

IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACIÓN DE *Sclerotium cepivorum*

Chagolla Badillo Ingrid Aimée¹, García Estrada David², Flores Martínez Alberto³

¹ [Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | [ia.chagollabadillo@ugto.mx]

² [Depto. Biología, DCNE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [albert_dge@hotmail.com]

³ [Depto. Biología, DCNE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [floralb@ugto.mx]

Resumen

La enfermedad denominada “pudrición blanca del ajo” causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk es difícil de controlar, debido a que el hongo forma esclerocios, que son estructuras de propagación muy resistentes. El conocimiento del proceso de diferenciación nos permitirá diseñar estrategias para el control de la enfermedad. El uso de herramientas bioinformáticas permite predecir la presencia de genes implicados en la conidiación y/o formación del esclerocio en *S. cepivorum*. Se han encontrado los ortólogos de los genes: Bcltf1, Bcltf2, Bchox8, Bcvel1, Bcvel2, Bclae1, Bcwcl1, Bcwcl2, Bcatf1, Bcreg1, Bcpks13, Ssltf2, VosA, VeA, FphA, LreA.; reportados en *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *A. flavus* y *A. nidulans*. Utilizando el algoritmo *BLAST* se recuperaron las secuencias en el genoma de *S. cepivorum* y posteriormente se predijeron los elementos regulatorios y motivos o dominios de cada uno de los ortólogos identificados. Por último, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes encontrados. Concluyendo así, que la bioinformática genera un escenario más certero y eficiente; ahorrando tiempo/recursos para la experimentación.

Abstract

The disease called "white garlic rot" caused by the fungus *Sclerotium cepivorum* Berk is difficult to control, because the fungus forms sclerotia, which are very resistant propagation structures. The knowledge of the process of differentiation will allow us to design strategies for the control of the disease. The use of bioinformatic tools allows to predict the presence of genes involved in the conidiation and / or formation of the sclerotium in *S. cepivorum*. The orthologs of the genes: Bcltf1, Bcltf2, Bchox8, Bcvel1, Bcvel2, Bclae1, Bcwcl1, Bcwcl2, Bcatf1, Bcreg1, Bcpks13, Ssltf2, VosA, VeA, FphA, LreA, LreB; reported in *B. cinerea* and *S. sclerotiorum*, *A. flavus* and *A. nidulans* have been found. Using the BLAST algorithm, the sequences in the genome of *S. cepivorum* were recovered and subsequently the regulatory elements and motifs or domains of each one of the identified orthologs were predicted. Finally, oligonucleotides were designed to amplify the genes found. Concluding thus, that bioinformatics generates a more accurate and efficient scenario; saving time / resources for experimentation.

Palabras Clave

Bioinformática; Genes; Ortólogos; Conidiación; Esclerocio.

INTRODUCCIÓN

S. cepivorum: una amenaza para el cultivo de ajo en el estado de Guanajuato.

México es uno de los principales productores de ajo en el mundo, y ocupa el segundo lugar en el continente americano como productor de esta especie. Guanajuato ocupa el primer lugar a nivel nacional como productor y exportador de esta hortaliza, ya que concurre con 40% de la superficie que se siembra en el país, con 50% de los volúmenes producidos y con 70% de las cuotas de exportación. En el Bajío se siembran anualmente alrededor de 3,000 hectáreas de ajo, razón por la cual está considerada como la principal zona productora del país. [1] Uno de los principales impedimentos y problemáticas para que el cultivo y por tanto la comercialización de la hortaliza sea exitosa; es la enfermedad denominada “podredumbre blanca” causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk. La patología es específica del género *Allium* (ajo, cebolla, chalote, etc.) y esta se caracteriza por mostrar un micelio blanco alrededor y encima del bulbo, ocasionalmente sobre raíces y cuello de las plantas, donde después de cierto tiempo, aparecen pequeñas esferas, negras y rugosas, de alrededor de 0.3 a 0.55 mm de diámetro [2]. Estas esferas son las estructuras de resistencia y diseminación del hongo llamadas esclerocios que tienen como función garantizar la sobrevivencia, reportándose hasta 20 años aún en ausencia de cultivos del género *Allium*. La germinación de los esclerocios es miceliogénica y el proceso se activa porque reconocen los exudados de tipo alquil y alquil-L-cisteína sulfóxidos que son metabolizados por la microbiota del suelo hacia una mezcla de tioles y sulfuros volátiles [3] como sulfuros de n-propil y alil cisteína dichos compuestos son reconocidos a una distancia de 10 cm de la raíz y 30 cm de profundidad [4]. Dada la capacidad de los esclerocios de permanecer viables por largos periodos de tiempo y la importancia económica que los cultivos de ajo (*Allium sativum* L.) representan para nuestro estado; Las estrategias para su control son de prioridad y la investigación no ha generado una respuesta del todo satisfactoria.

Bioinformática una herramienta para las futuras investigaciones.

La bioinformática, según una de sus definiciones más sencillas, es la aplicación de tecnologías computacionales y la estadística a la gestión y análisis de datos para resolver un problema biológico. [5] Se cuenta con servicios de obtención de información en línea (consultas a bases de datos de genes genomas, proteínas). Herramientas de análisis, búsqueda de similitudes entre secuencias (FASTA o BLAST). Alineamientos múltiples de secuencias (ClustalW, T-Coffee). Métodos predictivos (identificación de motivos, estructura de genes, regiones regulatorias etc.) Análisis estructural de proteínas (alineamiento estructural de proteínas, modelaje de proteínas). Diseño de oligonucleótidos para amplificación de genes. Servicios de acceso a literatura especializada y ontologías. [5]

En el presente proyecto se pretende identificar en el genoma de *S. cepivorum*, los genes involucrados en la diferenciación, sobre todo en la formación del esclerocio para su posterior validación y estudio experimental y diseñar estrategias que permitan el control del hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Se recuperaron las secuencias de los genes de interés: *Bcltf1*, *Bcltf2*, *Bcvel1*, *Bcvel2*, *Bclae1*, *Bcwcl1*, *Bcwcl2*, *Bcatf1*, *Bcreg1*, *Bcpks13*, *Ssltf2*, *VosA*, *VeA*, *FphA*, *LreA*, *LreB*. Utilizando la herramienta ENTREZ en la base de datos del Gene Bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

- 2.- Una vez recuperadas las secuencias se tradujeron a proteínas por medio de la herramienta Traslata (<https://web.expasy.org/translate>)
- 3.- Posteriormente se buscó en el genoma y transcriptoma de *S. cepivorum* mediante la herramienta BLAST local, con algoritmos diseñados en el laboratorio.
- 4.- Identificando los genes presentes en el genoma de *S. cepivorum*, se procedió a recuperar la secuencia y obtener la estructura de los mismos, haciendo uso de la herramienta FGENESH (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>)
- 5.- Después, se tomaron 2000 pb río arriba del codón de inicio para realizar el análisis de la región regulatoria con una serie de comandos (scripts) diseñados en el laboratorio. Prediciendo los elementos regulatorios en la secuencia de la región promotora. Para cerciorarse de la veracidad de esta predicción, se alineó la secuencia en el portal de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/align>) y la herramienta Patch1 (<http://gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/patch/bin/patch.cgi>) para identificar los factores de transcripción buscando en particular los implicados en la conidiación.
- 6.- Por último con la herramienta Primer 3 plus, se diseñaron los oligonucleotidos para amplificar por PCR las secuencias de los genes encontrados (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La esporulación asexual (conidiación) en los ascomycetos implica la formación de conidios, formados en estructuras especializadas llamadas conidióforos. La conidiación en hongos filamentosos implica muchos temas comunes, incluyendo regulación espacial y temporal de la expresión génica, especializada diferenciación celular, comunicaciones intracelulares e intercelulares, y respuesta a factores ambientales. El comienzo, la progresión y la finalización de la conidiación están reguladas por múltiples elementos genéticos positivos y negativos que dirigen expresión de genes requeridos para el crecimiento vegetativo apropiado y el ensamblaje del conidióforo y la maduración de las esporas [6]. Además de la programación genética, varias señales ambientales, como la luz, los iones, los nutrientes y el oxígeno afectan el crecimiento y desarrollo de los hongos [6]. La luz es un importante factor ambiental que controla el equilibrio entre el desarrollo sexual y asexual y el metabolismo secundario [7]. Algunos genes requeridos para la conidiogénesis son: en *A. nidulans* (*BrlA*), en *N. crassa* (*FL*), en *S. cerevisiae* (*AZF1p*), en *M. oryzae* (*COS1*), en *S. sclerotiorum* (*SsLTF2*) y en *B. cinerea* (*BcLTF2*). Estos últimos hongos están emparentados con *S. cepivorum*. *S. cepivorum* en condiciones normales no produce conidias. Dada la carencia de información sobre los genes que regulan dicho proceso en *S. cepivorum*, nos dimos a la tarea de plantear una estrategia bioinformática que nos ahorre tiempo y recursos para guiar a la investigación hacia un plano más certero. Se buscaron 17 genes reportados bibliográficamente cuyas funciones son importantes en la conidiación y formación del esclerocio (Tabla 1) de los cuales 16 con una identidad y longitud de alineamiento mayor al 50% y 100 pb fueron localizados el genoma de *S. cepivorum* (Tabla 2). Se buscó la estructura del gen tomando como base la estructura de los genes en *S. sclerotiorum* y *B. cinerea*, la estructura de los genes se muestra en la Figura 1. Después recaudamos los elementos regulatorios de cada uno de los genes, encontrando *AbaA* como el más predominante (Tabla 2). Por último, se diseñaron los oligonucleotidos para su posterior validación y estudio experimental y diseñar estrategias que permitan el control del hongo (Tabla 3).

CONCLUSIONES

Se identificaron 16 genes en el genoma de *S. cepivorum*, involucrados en la diferenciación y/o formación de la conidición o esclerocio. Se diseñaron oligonucleótidos que serán utilizados en estrategias experimentales para su posterior validación. Concluyendo así que la bioinformática genera un escenario más certero y eficiente; ahorrando tiempo/recursos para la experimentación.

AGRADECIMIENTOS

Quiero externar mi admiración y respeto al grupo de trabajo del Dr. Alberto Flores y la Dr. Paty Ponce. Quienes me admitieron y ofrecieron sus conocimientos con toda disponibilidad y paciencia. En específico al estudiante de maestría David Estrada quien estuvo ala-par conmigo. Y por supuesto, al comité de los veranos UG.

REFERENCIAS

- [1] © Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2015) Agenda Técnica Agrícola de Guanajuato, 978-607-7668-44-2 Recuperado de: https://extensionismo.sagarpa.gob.mx/web2/documentos/agenda_tecnica/F11_Guanajuato.pdf, https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/71233/MargenesComer_Ajo_Marzo2015.pdf
- [2] Schwartz HF, Mohan SK (1995) 'Compendium of Onion and Garlic Diseases'. (APS Press: St Paul, Minnesota, USA)
- [3] Coley-Smith, J. R. (1979.) *Survival of plant-pathogenic fungi in soil in the absence of host plants. ... Soil borne plant pathogens.* London: Academic Press.
- [4] Coley Smith J. R., King J. E. 1969. The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effect on germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk.
- [5] Kanehisa, M., & Bork, P. (2003). *Bioinformatics in the post-sequence era.* *Nature Genetics*, 33 Suppl 1, 305-310.
- [6] [6] Park, Hee-Soo & Yu, Jae-Hyuk. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current opinion in microbiology*. 15. 10.1016/j.mib.2012.09.006.
- [7] Cohrs, K. C., Simon, A., Viaud, M. and Schumacher, J. (2016), Light governs asexual differentiation in the grey mould fungus *Botrytis cinerea* via the putative transcription factor BcLTF2. *Environ Microbiol*, 18: 4068-4086. doi:10.1111/1462-2920.13431

Tabla 1. Genes seleccionados y encontrados en el genoma de *S. cepivorum* Berck

Gen	Organismo	Función	Presentes en el genoma de <i>S.cepivorum</i>	
1	SsLtf2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Factor de transcripción sensible a la luz, para inducir la formación de conidios y suprimir el desarrollo de esclerocios	Si
2	BcLtf1	<i>Botrytis cinerea</i>	Complejo administrativo de Ltf2	Si
3	BcLtf2	<i>Botrytis cinerea</i>	Factor de transcripción sensible a la luz, para inducir la formación de conidios y suprimir el desarrollo de esclerocios	Si
4	BcVel 1	<i>Botrytis cinerea</i>	Conexión de las señales de luz con el desarrollo y el metabolismo secundario	Si
5	BcVel2	<i>Botrytis cinerea</i>	Miembros del complejo VELVET; la eliminación de algún miembro inhibe el desarrollo de esclerocios acompañado por el aumento de la formación de conidios y la melanogénesis conidial.	Si
6	BcLae	<i>Botrytis cinerea</i>		Si
7	BcWcl1	<i>Botrytis cinerea</i>	Factores de transcripción que median la inhibición del desarrollo conidial y esclerocios bajo exposición a la luz azul.	Si
8	BcWcl2	<i>Botrytis cinerea</i>	Hacer frente al estrés oxidativo y virulencia.	Si

9	BcHox8	<i>Botrytis cinerea</i>	Factor de transcripción.	Si
10	BcAtf1	<i>Botrytis cinerea</i>	Su supresión influye en la formación de hifas aéreas excesiva acompañada de números disminuidos de conidios	Si
11	BcRbceg1	<i>Botrytis cinerea</i>	Su supresión impide la diferenciación de conidios en conidióforos desarrollados regularmente	Si
12	Pks13	<i>Botrytis cinerea</i>	Codifica la enzima clave de la melanogénesis conidial	Si
13	Lrea	<i>Aspergillus flavus</i>	Eceptores de la luz azul.	Si
14	Lreb	<i>Aspergillus nidulans</i>		No
15	FphA	<i>Aspergillus nidulans</i>	Eceptores de la luz roja.	Si
16	VosA	<i>Aspergillus flavus</i>	Regulador Negativo de la conidiación.	Si
17	VeA	<i>Aspergillus flavus</i>	Forma el heterodímero VelB-VeA necesario para el desarrollo sexual. Este hetero-dímero VeA-VelB también interactúa con LaeA,	Si

Tabla 2. Localización de los genes en el genoma de <i>S. cepivorum</i> Berck						Elemento regulatorio
Gen	Localización	Inicio	Termino	Identidad %	Caja TATA y AbaA	
1	Bcltf1	contig00356	10616	12248	81.8745	Si
2	(-) Bcltf2	contig00905	2934	4707	61.9875	Si
3	Bcvel1	contig00708	2610	4437	81.0705	Si
4	(-) Bcvel2	contig00061	58332	59443	84.41566667	Si
5	Bclae1	contig00781	14018	15150	72.766	Si
6	(-) Bcwcl1	contig00402	2193	5063	74	Si
7	(-) Bcwcl2	contig00042	63740	65334	75.969	Si
8	Bcatf1	contig01031	9095	10743	67.8425	Si
9	Bcreg1	contig00409	729	2006	74.005	Si
10	Bcps13	contig01022	3661	10115	92.1335	Si
11	(-) ssltf2	contig00905	2934	4716	63.968	Si
12	(-) VosA	contig00156	1017	1346	54.545	Si
13	VeA	contig00708	2649	3333	61.8575	Si
14	(-) FphA	contig01200	1833	5685	55.97	Si
15	(-) LreA	contig00402	2220	4121	46.154	Si
16	Bchox8	contig00538	15177	16947	94.771	Si

Gen	Primers			
	Primer_F	Primer_R	Product Size	
1	Bcltf1	CAGGCGTTTTGGTTTGATT	TGATCCGAGCCAATCACATA	155 bp
2	(-) Bcltf2	GTGGATGCAACCTCACCTT	TTGAGTTTCCACCACGATGA	196 bp
3	Bcvel1	CTTCCTCTTCGCAACTTTGG	CAACTTGTATTGGCCCTCGT	187 bp
4	(-) Bcvel2	CGAACATGGAATGTTTGTGC	GTGGCGCACTACCATAGGTT	215 bp
5	Bclae1	GCCGAACAACGACCAGTATT	CGCCAACGATGTGTATTGTC	206 bp

6	(-) Bcwl1	TCACCAGATGGCAAATTC	CCGACCACCAAGAAAGTGT	209 bp
7	(-) Bcwl2	TACCTGTCCACCTGCCTACC	CGGTAGGATCCAGTTCAAA	205 bp
8	Bcatf1	TGTCCTCCACAAAACAACA	ACCGGTGAGCATGTTAGGAC	247 bp
9	Bcreg1	CGGCAACATTTTCATACACG	AAGAGTAAACGCTGCCTCCA	224 bp
10	Bcpks13	AATGCAGCGTCTGGCTATCT	CACGCTGTATGATGGACCAC	244 bp
11	(-) ssltf2	TTTCTGTGACTGACGCCTTG	TTCAGCCACGATCTCTTCT	173 bp
12	(-) VosA	AGACCCTGCTCTGGAATTT	CGCCAAGATCGAAGGTATGT	174 bp
13	VeA	TTGATAGACCCAACGAAGC	GCCAATCAAAGGAGGATTCA	196 bp
14	(-) FphA	GCTTCTTTTGACGCCAGAC	ACGAGGGATATTTGGAACC	209 bp
15	(-) LreA	GGACTGGGTTGTGAACGAGT	GGGTTGTCCTACAAGCTGA	248 bp
16	BcHox8	CGTCCGTTCAAATCTGGTT	CCTCCAATGACTTTCCTGA	207 bp

Figura 1 Estructuras de los genes tomando como base la estructura de los genes en *S. sclerotiorum* y *B. cinerea*

