyó dos bandas con pesos cercanos a los 250 pb. El segundo corte incluyó dos bandas con pesos aproximados de 386 y 454 pb.

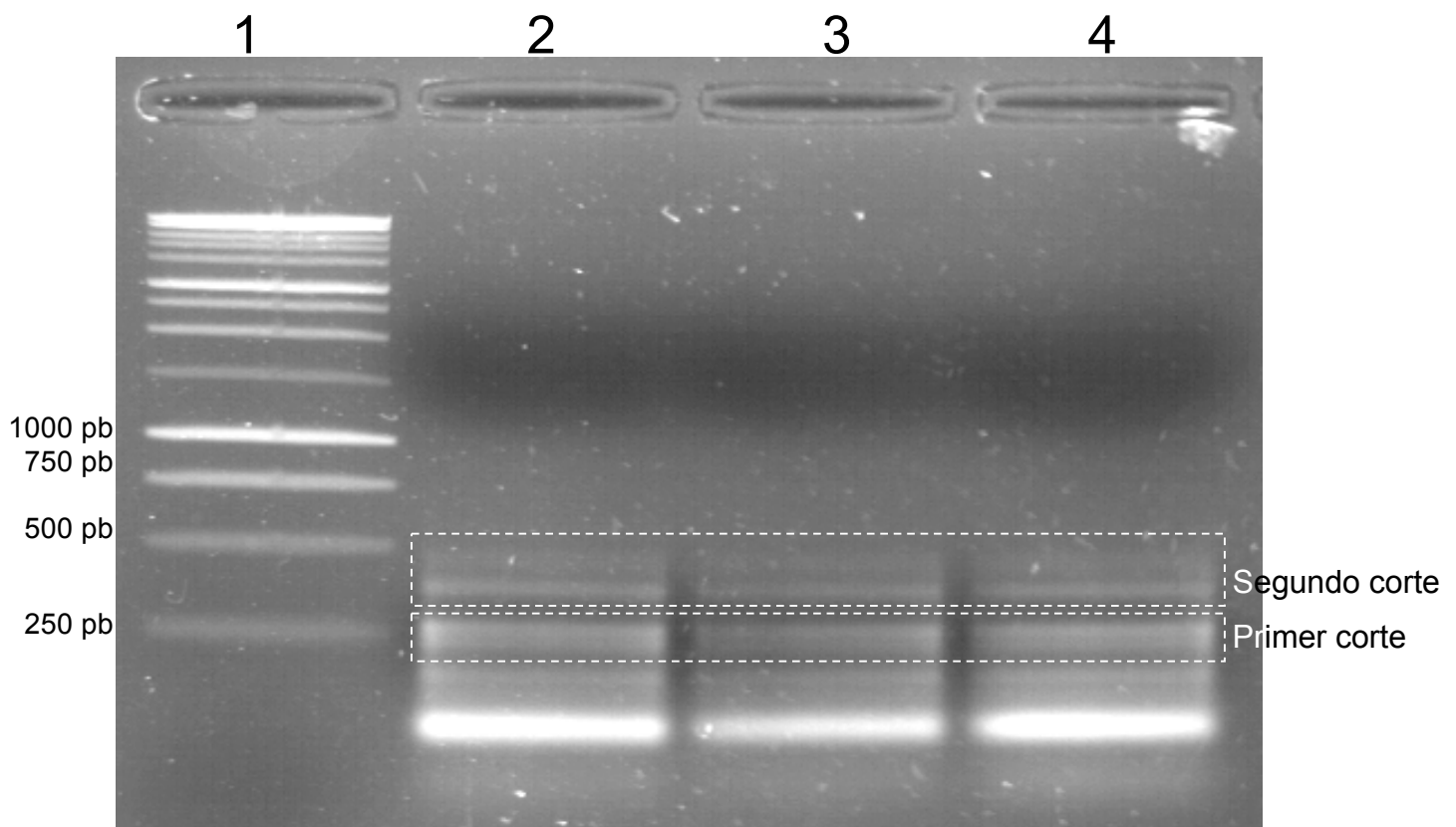


Figura 10. Gel para realizar corte de bandas.

Carril 1 marcador de peso molecular 1 Kb, carriles 2, 3 y 4, Hibridación Sustractiva.

Se obtuvieron 175 clonas como producto de la transformación del primer corte (250 pb aprox.) y 114 clonas del segundo corte (más de 250 pb) para un total de 289 clonas. De ellas, solo 143 tuvo inserto, es decir, el 49.48%.

Análisis tipo Southern.

De las 143 clonas a las que se les realizó el análisis tipo Southern, solo 54 mostraron ser diferenciales, las cuales se mandaron secuenciar, de éstas, 23 tuvieron fragmentos de gen. En el cuadro 2 se muestran las secuencias obtenidas, la proteína a la que se parecen y el valor de expectancia. Para obtener información sobre los procesos metabólicos en los que los fragmentos podían estar involucrados se usó la base en línea de UniProt (2008).



Cuadro 2. Comparación de las secuencias obtenidas con proteínas en el GenBank y sus valores de expectancia.

Numero de clona	Proteína	Valor E
YRP 190	Proteína ribosomal 40S S9 Precursor mitocondrial <i>Yarrowia lipolytica</i>	1e-59
YRP 185	Proteína hipotética An01g03510 <i>Aspergillus niger</i>	1e-53
YRP 282	Proteína asociada a senescencia <i>Cupressus sempervirens</i>	9e-41
YRP 204	Proteína ribosomal 60S L34 <i>Botryotinia fuckeliana</i>	2e-35
YRP 39	Proteína de mitocôndria <i>Aspergillus tubigensis</i>	1e-17
YRP 18 YRP 63 YRP 89	Proteína hipotética CHLREDRAFT_155068 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4e-12
YRP 147	Proteína hipotética YALI0C07128 <i>Yarrowia lipolytica</i>	2e-07
YRP 200	Proteína hipotética NFIA_029570 <i>Neosartorya fischeri</i>	1e-06
YRP 238	Proteína no conocida <i>Vitis vinifera</i>	7e-06
YRP 275	Proteína hipotética An02g01615 <i>Aspergillus niger</i>	2e-04
YRP 254	Proteína hipotética CIMG_05734 <i>Coccidioides immitis</i>	0.67
YRP 182	Proteína inducida por Dexametasona <i>Salmo salar</i>	1.1
YRP 224	Proteína hipotética <i>Pramecium tetraurelia</i>	3.3
YRP 211	Proteína con un dominio RING finger <i>Penicillium marneffeii</i>	3.4
YRP 201	Proteína hipotética TTHERM_01050640 <i>Tetrahymena thermophila</i>	9.8
YRP 49 YRP 64 YRP 93 YRP 213 YRP 216 YRP 284	Similitudes no significativas	

## Registro en el Gene Bank

Se registraron 16 secuencias en el GenBank (cuadro 3)

Cuadro 3. Secuencias registradas en el GenBank.

Secuencia	No. de acceso en el GenBank	Pares de bases
YRP 190	EH034415	359
YRP 185	EH057840	354
YRP 204	EH057841	340
YRP 282	EH034416	357
YRP 147	EH057842	165
YRP 200	EH057843	322
YRP 238	EH057844	407
YRP 254	EH057845	364
YRP 18	EH057832	152
YRP 63	EH057833	152
YRP 275	EH057834	326
YRP 211	EH057835	396
YRP 224	EH057836	344
YRP 182	EH057837	435
YRP 201	EH057838	327
YRP 39	EH057839	188

## DISCUSIÓN

La forma en que los esclerocios de *S. cepivorum* germinaron de forma errumpente, similar a lo ya reportado por diversos autores (Blackhouse y Stewart, 1987; Coley-Smith, 1960; New *et al.* 1984; Somerville, 1987) al igual que la germinación no errumpente, donde las hifas atraviesan la corteza sin observarse daño en la corteza del esclerocio (Blackhouse y Stewart, 1987; New *et al.* 1984; Somerville, 1987). El porcentaje de germinación errumpente estuvo directamente relacionado con un mayor porcentaje de DAS a la que los esclerocios fueron expuestos, coincidiendo con lo obtenido por Somerville (1987) para los porcentajes de DAS usados en el presente estudio.

