

# ANÁLISIS GENÉTICO FUNCIONAL DE LA FORMACIÓN DE CONIDIAS DE *SCLEROTIUM CEPIVORUM BERK*: AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANCA DEL AJO

Christian Lona Arrona (1), Patricia Ponce Noyola (2).

<sup>1</sup>[Licenciatura en Biología Experimental] | Dirección de correo electrónico: Chris.arrlo@hotmail.com

<sup>2</sup>[Departamento de Biología, División de ciencias naturales y exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] [Dirección de correo electrónico: pponce@ugto.com]

## Resumen

La enfermedad pudrición blanca, causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk (ScB), ocurre a nivel mundial en todos los lugares donde se siembran plantas del género *Allium* (cebolla, ajo, puerro, entre otros) y representa uno de los factores limitantes para su producción, ya que puede causar la pérdida total de los cultivos. (Sc B) es difícil de controlar, principalmente, por su capacidad de formar estructuras de resistencia y propagación denominadas esclerocios, los cuales pueden permanecer viables en suelo y en ausencia del hospedero hasta por 20 años. Se obtuvo una cepa mutante de (ScB-M) incapaz de formar esclerocios y que en su lugar forma conidias en gran cantidad, en la literatura se ha reportado que son estériles. Con la intención de determinar su capacidad de germinar, se decidió infectar en distintas etapas de crecimiento de semillas de ajo con conidias con núcleo de la cepa mutante de (ScB-M), para comprobar si son capaces de germinar y atacar a la planta del ajo.

## Abstract

White rot disease is a worldwide distribution disease caused by *Sclerotium cepivorum* Berk (ScB). This disease is present where plants of the genus *Allium* are cultivated and it represents one of the most important limiting factors for its production and commercialization as it can cause complete crop loss. ScB is able to produce structures of propagation and resistance called sclerotia, which can remain viable in soil up to 20 years in the absence of a host. Due to this structures, this fungus is difficult to eradicate. In our work group, a not-forming-sclerotia mutant (M) of ScB was obtained (ScB-M). It was shown that this mutant is able to produce a large amount of conidia. In previous studies it has been reported that ScB conidia are sterile and its function remains unknown. In order to determine the conidia ability to germinate and infect plants, we have decided to infect garlic seeds at different growth stages with isolated conidia from ScB-M.

## Palabras Clave

(Conidias; Esclerocio; *Sclerotium cepivorum* Berk; germinación; Ajo)

## INTRODUCCIÓN

La familia Sclerotiniaceae tiene entre sus miembros a importantes patógenos de plantas del género *Allium*. La enfermedad de la pudrición blanca, causada por *Sclerotium cepivorum* Berk, ocurre a nivel mundial en todos los lugares donde se siembran plantas del género *Allium* (cebolla, ajo, puerro, entre otros) y representa uno de los factores limitantes para su producción y comercialización ya que puede causar pérdidas de hasta el 100% de los cultivos [1] Los síntomas de la pudrición blanca incluyen clorosis de las hojas de la planta, marchitamiento y muerte de todo el follaje. Así mismo, en los bulbos se puede apreciar el micelio algodonoso y en etapas avanzadas se observarán también pequeños cuerpos negros denominados esclerocios [1] los cuales tienen la capacidad de permanecer viables hasta por 20 años en ausencia del hospedero, Debido a esta conformación son muy resistentes a diversos factores ambientales como luz UV, agentes oxidantes, desecación e incluso a diversos compuestos usados como antifúngicos [2] *S. cepivorum* Berk es capaz de generar tanto esclerocios como microconidias en condiciones de estrés, sin embargo, debido a que las condiciones de germinación de las microconidias aún no son claras, se cree que estas son estructuras estériles [3]. Algunos autores sugieren que dichas microconidias son espermacios y que necesitan obligadamente su contraparte sexual para que ocurra la germinación, sin embargo, esta teoría no es muy aceptada debido a que ya se ha reportado la germinación de estas estructuras [4]. En este trabajo se tiene como objetivo observar la conidiación y constatar si se puede lograr la germinación de conidias de la cepa mutante de *Sclerotium cepivorum* Berk (ScB-M), en semillas de la planta *Allium sativum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizó la cepa mutante *S. cepivorum* Berk (ScB-M) (M), incapaz de formar esclerocios. La cepa se propaga por bocado en cajas de Petri con medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) e incubo a 18 °C durante 12 días o hasta que formaron microconidias.

