

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS ESTRUCTURAS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Sclerotium cepivorum* BERK: AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANCA DEL AJO Y LA CEBOLLA

Bueno Arias María Margarita (1), Martínez Álvarez José Ascención (2), Dra. Ponce Noyola Patricia (3)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato] | [maggiebno@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [martinezjose@ugto.mx]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [poncep@ugto.mx]

Resumen

Sclerotium cepivorum Berk es un hongo patógeno de plantas del género *Allium*, como el ajo y la cebolla. Su control en México es importante ya que nuestro país es productor y exportador de estas hortalizas. Un gran problema para su combate, son sus estructuras de reproducción llamadas esclerocios, los cuales pueden permanecer viables en el suelo por mucho tiempo. Se ha observado que este hongo no forma conidios como consecuencia de sus hifas estériles, y estos se inducen solo en condiciones de estrés nutricional. En el laboratorio tenemos una cepa mutante de *S. cepivorum* que produce conidios mas no esclerocios. En este proyecto se planteó analizar la cantidad de carbohidratos totales en la pared celular (PC) del conidio y del esclerocio, pues se sabe que estos compuestos le confieren en parte a la célula su estructura y resistencia ante distintos tipos de estrés ambiental. Se recolectaron las PC, para romperse, lavarse y someterse a hidrólisis ácida a fin de cuantificar sus carbohidratos totales por el método de Dubois. De manera simultánea se aplicaron algunas técnicas de biología molecular para identificar *S. cepivorum*. Los resultados indican que las PC de conidios presentan menor proporción de carbohidratos en comparación de las de esclerocios.

Abstract

Sclerotium cepivorum Berk is a pathogenic fungus of plants, specifically of the genus *Allium* like garlic and onion, their eradication in Mexico would be really important because our country is a great producer and exporter of products of these vegetables. A big problem for their combat is represented by their reproduction structures called sclerotia. It has been observed that the wild strain of this fungus does not form conidia because its sterile hyphae, meanwhile it develops the mycelium from which sclerotia are form. In contrast, there is a mutant strain of *Sclerotium cepivorum* which produces conidia but not sclerotia. The purpose of this project was to analyze the amount of carbohydrates present in the cell wall (PC) of each structure, by the fact that carbohydrates in part confer to the cell its structure and resistance to different types of environmental stress. The structures of interest were collected, then they were mechanically broken with liquid nitrogen in the mortar and processed to an acidic hydrolysis followed by the quantification of total carbohydrates by the Dubois method. In a simultaneously way some molecular biology techniques were applied. The results indicate that conidia's PC present a lower proportion of carbohydrates than sclerotia's PC.

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos desempeñan un papel importante en la pared celular (PC) de los hongos, ésta es una estructura con gran plasticidad que protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental, entre los que destacan los cambios osmóticos, además de que constituye el primer lugar de interacción del hongo con el medio externo. Dicha PC se encuentra compuesta principalmente por polisacáridos y proteínas, destacando especialmente carbohidratos como la quitina, el glucano, y el manano o galactomanano. La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetil-D-glucos-2-amina unidas entre sí con enlaces β -1,4, cuyo contenido en la pared varía según la fase morfológica del hongo. El glucano por su parte es el polisacárido estructural más importante de la pared celular representando un 50 a 60% del peso seco de su estructura, con uniones comunes β -1,3 aunque también se pueden encontrar menos frecuentemente con enlaces β -1,6, β -1,4, α -1,3 y α -1,4. Cada 40 a 50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces β -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada, la cual le permite unirse a otras estructuras como a otros glucanos o a quitina, proporcionándole así a la PC una gran resistencia y mecánica esencial para mantener la integridad celular. También encontramos mananos que se componen por manosas, unidas por enlaces glucosídicos de los tipos; α -1,6, α -1,2, α -1,3 y β -1,3. Dentro de ellos se encuentran los galactomananos formados por unidades de β -D-manopirósica unidas por enlaces 1-4 con ramificaciones a α -D-galactopirósica unidas por enlaces 1-6. [1]

