



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO BIOLOGIA MOLECULAR

**Aislamiento e identificación de genes de
Sclerotium cepivorum Berk que se reprimen
durante la interacción con ajo (*Allium sativum* L.)**

Tesis que presenta

María Isabel Hernández Alvarez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Directores de Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Dr. Lorenzo Guevara Olvera

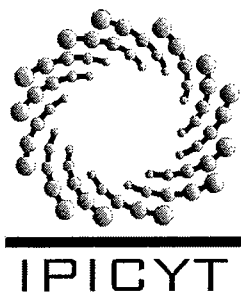
San Luis Potosí, S.L.P., 3 de Julio del 2006.



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Celaya, bajo la dirección de los Doctores Lorenzo Guevara Olvera y Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (182362).



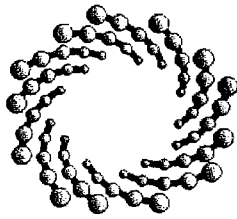
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Aislamiento e identificación de genes de *Sclerotium cepivorum* Berk que se reprimen durante la interacción con ajo (*Allium sativum* L.)" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Maria Isabel Hernández Alvarez** y aprobada el **28 de junio de 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Francisco Jiménez Bremont
(Codirector de la tesis)

Dr. Lorenzo Guevara Olvera
(Codirector de la tesis)

Dr. J. Sergio Casas Flores
(Asesor de la tesis)



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 024 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 3 días del mes de julio del año 2006, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dr. Lorenzo Guevara Olvera	Secretario	Instituto Tecnológico de Celaya
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

María Isabel Hernández Alvarez

sobre la Tesis intitulada:

Aislamiento e Identificación de Genes de Sclerotium cepivorum Berk que se Reprimen Durante la Interacción con Ajo (Allium sativum L.)

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Dr. Lorenzo Guevara Olvera (Instituto Tecnológico de Celaya)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes julio de 2006.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

Muéstrame Oh! Señor tus caminos, enséñame tus sendas, encamíname en tu verdad y enséñame porque tú eres el Dios de mi salvación. (Salmo 25,4-5)

Dedico el presente trabajo en primer lugar a Dios todopoderoso que me ha dado vida y la oportunidad de temer su nombre.

A mis padres porque han integrado el soporte para formar a mis hermanos y a mi como personas de bien.

A mi mamá por ser la mejor mujer que conozco, porque a pesar de todo sigues en pie y dando lo mejor de ti. Porque eres mi ejemplo de amor, lealtad y perseverancia. Mamá Te quiero mucho. Gracias por no abandonarme.

A mi papá por tu ejemplo de fortaleza y rectitud. Porque gracias a ti, conocí el sentido de la responsabilidad y confianza. A ti papá que no te dejas caer pese a las adversidades. Te quiero mucho Papá. Gracias por estar ahí siempre.

A mis hermanos, que me apoyan siempre. Cada uno de ustedes me ha dado antes que cualquier cosa su corazón y para mi eso es lo más importante. Gracias.

A mi hermana por su incomparable apoyo, confianza y consejos. Gracias por darme la oportunidad de conocer y convivir con mis sobrinos.

Agradecimientos

Al **Dr. Lorenzo Guevara Olvera** por aceptarme en su grupo de investigación, por todo el apoyo y consejos tanto en el ámbito profesional como en el personal, gracias.

Al **Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont** por su apoyo y ayuda en el desarrollo de este trabajo. Por brindarme la oportunidad de integrarme a su grupo de laboratorio y considerarme parte de él.

Al **Dr. Sergio Casas Flores** por sus sugerencias y tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

A **Humberto**, porque sigues apostando por mi. Por darme el impulso para crecer como persona y como profesionista. Porque a pesar de todo sigues ahí, buscándote la vida. Te admiro y te quiero mucho.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Biología Molecular del Tecnológico de Celaya: **Paulina Lozano, Violeta, Maria Elena, Araceli, Miriam, Adrien, Ahui, Félix, Miguel Ángel, Paulina Saucillo, Rafa, Magaña, Betillo, Guadalupe, Belem, Yola, Maria Esther y Angelina**, gracias por su ayuda y comprensión.

A mis amigas y compañeras de casa en Celaya: **Yola, Laura, Giovanna y Tere**. Gracias Tere por hacer de tu casa un hogar para nosotras. Yola, gracias por todo tu apoyo, tus consejos y al igual que Tere estar ahí en el momento preciso en que necesitaba una amiga, eso lo llevo en mi corazón.

Gracias **Faby** por brindarme tu casa pero sobre todo gracias por tu amistad. A **Areli, Claudia Robledo y Silvia Flores** por su amistad, gran ayuda y compañía en mi estancia en San Luis Potosí.

A los integrantes del laboratorio 7 del IPICYT, por recibirme no como a una extraña sino como a una amiga, en especial a: **Claudia, Yadira, Margarita y Pablo**, gracias por brindarme la oportunidad de conocerlos y considerarlos mis amigos.

A mis amigos incondicionales que me han acompañado en el difícil camino de la vida: **Emmanuel, Yudith, Mario, Eduardo Ligas y Maria Esther**, gracias por que sé que siempre podré contar con ustedes.

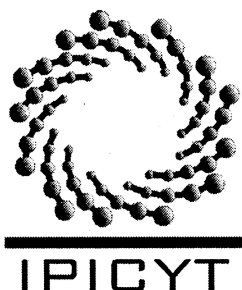
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la beca otorgada No. de Registro 182362.

INDICE

Página

Constancia de aprobación de la tesis	
Créditos institucionales	
Acta de Examen	
Dedicatorias	
Agradecimientos	
Resumen	
Abstract	
1. Introducción	1
2. Material y Métodos	
2.1. Materiales	3
2.2. Desarrollo del modelo de interacción Ajo- <i>Sclerotium cepivorum</i> para realizar la SSH reversa	3
2.3 Técnica de Hibridación Substractiva bajo Supresión	
2.3.1 Extracción de RNA	3
2.3.2 Síntesis, amplificación y purificación de la población de cDNA	3
2.3.3 Construcción de la genoteca substractiva	4
2.3.4 Almacenamiento de la genoteca substractiva	4
2.3.5 Construcción de los macroarreglos de cDNA	4
2.4 RT-PCR	5
2.5 Experimentos para el análisis de la expresión de los genes aislados por la SSH en otros sistemas de interacción	6
2.6 Análisis morfológicos de <i>Sclerotium cepivorum</i>	6
3. Resultados	
3.1 Establecimiento del modelo de la interacción Ajo- <i>Sclerotium</i> <i>cepivorum</i> para el desarrollo de la SSH	8
3.2 Identificación de genes reprimidos de <i>Sclerotium cepivorum</i> en la interacción con ajo	9
3.3 Análisis de la expresión de genes reprimidos de <i>Sclerotium</i> <i>cepivorum</i> a diferentes tiempos de interacción con el ajo	11
3.4 Análisis de los genes reprimidos de <i>Sclerotium cepivorum</i> aislados en la SSH reversa en interacción con Disulfuros de Dialilo (DADs)	13
3.4.1 Experimentos de morfología	13
3.4.2 Macroarreglos para la condición con DADs	15

3.5	Análisis de los genes reprimidos de <i>Sclerotium cepivorum</i> aislados en la SSH en la interacción con una planta no hospedante (maíz)	17
3.5.1	Macroarreglos para la condición con maíz	18
3.6	RT-PCR de 7 genes aislados en la SSH	18
3.7	Estudio de la interacción del maíz con <i>Sclerotium cepivorum</i> asociado con el cambio morfológico del hongo debido al estímulo por DADs o Ajo	19
4.	Discusión	21
5.	Referencias	24



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Aislamiento e identificación de genes de *Sclerotium cepivorum* Berk que se reprimen durante la interacción con ajo (*Allium sativum* L.)" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Maria Isabel Hernández Alvarez** y aprobada el **28 de junio de 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Francisco Jiménez Bremont
(Codirector de la tesis)

Dr. Lorenzo Guevara Olvera
(Codirector de la tesis)

Dr. J. Sergio Casas Flores
(Asesor de la tesis)

