

Actividad insecticida en *Galleria mellonella*, de la proteína recombinante SC1 del patógeno del ajo: *Sclerotium cepivorum* Berk

Insecticidal activity in *Galleria mellonella* of recombinant protein SC1 from the garlic pathogen *Sclerotium cepivorum* Berk

Montserrat P. Hernández López; Diego Alberto Almaguer Ruiz; Sandra E. González Hernández¹; Patricia Ponce Noyola¹

Departamento de Biología, DCNE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato
poncep@ugto.mx¹

Resumen

El hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* ataca plantas del género *Allium*, como el ajo y la cebolla. Su control es un gran desafío debido a su capacidad para formar **esclerocios**, estructuras de resistencia que pueden sobrevivir en el suelo por más de 20 años. Estos esclerocios germinan en presencia del hospedero, lo que afecta la producción agrícola y la economía de los agricultores.

En estudios previos del laboratorio, se identificó una proteína de 34.4 kDa, denominada SC1, que se acumula en los esclerocios maduros constituyendo hasta el 70% de su proteína total y que podría estar implicada en su formación, mantenimiento y germinación. Análisis bioinformáticos sugieren similitud con lectinas de fucosa y posible función insecticida debido a que los esclerocios permanecen intactos en el suelo sin ser degradados por insectos. El objetivo de este trabajo fue determinar si tiene actividad insecticida la proteína SC1.

En este estudio, se clonó, se expresó en bacteria y se purificó la **proteína SC1 recombinante (SC1-r)**. La evaluación de actividad tóxica de SC1-r inyectada en larvas de *Galleria mellonella*, no presentó letalidad a concentraciones de 1 y 5 µg/µL, sin embargo, la proteína indujo cambios fenotípicos, como melanización y alteraciones en la metamorfosis, en los tiempos evaluados.

Palabras clave: esclerocio, larva, toxicidad, purificación de proteína

Introducción

El hongo patógeno *Sclerotium cepivorum* Berk, causa la **podrición blanca del ajo y la cebolla**, una enfermedad destructiva en cultivos de la familia *Allium* que afecta su calidad y rendimiento (Pinto y col., 1998). La severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la cantidad de esclerocios (estructuras de resistencia del hongo), que hay en el suelo (Crowe y col., 1980).

Características morfológicas y estructurales del esclerocio

El hongo se reproduce y sobrevive principalmente a través de dos fases: **Micelio**: red de hifas blancas y algodonosas que crecen de manera vegetativa y **Esclerocios**: estructuras redondas, oscuras y compactas que se forman a partir del micelio. Miden entre 0.25 y 0.6 mm de diámetro y pueden permanecer viables en el suelo por más de **20 años**, incluso sin la presencia del ajo o la cebolla (Entwistle, 1990; Crowe y col., 1980; Crowe, 1995; Kohn y Grenville, 1989) (Figura 1). Los esclerocios son la forma de resistencia del hongo y la principal fuente de inóculo. Su germinación es activada por temperaturas bajas (14 °C a 18 °C) y se detiene por completo a 24 °C (Coley-Smith, 1979, citado por Crowe y col., 1980). La capacidad de los esclerocios para sobrevivir por tanto tiempo los convierte en el factor clave para la persistencia del hongo en los campos agrícolas (Entwistle, 1990).

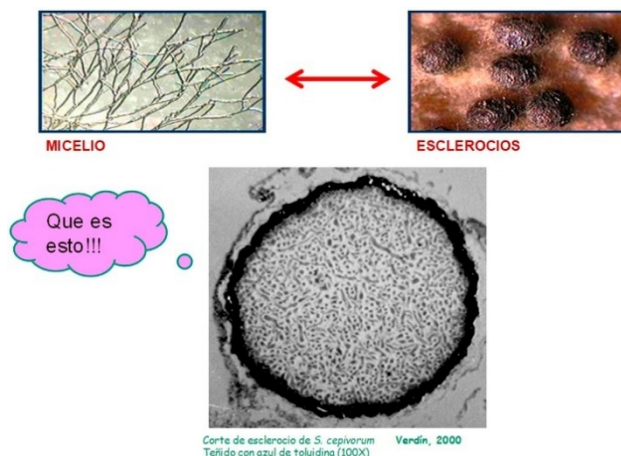


Figura 1. Morfología del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk comenzando a partir del micelio del hongo pasando a la formación de esclerocios en forma redondeada y un corte del esclerocio teñido con azul toluidina (100x). (imágenes tomadas de la colección del laboratorio).