Es por ello que en este proyecto se decidió buscar la cantidad de carbohidratos totales en la PC del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk- hongo causante de la pudrición blanca, la cual resulta ser la principal enfermedad que reduce el rendimiento y calidad del ajo y cebolla en México. Cuyo principal problema para su combate se debe a sus estructuras reproductivas llamadas esclerocios, los cuales pueden permanecer viables en el suelo hasta por 20 años y cuya germinación es estimulada por compuestos de azufre presentes en los exudados radicales de plantas del género *Allium*, conduciéndolos así a una infección o

inclusive una muerte por inanición. [2] Lo cual afecta directamente la economía del país al México situarse en uno de los 10 principales productores y exportadores de ajo a nivel mundial y el estado de Guanajuato es uno de los principales productores junto con Zacatecas, Aguascalientes, Puebla y Sonora. [3]

En este proyecto se trabajó con una cepa silvestre de *Sclerotium cepivorum* Berk (Wt) para la obtención de los esclerocios y una cepa mutante (M), incapaz de formar esclerocios, pero forma conidios. Las PC de ambas cepas fueron sometidas a los mismos procesos con el fin de observar la cantidad de carbohidratos presentes en la PC de cada una de ellas, para su posterior análisis comparativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección. Ambas cepas fueron sembradas en medio PDA, dejándose incubar a 18°C por 2 semanas con el fin de que hubiera cantidad suficiente de conidios o esclerocios según la cepa, por placa para su recolección. Este proceso se repitió varias veces, para tener suficiente material para la cuantificación.

Rompimiento de células con mortero. Se dispuso nitrógeno líquido en el mortero y se colocaron las muestras (esclerocios o conidios según fuera el caso). Se realizaron tres moliendas. Terminada la molienda se observó en el microscopio para corroborar si las estructuras se encontraban rotas. Los restos celulares se transfirieron a tubos Falcón. Posteriormente se lavaron añadiendo 1 mL de NaCl 1M seguido por una centrifugación de 5 min a 3,250 rpm. El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió con 5 mL de solución de lavado (SDS 2%, BME 0.3M, EDTA pH=7.5, Tris 50mM). Se procedió a calentar los tubos a baño María por 10 min a 100°C, y centrifugarlos por 5 min a 3,250 rpm. Se lavaron nuevamente, ahora con 1 mL de agua desionizada, seguida de la centrifugación por 5 minutos a 3,500 rpm. Nuevamente se desechó el sobrenadante y las muestras se dejaron congelando por 24 h para su posterior liofilización.

****La metodología para rompimiento celular fue idéntica para esclerocios y conidios, pero ambas se realizaron de manera independiente.**

Hidrolisis ácida para obtención de carbohidratos. Después de liofilizadas las paredes obtenidas de cada estructura, se agregó a cada tubo cierta cantidad de muestra (PC de esclerocio y conidios respectivamente) más 2 mL de TFA 2M, la mezcla se transfirió a una ampolleta la cual fue sellada con calor al mechero. Posteriormente se colocó en baño de arena en el horno a 100°C por 24 h. Pasadas las 24 h se rompieron las ampolletas. El material hidrolizado se transfirió a vasos de precipitados de 10 mL. Se colocaron en una parrilla con calentamiento en la campana de extracción, para la evaporación del TFA, antes de que se seque se adicionó 1 mL de H₂O desionizada esterilizada (esta operación se realiza de 7-10 veces). Los carbohidratos se recuperaron en tubos Eppendorf. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 4 min, se rescató el sobrenadante, y se eliminó la pastilla. Al finalizar las muestras fueron congeladas a -20°C para su futuro análisis.

Extracción ADN genómico de los conidios. El sobrenadante del primer lavado de rompimiento celular se recuperó para proceder a la obtención del ADN, esto para cerciorarnos que estuviéramos trabajando con *Sclerotium cepivorum* y no con una cepa contaminante. Posteriormente se separaron ambas muestras de ADN genómico por electroforesis horizontal, en un gel de agarosa al 1% y se compararon las bandas para determinar la calidad de ADN. Se procedió a amplificar el ADN de ambas estructuras con 5 pares de iniciadores específicos para *S. cepivorum* Berk. Después se separaron nuevamente los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1% para analizar por comparación del patrón electroforético de ambas muestras.

