



**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL
EXTRACROMOSOMAL DE LA CEPA (MCG2) DE *Sclerotium cepivorum* BERK:
AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANCA DEL AJO”**

Cristhian A. Jiménez Hernández ^a, Adriana Berenice Capetillo Gallegos ^a, Sandra E. González
Hernández ^a, Alberto Flores Martínez ^a y Patricia Ponce Noyola ^{a*}.

^a Departamento de Biología, DCNE, Universidad de Guanajuato, Col. Noria Alta S/N, Guanajuato,
Gto. México 36050. poncep@ugto.mx

Resumen

Sclerotium cepivorum Berk es un hongo imperfecto, causante de la enfermedad conocida como “pudrición blanca del ajo”, impactando negativamente en los cultivares de ajo y cebolla, entre otros de la familia *Allium*. El hongo es capaz de sobrevivir en el suelo por décadas formando estructuras de resistencia y propagación (esclerocios). Con la finalidad de lograr a mediano plazo un control efectivo de la enfermedad, en el grupo de trabajo nos hemos enfocado a conocer más sobre la biología de este hongo, y hemos detectado que, en algunos de los aislados, está presente material genético extracromosomal (MGE) de diferente tamaño molecular. Con el objetivo de determinar la naturaleza de este material, se emplearon diferentes enfoques bioquímicos y moleculares para purificar e identificar el material extracromosomal. Se identificó que el MGE es RNA de doble cadena, por su resistencia al tratamiento con DNasa I y RNasa A. Dicho material podría provenir de un micovirus multipartita.

Palabras clave: esclerocios; micovirus; Material Genético Extracromosomal; dsRNA

**" IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACROMOSOMAL
MATERIAL OF *Sclerotium cepivorum* BERK (MCG2) STRAIN: CAUSAL AGENT
OF GARLIC WHITE ROT”**

Abstract

Sclerotium cepivorum Berk is an imperfect fungus that causes the disease known as "white rot of garlic," negatively impacting garlic and onion cultivars, among others of the *Allium* family. The



fungus can survive in the soil for decades, forming resistance and propagation structures (sclerotia). To effectively control the disease in the medium term, the working group has focused on learning more about the biology of this fungus, and we have detected that in some isolates, extrachromosomal genetic material (MGE) of different molecular sizes is present. Various biochemical and molecular approaches were used to purify and identify the extrachromosomal material. The MGE was identified as double-stranded RNA due to its resistance to DNase I and RNase A treatment. Such material could come from a multipartite mycovirus.

Keywords: sclerotia; micovirus; Extracromosomal Genetic Material; dsRNA

1. Introducción

La “podrición blanca” es una enfermedad devastadora, con una distribución mundial y se puede presentar en donde haya cultivos del género *Allium* (p. ej. ajo y cebolla) (Crowe y col., 1993). Esta enfermedad es causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk y puede generar grandes pérdidas económicas, además de dejar el suelo inutilizable para sembrar plantas del género *Allium* en los sitios donde se haya encontrado la enfermedad por al menos un par de décadas (Sammour y col., 2011), esto debido a la formación de esclerocios; estructuras de resistencia y propagación compuestas de micelio compactado, envuelto en varias capas de células melanizadas (Gómez-Miranda y Leal, 1981). Se ha reportado que la severidad de

la enfermedad depende de la cantidad de esclerocios presentes en el área de cultivo: un esclerocio por kilogramo de suelo puede provocar un 50% en la incidencia de la enfermedad (Crowe y Hall, 1979).

Los esclerocios germinan al momento que detectan exudados de la raíz del ajo, específicamente los derivados de disulfuros de di-alilo rompiendo el estado de latencia y creciendo hasta la raíz de la planta, provocando así el inicio de la infección (Coley-Smith y col., 1990).

Se ha reportado que un posible factor de virulencia en los hongos que atacan plantas es la presencia de micovirus (Xie y col., 2006).

Por definición, el Material Genético Extracromosomal (MGE), es todo aquel



material genético que se encuentra fuera del núcleo de la célula eucariótica y no forma parte del material cromosomal celular (Kuttler y Sabine, 2007), este material puede ser plasmídico o viral. Desde el descubrimiento de los plásmidos en sistemas bacterianos, se han encontrado una variedad muy extensa de material extracromosomal en distintos tipos de células (procariontes y eucariontes), siendo este material de diferentes características físicas y composición (DNA o RNA, de cadena sencilla o doble) (Rush y Misra, 1985).

Este no es el único tipo de MGE que puede encontrarse en un hongo; Day y col., en 1977 describieron en el hongo *Cryphonectria parasítica* (hongo patógeno de los olmos), que en dicho hongo se albergaban moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA).

Chu y col. (2004) identificaron un micovirus de RNA de doble cadena (dsRNA) en 19 de 827 aislados de *Fusarium graminearum*; Xie y col., (2006), reportaron la “debilitación” de algunas cepas de *Sclerotinia sclerotiorum* para atacar a su planta hospedera, tal

debilidad fue asociada a la presencia de un micovirus de dsRNA.

Es importante mencionar que el dsRNA extracromosomal ha sido encontrado en diferentes clases de hongos, desde ascomicetos, hasta basidiomicetos. Además, algunos autores confirman que este material genético pertenece a un virus con genoma segmentado y aunque no se considera patógeno para el hongo (Hansen y col., 1985; Nuss, 1992; Buck, 1998), en algunas ocasiones puede conferir algún fenotipo específico respecto a la interacción con su huésped (McCabe y col., 1999).

A la fecha, no existe un patrón fenotípico para todos los virus que infectan hongos para asumir que juegan un papel específico en la biología de su hospedero (McCabe, 1999), por lo que aún falta investigar más con respecto a esta clase de virus.