Proteína específica del esclerocio de hongos.

Existe una variedad de hongos formadores de esclerocios como *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Claviceps*, *Botrytis*, *Verticillium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (ascomicota) y *Typhula*, *Coprinus* (Basidiomicotina) entre otros. En *Sclerotinia sclerotiorum*, se ha descrito una proteína que esta exclusivamente relacionada con el desarrollo del esclerocio, llamada SSP1, su peso molecular es de 37 kDa y es específica de esta estructura, representa el 50% del total de proteínas solubles del esclerocio (Russo y col., 1982; Russo y Van Etten, 1985). El Análisis estructural sugiere que la proteína SSP1 es similar a las lectinas específicas de fucosa; sin embargo, su función en el desarrollo de los esclerocios no está totalmente clara, ya que mutantes que carecen del gen *ssp1* no presentan un efecto notable en su crecimiento y desarrollo. Esto se ha atribuido a un gen compensatorio, llamado *ssp2*, que puede suplir la función de *ssp1* en *S.sclerotiorum* (Li y Rollins, 2010).

En *S. cepivorum* Berk, se identificó una proteína homóloga a SSP1, la cual fue denominada SC1, su peso molecular es de 34.4 kDa. Esta proteína se acumula de forma exclusiva en los **esclerocios**, llegando a representar hasta un 70% del total de las proteínas de la estructura. Su localización se encuentra específicamente en el interior de las hifas medulares (Figura 1) (Verdín, 1999; Alegría-Torres, 2004).

Función y Homología de la proteína SC1

Se ha asociado a la proteína SC1 con funciones en la formación, mantenimiento o germinación del esclerocio, dada su acumulación exclusiva en esta estructura. A nivel genético, el gen *sc1* es de copia única en el genoma de *S. cepivorum* y comparte una alta identidad (de 80% a 96%) con genes homólogos en otros hongos patógenos de plantas como *S. sclerotiorum*, *Botrytis fuckeliana*, *S. minor* y *S. trifoliorum* (González-Hernández, 2010).

Objetivos e Hipótesis del Estudio

Los esclerocios de *S. cepivorum* pueden permanecer viables en el suelo durante períodos prolongados. Se ha observado que, a pesar de la presencia de insectos en suelos agrícolas, estos no consumen los esclerocios, lo que sugiere una posible toxicidad en sus componentes.

Dado que la proteína **SC1** constituye la fracción mayoritaria de la proteína total en los esclerocios, se plantea la hipótesis de que protege a los esclerocios en el suelo de ser consumidos, porque es tóxica para los insectos.

Para probar esta hipótesis, el objetivo de este trabajo fue producir una gran cantidad de la **proteína SC1 por sobreexpresión en un vector bacteriano [proteína recombinante SC1 (SC1-r)]**, purificarla y evaluar su actividad en larvas del insecto *Galleria mellonella*, insecto descrito como un modelo adecuado para ensayos de toxicidad (Clavijo-Giraldo y col., 2016; Khan y col., 2016).

Metodología

Con la finalidad de expresar y purificar la proteína SC1 de *S. cepivorum*, en trabajos previos del laboratorio, se clonó el marco de lectura del gen *sc1* en el vector de expresión en frío *pColdI*. La expresión de la proteína recombinante (**SC1-r**) se induce a bajas temperaturas (15°C), y purificarla por cromatografía de afinidad, ya que contiene una etiqueta de histidinas (6xHis Tag).

Para cumplimiento de los objetivos, se siguió de manera general la siguiente metodología.

1. Inducción de la expresión de proteína SC1-r en *Escherichia coli* BL21(DE3).

Se inocularon 300 mL de medio LB (Luria Bertrani) suplementado con carbenicilina y cloranfenicol (100 µg/mL y 34 µg/mL respectivamente), con un pre-cultivo de 18 h de incubación de la bacteria transformante *E. coli* BL21. Se incubó a 37 °C, en agitación hasta obtener una densidad óptica D.O. (600nm) de 0.4 a 0.5 (de 3 h a 4 h). Después, a los cultivos se le adicionó el inductor IPTG, en concentraciones de 0.1 a 1 mM para establecer la expresión óptima de la proteína SC1. Se dejaron en hielo por 30 min, para posteriormente, incubar a 16 °C en agitación de 200 rpm, por 20 h. Finalmente, las células se cosecharon y almacenaron a 4 °C para posteriormente purificar la proteína de interés.

