



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO
en Celaya



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA

TESIS

Silenciamiento del gen *AaAlli* durante la resistencia de *Allium ampeloprasum*
L a la pudrición blanca ocasionada por *Sclerotium cepivorum* B empleando
V-VIGS

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

P R E S E N T A

IBQ. Ángel Basurto Rentería

Asesores:

Director: Dr. Lorenzo Guevara Olvera

Secretario: Dr. Humberto Ramírez Medina

Vocal: Dr. Leopoldo González Cruz

Asesor externo: M. en C. Elena Heredia García

Marzo del 2020, Celaya, Guanajuato



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Celaya, Gto., 03/Marzo/2020

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

No. de Oficio PIBQ-01-01-2020

ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ
JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
P R E S E N T E.

De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, con el fin de determinar la aprobación de impresión del proyecto de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulado:

"Silenciamiento del gen *AaAlli* durante la resistencia de *Allium ampeloprasum* L a la pudrición blanca ocasionada por *Sclerotium cepivorum* B empleando V-VIGS"

Presentado por el (la) pasante: C. IBQ. Ángel Basurto Rentería, comunicamos a Usted que esta Comisión Revisora ha tenido a bien aprobar la impresión de este trabajo.

Dr. Lorenzo Guevara Olvera
Presidente

Dr. Humberto Ramírez Medina
Secretario

Dr. Leopoldo González Cruz
Vocal

M.C. Elena Heredia García
Asesor Externo



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
en Celaya

POSGRADO DE INGENIERÍA
BIOQUÍMICA

Vo. Bo.

DR. LEOPOLDO GONZALEZ CRUZ
COORDINADOR DEL POSGRADO
INGENIERIA BIOQUIMICA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco fraternalmente al Dr. Lorenzo Guevara Olvera por todo el tiempo dedicado a asesorar y revisar el proyecto de Tesis

A la M. en C. Elena Heredia García y al INIFAP por proporcionar el material biológico y fina asesoría.

A mis asesores Dr. Humberto Ramírez Medina y Dr. Leopoldo González Cruz por su tiempo, dedicación y entrega para las revisiones.

Al Dr. Luis Alejandro Alcaraz Caracheo y M. en C. Roberto Edú Arriaga Medina por su disposición durante la medición de fuerza en el laboratorio de Mecánica.

A Lupita Barrón, Diego Ortíz, Janette Zavala, Karina López, Dr. Cervantes, Dr. Silva, Dr. Acosta, por apoyarme, brindarme diversión y enseñarme a luchar contra la frustración.

A Cinthia Jilote, Diana flores, Lilia Trejo, Paola Segura, Gustavo Marín y Karen Zárate; por permitirme transmitir un poco del conocimiento adquirido en el laboratorio de Biología Molecular.

A CONACyT por la beca otorgada durante el periodo del posgrado.

DEDICATORIA

A mis padres

Dedicado especialmente a mi padre Odon Basurto Espino quien durante el periodo de maestría me ofreció el mejor consejo de vida. A mi amada madre Ricarda por siempre estar conmigo.

A mis hermanos

Godofredo, Elena, Francisca, Pedro, Juventina, Tirzo, Sabas, Gregorio, Constantino, Eleuterio y Servando. Esto es por ustedes.

A mis primos Ivan y Elida, de quienes su apoyo se sintió desde que fui aceptado en el posgrado.

A mis amigos

Jaime Silva, Tania Sandoval, Itzamar Cervantes, Alejandro Rubio, Francisco Soto, Marichuy Gómez, Ricardo López. Gracias a sus consejos y apoyo moral; fue posible superar cada etapa de desarrollo personal y académicamente.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
I ANTECEDENTES	4
1.1 El ajo.....	4
1.1.1 Composición general y química del ajo.....	5
1.1.2 <i>Allium ampeloprasum</i> L.....	6
1.1.3 Importancia del ajo	8
1.2 Pudrición blanca	9
1.3 <i>Stromatinia cepivora</i> B.....	10
1.4 Genómica funcional.....	11
1.5 Mutagénesis química	11
1.5.1 Mutagénesis insercional	12
1.6 Silenciamiento génico postranscripcional (PTGS).....	13
1.6.1 Silenciamiento génico inducido por virus	15
1.7 PHYVV	17
1.8 Gen <i>AaAlli</i>	19
1.8.1 Alinasa	20
1.8.2 Aliina	21

1.8.3 Alicina.....	21
1.8.3.1 Actividad antifúngica de la alicina	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
METODOLOGÍA	27
2.1. Construcción del vector	27
2.1.1. Diseño de oligonucleótidos.....	27
2.1.2 Crecimiento de la clona 716	27
2.1.3 Extracción de ADN plasmídico por precipitación	28
2.1.4. Amplificación por PCR del fragmento del gen <i>AaAlli</i>	29
2.1.5. Purificación de ADN en producto de PCR mediante elución.....	30
2.1.6 Ligación al vector pGEM [®] -T Easy	31
2.1.7. Transformación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> (DH5α)..	32
2.1.8. Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción <i>Eco</i> RI.....	32
2.1.9. Digestión con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Sma</i> I para liberar el fragmento del gen <i>AaAlli</i>	33
2.1.10 Extracción del vector VIGS:: <i>AaPR</i> y eliminación del fragmento <i>AaPR</i> para liberar el vector (PHYVV)	34
2.1.11 Obtención del V-VIGS	36
2.2 Lavado y desinfección de ajo	36
2.3. Cultivo del hongo <i>Sclerotium cepivorum</i> B	37
2.4. Establecimiento de la interacción planta-patógeno	37
2.5 Silenciamiento del gen <i>AaAlli</i>	37

2.5.1 Extracción de ARN: Método del TRIzol® Reagent	38
2.5.2 Síntesis de ADN complementario.....	39
2.5.3 Confirmación del silenciamiento	40
2.5.4 Análisis del fenotipo.	40
2.6 Análisis estadístico	41
III RESULTADOS	42
3.1 Recuperación de <i>Sclerotium cepivorum</i> B.....	42
3.2 Análisis <i>in silico</i>	43
3.3 Construcción de V-VIGS.....	45
3.4 Interacción planta-patógeno	55
3.5 Expresión del gen <i>AaAlli</i> a las 60 h.....	56
3.6 Silenciamiento del gen <i>AaAlli</i>	58
3.6.1 Confirmación del silenciamiento del gen <i>AaAlli</i> a las 60 h mediante RT-PCR	58
3.6.2 Fenotipo de los ajos a los 15 días.....	60
3.6.3 Fenotipo de los ajos a los 22 días.....	62
3.7 Análisis estadístico	65
3.7.1 Análisis estadístico de los ajos a los 15 días	65
3.7.2 Análisis estadístico de los ajos a los 22 días	66
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	69
REFERENCIAS	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Compuestos sulfurados del ajo.....	6
Tabla 1.2 Clasificación taxonómica del ajo elefante.....	7
Tabla 1.3 Producción mundial de ajo.....	8
Tabla 1.4 Producción nacional general de ajo.....	8
Tabla 1.5 Producción nacional por estado.	9
Tabla 1.6 Taxonomía de <i>Stromatinia cepivora</i> B.	10
Tabla 1.7 Lista de VIGS empleados en plantas.	17
Tabla 2. 1 Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del fragmento <i>AaAlli</i>	29
Tabla 2. 2 Condiciones de PCR para la amplificación del fragmento <i>AaAlli</i>	30
Tabla 2. 3 Mezcla de reacción de ligación al vector pGEM - T Easy.....	31
Tabla 2. 4 Mezcla de reacción para la digestión con <i>Eco</i> RI.	33
Tabla 2. 5 Mezcla de reacción para la doble digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Sma</i> I para liberar el fragmento <i>AaAlli</i>	34
Tabla 2. 6 Mezcla de reacción para la doble digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Sma</i> I para el vector PHYVV.	35
Tabla 2. 7 Componentes para reacción de ligación.....	36
Tabla 3. 1 Resultados de la búsqueda en Blastx.	44
Tabla 3. 2 Cuantificación del ARN obtenido a las 60 h.....	59
Tabla 3. 3 Resultados de la medición de fuerza aplicada a los 15 días después de interacción. ...	61
Tabla 3. 4 Resultados de la medición de fuerza aplicada a los 22 días después de interacción. ...	64
Tabla 3. 5 Resultados del análisis de varianza a los 15 días.	65
Tabla 3. 6 Resultados del análisis de varianza a los 22 días.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Morfología del ajo.	5
Figura 1.2 Representación esquemática del proceso de silenciamiento postranscripcional (PTGS) en plantas (Martínez, 2016).....	15
Figura 1.3 Componente A y modificaciones realizadas al begomovirus PHYVV.	19
Figura 1.4 Composición química de la aliina.....	21
Figura 1.5 Reacción química de la formación de la alicina.	21
Figura 1.6 Supervivencia de <i>Aspergillus fumigatus</i> (●), <i>Aspergillus niger</i> (■), <i>Aspergillus terreus</i> (▲), <i>Aspergillus flavus</i> (◆) respecto al tiempo a una dosis de alicina (16 mg/L).	22
Figura 2.1 Condiciones de PCR para <i>GAPDH</i>	39
Figura 3.1 Germinación de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> B	42
Figura 3.2 Crecimiento de <i>Sclerotium cepivorum</i> B en medio PDA.	43
Figura 3.3 Resultados del alineamiento múltiple de la clona 716 de alinasa, respecto a la primer secuencia reportada en <i>Allium sativum</i> (Van Damme, 1992) y la primera reportada en <i>Allium ampeloprasum</i> (Sayadi <i>et al.</i> , 2017).....	44
Figura 3.4 Electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-4, ADN plasmídico.	45
Figura 3.5 Comprobación del inserto <i>AaAlli</i> mediante digestión. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-4, producto de la digestión con <i>Eco</i> RI.	46
Figura 3.6 Condiciones programadas para el gradiente de temperatura de alineamiento.	47
Figura 3.7 Determinación de temperatura de alineamiento Carriles: MT, Marcador de tamaño, 2-9; temperaturas de 60-70 °C.....	47
Figura 3. 8 Electroforesis de los productos de PCR a 66 °C. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-4, producto de PCR.	48
Figura 3. 9 Electroforesis en gel de agarosa del producto de elución. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1, producto de elución del fragmento del gen <i>AaAlli</i>	48
Figura 3. 10 Digestión con <i>Eco</i> RI. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-4, digestiones con <i>Eco</i> RI.	49