Se ha podido detectar la presencia de estos micovirus analizando el patrón electroforético de los ácidos nucleicos de los hongos, la electroforesis de campos pulsados (CHEF), se usa para resolver fragmentos grandes de material genético o cromosomas. En la figura 1 se describe el



principio básico de la electroforesis de campos pulsantes.

Respecto a *S. cepivorum*, existen cepas que poseen MGE (Luna-Martínez y Ponce P, 2001), y hasta la fecha existe solo un reporte donde este material extracromosomal fue estudiado (Reyes-Pérez y col., 2003). En este reporte evaluaron solo la relación del MGE con la virulencia de *S. cepivorum*, concluyendo que la presencia de este no afecta la capacidad infectiva del hongo, sin embargo, no se realizó ni la purificación ni caracterización de este material extracromosomal.

Como las bandas observadas del MGE son grandes, nos propusimos separarlas por medio de este tipo de electroforesis para caracterizarlas.

En este trabajo, se aisló y caracterizó parte del MGE presente en la cepa MCG2 de *S. cepivorum* Berk, con la finalidad de conocer más sobre la biología de este hongo, y tratar a mediano plazo, determinar el papel de los micovirus en la diferenciación de esclerocio-micelio y viceversa, así como en la interacción del hongo con su planta huésped.

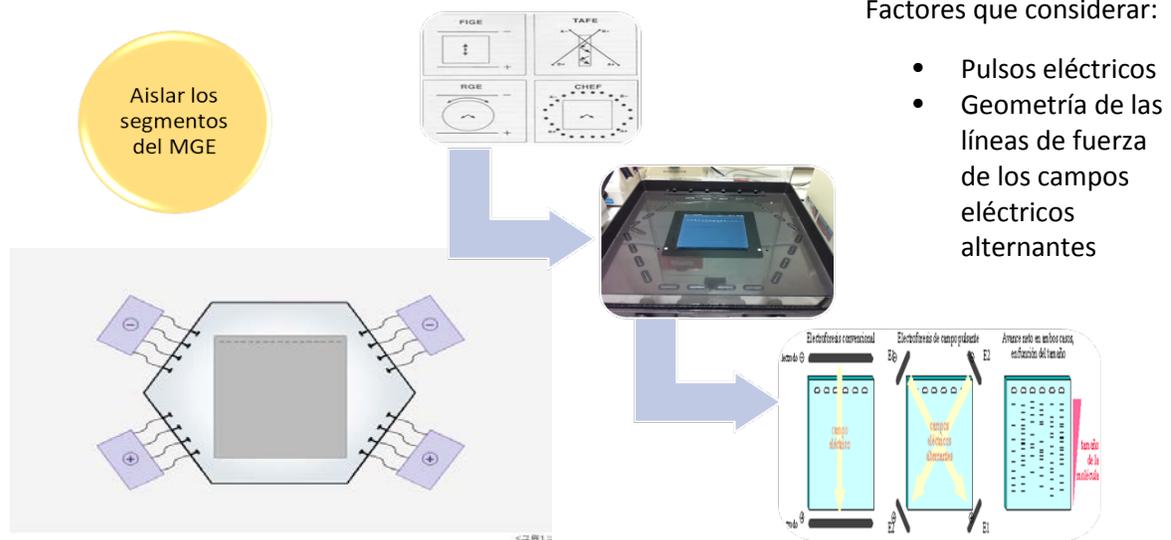


Figura 1. Electroforesis en campos pulsantes (CHEF)



2. Materiales y Métodos

2.1. Cepa y condiciones de cultivo

La cepa MCG2 de *S. cepivorum* Berk, se propagó en placas de medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA; Difco ®) sobre celofán, a 18 °C, por trasplante de micelio, permitiendo crecimiento vegetativo por cuatro días.

2.2. Extracción de ácidos nucleicos

2.2.1 Método con fenol-cloroformo-isoamílico

Para extraer los ácidos nucleicos totales a partir de micelio se utilizó el protocolo descrito por Raeder y Broda (1985), el cual se detalla a continuación: Micelio de 4 días de crecimiento, se cosechó y fue molido con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino. El pulverizado (0.5 mL aprox.) fue transferido a microtubos Eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 0.5 mL de regulador de extracción TENS (Tris-HCl 200 mM pH 8.5; EDTA 25 mM; NaCl 250 mM; SDS 0.5 %). Se adicionaron 30 µL de RNasa pancreática de bovino (10 mg/mL). Se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante 1 h con agitación en vortex. Se adicionó un

volumen equivalente de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente durante 10 min. Se centrifugó a 11,750 x g durante 30 min a 4 °C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se agregó un volumen equivalente de cloroformo (saturado con agua), se mezcló vigorosamente durante 3 min y se centrifugó 15 min a 11750 X g. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionó un volumen equivalente de isopropanol frío, mezclando por inversión y se incubó 30 min a -20 °C. Los ácidos nucleicos precipitados se recuperaron por centrifugación a 11,750 x g durante 3 min. La pastilla obtenida se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 70 % por agitación; se volvió a centrifugar a 11,750 x g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el menor volumen posible de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, pH 8.0) o agua desionizada estéril.

2.2.2 Extracción de RNA con Trizol®

Aproximadamente 0.5 g de micelio pulverizado fueron transferidos a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se mezcló con 1 mL de Trizol ® Reagent (Invitrogen) y se



siguió el protocolo descrito por el proveedor.