2. Obtención de proteínas totales en condiciones nativas

Las células inducidas se colectaron por centrifugación a 8000 x g por 10 min a 4°C, se resuspendieron en buffer de lisis/ lavado 1 (NaCl 300 mM, Na₃PO₄ 50 mM e imidazol 5 mM). Se lisaron por sonicación 4 veces en ciclos de 1 min en hielo. El homogenado se centrifugo por 20 min a 12,000 x g (4°C). Se recuperó el sobrenadante y se filtró por membrana Millipore de 0.45 y 0.22 micras.

3. Purificación de la proteína SC1 recombinante (SC1-r)

El protocolo de purificación se realizó siguiendo las especificaciones del proveedor de la columna (EconoFit Nuvia IMAC Columns- BIO RAD). Esta, permite la purificación de proteínas que contienen etiquetas de histidina debido a la afinidad a iones metálicos (Ni⁺⁺) presentes en la columna. Brevemente, se eliminó en etanol contenido en la columna pasando 2 volúmenes (CV: Volumen de la columna) de agua desionizada a un flujo de 2 mL/min. Se equilibró con 5 CV de buffer de equilibrio-lavado 2 (NaCl 300 mM, Na₃PO₄ 50 mM e imidazol 25 mM) con flujo de 2 mL/min. El filtrado de proteínas solubles se pasó a través de la columna 1

mL/min. Se lavó con 6 CV de buffer de lavado a 1 mL/min y enseguida con 6 CV de buffer de lavado 2, con flujo de 2 mL/min. La elución de la proteína recombinante se realizó con 10 mL de buffer (NaCl 300 mM, Na₃PO₄ 50 mM) en gradiente de concentración de 25 a 500 mM de imidazol, colectando fracciones de 0.5 mL a 2 mL/min.

4. Evaluación de la expresión de la proteína SC1-r

. Muestras de extracto total, los filtrados recuperados de la columna y las fracciones de elución se sometieron a separación electroforética en geles de poliacrilamida- SDS (SDS-PAGE), siguiendo el método descrito por (Laemmli, 1970), con la finalidad de visualizar la expresión de la proteína SC1-r y cuantificar la cantidad obtenida. Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 0.1%

5. Purificación de proteína SC1-r a partir de geles SDS-PAGE

Para eliminar proteínas contaminantes que co-purifican en la columna de afinidad, las fracciones que contienen mayor cantidad de proteína SC-r se separaron en geles SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con una solución fría de KCl 0.25M y DTT 1 mM. La banda mayoritaria de proteína correspondiente a SC1-r se cortó en fragmentos pequeños y se colocó en microtubos con 0.5 mL de solución salina fisiológica (PBS). Las muestras se dejaron en agitación a 400 rpm a 8°C durante toda la noche. Se eliminaron restos del gel de poliacrilamida por centrifugación y el sobrenadante, el cual contiene la proteína SC1-r se pasó a través de membrana de celulosa de 10 kDa de corte. (Amicon Ultra 0.5 MI, Millipore), se realizó un lavado con 0.5 mL de PBS. La proteína se recuperó y cuantificó usando el kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (SIGMA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

6. Efecto de la proteína SC1-r en lavas de *Galleria mellonella*

Grupos de 10 larvas de *G. mellonella* fueron desinfectadas en la última pro-pata derecha con etanol al 70% (v/v), e inyectadas con proteína pura en cantidades de 10 µg, 25 µg y 50 µg (en 10 µL, volumen total) con una jeringa Hamilton (aguja 26-G). Las larvas se mantuvieron a una temperatura de 37°C y fueron monitoreadas diariamente durante 8 días. Se registraron los signos como pérdida de movilidad, melanización, metamorfosis y muerte durante este periodo. Como control del experimento se inyectó PBS a un grupo de 10 larvas.

Para evaluar el efecto tóxico de la proteína SC1-r, se tomaron grupos de 5 larvas para las concentraciones de 1 y 5 µg /mL de proteína a evaluar. Se inocularon como arriba se menciona y a las 24 h post inoculación, se extrajo hemolinfa de las larvas y se cuantificó la actividad LDH (lactato deshidrogenasa), como indicador de citotoxicidad, cuando ésta se libera después de daño en la membrana plasmática de las células de la hemolinfa, usando el kit CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (invitrogen) donado gentilmente por el Dr. H. Mora.