RESUMEN

La pudrición blanca es una enfermedad causada por el hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berk, es considerada como el principal factor de pérdida en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) alrededor del mundo. El control de este hongo representa un gran reto, debido a la capacidad que tiene para formar esclerocios, los cuales, son estructuras de resistencia de gran tolerancia a cambios en los factores ambientales y gran longevidad, ya que pueden permanecer en dormancia durante más de 20 años alojados en el suelo. Varias estrategias han sido empleadas como parte de un programa de control integrado, desafortunadamente, ninguna ha resultado satisfactoria. La identificación de blancos genéticos potenciales que permitan el diseño de estrategias de control de la patogénesis es uno de los enfoques sugeridos y para ello, el estudio de la expresión genética diferencial es una herramienta fundamental. La Hibridación Substractiva bajo condiciones de Supresión (SSH) es una técnica de PCR que permite la identificación de genes inducidos y reprimidos. Recientemente, se han descrito genes que se reprimen en *Fusarium oxysporum* durante la patogénesis en algodón, los cuales podrían estar involucrados en el fenómeno de patogénesis. De acuerdo a estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo tiene el interés en aislar e identificar genes de *S. cepivorum* que se reprimen durante la interacción con la raíz de ajo como parte de un proyecto global que incluye el análisis de la expresión genética diferencial en el patógeno, en el huésped susceptible y tolerante a la pudrición blanca. Para obtener la SSH, se colocó un diente de ajo y 1 disco de micelio (condición control) y 1 disco de micelio (condición problema), el micelio fue cosechado a las 72 h post-inoculación. Posterior al procedimiento SSH, mediante ensayos tipo Southern a macroarreglos, se seleccionaron un total de 13 unigenes. Los genes identificados en este estudio por comparación con la base de datos NCBI, incluyen los que codifican para la enzima glioxal oxidasa *Glo 1*, la chaperona MOD E, la proteína *Cbk1p*, el transportador alta afinidad *Nramp 1*, la proteína o-fucosiltransferasa, la proteína músculo específica *Murf 1*, la proteína nebulina, la proteína de lisis *mut E*, una transposasa IS10 y proteínas hipotéticas. Algunos de estos genes están implicados en el crecimiento apical, lo cual permite

especular que la represión de estos transcritos permite el cambio morfológico que sufre *S. cepivorum* cuando se encuentra atacando al ajo. Durante la interacción, el micelio del hongo se presenta menos ramificado y alargado comparado con el crecimiento en ausencia de ajo. Para analizar esta diferencia de forma de crecimiento y la expresión de los transcritos de los genes obtenidos, se realizaron experimentos de interacción con disulfuros de dialilo (metabolitos producidos por ajo), con una planta no hospedante (maíz) e interacciones combinando estos componentes. Los resultados confirmaron la represión de los transcritos por el ajo y su metabolito y que el cambio en el patrón de crecimiento del hongo se debe a la presencia de los disulfuros de dialilo y al ajo.

Palabras clave: *Sclerotium cepivorum*, Pudrición blanca, Expresión genética diferencial

Abstract

White rot (WR) caused by *Sclerotium cepivorum* Berk, is the predominant disease of garlic (*A. sativum*) crops worldwide. Several strategies for WR control are now being used as part of an integrated control program, but with unsatisfactory results. Therefore, the study of the gene differential expression could provide clues about pathogenesis regulation and may lead to the discovery of molecular targets for novel antifungal drugs. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) is a PCR technique which permits the identification of both expressed and repressed genes. Recently, repressed genes have been reported during *Fusarium oxysporum*-cotton pathogenesis, these genes could be involved in this phenomenon. According to this, we have the interest in isolating and identifying repressed genes of *S. cepivorum* during fungus-garlic interaction, like part of a global project that includes the analysis of differential genetic expression in the pathogen and in the susceptible and tolerant host to white rot. Reverse SSH was performed to obtain this objective, where 13 uni-genes were obtained from the reverse subtraction of cDNA pools derived from fungus in absence (tester) and presence (driver). Differential gene expression was confirmed by Southern blot to arrays where replicates of reverse SSH library were individually hybridized with either driver or tester cDNA probes. 13 non redundant genes from 79 clones differentially expressed were isolated and their nucleotide sequences were obtained. Several gene fragments include homologues to *glyox1* (glyoxal oxidase), *Cbk1p* protein (required for efficient apical growth), *mod-E* (chaperone HSP90), nebuline, muscle specific *Murf 1*, *mutE* (lysis protein), IS10 transposase, into others. Some of these genes are involved in apical development, so we speculate that this transcriptional repression could be related to a morphological change observed in *S. cepivorum* when it is interacting with the garlic. At this stage, the mycelium is shorter than in absence of the garlic. In order to analyze this growth pattern and the expression of the isolated genes, several interaction experiments using diallyl disulfide exudates (natural *Allium* products), non host plant (maize) and a combination of these components were performed. Results confirm that the repression of the isolated

genes in presence of garlic and diallyl disulfide exudates correlates with fungal morphological change.

Keywords: *Sclerotium cepivorum*, Differential gene expression, SSH, White rot

1 INTRODUCCION

Sclerotium cepivorum Berk es el agente causal de la enfermedad conocida como “Pudrición Blanca”, es un hongo fitopatógeno que puede afectar la producción de ajo alrededor del mundo con perdidas hasta en un 100% de la cosecha (Pérez *et al.*, 1998a).

Según Agrios (2002), *Sclerotium cepivorum* pertenece a la División Eumycota, Clase Deuteromicetes y Orden Agonomycetales. Se propaga de forma rápida y únicamente se hospeda en plantas del género *Allium*. No se conoce su estado sexual. Desarrolla abundante micelio algodonoso y ramificado que al compactarse forma esclerocios esféricos de color negro; los cuales pueden permanecer viables hasta por 20 años alojados en el suelo (Crowe *et al.*, 1980). Los esclerocios son la fuente de inóculo primario debido a su capacidad de sobrevivencia. De tal manera que al sembrar plantas del genero *Allium*, los exudados radicales como son los disulfuros de dialilo que emiten como producto de su metabolismo, inducen la germinación de los esclerocios para dar lugar al ciclo patogénico del mismo (Entwistle, 1981). La enfermedad se inicia con la producción de las hifas por la germinación de los esclerocios, éstas infectan las raíces e invaden la base del tallo de la planta, como resultado, las raíces se colapsan y el bulbo se pudre, dando lugar al amarillamiento, marchitez y necrosis del follaje (Ellis *et al.*, 1993).

A pesar de los intentos para controlar esta enfermedad, ninguna de las estrategias culturales, físicas, químicas y/o biológicas aplicadas han resultado satisfactorias (Delgadillo *et al.*, 1998). Una alternativa que consiste en el mejoramiento genético para la obtención de plantas resistentes a la pudrición blanca se encuentra en desarrollo.

Como alternativa, la biología molecular con las técnicas para análisis de la expresión genética diferencial, ofrece las herramientas necesarias como la hibridación substractiva bajo supresión (SSH), una metodología basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Diatchenko *et al.*, 1996) que permite aislar e identificar fragmentos de genes inducidos (forward) o reprimidos (reverse) para generar información sobre genes expresados diferencialmente en diferentes procesos como en el caso de la patogénesis de *S. cepivorum* y con esta

información diseñar nuevas estrategias para su control. Relacionado con lo anterior, existen reportes donde se ha analizado la expresión genética diferencial de hongos patógenos, en éstos, se han encontrado genes inducidos y reprimidos cuando se lleva a cabo la interacción hospedante-patógeno (Down *et al.*, 2004, Harrier *et al.*, 2000, Braun *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha reportado un gen que codifica para glioxal oxidasa requerido para el crecimiento filamentoso y patogenicidad de *Ustilago maydis* (Leuthner *et al.*, 2004).

En nuestro grupo de investigación se han obtenido genes inducidos de *S. cepivorum* durante el inicio del proceso de patogénesis con ajo (Ramírez-Medina, 2004). De igual manera, observamos un cambio morfológico en el desarrollo del micelio de *S. cepivorum* en presencia o ausencia del ajo, lo cual pudiera estar relacionado con la patogenicidad del hongo, así como se conoce que es necesario la morfología de micelio para la patogenicidad de *Ustilago maydis* (Leuthner *et al.*, 2004). Por lo que, el objetivo del presente trabajo fué aislar e identificar los genes que se reprimen en el hongo durante la patogénesis. Este objetivo se logró mediante la construcción de un banco substractivo conteniendo fragmentos de genes que se expresan diferencialmente durante la interacción primaria o inicial entre *S. cepivorum* y el ajo. Los resultados muestran que un grupo de estos genes podrían estar involucrados en el cambio morfológico observado en el hongo dirigido a la patogenicidad. En un futuro trabajo, será importante demostrar molecularmente el papel que juegan los genes inducidos y reprimidos durante la pudrición blanca para emplearlos como potenciales blancos genéticos para el control de la enfermedad.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

Se empleo la cepa C2 de *S. cepivorum* Berk, aislada de Cortazar, Gto. México. El material vegetativo que se empleó fueron dientes de ajo Taiwán, variedad Tingüindin y semilla de maíz variedad B04L19 (lote 102), proporcionados por el campo experimental Bajío, INIFAP. Los dientes de ajo y las semillas de maíz fueron desinfectadas con etanol al 70% por 5 minutos, hipoclorito de sodio al 0.6% por 15 min, seguido por dos lavados con agua destilada estéril. El hongo fue propagado a partir de un esclerocio en medio Czapek agar (DIFCO). El micelio empleado para los tratamientos experimentales fue de un tiempo de crecimiento de 7 días a una temperatura de 16 °C en este medio. Los disulfuros de dialilo empleados fueron de la marca SIGMA.

2.2 Desarrollo del modelo de interacción *Sclerotium cepivorum*-ajo para realizar la SSH reversa.

En esta fase, dos condiciones fueron establecidas, micelio y micelio en presencia de ajo. En cajas de Petri con 20 ml de agua destilada estéril con y sin un diente ajo, se colocó 1 disco de 1 cm de diámetro de medio Czapek agar conteniendo micelio de *S. cepivorum* crecido por 7 días. Las cajas fueron transferidas a una incubadora donde se mantuvieron a 16 °C en la oscuridad y los micelios fueron cosechados a las 24, 72 y 96 h después de haber sido inoculados.

2.3 Técnica de Hibridación Substractiva bajo Supresión

2.3.1 Extracción de RNA

El RNA total fue extraído del micelio de todas las condiciones a los diferentes tiempos de acuerdo al protocolo del manual RNeasy kit (Qiagen). Para verificar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en un gel de agarosa desnaturizante al 1% (datos no mostrados).

