

Condiciones Óptimas para Inducir Germinación Errumpente y No Errumpente de *Sclerotium cepivorum* y Secuencias Asociadas a la Síntesis de Proteínas Durante la Germinación No Errumpente

Optimal Conditions to Induce Eruptive and No Eruptive Germination of *Sclerotium cepivorum* and Sequences Associated to Protein Synthesis during No Eruptive Germination

Yolanda Rodríguez Pagaza, Laboratorio de Fisiología y Fitopatología Molecular. Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, (LFFM-EF-IF-CP), km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. de Méx., CP 56230, México; **Lorenzo Guevara Olvera**, Laboratorio de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y Av. García Cubas S/N, Celaya, Gto., CP 38010, México; **Reyna Isabel Rojas Martínez**, **Emma Zavaleta Mejía**, LFFM-EF-IF-CP; **June K. Simpson**, Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León. Irapuato, Gto., CP 3682, México; **Mario Rocha Sosa**, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor., CP 62250, México. Correspondencia: ypagaza@colpos.mx

(Recibido: Noviembre 03, 2009 Aceptado: Abril 30, 2010)

Rodríguez Pagaza, Y., Guevara Olvera, L., Rojas Martínez, R. I., Zavaleta Mejía, E., Simpson, J. K. y Rocha Sosa, M. 2011. Condiciones Óptimas para Inducir Germinación Errumpente y No Errumpente de *Sclerotium cepivorum* y Secuencias Asociadas a la Síntesis de Proteínas Durante la Germinación No Errumpente. Revista Mexicana de Fitopatología 29:69-72.

Resumen. Se generó una biblioteca sustractiva con las secuencias asociadas a la síntesis de proteínas durante la germinación no errumpente de *Sclerotium cepivorum*. Para generar la biblioteca sustractiva se determinaron las condiciones óptimas para obtener germinación errumpente y no errumpente de esclerocios de *S. cepivorum*. A 22° C, el 96.7% de los esclerocios germinaron de forma no errumpente en ausencia de disulfuro de alilo (DAS), y el 91.67% de los esclerocios germinó de forma errumpente en presencia de DAS al 2%. En la biblioteca sustractiva se obtuvieron 23 fragmentos de genes asociados a la germinación no errumpente de *S. cepivorum*. Estos fragmentos tuvieron similitudes significativas con 15 proteínas diferentes, las cuales participan en los procesos de respiración, transcripción, traducción, transducción de señales y síntesis

Rodríguez Pagaza, Y., Guevara Olvera, L., Rojas Martínez, R. I., Zavaleta Mejía, E., Simpson, J. K. and Rocha Sosa, M. 2011. Optimal Conditions to Induce Eruptive and No Eruptive Germination of *Sclerotium cepivorum* and Sequences Associated to Protein Synthesis during No Eruptive Germination. Revista Mexicana de Fitopatología 29:69-72.

Abstract. A subtractive library of sequences associated to proteins synthesis in hyphal germination of *Sclerotium cepivorum* was generated. In order to generate the subtractive library, optimal conditions to have eruptive and hyphal germination of *S. cepivorum* sclerotia were determined. At 22° C, 96.7% of sclerotia germinated hyphally without allyl disulfide (DAS) and 91.67% of sclerotia germinated eruptively in presence of DAS 2%. Twenty three fragments of genes associated to hyphal germination of *S. cepivorum* were obtained in the subtractive library. Those fragments had significant similarity to 15 different proteins that participate in respiration, transcription, translation, signal transduction and amino acid and protein synthesis process. The results suggest that hyphal germination is faster than eruptive germination because have an increment in the metabolic

de aminoácidos y proteínas. Los resultados sugieren que la germinación no errumpente es más rápida que la germinación errumpente debido a un incremento en los procesos metabólicos de los esclerocios de *S. cepivorum* germinados de forma no errumpente.

Palabras clave adicionales: Hibridación sustractiva, disulfuro de alilo, GenBank.

Estudios realizados *in vitro* han mostrado que los esclerocios de *S. cepivorum* presentan dos tipos de germinación: errumpente y no errumpente. El determinar los posibles genes que se expresan durante uno y otro tipo de germinación ayudará a dilucidar los procesos bioquímicos y fisiológicos entre los dos tipos de germinación. Por esta razón, los objetivos del presente trabajo fueron determinar las condiciones óptimas para inducir la germinación errumpente y no errumpente de *S. cepivorum in vitro* y determinar los posibles genes que expresan de forma diferencial en la germinación no errumpente de *S. cepivorum* mediante la técnica de Hibridación Sustractiva bajo condiciones de Supresión HSS (Diatchenko y Siebert, 1998). Se probaron 5 tratamientos para determinar las condiciones óptimas para la germinación errumpente y no errumpente: esclerocios germinados en presencia de agua (DAS 0%) a 17° y 22° C, esclerocios germinados en presencia de 1% de disulfuro de alilo (DAS 1%) a 17° y 22° C; y esclerocios germinados en 2% de disulfuro de alilo (DAS 2%) a 22° C. Los esclerocios se colocaron individualmente en una gota de medio PDA dentro de cajas Petri. Se valoraron aproximadamente 100 esclerocios por tratamiento de forma individual cada 24 h por 16 días para determinar la forma de germinación.