Resultados

1. Detección de bacterias BL21 transformadas con el vector *pColdI-sc1*

Para expresar la proteína de interés, el vector denominado *pColdI-sc1* (el cual contiene la secuencia codificante para la proteína SC1) se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* BL21. Las células transformantes obtenidas se analizaron mediante PCR en colonia (figura 2A), amplificando el fragmento del gen *sc1*, cuyo tamaño esperado es de 934 pb. De las clonas positivas en la amplificación, se tomaron 3 de éstas para extraer el DNA plasmídico y evaluar por digestión con la enzima *KpnI*, la liberación del inserto esperado, esto se observa en la figura 2B.

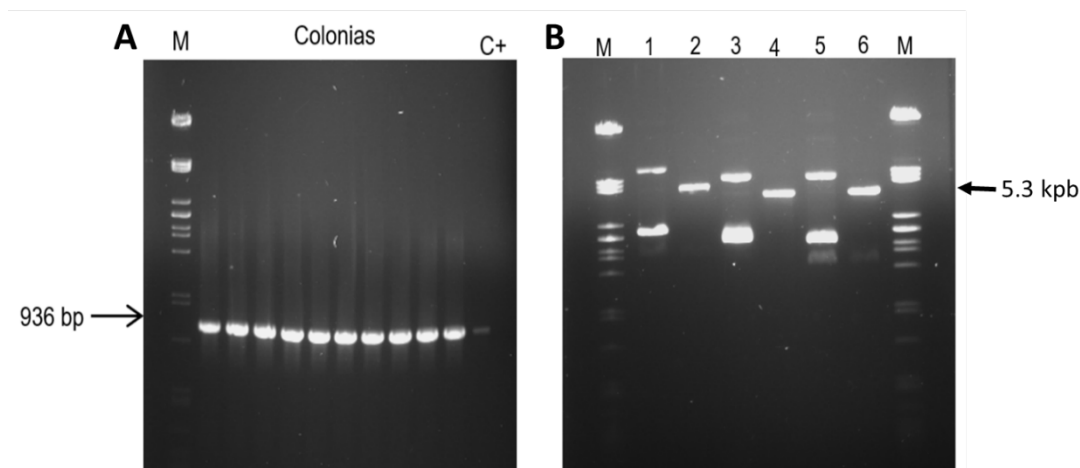


Figura 2. Análisis molecular de clones transformantes con *pCold-SC1*. A) PCR en colonia del gen *sc1* con un tamaño de 936 bp. M: marcador, C+ control positivo, B) Digestión de DNA plasmídico de 3 colonias con *KpnI*: M: marcador, Carriles 1, 3 y 5: DNA sin digerir para las colonias 2, 3 y 8 respectivamente. Carriles 2, 4 y 6 digestión con *KpnI* donde se identifica el fragmento esperado de 5.3 kpb

2. Expresión y purificación de la proteína recombinante SC1-r

Se seleccionaron dos clones bacterianos: una transformada con el vector *pCold-sc1*, que contiene el gen para la proteína SC1 recombinante (SC1-r), y una clona de control con el vector vacío *pColdI* (sin DNA insertado). La expresión de la proteína SC1-r se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección de Metodología.

Como se muestra en la Figura 3, el análisis del perfil proteico confirmó la expresión de la proteína SC1-r. Se observó una banda del tamaño esperado (37.6 kDa) en las fracciones solubles e insolubles del extracto de proteína total de la clona *pColdI-sc1*. Esta proteína no se observó en el control con el vector vacío, lo que confirma que se llevó a cabo la expresión de la proteína de interés. Con base en estos resultados, se escaló la inducción para obtener una mayor cantidad de proteína. La expresión de la proteína SC1-r fue diseñada con una cola de histidinas en su extremo amino terminal (N-terminal), lo que permitió purificarla mediante cromatografía de afinidad en columnas de Niquel-Agarosa.

Inicialmente, la purificación generó fracciones con una cantidad considerable de proteínas contaminantes. Para optimizar el proceso, se implementó una purificación con un gradiente de imidazol de 25 a 500 mM. Este método mejorado permitió obtener fracciones con mayor concentración de la proteína SC1-r y con un nivel significativamente menor de proteínas contaminantes co-eluyentes, como se ilustra en la Figura 4.