### Desinfección de *Allium sativum* y crecimiento

Las semillas de ajo se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.025% durante 5 min en condiciones de esterilidad, se lavaron posteriormente con suficiente agua estéril. Las semillas se colocaron en viales con agua estéril para la germinación y el crecimiento de la raíz.

### Recolección y separación de conidias

Las conidias se recolectaron después de 12 días de incubación, con agua estéril y raspando la placa. La suspensión de conidias se centrifugó a 3,250 rpm durante 30 min, la pastilla de conidias se lavó con 1ml de agua estéril, y se volvió a centrifugar a 3,500 rpm durante 30 min, posteriormente, la pastilla se resuspendió en 250µl de agua estéril y se volvió a centrifugar por tercera vez a 3,500 rpm. Las conidias se resuspendieron en 250 µl, volumen final.

### Conteo de conidias

Se tomó una alícuota de las conidias y se realizó una dilución 1:100, se contaron las conidias en una cámara de New Bauer para calcular el número de conidias que se agregarían a los gradientes de sacarosa.

### Separación de conidias mediante gradientes de sacarosa

Se prepararon soluciones de sacarosa al 15%, 30% 45% y 60% con regulador Tris- EDTA pH 7.5. Con las soluciones anteriormente descritas, se

prepararon gradientes discontinuos de sacarosa de la siguiente manera: un volumen de 1.5 ml de sacarosa al 60%, siguiendo 3ml de sacarosa al 45%, 3ml de sacarosa al 30% y por ultimo 1.5ml de sacarosa al 15%. Se le agrego la muestra de conidias a cada tubo y estos se centrifugaron durante 50 min a 10,00 rpm, se recuperaron todas las fases de los gradientes, así como las interfaces; la de mayor importancia fue la de 30%-45% de sacarosa, en donde se acumulan las conidias con núcleo, se volvieron a contabilizar las conidias por cámara de new Bauer. La muestra de conidias con núcleo sirvió para la infección de semillas de *Allium sativum*, se pusieron cantidades similares en cada experimento que se realizó.

### Tinción con DAPI

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Tinción utilizada para visualizar el núcleo de conidias en suspensión del gradiente. Se mezclaron 36  $\mu$ L de suspensión de conidias con 1.8  $\mu$ L de solución concentrada de DAPI (14 mM), la mezcla se dejó reposar 20 min, Todo el procedimiento se llevó a cabo en la obscuridad para que no se apagara la fluorescencia del DAPI (Fig.1).

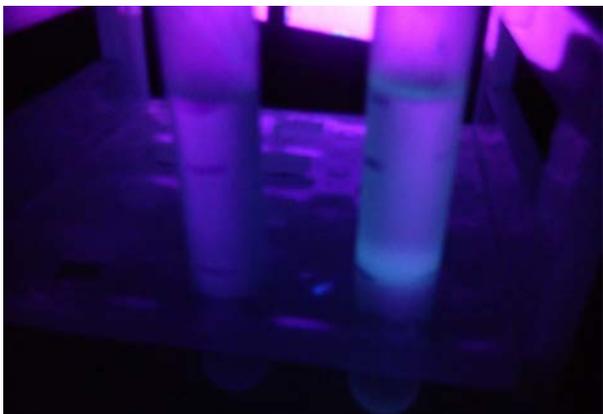


Fig. 1. Tinción de conidias con DAPI en gradiente de sacarosa.

### Infección de *Allium sativum*

Para la infección de *Allium sativum* se siguieron métodos diferentes. Se colocó una cantidad de conidias ya contabilizadas sobre fragmentos de semillas cortadas transversalmente, así como sus

raíces, las cuales se colocaron en papel filtro para evitar el desecamiento, también se colocaron ajos con raíz en crecimiento en viales con agua estéril donde se colocaron de igual manera el mismo número de conidias para su infección

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudio fisiológico del proceso de conidiación de la cepa mutante de *Sclerotium cepivorum berk*

La cepa mutante solo desarrolló estructuras encaminadas en el proceso de desarrollo de las conidias (Fig.2). Después de 12 días, ya formadas las conidias, se prosiguió a su recolección para un análisis mayor sobre su infección en plantas del genero *Allium* en este caso sobre *Allium sativum* (ajo).