En estudios realizados por diversos autores sobre germinación de esclerocios de *S. cepivorum*, el reporte y la clasificación del tipo de germinación (errumpente o no errumpente) se ha hecho observando los esclerocios en tiempos mayores a las 24 horas. Así, Backhouse y Stewart (1987) realizaron sus observaciones en esclerocios germinados en PDA a los 2 y 4 días de incubación a temperatura ambiente, mientras que Somerville (1987) las realizó a los 20 días de haber expuesto los esclerocios a diferentes concentraciones de sulfuro de alilo (AS). En el presente trabajo observamos que, esporádicamente un mismo esclerocio germinaba primero de forma no errumpente y después de forma errumpente con una diferencia entre los dos tipos de germinación de 24 a 48 horas. Si las observaciones se realizan con una diferencia de horas mayor a 24, existe la posibilidad de clasificar el tipo de germinación de un esclerocio de forma errónea.

Hasta el momento no había reportes de condiciones de temperatura y exposición a DAS que favorecieran la germinación no errumpente en el 100% de los esclerocios germinados, como en el presente estudio al germinar esclerocios con agua a 17° C. Sin embargo, para generar la biblioteca sustractiva, se necesitaban condiciones de germinación que aseguraran que la mayor parte de los esclerocios germinaran de forma errumpente o no errumpente a la misma temperatura. De acuerdo a los resultados, los tratamientos que se seleccionaron fueron esclerocios germinados en agua a 22° C (96.7 % de germinación no errumpente) y DAS 2% a 22° C (91.67% de germinación errumpente).

De los fragmentos obtenidos en la biblioteca sustractiva de genes asociados a la germinación no errumpente, algunas de las secuencias son similares a proteínas cuyas funciones están relacionadas con procesos de traducción, transcripción, transducción de señales y metabolismo secundario.

De las secuencias obtenidas algunas tuvieron similitud con proteínas involucradas en traducción, como las secuencias YRP 39, YRP 190 y YRP 204, parecidas a proteínas constitutivas de ribosomas, las dos primeras dentro de la mitocondria. La secuencia YRP 39 es similar a una proteína constitutiva de la unidad grande del ribosoma en mitocondrias de *Aspergillus tubingensis* (Juhasz *et al.*, 2007), mientras que la secuencia YRP 190 pertenece a la familia de las proteínas S9P, que

es una de las 31 proteínas que constituyen la unidad pequeña del ribosoma, por lo que esta involucrada en el proceso de traducción del ADN (UniProt, 2008). Wiltshire *et al.* (1999) reportan que la sobre expresión de la proteína S9 de *Candida albicans* en *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de interferir con la función normal de las mitocondrias de éste último, siendo identificada como una secuencia cuya expresión inhibe su crecimiento en galactosa. Debido a que las mitocondrias tienen su propia maquinaria de traducción, es decir, que los ribosomas mitocondriales traducen secuencias a proteínas que forman parte de la mitocondria, las secuencias YRP 39 y YRP 190 podrían estar vinculadas también a un incremento en la tasa de respiración de los esclerocios germinados de forma no errumpente. El aumento en la tasa de respiración es uno de los cambios fisiológicos y metabólicos presente en la germinación de otros propágulos en hongos (Cooke y Whipps, 1993; Garraway y Evans, 1991; Hardham, 2001; Jennings y Lysek, 1999). La secuencia YRP 190 también podría tener una función adicional dentro del proceso de germinación, de manera similar a lo que encontraron Ma y Dooner (2004), que al realizar experimentos con semillas del embrión mutante 1 en maíz (*lem1*), que posee un fenotipo letal, y compararlo con semillas no mutantes, encontraron que la proteína S9 se localizaba solo en el núcleo del mutante, mientras que en el maíz no mutante se encuentra en los plastidios y en el núcleo. Estos autores concluyen que la proteína S9 en los plastidios podría ser necesaria para el desarrollo normal del embrión y tener una función extra fuera de los plastidios requerida para la embriogénesis.

La secuencia YRP 204 es similar a una proteína constitutiva (L34) de la unidad grande del ribosoma (60S). Es una pequeña proteína básica de 44 a 51 residuos de aminoácidos, que, como muchas proteínas ribosomales, particularmente las de la unidad grande del ribosoma, están compuestas de dominios globulares, superficialmente expuestos con proyecciones como dedos que se extienden hasta el centro del rRNA para estabilizar su estructura. Esta secuencia se podría vincular con un aumento en la síntesis de proteínas en la germinación no errumpente de *S. cepivorum*, ya que diversas investigaciones han demostrado consistentemente que la síntesis *de novo* de proteínas es un prerrequisito para que las esporas en diversos hongos germinen (Griffin, 1994) y que también es necesaria en el crecimiento de las

hifas (Garraway y Evans, 1991; Hardham, 2001; Jennings y Lysek, 1999). Esta síntesis *de novo* de proteínas también es necesaria en la germinación, crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales, y concuerda con que se ha encontrado a la proteína L34 asociada a estos procesos. ZiYu *et al.* (1996) reportan un gen en tabaco (*rpL34*) que presenta alta homología con la proteína L34 en rata, donde se detectó que la actividad del promotor de *rpL34* es alta en tejidos en crecimiento, como los meristemos, órganos florales y frutos en desarrollo. Anteriormente, Gao *et al.* (1994) observaron la presencia de niveles bajos de transcritos del gen *rpL34* en semillas maduras de tabaco, los cuales se incrementaron drásticamente en semillas de un día de germinadas, seguido de una disminución de su actividad en semillas de más de 3 días de germinación.

La secuencia YRP 185 es similar a una secuencia de proteínas asociada con el proceso de transcripción. La secuencia YRP 185 es una fosfoproteína hipotética similar a la secuencia de una proteína ADA, que tiene actividad de cofactor transcripcional y en la regulación de la cromatina. Los procesos biológicos en que se ve involucrada es en la acetilación de histonas, regulación de la transcripción dependiente de ADN y la respuesta a drogas, este último inferido de fenotipos mutantes (UniProt, 2008). La proteína ADA3 de *S. cereviceae* es parte de los complejos ADA y SAGA histona acetiltransferasa, siendo ADA3 un adaptador proteínico dentro del complejo ADA y SAGA histona acetiltransferasa, que regula la expresión de genes. La histona acetiltransferasa cataliza la adición de grupos acetilo a residuos específicos de lisina presentes en los extremos N-terminales del centro de las histonas. La mayor parte de los autores reporta que las proteínas ADA son reguladores de la transcripción y están asociadas al crecimiento, desarrollo y a la expresión de diversos tipos de genes (Bertrand *et al.*, 2003; Kontoyiannis, 1999; Viachonasios *et al.*, 2003; Stockinger *et al.*, 2001). La secuencia YRP 185 puede estar vinculada a la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos en la germinación no errumpente de *S. cepivorum*, ya que a excepción de algunas especies de hongos, la gran mayoría requieren la síntesis de ácidos nucleicos para que sus esporas germinen (Griffin, 1994; Hardham, 2001; Moore, 1996; Sussman y Douthit, 1973)

La secuencia YRP 182 se parece a una lipoproteína inducida por dexametasona. Este tipo de proteína no está estudiada en *Salmo salar*, pero en el

caso del humano se sabe que su localización es generalmente en el lado citoplasmático de la membrana celular; tiene actividad de GTPasa interactuando selectivamente con GTP y esta involucrada en la transducción de señales, donde la serie de señales moleculares se genera como consecuencia de un receptor de una proteína G acoplada con su ligando (UniProt, 2008). En la germinación no errumpente de *S. cepivorum*, probablemente esta también vinculada con la transducción de señales a nivel celular.