Figura 3. 11 Digestión con el par de enzimas <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I. Carriles: MT; Marcador de tamaño, 1-2; digestiones con <i>Bam</i> HI y <i>Sma</i> I.	50
Figura 3. 12 ADN plasmídico de la construcción V-VIGS:: <i>AaPR</i> . Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-3, muestras de ADN plasmídico.	51
Figura 3. 13 Digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Sma</i> I. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1, ADN plasmídico digerido.	51
Figura 3. 14 Digestión de V-VIGS:: <i>AaPR</i> y pGEM:: <i>AaAlli</i> con <i>Bam</i> HI y <i>Sma</i> I. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-3, digestión de V-VIGS:: <i>AaPR</i> ; 4-5, digestiones de pGEM:: <i>AaAlli</i>	52
Figura 3. 15 Electroforesis en gel de agarosa del producto de elución del vector PHYVV A y el fragmento del gen <i>AaAlli</i> . Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1, vector PHYVV A; 2, fragmento del gen <i>AaAlli</i>	53
Figura 3. 16 Comprobación de la construcción V-VIGS:: <i>AaAlli</i> . Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1, digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Sma</i> I; 2, PCR de la construcción.	53
Figura 3. 17 ADN plasmídico de PHYVV B. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-2, ADN plasmídico de PHYVV B.	54
Figura 3. 18 Digestión con <i>Bam</i> HI de PHYVV B. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-2, digestiones de PHYVV B.	55
Figura 3. 19 Interacción planta-patógeno a los 15 días. a: <i>Allium sativum</i> var jaspeado- <i>Sclerotium cepivorum</i> , b: <i>Allium ampeloprasum</i> - <i>Sclerotium cepivorum</i>	56
Figura 3. 20 Extracción de ARN total a las 60 h. Carriles; MT, marcador de tamaño; 1-3, ARN de los ajos en interacción.	57
Figura 3. 21 RT-PCR a las 60 h. Carriles; MT, Marcador de tamaño; 1,Control positivo <i>GAPDH</i> ; 2-4, RT-PCR de ajos en interacción.	57
Figura 3. 22 Extracción de ARN a las 60 h. Carriles; MT, Marcador de tamaño; 1-3, ARN de ajos no silenciados; 4-6, ARN de ajos silenciados.	58
Figura 3. 23 RT-PCR del silenciamiento a las 60 h. Carriles; MT, Marcador de tamaño; 1-3, RT-PCR de ajos no silenciados; 4-6; RT-PCR de ajos silenciados. <i>GAPDH</i> en cada carril como control.	59
Figura 3. 24 Evaluación fenotípica a los 15 días después de interacción. a: <i>Allium sativum</i> var Texcoco tipo Taiwan, b: <i>Allium ampeloprasum</i> silenciado, c: <i>Allium ampeloprasum</i> no silenciado.	61

Figura 3. 25 Deformación generada por la fuerza aplicada sobre el ajo utilizando la maquina universal Zwick/Roell Z050.....	62
Figura 3. 26 Evaluación fenotípica a los 22 días después de interacción. a: <i>Allium sativum</i> var Texcoco tipo Taiwan, b: <i>Allium ampeloprasum</i> silenciado, c: <i>Allium ampeloprasum</i> no silenciado.....	63
Figura 3. 27 Comparación de medias de Tukey de la variable Fuerza a los 15 días. Valores con la misma letra son estadísticamente similares ($\alpha= 0.05$).....	65
Figura 3. 28 Comparación de medias de Tukey de la variable Fuerza a los 22 días. Valores con la misma letra son estadísticamente similares ($\alpha= 0.05$).....	67

RESUMEN

Existen millones de secuencias de genes que han sido depositados en base de datos internacionales. Así, mediante el análisis de esos datos, la genómica funcional tiene su campo de acción. La cuál se define como el estudio de la función de los elementos codificados en los genomas y el papel que estos elementos juegan en los procesos celulares.

En el 2016; Licona-Juárez generó un banco substractivo que contiene clonas de fragmentos de genes expresados diferencialmente (ESTs) durante la interacción incompatible entre el ajo elefante (*Allium ampeloprasum* L) y *Sclerotium cepivorum* B. Se ha elegido trabajar con el gen *AaAlli*, el cual codifica para una alinasa, enzima que cataliza la conversión de aliína en alicina, a la cual, de acuerdo a la literatura se le atribuyen propiedades antifúngicas. En la búsqueda en blastx presenta un valor E de $1e-135$ respecto a la accesión AYN25506.1, primera alinasa reportada para *A. ampeloprasum* L y el fragmento del gen *AaAlli* del banco; se ubica al extremo C terminal.

Para la construcción del V-VIGS, se generaron por PCR los sitios *Bam* HI y *Sma* I para que el fragmento de 323 pb del gen *AaAlli* fuera clonado en el componente A de PHYVV, en todas las digestiones enzimáticas se observó la liberación del fragmento esperado. El mismo comportamiento se presentó en la construcción V-VIGS::*AaPR*, con el fragmento de 280 pb del gen *AaPR* al digerir con el par de enzimas *Bam* HI y *Sma* I. Se validó el componente B con la enzima *Bam* HI observándose una banda de 3 000 pb correspondientes al vector pBluescript y la segunda de 2 571 pb de PHYVV B.

Los resultados del RT-PCR a las 60 h, indican una disminución de la expresión del gen *AaAlli*, durante la evaluación fenotípica se observó la pérdida de resistencia del ajo elefante a los 22 días de interacción con el patógeno y mostró fenotípicamente diferencia estadística significativa respecto a los ajos no silenciados.

ABSTRACT

There are millions of gene sequences that have been deposited in international databases. Thus, by analyzing these data, functional genomics has its action field. Which is defined as the study of the function of the elements encoded in genomes and the role that these elements play in cellular processes.

In 2016; Licona-Juárez generated a subtractive bank that contains clones of differentially expressed gene fragments (ESTs) during the incompatible interaction between elephant garlic (*Allium ampeloprasum* L) and *Sclerotium cepivorum* B. It has been chosen to work with the *AaAlli* gene, which codes for an alliinase, an enzyme that catalyzes the conversion of alliin into alliin, to which, according to the literature, antifungal properties are attributed. In the blastx search, it has an E value of 1e-135 with respect to the accession AYN25506.1 the first alliinase reported for *A. ampeloprasum* L, and the *AaAlli* gene fragment of the bank; is located at the C terminal end.

For the construction of the V-VIGS, the *Bam* HI and *Sma* I sites were generated by PCR so that the 323 bp fragment of the *AaAlli* gene was cloned into the A component of PHYVVV, in all the enzymatic digestions the expected fragment release was observed . The same behavior occurred in the V-VIGS::*AaPR* construct, with the 280 bp fragment of the *AaPR* gene when digesting with the pair of *Bam* HI and *Sma* I enzymes. Component B was validated with the *Bam* HI enzyme observing a band 3,000 bp corresponding to the pBluescript vector and the second 2 571 bp of PHYVVV B.

The results of the RT-PCR at 60 h, indicate a decrease in the expression of the *AaAlli* gene, during the phenotypic evaluation the loss of resistance of elephant garlic was observed at 22 days of interaction with the pathogen and showed phenotypically significant statistical difference with respect to the garlic not silenced.

INTRODUCCIÓN

El ajo es una planta diploide de propagación clonal ($2n = 16$) (Ipek, 2005) botánicamente pertenece al género *Allium* y a la familia *Alliaceae*, la cual incluye cultivos importantes como las cebollas. Es una hortaliza perenne, la cual tiene su origen en Asia Central, en estado silvestre se encuentra en la India, el Cauca y la parte occidental, desde Asia Central, a través de Asia Menor y Egipto, se difundió por toda Europa, de donde pasó a África y luego del descubrimiento, a América (Navarro, 2007).

Según datos reportador por la FAOSTAT, México produce el 0.3 % mundial, el estado con mayor producción es Zacatecas (53 105 ton) seguido por Guanajuato (12 906 ton). La producción de ajo en se ve afectada por la pudrición blanca ocasionada por el hongo *Sclerotium cepivorum*. Este hongo afecta solamente a las especies de *Allium* y desarrolla estructuras de resistencia que presentan la capacidad de sobrevivir en el suelo por más de 20 años sin perder su patogenicidad (Schwartz y Mohan, 2008). La pudrición blanca afecta directamente el bulbo causando pérdidas que pueden llegar al 100 % (Crowe *et al.*, 1980).

Las especies de *Allium* típicamente contienen una alta concentración de aminoácidos no proteicos de azufre que son responsables de sus características. Una de las clases de estos metabolitos secundarios de azufre no volátil, los sulfóxidos de S-alk (en) il-L-cisteína, que también se conocen como dialiltiosulfinatos, son los responsables del aroma característico de estos cultivos (Lancaster 1988), un ejemplo de dialiltiosulfinato es la alicina.

La actividad antifúngica de la alicina se ha reportado contra *Aspergillus* spp (Shadkchan *et al.*, 2004) y *Candida albicans* (Young-Sun *et al.*, 2012); por lo tanto, el silenciar el gen que codifica para alinasa, enzima que cataliza la conversión de alfina en alicina es de gran importancia para determinar la participación de este sulfóxido en la resistencia de *A. ampeloprasum* L contra *S. cepivorum* B.

I ANTECEDENTES

1.1 El ajo

El ajo como cultivo ha sido reconocido desde la antigüedad y dentro del género *Allium* es el segundo más importante después de la cebolla. A pesar de su importancia y el aumento de la producción, el rendimiento se ve afectado por diversos factores bióticos y abióticos (Cheruth *et al.*, 2008). Debido a estas afectaciones; los costos de producción son elevados y por lo tanto los agricultores no están dedicados en su totalidad a la producción de dicha hortaliza (Fabara, 2012). En la actualidad es valorado por su sabor y su impacto en la industria alimentaria, mientras que la investigación continúa para descubrir y afinar su utilidad con fines medicinales (Boriss, 2006).

El ajo es una planta de nombre científico *Allium sativum*, el término *Allium* procede de la palabra All, que significa “ardiente o caliente” mientras que el nombre “*sativum*” procede del latín que significa “cultivado” (García *et al.*, 2000). Tiene origen en Asia Central, en estado silvestre se encuentra en la India, el Cauca y en la parte occidental, desde Asia Central, a través de Asia Menor y Egipto, se difundió por toda Europa, de donde pasó a África y luego del descubrimiento, a América.

El género *Allium* contiene más de 300 especies de plantas; entre ellas se encuentra *Allium sativum* (ajo), que es un bulbo perteneciente a la familia Liliaceae y subfamilia Allioideae (Bender-Bojalil *et al.*, 2013). Es una planta bulbosa, vivaz y rústica cuyo sistema radicular consiste en una raíz bulbosa, compuesta por 20 o más bulbos, reunidos en su base por medio de una película delgada (Alonso, 2007). El verdadero tallo del ajo es pequeño, de aproximadamente 3 cm de diámetro y 5 mm de altura, en forma de plato y de él nacen las hojas y las raíces. Las hojas están formadas por una vaina y un limbo aplanado, estrecho, largo y fistuloso, con un nervio central desarrollado y puntiagudo al final. Las vainas son de forma cilíndrica y llegan a constituir el falso tallo o pseudotallo corto y erecto, característico de la planta. Las hojas alcanzan un tamaño de 20 a 50 cm de longitud y de 1 a 3 cm de ancho. En las vainas de las hojas no se acumulan sustancias nutritivas y al morir éstas, se convierten en protectoras de los bulbos. El bulbo del ajo está compuesto por varios bulbillos, denominados dientes, unidos a una base. En las axilas de las hojas se forman de seis a siete dientes, por lo que reciben el nombre de hojas fértiles, y las hojas de la primera hasta la

quinta o sexta reciben el nombre de hojas estériles. Los dientes son envueltos por las túnicas interiores y el bulbo completo por las exteriores. El tamaño de los dientes formados en las axilas de las hojas fértiles de distintas categorías, es desigual. Como regla fundamental, los dientes más grandes se forman en las hojas fértiles y luego su peso promedio disminuye paulatinamente. El número de dientes en un bulbo no es igual para las diferentes variedades (Sarita, 2000). Las flores son blancas o rosadas, conformando una umbela en el extremo del tallo que se cierra antes de la floración (Alonso, 2007).