Fig. 2. Crecimiento de *Sclerotium cepivorum Berk* cepa mutante sin la formación de esclerocios.

Se colectaron las conidias, se lavaron y se separaron en un gradiente de sacarosa como se describe en M&M. Mediante una tinción con DAPI (tinción de núcleos), pudimos observar la mayoría de estas conidias (Fig. 1). Debido a este hecho y a que en la literatura se les considera estructuras estériles [2], ya que a la fecha, aún no se encuentra alguna función para su presencia, se decidió evaluar si dichas conidias con nucleo eran capaces de germinar. Se encontró que la mayoría de conidias con núcleo están en la interfase 30-45% del gradiente de sacarosa.

## Análisis del proceso de germinación en *Allium sativum*

Con la evidencia experimental obtenida a la fecha no es posible concluir que cantidad de conidias son viables y capaces de germinar, por otra parte, desconocemos si las condiciones de cultivo probadas son las adecuadas para promover la germinación del mayor número posible de conidias por lo que se empleó un número razonable de conidias para la germinación. El número de conidias analizadas fue de  $1 \times 10^4$ , donde hubo distintos métodos para probar la germinación en *Allium sativum*. Al infectar con conidias a los fragmentos de la semilla del ajo no se encontró una manifestación positiva de infección al paso de los días de incubación, por lo que probablemente esta manera no se asemeja a lo que sucede *in vivo*, durante el ataque e infección de *S. cepivorum* Berk (Fig. 3A). La infección con conidias en la raíz de ajo presentó una respuesta similar ya que no hubo ninguna manifestación encaminada al proceso del desarrollo de germinación de las conidias (Fig. 3B). Estos resultados nos indican que tal vez no sea la vía indicada para infectar al ajo con conidias o estas estructuras son incapaces de germinar bajo estas condiciones.

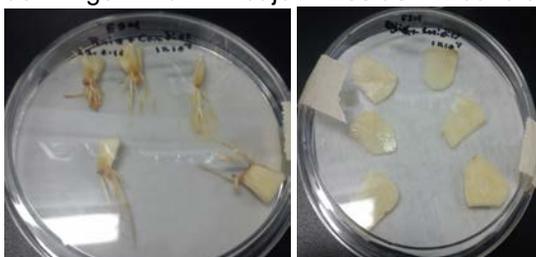


Fig. 3. A; infección de conidias sobre raíces de ajo a los 12 días B; infección de conidias sobre fragmentos de ajo a los 10 días.

Por lo que se prosiguió con la infección ahora de la raíz en solución, lo que aconteció al paso de los días fue una progresiva aparición de micelio incoloro sobre las raíces de los ajos infectados así como la clorosis de las hojas. (Fig.4), que es evidencia de que probablemente las conidias estén atacando e infectando al ajo por lo que se prosiguió a analizar al micelio de la raíz debido a

una posibilidad de infección y descartar crecimiento de otro hongo.

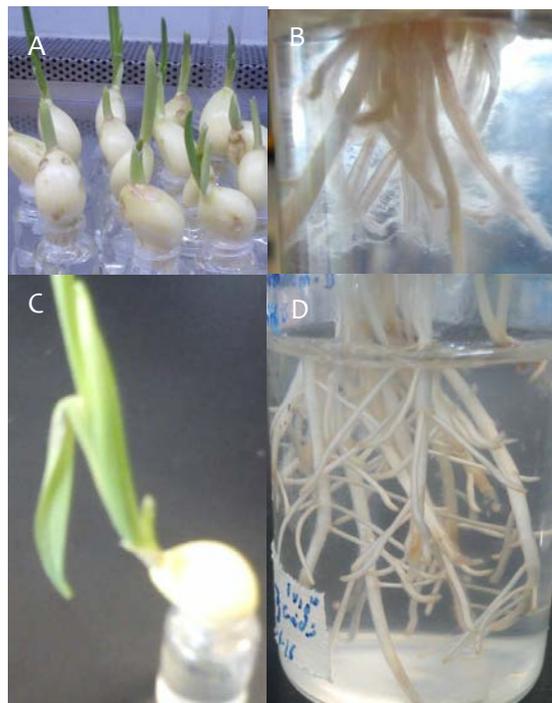


Fig.4. A; Crecimiento de 14 días de *Allium sativum*, B; Raíz infectada con conidias con aparición de micelio transparente de *Sclerotium cepivorum* berk. C; ajo infectado con síntomas de clorosis D; raíz completamente saludable sin ningún tipo de manifestación de *Sclerotium cepivorum* berk.