Las secuencias YRP 147 y YRP 224 tienen similitud con proteínas relacionadas con el metabolismo primario. La secuencia YRP 147 es similar a la proteína imidazol glicerol fosfato sintasa (hisHF). Sus funciones moleculares son de liasa y de transferasa. Esta proteína es una amidotransferasa que incorpora amonio derivado de glutamina al inusual nucleótido PRFAR (5 fosforibulosil-formimino-5 aminoimidazol 4 carboxamida ribonucleótido) para formar AICAR (aminoimidazole carboxamida ribonucleótido) y IGP (imidazologlicerol fosfato) (UniProt, 2008). En la germinación errumpente de *S. cepivorum*, la secuencia YRP 147 está probablemente asociada a la biosíntesis de hístidina, ya que se reporta que la proteína hisHF está involucrada en el proceso de biosíntesis de aminoácidos, particularmente la hístidina (UniProt, 2008). De manera similar, la secuencia YRP 224 probablemente esté involucrada con la biosíntesis de arginina en la germinación no errumpente de *S. cepivorum*. La secuencia YRP 224 es similar a una NAD/NADP octopina/nopalina dehidrogenasa con un dominio hélice alfa. La familia de enzimas Pfam consiste principalmente de octopina y nopalina dehidrogenasa de plasmidos Ti. Este grupo de enzimas tienen función molecular de coenzimas y actividad oxidoreductasa (UniProt, 2008). Mas específicamente actúa en la unión CH-NH del sustrato usando NAD(+) o NADP(+) como aceptor. La octopina dehidrogenasa esta involucrada en la obtención de arginina y piruvato a partir de octopina, mientras que la nopalina dehidrogenasa esta involucrada en la obtención de arginina, 2-oxoglutarato y NADPH a partir de nopalina (Beauchamp *et al.*, 1990). La síntesis de aminoácidos es fundamental para el crecimiento de las hifas en hongos (Griffin, 1994).

La secuencia YRP 211 fue similar a una proteína cuya función aún no se determina. La secuencia YRP 211 se parece a un tipo especializado de proteína con

de dedo de zinc, de 40 a 60 residuos que une dos átomos de zinc; probablemente envuelto en la interacción proteína-proteína. El dominio RING (del inglés Really Interesting New Gene) de una proteína se encuentra relacionado a un amplio rango de funciones como replicación viral, transducción de señales y desarrollo (UniProt, 2008).

De las secuencias restantes y reportadas en el presente trabajo, no hay mucha información sobre su función de acuerdo a la proteína a la que se asemejan, ya que éstas proteínas no han sido estudiadas aún (Eisen *et al.*, 2006; Jaillon *et al.* 2007; Merchant *et al.* 2007; Pel *et al.* 2007).

De acuerdo a varios autores (Hardham, 2001; Jennings y Lysek, 1999) en la mayor parte de los hongos, la germinación comprende tres fases: 1) incremento en el diámetro de las esporas al doble o al triple debido a la absorción de agua y al consecuente aumento de su actividad metabólica, 2) incremento de la tasa de respiración, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; y 3) germinación de la espora mediante un crecimiento localizado en la célula. El hecho de que los resultados del presente trabajo se obtuvieron mediante hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión, nos conduce a suponer que los fragmentos de genes obtenidos son mas abundantes en la germinación no errumpente que en la errumpente, y que los procesos metabólicos como respiración, transcripción, transducción de señales y síntesis de aminoácidos y proteínas, se dan más rápidamente y con mayor intensidad en la germinación no errumpente que en la germinación errumpente. Lo anterior podría asociarse con la diferencia observada en los tiempos que ocurrió una y otra germinación, la germinación no errumpente estimulada por agua se dio más rápidamente en comparación con la errumpente presentada por esclerocios expuestos al DAS.

## **CONCLUSIONES**

Las condiciones óptimas para obtener el mayor porcentaje de esclerocios germinados de forma errumpente y no errumpente fue con 2% de DAS y agua a 22° C, respectivamente.

Los 23 fragmentos obtenidos de genes asociados en la germinación no errumpente de *S. cepivorum*, tuvieron similitudes significativas con 15 proteínas diferentes las cuales participan en los procesos de transcripción, traducción, transducción de señales y metabolismo primario. Los resultados sugieren que existe un incremento en los procesos metabólicos de los esclerocios de *S. cepivorum* que permiten que la germinación no errumpente se lleve a cabo más rápidamente que la germinación errumpente.

## LITERATURA CITADA

- Banks, E. y L. V. Edgington 1989. Effect of integrated control practices on the onion white rot pathogen in organic soil. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 268-272.
- Backhouse, D. y A. Stewart. 1987. Anatomy and histochemistry of resting and germinating sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89(4):561-567.
- Beauchamp C. J. Chilton, W. S. Dion P. y Antoun H. 1990. Fungal catabolism of crown gall opines. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1):150-155.
- Bertrand C. Bergounioux C. Domenichini S. Delarue M y Zhou D. 2003. Arabidopsis histone acetyltransferase AtGCN5 Regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J. Biol. Chem.* 278(33):28246-28251.
- Coley-Smith, J. R. 1960. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. IIIV: Germination of Sclerotia. *Ann. Appl. Biol.* 48(1):8-18.
- Coley-Smith, J. R.; D. Parfitt; I. M. Taylor y R. A. Reese. 1987. Studies of dormancy in sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathol.* 36:594-599.
- Cooke, C. R. y J. M. Whipps. 1993. *Ecophysiology of Fungi*. Blackwell Scientific Publications. London, England. 352 pp.
- Crowe, F., y R. Bafus. 2002. A model for direct stimulated germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Resumen de ponencias de la 7<sup>th</sup>. International Workshop on Allium White Rot. Harris Ranch, California. E. U. A. (Disponible en: <http://www.cps-scp.ca/abstractslist.rtf>)
- Diatchenko, L., Y. F. C. Lau, A. P. Campbell. A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gursaya, E. D. Sverdlov y P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(12) :6025-6030.
- Diatchenko, L., A. Chenchik y P. Siebert. 1998. Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A+) or total RNA. En: *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. P. Siebert y J. Larrick. BioTechniques Books, MA. Pp. 213-239.
- Eisen, J. A., R. S. Cône, M. Wu, D. Wu, M. Thiagarajan, J. R. Wortman, J. H. Badger, Q. Ren, P. Amedeo, K. M. Jones, L. J. Tallon, A. L. Delcher, S. L. Salzberg, J. C.



- Silva, B. J. Haas, W. H. Majoros, M. Farzad, J. M. Carlton, R. K. Smith Jr., J. Garg, R. E. Pearlman, K. M. Karrer, L. Sun, G. Manning, N. C. Elde, A. P. Turkewitz, D. J. Asai, D. E. Wilkes, Y. Wang, H. Cai, K. Collins, B. A. Stewart, S. R. Lee, K. Wilamowska, Z. Weinberg, W. L. Ruzzo, D. Wloga, J. Gaertig, J. Frankel, C. Tsao, M. A. Gorovsky, P. J. Keeling, R. F. Waller, N. Patron, J. M. Cherry, N. A. Stover, C. J. Krieger, C. del Toro, H. F. Ryder, S. C. Williamson, R. A. Barbeau, E. P. Hamilton, y E. Orias. 2006. Macromolecular genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. PLoS Biol. 4(9):1620-1642.
- Entwistle, A. R. 1990a. Allium white rot and its control. Soil Use and Manag. 6: 201-209.
- Entwistle, A. R. 1990b. Root diseases. En: H. D. Rabinowitch, y J. L. Brewster. (eds) Onions and Allied crops. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. Vol. II.
- Esler, G. y J. R. Coley-Smith. 1983. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathol. 32:13-22.
- Gao J. W. Kim S. R. Chung Y. Y. Lee J. M y An G. 1994. Developmental and environmental regulation of two ribosomal protein genes in tobacco. Plant Mol. Biol. 25(5):761-770.
- Garraway, M. O., y R. C. Evans. 1991. Fungal nutrition and physiology. Krieger Publishing Company. Florida. E. U. A.
- Hardham, A. R. 2001. 5: Cell biology of fungal infection of plants. In: R. J. Howard y N. A. R. Gow. The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Vol. VIII. Biology of the fungal cell. Springer. Germany
- Jailor, O., J. Airy, B. Noel, A. Polarity, C. Cletmet, A. Casagrande, N. Choisine, S. Aubourg, N. Vitulo, C. Jubin, A. Vezzi, F. Legeai, P. Hugueney, C. Dasilva, D. Horner, E. Mica, D. Jublot, J. Poulain, C. Bruyere, A. Billault, B. Segurens, M. Gouyvenoux, E. Ugarte, F. Cattonaro, V. Anthouard, V. Vico, C. Del Fabbro, M. I. Alaux, G. Di Gaspero, V. Dumas, N. Felice, S. Paillard, I. Juman, M. Moroldo, S. Scalabrin, A. Canaguier, I. Le Clainche, G. Malacrida, E. Durand, G. Pesole, V. Laucou, P. Chatelet, D. Merdinoglu, M. Delledonne, M. Pezzotti, A. Lecharny, C. Scarpelli, F. Artiguenave, M. E. Pe, G. Valle, M. Morgante, M. Caboche, A. F. Adam-Blondon, J. Weissenbach, F. Quetier y P. Wincke. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature 449(27)463-467.
- Jennings, D. H. y G. Lysek. 1999. Fungal Biology: understanding the fungal lifestyle. Springer. E. U. A.
- Juhasz, A., Z. Hamari, F. Kevei, y I. Pfeiffer. 2007. Interpretation of mtDNA RFLP variability among *Aspergillus tubingensis* isolates. Ant. Van Leeuwen. 91(3):209-216.
- Kontoyiannis D. P. 1999. Genetic analysis of azole resistance by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob. Agents and Chemoth. 43(11):2731-2735.
- Ma, Z. R. y Dooner, H. K. 2004. A mutation in the nuclear-encoded plastid ribosomal protein S9 leads to early embryo lethality in maize. Plant J. 37(1):91-103.