2.3 Purificación de Material Genético Extracromosomal (MGE) a partir de geles de agarosa

2.3.1 Electroforesis horizontal estándar

Se emplearon geles de agarosa a diferentes concentraciones (0.6%-1.2% p/v) en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, 1 mM EDTA, pH 8.2-8.4) conteniendo BrEt 0.5 µg/mL. El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal que contenía TAE 1X. Los ácidos nucleicos de cada una de las muestras se mezclaron (2:1) con el regulador de carga (Colorante Naranja G 0.025%, Glicerol 30%) y se colocaron en los pozos del gel, la electroforesis de la muestra se llevó al cabo a diferentes voltajes (30-80 volts) y diferentes tiempos (desde 90 min para moléculas de bajo peso molecular hasta 16 h para moléculas de alto peso molecular). Como marcador de tamaño molecular se utilizó el DNA del fago lambda cortado con la enzima de restricción *Pst* I. Al término de la electroforesis los geles se observaron en un trans-iluminador de luz ultravioleta y la imagen se capturó en el equipo ChemiDoc MS (BioRad™). Una vez identificadas las

bandas del MGE, éstas fueron cortadas del gel con ayuda de un bisturí estéril, los fragmentos del gel fueron depositados en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Los ácidos nucleicos contenidos en los fragmentos de agarosa fueron purificados con el Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research); cuyo protocolo se siguió de acuerdo con el fabricante. La elusión de los ácidos nucleicos se realizó con agua tratada con DEPC (Dietilpircarbonato; 0.001% v/v final). Los ácidos nucleicos purificados se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

2.3.2 Electroforesis de campo eléctrico pulsante o campo eléctrico homogéneo de contorno limitado (CHEF, contour clamped homogeneous electric Field)

Se utilizaron geles de agarosa de baja electro endo osmosis (EEO) al 1% en TBE 0.5X (Tris-borato 44.5 mM, 1 mM EDTA, pH 8.2-8.4). el gel para rellenar los pozos se preparó con agarosa (LMP), en regulador TBE 0.5X. La muestra de RNA total se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión (LMP) para tener una concentración final de 0.7 % y se colocó en el pozo del gel de EEO, hasta llenarlo y se dejó solidificar. El gel se colocó en el



centro de la cámara de electroforesis (CHEF), se llenó con regulador TBE 0.5X el cual se mantuvo a una temperatura constante de 10 °C. Las condiciones de cada electroforesis dependieron de la muestra y se mencionan en los resultados. Al finalizar la electroforesis, el gel se retiró de la cámara y se tiñó con BrEt (0.35 µg/mL). El gel se observó y se capturó su imagen en el equipo ChemiDoc MS (BioRad™). Posteriormente la banda de agarosa con el material extracromosomal se recuperó y purificó como se describió anteriormente.

2.4 Análisis del Material Extracromosomal

2.4.1 Tratamiento con RNasa A

Las muestras de ácidos nucleicos totales se trataron como se describe en Ausubel (2003). Brevemente, la muestra se llevó a un volumen final de 100 µL con agua tratada con DEPC. Se adicionaron 10 µL de RNasa pancreática de bovino (10 mg/mL). Se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante 1h con agitación. Se adicionó un volumen equivalente de la mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente durante 10 min. Se centrifugó a 12,000 x g durante 30 min a

4 °C. La fase acuosa fue transferida a un tubo estéril y se agregó un volumen equivalente de cloroformo, se mezcló vigorosamente durante 3 min y se centrifugó durante 15 min a 12,000X g. La fase acuosa se recuperó y se adicionó un volumen equivalente de isopropanol frío, se mezcló por inversión. Se dejó a -20 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 12,000X g durante 3 min, el sobrenadante fue eliminado por decantación, y la pastilla se lavó dos veces por centrifugación a 12,000X g por 5 min, con etanol al 70 % despegándola por agitación. Se descartó el sobrenadante por decantación, se dejó secar la pastilla y, por último, se resuspendió en TE pH 8.0 o agua desionizada estéril tratada con DEPC.

2.4.2 Tratamiento con DNasa I

Las muestras de ácidos nucleicos totales se trataron como se describe en Ausubel, 2003, el cual se describe brevemente. En un tubo Eppendorf se realizó la siguiente mezcla de reacción: 1 µg de muestra (MGE); 5 µL de regulador 10X (Fermentas™); 1 µL de DNasa I (1 U) (Fermentas™); Agua DEPC a 50 µL. La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. Para detener la reacción se adicionaron 50



μ L de fenol: cloroformo: isoamílico y se agitó en el vórtex durante 3 min. Se centrifugó a 12,000 x g por 10 min. La muestra se precipitó con un volumen equivalente de isopropanol frío durante 16 h. Posteriormente, la muestra se resuspendió en 20 μ L de agua DEPC.

3. Resultados

3.1 Extracción del MGE de la cepa MCG2

Se extrajeron los ácidos nucleicos totales de la cepa MCG2 como se describe en materiales y métodos (M&M), en la figura 2 se observa el DNA total (de mayor intensidad y mayor tamaño molecular) y otras bandas (debajo del DNA total) de

alto tamaño molecular. En el panel A la separación fue en agarosa al 1%, se observan tres bandas y en el panel B en agarosa al 0.6%, en donde se observan al menos 4 bandas.

La separación electroforética del RNA total extraído (descrito en M&M) se muestra en la figura 3 en donde se puede observar la separación de los RNA ribosomales del hongo (28S y 18S) y al menos 3 bandas de RNA de tamaño molecular alto (entre 5.07 y 14.05 kpb), las cuales se indican en el recuadro blanco. Se ha descrito en la literatura que muchos micovirus tienen su genoma segmentado, por tal razón, nos propusimos purificar las tres bandas que se observaron en esta cepa.