2.3.2 Síntesis, amplificación y purificación de la población de cDNA

Se empleó 1 µg de RNA total de cada condición como templado para sintetizar el cDNA utilizando la enzima Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) y el kit de síntesis SMART™ PCR cDNA synthesis kit (Clontech). Para purificar la población de cDNA se emplearon Columnas de CROMA-SPIN 1000.

2.3.3 Construcción de la genoteca substractiva

La SSH reversa se realizó de acuerdo al protocolo de CLONTECH PCR-Select™ cDNA subtraction kit (Clontech), empleando el micelio que se cosechó a las 72 h post-inoculación. El cDNA de la condición ajo y micelio fué empleada como control (driver) y el cDNA de la condición micelio fué empleada como problema (tester). Ambos cDNAs fueron digeridos con la enzima *Rsa*I, y el cDNA problema fue ligado a diferentes adaptadores. Para normalizar y enriquecer los cDNAs expresados diferencialmente se realizaron dos rondas de hibridación y amplificación por PCR. Los productos del segundo PCR fueron clonados en el vector TOPO PCR 4 (Invitrogen) y los productos de ligación fueron utilizados para transformar células de *Escherichia coli* TOP 10F' (Promega).

Las células transformadas fueron plaqueadas en cajas de Petri con LB/kanamicina y se dejaron crecer toda la noche. Las colonias transformantes fueron cultivadas individualmente en medio LB/ampicilina/kanamicina a 37 °C toda la noche. Los plásmidos fueron analizados y seleccionados de acuerdo a la presencia de insertos usando la enzima de restricción *Eco*RI.

2.3.4 Almacenamiento de la genoteca substractiva

Las colonias recombinantes seleccionadas fueron inoculadas por separado en 5 ml de medio LB/ampicilina/kanamicina y fueron cultivadas en agitación a 37 °C toda la noche. Posteriormente, 500 µl de cada cultivo fueron añadidos a un vial criogénico de 2 ml (Corning) que a su vez contenía 500 µl de glicerol al 100% y se almacenaron a -80 °C.

2.3.5 Construcción de los macroarreglos de cDNA

Para confirmar la expresión diferencial de las clonas positivas, 3 µg de cada plásmido recombinante fueron fijados en una membrana de nylon BrightStar™-Plus cargada positivamente (Ambion Inc), para construir arreglos de 12X4 clonas usando el PR 648 Slot Blot Manifold (Amersham Biosciences).

Replicas de las clonas obtenidas de la SSH reversa fueron hibridadas con las sondas de cDNA del control y problema. El marcaje y detección de las sondas fué generado por la incorporación de fluoresceína-11-dUTP empleando Gene Images CDP-Star random prime labeling y detection module (Amersham Pharmacia Biotech Inc). El análisis de los resultados y la clasificación fueron llevados a cabo de acuerdo al criterio que describe el paquete de reactivos. Las clonas diferenciales fueron seleccionadas y la secuenciación se llevó a cabo con el aparato ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Las intensidades de las señales de las clonas diferenciales fueron cuantificadas empleando el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). La comparación de las secuencias con la base de datos fue realizada empleando el algoritmo Blastx del NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

2.4 RT-PCR

Para corroborar la expresión diferencial de algunos de los genes aislados, se extrajo RNA total de todas las condiciones experimentales y se sintetizó cDNA (como se describió anteriormente). La secuencia de los oligonucleótidos empleados para las amplificaciones RT-PCR se muestra en la tabla 1. El gen que codifica para la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa de *Sclerotium cepivorum* (*GdphSc*) se empleó como un control interno. Se realizaron las amplificaciones a 30 ciclos de PCR con una temperatura de alineamiento de 60 °C. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de Etidio y fotografiados usando el software de BioCaptMw (Vilber Lourmat Corp.). Los archivos fueron importados en formato TIFF, y evaluados para la expresión diferencial. Las intensidades de las señales de las amplificaciones fueron cuantificadas empleando el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para los experimentos de RT-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
Sc 10S	AAGCTGGAGGGCGTGTCTGTGC
Sc 10AS	TCACCTTCGCCAGTGGTGTCAAGT
Sc 18S	GATCGAGGAGACGTTACCA
Sc 18AS	GAAAGAATAATATCTACTGTCTGG
Sc 50S	GGCAGTGTAGTGGGCAGGGAAT
Sc 50AS	CTCATCCAGGATGGCATAACAACG
Sc 71S	GGAATTCAAACAATAAGCAATTA
Sc 71AS	CTTGTGTTTCATCATTGTTAAC
Sc 72S	AGCTCTTTACCACTGTCCAAC
Sc 72AS	CAAGCCTACGTTGCTCACTAT
Sc 88S	GCATCTCCGCTGCCGATTCAAC
Sc 88AS	TCCAAGATGACTTTAACCTATGCGG
Sc 92S	CCTGCCTTCCAGCACCTTGTCC
Sc 92AS	CGTGCTGTGTTCGGATCATCGTC
Sc Gdph S	GGTGTCAACAACGAGACCTACA
Sc Gdph AS	GCGGACAGTCAAGTCAACAAC

2.5 Experimentos para el análisis de expresión de los genes aislados por la SSH en otros sistemas de interacción.

Para establecer un control negativo vegetativo, y determinar si los genes identificados por SSH reversa presentan una expresión diferente cuando el hongo esta solo o en presencia de una planta no hospedante, se colocó 1 disco de micelio en contacto con la raíz de una semilla de maíz, en 20 ml de agua estéril y se incubó a 16 °C en la oscuridad. La cosecha del micelio se realizó a las 72 h post-inoculación.

De la misma manera, para observar si los genes aislados se reprimen por la presencia del hospedante o por los DADs, en una caja de Petri con 3 divisiones se colocaron 10 ml de agua destilada estéril, se colocó 1 disco de micelio en cada una de 2 de la divisiones, en la tercera división se colocó un algodón con 2 ml de DADs al 0.075%. La cosecha del micelio se realizó a las 72 h después.

2.6 Análisis morfológicos de *Sclerotium cepivorum*

a) Con disulfuros de dialilo (DADs)

Dos experimentos fueron establecidos para evaluar el efecto de los DADs (compuesto metabolizado por la microbiota del suelo a partir de exudados naturales del ajo) sobre la morfología de *S. cepivorum*, en uno se utilizaron esclerocios y en otro micelio del hongo. El experimento 1 (a1) se realizó por duplicado utilizando medio Czapek y PDA, consistió en colocar en una caja de Petri 10 gotas de agar (se realizó el experimento con medio Czapek y PDA) con un esclerocio en cada gota, y en el centro de la caja un cuadrado de 2X2 cm de algodón con 2 ml de agua destilada estéril o 2 ml de DADs al 2%. En el experimento 2 (a2), se utilizaron cajas de Petri con tres divisiones, dos de las divisiones contenían agua destilada estéril y 1 disco de 1 cm de diámetro de medio Czapek agar conteniendo micelio crecido por 7 días y en la tercera división un algodón que contenía agua destilada estéril o DADs al 0.075%. En ambos experimentos 3 repeticiones fueron realizadas. Las cajas de los dos experimentos fueron incubadas a 16 °C en la oscuridad a las 72 h el crecimiento del hongo fue observado al microscopio.

b) Con maíz y diente de ajo

Para observar la diferencia de patrón de crecimiento de micelio expuesto a ajo, maíz y DADs se estableció un experimento en el que se incluyeron los siguientes tratamientos (todos en cajas de Petri con 20 ml de agua destilada estéril):

- 1.- Ajo únicamente, (A).
- 2.- Maíz únicamente, (M).
- 3.- Disco de micelio crecido por 7 días en medio Czapek agar, (S).
- 4.- Ajo incubado por 3 días en agua inoculado con un disco de micelio crecido por 7 días en medio Czapek agar, (AS).
- 5.- Maíz incubado por 3 días en agua inoculado con un disco de micelio crecido por 7 días en medio Czapek agar (MS).
- 6.- Ajo incubado por 3 días en agua inoculado con un disco de micelio que se había dejado crecer por 3 días en agua, (AS3).

7.- Maíz incubado por 3 días en agua inoculado con un disco de micelio que había sido expuesto por 3 días en ajo que tenía 3 días de germinado, (MS3).

8.- Maíz incubado por 3 días en agua tratado al tercer día con 2 ml de DADs (0.075%) e inoculado con un disco de micelio del hongo crecido por 7 días en Czapek agar, (MSc3).

Los tratamientos 1-5 fueron empleados como controles. Las cajas petri fueron incubadas a 16 °C en la oscuridad. Se hicieron observaciones sobre desarrollo del micelio a partir del tercer día para todos los tratamientos.

3 RESULTADOS

3.1 Establecimiento del modelo de la interacción Ajo-*Sclerotium cepivorum* para el desarrollo de la SSH.

En nuestro grupo de investigación se ha observado que *S. cepivorum* presenta un cambio en su patrón de crecimiento cuando interacciona con su hospedante en comparación cuando crece en ausencia de éste. Así, se estableció un modelo experimental donde se prepararon dos condiciones, en ausencia y presencia de ajo (ver materiales y métodos). Respecto a la preparación de esta última condición, un diente de ajo debe permanecer en agua por 3 días antes de ser inoculado con el micelio de *S. cepivorum*, durante este tiempo se desarrolla la raíz, exudando los disulfuros de dialilo y otros compuestos radicales, que estimulan la patogénesis del hongo (Delgadillo *et al.*, 2000).