- Merchant, S. S., S. E. Prochnik, O. Vallon, E. H. Harris, S. J. Karpowicz, G. B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L. K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W. F. Marshall, L. Qu, D. R. Nelson, A. A. Sanderfoot, M. H. Spalding, V. V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S. M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, I. V. Grigoriev, D. S. Rokhsar, y A. R. Grossman. 2007. The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245-251.
- Moore L., E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. Prentice Hall. E. U. A.
- New, C. M.; J. R. Coley-Smith y N. I. Georgy. 1984. Scanning electron microscopy of sclerotial germination in *Sclerotium cepivorum*. *Trans. Br. Micol. Soc.* 83(4):690-693.
- Pel, H. J., J. H. de Winde, D. B. Archer, P. S. Dyer, G. Hofmann, P. J. Schaap, G. Turner, R. P. de Vries, R. Albang, K. Albermann, M. R. Andersen, J. D. Bendtsen, J. A. E. Benen, M. van den Berg, S. Breestraat, M. X. Caddick, R. Contreras, M. Cornell, P. M. Coutinho, E. G. J. Danchin, A. J. M. Debets, P. Dekker, P. W. M. van Dijck, A. van Dijk, L. Dijkhuizen, A. J. M. Driessen, C. d'Enfert, S. Geysens, C. Goosen, G. S. P. Groot, P. W. J. de Groot, T. Guillemette, B. Henrissat, M. Herweijer, J. P. T. W. van den Hombergh, C. A. M. J. J. van den Hondel, R. T. J. M. van der Heijden, R. M. van der Kaaij, F. M. Klis, H. J. Kools, C. P. Kubicek, P. A. van Kuyk, J. Lauber, X. Lu, M. J. E. C. van der Maarel, R. Meulenbergh, H. Menke, M. A. Mortimer, J. Nielsen, S. G. Oliver, M. Olsthoorn, K. Pal, N. I. N. M. E. van Peij, A. F. J. Ram, U. Rinas, J. A. Roubos, C. M. J. Sagt, M. Schmoll, J. Sun, D. Ussery, J. Varga, W. Vervecken, P. J. J. van de Vondervoort, H. Wedler, H. A. B. Wosten, A. Zeng, A. J. J. van Ooyen, J. Visser y H. Stam. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotech.* 25(2):221-231.
- Somerville, P. A. y D. H. Hall. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation and germination stimulants to reduce inoculum density. *Plant Dis.* 71:229-233.
- Stockinger E. Mao Y. Regier M. K. Triezenberg S. J. y Thomashow M. F. 2001. transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in *Arabidopsis* and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic Acids Res.* 29(7):1524-1533.
- Sussman, A. S. y H. A. Douthit, 1973. Dormancy in microbial spores. *Ann. Rev. Physiol.* 24:311-352.
- UniProt Consortium. 2008. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 36:D190-D195 (Disponibile en línea <http://www.uniprot.org>)
- Viachonasios K. E. Thomashow M y Triezenberg S. J. 2003. Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptador genes dramatically affect Arabidopsis growth, development and gene expression. *Plant Cell* 15:626-638.
- Wiltshire C. Black S. Brown A. J. P. 1999. Over-expression of *Candida albicans* mitochondrial ribosomal protein S9 (MrpS9p) disturbs mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester)* 15(2):139-143.
- ZiYu D. JianWei G. KyungSook A. Lee J. M. Edwards G. E. y GynHeung A. 1996. Promoter elements controlling development and environmental regulation of tobacco ribosomal protein gene L34. *Plant Mol. Biol.* 32(6):1055-1065

## CAPITULO IV. CONCLUSIONES GENERALES

*In vitro* el micelio de *Sclerotium cepivorum* permaneció viable por 123 días bajo condiciones de estrés por falta de humedad, pero en suelo no esterilizado no fue posible reaislarlo, aún en un periodo tan corto de solo 2 días posteriores a la infestación del suelo con hifas de *S. cepivorum*.

Las condiciones óptimas para obtener el mayor porcentaje de esclerocios germinados de forma errumpente y no errumpente fue con 2% de DAS y agua a 22° C respectivamente.

Los 23 fragmentos obtenidos de genes asociados en la germinación no errumpente de *S. cepivorum*, tuvieron similitudes significativas con 15 proteínas diferentes las cuales participan en los procesos de transcripción, traducción, transducción de señales y metabolismo primario. Los resultados sugieren que existe un incremento en los procesos metabólicos de los esclerocios de *S. cepivorum* que permiten que la germinación no errumpente se lleve a cabo más rápidamente que la germinación errumpente.

## ANEXO I

### Extracción de RNA total (Kit RNeasy. QIAGEN)

1. Los esclerocios se molieron hasta obtener un polvo muy fino, en un mortero previamente esterilizado y enfriado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se usó nitrógeno líquido para mantener la muestra fría.
2. La muestra se recolectó en un tubo Eppendorf. Se adicionaron  $450\ \mu\text{l}$  de buffer RLC. Se agitó en vortex vigorosamente (El buffer RLC se activa con  $\beta$ -mercaptoetanol 1ml:10 $\mu\text{l}$  respectivamente).
3. La muestra se dejó incubar a  $56^{\circ}\text{C}$  por 4 min.
4. La muestra se vació directamente dentro de la columna QIAshredder color lila. Se centrifugó 2 min. a máxima velocidad. Se pasó el centrifugado a otro tubo Eppendorf cuidando de no tocar la pastilla.
5. Se adicionó a la muestra medio volumen de etanol al 96%, mezclando por inversión.
6. Se vació la muestra en la minicolumna RNeasy color rosa. Se centrifugó 15 seg. a 10000 rpm. Se descartó en filtrado.
7. Se adicionaron  $350\ \mu\text{l}$  de buffer RW1 a la minicolumna. Se centrifugó 15 seg. a 10000 rpm para lavar la columna. Se descartó el filtrado.
8. Se adicionaron  $80\ \mu\text{l}$  de DNAsa (10 $\mu\text{l}$  DNAsa en 70 $\mu\text{l}$  de buffer RDD) directamente en la membrana de la columna. Se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente.
9. Se adicionaron  $350\ \mu\text{l}$  de buffer RW1 a la minicolumna. Se centrifugó 15 seg. a 10000 rpm para lavar la columna. Se descartó el filtrado con todo y el tubo colector.
10. Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo. Se adicionaron  $500\ \mu\text{l}$  de buffer RPE a la minicolumna. Se centrifugó 15 seg. a 10000 rpm para lavar la columna. Se descartó el filtrado.
11. Se centrifugó 1 min. A 10000 rpm. para secar la membrana de gel de sílice de la columna. Se descartó el filtrado y el tubo colector.
12. Se transfirió la minicolumna a un tubo Eppendorf nuevo. Se agregaron  $20\ \mu\text{l}$  de agua libre de RNAsas vertiéndola cuidadosamente en el centro de la minicolumna. Se dejó reposar 10 min. Se centrifugó a 10000 rpm 1 min.
13. Se transfirió la minicolumna a un tubo Eppendorf nuevo. Se agregaron  $40\ \mu\text{l}$  de agua libre de RNAsas vertiéndola cuidadosamente en el centro de la minicolumna. Se dejó reposar 10 min. Se centrifugó a 10000 rpm 1 min.
14. Se verificó la calidad del RNA extraído en un gel de agarosa al 1.2%.