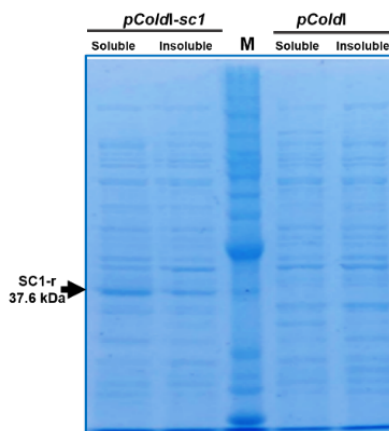


Figura 3. Perfil de proteínas de extractos solubles e insolubles de células BL21 inducidas para expresión (IPTG 0.5 mM). Gel SDS-PAGE 12%, teñido con azul de coomassie.

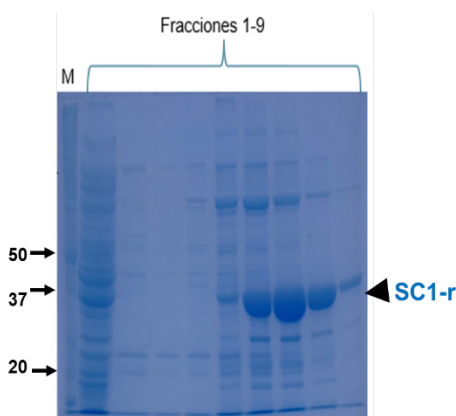


Figura 4. Perfil de proteínas purificadas por cromatografía de afinidad. Elución de la proteína SC1-r por gradiente de imidazol, 25-500 mM. SDS-PAGE al 12% de las fracciones recolectadas.

Al aplicar un gradiente de imidazol en la cromatografía de afinidad para la purificación de la proteína de interés (~37 kDa), fue posible eliminar parcialmente las impurezas que presentan una unión débil a la resina. El análisis por SDS-PAGE mostró que, aunque se redujo la cantidad de impurezas, estas no fueron eliminadas en su totalidad (Figura 4).

Las fracciones con mayor concentración de proteína SC1-r y menor cantidad de contaminantes, se separaron por electroforesis en un gel de SDS-PAGE, posteriormente el gel se incubó con KCl para la precipitación y obtención de la proteína mayoritaria como se describe en la metodología (Figura 5A). La pureza de la proteína se corroboró mediante un segundo análisis en gel de poliacrilamida (Figura 5B), seguido de su cuantificación y ajuste de concentración para ensayos de toxicidad en larvas de *Galleria mellonella*. Con la metodología seguida en este proyecto, a partir de un cultivo de 300 mL de células transformadas e inducidas, se obtuvieron aproximadamente 1.3 mg de proteína SC1-r pura.

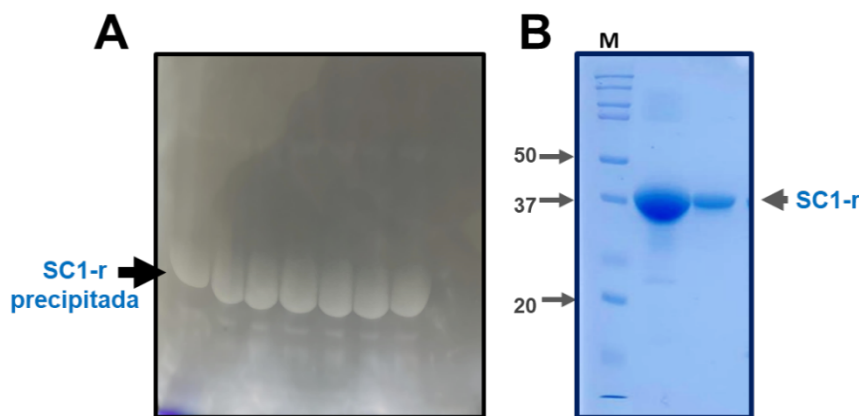


Figura 5. Precipitación y pureza de SC1-r en gel SDS-PAGE- A. SC1-r precipitada (KCl (0.25 M) y DTT (1 mM)), generando un precipitado blanco visible. B. Análisis de pureza de SC1-r

3. Determinación de la actividad tóxica de la proteína recombinante Sc1-r de *S. cepivorum* sobre larvas de *Galleria mellonella*.

Se inyectaron larvas de *Galleria mellonella*, con diferentes concentraciones de la proteína SC1-r, como se describe en la metodología. La proteína SC1-r no produjo una reducción significativa en la sobrevivencia o

en la metamorfosis de las larvas, durante los primeros dos días posteriores a la inoculación, con ninguna de las concentraciones evaluadas (1, 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 6). Sin embargo, a partir del segundo día, se observó el inicio de un proceso de melanización en algunas larvas, lo que sugiere una respuesta fisiológica temprana al tratamiento con la proteína (Figura 6C y figura 7). El efecto más evidente se registró en el quinto día post-inoculación, especialmente en el grupo tratado con la concentración más alta de la proteína (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), donde se observó una disminución de la sobrevivencia y notables alteraciones en el proceso de metamorfosis (Figura 6A, 6B).