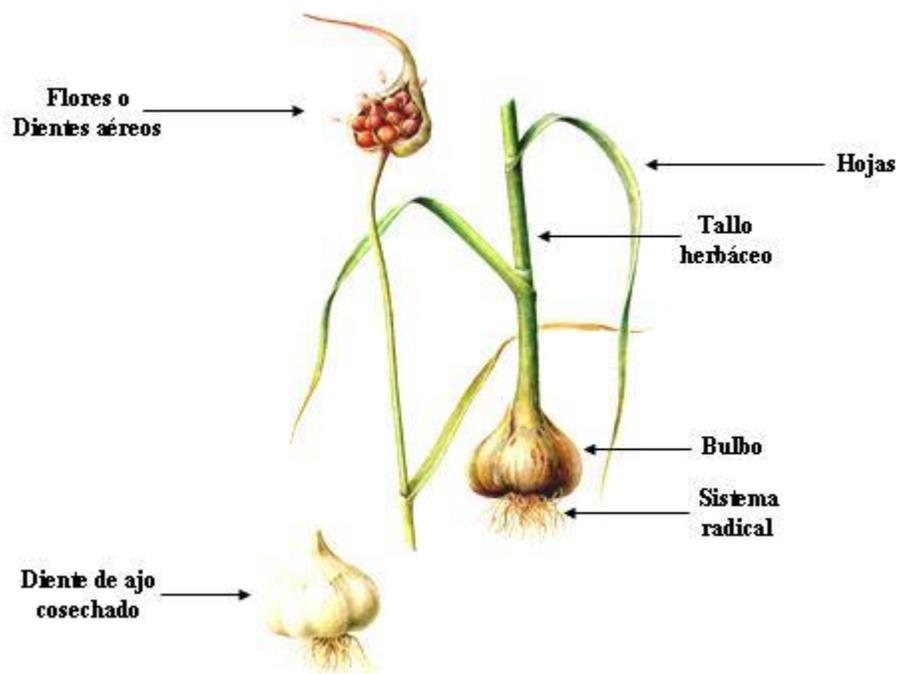


Figura 1.1 Morfología del ajo.

1.1.1 Composición general y química del ajo

El ajo se compone principalmente de agua 56-68 % en peso, seguido de los carbohidratos 26-30 %. Los componentes con propiedades nutraceuticos, son los compuestos sulfurados (11-35 mg/100 g de ajo fresco). Otros componentes son las vitaminas (ácido ascórbico 30 mg/100 g peso fresco; vitamina E 9.4 µg/g) y minerales como el Selenio (0.014 mg/100 g) (Lawson, 1993).

Los compuestos sulfurados (azufrados) han sido considerados la clave de los beneficios para la salud que este aporta. En el siguiente cuadro se enlistan los compuestos sulfurados y sus posibles acciones biológicas.

Tabla 1.1 Compuestos sulfurados del ajo.

Característica	Compuesto	Actividad biológica
Soluble en agua	S-alil-cisteína	Hipocolesterolemiantes, antioxidantes, quimioprotectores contra el cáncer. Favorecen la acción desintoxicante del hígado frente a sustancia químicas.
	S-alil-mercaptocisteína	
	S-metil cisteína	
	γ -glutamil cisteína	
Solubles en aceite	Sulfuro dialfílico	Antibiótico, antifúngico, antiviral Desintoxicante. Anticancerígeno, previene daños químicos del ADN. Hipocolesterolemiante, previene la arterosclerosis antitumoral. Hipotensora, hipoglucemiante. Antiinflamatorio, vasodilatador, hipotensor, antibiótico.
	Disulfuro dialfílico (dialil disulfuro)	
	Alicina (Óxido de disulfuro dialfílico)	
	Trisulfuro dialfílico	
	Trisulfuro alilmetílico	
	Aliina	
	Ditiínas	
	Viniloditiínas	
	Ajoeno	

1.1.2 *Allium ampeloprasum* L

Allium ampeloprasum pertenece al género *Allium* y originalmente se encuentra en Asia Central y el norte de Europa. Sin embargo, puede ser cultivado en otras regiones del mundo. *A. ampeloprasum* es una planta bulbosa perenne utilizada en la industria alimentaria. Esta planta se usa como agente antiasmático, antiséptico, diurético, vasodilatador y expectorante en la medicina tradicional iraní (Lim, 2015).

En la **Tabla 1.2** se muestra su clasificación taxonómica.

Tabla 1.2 Clasificación taxonómica del ajo elefante.

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Amaryllidaceae
Género	<i>Allium</i>
Especie	<i>A. ampeloprasum</i>

(Govaerts, 2017)

Las principales características según información obtenida del jardín botánico Cabildo de Gran Canaria publicados en el 2013 (Meza, 2017), son su bulbo esférico, con túnica externa membranosa, cuenta con escapo (tallo) de 130 a 150 cm, provisto de hojas planas, envainando en la parte basal del tallo. La inflorescencia llega a medir de 8 a 9 cm, siendo esférica y densa.

Su sistema radicular se encuentra conformado por una raíz bulbosa; el bulbo alcanza de 8 a 10 cm de diámetro y está conformado por cuatro a seis bulbillos periféricos. Para la protección de los bulbillos se encuentran las catáfils, que son capas espesas pero frágiles cuando están secas o también llamadas túnicas. Las túnicas externas son blancas y se parten con facilidad, sobre todo cuando se retrasa la cosecha, a su vez la túnica que envuelve el diente es de color blanco marfil.

Esta especie al igual que *A. sativum* L no produce semilla, se caracteriza por tener un desarrollo inicial (brotación) lento, pero posteriormente presenta un desarrollo de planta muy vigoroso y tiene un período vegetativo de 210 a 230 días aproximadamente (Rabinowitch y currah, 2002).

El sabor de los dientes es más suave que el del ajo común, por lo que se consume crudo (Stephens, 2003). Se produce comercialmente en Uruguay, Argentina, Estados Unidos, Chile, Rusia, Egipto, Grecia e India. Se trata de una hortaliza “menor” comercializada por la vía gourmet, consumida en fresco y apreciada por el sabor suave y el gran tamaño de sus dientes (Lanzavechia, 2009).

1.1.3 Importancia del ajo

El valor del ajo como cultivo es reconocido desde la antigüedad. Se estima que ha sido cultivado por más de 5 000 años. En general, ha sido empleado como alimento, condimento y medicina por muchas culturas en Asia y la región mediterránea (Ipek *et al.*, 2005). Ha sido considerado valioso debido a sus efectos antibacterianos, antioxidantes, anticancerígenos y reductores del colesterol (Park y Kim, 2011). Según datos publicados por la FAOSTAT (**Tabla 1.3**); la producción mundial para el año 2017 fue de 28,164,055 Ton, siendo china el principal productor y México se ubicaba en el lugar número 20.

Tabla 1.3 Producción mundial de ajo.

Producción mundial 2017	
Área cosechada (ha)	1 577 779
Rendimiento (ton/ha)	17.8504
Producción (ton)	28 164 055

(FAOSTAT, 2018)

Según datos reportador por el SIAP, la producción nacional hasta el 31 de Agosto del 2018 fue de 90 578 ton como se muestra en la **Tabla 1.4**.

Tabla 1.4 Producción nacional general de ajo.

Producción nacional 2018 (31 de Diciembre del 2018)	
Superficie sembrada (ha)	7 341
Superficie cosechada (ha)	6 976
Producción (ton)	90 578
Rendimiento (ton/ha)	12.983

(SIAPa, 2018)

De la producción nacional, el principal productor fue Zacatecas como se muestre en la **Tabla 1.5**.

Tabla 1.5 Producción nacional por estado.

Estado	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
Zacatecas	3 424	3 358	55 552	16.543
Guanajuato	988	988	10 732	10.854
Sonora	575	575	5 296	9.211
Puebla	526	526	4 132	7.855
Baja California	312	312	3 242	10.391
Nuevo León	257	253	2 614	10.324
Aguascalientes	135	135	1 694	12.552
Oaxaca	188	188	1 384	7.364
Veracruz	80	80	1 284	16.044
Querétaro	105	105	879	8.371

(SIAPb, 2018)

El rendimiento disminuye debido a factores bióticos y abióticos; dentro de los factores bióticos el más importante de ellos es la enfermedad de la pudrición blanca que ataca a especies del género *Allium*.

1.2 Pudrición blanca

La pudrición blanca, es una de las enfermedades más importantes para los cultivadores de ajo y cebolla, ha causado problemas en países de Europa, África Oceanía y América, en los cuales ha ocasionado pérdidas considerables en dichos cultivos. Se indicó que el punto para la diseminación de este hongo y que afecta a productores de cebolla en el mundo, está en Europa (Granados, 2005). La pudrición blanca es causada por el hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* B, la cual, es predominante en cultivos de alliáceas y trae consecuencias económicas devastadoras.

La enfermedad puede presentarse tanto en el crecimiento vegetativo como floración e incluso postcosecha. Los síntomas son característicos, las plantas presentan un amarillamiento inicial progresivo desde las puntas hasta la base de las hojas más viejas, posteriormente se marchitan y finalmente mueren (Valle, 1989). Tanto las raíces como el bulbo son atacados por el hongo, mismo que se manifiesta en forma abundante de micelio blanco algodonoso en toda la superficie del bulbo. El hongo penetra y crece a través de las raíces y eventualmente penetra a la base del bulbo causando una descomposición semi-acuosa (APS, 1995). Una vez que se ha presentado el micelio en la base

de las plantas o sobre los bulbos, se pueden observar pequeños esclerocios de color blanquecino al inicio y finalmente negros, los cuales serán liberados al suelo tan pronto como el tejido donde se desarrollan se pudra por completo (Crowe, 1995).

La enfermedad puede ser transmitida a través de dientes de ajo usados como semillas para una nueva siembra, suelos infestados, a través del agua de riego, el viento y movimientos mecánicos generados por la maquinaria, el calzado o implementos usados en la agricultura.

1.3 *Stromatinia cepivora* B

Según datos reportado en la base de datos index fungorum (www.indexfungorum.org), Sclerotiniaceae es una familia fúngica del orden Helotiales dentro del filo Ascomicota (**Tabla 1.6**), descrita por Whetzel (1945). La reproducción sexual de los hongos de esta familia, era desconocido hasta principios de la década de 1930. Whetzel (1929) sugirió que los microconidios podrían actuar como gametos masculinos y la reproducción sexual se produce solo cuando se cruzan cepas complementarias. Los esclerocios son la forma de diseminación más conocida de esta especie (New *et al.*, 1984), *Stromatinia cepivora* B es el teleomorfo de *Sclerotium cepivorum* B (Rivera-Méndez *et al.*, 2020), forma esclerocios y se ha reportado la formación de microconidias cuando se cultiva sobre agar agua (Schwartz y Mohan, 2008), en el desarrollo de la presente tesis se le seguirá nombrando *Sclerotium cepivorum* B.

Tabla 1.6 Taxonomía de *Stromatinia cepivora* B.

Reino	Fungi
Filo	Ascomicota
Subfilo	Psicomicotina
Clase	Leotiomicetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Stromatinia</i>
Especie	<i>S. cepivora</i>

Produce abundante micelio, de color blanco, marrón o grisáceo. Las hifas son ramificadas y cada ramificación se divide mediante septos. Establece un tipo de estructura de resistencia a la que se le da el nombre de “esclerocio” y presenta coloraciones desde pardo oscuro hasta negro, es globosa o subglobosa y de apariencia húmeda en su superficie. Los esclerocios pueden sobrevivir en el

suelo hasta por 20 años sin perder su viabilidad (Coley- Smith *et al.*, 1990) y su germinación responde a los exudados de compuestos sulfatados y a los grupos tiol (Davis, 2002).