### Síntesis de cDNA (Kit Super SMARTTM PCR cDNA Síntesis Kit, Biosciences, Clontech)

#### Protocolo para la síntesis de primera cadena de DNA a partir de RNA

1. En un tubo de PCR se adicionaron los siguientes reactivos:
  - 1-50  $\mu\text{l}$  RNA total (2-1000 ng de RNA total)
  - 7  $\mu\text{l}$  primer II A 3'SMART CDS (12  $\mu\text{M}$ )
  - 7  $\mu\text{l}$  primer SMART II A (12  $\mu\text{M}$ )

X µl agua desionizada  
64 µl volumen total

2. Se mezcló la muestra con suavidad y se centrifugó brevemente.
3. Se incubó la muestra a 65°C por 2 min en el termociclador, reduciendo la temperatura a 42°C.
4. Se adicionaron al tubo PCR los siguientes reactivos a temperatura ambiente:  
20 µl buffer de primera cadena 5X  
2 µl DTT (100mM)  
10 µl dNTP 50X (10mM)  
5 µl agua desionizada estéril  
5 µl transcriptasa reversa PowerScript
5. Se mezcló la muestra suavemente subiendo y bajando el émbolo y se centrifugó un pulso.
6. Se incubó a 42°C 1.5 h. en termociclador.
7. Se adicionaron 2 µl de EDTA 0.5 M para parar la reacción. Se guardó a -20°C.

#### **Protocolo para purificación de primera cadena (PCR clean-up Gel extraction, Macherey-Nagel)**

1. Se mezcló 1 volumen de la muestra con dos volúmenes de buffer NT.
2. La mezcla se colocó en una columna NucleoSpin Extract II. Se centrifugó 1 min. A 11 000 x g. Se descartó el filtrado.
3. Se adicionaron 600 µL de buffer NT3 a la columna. Se centrifugó 1 min. A 11 000 x g. Se descartó el sobrenadante.
4. Se centrifugó 2 min a 11 000 para secar la membrana.
5. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf nuevo y etiquetado. Se incubó de 2 a 4 min. a 70°C para evaporar el etanol residual de la solución NT3, que puede inhibir el paso de elusión. Para recuperar fragmentos mayores de ADN (5 a 10 Kb), se incubó el buffer de elusión a 70°C antes de agregarlo.
6. Se adicionaron 30 µL de buffer de elusión NE a la columna y se incubó 1 min. A temperatura ambiente.
7. Se centrifugó 1 min. A 11 000 xg.

#### **Protocolo para la determinación del número de ciclos óptimos para la segunda cadena de DNA**

1. Se realizó la dilución conforme a la tabla presentada en el manual del kit (5 µl de RNA de cadena simple y 75 µl de agua desionizada estéril, para un total de 80 µl)
2. En un tubo PCR, se adicionaron los siguientes reactivos en el orden mostrado:  
4 µl de agua desionizada estéril.  
10 µl Buffer Titanium  
2 µl dNTP 50X (10mM)  
2 µl primer II A 5' PCR (12 µM)  
2 µl Titanium polimerasa
3. Se mezcló en vortex y se centrifugó un pulso.
4. Se agregaron 20 µl de la dilución de primera cadena (paso 1).
5. Se metió el tubo directamente al termociclador precalentado a 95°C.

6. Se llevó a cabo la PCR con las siguientes condiciones:

95°C 1 min.

30 ciclos

95°C 15 seg

65°C 30 seg

68°C 6 min

68°C 10 seg

4°C ∞

7. En el ciclo 15 se puso en pausa el programa. Se transfirieron 35 µl del PCR a un tubo de PCR limpio, que se etiquetó como "optimización". El tubo "experimental" se guardó a 4°C. Con el tubo de "optimización" se determinará el número de ciclos óptimos para segunda cadena.
8. Se tomó una alícuota de 5 µl del tubo "optimización" y se dejó correr otros tres ciclos tomando alícuotas cada 3 ciclos, teniéndose así 7 alícuotas que correspondieron a los ciclos 15, 18, 21, 24, 27, 30 y 33. Cada una de las alícuotas se colocó en un tubo para PCR estéril debidamente etiquetado.
9. Se verificaron las muestras en un gel de agarosa al 1.2%, determinándose el número de ciclos óptimos para cada muestra.

### **Protocolo para la síntesis de la segunda cadena de DNA**

Se volvió a realizar el protocolo anterior llevando la reacción de cada muestra al número de ciclos óptimos determinado para la síntesis de segunda cadena de DNA.

### **Protocolo para la purificación de cDNA**

1. Se tomó una alícuota de 5 µl de la muestra de segunda cadena sintetizada (cDNA), se colocó en un tubo de PCR estéril y se etiquetó como "muestra A".
2. El resto de la muestra de cDNA se le adicionó un volumen igual al de la muestra de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó en vortex.
3. Se centrifugo la muestra a 14000 rpm 10 min.
4. La fase superior se pasó a un tubo Eppendorf estéril.
5. Se adicionaron 700 µl de n-butanol y se agitó en vortex.
6. La muestra se centrifugó a 14000 rpm 1 min.
7. Se descartó la fase superior.
8. Se tomó una columna BD CHROMA SPIN 1000 y se mezcló bien el buffer con la matriz que contiene. Luego se colocó la columna en un tubo Eppendorf para descartar el buffer que contiene.
9. Se agregaron 1.5 µl de buffer TNE 1X y se drenó la columna completamente.
10. La muestra se colocó despacio y cuidadosamente en el centro de la columna.
11. Se aplicaron 25 µl de buffer TNE 1X y se drenó la columna completamente.
12. Se aplicaron 150 µl de buffer TNE 1X y se drenó la columna completamente.
13. La columna se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo estéril.
14. Se aplicaron 320 µl de buffer TNE 1X colectándose en el tubo Eppendorf. A este tubo se le etiquetó como "muestra B".

15. Se aplicaron 75  $\mu$ l de buffer TNE 1X colectándose en un tubo Eppendorf nuevo. A este tubo se le etiquetó como "muestra C".
16. Se aplicaron 100  $\mu$ l de buffer TNE 1X colectándose en un tubo Eppendorf nuevo. A este tubo se le etiquetó como "muestra D".
17. Se aplicaron 100  $\mu$ l de buffer TNE 1X colectándose en un tubo Eppendorf nuevo. A este tubo se le etiquetó como "muestra E".
18. Para verificar en que muestra (B, C, D, o E) se encuentra el cDNA purificado, se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l y, junto con la muestra A, se corrieron en un gel de agarosa al 1.2%. La muestra A sirve de comparación para verificar la purificación del cDNA.

### Validación de banco

Protocolo para la validación de banco usando 2 primers para el gen GAPDH de *Sclerotinia sclerotiorum*

1. Se preparó la siguiente mezcla de reacción (para 4 muestras) en un tubo de PCR nuevo:
 

a. Buffer 10x	10 $\mu$ l
b. dNTP's	2 $\mu$ l
c. Enzima Titanium	1 $\mu$ l
d. H <sub>2</sub> O estéril	83 $\mu$ l
  
2. La mezcla de reacción se mezcló adecuadamente y se separó en 4 tubos (22  $\mu$ l c/u). Después se le agregó a cada uno de los tubos los siguientes reactivos:
 

a. cDNA	3 $\mu$ l
b. Oligo sentido	1 $\mu$ l
c. Oligo antisentido	1 $\mu$ l

Dos de los 4 tubos fueron para las muestras a verificar el estado del cDNA. Otro fue para el control positivo (que se le agregó 1  $\mu$ l de DNA 1:10) y otro para el control negativo (que se agregó 3  $\mu$ l de agua estéril).
3. Se llevo a cabo una PCR con las siguientes condiciones:

94°C	4 min.	
	30 ciclos	
94°C		1 min.
55°C		1:30 min.
72°C		1 min.
72°C	7 min.	
4°C	$\infty$	

4. El resultado se verificó en un gel de agarosa al 1.2%.

### Hibridación Sustractiva bajo Supresión (Kit PCR-Select cDNA Subtraction, Clontech)

#### Protocolo para la digestión del cDNA con Rsa I

1. Para cada una de las muestras (control y prueba), en un tubo Eppendorf nuevo se adicionaron los siguientes reactivos:
  - a. cDNA purificado 22  $\mu$ l
  - b. Regulador de restricción de la enzima *Rsa I* 10X 2.5  $\mu$ l
  - c. *Rsa I* (10u/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l
2. Se agitaron ambos tubos en el vortex y se le dio un pulso en la centrífuga.
3. Se incubaron a 37°C por 20 min.
4. Se verificó la eficiencia de la digestión en un gel de agarosa al 1.2%.

