

ANÁLISIS GENÉTICO FUNCIONAL DE LA FORMACION DEL ESCLEROCIO DE *Sclerotium cepivorum* Berk: AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANCA DEL AJO (análisis morfológico)

Dante Ríos Segovia (1), Dra. Patricia Ponce Noyola (2), Dra. Claudia Erika Morales Hernández (3)

1 [Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [d.riossegovia@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [poncep@ugto.mx]

3 [Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ce.moraleshernandez@ugto.mx]

Resumen

Sclerotium cepivorum Berk es un hongo fitopatógeno que produce estructuras de reproducción y resistencia llamadas esclerocios; estas estructuras pueden permanecer en suelo durante mucho tiempo y en cuanto se siembra ajo o cebolla, se rompe el estado de dormancia y ataca a estas hortalizas. Se ha descrito que el hongo cuando es crecido en agar-agua (AA) no forma esclerocios y crece muy poco en comparación con un medio de cultivo rico como el PDA. Para determinar si el medio de cultivo afecta la expresión de proteínas, en este trabajo se planteó el objetivo de crecer a diferentes tiempos a *S. cepivorum* en dos medios de cultivo, uno pobre y otro rico y determinar las diferencias morfológicas y en las proteínas expresadas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se creció el hongo en (AA) y PDA, se dejó incubando durante 15 días, haciendo observaciones cada 5 días. Se tomó el micelio a los diferentes tiempos y se rompió el micelio y el sobrenadante se analizó en los geles. Los resultados indican que hay diferencias en la expresión de proteínas. La proteína *Sc1* en PDA se expresa a tiempos más cortos y se ve poco expresada en AA.

Abstract

Sclerotium cepivorum Berk is a phytopathogenic fungus that produces reproductive and resistance structures called sclerotia; these structures can remain in soil for a long time and when garlic or onion are planted, the latency stage is broken and the fungus is able to attack. The fungus has been described when grown on water-agar (WA) sclerotia was not observed and grows less than in a rich crop medium such as PDA. To determine if the medium affects protein expression, the aim in this work was to grow *S. cepivorum* at different times in two crop medium, one poor and another rich and determined the morphological differences and the expressed proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels. The fungus was grown in (WA) and PDA, it was incubated for 15 days and every 5 days making observations. Mycelium was taken at different growing stages and broken and the supernatant was analyzed by polyacrylamide gels. The results indicated differences in protein expression. The protein *Sc1* in PDA is expressed in shorter times, and it is little expressed in WA.

Palabras Clave

Allium; Proteína; Desarrollo; Electroforesis; Patógeno

INTRODUCCIÓN

Sclerotium cepivorum Berk es un hongo fitopatógeno causante de la pudrición blanca del Ajo (*Allium Sativum* L.), un importante cultivo del que se produce 47 mil toneladas, que generan 720 millones de pesos a la economía mexicana. Guanajuato, junto con Zacatecas, son los productores más importantes de ajo del país [4], por lo que es importante erradicar este patógeno.

La pudrición blanca ocasiona que haya grandes pérdidas en los cultivos cuando se siembra en el periodo otoño-invierno.

Este hongo es deuteromiceto, pues se desconoce su fase sexual, su hospedero comprende plantas del género *Allium*, crece entre los 15 y 20°C [5], su crecimiento vegetativo es mediante la formación de micelio color blanco, algodonoso y ramificado [1]. Este desarrolla estructuras de resistencia llamadas “esclerocios”, que ocasionan que se mantenga hasta 20 años en la tierra, estos surgen como acúmulos de hifas, posteriormente incrementan su tamaño y se pigmentan, sintetizando melanina, que sirve de protección de rayos UV, especies reactivas de oxígeno (ROS) y degradación de enzimas producidas por hongos antagonistas [1]. Su tamaño oscila entre los 0.25 - 0.6 mm de diámetro [1].

Se ha reportado que el esclerocio se observa en medio rico (PDA), pero en medio pobre como (AA) únicamente se observan microconidióforos, la mayoría de éstos estériles [3].