Este patógeno coloniza las raíces de sus hospederos y en estadios avanzados puede infectar completamente el bulbo, provocando una descomposición blanda del tejido, que se recubre de un micelio blanquecino. A medida que la enfermedad avanza sobre las raíces y bulbos, la planta muestra signos de marchitez, enanismo y las hojas terminan completamente necrosadas (Velásquez y Medina, 2004).

1.4 Genómica funcional

La genómica funcional consiste en la recolección sistemática de información sobre la función de los genes, mediante la aplicación de aproximaciones experimentales globales que evalúen la función de dichos genes haciendo uso de la información y elementos de la genómica estructural. Se caracteriza por la combinación de metodologías experimentales a gran escala con estudios computacionales de los resultados y también de la información obtenida mediante la secuenciación de genomas (genómica comparativa y bioinformática). Con la genómica funcional el objetivo es llenar el hueco existente entre el conocimiento de las secuencias de un gen y su función, para de esta manera desvelar el comportamiento de los sistemas biológicos. Se trata de expandir el alcance de la investigación biológica desde el estudio de genes individuales al estudio de todos los genes de una célula al mismo tiempo, en un momento determinado (Encarnación-Guevara, 2006).

La forma de evaluar la función de un gen es a través de interrumpir su función; las herramientas moleculares que se han utilizado para la evaluación de la función de genes es a través de mutagénesis química, con metilsulfonato (EMS), mutagénesis insercional (transposones o T-DNA) o también por medio de la sobreexpresión con un promotor diferente (Tiessen, 2012).

1.5 Mutagénesis química

La interacción de ciertos compuestos químicos ambientales y el metabolismo celular puede resultar en cambios genéticos en la estructura del ADN, afectando a uno o más genes. Estas mutaciones inducidas químicamente se conocen como mutagénesis química. Los productos químicos capaces de inducir mutaciones genéticas (es decir, mutágenos químicos o compuestos genotóxicos) están presentes en ambientes y productos naturales y artificiales.

Los mutágenos químicos tienden a causar cambios de un solo par de bases (pb), o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), ya que se los denomina más comúnmente, en lugar de deleciones y translocaciones. De los mutágenos químicos, el EMS (metanosulfonato de etilo) es hoy en día el más utilizado. El EMS alquila selectivamente las bases de guanina, lo que hace que la ADN polimerasa favorezca la colocación de un residuo de timina sobre un residuo de citosina opuesto a la O-6-etil-guanina durante la replicación del ADN, lo que da como resultado una mutación puntual aleatoria. La mayoría de los cambios (70–99 %) en poblaciones con mutación de EMS son transiciones de pares de bases de GC a AT (Till *et al.*, 2004). Las mutaciones en las regiones de codificación pueden ser silenciosas, sin sentido o sin sentido. En las regiones no codificantes, las mutaciones pueden cambiar las secuencias promotoras u otras regiones reguladoras, lo que resulta en una regulación hacia arriba o hacia abajo de la transcripción de genes. El empalme aberrante del ARNm, la estabilidad alterada del ARNm y los cambios en la traducción de proteínas también pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis.

Otros mutágenos como la azida sódica (Az) y la metilnitrosourea (MNU) también se utilizan y, a menudo, se combinan en una solución de Az-MNU. Genéticamente, Az-MNU causa predominantemente cambios de GC a AT, o cambios de AT a GC. Por lo tanto, al contrario de EMS, un cambio puede ocurrir en cualquier dirección (Till *et al.*, 2007). Los tres mutágenos químicos son, como se puede esperar, fuertemente cancerígenos y deben manejarse con extremo cuidado.

1.5.1 Mutagénesis insercional

Mientras que la mutagénesis por agentes químicos o físicos modifican parte del genoma de la planta sin que se pueda saber fácilmente qué gen o genes se han visto afectados, gracias a la utilización

de la mutagénesis insercional, cuyo agente mutagénico es un fragmento de ADN de secuencia conocida, el gen alterado queda etiquetado por lo que es más sencillo llegar a su identificación y clonación.

Las técnicas de transformación genética más utilizados son la transformación indirecta con *Agrobacterium tumefaciens* y el método biobalístico mediante el bombardeo de células vegetales con partículas recubiertas con ADN. Los vectores que se utilizan para obtener los mutantes insercionales son los transposones y el T-DNA (Baum *et al.*, 1997).

1.6 Silenciamiento génico postranscripcional (PTGS)

El silenciamiento génico es un complejo sistema de regulación génica que en plantas controla procesos de crecimiento y desarrollo, estabilidad genómica, adaptación a condiciones de estrés y defensa frente a patógenos (Chapman *et al.*, 2004). Este sistema está dirigido por pequeñas moléculas de RNA (small RNAs, sRNAs) de 21 a 25 nucleótidos de tamaño, que guían al silenciamiento de genes específicos a nivel post-transcripcional (posttranscriptional gene silencing, PTGS) o transcripcional (Transcriptional gene silencing, TGS) (Baulcombe, 2004). El silenciamiento se activa en respuesta a RNAs de doble cadena (dsRNAs) o de RNAs de cadena sencilla (ssRNAs) con una estructura secundaria compleja (**Figura 1.2**). Estas moléculas son reconocidas y procesadas por ribonucleasas (RNAsas) de tipo III denominadas Dicer (en plantas Dicer-like, DCL) en dúplex de RNAs de 20 a 24 nts de longitud que son estabilizados por la metilación en sus extremos 3' hidroxilos por la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1) (Bologna y Voinnet, 2014). Los sRNAs actúan asociándose a los complejos efectores de silenciamiento a través de su unión con las proteínas ARGONAUTA (AGO) proporcionándoles especificidad por sus moléculas de DNA o RNA objetivo a través de mecanismos dependientes de homología de secuencia (Vaucheret, 2008). La interacción funcional de estos complejos efectores con las moléculas de RNA objetivo conduce a una regulación post-transcripcional negativa a través del corte endonucleolítico de este RNA o de la represión de su traducción (Brodersen *et al.*, 2008). La interacción con las moléculas de DNA blanco da lugar a su represión transcripcional a través de la modificación por metilación del DNA y/o las histonas (Baulcombe, 2015) La biogénesis y/o

carga de los sRNAs en proteínas AGO se facilita gracias a la actividad de una proteína de unión a dsRNA (dsRNA-binding protein, DRB) que interacciona directamente con DCL (Li y Ding, 2006). Además, en plantas, hongos y nematodos el silenciamiento requiere de la actividad de RNA polimerasas celulares dependientes de RNA (RNA-dependent RNA polymerases, RDRs) que generan precursores de RNA bicatenario a partir de RNAs molde de cadena sencilla (Voinnet, 2008). Las enzimas RDR son esenciales en la formación de sRNAs secundarios que refuerzan el efecto del silenciamiento génico iniciado por los inductores primarios (Wassenegger y Krczal, 2006). Los sRNAs actúan además como elementos móviles de silenciamiento desplazándose entre células adyacentes a través de los plasmodesmos o a larga distancia usando los haces vasculares del floema (Melnik *et al.*, 2011). Algunos miRNAs y siRNAs de 21 nts pueden promover la degradación de mRNAs objetivos en tejidos distantes (Carlsbecker *et al.*, 2010) mientras que los siRNAs de 24 nts activan mecanismos de metilación del DNA (Molnar *et al.*, 2010).

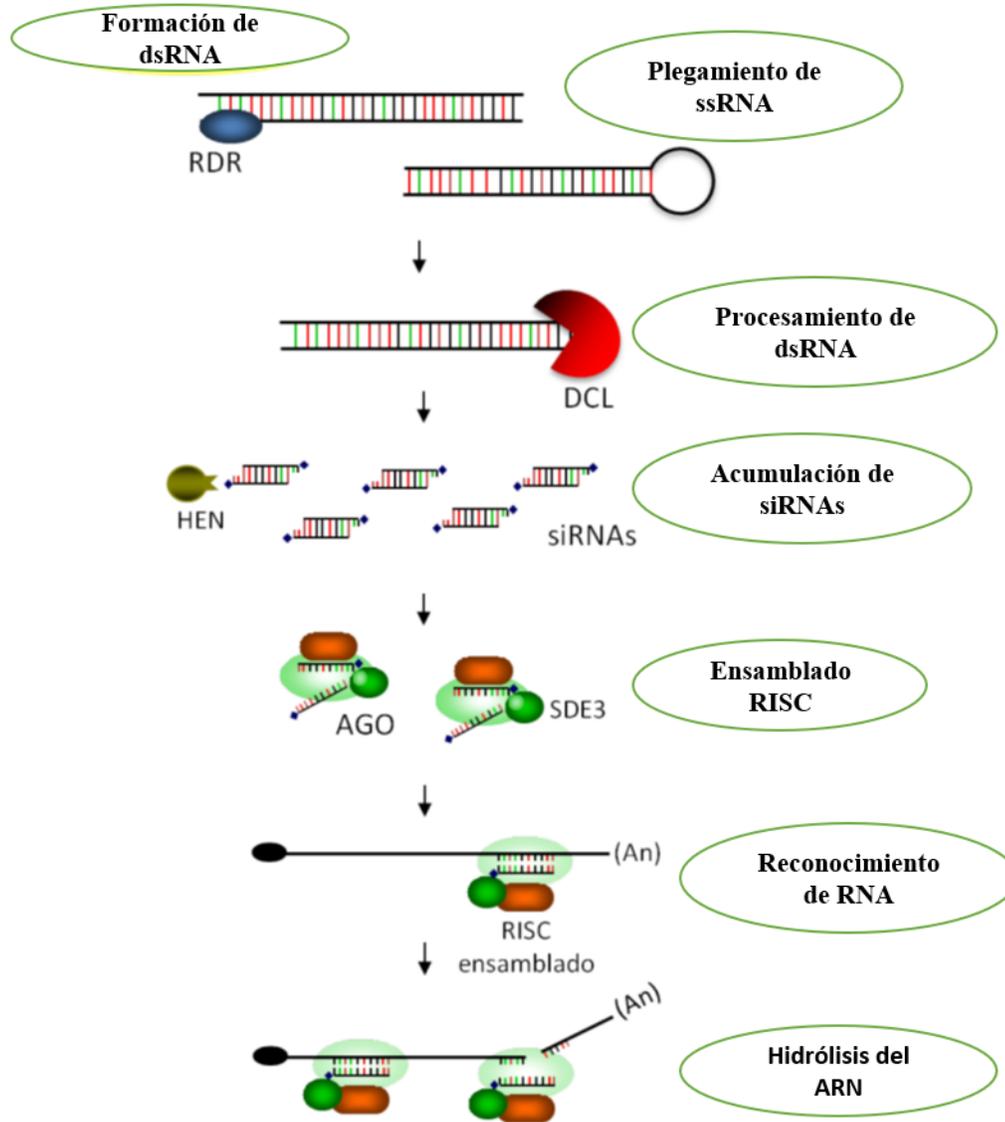


Figura 1.2 Representación esquemática del proceso de silenciamiento postranscripcional (PTGS) en plantas (Martínez, 2016).

1.6.1 Silenciamiento génico inducido por virus

En el caso de los virus de RNA, la replicación se lleva a cabo generalmente en el citoplasma de la célula infectada catalizada por una RNA polimerasa viral dependiente de RNA (Heinlein, 2015). La replicación de los virus de ssDNA transcurre normalmente en el núcleo utilizando la maquinaria

celular de síntesis de DNA del hospedero (Hull *et al.*, 1987). En cambio, la replicación de los virus de dsDNA presenta una fase nuclear donde se lleva a cabo la transcripción viral y otra citoplasmática en la que se producen nuevas moléculas de dsDNA mediante transcripción inversa por una DNA polimerasa dependiente de RNA viral (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).