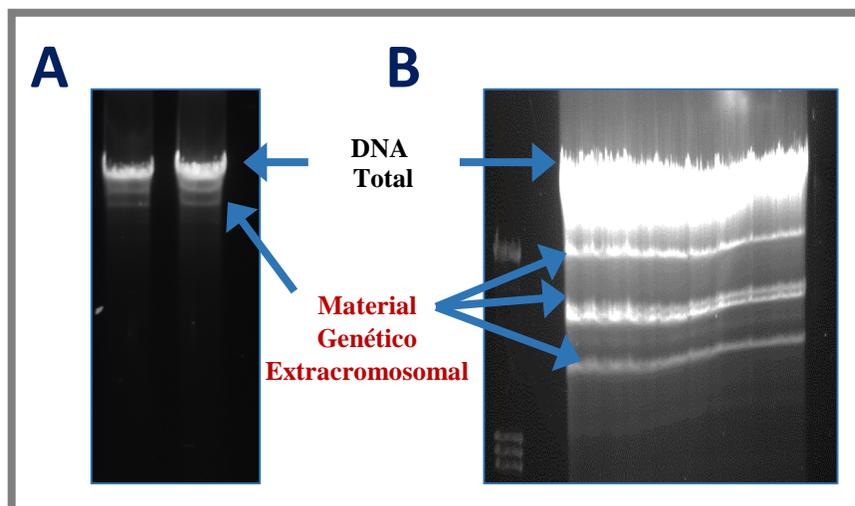


Figura 2. Ácidos nucleicos totales de *Sclerotium cepivorum* Berk.

A) Electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, a 75 Volts durante 30 min. Ambos carriles pertenecen a la misma cepa (MCG2) B) Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.6%, a 45 Volts durante 5 h. Ácidos nucleicos totales de la cepa MCG2, a los costados el marcador de tamaño (λ -PstI).

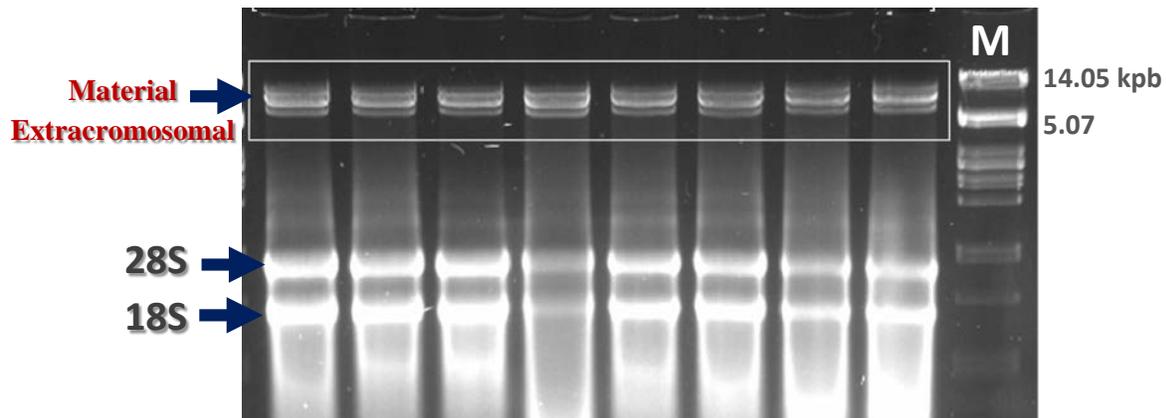


Figura 3. RNA total de la cepa MCG2. Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt como se describe en M&M. M: marcador de tamaño molecular (λ -Pst-I)

Con el fin de que las bandas se separaran más y poderlas purificar de manera individual, el MGE se sometió a electroforesis en un gel de agarosa a menor

concentración (Figura 4), se observan claramente tres bandas de tamaño molecular entre 10Kpb y 13 Kpb.

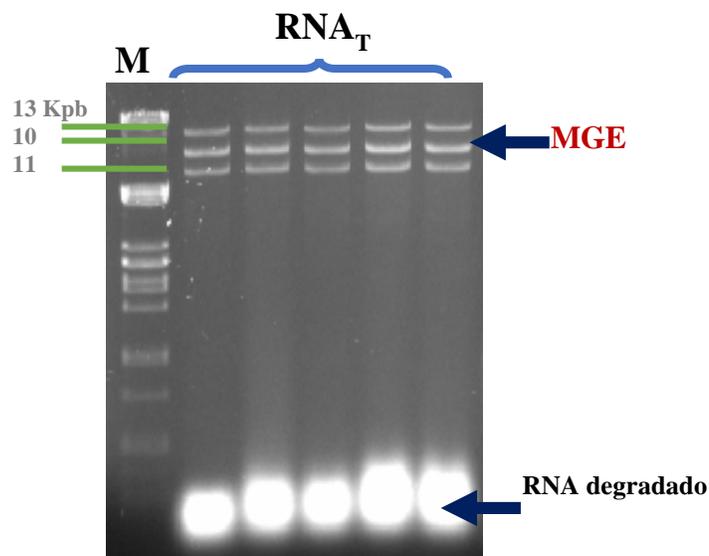


Figura 4. Material Genético Extracromosomal (MGE) del aislado MCG2. El MGE se extrajo con Trizol y separado por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 0.6%, voltaje 80v durante 3 h y teñido con BrEt como se describe en M&M. M: marcador de tamaño molecular (λ -Pst-I)



Como las bandas observadas del MGE son de gran tamaño, se separaron por medio de electroforesis en campos pulsantes para caracterizarlas, para lo cual, se probaron diferentes concentraciones de agarosa, voltaje, pulsos asignados para el cambio en la orientación y tiempo de corrida, se pudieron separar más las tres bandas, asignándoles letras de la A, B y C en función del tamaño observado. En la figura 5 se observan las tres bandas del MGE de la cepa MCG2, en diferentes condiciones de la electroforesis en campos pulsantes. En donde podemos observar que en las condiciones de electroforesis del panel A se separaron mejor las bandas de interés.

Posteriormente se purificaron las bandas y se cuantificaron como se describe en M&M.

Después de cuantificar el MGE obtenido por la separación en el CHEF y la extracción de la agarosa, determinamos que el rendimiento obtenido no resultaba suficiente para los análisis químicos que se requerían. Por lo que las bandas del MGE se separaron y purificaron utilizando electroforesis horizontal en geles de agarosa (Figura 6). Esta estrategia resultó más simple y se obtuvo un mayor rendimiento del MGE.