En relación al crecimiento del hongo no se observó cambio significativo durante el primer día después de iniciado el experimento, fue hasta las 72 h cuando se observó que el micelio se había desarrollado de forma diferente dependiendo de la condición en que se encontraba. Cuando el micelio creció en presencia de ajo el crecimiento fué uniforme, las hifas se observaron mas juntas en comparación a cuando el hongo fué crecido solo, el crecimiento fué muy ramificado, hifas mas alargadas (Fig. 1). Al cuarto día (96 h), el hongo ya había invadido la raíz del ajo. De acuerdo a nuestro objetivo, el cual consiste en aislar e identificar los genes del hongo que se reprimen al inicio del proceso de patogénesis, se seleccionó el tiempo de 72 h para llevar a cabo la cosecha de micelio y crear la genoteca subtractiva (Fig. 1), ya que en este momento se ha observado que en el hongo se inducen genes involucrados en el proceso patogénico (Ramírez-Medina, 2004).



Fig. 1. Micelio de *Sclerotium cepivorum* a las 72 h post-inoculación. Condición problema: disco de micelio y agua; condición control: disco de micelio, agua y un diente de ajo.

3.2 Identificación de genes reprimidos de *Sclerotium cepivorum* en la interacción con ajo.

Para identificar los genes reprimidos de *S. cepivorum* durante la interacción con ajo, se construyó una SSH a las 72 h de crecimiento del hongo sin el ajo (problema ó tester) y la interacción del hongo con el ajo (control ó driver). Posteriormente se clonaron los fragmentos amplificados y se procedió a realizar un primer escrutinio mediante una hibridación tipo Southern a macroarreglos de cDNA, empleando como sondas los cDNAs problema y control marcadas con fluoresceína. De un total de 208 clonas se seleccionaron 79 para secuenciar, en éstas se observó señal más intensa, sus insertos se encontraron en un rango de 130 a 380 pares de bases (pb).

Después de ensamblar y analizar las secuencias obtenidas, un total de 13 unigenes fueron obtenidos de la SSH reversa. La búsqueda de homología de estos transcritos reveló que las secuencias encontradas son similares a hongos, animales y otros microorganismos. Los genes identificados en este estudio incluyen los que codifican para la enzima glioxal oxidasa, la chaperona MOD E, la proteína *Cbk1p*, el transportador alta afinidad *Nramp 1*, la proteína o-fucosiltransferasa, la proteína músculo específica *Murf 1*, la proteína nebulina, una proteína de lisis, una transposasa IS10 y proteínas hipotéticas (Tabla 2). También

fueron identificados transcritos cuyas secuencias no se encontraron similares a alguna secuencia reportada, como se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2. Clasificación de las secuencias de cDNA aisladas en la SSH reversa.

Clasificación de fragmentos					
Clonas	Número de acceso (NCBI)	Gen con mayor homología	I/P*	Posible función	Referencia
Homología a Hongos					
Sc 71	DW520899	<i>Glo 1</i> , Glioxal oxidasa (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	53/61	Requerida para crecimiento filamentosos	Leuthner <i>et al.</i> , 2005
Sc 72	DW520897	<i>MOD-E</i> (<i>Podospora anserina</i>)	86/95	Formación de estructuras de resistencia	Loubradou <i>et al.</i> , 1997
Sc 88	DW520896	<i>Cbk1p</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	87/92	Requerida para un crecimiento eficiente	Weiss <i>et al.</i> , 2002
Similares a animales					
Sc 18	DW520901	Proteína <i>Nramp 1</i> (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	42/57	Transportador divalente	Dorschner <i>et al.</i> , 1999 ; Boechat <i>et al.</i> , 2002
Sc 46	DW520903	Proteína O-fucosiltransferasa (<i>Sus scrofa</i>)	34/59	Adición de fucosa a Ser o Thr en glicoproteínas	Martínez-Dunker <i>et al.</i> , 2003
Sc 50	DW520904	Músculo específica <i>Murf 1</i> (<i>Homo sapiens</i>)	94/100	Asociada en citoesqueleto	Centner <i>et al.</i> , 2001
Sc 92	DW520894	Nebulina (<i>Homo sapiens</i>)	100/ 100	Determina la longitud de filamento de células de músculo estriado	Labeit <i>et al.</i> , 1995
Similares a otros microorganismos					
Sc 10	DW520895	<i>Mut E</i> Proteína de lisis (<i>Coliphage phiX174</i>)	100/ 100	Potencial lítico	Henrich <i>et al.</i> , 1995

Sc 11A	DW520898	Transposasa IS10 (<i>Shigella flexneri</i>)	76/76	Promueve la transposición de IS10 y Tn10	Chalmers <i>et al.</i> , 2000
Sc 13 C	En proceso	Proteína hipotética RcanM_01000334 (<i>Rickettsia rickettsii</i>)	46/59	Proteína hipotética	Madan <i>et al.</i> , 2006
Sc 115	DW520900	Proteína hipotética (<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7).	46/68	Proteína hipotética	Seeger <i>et al.</i> , 2004
Sin similitud					
Sc 16 D	En proceso	No se encontró similitud significativa			
Sc 31	En proceso	No se encontró similitud significativa			

*I/P = Aminoácidos Idénticos/aminoácidos Positivos

3.3 Análisis de la expresión de genes reprimidos de *Sclerotium cepivorum* a diferentes tiempos de interacción con el ajo.








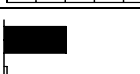

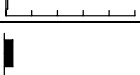
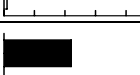

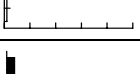


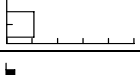
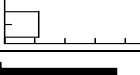
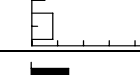

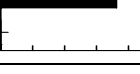
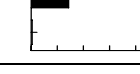
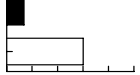
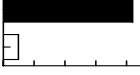






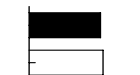



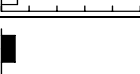
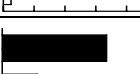




Para analizar la expresión diferencial en un rango de tiempo más amplio de la interacción de *S. cepivorum* con el ajo, se analizaron los 13 unigenes a 72 h (tiempo en donde se realizó la SSH) y en dos tiempos adicionales, 24 y 96 h, mediante experimentos tipo Southern a macroarreglos. Las intensidades de las señales fueron cuantificadas y los valores encontrados fueron estandarizados con el gen *Gdph Sc* que codifica para la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Tabla 3).

A las 72 h, los resultados revelaron que 11 transcritos (Sc 10, 11A, 18, 71, 72, 88, 92, 115, 13C, 16D, 31) fueron fuertemente reprimidos (por lo menos 2 veces) cuando el hongo esta en la interacción con el ajo, y 2 clones (Sc 46 y 50) se reprimieron en menor grado (Tabla 3).

Al realizar el experimento monitoreando los días de interacción, los resultados mostraron que los genes que cambiaron la tendencia de expresión a las primeras 24 h respecto a la que mostraron a las 72 h fueron: Sc 10, 11A, 71, 72, 88, 92,

13C, 16D, 31. Los genes que no modificaron esta tendencia de expresión entre las 24 y 72 h fueron: Sc 18, 46 y 115, en tanto, a las 96 h, tiempo en el cual, el hongo ya se encuentra unido a la raíz del ajo, los genes Sc 10, 11A, 18, 46, 50, 92, 13C y 16D, disminuyeron su expresión de la condición problema hasta aproximadamente igualar dicha expresión entre ambas condiciones (Tabla 3).

Tabla 3. Gráficas de los datos obtenidos de expresión de los genes aislados en la SSH analizados por macroarreglos utilizando como sonda cDNA de micelio de *Sclerotium cepivorum* en presencia y ausencia de ajo a diferentes tiempos. El tercer día corresponde al tiempo en el que se realizó la genoteca substractiva, y a los días 1 y 4, este último corresponde al tiempo donde el micelio ya invadió la raíz del ajo.

Fragmentos de Genes	Día 1	Día 3	Día 4
Sc 10			
Sc 11A			
Sc 18			
Sc 46			
Sc 50			
Sc 71			
Sc 72			
Sc 88			
Sc 92			
Sc 115			
Sc 13C			
Sc 16D			
Sc 31			

 Condición Problema sin ajo
  Condición Control con ajo

3.4 Análisis de los genes reprimidos de *Sclerotium cepivorum* aislados en la SSH reversa en interacción con Disulfuros de Dialilo (DADs).

3.4.1 Experimentos de morfología

Como se mencionó anteriormente, cuando *S. cepivorum* crece sin la presencia de ajo, las hifas son muy ramificadas y parecen más alargadas en comparación de cuando se encuentra con ajo. Para descartar, si el efecto observado sobre esta característica se debía a la presencia o ausencia del ajo exclusivamente o era efecto del medio de cultivo, se planteó un experimento donde se puso a crecer el hongo en dos medios diferentes (Czapek: medio mínimo y PDA: medio rico) en presencia y ausencia de ajo. El patrón de crecimiento del micelio en ambas condiciones fué igual para los diferentes medios (datos no mostrados).

De acuerdo a lo que reportaron Delgadillo *et al.*, (2000), que son los disulfuros de dialilo (DADs) (metabolitos a partir del genero *Allium*) los que estimulan la patogénesis de *S. cepivorum*, se planteó emplear los DADs para confirmar el patrón de crecimiento observado, tanto en medio Czapek como PDA.