Cualquiera que sea la naturaleza de su genoma, los virus de plantas son capaces de activar el mecanismo de silenciamiento por RNA en la célula infectada a través de la formación de dsRNA por tanto, de sRNAs de origen viral (vsiRNAs) (Ding, 2010). Los vsiRNAs comparten características similares con los siRNAs y miRNAs endógenos lo que les posibilita el acceso a los mismos complejos efectores de silenciamiento y por tanto a regular la expresión de genes con secuencias complementarias (Ding y Voinnet, 2007). De este modo, los vsiRNAs formados durante una infección tienen el potencial de guiar el auto silenciamiento de los genomas virales de los que se originan y reprimir o limitar la proliferación viral. Al mismo tiempo, pueden potencialmente modular la expresión del genoma del hospedero a través de interacciones funcionales con secuencias complementarias endógenas de RNA y DNA (Llave, 2010).

El silenciamiento por RNA inducido por virus se produce en tres fases distintas: iniciación, amplificación y dispersión sistémica (Ding, 2010; Llave, 2010; Voinnet, 2009). La iniciación se activa con la formación de dsRNAs a partir de ssRNA viral. Estas moléculas inductoras son reconocidas por las mismas proteínas DCL que actúan en la biogénesis de sRNAs endógenos y a continuación procesadas para dar lugar a vsiRNAs primarios de 21, 22 y 24 nts de longitud. La amplificación se caracteriza por la producción de vsiRNAs secundarios procedentes de dsRNAs cuya síntesis es dependiente de la acción de proteínas RDR del hospedero. Estos vsiRNAs secundarios participan en la dispersión sistémica del silenciamiento, que implica el transporte de la señal de silenciamiento célula a célula y a través del floema (Molnar *et al.*, 2010) inmunizando así a las células adyacentes y a tejidos distantes situados delante del frente de infección (Baulcombe, 2004).

VIGS ha sido utilizado en muchas especies de plantas para caracterizar genes involucrados en varios procesos de desarrollo, resistencia a enfermedades, estrés abiótico, resistencia a nemátodos e insectos entre otros (Dagnachew *et al.*, 2019). Para la aplicación de VIGS deben cumplirse tres pasos; construcción de genomas virales para incluir genes del hospedero destinados a ser

silenciados, la infección de la planta y el silenciamiento del gen objetivo como parte del mecanismo de defensa de contra el virus (Senthil-Kumar y Myrose, 2011).

Algunos de los vectores utilizados para silenciamiento génico inducido por virus en plantas monocotiledones y dicotiledóneas se muestran en la **Tabla 1.7**:

Tabla 1.7 Lista de VIGS empleados en plantas.

VIGS vector	Planta	Gen silenciado	Referencia
BSMV	Trigo	<i>TaBTF 3</i> (Basic Transcription Factor 3)	Kang <i>et al.</i> , 2013
	Cebada	<i>HvDhn6</i> (Dehidrina)	Liang <i>et al.</i> , 2012
BPMV	Soya	<i>GmRPA3</i> (Proteína 3 de la replicación)	Atwood <i>et al.</i> , 2014
PEBV	Chícharo	<i>TRX-F, TRX-M</i> (Tioredoxina)	Luo <i>et al.</i> , 2012
TRV	Jitomate	<i>SlMPK4</i> (Proteín kinasa activada por mitógeno 4)	Virk. <i>et al.</i> , 2013
PHYVV	Chile	<i>Comt, pAmt y Kas</i>	Abraham-Juárez <i>et al.</i> , 2007

1.7 PHYVV

El vector viral que se utilizará para el silenciamiento génico del gen *AaAlli* el Begomovirus PHYVV (Virus Huasteco de la Vena Amarilla del Chile).

PHYVV junto a otras 322 especies corresponden a los Begomovirus los cuales infectan principalmente a plantas dicotiledóneas. Su genoma es bipartita integrado por dos componentes genómicos denominados ADN-A y ADN-B, el tamaño molecular oscila entre 2.7 y 3.0 kb, respectivamente (Yudava *et al.*, 2010). Ambos componentes están organizados en unidades de

transcripción divergentes separadas por una región intergénica o región común (RI o RC), la cual contiene el origen de replicación del virus y dos promotores que dirigen la transcripción genética en direcciones opuestas, con excepción de una secuencia de RI de aproximadamente 200 pb que se encuentra en ambos ADN virales y es denominada como región común (RC) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Los dos componentes, a pesar de ser completamente diferentes, presentan una región común (RC) homóloga entre ellas. El ADN-A contiene toda la información que se requiere para la replicación y formación de la cápside del virus, mientras que el componente ADN-B codifica para las proteínas involucradas en el movimiento viral de célula a célula y en el rango de hospederos.

En 1993, en México se reportó por vez primera la aparición de PHYVV en la zona de las Huastecas (Tamaulipas), al cual se le denominó virus huasteco del chile (PHV) (Torres-Pacheco *et al.*, 1993) y posteriormente se modificó el nombre a virus huasteco vena amarilla del chile (Pepper Huasteco Yellow Vein Virus, PHYVV), por los síntomas que causa en la hoja de las plantas infectadas. En estudios anteriores, se han silenciado monocotiledóneas (*Allium ampeloprasum* L y *Allium sativum* L).

Al vector VIGS-PHYVV componente A (**Figura 1.3**) se le eliminó el 80 % del gen que codifica para la cápside (PC) mediante una digestión parcial del componente A con la enzima *Sty* I y se sustituyó por un sitio de clonación múltiple (SCM). También contiene secuencias que codifican para una proteína asociada a la replicación (Rep), una proteína activadora de la transcripción (TrAP) y una proteína potenciadora de la replicación (REn). Por su parte el componente B consta de secuencias de genes que codifican para una proteína de movimiento (MP) y una proteína de transporte nuclear (NSP). Cabe mencionar que otra de las ventajas que caracteriza al vector PHYVV es que el promotor de la cápside *AvI* es divergente, por lo cual es una excelente herramienta como vector de silenciamiento (Abraham-Juárez *et al.*, 2007).

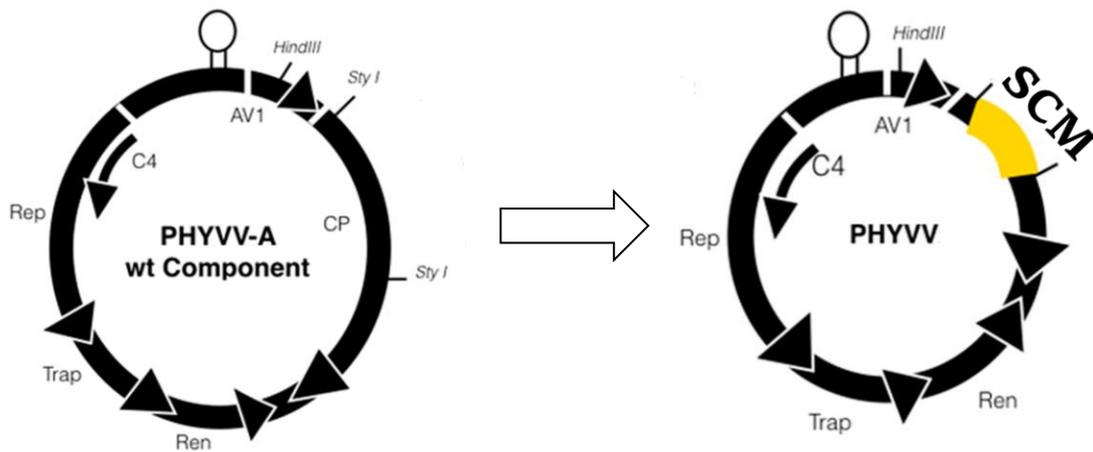


Figura 1.3 Componente A y modificaciones realizadas al begomovirus PHYVV.

1.8 Gen *AaAlli*

Licona-Juarez en el 2016, generó un banco sustractivo de 115 clonas obtenidas a 60 h, por medio de Hibridación Sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH) implicadas en la reacción incompatible de *Allium ampeloprasum* L con *Sclerotium cepivorum* B, del banco SSH se trabajó con la clona 716; la cual codifica para una alinasa.

El fragmento consta de 609 nucleótidos cuya secuencia se encuentra a continuación:

```

ACATGAGTTGATCAAATCATCCTTTGTTTTGATCAAACCTTAAACGCACGTAACGAC
TGCCTGCTTCGAAACCCACTCCACTTTGGGTGTTGATACGTCCATTCTGAAATGTCTG
GTAGCAATCTTTGTCTTCTTCCCATTACATTTACCCATGCATAAGATGGGGATGGA
GGTCTCATTCTTCTGAAGTAATTGCAGTATTCACCTTTGAGGAAGCTCTTGATAGGAGA
ATCTGTCGGATTGATCGAGCAGTGCAGTGATATTTACCCATCTCTCCCTTAGTTTCAG
AAAAGCGAATGTGTTGAGGTCGCGCATGGTGCCCTTTTGCGTTTTACCATCGCTAC
AACTTCTTTTAGAACTTTGAGCGATCGTAGTTGTGTTTCACGAGGTGTGCCCTCCGTG
TTCTTCACCATGTATTCCAACAACCTTATGATACACAGATTCATCCTTTATCAACGCC
ACCCAAATCGACTACCAGAGTGTCCAGTGAATTTAGACATTGTAAAGAGCAAGATAT

```

CTTCATCGGCTTTGTACTTGATTGGGGTGTAATGAGGCCAGTAGTAAACCATATCGT
AAATGGATTTGCATCCCTTGATTACTTCATGAC

1.8.1 Alinasa

Si la célula es dañada por plagas o físicamente, la enzima vacuolar Alinasa es liberada (Alin:liasa EC. 4.4.1.4); la cual induce la conversión de Aliina a Alicina. Esta enzima pertenece a la familia de liasas, específicamente a carbón-sulfurilasas. En cuestión de segundos se lleva a cabo la reacción encontrándose entre los productos de la misma; piruvato y amonio.

La enzima es una glucoproteína homodimérica formada por dos subunidades idénticas de 51.1 kDa cada una que contiene cuatro sitios de glicosilación (Kuettner *et al.*, 2009). Hay diez residuos de cisteína por monómero de alinasa, ocho de los cuales forman cuatro puentes disulfuro y dos de los cuales son tioles libres. Los residuos Cys368 y Cys376 forman un puente S - S cerca del extremo C, que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la rigidez del dominio catalítico y la orientación relativa del sustrato - cofactor (Weiner *et al.*, 2009).

La actividad de esta enzima depende de las condiciones de reacción, como el pH, la temperatura y las concentraciones de iones. Puede encontrar en otras especies *Allium* que contienen azufre. Esta enzima se activa a pH de 4.5 hasta 9.0, pero se inactiva rápidamente y de forma irreversible a pH 1.5-3. La actividad enzimática decrece rápidamente a la temperatura de 42 °C, indicando que la temperatura óptima de activación de la enzima alinasa, se encuentra entre 35 °C hasta 47 °C y su inactivación se produce de 42 °C a 60 °C, a temperaturas mayores de 60 °C la enzima es destruida en su totalidad (Krest y Keusgen, 2000).