Dentro del esclerocio se encuentra una proteína mayoritaria denominada Sc1, la cual pesa entre 34 y 36 KDa y puede construir hasta 70% de la proteína total del esclerocio. No se sabe su función dentro del esclerocio, pero se piensa que es utilizada como nutriente cuando éste germina [2].

Nuestra hipótesis propone que si las condiciones de cultivo no favorecen la formación de esclerocio, no se producirá la proteína Sc1. El objetivo es analizar las condiciones reportadas en la literatura,

para que el hongo crezca pero no se forme el esclerocio [3], así como observar si presenta otras estructuras de crecimiento (conidias) y analizar bioquímicamente el contenido intracelular a diferentes tiempos de cultivo para determinar la presencia de la proteína Sc1.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó por duplicado para ver la reproducibilidad y confiabilidad de éste.

Condiciones de crecimiento y cepa usada:

Se sembró *Sclerotium cepivorum* Berk en Agar-Agua y en el medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), en placas con 25 ml de medio de cultivo y en presencia de celofán, para poder cosechar el micelio más fácilmente; las cajas se incubaron a 18°C, observando su crecimiento en el microscopio estereoscópico, a los 5, 10 y 15 días de cultivo.

Rompimiento del micelio:

Para la obtención de las proteínas intracelulares, se recuperó el micelio con una espátula en tubos Falcón, y rápidamente se congeló con Nitrógeno líquido, los tubos se guardaron a -20°C hasta su uso. El micelio congelado se rompió en un mortero y posteriormente con homogeneizador celular tipo Potter, utilizando como regulador de rompimiento Tris HCl 50 mM pH 7.4, adicionado con SDS 0.2%, se incluyó el PMSF 10mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) al 10% para inhibir proteasas intracelulares, se centrifugó el homogenado a 3,000 rpm durante 15 min y posteriormente se recuperó el sobrenadante, al cual se agrego Etanol al 20% (para precipitar carbohidratos) y se dejó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó la muestra a 4,000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante.

Cuantificación de Proteína:

Se cuantificó la cantidad de proteínas por el método Lowry del sobrenadante, la cuantificación

se realizó utilizando el espectrofotómetro DU7 (Beckman).

Se calculó la concentración de proteína/ μL , utilizando BSA (albúmina bovina sérica), como estándar, para saber cuántos μL de cada muestra deberíamos de poner en cada pozo del gel para tener la misma cantidad de proteína en cada carril. Para obtener la cantidad de proteína deseada, las muestras se liofilizaron (secado por sublimación), al terminar de liofilizar, diluimos la muestra en la mínima cantidad de H_2O desionizada y regulador de carga, esas muestras se centrifugaron unos seg. y se pusieron a hervir en baño María durante 5 min. Para el primer experimento se hicieron dos geles de poliacrilamida y para el segundo experimento uno, variando la concentración de proteína, se separaron en el gel 20 μg , 100 μg y 28 μg de proteína respectivamente para cada tiempo de incubación analizado.

Separación de las proteínas por electroforesis:

Se llevó a cabo electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se preparó el gel separador al 12% y el gel concentrador al 4%, se depositó en la cámara de electroforesis y se agregó el regulador de corrida (25mM Tris, 192mM glicina, 0.1% SDS pH8.3), posteriormente se pusieron las muestras en cada carril y éstas se separaron en el gel a 100 V durante 4 h.

Tinción de los geles de poliacrilamida:

Posterior a la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Cuando se tenía poca proteína los geles se tiñeron con Nitrato de Plata. A continuación se describen las dos técnicas de tinción.

- Tinción con azul de Coomassie:

Se colocó la solución de Coomassie en el gel, y se metió al microondas por 10 seg, se dejó en agitación por 30 min y se recuperó el colorante, posteriormente al gel se le agregó la solución para desteñir, poniéndolo 10 seg en el microondas.