Cuantificación de carbohidratos totales por el método de Dubois.^[4] Se prepararon diluciones de manosa como estándar a distintas concentraciones para realizar la curva de calibración de carbohidratos. De cada lote de PC de esclerocios y conidios se colocaron 20µL de muestra y 180µL de agua deionizada. Dividiéndose cada uno en tubos con 100µL. También se preparó un blanco. A cada tubo se le añadieron 300µL de fenol al 80% en H₂O y posteriormente 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado. Los tubos se agitaron en el vortex, se incubaron por 30 min a temperatura ambiente cuidándose de la luz.

Finalmente, las muestras se leyeron a una Absorbancia de 490 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó una curva de calibración de carbohidratos con manosa a distintas concentraciones, obteniendo los siguientes resultados:

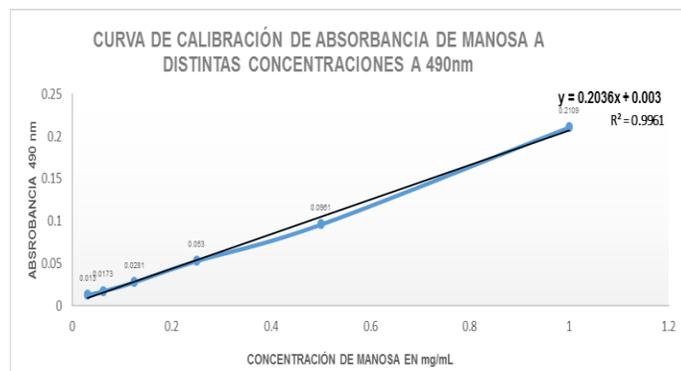


Gráfico 1. Curva de calibración de manosa.

Empleando la curva de calibración de la manosa, tomando “y” como los valores de Absorbancia despejamos “x” en cada caso para obtener los valores de concentración de carbohidratos (CHO’s) correspondientes a cada una de nuestras muestras.

Obteniendo así los siguientes resultados para la cepa (Wt) y la (M):

MUESTRA	A 490nm	PRO M A 490nm	CONCENTRACION CHO's en mg/mL	PROME DIO	DESV.ST D
1	0.0762	0.08205	0.388261297		
1'	0.0879				
2	0.0624	0.0676	0.317288802		
2'	0.0728			0.38515062	0.066361186
3	0.1104	0.0946	0.449901768		
3'	0.0788				

MUESTRA M	A 490nm	PROM A 490nm	CONCENTRACION CHO's en mg/mL	PROMEDIO	DESV.STD
1	0.0629	0.05485	0.254666012	0.2275704	0.034233768
1'	0.0468				
2	0.0336	0.05165	0.238948919		
2'	0.0697				
3	0.0409	0.0415	0.189096267		
3'	0.0421				

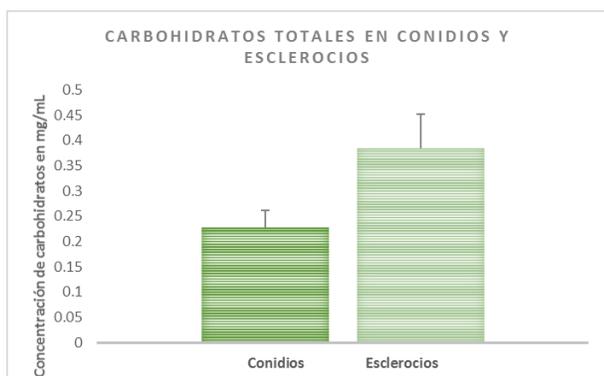


Gráfico 2. Comparación de concentración carbohidratos totales en conidios y esclerocios

Al realizar una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de ambos ADN se observó el mismo patrón de bandeo, por lo que se comprobó mediante técnicas moleculares que los conidios pertenecen a la especie *S. cepivorum* Berk.