Las primeras secuencias de cDNA alinasa fueron publicadas por Van Damme *et al.* (1992). Desde entonces, se han descrito y publicado secuencias que se originan de varias especies, incluidas varias específicas de los tejidos de las hojas, los bulbos y las raíces. Se ha informado que su secuencia tiene una longitud de aproximadamente 2 200 nucleótidos, que codifica un polipéptido de 486 aminoácidos.

1.8.2 Aliina

La aliina o S-alilcisteína sulfóxido es el compuesto sulfurado más abundante en el ajo fresco, es inodora y estable. El ajo contiene 7-14 mg por gramo de peso fresco y de 18 - 42 mg/g de peso seco.

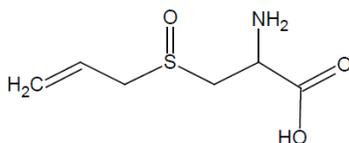


Figura 1.4 Composición química de la aliina.

La aliina es estable en soluciones acuosas y a temperaturas elevadas (Stoll y Seebek, 1951). Cuando las células se rompen, reacciona y en aproximadamente diez segundos toda la aliina expuesta se convierte en tiosulfonatos que emiten el aroma característico del ajo fresco (Lawson y Wang, 2005).

1.8.3 Alicina

La alicina (S-2-propenil éster del ácido 2-propenol-1- sulfinoiotico) representa típicamente el 70 % de los compuestos sulfurados presentes en ajo fresco, siendo así el tiosulfonato de mayor abundancia en la planta (Lawson, 1998). Este es un compuesto que se forma a través de la interacción de su precursor (aliina) con la enzima alinasa (**Figura 1.5**).

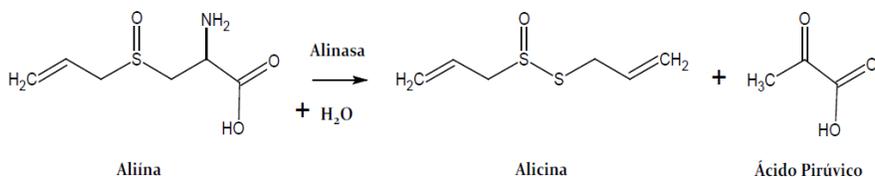


Figura 1.5 Reacción química de la formación de la alicina.

Es un componente oxidante producido por el ajo crudo cuando sus células se rompen por la acción de un corte o triturado, permitiendo la interacción de la enzima alinasa. La reacción se completa de 0.2 a 0.5 minutos después de haber iniciado (Lawson, 1993).

1.8.3.1 Actividad antifúngica de la alicina

La actividad antifúngica de la alicina ya se ha reportado en otros hongos, tales como *Aspergillus* spp y *Candida albicans*.

Como se observa en la **Figura 1.6**; en 2004, Shadkchan y colaboradores evaluaron el efecto de la alicina en la inhibición del crecimiento de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, a una concentración de 16 mg/L el crecimiento de las 4 especies de *Aspergillus* desciende a 0 desde las 12 horas después de ser inoculados en presencia de alicina.

Young-Sun *et al.* (2012) evaluaron a la alicina como agente antifúngico contra la candidiasis ocasionada por *Candida albicans*. Su objetivo fue evaluar la actividad de la alicina sola y en combinación con uno y con dos fármacos (Flucitosina y Anfotericina B). Emplearon 1 µg/mL como MIC₁₀ y sus resultados demuestran que el uso de alicina tiene un efecto potenciador cuando se aplica en conjunto con Flucitosina y Anfotericina B.

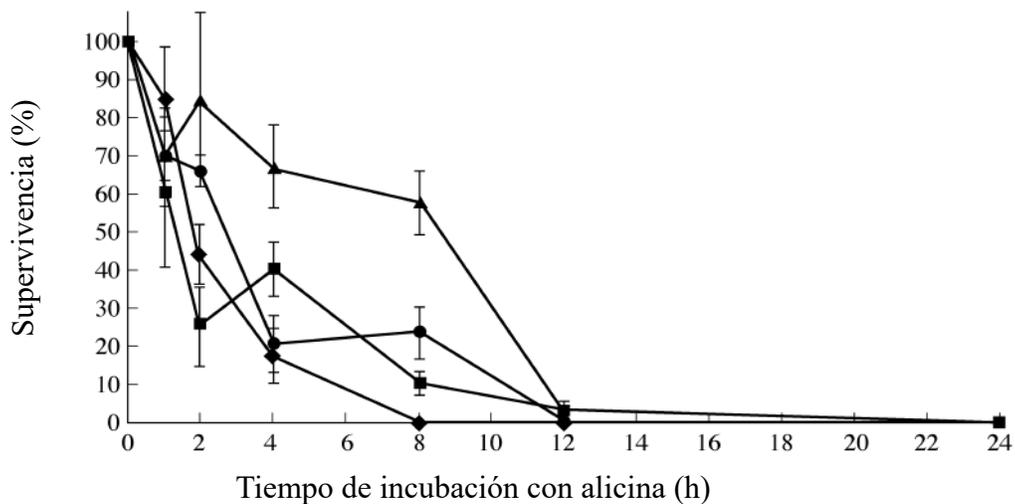


Figura 1.6 Supervivencia de *Aspergillus fumigatus*(●) , *Aspergillus niger*(■), *Aspergillus terreus*(▲), *Aspergillus flavus*(◆) respecto al tiempo a una dosis de alicina (16 mg/L).

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de ajo común (*Allium sativum* L) es una importante actividad de interés económico; sin embargo, la pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* B; afecta a este cultivo generando un impacto negativo en la demanda y en la economía de los productores.

La resistencia natural que presenta *Allium ampeloprasum* L a la pudrición puede utilizarse como modelo para elucidar el gen o set de genes que le confieren dicha propiedad, de ahí la importancia de conocer la función del gen *AaAlli* el cual se expresó diferencialmente durante la resistencia de *Allium ampeloprasum* L contra *Sclerotium cepivorum* B.

HIPÓTESIS

El vector VIGS::*AaAlli* dirige el silenciamiento del gen *AaAlli* y provoca un fenotipo susceptible a la infección por *Sclerotium cepivorum* B.

OBJETIVO GENERAL

Silenciar el gen *AaAlli* en *Allium ampeloprasum* L empleando V-VIGS derivado del begomovirus PHYVVV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Diseñar un V-VIGS para el silenciamiento del gen *AaAlli* en *Allium ampeloprasum* L.
- II. Comprobar el silenciamiento del gen *AaAlli* por medio de RT-PCR a las 60 h después de interacción con *Sclerotium cepivorum* B.
- III. Analizar el fenotipo de los ajos silenciados mediante mediciones de fuerza de los tejidos infectados por *Sclerotium cepivorum* B.

II MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y Semillas

- Ajo elefante (*Allium ampeloprasum* L) variedad complex, proporcionado por INIFAP
- Cepa C2 de *Sclerotium cepivorum* B aislada de Cortázar, Guanajuato, Proporcionada por INIFAP.
- Ajo susceptible (*Allium sativum* var Texcoco tipo taiwan).
- Células competentes de *Escherichia coli* DH5α.

Medios de cultivo

- Papa-Dextrosa (PDA).
- Luria Bertani (LB).
- Czapeck.
- SOC.

Plásmidos

- pGEM-T easy de Promega.
- V-VIGS::*AaPR*.
- PHYVV -ΔCap.
- PHYVV B.

Oligonucleótidos

- *AaAlliS*: 5' - CCCGGGGAAGATATCTTGCTGTTTACT - 3'
- *AaAlliAS*: 5' - GGATCCTCTTGATAGGAGAATCTGTC - 3'
- *GAPDHS*: 5' - CAAGGTCATCCATGACAACTTTG - 3'
- *GAPDHAS*: 5' - GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3'

METODOLOGÍA

2.1. Construcción del vector

2.1.1. Diseño de oligonucleótidos

De las secuencias proporcionadas por Liconá-Juárez (2016), se empleó la clona 716, la cual, de acuerdo a la base de datos NCBI codifica para una Alinasa; el diseño de oligonucleótidos se realizó con el apoyo del algoritmo **OLIGO-CALC**. Los oligonucleótidos diseñados presentaron una longitud de 20 a 24 pb y en dicho programa se determinó la temperatura de alineamiento.

2.1.2 Crecimiento de la clona 716

El procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar

1. Se tomó un inóculo con un asa bacteriológica de la clona 716 que se encuentra almacenada a 80 °C en una suspensión de glicerol en el Laboratorio de Biología Molecular del Tecnológico Nacional de México en Celaya.
2. Se sembró por estría en medio de cultivo sólido Luria Bertani con ampicilina como antibiótico de selección (concentración final de 50 µg/mL).
3. Se incubó la caja Petri a 37 °C durante 16 h.
4. Transcurridas las 16 h se tomó una muestra de la caja Petri y se inocularon en tubos Falcon con 5 mL de medio líquido LB y ampicilina como antibiótico de selección (concentración final de 50 µg/mL).
5. Se incubaron los tubos a 37 °C en agitación (250 rpm) durante 16 h.

2.1.3 Extracción de ADN plasmídico por precipitación

1. Se etiquetaron tubos Eppendorf de manera que permita identificar cada colonia y su respectivo tubo Falcon.
2. Bajo condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar se vaciaron 1.5 mL de cultivo de los tubos Falcon a los tubos Eppendorf y se centrifugará a 13 000 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se colocaron nuevamente 1.5 mL de cultivo, repitiéndose este paso 3 veces.
3. Se adicionaron 250 μ L de solución de suspensión P1 a la pastilla y se agitaron en Vortex hasta homogeneidad.
4. Se adicionaron 250 μ L de solución de lisis P2, se mezcló por inversión 5 veces e incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
5. Se añadieron 350 μ L de solución de neutralización P3, se mezclaron los tubos por inversión 5 veces y se incubaron por 5 min.
6. Se centrifugaron los tubos a 13 000 rpm durante 15 min y se transfirieron 750 μ L aproximadamente del sobrenadante a un tubo nuevo y estéril con ayuda de una micropipeta para evitar contaminación con la proteína precipitada.
7. Se agregó a cada tubo una cantidad de isopropanol igual al sobrenadante recuperado, se homogenizaron por inversión e incubaron a temperatura ambiente durante 15 min.
8. Se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 min.
9. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de etanol al 70 %. Se resuspendió la pastilla por medio de aparato tipo Vortex y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min.
10. Se descartó el sobrenadante y se secaron las pastillas a temperatura ambiente colocando los tubos de manera inclinada por 1 h.
11. A cada tubo se agregarán 20 μ L de agua destilada estéril.
12. Se comprobaron las extracciones mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain® y se almacenó el ADN restante a -20 °C.

2.1.4. Amplificación por PCR del fragmento del gen *AaAlli*

1. Se tomó 1 μL de ADN plasmídico de la clona 716 obtenido por precipitación y se realizó la mezcla para la reacción de PCR en tubos estériles, como se muestra en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2. 1 Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del fragmento *AaAlli*.