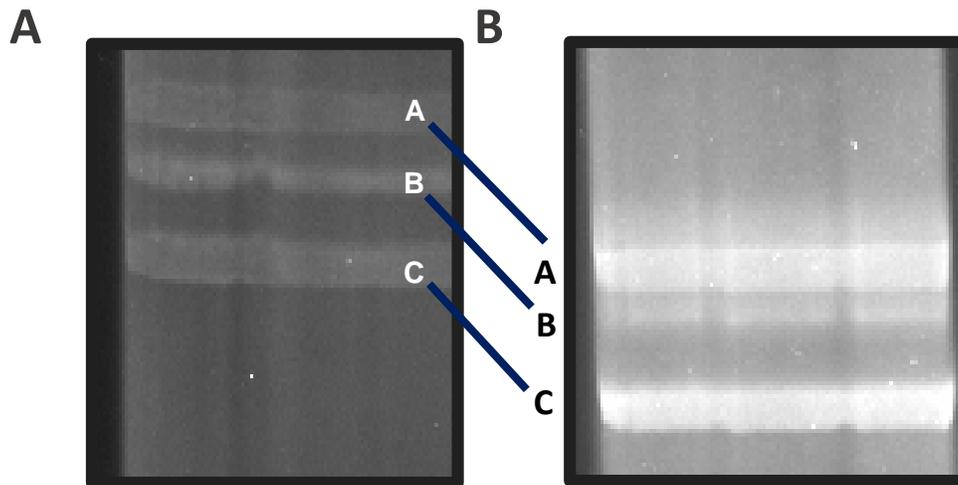


Figura 5. Separación de las bandas del MGE del aislado MCG2 por CHEF.

A: Condiciones de la electroforesis: agarosa 1%, 155 volts, 16.5 h de separación. B: Condiciones de electroforesis: agarosa 1%, 175 volts, 16.5 h de separación. M: marcador de tamaño molecular (λ -Pst-I)

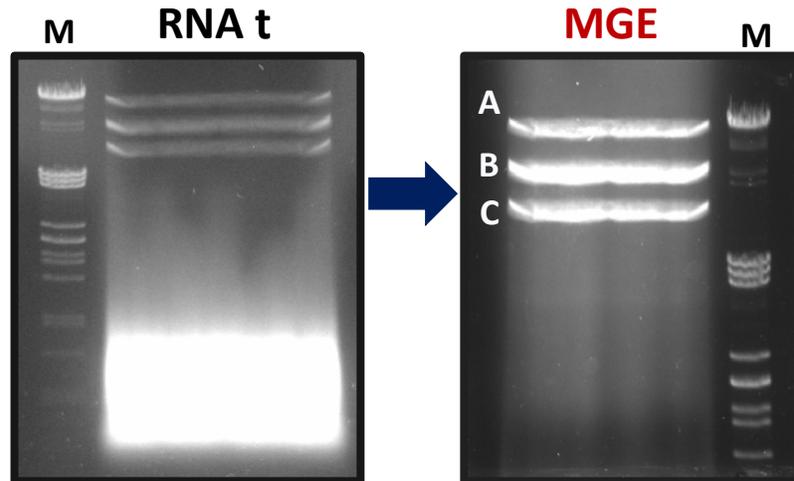


Figura 6. Separación de las bandas de MGE del aislado MCG2 por electroforesis horizontal en geles de agarosa. A, B, C representan las bandas del MGE. M: marcador de tamaño molecular (λ -*Pst*-I). Condiciones: gel de agarosa al 0.6%, 80Volts a diferentes tiempos de separación.

3.1 Caracterización del MGE del aislado MCG2

Ya teniendo aislado el MGE, se procedió a la caracterización de éste. Se aislaron los ácidos nucleicos totales y se trataron con DNasa I, como se describe en M&M, el resultado se presenta en la figura 7A, en donde se puede observar que después del tratamiento con la enzima DNasa I, se elimina la banda correspondiente a DNA genómico (recuadro rojo) y persisten las bandas de alto peso molecular, sugiriendo que se trata de RNA. Posterior a la electroforesis, las bandas se cortaron y purificaron con ayuda del Kit de

Zimoclean™ Gel DNA Recovery, como se describe en M&M.

El material recuperado de las bandas del gel de electroforesis se trató con RNasa A, la cual degrada RNA de cadena sencilla en las condiciones descritas en M&M, los resultados se observan en la figura 7B. Como el MGE no se degrada, se descarta que se tratara de RNA de cadena sencilla. La única posibilidad que queda es que se trate de RNA de doble cadena (dsRNA)

4. Discusión

La presencia de virus en hongos fue identificada desde 1948 en una productora de hongos en Pensilvania (Sinden y