### Protocolo para purificar el cDNA digerido (NucleoTraP<sup>®</sup>CR, Macherey-Nagel)

1. Se adicionaron 4 volúmenes de buffer NT2 por volumen de cDNA digerido en el tubo de PCR.
2. Se mezcló en vortex la suspensión NucleoTraP<sup>®</sup>CR. Por cada  $\mu$ g de cDNA se adicionaron 4  $\mu$ l de sílice (mínimo 10  $\mu$ l). Se incubó la mezcla 10 min. A temperatura ambiente, mezclándose en vortex cada 2 min.
3. Se adicionaron 400  $\mu$ l de buffer NT2 y se resuspendió en vortex. Se centrifugó a 10000 xg 30 segundos. Se descartó el sobrenadante.
4. Se adicionaron 400  $\mu$ l de buffer NT3 y se resuspendió en vortex. Se centrifugó 10000 xg 30 segundos. Se descartó el sobrenadante.
5. Se adicionaron 400  $\mu$ l de buffer NT3 y se resuspendió en vortex. Se centrifugó 10000 xg 30 segundos. Se descartó el sobrenadante. Se volvió a dar un pulso en la centrífuga y se removió el sobrenadante completamente.
6. Se secó el sílice a 37°C 10 min. en el termomixer. El etanol residual del buffer NT3 podría inhibir las subsecuentes reacciones.
7. Se adicionaron 25  $\mu$ l de buffer de elusión NE. Se resuspendió la mezcla en vortex. Se incubó la mezcla 15 min. a 55°C en termomixer, mezclando cada 5 min en vortex. Se centrifugó la mezcla a 10000 xg 30 seg. Se transfirió el cDNA contenido en el sobrenadante a un tubo Eppendorf etiquetado y limpio.

### Protocolo para ligar con adaptadores

8. Se etiquetaron dos tubos con los nombres de “muestra 1/1” y “muestra 1/2”.
9. A cada uno de los tubos se adicionaron los siguientes reactivos.
  - a. Agua estéril 3  $\mu$ l
  - b. Buffer de ligación 5X 2  $\mu$ l
  - c. Ligasa de DNA T4 (400u/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l
10. Dependiendo de la etiqueta de la muestra, se adicionó a cada tubo los siguientes reactivos:

	Muestra 1/1 ( $\mu$ l)	Muestra 1/2 ( $\mu$ l)
a. Muestra del cDNA problema digerido con <i>Rsa I</i>	2	2
b. Adaptador 1 (10 $\mu$ M)	2	-
c. Adaptador 2R (10 $\mu$ M)	-	2
Volumen total	10	10

11. Se agitó en vortex y se le dio un pulso en la centrífuga.



12. En otro tubo etiquetado como No sustraído se adicionaron 2  $\mu$ l de la muestra 1/1 y 2  $\mu$ l de la muestra 1/2.
13. Se incubó a 16°C por 14 horas (toda la noche).
14. Se adicionó 1  $\mu$ l de EDTA/Glycogen
15. Se calentaron las muestras a 72°C por 5 min para inactivar la ligasa.
16. Se removió 1  $\mu$ l del control no sustraído y se diluyó en 1 mL de agua. Este se usará en el PCR.

### Protocolo para primera hibridación

1. Se etiquetaron dos tubos de PCR con los nombres de “muestra 1” y “muestra 2”. Dependiendo del tubo, se agregaron los siguientes reactivos:

	Muestra 1	Muestra 2
	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)
a. cDNA control digerido con <i>Rsa I</i>	1.5	1.5
b. cDNA problema ligado con adaptador 1	1.5	-
c. cDNA problema ligado con adaptador 2R	-	1.5
d. Buffer de hibridación 4X	1.0	1.0
e. Volumen final	4.0	4.0

2. La muestra se incubó a 98°C 1.5 min.
3. Las muestras se pusieron a incubar a 68°C durante 8 horas en termociclador.

### Protocolo para segunda hibridación

1. En un tubo se adicionaron los siguientes reactivos:
 

a. cDNA control digerido con <i>Rsa I</i>	1 $\mu$ l
b. Buffer de hibridación 4X	1 $\mu$ l
c. Agua estéril	2 $\mu$ l
2. Se tomó 1  $\mu$ l de esta mezcla y se pasó a otro tubo de PCR debidamente etiquetado. Se incubó a 98°C 90 seg.
3. Para adicional las dos muestras hibridadas al mismo tiempo, se utilizó la siguiente técnica:
  - a. Se tomó toda ala muestra etiquetada como muestra 2 de la primera hibridación. Para ello se usó una micropipeta de 20  $\mu$ l.
  - b. Se dejó subir un poco el émbolo para que absorbiera una pequeña cantidad de aire. Esta burbuja de aire separará la muestra anterior de la siguiente.
  - c. Se tomó la muestra de 1  $\mu$ l incubada.
  - d. Todo se vació en el tubo etiquetado como muestra 1 de la primera hibridación. Se mezcló con la pipeta.
4. Se dio un pulso en la centrífuga.
5. Se incubó a 68°C por 14 horas.
6. Se adicionaron 200  $\mu$ l de buffer de dilución y se mezcló por pipeteo.
7. Finalmente se calentó en termociclador a 68°C por 7 min.

### Protocolo para primera PCR

1. En dos tubos debidamente etiquetados, se adicionaron los siguientes reactivos:

- |                                    |      |
|------------------------------------|------|
|                                    | (µl) |
| a. Agua estéril                    | 19.5 |
| b. Buffer de reacción PCR 10X      | 2.5  |
| c. Mezcla dNTP's (10mM)            | 0.5  |
| d. Primer PCR 1 (10mM)             | 1.0  |
| e. Mezcla Polimerasa Advantage 50x | 0.5  |
| Volumen total                      | 24.0 |
2. Se agitó en vortex y se dio un pulso en la centrifuga.
  3. Se añadió 1 µl de la muestra de la segunda hibridación al primer tubo. En el segundo tubo se adicionó 1µl de la dilución del control no sustraído.
  4. La reacción se incubó en el termociclador a 75°C por 5 min.
  5. De inmediato se realizó la siguiente PCR (termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR Systems 2400):
 

94°C	25 seg
27 ciclos	
94°C	10 seg
66°C	30 seg
72°C	90 seg
  6. Se prosiguió con el protocolo para segunda PCR.

#### **Protocolo para segunda PCR**

1. En un tubo de PCR estéril, se diluyó 3 µl del producto de la primera PCR en 27 µl de agua destilada.
2. En otro tubo de PCR se preparó la siguiente mezcla de reactivos:
 

	(µl)
a. Agua estéril	18.5
b. Buffer de reacción PCR 10X	2.5
c. Primer anidado 1 (10 µM)	1.0
d. Primer anidado 2R (10 µM)	1.0
e. Mezcla de dNTP's (10 µM)	0.5
f. Mezcla de polimerasa Advantage 50X	0.5
Volumen total	24.0
3. A la mezcla anterior se adicionaron 1 µl de la dilución del producto de la primera PCR.
4. Se realizó la siguiente PCR:
 

10 ciclos	
94°C	10 seg
68°C	30 seg
72°C	90 seg
5. Se verificó la amplificación del producto en un gel de agarosa al 2%.
6. Se cortaron las bandas obtenidas del gel con un bisturí, colocándolas en tubos Eppendorf de menor cantidad de bases a mayor cantidad, y se pusieron en tubos Eppendorf numerados ascendentemente.
7. Los tubos Eppendorf se almacenaron a -20°C.