Mezcla Global	vol/rx (μL)
Agua	17.4
Regulador de Dream Taq polimerasa	2.5
Cloruro de Magnesio (MgCl_2)	1.5
Oligonucleótido Sentido (<i>AaAlliS</i>)	1.0
Oligonucleótido Antisentido (<i>AaAlliAS</i>)	1.0
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5
ADN	1.0
Taq polimerasa	0.1
Volumen Total	25.0

2. Se mezcló por resuspensión suave e inmediatamente se colocó en el termociclador.
3. Las condiciones de amplificación calculadas respecto a las indicaciones de la enzima son las siguientes:

Tabla 2. 2 Condiciones de PCR para la amplificación del fragmento *AaAlli*.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	4	
95	0:30	34
66	0:45	
72	0:45	
72	5	
4	∞	

4. Se analizaron 4 µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain®

5. Se almacenaron los productos de la reacción a -20 °C.

2.1.5. Purificación de ADN en producto de PCR mediante elución

La metodología de purificación de ADN a partir del producto de PCR, se realizó conforme al protocolo del fabricante: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

Purificación por centrifugación

A. Disolver la fracción del gel

1. Después de la electroforesis, se cortó la banda de ADN del gel y colocó la fracción del gel en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

2. Se agregó 10 µl de solución de unión a membrana por cada 10 mg de la fracción del gel. Se homogeneizó mediante aparato tipo Vortex e incubó a 60 °C hasta que el gel estuvo completamente disuelto.

B. Unión de ADN

1. Se insertó la mini columna SV en el tubo de recolección.

2. Se transfirió la mezcla de gel disuelto o el producto de PCR preparado a la mini columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.

3. Se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se reinsertó la minicolumna en el tubo de colección.

C. Lavado

4. Se agregó 700 μL de solución de lavado de membrana (etanol añadido). Se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se reinsertó la minicolumna en el tubo de colección.
5. El paso 4 se repitió con 500 μL de solución de lavado de membrana. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos.
6. Se vació el tubo de recolección y se volvió a centrifugar el conjunto de la columna durante 1 minuto con la tapa abierta.
7. Se pasó la mini columna a un tubo Eppendorf limpio de 1.5 mL.
8. Se agregaron 50 μL de agua libre de nucleasas a la mini columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a 13 000 por 1 minuto.
9. Se desechó la mini columna y fue almacenado el ADN purificado a -20°C .

2.1.6 Ligación al vector pGEM[®]-T Easy

El producto de elución del fragmento del gen *AaAlli* obtenido por amplificación por PCR fue ligado al vector pGEM[®]-T Easy Promega de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante.

1. Se realizó la reacción de ligación añadiendo a un tubo estéril los siguientes reactivos en el orden en que se muestra (**Tabla 2.3**):

Tabla 2. 3 Mezcla de reacción de ligación al vector pGEM - T Easy.

Reactivos	Vol/rxn
Regulador T4 ADN ligasa	5 μL
Producto de elución	1 μL
T4 ADN Ligasa	1 μL
Agua estéril	2 μL
Vector pGEM [®] -T Easy	1 μL
Volumen Total	10 μL

2. Se mezcló por pipeteo suave.
3. Se incubó la reacción a 4 °C durante 18 h.

2.1.7. Transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* (DH5α)

1. Se descongelaron las células (50 µL) por 5 min en hielo.
2. Se centrifugó el producto de ligación brevemente.
3. Se adicionaron 2 µL de producto de ligación a la alícuota de células, se mezcla suavemente.
4. Posteriormente, se incubó el tubo en hielo por 30 min.
5. Concluidos los 30 min se realizó el choque térmico a 42 °C durante 45 seg en termoblock.
6. Se incubó nuevamente el tubo en hielo durante 15 min.
7. Se adicionaron 250 µL de medio LB a 4 °C.
8. Se incubaron en agitación (250 rpm) a 37 °C durante 1 h.
9. Antes de cumplirse el tiempo de incubación se añadieron los reactivos de selección a cajas Petri con agar LB y ampicilina (concentración final de 50 µg/mL), se esparcieron con una varilla de vidrio, 12.5 µL de IPTG (100 mM) y 10 µL de X-gal por toda la superficie del agar y se incubó la caja durante 30 min a 37 °C.
10. El cultivo celular se centrifugó a 5 000 rpm durante 5 min. Se retiraron 100 µL de la parte superior.
11. El resto se mezcló por pipeteo suave.
12. Se sembraron las células en la caja Petri suavemente para evitar daño celular y se incubaron durante 16 h a 37 °C.
13. Se observó el crecimiento de colonias blancas y azules, siendo las blancas las de interés.

2.1.8. Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción *Eco* RI

A manera de comprobación, se liberó el inserto del fragmento del gen *AaAlli* del vector mediante digestión con la enzima *Eco* RI ya que pGEM[®]-T Easy cuenta con sitios de restricción para esta

enzima, liberándose el inserto y 18 pares de bases más correspondientes al corte generado por *Eco* RI.

1. Se preparó la siguiente mezcla de reacción como se indica en la **Tabla 2.4** para cada muestra a digerir.

Tabla 2. 4 Mezcla de reacción para la digestión con *Eco* RI.

Reactivos	Vol/rxn
Agua libre de nucleasas	12 μ L
Regulador Anza 10x	1.5 μ L
<i>Eco</i> RI (Anza)	0.5 μ L
ADN	1 μ L
Volumen Total	15 μL

2. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 h y se comprobó la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain®.

2.1.9. Digestión con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Sma* I para liberar el fragmento del gen *AaAlli*.

Se realizó la digestión con las enzimas *Bam* HI y *Sma* I para liberar el fragmento del gen *AaAlli*, los cuales fueron empleados para clonar el fragmento en el componente A del vector PHYVV.

1. Se preparó la mezcla de reacción (**Tabla 2.5**) por cada muestra a digerir:

Tabla 2. 5 Mezcla de reacción para la doble digestión con *Bam* HI y *Sma* I para liberar el fragmento *AaAlli*.

Reactivos	Vol/rxn
Agua estéril	12.5 µL
Regulador Anza 10x	1.5 µL
<i>Bam</i> HI (Anza)	0.5 µL
<i>Sma</i> I (Anza)	0.5 µL
ADN	1.0 µL (1 000 ng/µL)
Volumen total	15 µL

2. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 h y se comprobó la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain®.

2.1.10 Extracción del vector VIGS::*AaPR* y eliminación del fragmento *AaPR* para liberar el vector (PHYVV)

1. En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar estéril) se tomó una muestra del stock de células de la construcción V-VIGS::*AaPR* con un asa bacteriológica previamente esterilizada y se procedió a la siembra por estría en medio sólido LB con ampicilina (concentración final de 50 µg/mL).
2. Se incubaron las cajas Petri a 37 °C durante 16 h y se seleccionaron 4 colonias para ser transferidas a medio líquido LB con ampicilina (concentración final de 50 µg/mL).
3. En tubos Falcon de 15 ml con un contenido de 5 ml de medio LB + ampicilina; se inocularon mediante punción las colonias seleccionadas y se incubaron a 37 °C durante 16 h con agitación de 250 rpm.
4. Se realizó la extracción de ADN plasmídico por precipitación y se comprobó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain®.
5. Se realizó la digestión del vector con las enzimas *Bam* HI y *Sma* I para liberar el fragmento del gen *AaPR* y obtener el componente A del vector PHYVV con los sitios *Bam* HI y *Sma* I libres.

6. Se preparó la siguiente mezcla de reacción (**Tabla 2.6**) por cada muestra a digerir:

Tabla 2. 6 Mezcla de reacción para la doble digestión con *Bam* HI y *Sma* I para el vector PHYVV.

Reactivos	Vol/rxn
Agua libre de nucleasas	12.5 μ L
Regulador Anza 10x	1.5 μ L
<i>Bam</i> HI (Anza)	0.5 μ L
<i>Sma</i> I (Anza)	0.5 μ L
ADN	1 μ L (1 000 ng/ μ L)
Volumen total	16 μL

7. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 h, se comprobó la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain®.
8. Se realizó la purificación del ADN perteneciente a la banda de 5 000 pb en geles de agarosa mediante elución como se establece en el método de purificación.

2.1.11 Obtención del V-VIGS

Tanto el ADN que se obtuvo de las clonas, como el del vector PHYVV; contienen los sitios de restricción *Bam* HI y *Sma* I. Por lo tanto, sólo restará unir ambas partes, para ello se realizó una ligación con la siguiente composición en un tubo para PCR de 200 µL:

Tabla 2. 7 Componentes para reacción de ligación.

Relación de inserto/vector	3/1
Thermo Scientific 10x T4 ADN Ligasa buffer	2 µL
Solución 50 % PEG 4000	2 µL
T4 ADN Ligasa	2 µL
Agua libre de nucleasas	Para 20 µL

La reacción de ligación se realizó a 22 °C durante 1 h. Una vez terminada la reacción, se utilizó el material resultante para transformar células químicamente competentes siguiendo los pasos descritos en el apartado: **Transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli***. Se realizó extracción de ADN plasmídico como lo indica la metodología, posterior a esto se realizó digestión con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Sma* I para la confirmación del V-VIGS.

2.2 Lavado y desinfección de ajo

Los bulbos de *Allium ampeloprasum* L se sometieron a un proceso de lavado y desinfección el cual consiste en sumergirlos en etanol al 70 % durante 5 min, posteriormente en hipoclorito de sodio al 0.6 % durante 15 min y una vez transcurrido el tiempo correspondiente lavar con agua destilada estéril.

2.3. Cultivo del hongo *Sclerotium cepivorum* B

Para realizar la interacción incompatible con *Sclerotium cepivorum* B, debemos recuperarlo desde los esclerocios almacenados en el laboratorio de Biología Molecular bajo los siguientes pasos:

- 1.-Se esterilizó el medio PDA y colocó en cajas Petri.
- 2.- En el centro de cada caja Petri se colocó un esclerocio con ayuda de pinzas estériles.
- 3.- Se observó crecimiento y formación de nuevos esclerocios.

2.4. Establecimiento de la interacción planta-patógeno

1. Una vez finalizado el lavado de los bulbillos se colocaron en frascos (previamente etiquetados) estériles con agua destilada estéril y se incubaron a 16 °C durante 3 días para promover el crecimiento de la raíz de éstos.
2. En el caso del hongo, se inocularon en placas con medio Czapek durante 7 días.
3. Posterior a los 3 días de germinación se tomó un disco de micelio de *Sclerotium cepivorum* B inoculado en agar Czapek con 7 días de crecimiento y se introdujo uno en cada uno de los frascos en el extremo opuesto a donde se ubica el ajo. Los discos siempre deben permanecer con el micelio en la parte superior.
4. Se sellaron los frascos para evitar contaminación y se incubaron a 16 °C durante 60 h y hasta 22 días; se observó la interacción entre el patógeno y el ajo.

2.5 Silenciamiento del gen *AaAlli*.

El silenciamiento del gen *AaAlli* se realizó inoculando 12 ajos germinados, utilizando 2.5 µg del V-VIGS + 2.5 µg de PHYVV B a los que denominaremos silenciados, del mismo modo, 12 ajos elefantes utilizando 2.5 µg de PHYVV A silvestre (PHYVV-ΔCap) + 2.5 µg de PHYVV B a los que denominaremos no silenciados (6 ajos para el RT-PCR y 6 de los ajos para evaluación fenotípica), se colocaron en interacción con *S. cepivorum* B como se indica en el paso **2.4** . Los 12

ajos elefantes (no silenciados) inoculados con componentes silvestres (A y B) serán utilizados como control para demostrar que los síntomas que se desarrollaron en el resto de los ajos no se debieron a la inoculación con el V-VIGS. Una vez infectados todos los ajos se incubaron nuevamente a 16 °C hasta que pase el tiempo previsto para cada análisis.

Para confirmar que el gen de interés fue silenciado se utilizó la técnica de RT-PCR a las 60 h. También se evaluó el fenotipo resultante después de 22 días haciendo una medición de fuerza con una máquina universal Zwick/Roell Z050.