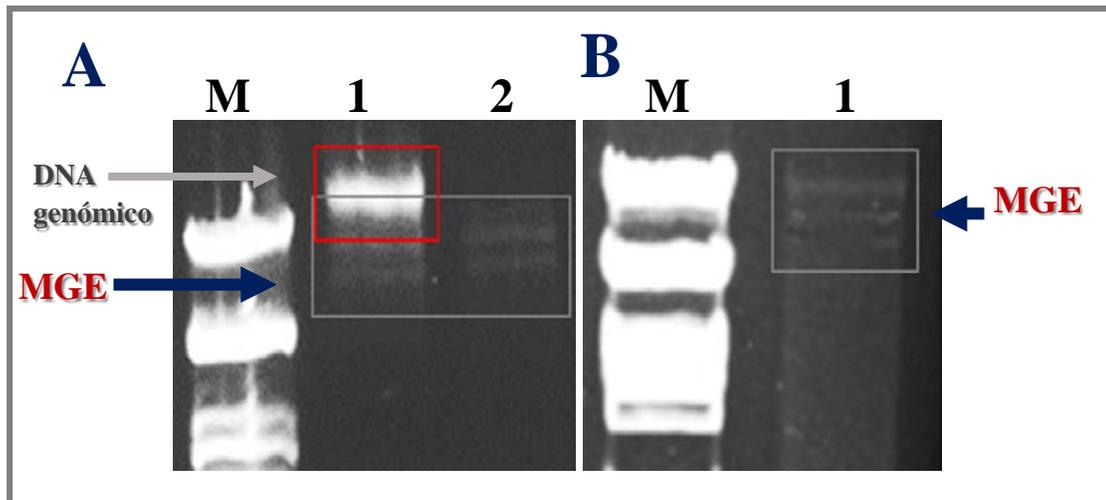


Figura 7. Efecto de la DNasa I y RNasa A sobre el MGE del aislado MCG2. A. Carril 1: Material genético total. Carril 2: después del tratamiento con DNasa I. B. Carril 1: Material después del tratamiento con RNasa I. M: marcador de tamaño molecular (λ -Pst-I). El tratamiento del MGE con la DNasa I y RNasa I se realizó como se describe en M&M.

Hauser, 1950). Desde el primer reporte de la presencia de virus infectando a *Agaricus bisporus* (Holings, 1962), la presencia de micovirus ha crecido enormemente, entre los que se ha reportado la presencia de Virus de RNA de doble cadena, RNA de cadena sencilla y de DNA de cadena sencilla (Buck, 1998). La producción de toxina por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* llamadas cepas Killer, se debe a la presencia de virus de dsRNA, no siendo exclusiva de este hongo, ya que se han detectado en otros hongos como *Hanseniospora uvarum*, *Ustilago maydis* y *Zygosaccharomises bailii* (Park y col., 1996).

La mayoría de las veces los micovirus permanecen como infecciones latentes en las cuales no hay manifestación de ningún síntoma, algunos micovirus producen hipovirulencia, como en el caso de *Cryphonectria parasítica*, por lo que se ha planteado su utilización en control biológico (Nuss, 2005, Craven y col., 1993), el problema es que no se conoce ningún vector de transmisión, se sabe que se transmiten por transferencia horizontal como anastomosis entre el micelio de dos cepas o durante la conidiación.

El micovirus presente en *S. cepivorum* es bastante estable por lo que hemos pensado en su utilización como vector de



transformación para introducir diversos genes en este hongo fitopatógeno.

La gran mayoría de los micovirus al parecer confieren efectos mínimos a su hongo hospedero, por lo que se les podría dar un enfoque complementario como vectores de transformación. Desde este punto de vista los micovirus no necesariamente tendrían que conferir un efecto perjudicial a su hospedero, aunque requerirían de una estructura genómica susceptible a la incorporación de genes no virales. Como ejemplo el virus Flexivirus potato X, ha sido usado con éxito como un vector para la expresión de genes de una gama de diferentes fuentes de plantas, así los micovirus de ssRNA pertenecientes a la familia *Flexiviridae*, BVX, BCVF y el SsDRV son posibles candidatos para ser empleados como vectores. (Smolenska y col., 1998; Hendy y col., 1999; Kopertekh y col., 2004; Wagner y col., 2004).

Los vectores de virus pueden ser desarrollados por la manipulación de genomas víricos para expresar secuencias exógenas (Pearson y col., 2009). Por ello, para la construcción de un vector se requiere entender la regulación de los genes que permiten la expresión viral,

además de que algunos vectores son considerados de gran valor como productos comerciales. (Shivprasad y col., 1999). Hoy en día los fitopatólogos y micólogos tienen un gran interés en los micovirus, debido a que podrían representar a potenciales agentes de control biológico. Además de que, a un nivel aplicado, estos micovirus podrían tener un uso potencial como vectores de expresión de genes antifúngicos de procedencia no viral y ser especialmente empleados como biocontroladores contra fitopatógenos o como herramientas para responder cuestiones básicas sobre la biología de los hongos (Rodríguez y col., 2014). Su interés también radica en que recientemente se han descrito virus de hongos fitopatógenos que muestran secuencias idénticas con virus de plantas. Los cuales incluyen a *Sclerophthora macrospora Virus B (SmVB)* (Yokoi y col., 1999) con *Luteoviridae* y *Sobemoviridae*, *Sclerophthora macrospora Virus A (SmVA)* (Yokoi y col., 2003) con *Nodaviridae* y *Tombusviridae*, *Botrytis cinerea virus F (BCVF)* (Howitt y col., 2001), *Botrytis virus X (BVX)* (Howitt y col., 2006) y *Sclerotinia sclerotiorum* y su debilitación asociada al RNA del virus (SsDRV) con



Flexiviridae, entre otros (Xie y col., 2006). Sin embargo, los micovirus son suficientemente distintos entre sí y de sus parientes más cercanos (virus de plantas), y por ello se les considera como un nuevo género, a pesar de que varios de ellos pertenecen a familias donde predominan los virus de plantas. Por otro lado, está clara relación filogenética eleva las posibilidades de que al menos algunos micovirus pudieran tener su origen como virus de plantas, usando el hongo como vector de transmisión (Sabanadzovic y col., 2009). Sin embargo, los micovirus son distintos porque son capaces de replicarse dentro del hospedero (Rochon y col., 2004).

La asociación entre virus de hongos fitopatógenos y sus hospederos son similares a las asociaciones entre plantas y hongos endofíticos, donde la mayoría de ellos no causan síntomas en sus hospederos (Herrero, 2011), de aquí su posible coevolución.

Analizando los datos de secuenciación de última generación de genomas de aproximadamente 70 genomas de hongos fitopatógenos, se han detectado más de 60 micovirus no descritos previamente

(Marzano y col., 2016), la detección por metagenómica dependerá de que la cepa secuenciada contenga el virus, nuestro grupo analizó más de 40 aislados de *S. cepivorum* de tres estados de la región del bajo y el 57.4% de las muestras contienen MGE no teniendo relación con el origen del aislado (Luna-Martínez, 2001).