- Tinción con Nitrato de Plata:

Se lavó el gel con metanol 50% por 10 min y se hizo otro lavado con agua durante 10 min, se incubó el gel en 0.02% Tiosulfato de Sodio por un min y se hicieron otros 2 lavados de un min con H_2O , después se coloca el gel en 0.1% Nitrato de Plata, y se incubó a 4°C por 20 min, se lavó 2 veces con H_2O durante un min, al finalizar se reveló en Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) al 2% con agitación vigorosa, cuando el gel se tornó del color deseado se retiró la solución y se agregó ácido acético al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al sembrar en Agar-Agua y medio de cultivo PDA, se noto la gran diferencia en el crecimiento y desarrollo del hongo. En Medio PDA se observaron hifas, que con el paso del tiempo formaron acúmulos hasta verse el esclerocio, aumentando su cantidad con el paso del tiempo.



IMAGEN 1: Crecimiento de la cepa en medio PDA (5,10 y 15 días de incubación)

En el crecimiento en Agar-Agua se observó al principio solo hifas, tiempo después se comenzaron a observar conidias.



IMAGEN 2: Crecimiento de la cepa en medio AA (5,10 y 15 días de incubación)

Hasta que se empezaron a observar muy pocos acúmulos de hifas, observando en el microscopio óptico observamos que presentan primordios de esclerocio y conidias. A los 15 días ya se

observaban esclerocios pigmentados en algunas placas, menos de 10 esclerocios por placa.

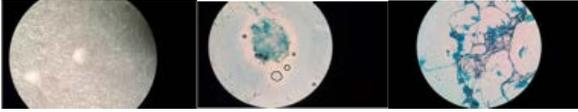


IMAGEN 3: Cepa en AA, donde se observa el desarrollo de esclerocio y conidias. Microscopía de campo claro

Se cosechó el micelio de los medios probados y a los diferentes días de observación (5,10 y 15 días), se congeló y posteriormente se rompió en las condiciones que se describen en materiales y métodos.

Se cuantificó la proteína de cada uno de los sobrenadantes obtenidos y se liofilizó para tener cantidades similares de proteína en cada muestra y poder separarla por electroforesis en geles de poliacrilamida variando la concentración de ésta.

En los geles de poliacrilamida, se observó que la proteína *Sc1* (en base al PM ya conocido), se comienza a ver a los 10 días solo en PDA y a los 15 días en medio PDA y AA (se observa lo mismo en todos los geles analizados).

También se observó diferencias en los pesos moleculares (PM) de las proteínas del hongo cuando fue crecido en AA o PDA y a los diferentes tiempos de incubación (5, 10 y 15 días).

Los resultados están marcados sobre las imágenes de los geles obtenidos.

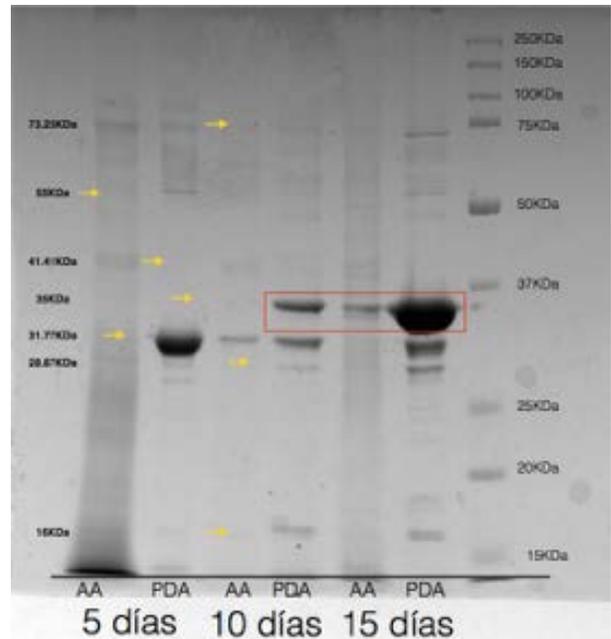
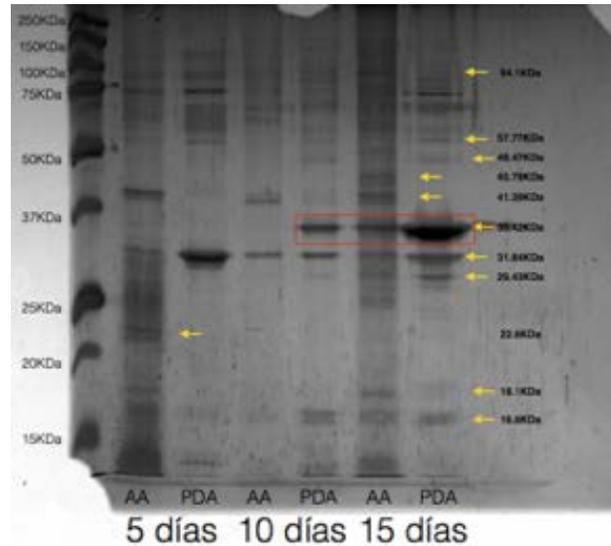