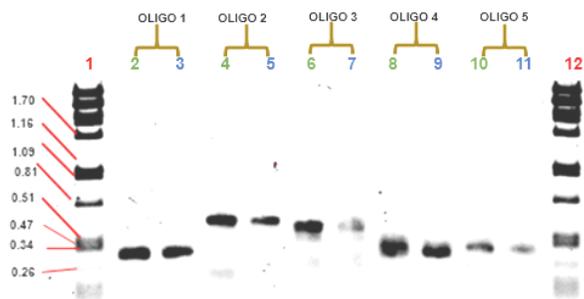


Imagen 1. Patrón de amplificación específico para *S. cepivorum* Berk. Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación de la cepa silvestre (Wt) y la mutante (M). [Carriles 1 y 12 marcadores para el tamaño de ADN] [Carriles 2,4,6,8 y 10

amplificación de cepa Wt]. [Carriles 3,4,7,9 y 11 amplificación de cepa M]

Durante la recolección de conidios se observó que había una fracción que no se iban al fondo después de la centrifugación como era de esperarse, estos por el contrario permanecían en la pared superior del tubo.

Dichos conidios se recolectaron y se tiñieron sus núcleos con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) y se observaron en el microscopio de epi-fluorescencia; se notó que aproximadamente el 2% de ellos presentaban material genético, al ser los únicos que presentaban fluorescencia.



Imagen 2. Conidios teñidos con DAPI observados con el objetivo de 100x al microscopio de fluorescencia. En el cuadro rojo podemos observar dos conidios que muestran fluorescencia a diferencia de los otros que no la presentan.

CONCLUSIONES.

1. Los conidios de la cepa mutante (M) de *Sclerotium cepivorum* Berk presentan en menor proporción carbohidratos de pared que los esclerocios de la cepa silvestre (Wt).
2. Molecularmente los conidios pertenecen a la especie *Sclerotium cepivorum* Berk.
3. La cepa mutante de *Sclerotium cepivorum* Berk produce conidios con y sin núcleo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todo el personal de laboratorio donde se realizó la experimentación, pero especialmente a la Dra. Patricia Ponce Noyola y a José Ascención Martínez Álvarez por brindarme su tiempo, conocimientos y apoyo durante la investigación. También agradezco a la Universidad de Guanajuato por permitirme participar en este proyecto. Se agradece a la Universidad de Guanajuato por el apoyo institucional para fortalecer la excelencia académica convenio 89/2016.

REFERENCIAS

Artículo:

[1] Pontón José 2008. "La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina". Revista Iberoamericana de Micología 25 edición 2008; 25: 78-82. Recuperado de: <http://www.reviberoammicol.com/2008-25/078082.pdf>

[2] Delgadillo Sánchez Felipe, Zavaleta Mejía Emma, Aguilar Laguna Arturo, Arévalo Valenzuela Alfredo, Torres Pacheco Irineo, Valdivia Alcalá Ramón, Garzón Tiznado José Antonio. "Manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) del ajo en Guanajuato" México Agricultura Técnica en México, vol. 30, núm. 1, enero-junio, 2004, pp. 41-52. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60830104>.

[3] Delgadillo Sánchez Felipe, Zavaleta Mejía Emma, Osada Kawasoe Seiji, Arévalo Valenzuela Alfredo, González-Hernández Víctor Arturo, Nieto Ángel Daniel e Torres Pacheco Irineo. "DENSIDAD DE INÓCULO DE *Sclerotium cepivorum* Berk. Y SU CONTROL MEDIANTE TEBUCONAZOLE EN AJO (*Allium sativum* L.)" Revista Fitotecnia Mexicana Vol. 25 (4): 349 – 354, 2002. Recuperado de: <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/25-4/3a.pdf>

[4] Cristancho Cruz Leidy Milena, Monroy Soler Ricardo Alonso. "MANUAL DE MÉTODOS GENERALES PARA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS". UPTC 2014. Pág: 5-7. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/LeidyCristancho/manual-de-mtodos-generales-para-determinacin-de-carbohidratos>