Los resultados obtenidos nos indicaron que posiblemente el MGE de *S. cepivorum* aislado MCG2, se trata de un micovirus de RNA de cadena doble (dsRNA) y de naturaleza multipartita o segmentado, ya que se observan al menos tres bandas del MGE. Se ha reportado según los perfiles de dsRNA que, los virus generalmente constan de una banda (para virus monopartitas), dos bandas (bipartita) o más bandas genómicas (multipartita), de longitud completa y varias otras bandas que corresponden a las formas subgenómicas replicativas de los virus de RNA (Condit y Fraenkel-Conrat, 1979; Osman y Buck, 1990). En *Sclerotinia sclerotiorum*, hongo filogenéticamente cercano a *S. cepivorum* se reportaron tres segmentos de dsRNA, dos de tamaño similar a 9.5 kbp y un tercero de 3.6 kbp. (Xie et al., 2011). Además, varias familias de virus presentes en diferentes especies



del género *Fusarium* son la mayoría, dsRNA con genomas segmentados (de uno a cinco segmentos de RNA) y diferentes tamaños en kpb (Li y col., 2019).

5. Conclusiones

Las técnicas de análisis nos permitieron identificar que el MGE identificado de la cepa MCG2 de *S. cepivorum*, consiste principalmente en dsRNA. Mediante extracción de este material con Trizol®, purificación a partir de geles de agarosa en electroforesis de campos pulsantes, y tratamiento con nucleasas fue la mejor estrategia para obtener, purificar y conocer la naturaleza del MGE. En el perfil electroforético de dsRNA se observaron al menos tres bandas de RNA, (entre 5.07 y 14.05 kpb), lo que nos permite sugerir que el virus de dsRNA es tripartita, debido a la presencia de tres bandas de RNA. Se ha reportado en varios hongos fitopatógenos y no fitopatógenos que la presencia de dsRNA es debido virus presentes en hongos. Se sabe que la mayoría de estos micovirus son dsRNA, sin embargo, también han incrementado los reportes de micovirus con genomas de RNA de cadena sencilla (ssRNA), por lo que para nosotros era importante identificar qué tipo de

molécula es el MGE presente en *S. cepivorum*. Nuestro estudio abre las posibilidades para identificar la presencia de otros micovirus en los aislados de *S. cepivorum* en México que puedan causar o no hipovirulencia, lo que nos podría proporcionar información útil para el desarrollo de estos virus para el control biológico de hongos fitopatógenos o para el desarrollo de herramientas biotecnológicas.

6. Referencias bibliográficas

- Ausubel F.M. & col. (2003).** *Current Protocols in Molecular Biology* (vol. 1, John Wiley & Sons Inc Ed). ISBN047150338X
- Buck K. W. (1998).** Molecular variability of viruses of fungi. Bridge P. D., Couteaudier Y., Clackson J. M. (Eds.) *Molecular Variability of fungal Pathogens. CAB International*, 53-72. SBN:9780851992662
- Chu Y.M., Lim W.S., Yea S.J., Cho J.D., Lee Y.W. & Kim K.H. (2004).** Complexity of dsRNA Mycovirus Isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes*, 28(1), 135-143. doi: 10.1023/B:VIRU.0000012270.67302.35
- Coley-Smith J.R., Mitchell C.M. & Sansford C.E. (1990).** Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology*, 39, 58-69. doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02476.x.
- Condit C. & Fraenkel-Conrat H. (1979).** Isolation of replicative forms of 3' terminal subgenomic RNAs of tobacco necrosis



- virus. *Virology* 97, 122-30. DOI:10.1016/0042-6822(79)90378-7
- Craven M., Pawlyk D., Choi G.H., & Nuss D.L. (1993).** Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *Journal of Virology*, 67, 6513–6521. doi: 10.1128/JVI.67.11.6513-6521.1993
- Crowe F.J. & Hall D.H. (1979).** Vertical distribution of Sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and host root systems relative to white rot of onion and garlic. *Phytopathology*, 70, 70-73.
- Crowe F.J., Darnell T., Thornton M., Davis M., Mcgrath D., Koepsell P., Redondo E. & Laborde J. (1993).** White rot control studies show promise of better future. *Onion World*, 9, 22-25.
- Day P.R., Dodds J.A., Elliston J.E., Jaynes R.A. & Anagnostakis S.L. (1977).** Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 67, 1393-1396. DOI: 10.1094/Phyto-67-1393
- Dey P.M. & Harborne J.B. (1997).** Plant Biochemistry. Academic Press Ed.
- Gómez-Miranda B. & Leal J.A. (1981).** Extracellular and cell wall polysaccharides of *Aspergillus alliaceus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 76(2), 249-253. [oi.org/10.1016/S0007-1536\(82\)80016-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(82)80016-8)
- Hansen D.R., Van-Alfen N.K., Gillies K. & Powell W.A. (1985).** Naked dsRNA associated with Hypovirulence of *Endothia parasitica* Is Packaged in Fungal Vesicles. *Journal of General Virology*, 66, 2605-2614.
- Hendy, S., Chen, Z.C., Barker, H., Santa Cruz, S., Chapman, S., Torrance, L., Cockburn, W. & Whitelam, G.C. (1999).** Rapid production of single-chain Fv fragments in plants using a potato virus X episomal vector. *Journal of Immunological Methods*, 231, 137-146. doi: 10.1016/s0022-1759(99)00150-7.
- Herrero-Asensio, N. (2011).** Micovirus asociados a los hongos endofíticos y entomopatógenos *Tolypocladium cylindrosporum* y *Beauveria bassiana*. Universidad de Salamanca. CSIC- Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA).
- Howitt, R.L.J., Beever, R.E., Pearson, M.N. & Foster, R.L.S. (2001).** Genome characterization of *Botrytis virus F*, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant ‘potex-like’ viruses. *The Journal of General virology*, 82, 67-78. DOI: [10.1099/0022-1317-82-1-67](https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-1-67)
- Howitt, R.L.J., Beever, R.E., Pearson, M.N. & Forster, R.L.S. (2006).** Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, *Botrytis virus X*, reveals high amino acid identity to genes from plant ‘potex-like’ viruses. *Archives of virology*, 151(3), 563–579. doi: 10.1007/s00705-005-0621-y
- Kopertekh, L., Juettner, G. & Schiemann, J. (2004).** Site-specific recombination induced in transgenic plants by PVX virus vector expressing bacteriophage P1 recombinase. *Plant Science*, 166, 485-492. [10.1016/j.plantsci.2003.10.018](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.018)
- Kuttler F. & Sabine M. (2007).** Formation of non-random extra chromosomal elements during development, differentiation and onco genesis. *Seminars in Cancer Biology*, 17(1), 56-64. doi: 10.1016/j.semcancer.2006.10.007
4. **Li P, Bhattacharjee P, Wang S, Zhang L, Ahmed I, & Guo L. (2019).** Mycoviruses in *Fusarium* Species: An Update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 18, 9:257. doi: 10.3389/fcimb.2019.00257.



- Luna-Martínez F. & Ponce Noyola P (2001).** Caracterización molecular de aislados de *Sclerotium cepivorum* mediante análisis de polimorfismos de los fragmentos amplificados al azar. *ACTA UNIVERSITARIA* Vol. 11 No. 2 Agosto 2001
- Marzano S.L, Nelson B.D, Ajayi-Oyetunde O, Bradley C.A, Hughes T.J, Hartman G.L, Eastburn D.M, & Domier L.L. (2016).** Identification of diverse mycoviruses through metatranscriptomics characterization of the viromes of five major fungal plant pathogens. *Journal of virology*, 90(15), 6846–6863. DOI: [10.1128/JVI.00357-16](https://doi.org/10.1128/JVI.00357-16)
- McCabe P.M., Pfeiffer P. & Van Alfen N. K. (1999).** The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends in microbiology*, 7(9), 377-381. doi: 10.1016/s0966-842x(99)01568-1
- Nuss D.L. (1992).** Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiology Reviews*, 56(4), 561. doi: [10.1128/mr.56.4.561-576.1992](https://doi.org/10.1128/mr.56.4.561-576.1992)
- Nuss D.L. (2005).** Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nature reviews Microbiology*, 3, 632–642. doi: 10.1038/nrmicro1206
- Park C.M., Banerjee N., Koltin Y., & Bruenn J.A. (1996).** The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin. *Molecular Microbiology*, 20, 957-963. doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02537.x
- Pearson, M.N., Beever, R.E., Bione, B. & Arthur, K. (2009).** Mycovirus of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 10, 115-128. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x
- Raeder U. & Broda P. (1985).** Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1(1), 17-20. DOI:[10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x)
- Reyes-Pérez N., Marbán-Mendoza N., Delgadillo-Sánchez F. & De la Torre-Almaráz R. (2003).** Variabilidad en aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk y su relación con ARN de cadena doble. *Agrociencia*, 17(5), 495-502.
- Rochon D., Kakani, K., Robbins, M. & Reade, R. (2004).** Molecular aspects of plant virus transmission by oospidium and plasmodiophorid vectors. *Annual review of phytopathology*, 42, 211-241. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140317
- Rodríguez García C., Medina, V., Alonso, A. & Ayllón, M.A. (2014).** Mycoviruses of *Botrytis cinerea* isolates from different hosts. *Annals of Applied Biology*, 164, 46-61. doi.org/10.1111/aab.12073
- Rush M. & Misra R. (1985)** Extrachromosomal DNA in eukaryotes. *Plasmid* 14(3), 177-191.
- Sabanadzovic S., Valverde, R.A., Brown, J.K., Martin, R.R. & Tzanetakis, I.E. (2009).** Southern tomato virus: The link between the families *Totiviridae* and *Partitiviridae*. *Virus Research*, 140, 130-137. DOI: [10.1016/j.virusres.2008.11.018](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.11.018)
- Sammour R. H., Mahmoud 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. *Trends in Microbiology*, 7, 101-111. DOI:[10.1111/j.0032-0862.2004.01013.x](https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01013.x)
- Shivprasad S., Pogue, G.P., Lewandowski, D.J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L.K. & Dawson, W.O. (1999).** Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in Tobacco mosaic virus-based



- vectors. *Virology*, 225, 312-323. doi: 10.1006/viro.1998.9579
- Sinden J.W. & Hauser E. (1950).** Report on two new mushroom diseases *Mushroom Science*, 1, 96-100.
- Smolenska L., Roberts, I.M., Learmonth, D., Porter, A.J., Harris, W.J., Wilson, T.A. & Santa-Cruz, S. (1998.)** Production of a functional single chain antibody attached to the surface of a plant virus. *FEBS Letters*, 441, 379-382.
- Wagner B., Fuchs, H., Adhami, F., Ma, Y., Scheiner, O. & Breiteneder, H. (2004).** Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. *Methods*, 32, 227-234. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.08.005
- Xie J., Wei D., Jiang D., Fu Y., Li G., Ghabrial S & col. (2006).** Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of General Virology*, 87(1), 241-249. doi: 10.1099/vir.0.81522-0
- 2. Xie, J., Xiao, X., Fu, Y., Liu, H., Cheng, J., Ghabrial, S. A., et al. (2011).** A novel mycovirus closely related to hypoviruses that infects the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology*, 418, 49-56. doi: 10.1016/j.virol.2011.07.008
- Yokoi, T., Yakemoto, Y., Suzuki, M., Yamashita, S. & Hibi, T. (1999).** The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora Virus B*. *Virology*, 264, 344-349. doi: 10.1006/viro.1999.0018
- Yokoi, T., Yamashita, S., & Hibi, T. (2003).** The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora virus A*. *Virology*, 311, 394-399. doi: 10.1016/s0042-6822(03)00183-1