La melanización de las larvas, se manifestó de forma progresiva desde el segundo día, lo que indica que puede servir como un biomarcador temprano de la respuesta de las larvas a la proteína SC1-r. Estos resultados sugieren que, aunque la proteína no es letal de forma inmediata, a las concentraciones probadas, induce una respuesta biológica que afecta la salud y el desarrollo de las larvas a largo plazo (Figura 7).

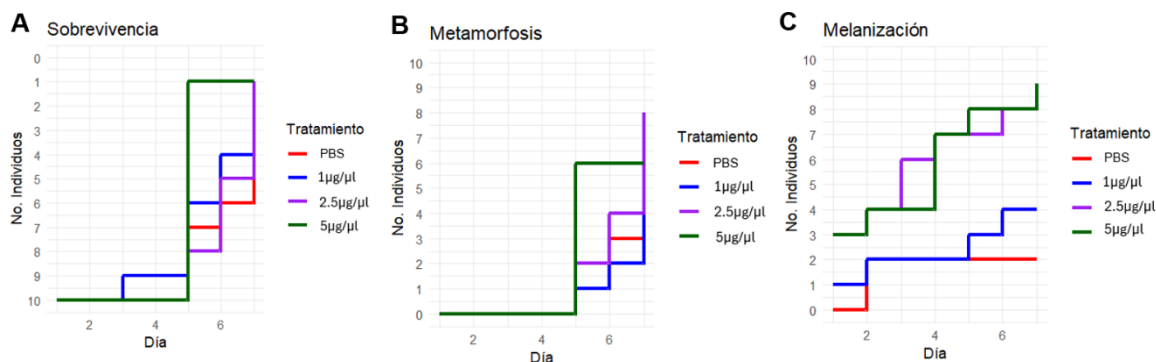


Figura 6. Efecto de SC1-r (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), en larvas de *Galleria mellonella* ($n=10$). A) Porcentaje de sobrevivencia diaria de los individuos B) Porcentaje de larvas que lograron completar la metamorfosis. C) Porcentaje de individuos que presentaron melanización a lo largo del periodo experimental. Datos analizados con test log-rank y reportados en curvas de sobrevivencia Kaplan-Meier; $p < 0.0002$.

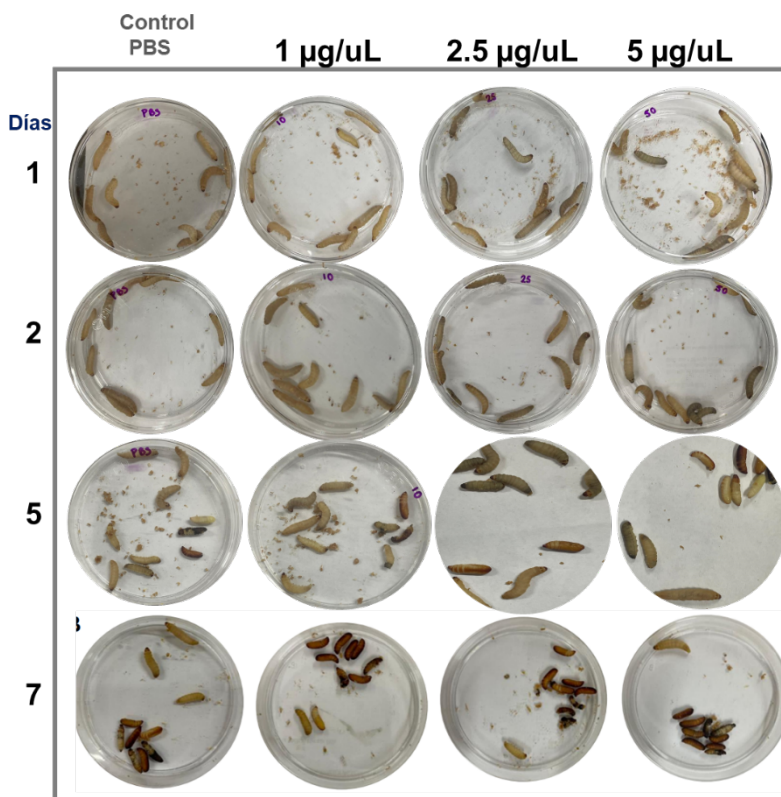


Figura 7. Efecto de SC1-r (1µg/µl, 2.5µg/µl y 5µg/µl) en *Galleria mellonella* (n = 10): la proteína indujo melanización temprana y, a 5 µg/mL, redujo la sobrevivencia y alteró la metamorfosis.