En la Figura 2 se observa el experimento donde se colocaron los esclerocios en gotas de agar y se expusieron a DADS al 2% y agua (experimento de morfología a1, ver materiales y métodos), el patrón de crecimiento fue similar al observado en nuestro modelo experimental como esperábamos con ambos medios de cultivo. En las cajas donde se aplicó el tratamiento con DADs se observó que el hongo se desarrolla y forma esclerocios solo dentro de la gota de agar. En las cajas de condición solo agua, se observó que el crecimiento de las hifas es mucho mayor y la formación de los esclerocios se da fuera del medio sobre la misma caja de Petri. Además, al microscopio se observa que las hifas son más delgadas y alargadas comparadas con aquellas que estuvieron expuestas a los DADs (Fig. 2).

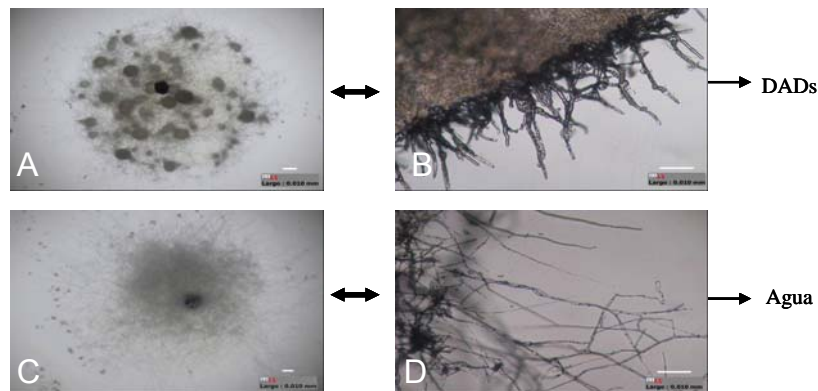


Fig. 2. Micelio de *Sclerotium cepivorum*. A) Micelio de *S. cepivorum* desarrollado a partir de un esclerocio en gota de PDA en interacción con disulfuros de dialilo al 2% después de 15 días de interacción. B) Foto de acercamiento 10X en la periferia de la gota de agar descrito en A. C) Micelio de *S. cepivorum* desarrollado a partir de un esclerocio en gotas de PDA interacción con agua después de 15 días. D) Foto de acercamiento 10X en la periferia de la gota de gota de agar descrito en C.

Un patrón de crecimiento igual se observó al realizar el experimento donde el micelio fue crecido en medio Czapek y se expuso al estímulo de DADs al 0.075% y agua solamente (experimento de morfología a2, ver materiales y métodos). Donde las cajas que se pusieron en contacto con los DADs, presentaron el mismo patrón de desarrollo que cuando está en interacción con el ajo. Así, conforme se fue disminuyendo el porcentaje de DADs aplicados al tratamiento (de 2 hasta 0.05%), se observó que las hifas se desarrollaron muy similares a cuando el hongo crece solo (Fig. 3).

Con estos experimentos se confirmó que:

1. *S. cepivorum* no cambia su patrón de crecimiento (alargado y ramificado cuando crece solo, uniforme y transparente cuando está en presencia de ajo) independientemente del medio de cultivo que se emplee.
2. El micelio crece de manera similar cuando está en presencia de ajo o de DADs.
3. El micelio crece de manera similar cuando está en presencia de ajo o de DADs, independientemente del medio de cultivo en que se encuentre presente.

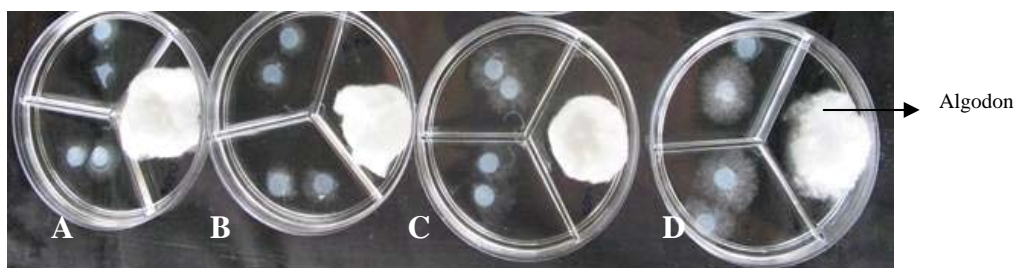
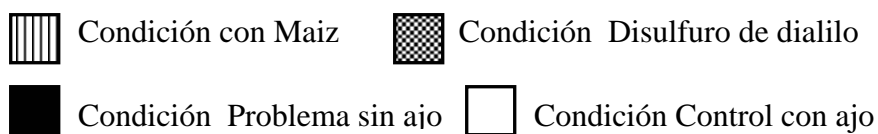
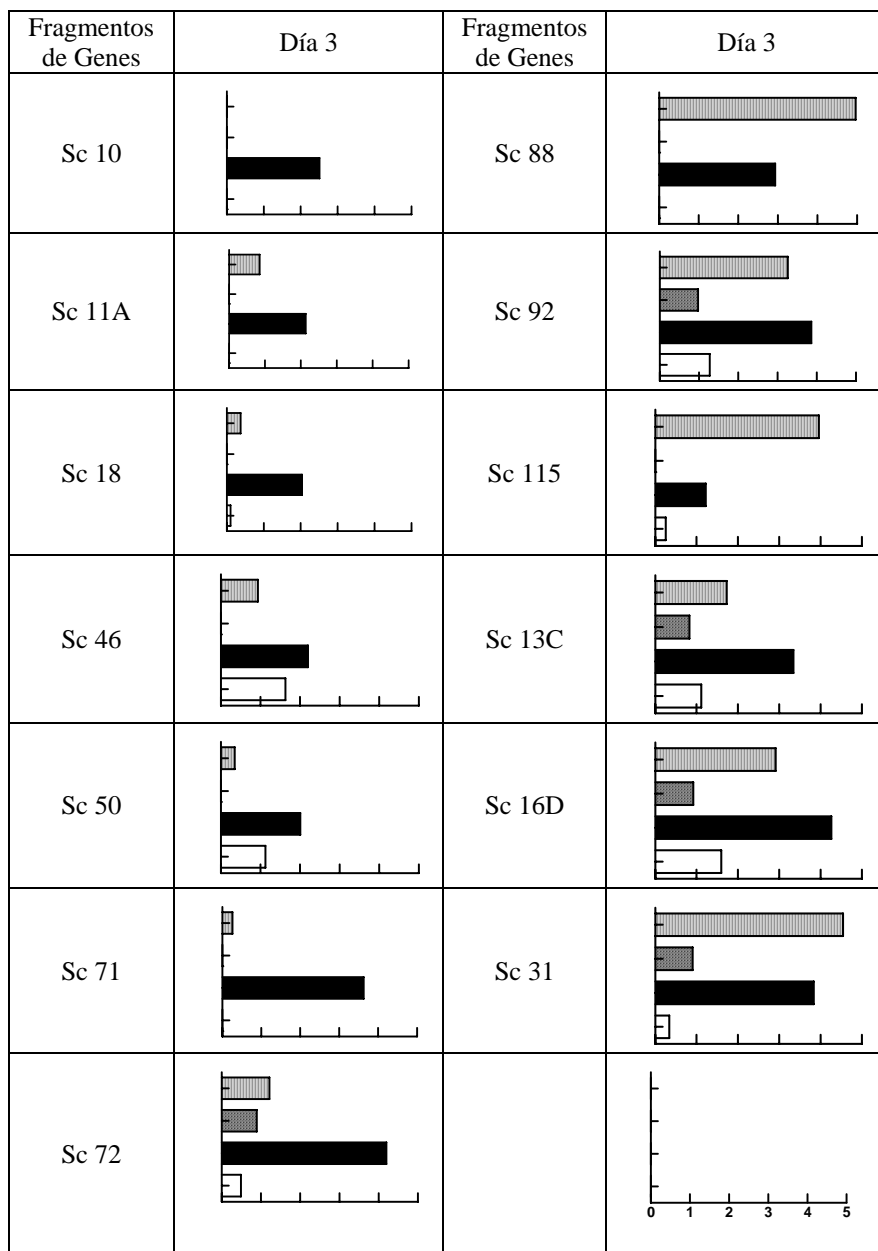


Fig. 3. Micelio de *Sclerotium cepivorum*. A) Micelio de *S. cepivorum* desarrollado 3 días en interacción con disulfuros de dialilo al 0.25 % colocados en algodón colocado del lado derecho de la cada Petri; B) Mismas condiciones que en A pero con 0.1 % de disulfuros de dialilo; C) con 0.05 % de disulfuros de dialilo; D) solamente agua.

3.4.2 Macroarreglos para la condición con DADs

Para elucidar si los genes reprimidos aislados en la SSH reversa (en interacción con ajo) se reprimen con DADs, se planteó un experimento de tipo macroarreglo. Para la obtención del cDNA que se empleó como sonda, el hongo se colocó en interacción con DADs al 0.075% por 3 días (Fig. 4). El porcentaje DADs 0.075 % fue determinado como el óptimo de acuerdo a los experimentos de morfología a2, mencionado en el apartado 3.1. Los resultados de la hibridación tipo Southern a macroarreglos mostraron que de los 13 transcritos analizados, los correspondientes a: Sc 10, 11A, 18, 46, 50, 71, 88 y 115 se observaron completamente reprimidos ante el estímulo de los DADs como se esperaba y las clonas: Sc 72, 92, 13C, 16D y 31 mostraron un comportamiento similar al observado en presencia de ajo, un promedio de 3 veces menos que con respecto al problema (Tabla 4).