Los tratamientos que se seleccionaron como óptimos fueron esclerocios germinados en DAS 0 % a 22° C (96.7 % de germinación no errumpente) y DAS 2% a 22° C (91.67% de germinación errumpente) (Figura 1). La HSS se realizó usando el Kit PCR-Select™ cDNA subtraction (Clontech) y se corroboró que las clonas fueran diferenciales mediante una hibridación tipo Southern. Se obtuvieron 23 clonas diferenciales que se purificaron, se secuenciaron y se compararon con proteínas en el GenBank, obteniéndose 2 clonas redundantes y 6 que no tuvieron similitudes significativas (Cuadro 1). Para obtener información sobre los procesos metabólicos en los que los fragmentos podrían estar involucrados se usó la base en línea de UniProt Consortium (2008). Se registraron 16 secuencias en el GenBank (Cuadro 1). Las secuencias YRP 63 y YRP 18 se registraron por separado debido a que difieren en sus nucleótidos.

Los 23 fragmentos de genes obtenidos tuvieron similitudes significativas con 15 proteínas diferentes las cuales participan en los procesos de transcripción, traducción, transducción de señales y metabolismo primario. Los resultados sugieren que existe un incremento en los procesos metabólicos de los esclerocios de *S. cepivorum* que permiten que la germinación no errumpente se lleve a cabo más rápidamente que la germinación errumpente. Lo anterior concuerda con la diferencia observada en los tiempos en que ocurrió uno y otro tipo de germinación, ya que los esclerocios

processes in sclerotia of *S. cepivorum* germinated hyphally.

Additional keywords: Subtractive hybridization, allyl disulfide, GenBank.

It has been shown by studies performed *in vitro* that *S. cepivorum* sclerotia reveal two germination types: eruptive and hyphal. The determination of what genes are expressed during either germination rate will help to elucidate the biochemical and physiological processes between the two types of germination. Consequently, the present study is aimed to determine the optimal conditions to induce the *S. cepivorum in vitro* eruptive and hyphal germination and to identify possible genes differentially expressed during *S. cepivorum* hyphal germination throughout the Suppression Subtractive Hybridization (SSH) technique (Diatchenko and Siebert, 1998). A total of 5 treatments were tested in order to determine the optimal conditions for eruptive and hyphal germination: sclerotia germinated in the presence of water (DAS 0%) at 17° and 22° C, sclerotia germinated in the presence of 1% allyl disulfide (DAS 1%) at 17° and 22° C; and sclerotia germinated in 2% of allyl disulfide (DAS 2%) at 22° C. The sclerotia were placed individually in a drop of PDA medium in Petri dishes. Approximately 100 sclerotia per treatment were assessed individually every 24 h for 16 days to determine the form of germination.

The treatments selected as optimal were the sclerotia germinated in DAS 0% at 22° C (96.7 % of hyphal germination) and DAS 2% at 22° C (91.67% of eruptive germination) (Fig. 1). The SSH was conducted using the PCR-Select™ cDNA subtraction (Clontech) kit and it confirmed that the clones were differential by means of Southern hybridization. A total of 23 differential clones were obtained, which were purified, sequenced and compared with proteins at the GenBank; 2 redundant clones and 6 with no significant similarities were

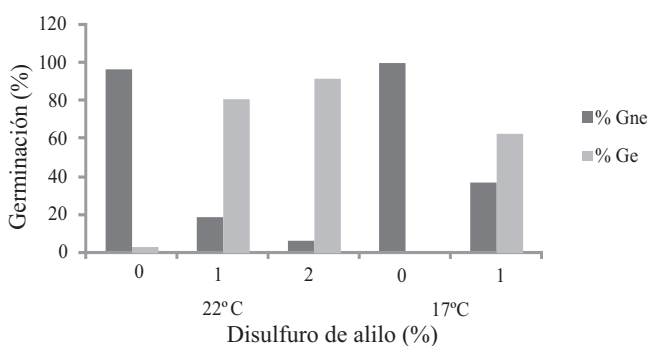


Figura. 1. Porcentaje de germinación errumpente y no errumpente de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* expuestos a diferentes concentraciones de disulfuro de alilo, 16 días después de la siembra. Gne, germinación no errumpente; Ge, germinación.

Figure 1. Eruptive and hyphal germination percentage of *Sclerotium cepivorum* exposed to different allyl disulfide concentrations 16 days after sowing. Gne, hyphal germination; Ge, eruptive.

Cuadro 1. Comparación de las secuencias obtenidas en la biblioteca sustractiva con proteínas en el GenBank, sus valores de expectancia y números de acceso.

Table 1. Comparison of the sequences obtained in the subtractive library with proteins in the GenBank, expect values and access numbers.