Dado que la proteína SC1-r no indujo alta mortalidad (figura 6A) en *Galleria mellonella*, pero sí melanización temprana y aceleración de la metamorfosis, se evaluó su potencial citotóxico en hemolinfa larval, mediante la liberación de LDH (lactato deshidrogenasa), como indicador de daño en membrana plasmática, 24 h posteriores a la inoculación de 1 y 5 µg/µL. Los resultados preliminares sugieren actividad citotóxica de SC1-r, aunque no concluyentes, por lo que será necesario repetir el ensayo con volúmenes de hemolinfa estandarizados (datos no mostrados).

Discusión

La proteína SC1 es un componente principal de las estructuras de reproducción y resistencia del hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum*, llamados esclerocios, los cuales causan la pudrición blanca del ajo y la cebolla. A pesar de su alta abundancia, la función biológica de SC1 dentro del ciclo de vida del hongo es desconocida (Coley-Smith, 1979; González-Hernández y col., 2010).

Para explorar la posible función insecticida de SC1, la proteína expresada heterológicamente en *E. coli* (SC1-r), se purificó y se evaluó su toxicidad en larvas de *Galleria mellonella*, un modelo biológico adecuado para ensayos de toxicidad de compuestos y proteínas de origen fúngico, vegetal y bacteriano (Clavijo y col., 2016; Khan y col., 2016; Liao y col., 2021). Los resultados revelaron que, si bien la proteína SC1-r no causó una mortalidad inmediata en las larvas, sí indujo respuestas fisiológicas significativas, como melanización temprana y alteraciones en la metamorfosis (Figura 6 y 7). Sugiriendo que estos efectos podrían estar asociados a un nivel significativo de toxicidad celular (Marena y col., 2025). Datos preliminares de la detección de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en la hemolinfa de larvas tratadas con SC1-r refuerza esta hipótesis. La liberación de LDH, producto de la lisis celular, es un marcador confiable de daño en la membrana plasmática, lo cual sugiere que la proteína podría estar comprometiendo la integridad celular desde etapas tempranas del tratamiento (24 h). El hecho de que este efecto sea perceptible incluso a concentraciones bajas (1 µg/µL) señala un posible mecanismo de acción citotóxico, más que exclusivamente inmunomodulador.

Por otro lado, la melanización observada podría ser una respuesta inmune innata frente al daño tisular o al estrés celular, ya que en insectos este proceso está asociado con la activación de la vía de la fenoloxidasas (Liao y col., 2021; Matos-Silva y col., 2024). Este pigmento, de estructura altamente polimerizada, rodea e infiltra células o sustancias extrañas, impidiéndoles desarrollar sus funciones vitales, constituyendo así un mecanismo clave de la respuesta humoral en insectos (Li y col., 1992). Asimismo, la aceleración en la metamorfosis podría representar una estrategia adaptativa del organismo para compensar o mitigar condiciones fisiológicas adversas, desencadenando procesos de desarrollo acelerados como mecanismo de defensa.

En conjunto, estos hallazgos indican que la proteína recombinante SC1-r ejerce un efecto citotóxico detectable en *G. mellonella*, lo que plantea su potencial como agente bioactivo en modelos de infección o en el control biológico de insectos plaga (Liao y col., 2021). No obstante, será necesario determinar si la proteína nativa SC1, obtenida directamente de los esclerocios, presenta la misma actividad citotóxica, considerando la posibilidad de que modificaciones postraduccionales influyan en su actividad biológica y potencien sus efectos al ser inyectada en la larva. Para comprender con mayor profundidad los mecanismos involucrados en esta toxicidad, se requieren estudios complementarios que incluyan la cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la detección de marcadores apoptóticos y pruebas funcionales en células hemocíticas (Matos-Silva y col., 2024; Marena y col., 2025), para comprender a profundidad los mecanismos involucrados en la toxicidad de la proteína SC1-r observada.