Tabla 4. Gráficas de los datos obtenidos de expresión de los genes aislados en la SSH analizados por macroarreglos a los 3 días de interacción con maíz y con disulfuros de dialilo, comparados con los datos obtenidos de las condiciones con ajo y sin ajo en el mismo tiempo de interacción.



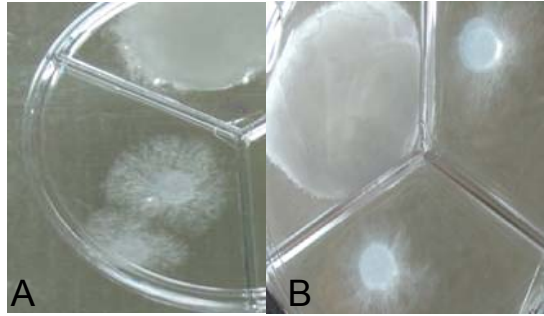


Fig. 4. Desarrollo de micelio de *Sclerotium cepivorum*. A) Experimento como se describe en la figura 3 en interacción con agua; B) Con una concentración de al 0.075% de disulfuros de dialilo.

3.5 Análisis de los genes reprimidos de *Sclerotium cepivorum* aislados en la SSH en la interacción con una planta no hospedante (maíz).

Se ha demostrado que el hongo *S. cepivorum* solo ataca plantas del genero *Allium* (Crowe *et al.*, 1980). Así, para determinar si las clonas diferenciales aisladas en la genoteca substractiva son reprimidas por otra planta no hospedante, se realizó un experimento donde el hongo se colocó en interacción con una semilla de maíz ya germinada. Como se muestra en la Figura 5, el brote y la raíz del maíz no presentan daños en presencia del hongo, y por parte del hongo se observa la formación de esclerocios, lo cual sucede en las etapas tardías de la pudrición blanca o cuando el hongo no encuentra su hospedante. En sistemas compatibles de interacción hongo-planta se ha reportado la participación de algunos metabolitos de la planta para que la patogénesis progrese (Prell *et al.* 2001), sin embargo se podría proponer que el maíz no produce los metabolitos (como los DADs) originando un sistema incompatible.

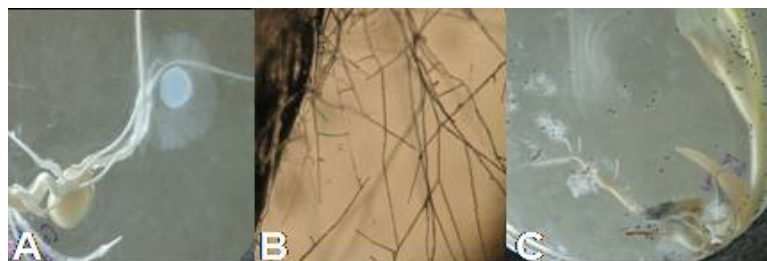


Fig. 5. Interacción *Sclerotium cepivorum* con maíz. A) Semilla de maíz germinada en interacción 3 días con el hongo. B) Acercamiento 10X de la fotografía A. C) Interacción hongo y maíz a los 20 días.

3.5.1 Macroarreglos para la condición con maíz.

En el análisis tipo Southern a macroarreglos los resultados mostraron que de los 13 genes que se aislaron en la SSH reversa, todos excepto Sc 10, presentaron la misma variación de expresión que la condición problema, es decir cuando el hongo creció sin ajo (Tabla 4). Las clonas Sc 88, 92, 115, 13C, 16D y 31 al cambiar el sistema (en lugar de ajo, maíz) se indujeron al menos dos veces más comparadas con la expresión en la condición con ajo. Las que permanecieron inducidas pero en menor proporción fueron: Sc 11A, 18, 46, 50, 71, y 72. (Tabla 4).

3.6 RT-PCR de 7 genes aislados en la SSH.

Para corroborar la expresión diferencial de las clonas aisladas analizadas en los macroarreglos, se seleccionaron al azar, 7 de las 13 clonas obtenidas en la SSH (Sc 10, Sc 18, Sc 71, Sc 72, Sc 88 y Sc 92) y se realizaron experimentos de RT-PCR en todas las condiciones (Fig. 6). Al igual que como se observó en los macroarreglos, el mayor contraste respecto a la condición problema con el control se tuvo a las 72 h, tiempo en que se realizó la SSH. A los tiempos de 24 y 96 h, el nivel de expresión diferencial se observó en menor proporción comparado con las 72 h, la condición problema se indujo un promedio de media vez más respecto a la condición control, excepto para Sc 50 y 92 en las que no se observó un cambio significativo en el nivel de expresión en los diferentes tiempos. Tomando en cuenta que fué a las 72 h post-inoculación el tiempo en el que se realizó el proceso de SSH, se confirmó a nivel transcripcional que las secuencias fueron reprimidas, debido a que en este tiempo la señal de amplificación de la RT-PCR se observó un promedio de una vez menos intensa en la condición en que el hongo se encuentra en presencia de ajo comparada con la condición en que se encuentra solo. Para las condiciones de maíz y disulfuros al tiempo de 72 h, el nivel de expresión fue muy similar al obtenido en los macroarreglos (Fig.6). Los genes Sc 18, 71 y 88 se indujeron aproximadamente una vez más cuando estuvieron en interacción con maíz respecto a la condición con DADs.

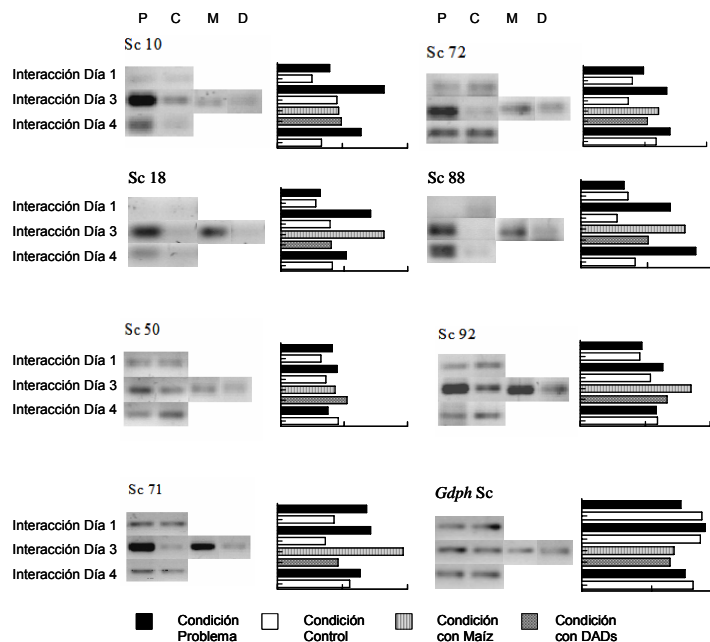


Fig. 6. Análisis RT-PCR de algunos de los transcritos diferenciales aislados en la SSH reversa. P, C, M, D corresponden a la Condición Problema sin ajo, Control con ajo, Maíz y Disulfuros de Dialilo (DADs,) respectivamente. Los valores de las gráficas fueron calculados basados en la intensidad de las bandas mediante el software Quantity One y normalizados con el gen Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa de *Sclerotium cepivorum* (*Gdph Sc*).

3.7 Estudio de la interacción del maíz con *Sclerotium cepivorum* asociado con el cambio morfológico del hongo debido al estímulo por DADs o ajo.

Se realizaron una serie de experimentos para estudiar si la morfología del hongo asociada al estímulo por ajo o DADs era capaz de infectar al maíz (ver materiales y métodos). Los resultados mostraron:

En el experimento **MS3**, donde se colocó el hongo 3 días en interacción con ajo (incubado a su vez 3 días en agua) y luego se pasó a maíz que se había incubado previamente 3 días en agua, no se observó cambio en la morfología de las hifas del hongo a simple vista. A pesar de que al inicio de la interacción, las hifas tenían una dirección de crecimiento determinada en relación a la posición en la que se encontraba la raíz del ajo, al colocarlas en contacto con la semilla de maíz germinada su crecimiento fue radial mostrando un patrón similar al de MS (maíz incubado 3 días en agua inoculado con un disco de micelio) (Fig. 7A). A los 20

días de interacción no se observó daño en el maíz y por su parte el hongo empezó a formar esclerocios (Fig. 7B y C).

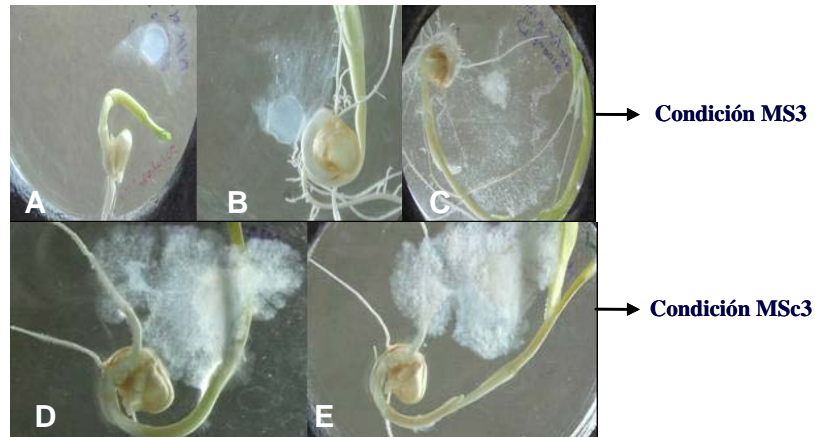


Fig. 7. Micelio de *Sclerotium cepivorum* al tercer día de interacción con maíz. A) Micelio proveniente de interacción 3 días con ajo transferido a semilla de maíz germinado (Condición MS3); B) Misma placa a los 5 días de interacción; C) A los 12 días de interacción; D) Micelio desarrollado en interacción 3 días con maíz germinado el cual se le agregaron disulfuros de dialilo al 0.075% a la raíz (Condición MSc3); E) Misma placa descrita en D a los 15 días de interacción.