#### **Protocolo para extracción de DNA de geles de agarosa (Kit QUIAEX II, Quiagen)**

1. Se seleccionó la banda más cercana a 250 pb.
2. Se pesó el tubo Eppendorf con la banda y sin la banda para determinar la cantidad de gel presente en el tubo, así como calcular aproximadamente la cantidad de DNA.
3. Se adicionaron 3 volúmenes de buffer QX1 por volumen de gel. Disolver el gel por inmersión.
4. Se resuspendió la muestra con el volumen de QUIAEX II que se indica a continuación (dar vortex a la resina QUIAEX II antes de tomar la cantidad necesaria):

Menos de 2 $\mu$ g de DNA	8 $\mu$ l
2 $\mu$ g de DNA	10 $\mu$ l
De 2 a 10 $\mu$ g de DNA	30 $\mu$ l
Por cada 10 $\mu$ g adicionales de DNA	30 $\mu$ l
5. Se agitó en vortex.
6. Se incubó a 55°C por 10 min. Durante este tiempo, se mezcló por inversión el tubo cada 2 min.
7. Se centrifugó a 12000 rpm un minuto. Se descartó el sobrenadante con la pipeta.
8. Se agregaron 500  $\mu$ l de QX1. Se agitó en vortex. Se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante con la pipeta.
9. Se agregaron 500  $\mu$ l de regulador PE. Se agitó en vortex. Se centrifugó a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante con pipeta. Este paso se repitió una vez más.
10. Se centrifugó una vez más a 13000 rpm. Se descartó el líquido.
11. Se secó la pastilla a temperatura ambiente durante media hora.
12. Se agregaron 20  $\mu$ l de agua estéril.
13. Se incubó a 55°C por 5 min. Se agitó en vortex.
14. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto.
15. Se pasó el líquido a un tubo Eppendorf estéril de inmediato y se puso en hielo.
16. El producto se verificó en un gel de agarosa al 1.2% para determinar la calidad de la muestra.

### **Transformación (Kit TOPO TA Cloning para secuenciación, Invitrogen)**

#### **Protocolo para ligación con TOPO**

1. En un tubo de PCR debidamente etiquetado, se colocaron los siguientes reactivos:

ADN purificado	4 $\mu$ l
Solución salina	1 $\mu$ l
Vector pCR 4-TOPO	1 $\mu$ l
Volumen Final	6 $\mu$ l
2. Los tubos de PCR se pusieron en el termociclador a 23°C por 2:30 min para que se llevara a cabo la ligación.
3. Se colocó en hielo y se prosiguió con la transformación.

#### **Protocolo para transformación de células competentes**

1. Se añadió todo el producto de ligación dentro de un vial One Shot químicamente competente con *Escherichia coli* y se mezcló muy suavemente con la punta de la pipeta sin pipetear.
2. Se incubó el vial en hielo 10 min.
3. Se incubó el vial en agua precalentada a 42°C por 60 segundos. De inmediato se regresó al hielo 10 min.
4. Se añadieron al vial 300 µl de medio SOC a temperatura ambiente.
5. Se incubó el vial en una incubadora con agitación a 37°C y 250 rpm 1 hora. Los tubos se colocaron horizontalmente.
6. El contenido del vial se sembró en cuatro cajas Petri con agar LB y antibiótico kanamicina. La alícuota que se puso en cada caja Petri se distribuyó en el medio usando una varilla de vidrio acodada estéril.
7. Las cajas Petri sembradas se incubaron a 37°C toda la noche para la obtención de las colonias transformadas.

### **Extracción de DNA plasmídico de células transformantes (Kit Plasmid or cosmid DNA Purification, Quiagen), y verificación de la presencia del inserto.**

#### **Protocolo para multiplicación de células transformantes**

En un tubo Falcon debidamente etiquetado y con 5 ml de medio líquido LB, se puso a crecer cada una de las colonias transformantes durante toda la noche en incubadora con agitación a 37°C y 250 rpm.

#### **Protocolo para mini preparación**

1. En tubos Eppendorf debidamente etiquetados, se vaciaron 1.5 ml de medio líquido LB con las colonias transformantes de interés. Los tubos Falcon se agitaron antes de vaciar parte de su contenido a los tubos Eppendorf con la finalidad de remover a las bacterias que generalmente se asientan en el fondo del tubo. Esto se realizó en la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.
2. Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 13000 rpm 5 min. Se desechó el sobrenadante.
3. Se llenaron nuevamente los tubos Eppendorf con 1.5 ml de medio líquido LB con las colonias transformantes. Se centrifugaron a 13000 rpm 5 min y se desechó el sobrenadante.
4. Se adicionaron 250µl de solución reguladora P1 a cada tubo Eppendorf. Se resuspendieron las bacterias con vortex.
5. Se adicionaron 250µl de solución reguladora P2. Se invirtieron los tubos de 2 a 4 veces. Los tubos no deben permanecer en este paso por más de 5 min.
6. Se adicionaron 350µl de solución reguladora P3. Los tubos se invirtieron de 4 a 6 veces.
7. Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm 12 min.
8. En tubos nuevos debidamente etiquetados, se pasó con cuidado el sobrenadante con la pipeta. Se adicionaron 750µl de isopropanol frío para precipitar el ADN. Se dejó precipitar mínimo 1 hora a -20°C.
9. Se centrifugó a 13000 rpm 5 min.

10. Se descartó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla aproximadamente 30 min.
11. Se resuspendió la pastilla en 30  $\mu$ l de agua destilada estéril.
12. Para disolver el DNA se incubaron los tubos a 50°C por 2 min mezclando enseguida por vortex. Este paso se repitió una vez más.
13. Los tubos se almacenaron a -20°C.
14. En tubos aparte, debidamente etiquetados, se vacían 1.5 ml de medio líquido LB con las bacterias transformadas. Estos tubos Eppendorf se guardan a -4°C aparte como reserva de material para posteriores extracciones de ADN plasmídico.

### **Protocolo para digestión con EcoRI**

1. En un tubo de PCR estéril debidamente etiquetado se adicionaron los siguientes reactivos:
  - 1.0  $\mu$ l de ADN extraído por mini preparación.
  - 1.5  $\mu$ l de buffer 10x
  - 0.3  $\mu$ l de enzima Eco RI
  - 10  $\mu$ l de agua destilada estéril
2. Se dejó incubando a 37°C toda la noche.
3. Se verificó la presencia de inserto en un gel de agarosa al 1.2% cargando en el gel todo el producto de digestión.

### **Hibridación tipo Southern (Kit Gene Images Random Primer Labeling, Amersham Biosciences)**

#### **Protocolo para la separación de plásmidos con inserto y preparación de controles positivos**

1. Se seleccionaron aquellos tubos Eppendorf con plásmido extraído por minipreparación en los que se hubiera verificado la presencia de inserto.
2. La muestra de cada tubo se dividió en dos, ajustando cada una de las muestras a 30  $\mu$ l.
3. Se prepararon los controles positivos usando 20  $\mu$ l de cDNA para cada membrana de nitrocelulosa.

#### **Protocolo para marcado de sonda**

1. En un tubo PCR debidamente etiquetado, se adicionaron 25  $\mu$ l de cDNA purificado de la muestra problema de la fracción que se utilizó para hacer la hibridación sustractiva (B-D). En otro tubo se adicionaron 20  $\mu$ l de cDNA de la muestra control.
2. Ambos tubos se desnaturalizaron 5 min en agua hirviendo.
3. Ambos tubos se colocaron rápidamente en hielo por 5 min.
4. Se adicionó a cada uno de los tubos los siguientes reactivos:
 

Agua estéril	9 $\mu$ l
Mezcla de nucleótidos	10 $\mu$ l
Primers	5 $\mu$ l
cDNA desnaturalizado	25 $\mu$ l
Enzima exonucleasa	1 $\mu$ l

Volumen Total 50  $\mu$ l

(En la sonda control, se adicionaron 14  $\mu$ l de agua y 20  $\mu$ l de cDNA desnaturalizado)

5. Se mezcló muy ligeramente con la punta de la pipeta sin pipetear.
6. Se incubaron en termociclador a 37°C 3 horas.
7. Se almacenó a -20°C en la oscuridad.

#### **Protocolo para verificación de marcaje de la sonda**

1. En un tubo para PCR debidamente tapado de la luz con papel aluminio, se preparó una dilución 1:4 de los nucleótidos 5X en agua destilada estéril. Se prepararon 5  $\mu$ l.
2. En un envase pequeño se preparó una solución 1:9 de SSC 20X en agua estéril. Se puso a precalentar a 60°C en el hibridizador.
3. Se cortó un pedazo de membrana de nitrocelulosa (Hybond-N+, Amersham Biosciences) que pudiera ser introducido sin problemas en el envase con la solución de SSC 2X precalentada.
4. Se colocó sobre la membrana de nitrocelulosa los 5  $\mu$ l de la dilución de nucleótidos. En seguida, la sonda control marcada, seguida de la sonda problema marcada. Cada una de estas muestras se adicionó por separado a la membrana en forma de gotas consecutivas. Se pusieron las tres muestras lo más rápido posible.
5. Se introdujo inmediatamente la membrana en el envase con el SSC precalentado. Se incubó en el hibridizador a 60°C por 15 min con agitación suave.
6. Se verificó la membrana con luz UV. Se considero que el marcaje de la sonda es adecuado si la intensidad es similar a la dilución.