Número de clona	Proteína	Valor E	No. de acceso en el GenBank
YPR 190	Proteína ribosomal 40S S9 Prrecursor mitocondria <i>Yarrowia lipolytica</i>	1e-59	Eh034415
YPR 185	Proteína hipoitética An01g03510 <i>Aspergillus niger</i>	1e-53	Eh057840
YPR 282	Proteína asociada a senescencia <i>Cupressus sempervirens</i>	9e-41	EH034416
YPR 204	Proteína ribosomal 60S L34 <i>Botryotinia fuckeliana</i>	2e-35	EH057841
YPR 39	Proteína de mitocondria <i>Aspergillus tubigensis</i>	1e-17	Eh057839
YPR 18 YPR 63 YPR 89	Proteína hipotética CHLREDRAFT_155068 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4e-12	EH057832 (YPR 18) EH057833 (YPR 63)
YPR 147	Proteína hipotética YALI0C07128 <i>Yarrowia lipolytica</i>	2e-07	Eh057842
YPR 200	Proteína hipotética NFIA_029570 <i>Neosartorya fischeri</i>	1e-06	EH057843
YPR 238	Proteína no conocida <i>Vitis vinifera</i>	7e-06	EH057844
YPR 275	Proteína hipotética An02g01615 <i>Aspergillus niger</i>	2e-04	Eh057834
YPR 254	Proteína hipotética CIMG_05734 <i>Ciccidiodes immitis</i>	0.67	Eh057845
YPR 182	Proteína inducida por Dexametasona <i>Salmo salar</i>	1.1	EH057837
YPR 224	Proteína hipotética <i>Pramecium tetraurelia</i>	3.3	EH057836
YPR 211	Proteína con un dominio RING finger <i>Penicillium marneffe</i>	3.4	Eh057835
YPR 201	Proteína hipotética THERM_01050640 <i>Tetrahymena thermophila</i>	9.8	Eh057838
YPR 49 YPR 64 YPR 93 YPR 213 YPR 216 YPR 284	Similitudes no significativas		

con DAS 0% germinaron más rápido que los expuestos a DAS 1 y 2%, observándose cuatro esclerocios ya germinados el primer día a 22° C y uno el segundo día a 17° C. En las cajas Petri expuestas a DAS se observaron los primeros esclerocios germinados hasta los 5 (22° C, DAS 1%), 3 (22° C, DAS 2%) y 6 días (17° C, DAS 1%) después de la siembra (dds). La mayoría de los esclerocios expuestos a DAS 0% germinaron entre los 3 y 7 dds en ambas temperaturas (81 y 86 esclerocios a 22° y 17° C, respectivamente), la mayoría de los expuestos a DAS 1% y 2% lo hicieron entre los 5 y 11 dds, y los expuestos a DAS 1 y 2% a 17° y 22° C, respectivamente, lo hicieron entre los 8 y 13 dds. Las condiciones óptimas para obtener el mayor porcentaje de esclerocios germinados de forma errupente y no errupente fue con DAS 2% y 0% a 22° C respectivamente. Los resultados obtenidos de la HSS sugieren que existe un incremento en los procesos metabólicos de los esclerocios de *S. cepivorum* que permiten que la germinación no errupente se lleve a cabo más rápidamente que la germinación errupente.

LITERATURA CITADA

- Diatchenko, L., A. Chenchik and P. Siebert. 1998. Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A+) or total RNA. Pp. 213-239. In: Siebert, P. and Larrick, J. (eds.). RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis. BioTechniques Books, MA. USA. 350 p.
- UniProt Consortium. 2008. The Universal Protein Resource (UniProt). Nucleic Acids Research 36:D190-D195 <http://www.uniprot.org>. (consulta, mayo de 2008).

obtained (Table 1). The on line UniProt Consortium (2008) data base was used for information on metabolic processes in which the fragments could be involved. A total of 16 sequences were registered at the Gen Bank (Table 1). The YRP63 and YRP18 sequences were registered separately because they differ in nucleotides.

Significant similarities with 15 different proteins which are involved in the processes of transcription, translation, signal transduction and primary metabolism were revealed by the 23 gene fragments obtained. It is suggested by the results that there is an increase of *S. cepivorum* sclerotia metabolic processes that allow the hyphal germination to be performed faster than the eruptive germination. This is consistent with the difference observed among the times where one or the other germination type occurred, since the sclerotia with DAS 0% germinated faster than those exposed to DAS at 1 and 2%, with four sclerotia observed to have germinated on the first day at 22° C and one on the second day at 17° C. Regarding the Petri dishes exposed to DAS, germination was observed until the 5th (22° C, DAS 1%), 3rd (22° C, DAS 2%) and 6th day after sowing (17° C, DAS 1%). Most of the sclerotia exposed to DAS 0% germinated between the 3rd y 7th days after sowing in both temperatures (81 and 86 sclerotia at 22° and 17° C, respectively). Most of those exposed to DAS at 1% and 2% made it between the 5th and 11th day after sowing. Those exposed to DAS 1 and 2% at 17° and 22° C, respectively, made it between the 8th and 13th day after sowing.

The optimal conditions to obtain the highest percentage of sclerotia eruptive and hyphal germinated were by DAS 2% and 0% at 22° C, respectively. It is suggested by SSH results that there is an increase in the metabolic processes of *S. cepivorum* sclerotia metabolic processes that allow the hyphal germination to be performed faster than the eruptive germination.