En el experimento **MSc3**, donde se colocó un disco de micelio en interacción con una semilla de maíz germinada con 2 ml de DADs al 0.075% en la raíz, se observó que el crecimiento de las hifas a las 72 h fué aproximadamente 3 veces mayor que en MS (interacción maíz-hongo) al mismo tiempo. Sin embargo al cabo de 15 días no se observó daño en el maíz y el hongo pareció establecerse para formar esclerocios (Fig. 7D y E).

Para observar si el hongo puede revertir la morfología de las hifas ramificadas y delgadas cuando se coloca en interacción con ajo para invadirlo, se realizó un experimento donde se colocó micelio crecido 3 días en agua a interaccionar con ajo incubado por 3 días en agua, **AS3** (ver materiales y métodos). A las 72 h, se observó un cambio notorio en el patrón de crecimiento de las hifas en los extremos de ellas. El crecimiento de las hifas en la periferia ya no se observó ramificado, sino formando el crecimiento característico (observado por nuestro grupo) cuando el hongo se encuentra en contacto con el ajo. Este contraste morfológico puede observarse en la Figura 8. A los 12 días de interacción se puede observar como el hongo ya invadió la raíz y el bulbo de ajo.



Fig. 8. Micelio de *Sclerotium cepivorum*. A) Micelio proveniente de 3 días de incubación con agua transferido a ajo germinado; B) Misma placa a los 3 días de interacción; C) A los 12 días de interacción.

4 Discusión:

El presente estudio describe la aplicación de la Hibridación Substractiva bajo supresión para obtener información relacionada con los cambios en la expresión genética de *Sclerotium cepivorum* durante su interacción con ajo, particularmente aquellos genes reprimidos en este proceso.

De los transcritos encontrados por SSH reversa (Tabla 2), aquellos que codifican para las proteínas glioxal oxidasa (*Glo 1*), *Cbk1p*, nebulina y *murf 1*, se ha reportado que están relacionados con el crecimiento apical de la hifa (Leuthner B., *et al.* 2005, Weiss, *et al.* 2002, Labeit *et al.* 1995, Centner *et al.* 2001). La nebulina es una proteína grande de filamento reportada solamente para músculo esquelético de vertebrados. La correlación de su tamaño con la longitud del filamento sugiere que la nebulina puede funcionar para determinar la longitud de los filamentos delgados de las células del músculo esquelético (Labeit *et al.* 1995). La expresión de los genes en la interacción a diferentes días, revelo que los genes que codifican para *Glo 1* y *Cbk1p* después del tercer día se encuentran reprimidos casi en su totalidad cuando el hongo se encuentra en presencia de ajo y de DADs, por lo tanto estos genes podrían ser muy importantes para dar la característica de un mayor alargamiento de hifas cuando el hongo esta en ausencia del ajo. Leuthner *et al.*, (2005) reportaron que *Glo 1* puede funcionar en vías de señalización que regulan el crecimiento filamentoso de *Ustilago maydis* por la generación de peróxido de hidrógeno como un segundo mensajero o como una fuente de radicales superóxido más activos. Se ha postulado un requerimiento de un estado hiperoxidante transitorio para dirigir la diferenciación en muchos

organismos. Toledo *et al.*, (1995) y Navarro *et al.*, (1996) reportan que en la mayoría de los procesos morfogénicos existe un estado hiperoxidativo durante la conidiación de *Neurospora crassa*. Para plantas se ha demostrado que NADPH oxidasas controlan la expansión celular y crecimiento polarizado de células de raíz por la generación de especies reactivas de oxígeno que regulan la actividad de canales de calcio (Foreman *et al.*, 2003). Recientemente, Lara-Ortiz *et al.* (2003) demostraron generación de la NADPH oxidasa en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*.

En relación con nuestro estudio, sugerimos que *Glo1* debido a que es una oxidasa, podría relacionarse con el alargamiento de las hifas de *S. cepivorum* en la búsqueda de nutrientes.

La chaperona MOD E podría estar relacionada con la formación de esclerocios o estructuras de resistencia (Labradou *et al.* 1997). Esta proteína MOD E es codificada por un gen miembro de la familia Hsp90, proteínas involucradas en muchos procesos celulares. En este estudio se menciona que MOD E está relacionada en la formación de ascosporas, ya que se propone se encuentra en etapas tardías del ciclo celular. MOD E puede estar asociada con una cinasa de proteínas que controla negativamente el ciclo celular y sexual en el caso de *Podospora anserina*. En nuestro estudio de la expresión por tiempo, se observó que este gen se expresa de manera diferencial mucho más contrastante al tercer día de interacción.

La clona Sc 46 que es homóloga a la proteína o-fucosiltransferasa, se ha reportado en la ruta de señalización NOTCH, en estos reportes se menciona como una enzima clave para dicha vía, se ha visto involucrada en el ciclo celular y la apoptosis (Martínez-Dunker *et al.* 2003). Esta clona muestra variación de expresión en presencia y ausencia de ajo, su mayor represión se observa cuando están presentes los disulfuros de dialilo. (Fig. 6)

En la expresión diferencial de genes reprimidos de *S. cepivorum* encontramos genes que codifican proteínas como la proteína de lisis del fago *Coliphage phiX174* (Tabla 2), en relación a esto New *et al.*, (1984) reportaron que en este tipo de hifas de *S. cepivorum* donde la germinación no es inducida por el

hospedante generalmente terminan en la formación de esclerocios, pero algunas de las hifas se colapsan y se lisan a los pocos días. Sugerimos que esta proteína podría estar involucrada en este último proceso, provocando la lisis de algunas de las hifas para que con esos nutrientes pueda generar nuevamente los esclerocios. Agrupando aquellos genes que están relacionados con crecimiento apical de las hifas, los resultados muestran que estos genes presentan un comportamiento similar cuando se analizó el nivel de expresión por días y por tratamientos en interacción con diferentes sistemas incluyendo los DADs. Esto confirma que esos genes se encuentran encendidos cuando el hongo no se encuentra en contacto con el estímulo del ajo independientemente de si está solo o en presencia de otra planta. De aquí podríamos elucidar que ellos son una batería de genes encargados de acelerar ese alargamiento de las hifas para generar esta morfología específica cuando el hongo está en ausencia de ajo, presentando la mayoría de ellos el mismo efecto de represión cuando son expuestos a los disulfuros de dialilo.

Existen muy pocos reportes de morfología relacionados a formación de esclerocios en *S. cepivorum* in vitro y de desarrollo de estructuras de infección en cebolla (Littley *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1989). En nuestro trabajo observamos un cambio visible en el patrón de crecimiento de las hifas de *S. cepivorum* cuando está en presencia o ausencia de ajo dato que no ha sido reportado. Planteamos diferentes tipos de interacciones con ajo, maíz, disulfuros de dialilo y 2 medios de cultivo diferentes para corroborar el cambio mencionado, en todas ellas se observa la misma tendencia de crecimiento, confirmando que el patrón de crecimiento que presenta *S. cepivorum* es debido a la presencia de su hospedante. A su vez un grupo de los genes reprimidos que aislamos por SSH podrían estar relacionados directamente con este cambio morfológico.

La identificación de los genes tanto los que se inducen como los que se reprimen es esencial para entender el proceso de patogénesis de *S. cepivorum*. Los genes identificados en este trabajo muy probablemente serán importantes ya que son aquellos que se reprimen al inicio del proceso de patogénesis, por lo que se podría pensar que si estos genes permanecieran activos no ocurriría como tal el proceso

infectivo. Lo anterior deberá ser corroborado con experimentos posteriores de transformación del hongo.

5 REFERENCIAS

Agrios, G., N. 2002. Fitopatología. UTEHA. Mexico.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3):403-10.

Ambion, Inc. 2005. Online Northern Analysis/BrightStar[®]-Plus Positively Charged Nylon Membrane [online]. Ambion, Inc. Available from <http://www.ambion.com/catalog/ProdGrp.html?fkApp=5&fkProdGrp=62> [updated 2005; cited 30 June 2005].

Amersham Biosciences, 2002. Online Instruction/Protocol/ECF random prime labelling and signal amplification system [online]. General Electric Company. Available from http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/latin_america_homepage00919.nsf/content/D1CBA5A22E1B808BC1256EB400418042?OpenDocument&hometitle=search [updated 1997-2005; cited 30 June 2005].

Amersham Biosciences, 2005. Online Products/Blotting, Labeling & Detection/Nucleic Acid/Blotting/Blotting Equipment/PR 648 Slot Blot Manifold [online]. General Electric Company. Available from <http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/Products?OpenDocument&parentid=577896&moduleid=46964> [updated 1997-2005; cited 30 June 2005].

Boechat N, Lagier-Roger B, Petit S, Bordat Y, Rauzier J, Hance AJ, Gicquel B, Reyat JM. 2002. Disruption of the gene homologous to mammalian Nramp1 in Mycobacterium tuberculosis does not affect virulence in mice. *Infect Immun.* 70(8):4124-31.

Braun B.R., Head W.S., Wang M.X., Johnson A.D. 2000. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics.* 156(1):31-44.