IMAGEN 4: Gel de poliacrilamida al 12% teñido con plata, proteína *Sc1* marcada en rojo

CONCLUSIONES

1. La cepa de *Sclerotium cepivorum* desarrolló esclerocio en abundancia en medio de cultivo rico Papa-Dextrosa-Agar, a diferencia del medio pobre Agar-Agua, desarrolló poco esclerocios [Imágenes 1&2], pensamos que tomó los nutrientes necesarios del celofán de la placa de medio, pues está hecho de celulosa. Ya que no está reportado en la literatura científica que *S.cepivorum* forme esclerocios en Agar-Agua.
2. La diferencia de proteínas entre las etapas de desarrollo de la cepa (5,10 y 15 días) y el medio (PDA y AA) es notable, se pueden observar que hay diferencias en las proteínas al mismo día de incubación, simplemente por el cambio del medio de cultivo (comparar carriles de 10 días con los dos medios probados).
3. La presencia de la proteína *Sc1* solo se da cuando se va a formar el esclerocio, ya que en los carriles en donde el hongo se creció en AA casi no se detecta la presencia de ésta.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes personas, que me apoyaron de diferentes maneras durante el proyecto realizado en el laboratorio de los Dres. Alberto Flores y Patricia Ponce Noyola:

M.C. Sandra Elizabeth González Hernández (apoyo técnico del laboratorio)

Dr. Alberto Flores Martínez

I.B.Q. Jessica Edith Torres Granados

Q.F.B. Roció Ortega Cuevas

Dr. Juan Orlando Flores Rizo

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por la oportunidad de que jóvenes empecemos a tener un contacto con la ciencia.

REFERENCIAS

Libro:

[1] Q.F.B. Sandra Elizabeth González Hernández, Estrategias moleculares para la interrupción del gen *Sc1* de *Sclerotium cepivorum* Berk, Maestro en Ciencias (Biología), Universidad de Guanajuato, Noviembre 2013, 68 h.

[2] Q.F.B Jorge Alejandro Alegría Torres, Caracterización Bioquímica y molecular de la proteína del desarrollo *Sc1* de *Sclerotium cepivorum* Berk, Maestro en Ciencias (Biología), Universidad de Guanajuato, Febrero 2004, 70 h.

[5] Nelson Virgilio Piraneque Gambasica, Factores Edafológicos que determinan la presencia y diseminación del hongo *Sclerotium cepivorum* en el cultivo de cebolla de bulbo (*Allium cepa*) en Tibasosa, Boyacá, Posgrado en ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, 2008, 193 h.

Artículo:

[3] C. Gindro and G. L'Hoste (1997). Germination and Infectious Potential of Microconidia of *Sclerotium cepivorum*. *J. Phytopathology* 145, 171-175. Université de Lausanne, Institut de Botanique Systématique et de Géobotanique, Dorigny, Switzerland.

[4] Redacción (2014). El ajo, una industria de peso. Tierra Fértil. Recuperado de <http://tierrafertil.com.mx/el-ajo-una-industria-de-peso/>