Para corroborar la capacidad de infección del micelio de *Sclerotium cepivorum* se procedió a infectar a fragmentos de semillas de ajo, así como también, a las raíces de la planta, con micelio de la cepa mutante y con micelio de la cepas silvestre, que se ha reportado que tiene todas la capacidad de infectar, pero no se tiene reportado si la cepa mutante de *Sclerotium cepivorum* Berk tiene esa capacidad, por lo que se realizó una comparación de infección utilizando micelio tanto de la cepa silvestre, como de la mutante, para lograr tener un punto de referencia mayor, el resultado fue que el micelio de la cepa mutante también tiene esas capacidades infectivas logrando penetrar en el ajo, así como en la raíz y consumir todos los componentes nutritivos que existen en él (Fig.5A). La aparición de un micelio algodonoso de color blanco que es como

naturalmente se encuentra e infecta *Sclerotium cepivorum* Berk al ajo en el campo, por lo que fue una de las principales señales de que la cepa mutante también tiene esas capacidades, por lo que se prosiguió a analizar y observar si esta manifestación corresponde a *Sclerotium cepivorum* berk, y no de otro hongo que pueda corresponder a las mismas características de crecimiento.

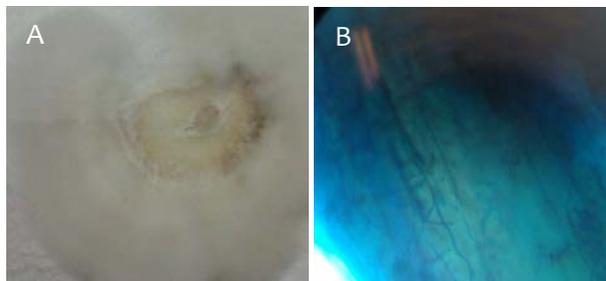


Fig. 5. A; Crecimiento de micelio algodonoso correspondiente a *Sclerotium cepivorum* Berk. B; Tinción con azul de algodón de raíz infectada que muestra micelio dentro de ella, vista bajo microscopio 40x.

Para descartar la presencia de algún otro hongo contaminante, se aisló el ADN de la cepa mutante y se le determinó su patrón de amplificación característico de *S. cepivorum*, utilizando los iniciadores específicos para éste hongo.

## CONCLUSIONES

La capacidad de infección que tiene *Sclerotium cepivorum* berk (M) es altamente eficaz a través del micelio que no pierde ninguna funcionalidad.

La infección a través de conidias existe, pero bajo ciertas condiciones que se seguirán estudiando para encontrar la manera en las cuales puedan germinar en *Allium sativum* y encontrar una manera de controlarlo en el campo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al grupo de trabajo de los Dres. Patricia Ponce y Alberto Flores, por el apoyo y conocimiento brindado, a la MC Sandra E. González Hernández y a la c. a Dra. Alicia del C. Hernández Guzmán por el apoyo técnico brindado.

A la Universidad de Guanajuato por los apoyos económicos para realización del proyecto.

## REFERENCIAS

- [1] Cooke, R. C. (1971). Physiology of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* during growth and maturation. Transactions of the British Mycological Society 56 (1), 51-59.
- [2] Sammour, R. H., Mahmoud, Y. A.-G., Mustafa, A. A. & Alhoziem, R. (2011). Biology, controlling and genetic variability in *Sclerotium cepivorum* Berk; the causal agent of *Allium* white rot disease. Current Trends in Microbiology 7, 101-111.
- [3] Rossier, C., Ton-That, T. C., Turian, G. (1977). Microcyclic microconidiation in *Neurospora crassa*. Experimental Mycology 1, 52-62.
- [4] Willetts, H. J. & Bullock, S. (1992). Developmental biology of sclerotia. Mycological Research 96 (10), 801-816.