Conclusiones

1. Se purificó con un alto grado de pureza la proteína recombinante SC1 (SC1-r) del hongo *Sclerotium cepivorum*.

2. Larvas de *G. mellonella* responden a la inoculación de la proteína (SC1-r), pigmentándose (melanización) y formando el capullo (metamorfosis) de manera prematura, días antes que las larvas control inyectadas sin la proteína.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la DAIP por el apoyo económico brindado a MPHL & DAAR para realizar su estancia de verano. Al Dr. HMMM y sus alumnos de posgrado: MGG & URS por el apoyo brindado con los experimentos de *G. mellonella*, y a la M en C SEGH por todo el apoyo técnico brindado para la realización de este proyecto.

Bibliografía/Referencias

1. Alegría-Torres J.A. (2004). Caracterización Bioquímica y Molecular de la Proteína del desarrollo Sc1 de *Sclerotium cepivorum* Berk. Tesis de Maestría, Universidad de Guanajuato.
2. Clavijo-Giraldo, D.M., Martínez-Alvarez, J.A., Lopes-Bezerra, L.M., Ponce-Noyola, P., · Bernardo Franco · Almeida, R., Mora-Montes H.M. (2016). Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. *Journal of Microbiological Methods*. 122:73-77 doi: 10.1016/j.mimet.2016.01.014.
3. Coley – Smith, J.R. (1979). Survival of plant pathogenic fungi in soil in the absence of host plants. En: Soil Borne *Plant Pathogens*, pp 39-57.
4. Crowe, F. J., Hall, D. A., Greathead, A.S. y Baghott, K. G. (1980). Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* Berk and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology*, 70: 64-69.
5. Crowe, F.J. (1995). White Rot. En: Compendium of Onion and Garlic Diseases. Ed. Schwartz, F.H. and Mohan, S.K. *ASP Press*. pp 14-16.
6. Entwistle, A.R., Merriman, P.R., Munasinghe, H.L., and Mitchell P. (1990). Diallyl disulphide to reduce the numbers of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 14: 229-232.
7. González Hernández, S. E., Alegría Torres, J. A., Ponce Noyola, P. y Flores Martínez, A. (2010). CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA PROTEÍNA DEL DESARROLLO Sc1 DE *Sclerotium cepivorum*. Memorias del XXVIII CONGRESO NACIONAL SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA, A.C.
8. Khan, S., Nadir, S., Lihua, G., Xu, J., Holmes, K.A., Dewen, Q. (2016). Identification and characterization of an insect toxin protein, Bb70p, from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, using *Galleria mellonella* as a model system, *Journal of Invertebrate Pathology*. 133; 87-94. ISSN 0022-2011, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.010>.
9. Kohn LM, y Grenville DJ. 1989. Anatomy and histochemistry of stromatal anamorphs in the Sclerotiniaceae, *Can. J. Bot.* 67: 371-393.
10. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259). 680-685 doi:10.1038/227680a0.
11. Li, J., Tracy, J. W. y Christensen, B. M. (1992). Phenol oxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. *Developmental & Comparative Immunology*, 16: 41-48.
12. Li, M. Y., and Rollins, J. A., (2010). The development-specific ssp1 and ssp2 genes of *Sclerotinia sclerotiorum* encode lectins with distinct yet compensatory regulation. *Fungal Genetics and Biology*. 47:531-538.

13. Liao C, Yang Y, Fan X, Du J, Zhu J, Sang M, Li B. (2021). Toxicity of insecticidal proteins from entomopathogenic bacteria to *Galleria mellonella* larvae. 3 *Biotech*. 11(2):101.
14. Marena, G.D.; Thomaz, L.; Nosanchuk, J.D.; Taborda, C.P. (2025). *Galleria mellonella* as an Invertebrate Model for Studying Fungal Infections. *J. Fungi*. 11, 157.
15. Matos-Silva, S. J.Lacorte-Singulani, L. deSouza-Fernandez; K.F. Migliato; M.J. Soares-Mendes-Giannini; A.M.Fusco-Almeida. (2024). Exploring *Galleria mellonella* as a novel model for evaluating permeation and toxicity of natural compounds. *Public Health Toxicol*.4:22-30.
16. Pinto, C.M., Maffia, L.A., Berguer, R.D., Mizobuti, E.S., y Casali, V, W. (1998). Progress of white rot in garlic cultivars planted at different times. *Plant Dis*. 82:1142-1146.
17. Russo, G.M., Dahlberg, K.R., and Van Etten, J.L., (1982). Identification of a development-specific protein in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Exp Mycol* 6: 259–267.
18. Verdín-Ramos J. A. (1999). Purificación y localización de la proteína Sc1 de *Sclerotium cepivorum* Berk. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato.