

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Sclerotium cepivorum* MEDIANTE ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS AL AZAR*

Francisco Luna Martínez** y Patricia Ponce Noyola***

Artículo invitado para la nueva sección de tesis laureadas, que pasa íntegro y sin la revisión de los Árbitros.

RESUMEN

Sclerotium cepivorum es el agente causal de la "pudrición blanca" del ajo. El conocer su variabilidad genética permitirá buscar estrategias de control más eficientes. Se utilizaron 47 aislados de *S. cepivorum* provenientes de Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas y 7 cepas de referencia. El análisis morfológico correspondió al establecido para este hongo. Se amplificó el gen ribosomal 18S dando un tamaño cercano a 2.2 kb en todos los aislados y cepas de *S. cepivorum*, en los hongos control fue de aproximadamente 18 kb. El grado de variabilidad se analizó por medio del Polimorfismo de los Fragmentos Amplificados al Azar (RAPD). Los aislados de *S. cepivorum* dieron un patrón génico similar, pero muy diferente al que muestran los otros hongos fitopatógenos. La disimilitud genética promedio fue de 9.4%. Se proponen algunas bandas como marcadores moleculares para identificar al fitopatógeno. En el dendograma se aprecia que hay tendencia de los aislados a agruparse según el estado de donde provienen.

ABSTRACT

Sclerotium cepivorum is the etiologic agent of garlic "white rot". Knowledge of genetic variability of the fungus may help to design efficient strategies for its control. For this study, 47 isolates obtained from Aguascalientes, Guanajuato and Zacatecas as well as 7 reference strains were used. Morphological characterization was that established for this organism. PCR amplification of ribosomal 18S gene generated a DNA fragment of a size close to 2.2 Kb in all isolates and reference strains, as compared to that of 1.8 Kb amplified in control fungi. Variability was analyzed by Random Amplified Polymorphism Distance (RAPD). Isolates exhibited a similar gene pattern with an average dissimilitud of 9.4%. Some of the bands identified here can be useful as molecular markers in identification studies of this plant pathogen. Dendogram analysis of data revealed a tendency of isolates to group according to their geographic procedence.

Palabras clave: Pudrición blanca; *Sclerotium cepivorum*; RAPD; variabilidad genética; enfermedades del ajo.

Key words: White rot; *Sclerotium cepivorum*; RAPD; genetic variability; garlic disease.

INTRODUCCIÓN

PUDRICIÓN BLANCA. La pudrición blanca es una de las enfermedades fúngicas más importantes, extendidas y destructivas de las especies del género *Allium*. Esta se propaga de manera rápida atacando más de 700 especies de plantas en cualquier

suelo donde los cultivos estén en período de crecimiento y con igual magnitud en el desarrollo de la parte de la planta hospedera durante la temporada fría, la cual conduce al desarrollo y reproducción del patógeno *Sclerotium cepivorum* (Coley-Smith y Entwistle, 1988; Pinto y col 1988). Bajo estas condiciones, esta enfermedad se vuelve la mayor limitante en la

* Artículo de la tesis de Maestría en Ciencias (Biología) de Francisco Luna Martínez** con el reconocimiento de *Cum Laude*.

** Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N, A.P. 187, Guanajuato Gto. 36000.

*** Asesorada por la Dra. Patricia Ponce Noyola del IIBE de la Facultad de Química. (29 de Enero del 2000). e-mail: poncep@quijote.ugto.mx.

producción de los cultivos de *Allium* (Crowe, 1980a). A la fecha no se ha reportado la existencia de especies del género *Allium* resistentes a la infección por *S. cepivorum*.

Los síntomas iniciales que presenta la planta afectada por la pudrición blanca se caracterizan por una clorosis, seguida por el marchitamiento y caída de las hojas inferiores. Al arrancar una planta puede observarse que la base de las hojas, el bulbo y las raíces están necróticas y cubiertas por una pelusa blanca (micelio). También se pueden observar algunas pequeñas manchas negras, debido a que el micelio tiende a formar esclerocios (formas de resistencia y de reproducción asexual de *S. cepivorum*), cuyos cuerpos son pequeños, esféricos y de color oscuro. La pudrición del bulbo es suave y acuosa. Sobre el ajo, el crecimiento de otros organismos es inhibido, permitiendo así un diagnóstico relativamente fácil. Los síntomas en el follaje se presentan solamente después que el patógeno ha crecido y penetrado a la base del tallo o el bulbo de la planta (Crowe, 1995).

La germinación de los esclerocios de *S. cepivorum* es ocasionada por la producción de exudados radicales de plantas del género *Allium*; estas sustancias son alquil y alquenil-L-cisteín sulfóxidos que son metabolizados por la microbiota del suelo que los descomponen hacia una mezcla de tioles y sulfuros volátiles (Coley-Smith y Parfitt, 1986). Los esclerocios de *S. cepivorum* pueden sobrevivir por más de 20 años en el suelo aún en la ausencia de la planta huésped y pueden diseminarse de un campo a otro por equipo contaminado o por el uso de semillas (dientes de ajo) contaminadas con el patógeno. Su germinación es estimulada a bajas temperaturas, tornándose óptima entre los 14-18°C y terminando abruptamente alrededor de los 24°C (Coley-Smith, 1960).

S. cepivorum es un hongo fitopatógeno clasificado como un deuteromiceto ya que no se conoce su ciclo de vida sexual ni si produce esporas funcionales, sin embargo, se ha sugerido que es un ascomiceto ya que se ha reportado la formación de microconidias de

1.6 a 3.4 $\mu\mu$ cuando se crece sobre agar agua (Schwartz y Mohan, 1995) y porque se han encontrado fíalides conteniendo microconidias sobre la superficie de esclerocios (Littley y Rahe, 1992).

Grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum*. La variación en la efectividad de las prácticas de control de la pudrición blanca puede estar asociada con la variabilidad genética de *S. cepivorum* (Earnshaw y Boland, 1997). Un método para medir indirectamente la variabilidad genética entre aislados de hongos fitopatógenos es la determinación de Grupos de Compatibilidad Micelial (MCG, del inglés: mycelial compatibility groups) ya que no revela el grado de relación entre aislados provenientes del mismo o de diferente MCG. Solamente aislados provenientes del mismo MCG pueden formar heterocariontes estables por lo que la compatibilidad micelial sirve como un indicador cualitativo de relación entre aislados (Earnshaw y Boland, 1997).

Algunos métodos que miden directamente la variabilidad genética en hongos son: polimorfismo de isoenzimas y polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de DNA nuclear y mitocondrial (Earnshaw y Boland, 1997), además de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Martínez y Simpson, 1998) y polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados al azar (RAPD) (Williams y col. 1990).

Genes ribosomales como herramienta de clasificación de organismos. La unidad ribosomal nuclear en eucariontes está constituida por los genes 18S, 5.8S, 28S y en algunos casos existe la subunidad 5S que puede estar localizada dentro de la unidad ribosomal o en otra región del genoma. La utilidad de estudiar estas regiones es el establecimiento de filogenias y divergencias evolutivas intra o íter específicas comparando organismos en un amplio rango de jerarquías taxonómicas morfológicas y/o fisiológicamente diferentes o similares (Tan y col, 1994; Fatehi y Bridge, 1998; Márquez-Lona, 1998).

Los genes nucleares de RNA ribosomal de las subunidades pequeña (n rRNA 18S) y grande (n rRNA 28S), han sido empleados para determinar relaciones filogenéticas entre hongos, protista, eucariontes y procariontes donde los caracteres morfológicos no son muy claros (Castlebury y Domier, 1998). El gen 5.8S está conservado evolutivamente como los genes 18S y 28S, pero su tamaño pequeño limita su utilidad en comparaciones filogenéticas (Duggal y col, 1997). En contraste, la región íter espaciadora (ITS) muestra mucho mas divergencia y es usada para comparar organismos muy relacionados (White y col, 1990).

Carbone y col (1995), analizaron la secuencia de la región íter espaciadora 1 de la unidad ribosomal (ITS-1) en *S. cepivorum* y en los ascomicetos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia trifoliorum* y *Sclerotinia minor* reportando una similitud de más del 98% entre ellos. Por otro lado Márquez-Lona (1998), al utilizar los iniciadores NS1 y NS8 descritos por White y col (1990) (Tabla 1) para amplificar el gen n rRNA en aislados de *S. cepivorum*, encontró un producto de amplificación de aproximadamente 2.2 kpb y para otros hongos como *Sacch. cerevisiae*, *T. harzianum*, *U. maydis* y *M. rouxii*, un producto de amplificación de aproximadamente 1.8 kpb.

Polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar (RAPD). El desarrollo de marcadores moleculares ha permitido una intensa investigación y la caracterización genética en hongos. La ventaja de los marcadores moleculares es que permiten utilizar información sobre eventos naturales y mutaciones

fenotípicamente neutrales dentro de las poblaciones. La mayoría de las poblaciones tienen, relativamente, altas frecuencias de polimorfismos debidos a pequeños cambios en el DNA, como mutaciones puntuales tales como, sustitución de bases, inserciones, deleciones y translocaciones (Rosewich y Mcdonald, 1994). Las nuevas tecnologías, tales como RAPD, RFLP y AFLP han permitido la detección de esos polimorfismos con lo que se puede hacer una eficiente discriminación entre individuos, estas tecnologías son herramientas muy usadas actualmente en Biología Molecular ya que permiten el análisis del genoma completo, evitan las imprecisiones debido a efectos ambientales y pueden reducir tiempo, espacio y costo en los programas de biomejoramiento. Muchos hongos filamentosos tienen pocos marcadores fenotípicos que pueden ser usados para diferenciar entre individuos en una población, esto limita el estudio sobre la biología de poblaciones en estos organismos. Los marcadores fenotípicos han sido útiles para diferenciar ciertos grupos entre algunas especies, pero no tienen suficiente resolución para distinguir entre individuos de una misma especie. La actual disposición de marcadores genéticos basados en diferencias en la secuencia de DNA ha hecho posible y práctico llevar a cabo estudios básicos de población y de biología evolutiva en hongos (Rosewich y Mcdonald, 1994).

Los RAPDs han sido empleados para diferenciar algunas cepas de la misma especie en plantas, bacterias, animales y hongos (Williams y col. 1990). Welsh y McClelland (1990) describen que una simple y reproducible huella de genomas complejos puede ser generada usando iniciadores elegidos arbitrariamente y la reac-

Tabla 1. Iniciadores empleados para amplificar genes ribosomales.

INICIADOR	AMPLIFICACION DEL:	TAMAÑO ESPERADO	SECUENCIA (5' 3')
MS1	Fragmento interno del gen mt SSU rRNA	~0.716 kpb	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG
MS2			GCGGATTATCGAATTAATAAC
NS1	Gen n rRNA 18S	~1.8 kpb	GTAGTCATATGCTTGCTC
NS8			GGCTGCTGGCACCAGACTGC

ción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: polymerase chain reaction), por lo que no se requiere un conocimiento previo de la genética molecular de los organismos sometidos a esta investigación. Cada iniciador da un modelo diferente de productos de amplificación, los cuales son marcadores dominantes; de esta manera, los datos producidos (huellas génicas) permiten la diferenciación de cepas de la misma especie aún estrechamente relacionadas. Por otro lado Williams y col. (1990) describieron un ensayo de polimorfismos de DNA de hongos en general, basado en la amplificación al azar de fragmentos de DNA con iniciadores sencillos de secuencias arbitrarias de nucleótidos. Dichos polimorfismos pueden ser usados para construir mapas genéticos de gran variedad de especies. Ellos sugieren que dichos polimorfismos sean llamados marcadores de Polimorfismo de Fragmentos Amplificados al Azar: RAPD (del inglés: Random Amplified Polymorphic DNA). La característica "al azar" de RAPD se refiere al iniciador cuya secuencia es arbitraria. En el RAPD, los iniciadores se alinean a su secuencia complementaria a lo largo de todo el genoma durante la reacción y por ello se requieren bajas temperaturas de alineación, generalmente de 30 a 37°C.

En conclusión, las ventajas de la técnica de RAPD, comparada con otras técnicas que permiten obtener la huella génica en aislados, son: rapidez, no requiere de librerías génicas ni de ninguna forma de clonación, se requieren pequeñas cantidades de DNA, los iniciadores son fáciles de conseguir y no requiere radioisótopos, por ello es baja en costo y brinda mayor seguridad al operario. Esta técnica es altamente recomendada para trabajos sobre biología de poblaciones y ecología molecular de hongos, mapeo genético, identificación de heterocariontes/homocariontes, es decir, básicamente en cualquier proyecto de identificación genética de hongos (Foster y col, 1993; Rosewich y McDonald, 1994).

Existen algunos antecedentes en torno a la variabilidad genética de *S. cepivorum* empleando la técnica de RAPD. Márquez-Lona (1998),

empleando 20 aislados de *S. cepivorum* provenientes de Celaya, Gto. probó 20 decañiciadores (Operon Technologies, Inc) de los cuales propone 12 iniciadores (Tabla 2) para realizar el análisis RAPD con este fitopatógeno. Asimismo, Pérez-Moreno (1999) empleó un total de 31 aislados de *S. cepivorum*, probó 30 iniciadores (Bio-synthesis, Inc.) y con cinco de ellos encontró amplificación al realizar RAPDs.

Tabla 2. Iniciadores empleados en reacciones tipo RAPD.

INICIADOR	SECUENCIA (5'—3')
OPA02	TGCCGAGCTG
OPA03	AGTCAGCCAC
OPA13	CAGCACCCAC
OPB10	CTGCTGGGAC
OPE14	TGCGGCTGAG
OPG02	GGCACTGAGG
OPG10	AGGGCCGTCT
OPH03	AGACGTCCAC
OPH18	GAATCGGCCA
OPH19	CTGACCAGCC
OPJ20	AAGCGCCTC

Análisis de la disimilitud genética. La variabilidad genética entre individuos de una misma especie, se puede cuantificar analizando los patrones de bandeo obtenidos por diferentes técnicas, como RAPD.

En la construcción de diagramas tipo árbol o dendograma, se usa una medida de disimilaridad genética entre individuos, llamada formalmente Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). La disimilaridad genética entre dos OTUs es un estimado cuantitativo de la divergencia genética entre ellas. La medida de disimilaridad genética puede variar entre cero (para las OTUs muy relacionadas) y uno. Las bandas de RAPDs pueden ser numéricamente codificadas como 1 y 0. El número 1 corresponde a la presencia de la banda y el 0 a su ausencia. Para medir la disimilaridad genética entre dos OTUs, se necesita comparar su patrón de bandeo; patrones similares indican individuos genéticamente muy emparentados, mientras que patrones muy diferentes indican divergencia genética. Mediante un

análisis matemático se construyen los árboles; el programa busca la mínima disimilitud, y dos OTUs con la mínima disimilitud son reunidos (Martínez y Simpson, 1998).

Se han descrito varios tipos de OTUs, como por ejemplo, el Coeficiente de apareamiento simple, el Coeficiente de Nei y Li (1979), el Coeficiente de Jaccard, entre muchos otros. El Coeficiente de apareamiento simple es recomendado para usarse en trabajos de diversidad genética cuando el número de aislados es grande ya que toma en cuenta los pares de valores (0,0), es decir, toma en cuenta la ausencia de una determinada banda dentro del patrón génico del par de aislados que examina. La ausencia de bandas también tiene un significado de homología en las secuencias del DNA del genoma de cada especie. El coeficiente de Nei y Li, así como el de Jaccard, depende solamente de las bandas presentes en los individuos que se están analizando, no de las bandas que están presentes en cualquier otro individuo de la muestra anterior. (Dr. Octavio Martínez de la Vega, comunicación personal).

JUSTIFICACIÓN

Guanajuato, Zacatecas y Aguascalientes son las entidades federativas más importantes en la producción de ajo y cebolla, ambos hospederos de *S. cepivorum* (Laborde, 1987). Por ello es necesario realizar estudios que lleven a conocer a este fitopatógeno con el fin de conservar la producción de dichas hortalizas. Se ha intentado controlar la pudrición blanca utilizando la poca información disponible que existe en la literatura pero los resultados hasta la fecha han sido parciales. En el Bajío se han realizado esfuerzos importantes para generar tecnología para el control del patógeno. Se han evaluado medios de control biológico a través de pruebas y búsqueda de enemigos naturales del hongo, control cultural con inundación y solarización, control genético con el uso de variedades de la planta resistentes al hongo, y control químico con aplicación de fungicidas al suelo y a la

semilla. Con el uso de productos químicos se han tenido algunos resultados positivos pero limitados. Existe poca información disponible sobre la variabilidad genética entre aislados de *S. cepivorum* o sobre la importancia de tal variabilidad sobre las prácticas de control de este fitopatógeno (Earnshaw y Boland, 1997), por ello, nos hemos planteado como objetivo obtener información básica sobre *S. cepivorum* que permita diseñar y establecer las estrategias más adecuadas para el control de la pudrición blanca del ajo en la región. En este trabajo nos propusimos determinar el grado de variabilidad genética entre aislados de *S. cepivorum* provenientes de varios estados mediante el análisis tipo RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados y cepas empleados. La lista de aislados y cepas que fueron empleados en este estudio (Tabla 3) puede dividirse de la siguiente manera: 1) Cepas de referencia de *S. cepivorum*. Seis cepas que cada una representa un Grupo de Compatibilidad Micelial (MCG) diferente (proporcionadas por la Dra. Linda Kohn, de la Universidad de Toronto, Canadá). Una cepa proveniente de Inglaterra denominada 2FD30E (proporcionada por Felipe Delgadillo del INIFAP-Celaya). 2) Aislados de *S. cepivorum*. Se utilizaron 47 aislados mexicanos provenientes de tres Estados productores de ajo: 29 de Guanajuato, 13 de Aguascalientes y 5 de Zacatecas. Los aislados de Guanajuato y Aguascalientes provienen de esclerocios que fueron colectados de muestras suelo de campos donde se ha presentado la pudrición blanca. Los aislados provenientes de Zacatecas son esclerocios que fueron obtenidos directamente de bulbos de ajo infestados. Los aislados "FD" fueron proporcionados por Felipe Delgadillo (INIFAP-Celaya), "C2" por Luis Pérez (ICA); "SC" por Alfredo Herrera (CINVESTAV-Irapuato); las "INI" y "AC" por Luis C. López y Juan T. Guerrero (INIFAP-Aguascalientes); y por último, las "FAZ" por Jorge A. Verdín, Alberto Flores y Francisco

Tabla 3. Clave, nombre y origen de los aislados y cepas empleados en este estudio.

1	FD1	GTO	20	FD27	GTO	39	AC1	AGS
2	FD2	GTO	21	FD28	GTO	40	AC2	AGS
3	FD4	GTO	22	FD31	GTO	41	AC6	AGS
4	FD5	GTO	23	FD32	GTO	42	AC8	AGS
5	FD6	GTO	24	FD34	GTO	43	FAZ1	ZAC
6	FD8	GTO	25	FD42	GTO	44	FAZ2	ZAC
7	FD11	GTO	26	M1A	GTO	45	FAZ3	ZAC
8	FD12	GTO	27	M2A	GTO	46	FAZ4	ZAC
9	FD14	GTO	28	C2	GTO	47	FAZ5	ZAC
10	FD15	GTO	29	SC	GTO	48	2FD30E	Inglaterra
11	FD16	GTO	30	INI1	AGS	49	MCG1	Canadá
12	FD17	GTO	31	INI2	AGS	50	MCG2	Canadá
13	FD18	GTO	32	INI4	AGS	51	MCG3	Canadá
14	FD19	GTO	33	INI5	AGS	52	MCG4	Canadá
15	FD20	GTO	34	INI6	AGS	53	MCG5	Canadá
16	FD21	GTO	35	INI7	AGS	54	MCG6	Canadá
17	FD22	GTO	36	INI8	AGS	55	<i>Sclerotium rolfsii</i>	CINVESTAV
18	FD23	GTO	37	INI9	AGS	56	<i>Rhizoctonia solani</i>	CINVESTAV
19	FD24	GTO	38	INI10	AGS	57	<i>Botrytis cinerea</i>	CINVESTAV
						58	<i>Macrophomina phaseolina</i>	CINVESTAV

Luna (UGTO). **3)** Otras cepas. Se utilizaron 4 cepas de hongos fitopatógenos, los cuales son también formadores de esclerocios: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* y *Macrophomina phaseolina*. Estas cepas fueron proporcionadas por Alfredo Herrera E. (CINVESTAV-Irapuato).

Cultivo de aislados y cepas empleados.

Se utilizaron dos medios de cultivo: Agar Extracto de Malta, que contiene caldo extracto de malta al 3.4% (Bioxon) y agar bacteriológico al 1.5% (Bioxon). El otro medio fue Agar de Dextrosa y Papa (PDA) al 3.9% (Bioxon). Estos medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C (1.05 kg/cm³) durante 15 min. Todos los cultivos de *S. cepivorum* y de *B. cinerea* se incubaron a una temperatura entre 18 y 21 °C, mientras que cultivos de *S. rolfsii*, *R. solani* y *M. phaseolina* se incubaron a 28°C.

Caracterización de la morfología colonial y la morfología de los esclerocios. La morfología colonial y la morfología de los esclerocios fue observada para todos los aislados y cepas

de referencia empleados capturando las imágenes con una cámara de video acoplada a una computadora, utilizando el programa Apple Video Player.

Extracción y cuantificación del DNA. Se siguió el procedimiento para extraer el DNA descrito por Flores-Martínez y col (1997). La calidad del DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la cuantificación se tomó una alícuota de la suspensión de DNA y se midió la densidad óptica a 280 y 260 nm. en un espectrofotómetro Beckman DU-600. Con esta información, se ajustó la concentración a 100 ng/μL de DNA de cada muestra.

Electroforesis en gel de Agarosa. Se prepararon geles de Agarosa a la concentración deseada en una cámara horizontal, empleando regulador TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8.0, EDTA 1 mM), las muestras se mezclaron con regulador de carga (Azul de bromofenol 0.25%, Xilen cianol 0.25% y glicerol 30% en TAE) en proporción 5:1 y la electroforesis se

efectuó a voltaje constante (normalmente 75 Volts). Como marcadores de tamaño molecular se utilizó DNA del fago λ cortado con la enzima de restricción *Pst* I (λ -*Pst* I). Con el fin de visualizar las bandas de DNA, al momento de preparar la agarosa se le adicionó bromuro de etidio a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los geles se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta y la imagen se grabó en un registrador de información Eagle eye II de Stratagene. En la mayoría de los casos se tomaron dos imágenes del gel: una imagen se integró de tal modo que se pudiesen ver la mayoría de las bandas, mientras que, para visualizar mejor las bandas más débiles se tomaba la segunda imagen.

Amplificación de genes ribosomales. Para amplificar los genes ribosomales utilizando la técnica de PCR, se utilizaron los iniciadores mostrados en la Tabla 1. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μL en tubos Eppendorff de 0.5 mL; utilizando 1.5 unidades de Taq DNA Polimerasa (Gibco BRL) utilizando la mezcla de reacción sugerida por el proveedor. En el caso de los RAPDs se empleó 20 μM de iniciador), posteriormente se agregaron aprox. 50 μL de aceite mineral. Las condiciones de amplificación fueron: Un ciclo (3 min/95°C), cuarenta ciclos (1 min/95°C, 1 min/50°C, 2 min/72 °C), un ciclo (10 min/ 72°C), un ciclo (10 min/ 6°C). Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador RoboCycler Gradient 40 de Stratagene.

Reacciones de amplificación tipo RAPD. Para las reacciones tipo RAPD se utilizaron los 12 iniciadores reportados por Márquez-Lona (1998) y que se muestran en la Tabla 2. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo (3 min/ 95°C), cuarenta ciclos (1 min/95°C, 40 s/30°C, 2 min/72°C), un ciclo (10 min/72°C), y un ciclo (10 min/ 6°C). Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador RoboCycler Gradient 40 de Stratagene. Estas condiciones siempre se mantuvieron constantes durante todas las amplificaciones.

Análisis de los productos obtenidos en reacciones de amplificación. Los productos de amplificación fueron concentrados por centrifugación al vacío empleando un equipo marca SAVANT Co. Cada muestra se resuspendió en 6 μL de agua desionizada y 5 μL de regulador de carga. De los 11 μL resultantes, 1.5 μL se sometieron a electroforesis con el fin de detectar las muestras con amplificación positiva. Los 9.5 μL restantes fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior utilización.

Los productos de amplificación de las reacciones de PCR del gen rRNA 18S se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describió anteriormente. Para separar los productos de amplificación de las reacciones tipo RAPD, se usaron geles de agarosa al 1.4%.

Análisis del patrón de bandeo de RAPDs. Se utilizó una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel para cada uno de los doce iniciadores empleados en este estudio. La presencia de una banda fue representada con un valor de 1, mientras que a la ausencia se le dio un valor de 0. Se le dio un valor de ND cuando no se tenía la certeza de la existencia de la banda ya fuese por cualquiera de los dos motivos siguientes: 1) Cuando el patrón de bandeo mostrado era débil y por ello la banda en cuestión no pudiera observarse. 2) Cuando la amplificación de las bandas vecinas era tan intensa que no permitía visualizar la banda analizada.

Matriz de disimilitud genética y dendograma. Para analizar matemáticamente los patrones de bandeo obtenidos con los 12 iniciadores-RAPD utilizados, se contó con la colaboración y asesoría del Dr. Octavio Martínez de la Vega del CINVESTAV-Irapuato. Para determinar la distancia genética entre cada par de aislados de *S. cepivorum* se empleó el coeficiente de disimilaridad de apareamiento simple utilizando la fórmula para calcular la proporción de bandas no compartidas (DAP) propuesta por Skroch y col (1992).

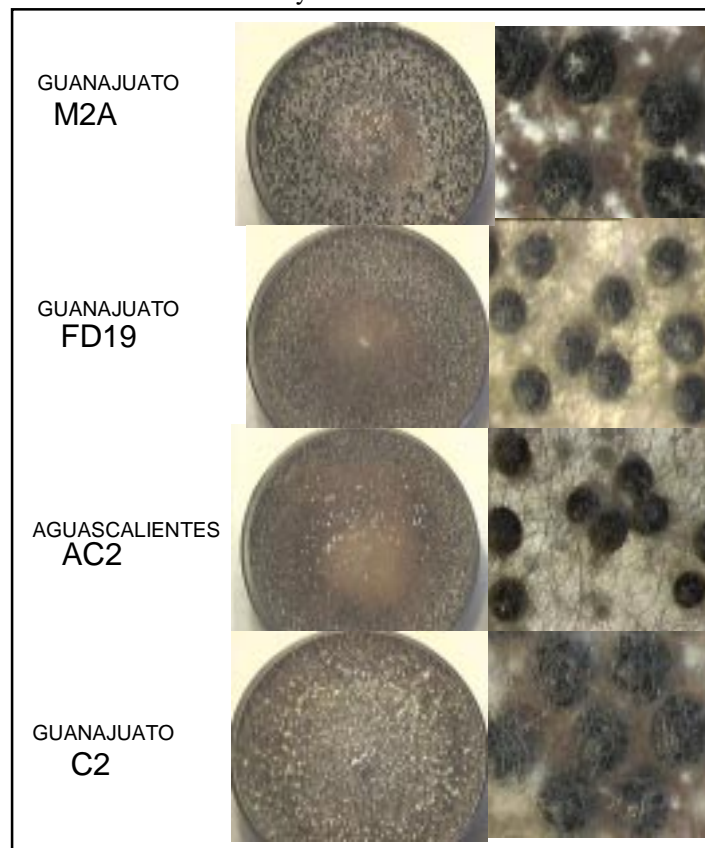
Con los coeficientes de disimilitud de apareamiento simple, se construyó una matriz de disimilitud genética. Además se construyó un dendograma usando el método de los promedios no ponderados (UPGMA, del inglés: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología colonial y morfología de los esclerocios de las cepas y aislados empleados. Con el fin de caracterizar morfológicamente a los aislados y cepas utilizadas, se inoculó micelio en placas de Agar Extracto de Malta y se dejaron incubando hasta la formación de esclerocios. Todos los aislados mexicanos presentaron la morfología colonial típica de las cepas de referencia. Asimismo, todos los aislados fueron capaces de formar esclerocios con las características propias reportadas para *S. cepivorum* (Crowe y col, 1980; Crowe y Hall, 1980a,b; Backhouse y Stewart, 1987; Kohn y Grenville, 1989; Crowe, 1995), cuatro de ellos se muestran en la Fig. 1.

La morfología colonial que presentaron los otros hongos fitopatógenos empleados en este estudio fue muy diferente a la de *S. cepivorum*. Los cultivos de *S. rolfsii* mostraron micelio blanco y esclerocios redondos de color café claro y de un tamaño correspondiente a lo reportado (0.5-1.0 mm) (Punja y Damiani, 1996; Harton y col, 1995). *R. solani* mostró micelio café y conglomerados de esclerocios amorfos de color café que corresponde a lo ya descrito (Young y Ashford, 1995). *B. cinerea* mostró micelio blanco con acumulos de micelio amarillento-grisáceo (al microscopio estereoscópico se podían apreciar los conidióforos) y esclerocios de forma irregular, negros con un diámetro entre 2-10 mm correspondiente a lo reportado en la literatura (Kohn y Grenville, 1989; Crowe y col, 1995). *M. phaseolina* (teleomorfo de *Sclerotium bataticola*) mostró micelio muy negro y formó microesclerocios redondos de 28-

Figura 1. Morfología colonial y de los esclerocios. Los aislados y cepas fueron crecido en placas con medio de Agar Extracto de Malta y se dejaron incubando hasta la formación de los esclerocios, como se describe en Materiales y Métodos.

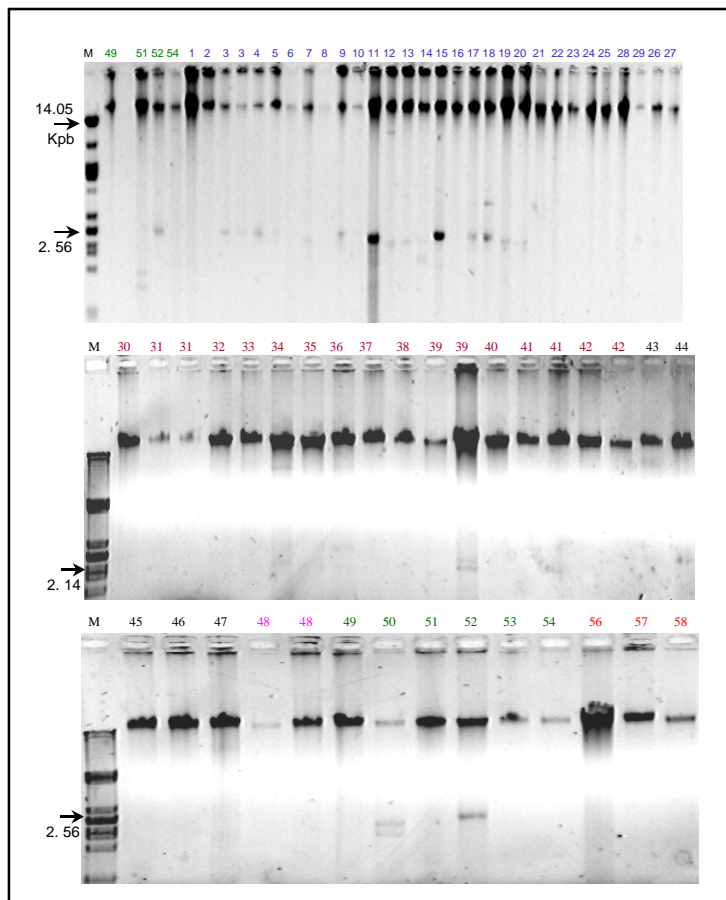


162 μm , similar a la ya reportado (Jiménez y col, 1983).

Obtención de DNA total. El DNA total se extrajo como se describe en materiales y métodos, en algunas muestras, junto con el DNA coprecipitaba un material muy viscoso que era eliminado mecánicamente. Electroforesis en geles de agarosa al 1% del DNA de cada una de las muestras indicó que no estaban degradados ni contenían cantidades detectables de RNA. También nos percatamos de la presencia de bandas de material extracromosomal en 31 de los aislados y cepas de referencia de *S. cepivorum*, lo que corresponde al 57.4% de la población analizada de *S. cepivorum* (Fig. 2).

Desconocemos la naturaleza química de este material extracromosomal así como su papel en la fisiología de *S. cepivorum*; sin embar-

Figura 2. DNA total de aislados y cepas de referencia. El DNA total se obtuvo como se describe en Materiales y Métodos. Geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt. M. Marcador de tamaño molecular (1-Pst I) Los números sobre los carriles corresponden al numero de aislado y cepa según la Tabla 3. Los números duplicados corresponden a dos extracciones diferentes.



go, cabe la posibilidad de que este material pudieran ser plásmidos (Griffiths, 1995), transposones (Kempken y Kück, 1998) o RNA de doble cadena (Chun y Lee, 1997; Beck y col., 1994). A la fecha, no hemos encontrado en la literatura que se reporte la presencia de un material similar al detectado en *S. cepivorum*. En nuestro caso, se abre la perspectiva de analizar la naturaleza del material observado y determinar su posible papel en la biología de este organismo.

Amplificación del gen n rRNA 18S mediante PCR. Después de verificar la calidad del DNA de cada uno de los aislados y cepas empleadas, se procedió a realizar la amplifica-

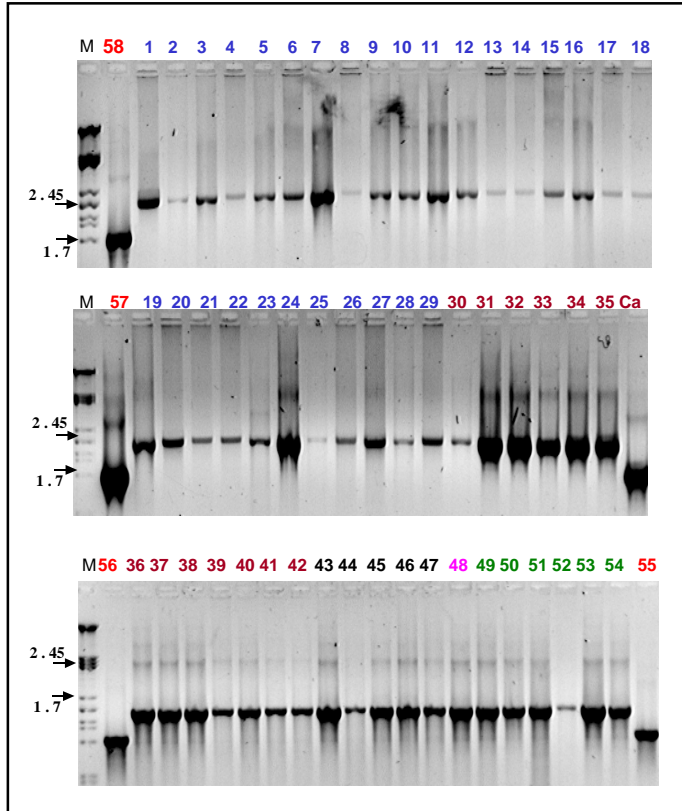
ción del gen n rRNA 18S utilizando la técnica de PCR con los iniciadores NS1 y NS8 como se describió en Materiales y Métodos. Se encontró que la amplificación de este gen en aislados y cepas de *S. cepivorum* daba un producto de aprox. 2.2 kpb mientras que el producto en los otros hongos fitopatógenos empleados fue de alrededor de 1.8 kpb (Fig. 3).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Márquez-Lona (1998) y con los reportados por White y col (1990). Márquez-Lona (1998) encontró un producto de amplificación de aproximadamente 2.2 kpb en aislados de *S. cepivorum* provenientes del municipio de Celaya, Gto. y un producto de amplificación de aproximadamente 1.8 kpb en *Sacch. cerevisiae*, *T. harzianum*, *Ustilago maydis* y *Mucor rouxii*; resultados similares a los reportados para otros hongos por White y col (1990). Un mayor tamaño al esperado en el producto de amplificación en los aislados y cepas de *S. cepivorum* puede sugerir la presencia de una o varias secuencias de inserción dentro del gen n rRNA 18S. En el gen n rRNA 18S de *Plasmodiophora bassicae*, de 3.026

kpb, se han encontrado tres intrones (Castlebury y Domier, 1998). En aislados de *Cladonia chlorophaea* se han encontrado hasta 7 intrones en el gen n rRNA 18S con un tamaño entre 200 y 400 nucleótidos; la cantidad y posición de los intrones variaba de aislado a aislado (DePriest, 1993; DePriest y Been, 1992).

Análisis cualitativo de los patrones de bandeo de RAPDs. Se realizaron los ensayos tipo RAPD empleando los 12 iniciadores descritos por Márquez-Lona (1998). Las Figs. 4 y 5, muestran el patrón de bandeo obtenido con los iniciadores OPB10 y OPH19 para todos los aislados y cepas empleadas. Con todos los iniciadores se obtuvieron productos de amplificación. En general, no observamos muchas diferen-

Figura 3. Amplificación del gen n rRNA 18S. La amplificación se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt. M. Marcador de tamaño molecular (1-Pst I) Los números sobre los carriles corresponden al número de aislado y cepa según la Tabla 3. Ca. *Candida albicans*



cias en el patrón de bandeo en los aislados y cepas de *S. cepivorum* con los iniciadores probados, pero si fueron más notorias las diferencias con respecto al patrón de bandeo que presentaban los otros hongos fitopatógenos utilizados.

En el presente estudio, refiriéndonos a los patrones génicos obtenidos con cada iniciador con los aislados y cepas de *S. cepivorum*, llamamos a una banda polimórfica como aquella que está presente a una frecuencia mayor al 1% y menor al 100% Lewin (1997). Por lo tanto una banda que este presente en todos los patrones génicos tendrá una frecuencia del 100% y es llamada banda no polimórfica.

Para el análisis matemático realizado en el presente estudio, solo se consideraron aquellas

bandas que fueron capaces de ser distinguibles como presentes o ausentes dadas las condiciones propias de cada gel. Se tomaron como idénticas las bandas que tuvieron el mismo tamaño, la intensidad de las bandas no fue considerada un factor de polimorfismo. En las Figs. 4 y 5 se indican con un número las bandas seleccionadas. No sabemos aún a que se debe este incremento en la intensidad de las bandas, ni si tienen relación con alguna actividad fisiológica de los aislados, pero es posible que realizando estudios fisiológicos y bioquímicos se pueda correlacionar la ausencia o presencia de una banda o la mayor amplificación de una banda, con alguna característica fisiológica en estos aislados que lleve a obtener más información que permita controlar la pudrición blanca.

En la Tabla 4 se anotó la cantidad de bandas analizadas en los patrones génicos obtenidos con cada iniciador, así como cuantas de ellas son bandas polimórficas y no polimórficas; la cantidad de bandas consideradas con cada iniciador-RAPD estuvo entre siete y quince. Aunque existe un alto porcentaje de bandas polimórficas (84.5%), los patrones génicos de *S. cepivorum* encontrados con cada iniciador son muy parecidos debido a que 66.7% de las bandas polimórficas tienen una frecuencia superior al 51.9% (Tabla 5).

El análisis descrito en la Tabla 4 no refleja la frecuencia con que aparece una banda dentro de los patrones, por esta razón, se calculó la frecuencia de cada banda analizada y estos resultados se muestran en la Tabla 5. Los iniciadores con los que se obtuvieron los patrones génicos mas polimórficos fueron OPG02, OPH18 y OPJ20, mientras que los menos polimórficos fueron OPE14, OPH03, OPA02 y OPH04.

Análisis cuantitativo de los patrones de bandeo. El análisis de los patrones de bandeo obtenidos con los 12 iniciadores empleados es representado por una matriz de disimilitud. Di-

Figura 4. RAPD con el iniciador OPB10. Electroforesis en gel de agarosa 1.4% teñido con BrEt. M, marcador de tamaño molecular. Los números de los aislados se presentan en la Tabla 3. Los números dentro de cada gel indican las bandas analizadas.

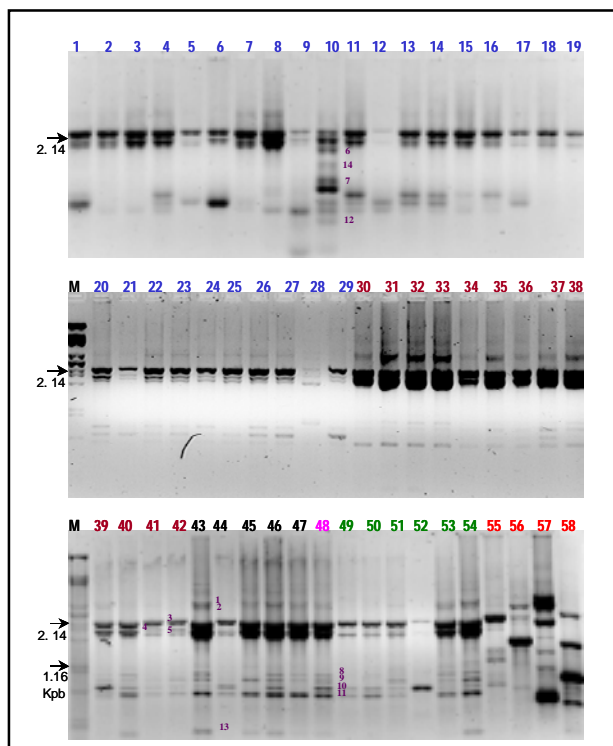


Figura 5. RAPD con el iniciador OPH19. Electroforesis en gel de agarosa 1.4% teñido con BrEt. M, marcador de tamaño molecular. Los números de los aislados se presentan en la Tabla 3. Los números dentro de cada gel indican las bandas analizadas.

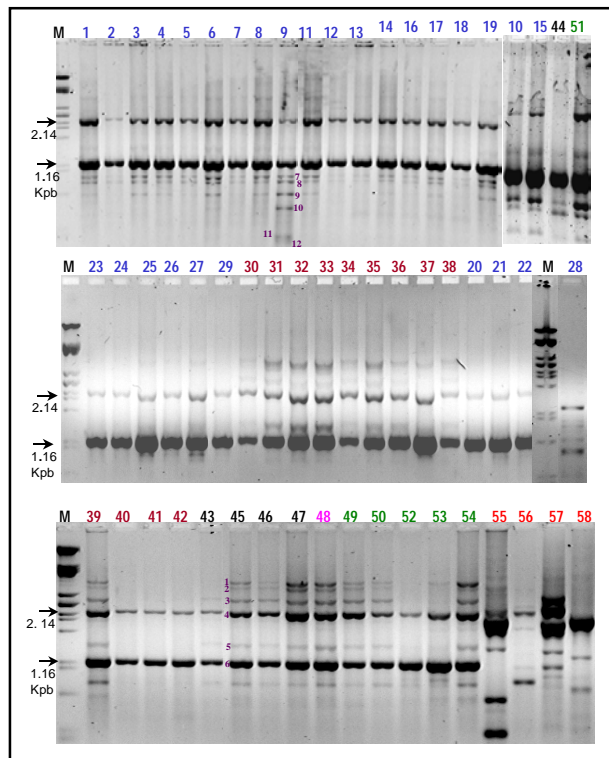


Tabla 4. Bandas polimórficas obtenidas con cada iniciador en el análisis de RAPDS.

INICIADOR	NUMERO TOTAL DE BANDAS	NUMERO DE BANDAS POLIMÓRFICAS	NUMERO DE BANDAS NO POLIMÓRFICAS
OPA02	15	11	4
OPA03	14	11	3
OPA13	10	7	3
OPB10	14	13	1
OPE14	10	9	1
OPG02	13	13	0
OPG10	7	6	1
OPH03	11	8	3
OPH04	14	11	3
OPH18	15	13	2
OPH19	12	11	1
OPJ20	13	12	1
TOTAL	148(100%)	125 (84.5%)	23 (15.5%)

Tabla 5. Frecuencia (%) de cada banda en el patrón génico obtenido en los aislados y cepas de *S. cepivorum*.

BANDA	OPA02	OPA03	OPA13	OPB10	OPE14	OPG02	OPG10	OPH03	OPH04	OPH18	OPH19	OPJ20
1	96.3	90.7	40.7	40.7	92.6	85.2	100	35.2	96.3	35.2	57.4	55.6
2	68.5	98.2	83.3	72.2	100	87	96.3	14.8	94.4	31.5	31.5	66.7
3	14.8	100	83.3	100	94.4	54.7	29.3	98.2	98.2	90.7	35.2	70.4
4	3.7	92.6	98.2	97.8	77.8	32.1	92.6	96.3	44.4	69.8	98.2	81.5
5	100	77.8	100	98.2	1.9	17	61.5	51.9	37	74.1	51.9	90.7
6	100	100	88.9	14.8	1.9	96.2	62.3	100	18.5	92.6	100	100
7	100	100	100	20.4	1.9	78.8	75.5	100	100	90.7	66.7	1.9
8	1.9	85.2	59.6	44.4	1.9	20.8		98.2	100	88.9	75.9	14.8
9	68.5	11.1	100	75.9	1.9	84.9		100	42.6	100	44.4	44.4
10	100	77.8	69.2	87	3.7	3.7		88.9	100	100	5.6	55.6
11	35.2	22.2		87		1.9		90.7	94.4	79.6	1.9	18.5
12	3.7	40.7		3.7		13			98.2	72.2	1.9	96.1
13	3.7	1.9		16.7		13			1.9	75.9		51.9
14	31.5	9.3		3.7					5.6	1.9		
15	5.6									1.9		

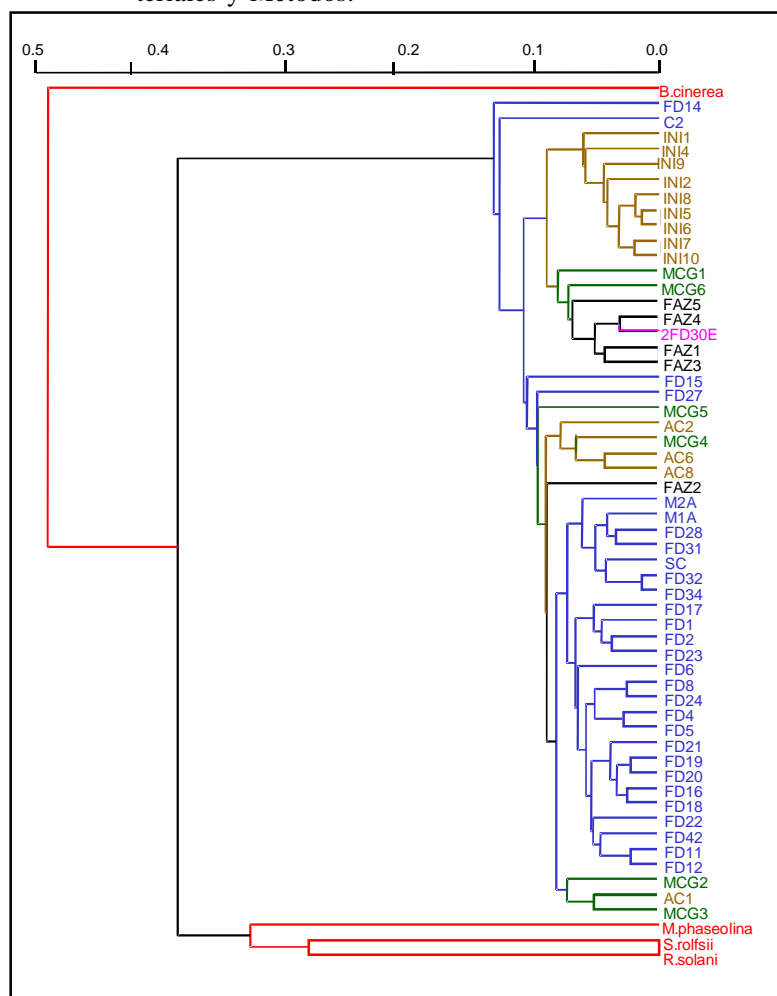
cha matriz de disimilitud fue construida contando con la colaboración del Dr. Octavio Martínez de la Vega empleando los coeficientes de disimilaridad de apareamiento simple (Skroch y col, 1992). Debido a que la población de aislados empleados en este estudio fue grande, se eligió emplear este coeficiente porque permite tomar en cuenta los pares de valores (0&0). Del análisis estadístico de todos los coeficientes de disimilaridad de apareamiento simple de los aislados y cepas de *S. cepivorum* se obtuvieron los siguientes resultados: Número de datos: 1431, Promedio: 0.0941, Mediana: 0.095. De lo anterior podemos concluir que la disimilitud genética promedio entre la población analizada de *S. cepivorum* es de 9.4%, lo cual indica que el grado de variabilidad genética en ella es poca y que este hongo fitopatógeno ha llevado a un grado mínimo su recombinación genética. Existen estudios realizados en otros hongos que sirven como referencia para comparar el grado de variabilidad genética encontrada en este trabajo; en ellos, también se ha trabajado con una población de aislados de la misma especie y realizado su análisis empleando la técnica de RAPD. En *Sclerotinia homeocarpa* se encontró baja disimilaridad genética (< 20%) (Raina y col, 1997). En *Beauveria brongniartii* la disimilari-

dad genética encontrada fue menor del 12% (Piatti y col, 1998).

Para visualizar mejor la relación que existe entre los coeficientes de disimilitud genética contenidos en la matriz, se construyó un dendograma empleando el método UPGMA (método de los promedios no ponderados). En este dendograma (Fig. 6) se puede ver que la variabilidad existente entre la mayoría de los aislados es baja. Además puede observarse como los otros hongos fitopatógenos analizados, tienen un grado mucho mayor de disimilitud respecto a la población de aislados de *S. cepivorum*, es decir, el análisis tipo RAPD logra diferenciar a aislados de *S. cepivorum* de los que no lo son.

Un análisis mas fino del dendograma de la Fig. 6 permite descubrir que los aislados de *S. cepivorum* se agrupan en su mayoría de acuerdo al Estado de donde provienen. La mayoría de los aislados y cepas se distribuyen en dos grandes ramas. Básicamente en una rama se agrupan los aislados “INI” (de Aguascalientes) y “FAZ” (de Zacatecas) y en la otra rama, los aislados de Guanajuato y los “AC” (de Aguascalientes). Todos los aislados “INI” se agrupan en una sub-rama y cuatro de los cinco aislados “FAZ” también se agrupan en otra sub-

Figura 6. Distribución de los aislados en función de sus patrones génicos. Dendograma construido usando el método de los promedios no ponderados (UPGMA), empleando los coeficientes de apareamiento simple. Como se describe en Materiales y Métodos.



rama junto con la cepa de Inglaterra; mientras que el otro aislado de Zacatecas (FAZ2) se encuentra en la otra gran rama, no asociado a ningún otro aislado. Los aislados de Guanajuato se agrupan en una sub-rama, con excepción de FD14, C2, FD15 y FD27. Tres de los cuatro aislados “AC” se agrupan en una sub-rama del dendograma junto con. También se observa como el cuarto aislado “AC” (AC1) se agrupa en una rama junto con MCG2 y MCG3.

Dada la poca variabilidad genética que tiene la población de *S. cepivorum* analizada en este trabajo, puede suponerse que un mismo método de control debe tener similar efectividad en sue-

los de cultivo de distintas zonas agrícolas con similar densidad de esclerocios viables. Quizá las variaciones en la efectividad de las prácticas de control de la pudrición blanca son debidas a otras condiciones tales como: condiciones climáticas propias de cada región, diferentes tipos de suelo según su composición química y/o microbiológica, diferencias en la implementación del método de control, etc.

Se analizó si en los aislados de Guanajuato había alguna correlación entre su agrupamiento y el municipio de procedencia, observándose que no hay ninguna correlación al respecto. Es probable que el intercambio anual de ajo que realizan los campesinos guanajuatenses provoquen un intercambio intenso de aislados de *S. cepivorum*.

También se investigó si los aislados se agrupaban de acuerdo a la presencia de material extracromosomal, lo cual no fue así; es decir, los aislados de *S. cepivorum* con material extracromosomal se agrupan junto con aquellos aislados a los que no se les detectó dicho material. Sin embargo,

en el dendograma el aislado (FD14) con mayor cantidad de material extracromosomal, si se separó de los otros. Desconocemos si la separación de FD14 es atribuible a la presencia del material extracromosomal pero existen otros estudios que indican que este material tiene poca influencia sobre el patrón génico obtenido con RAPD.

Así pues, aquí se reporta que los aislados mexicanos de *S. cepivorum* logran discernirse mediante análisis RAPD según la entidad federativa de donde provienen. Aunque a la fecha desconocemos cual es la presión selectiva que provoca dicha separación.

Bandas propuestas como marcadores moleculares para la identificación de *S. cepivorum*. Como se mencionó anteriormente, los patrones génicos obtenidos entre *S. cepivorum* y las cepas control (*S. rolf sii*, *R. solani*, *B. cinerea* y *M. phaseolina*) son distintos entre sí, lo cual hace factible identificar bandas que se amplifican selectivamente en aislados de *S. cepivorum* y emplearlas para identificar muestras que presumiblemente sean de este hongo. Para este fin, fue necesario identificar las bandas que comparten las cepas control y los aislados de *S. cepivorum* con cada iniciador, para descartarlas (Tabla 6). El número total de bandas analizadas fue de 337, de las cuales, 189 pertenecen exclusivamente a las cepas control; 48 se compartían entre las cepas control y las cepas de *S. cepivorum* y 100 bandas restantes son exclusivas de *S. cepivorum*, (Tabla 6).

Tabla 6. Bandas compartidas entre las cepas control y *S. cepivorum*.

INICIADOR	<i>S. rolf sii</i>	<i>R. solani</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>M. phaseolina</i>
OPA02	15	-----	1	1
OPA03	-----	-----	14	3, 8
OPA13	7	5	3, 6	-----
OPB10	2, 10	2	-----	6, 9
OPE14	6	10	3, 10	-----
OPG02	2	-----	5	-----
OPG10	-----	2, 4	2, 4, 6	-----
OPH03	-----	-----	5	-----
OPH04	1,6,8,10	-----	-----	8
OPH18	6	-----	5, 6	4, 5, 10, 13
OPH19	5, 9, 11	6,7	3, 6	-----
OPJ20	4, 5	-----	-----	-----

* Los números significan el número de la banda.

Posteriormente, se seleccionaron aquellas bandas que tuvieran una frecuencia superior al 90%, que fueran nítidas dentro del patrón génico y que se les pudiera determinar su tamaño molecular. De las bandas exclusivas de *S. cepivorum* se proponen 33 bandas que cumplen los criterios antes mencionados y que podrían ser empleadas como marcadores moleculares para identificar a este organismo (Tabla 7).

Tabla 7. Bandas propuestas como marcadores moleculares para identificación de *S. cepivorum*.

INICIADOR	BANDAS	Tamaño molecular (kpb)
OPA02	5, 6, 7, 10	1.38, 1.28, 1.19, 0.89
OPA03	2, 4, 6, 7	2.79, 2.04, 1.47, 1.25
OPA13	4, 9	1.88, 1.20
OPB10	3, 4, 5	2.11, 1.90, 1.82
OPE14	1, 2	1.30, 1.13
OPG10	1	4.7
OPH03	3, 4, 6, 7, 8, 9	2.1, 1.82, 1.19, 1.0, 0.88, 0.7
OPH04	2, 3, 7, 11, 12	2.27, 1.89, 0.95, 0.66, 0.55
OPH18	3, 7, 9	2.73, 1.32, 0.81
OPH19	4	2.14
OPJ20	6, 12	1.12, 0.35

Dado los criterios mencionados anteriormente y los resultados de la tabla 7, los iniciadores OPA02, OPA03, OPH03 y OPH04 son los iniciadores más idóneos para utilizarse en la identificación molecular de aislados de *S. cepivorum*, ya que son los que proporcionan una cantidad mayor de bandas claras y conservadas.

CONCLUSIONES

Tanto los aislados como las cepas de referencia de *S. cepivorum* mostraron patrones similares de morfología colonial y morfología de los esclerocios. Se encontró material extracromosomal en el 57.4% de la población analizada de *S. cepivorum*.

Todos los aislados y cepas de referencia de *S. cepivorum* mostraron un producto de amplificación de aproximadamente 2.2 kpb correspondiente al gen n rRNA 18S, mientras que los otros hongos fitopatógenos empleados dan el producto de amplificación esperado de aproximadamente 1.8 kpb. Todos los iniciadores probados dan bandas de amplificación. Se lograron condiciones de reproducibilidad en los RAPDs realizados, El 84.5% de las bandas analizadas son polimórficas. El análisis RAPD logra discernir claramente a los aislados de *S. cepivorum* de los otros hongos fitopatógenos empleados. Esto

apoya la conclusión de que todos los aislados son *S. cepivorum*. Con todos los iniciadores empleados, los aislados y cepas de *S. cepivorum* dan un patrón similar entre sí, pero muy diferente al que mostraron los otros hongos fitopatógenos utilizados. La disimilitud genética promedio entre los aislados de *S. cepivorum* es de 9.4%. Ello implica que la recombinación genética en los aislados de este fitopatógeno es poca. El dendograma, de manera general, agrupa a los aislados según la entidad federativa de donde provienen, pero no se logra agrupar a los aislados guanajuatenses según el municipio de origen, tampoco agrupa a los aislados que tienen material extracromosomal. Se proponen 33 bandas como marcadores moleculares para identificación de *S. cepivorum*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Octavio Martínez de la Vega del CINVESTAV-Irapuato, por su ayuda en el análisis matemático de los datos, al Dr. Alberto Flores Martínez por el apoyo en la recolección de muestras y por las sugerencias y críticas al trabajo desarrollado, así como también al Dr. Felipe Delgadillo (INIFAP-Celaya) y Dr. Alfredo Herrera-Estrella (CINVESTAV-Irapuato) por proporcionarnos las cepas analizadas. Al Dr. Everardo López Romero por la crítica al trabajo. Francisco Luna Martínez fue becario del CONACYT. Este proyecto recibió apoyo del SIHGO proyectos: ALIM 16/96 y 19990201016

REFERENCIAS

- Backhouse, D. and Stewart, A. 1987. Anatomy and histochemistry of resting and germinating sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 89 (4): 561-567
- Beck, R. J., Smith, O. P., Tooley, P. W., Peterson, G. L. and Bonde, M. R. 1994. Characterization of double-stranded RNA from *Tilletia indica*. *Mycologia*, 86:656-659.
- Carbone, I., Anderson, J. B. and Kohn, L. M. 1995. A group-1 intron in the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Gen.*, 27:166-176.
- Castlebury, L. A. and Domier, L. L. 1998. Small subunit ribosomal RNA gene phylogeny of *Plasmodiophora brassicae*. *Mycologia*, 90 (1):102-107.
- Chun, S. J. and Lee, Y. H. 1997. Inheritance of dsRNAs in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 148:159-162.
- Coley-Smith, J. R. 1960. Studies of the biology of *S. cepivorum* Berk. IV. Germination of sclerotia. *Ann. Appl. Biol.*, 48:8-18.
- Coley-Smith, J. R. and Parfitt, D. 1986. Some effects of Diallil Disulphide on Sclerotia of *Sclerotium cepivorum*: Possible Novel Control Method for White Rot Disease of Onions. *Pestic. Sci.*, 37:587-594.
- Coley-Smith, J. R. and Entwistle, A. R. (1988). Susceptibility of cultivars of garlic to *Sclerotium cepivorum*. *Plant pathol.*, 37(2):261-26
- Crowe, F. J., Hall, D. H., Greathead, A. S. and Baghott, K. G. 1980. Inoculum Density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of White Rot of Onion and Garlic. *Phytopathology*, 70: 64-69
- Crowe, F. J. and Hall, D. H. 1980a. 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. and Hall, D. H. 1980b. Soil Temperature and Moisture Effects on *Sclerotium* Germination and Infection of Onion Seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology*, 70: 74-78.

- Crowe, F., Mohan, S. K. and Schwartz, F. H., 1995. Other Botrytis Diseases. En: *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. Ed. Schwartz, F. H. and Mohan, S. K. 1995. ASP Press. p. 18.
- DePriest, P. T. 1993. Small subunit rDNA variation in a population of lichen fungi due to optional group-I introns. *Gene*, 134:67-74
- DePriest, P. T. and Been, M. D. 1992. Numerous Group I Introns with Variable Distributions in the Ribosomal DNA of a Lichen Fungus. *J. Mol. Biol.*, 228: 315-321.
- Duggal, A., Dumas, M. T., Jeng, R. S. and Hubbes, M. 1997. Ribosomal variation in six species of *Fusarium*. *Mycopathologia*, 140:35-49
- Earnshaw, D. and Boland, G. J. 1997. Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathol.*, 46(2):229-238.
- Fatehi, J. and Bridge, P. 1998. Detection of multiple rRNA-ITS regions in isolates of *Ascochyta*. *Mycol. Res.*, 102 (6):762-766
- Flores A., Chet, I. y Herrera, A. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over expression of the proteinase encoding gene prb1. *Curr. Gen.*, 31: 30-37
- Foster, L. M., Kozac, K. R., Loftus, M. G., Stevens, J. J. and Ross, I. K. 1993. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycol. Res.*, 97(7):769-781.
- Griffiths, A. J. F. 1995 Natural plasmids of Filamentous Fungi. *Microb. Reviews*, 59:673-685
- Harlton, C. E., Lévesque, C. A. and Punja, Z. K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology*, 85:1269-81
- Jiménez, R. M., Blanco, M. A. and Sackston, W. E. 1983. Incidence and Distribution of Charcoal Rot of Sunflower Caused by *Macrophomina phaseolina* in Spain. *Plant Dis.*, 67: 1033-1036
- Kempken, F. and Kück, U. 1998. Transposons in filamentous fungi-facts and perspectives. *BioEssays*, 20:652-659
- Kohn, L. M. and Grenville, D. J. 1989. Anatomy and Histochemistry of stromatal anamorphs in the *Sclerotiniacea*. *Can. J. Bot.*, 67: 371-393.
- Laborde, J. A. 1987. Coexistence of garlic white rot with commercial production in Central Mexico. Proceedings of the third International workshop on *Allium* white rot. Section 1. (Ed. By A.R. Entwistle). Wellesbourne, U.K. T.W. Printing Associates Ltd. Leamington Spa, U.K. p.24
- Lewin, B. 1997. *Genes VI*. Oxford University Press and Cell Press. Printing in U.S.A.
- Littley, E. R. and Rahe, J. E. 1992. Sclerotial morphogenesis in *Sclerotium cepivorum* *in vitro*. *Can. J. Bot.*, 70:772-778.
- Márquez-Lona, E. M. 1998. Caracterización molecular de aislados de *Sclerotium cepivorum* a partir de suelos infectados de la región de Celaya. Tesis para obtener el título de Q.F.B., Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.
- Martínez, O. and Simpson, J. September 1998. *Analysis of AFLP data to construct dendograms*. International Training Course on Analysis and Manipulation of the Fungal Genome. CINVESTAV. Irapuato, Gto., México. 94-99
- Nei, M. and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76 (10):5269-5273.

- Overmeyer, C., Lünemann, S., von Wallbrunn, C. and Meinhardt, F. 1996. Genetic variability among isolates and sexual offspring of the plant pathogenic fungus *Calonectria morganii* on the basis of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Curr. Microb.*, 33:249-255.
- Pérez, M. L. 1999. *Estructura poblacional de Sclerotium cepivorum Berk en México*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. CINVESTAV. Irapuato, Gto., México.
- Piatti, P., Cravanzola, F., Bridge, P. D. and Ozino, O. I. 1998. Molecular characterization of *Beuveria brongniartii* isolates obtained from *Melolontha melolontha* in Valle d'Aosta (Italy) by RAPD-PCR. *Lett. in Appl. Microbiology*, 26:317-324.
- Pinto, C. M, Maffia, L. A, Berguer, R. D, Mizobuti, E. S, and Casali, V. W. 1998. Progress of White Rot in garlic cultivars planted at Different times. *Plant Dis.*, 82:1142-1146.
- Punja, Z. K. and Damiani, A. 1996. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. *Mycologia*, 88(5):694-706.
- Raina, K., Jackson, N., and Chandlee, J.M. 1997. Detection of genetic variation in *Sclerotinia homeocarpa* isolates using RAPD analysis. *Mycol. Res.*, 101(5):585-590.
- Rosewich, U. L. and McDonald, B. A. 1994. DNA Fingerprinting in Fungi. *Meth. Mol. Cell. Biol.*, 5:41-48.
- Sharma, T. and Tewari, P. 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.*, 102(7):807-814.
- Skroch, P., Tivang, J. and Nienhuis, J. 1992. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data, En: *Joint Plant Breeding Symposia*. Crop Science Society of America - American Society for Horticultural Science - American Genetic Association, Minneapolis, Mn. pp. 26-30
- Tan, M. K., Wong, P. T. W. and Holley, M. P. 1994. Characterization of nuclear ribosomal DNA (rDNA) in *Gaeumannomyces graminis* and correlation of rDNA variation with *G. graminis* varieties. *Mycol. Res.*, 98(5):553-561.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, 18(24):7213-7218.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc. San Diego California, pp 315-322.
- Williams, G. K., Kubelik, A. R. Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18(22):6531-6535.
- Young, N. and Ashford, A. E. 1995. Apoplastic permeability of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum* and *Rhizoctonia solani*. *New Phytol.*, 131:33-40