Carlyon, J.A., Roberts, D.M., and Marconi, R.T. 2000. Evolutionary and molecular analyses of the *Borrelia bdr* super gene family: delineation of distinct sub-families and demonstration of the genus wide conservation of putative functional domains, structural properties and repeat motifs. *Microb Pathog.* 28 (2): 89-105.

Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang ML, Trombitas K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H and Labeit S. 2001. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol.* 306(4):717-26.

Chalmers, R., Sewitz, S., Lipkow, K., and Crellin P. 2000. Complete nucleotide sequence of Tn10. *J Bacteriol.* 182 (10): 2970-2.

Clontech, 2001. Online PCR and Cloning Technologies/BD SMART[™] cDNA Technology/SMART[™] PCR cDNA Synthesis kit [online]. BD Biosciences Clontech Discovery Labware Immunocytometry Systems Pharmingen. Available from

<http://www.clontech.com/clontech/smart/index.shtml> [updated 2004; cited 30 June Nov 2005].

Clontech, 2002. Online PCR and Cloning Technologies/BD Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction/PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit [online]. BD Biosciences Clontech Discovery Labware Immunocytometry Systems Pharmingen. Available from <http://www.clontech.com/clontech/pcr-select/index.shtml> [updated 2004; cited 30 June Nov 2005].

Coley-Smith, J.R., Mitchell, C.M., and Sansford, C.E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. Plant. Path. 39: 58-69.

Corning, 2005. Online corning home/life sciences/latin America/product catalog/Cryogenic Vials, Plastic/Corning® 2mL External Threaded Polypropylene Cryogenic Vial, Self-Standing with Round Bottom (Item #430659) [online]. Corning Incorporated. Available from [http://www.corning.com/catalog.corning.com/Lifesciences/productdetails.aspx?p=Containers@@@2402&id=430659\(Containers\)®ion=LA&language=EN](http://www.corning.com/catalog.corning.com/Lifesciences/productdetails.aspx?p=Containers@@@2402&id=430659(Containers)®ion=LA&language=EN) [updated 2005; cited 30 June 2005].

Crowe, F.J. and Hall, D.H. 1980. Soil temperature and moisture effects on sclerotium germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. Phytopathology 70:74-8.

Dai, Z., Xingxue M., Magnuson J. K., and Lasure, L.L. 2004. Identification of genes associated with morphology in *Aspergillus niger* by using suppression subtractive hybridization. Applied and Environmental Microbiology. 70 (4): 2474-2485.

Delgadillo, S.F. 1998. Efecto de la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. en la eficacia de tebuconazole para controlar la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* L.). Tesis Doctoral, Colegio de postgraduados, Montecillo, Méx.

Delgadillo, S.F., Arévalo, A., and Torres, P.I. 2000. Manejo de la pudrición blanca en Guanajuato. En desplegable para productores No. 3. Octubre 2000, Guanajuato, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. p.13.

Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. 93(12):6025-6030.

DIFCO Czapeck-Dox Broth and Czapek Solution Agar. Base for the Cultivation of Fungi and Bacteria Capable of the Utilization of Inorganic Nitrogen. Cat. 23910 and 233810.

Dorschner, M.O. and Phillips, R.B. 1999. Comparative analysis of two Nramp loci from rainbow trout. DNA Cell Biol. 18 (7): 573-83.

Down, C., Wilson, L. W., and Mc Fadden, H. 2004. Gene Expression Profile Changes in Cotton Root and Hypocotyl Tissues in Response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*. *MPMI*. 17 (6): 664-67.

Ellis, P.R., Entwistle, A.R. y Walkey, D.G.A (1993) *Pest and Diseases of Alpine Plants*, AGS. Alpine Gardens Society.

Entwistle, A. R., 1981. Diallyl-Disulphide to reduce the numbers of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 14:229-32.

Entwistle, A. R. 1998a. Opportunities for the integrated control of Allium. En: A. R. Entwistle, Y L. Perez M. *Proceedings of the Sixth International Workshop on Allium White Rot*. Irapuato Guanajuato, Mexico.

Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstaed, P., Costa S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M., Dolan, L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:422-46.

Harrier, L.A. & Watson, C.A. 2003. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Advances in Agronomy*, In Press.

Henrich. B. and Schmidtberger, B. 1995. Positive-selection vector with enhanced lytic potential based on a variant of phi X174 phage gene E. *Gene*. 154 (1): 51-4.

Invitrogen, 2005. Online product information/life science products and services/ TOPO[®] Cloning Technology/ pCR2.1-TOPO cloning vector [online]. Invitrogen. Available from <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=4073&CID=ILCFRIENDLYURL&AT=TOPO> updated 2005; cited 30 June 2005].

Labeit, S. and Kolmerer, B. 1995. The complete primary structure of human nebulin and its correlation to muscle structure. *J Mol Biol.* 248 (2): 308-15.

Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., Aguirre J. 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase Nox A regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 50:1241-1255.

Littley, E.R. and Rahe, J. E. 1992. Sclerotial morphogenesis in *Sclerotium cepivorum* in vitro. *Can J. Bot.* 70: 772-8.

Loubradou, G., Begueret, J., and Turcq, B. 1997. A mutation in an HSP90 gene affects the sexual cycle and suppresses vegetative incompatibility in the fungus *Podospira anserina*. *Genetics*. 147 (2):581-8.

Leuthner, B., Aichinger, C., Oehmen, E., Koopmann, E., Muller, O., Muller, P., Kahmann, R., Bolker, M., and Schreier, P.H. 2005. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*. 272 (6): 639-50.

Madan,A., Fahey,J., Helton,E., Kettelman,M., Madan,A., Rodrigues,S., Sanchez,A., Whiting,M., Dasch,G. and Ereemeva,M. 2006. Complete Genomic Sequence of *Rickettsia Canadensis*. NCBI Accession number: ZP_01347426.

Martinez-Dunker,I., Mollicone,R., Candelier,J.J., Breton,C. and Oriol,R. 2003. *Glycobiology* 13:1c-5c

Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W., Timberlake, W.E., Aguirre J. 1996 *cat A*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* 29:352-9.

NCBI, 2005. Online Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)/Translated query vs. protein database (blastx) [online]. National Center for Biotechnology Information. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST/ [updated 15 June 2005; cited 30 June 2005].

New, C.M. and Coley-Smith, J. R. 1984. Scanning electron microscopy of sclerotial germination in *Sclerotium cepivorum*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 83(4): 690-3.

Perez, M.L., Olalde P.V., Salinas, J.G., Sanchez, J.R., and Entwistle A.R. 1998a. Current know distribution of white rot *Sclerotium cepivorum* Berk in Mexico. En: A.R. Entwistle, and L. Perez M. Proceedings of the Sixth International Workshop on Allium White Rot, Irapuato Guanajuato, Mexico.

Perkin Elmer, 2004. Store Catalog/ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer [online]. Applied Biosystems. Available from <http://www.appliedbiosystems.com/index.cfm/catalog/myab/StoreCatalog/products/CategoryDetails.jsp?hierarchyID=101&category3rd=111903&trail=no> [update 2004; cited 30 June 2005].

Prell, H. H. and Day, P.R. Basic Compatibility: The Colonization of Host Plants by Pathogenic Fungi. P.p. 52-6. En: *Plant-Fungal pathogen Interaction A Classical and Molecular View*. Springer-Verlag Press, Berlin Heidelberg Germany.

Qiagen, 1999. QIAEX II Handbook. Qiagen, Germany. Protocol

Qiagen. 2001. RNeasy® Mini Handbook. Qiagen, Germany. Protocol

Ramírez-Medina, H. 2004 Identificación y Clonación de Genes Involucrados en la Patogénesis de *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum* L.) empleando Hibridaciones Substractivas y Microarreglos de ADNc. Tesis de Maestría.

Robson, G. 1999. Hyphal cell biology. Pp. 164-184 En: *Molecular fungal biology*. Eds., R.P. Oliver and M. Schweizer. Cambridge University Press, England.

Seeger, K., Murphy, L., Harris, D., Berriman, M., Pain, A., Hall, N., Quail, M. and Barrell, B. P.falci-parum Genome Sequencing Consortium, The Wellcome Trust Sanger Institute,

Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK. Unpublished. Submitted (20-SEP-2002).

Scholz, G. M., Hartson, S.D., Cartledge K., Volk, L., Matts, R.L., and Dunn, A.R. 2001 The Molecular Chaperone Hsp90 Is Required for Signal Transduction by Wild-Type Hck and Maintenance of Its Constitutively Active Counterpart1. *Cell Growth & Differentiation*. 12:409-417.

Stewart, A., Backhouse, D., Sutherland, P.W. and Fullerton, R. A. 1989. The Development of Infection Structures of *Sclerotium cepivorum* on Onion. *J. Phytopathology* 126, 22-32.

Taylor, J. & Harrier, L.A. (2003) Expression studies of plant genes differentially expressed in leaf and root tissue of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal colonised tomato plants. *Molecular Plant Biology*, In Press.

Toledo I., Rangel, P., Jansberg W., 1995. Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Arch Biochem Biophys* 319:519-24.

Van den Bergh, K.P., Van Damme, E.J., Peumans, W.J., and Coosemans, J. 2002. Ee-CBP, a hevein-type antimicrobial peptide from bark of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet.* 67 (2):327-31.

Weiss, E.L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D.G., and Luca, F.C. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J Cell Biol.* 158 (5):885-900.