#### **Protocolo para la preparación del arreglo comprobatorio**

1. Se preparó el buffer de hibridación con los siguientes reactivos:

a. SSC 20X	25 ml
b. Líquido de bloqueo	5 ml
c. Sulfato de dextran	5 gr
d. SDS 10%	1 ml
e. Agua destilada estéril	Ajustar a 100 ml

Se prepararon 0.3ml de solución por cm<sup>2</sup> de membrana. La solución se separó en dos envases de plástico de tamaño adecuado.

2. Se pusieron a precalentar los dos envases con el buffer de hibridación en el hibridizador a 64°C (Este buffer se puede volver a reutilizar guardándolo en un envase protegido de la luz. Se adiciona nuevamente sonda al momento de volver a reutilizarlo).
3. Las membranas de nitrocelulosa que se iban a usar se marcaron con un pequeño corte.
4. Se desnaturalizaron las muestras por 5 min en agua hirviendo y enseguida se colocaron 5 min al menos en hielo.
5. Se armó el aparato Slot colocando 2 papeles filtro humedecidos con agua estéril, luego la membrana de nitrocelulosa humedecida por el revés y luego la tapa. Se aplicó vacío.
6. Se cargó los 30  $\mu$ l de cada muestra en cada slot.

7. Se retiró la membrana del aparato Slot y se fijó el DNA en el crosslinker dos pulsos óptimos (700 unidades de energía) por el envés de la membrana y uno por el revés.
8. Se colocó la membrana dentro del envase con el buffer de hibridación precalentado. Se dejó prehibridar al menos 30 min en el hibridizador a 64°C con agitación suave.
9. Se agregaron 10 µl de la sonda marcada y previamente desnaturalizada 5 min en agua hirviendo y 5 min en hielo. A uno de los envases se adicionó la sonda de la muestra control. Al otro la sonda de la muestra problema.
10. Se dejaron las membranas hibridando durante mínimo 12 horas, máximo 16 horas.

#### **Protocolo para lavados de astringencia**

1. Se prepararon tres buffers de astringencia usando los siguientes reactivos:
  - a. Buffer 1      SSC 0.5X  
                      SDS 0.1%
  - b. Buffer 2      SSC 0.25X  
                      SDS 0.1%
  - c. Buffer 3      SSC 0.125X  
                      SDS 0.1%
2. Los buffers se pusieron a precalentar a 64°C en el hibridizador 15 min antes.
3. Las membranas se lavaron con los 3 buffers de astringencia por 15 min en cada uno de ellos, dejándolos durante este tiempo en el hibridizador a 64°C y agitación suave. Se desechan los buffers.

#### **Protocolo para detección y revelado de las membranas**

1. Durante este procedimiento, las membranas se cubrieron de la luz con papel aluminio.
2. Se preparó el buffer de detección (dilución 1:10 de líquido de bloqueo en Buffer A) y se precalentó a 36°C.
3. Las membranas se pusieron en el buffer de detección 1h. (Este buffer se puede volver a utilizar. Se guarda a -4 °C y cubierto de la luz. Al reutilizarse se deja 1.5 h).
4. Se preparó el buffer de anticuerpo (Fosfatasa alcalina antiluoresceína en dilución 1:5000; BSA al 0.5% en buffer A) y se precalentó a 36°C. (Se recomienda prepararlo en tubos Falcon de 50 ml. Se agrega el BSA cristalizado, se agrega un poco de buffer A y se disuelve el BSA moviendo rotatoriamente el tubo Falcon teniendo cuidado de no hacer burbujas. Posteriormente se agrega el resto de buffer A y el anticuerpo).
5. Las membranas se colocaron en el buffer de anticuerpo 1h. (Se puede volver a reutilizar el buffer guardándolo lejos de la luz a -4 °C. Al reutilizarse se deja de 2 a 3 horas).
6. Se preparó la solución de lavado con Tween 20 (0.3% de Tween en buffer A).
7. Las membranas se lavaron 10 min con la solución preparada de Tween. Este lavado se repitió 2 veces más.
8. Cada una de las membranas se colocó en una bolsa de plástico sellable.

9. Abriendo el plástico y a lo largo de la membrana se agregaron 500  $\mu$ l de sustrato. El plástico se cerró y se selló por los otros dos lados. Se etiquetó debidamente y se dejó revelando 1.5 horas. (Se pueden revisar a las 1.5 y 3 horas después).
10. Las membranas se vieron y se compararon con luz normal, seleccionando aquellas en que la intensidad del color era más fuerte con la sonda problema que con la sonda control.

### **Secuenciación (Kit QIAprep Miniprep para purificación de DNA grado biología molecular, Qiagen)**

#### **Protocolo para purificación de ADN plasmídico de clonas para enviar a secuenciación**

1. Una vez determinadas las clonas diferenciales, se pusieron a crecer 30  $\mu$ l de la solución de bacterias en medio LB (último paso del protocolo de mini preparación) en tubos Falcon con medio LB más ampicilina y kanamicina. Los tubos se incubaron a 38°C toda la noche.
2. En tubos Eppendorf debidamente etiquetados, se vaciaron 1.5 ml de medio líquido LB con las colonias transformantes de interés. Los tubos Falcon se agitaron antes de vaciar parte de su contenido a los tubos Eppendorf con la finalidad de remover a las bacterias que generalmente se asientan en el fondo del tubo. Esto se realizó en la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.
3. Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 12000 rpm 5 min. Se desechó el sobrenadante.
4. Se llenaron nuevamente los tubos Eppendorf con 1.5 ml de medio líquido LB con las colonias transformantes. Se centrifugaron a 12000 rpm 5 min y se desechó el sobrenadante.
5. Se adicionaron 250 $\mu$ l de solución reguladora P1 a cada tubo Eppendorf. Se resuspendieron las bacterias con vortex.
6. Se adicionaron 250 $\mu$ l de solución reguladora P2. Se invirtieron los tubos de 2 a 4 veces. Los tubos no deben permanecer en este paso por más de 5 min.
7. Se adicionaron 350 $\mu$ l de solución reguladora N3. Los tubos se invirtieron de 4 a 6 veces.
8. Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm 12 min.
9. El contenido de la fase líquida se pasó a una mini columna azul (QIAprep Spin Column, QIAGEN). Se dejó reposar por 5 min y se centrifugó a 12000 rpm por 1 min.
10. Se desechó la fase líquida. Se adicionaron 350  $\mu$ l de solución PE y se centrifugó a 12000 rpm 1min.
11. Se desechó el líquido. Se centrifugó a 12000 rpm 1 min.
12. La columna se cambió a un tubo Eppendorf estéril y debidamente etiquetado. Se agregaron 30 $\mu$ l de agua destilada estéril en el centro de la mini columna sin tocar la membrana. Se dejó 5 min para que la membrana se humedezca.
13. Se centrifugó a 14000 rpm 2 min.
14. Se corre un gel de agarosa al 1.2% para verificar la presencia del plásmido, su calidad y concentración. Se recomienda que se verifique la presencia de



inserto a una muestra representativa del total de clonas a mandar secuenciar.

## ANEXO II

### Medios

#### Medio de cultivo LB

Bactotriptono o peptona de caseína	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g

Disolver en 950 de agua destilada, aforar a 1000 ml y ajustar el pH 7.0. Esterilizar a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar 1ml de ampicilina y/o kanamicina (50 mg/ml).

#### Agar LB

Bactotriptono o peptona de caseína	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Agar bacteriológico	15g

Disolver en 950 de agua destilada, aforar a 1000 ml y ajustar el pH 7.0. Esterilizar a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente a no menos de 60°C. Agregar 1ml de ampicilina y/o kanamicina (50 mg/ml). Vaciar a cajas Petri y dejar solidificar.

### Soluciones

#### Buffer TNE 1X

Tris HCl pH 8	10 mM
NaCl	10 mM
EDTA	0.1 mM

Se ajusta el pH a 8 con NaOH. Se esteriliza en autoclave.

#### Buffer A

Tris HCl	100 mM
NaCl	300 mM

Se ajusta el pH a 7.2-7.4 con NaOH. Se esteriliza en mismo día que se va a usar.

#### Solución TAE 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH8	100 ml

Se lleva a 1 litro. Se ajusta el pH a 8 con ácido acético y se esteriliza.