2.5.1 Extracción de ARN: Método del TRIzol® Reagent

Este método se utilizó para todas las extracciones de ARN de ajo y está basado en el protocolo de Invitrogen incluido en los paquetes de reactivos TRIzol® Reagent.

1. Se tomó tejido del ajo y se pulverizó con N₂ líquido hasta que se formó un polvo fino en un mortero tratado previamente con una solución de etanol y dietilpirocarbonato (DEPC), esterilizado y congelado a -20 °C, el polvo obtenido se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL tratados con etanol y DEPC.
2. Se adicionó 1 mL de TRIzol® Reagent y se homogenizó por inversión hasta su completa suspensión.
3. El tubo se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo e incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
4. Se agregaron 0.2 mL de cloroformo y se agitó por inversión durante 15 s.
5. La muestra se incubó por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4 °C formando dos fases.

La fase acuosa se transfirió otro tubo limpio tratado con etanol y DEPC (en esta fase se encuentra el ARN).

6. Se agregaron 0.5 mL de isopropanol y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente.
7. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C y el sobrenadante se desechó.
8. Se adicionó 1 mL de etanol al 75 % y se centrifugó a 7 500 rpm por 5 min a 4 °C.
9. Se desechó el sobrenadante.

10. Los pasos 8 y 9 se repitieron una vez más.
11. Se colocó el tubo de manera inversa sobre una sanita, y se secó la pastilla por 15 min.
12. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 25 μL en agua destilada tratada con DEPC.
13. Se terminó la extracción calentando a 58 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.
14. El producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa desnaturalizante (DEPC) al 1.2 %.

2.5.2 Síntesis de ADN complementario

1. En un tubo para PCR estéril tratado con DEPC, en hielo se agregaron los siguientes reactivos:

Reactivos	Vol/rxn
Agua libre de nucleasas	Aforo
Oligo (dT) ₁₈ iniciador	1.0 μL
ARN total	700 ng
Volumen total	11 μL

2. Se mezcló centrifugando brevemente e incubó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Después se colocó en hielo nuevamente.
3. Se agregaron los siguientes componentes en el orden indicado:

Reactivos	Vol/rxn
5x Regulador	4.0 μL
Inhibidor RiboLock RNasa	1.0 μL
Mezcla 10 mM dNTP	2.0 μL
M-MuLV RT	2.0 μL
Volumen total	20.0 μL

4. Se mezcló centrifugando brevemente.
5. Fue incubado a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos.
6. Se terminó la reacción calentando a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos.

2.5.3 Confirmación del silenciamiento

Para llevar a cabo la confirmación del silenciamiento se empleó la técnica de RT-PCR a las 60 h posteriores a la infección de los ajos elefante silenciados y no silenciados.

A continuación se describe el procedimiento que se realizó para la confirmación en cada tiempo.

1. Después de 60 h posterior a la infección se retiraron de incubación los ajos silenciados y los no silenciados.
2. Se les eliminó el micelio desarrollado hasta el momento y se les extrajo el ARN como se describe en el apartado 2.5.1 .
3. Después de haber extraído el ARN se realizó la síntesis ADNc (apartado 2.5.2).
4. El ADNc sintetizado se utilizó como templado para el PCR.
5. Los productos del PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.2 % para confirmar.

Como control en las reacciones de RT-PCR se utilizó *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y las condiciones para amplificar son las siguientes:

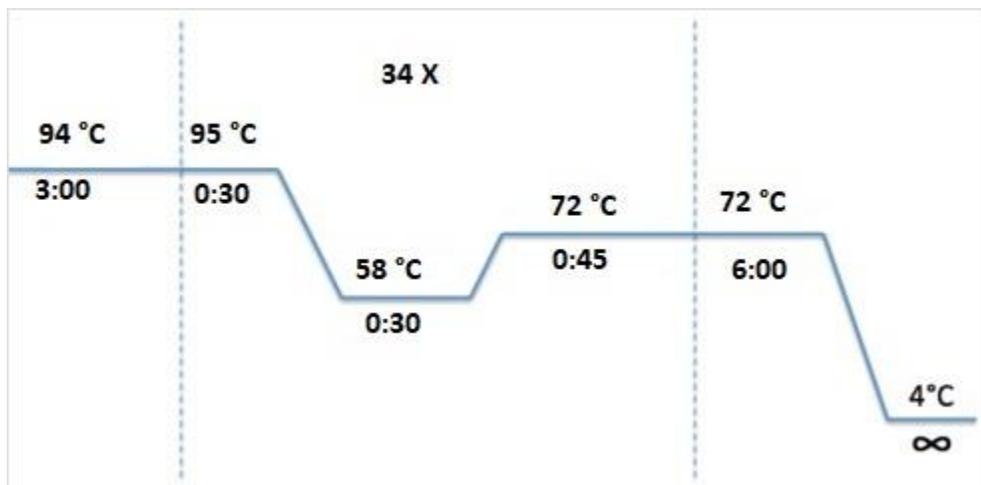


Figura 2. 1 Condiciones de PCR para *GAPDH*.

2.5.4 Análisis del fenotipo.

Pasado 15 y 22 días de la inoculación de los ajos de *Allium ampeloprasum* L con el patógeno, se realizó análisis contrastando el fenotipo. Se eliminó el micelio con ayuda de sanitas, pinzas y bisturí

procurando no lastimar el tejido. Después de retirar el micelio, se les tomaron fotografías mostrando el daño ocasionado por *Sclerotium cepivorum* B o la ausencia de éste. Para confirmar la maceración, se realizaron mediciones de fuerza utilizando una máquina universal Zwick/Roell Z050 bajo las siguientes condiciones: 22 °C, 43 % de Humedad relativa, velocidad de 10 mm/min.

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Minitab versión 19.2, se efectuaron pruebas de comparación de medias ($\alpha = 0.05$). Las **Tablas** y **Figuras** se elaboraron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2016.

III RESULTADOS

3.1 Recuperación de *Sclerotium cepivorum* B

Para realizar la interacción planta-patógeno, se sembraron esclerocios en el centro de cajas Petri que contienen medio PDA. La germinación del esclerocio se observó a los 3 días después de inoculación como se muestra en la **Figura 3.1**.

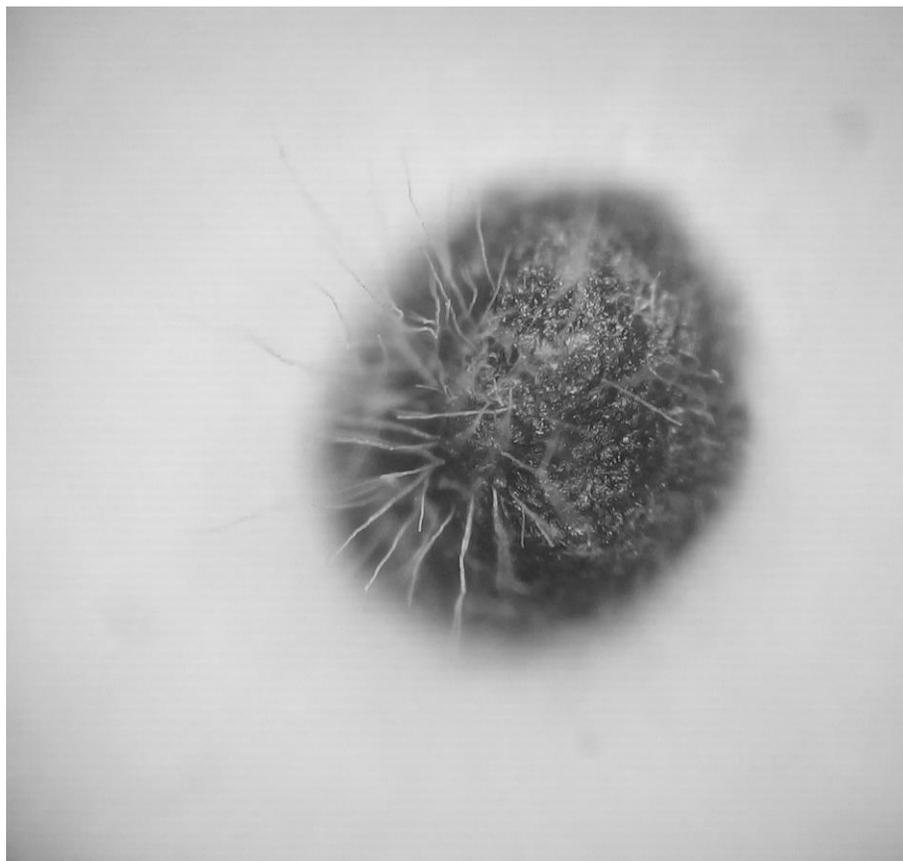


Figura 3.1 Germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* B

Según Prieto en el 2016 el crecimiento típico de *S. cepivorum* B es algodonoso, de bordes uniformes, radial regular de color blanco que se torna pardo con el paso del tiempo. Esta morfología coincide con el resultado obtenido que se muestra en la **Figura 3.2**.

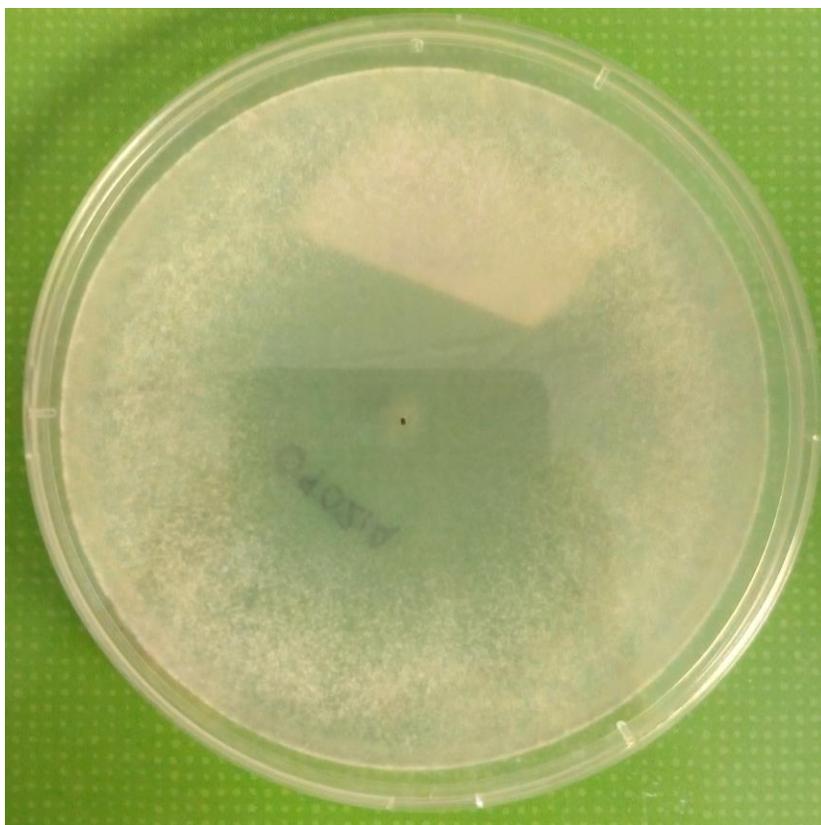


Figura 3.2 Crecimiento de *Sclerotium cepivorum* B en medio PDA.

Una vez transcurridos 15 días después de inoculación; comenzó a formar esclerocios; por lo tanto la caja se torna marrón en lugar de blanco algodonoso.

3.2 Análisis *in silico*

Dentro del banco SSH (Liconá-Juárez, 2016), se encuentran 5 clonas que codifican para alinasa, por lo tanto; se realizó en análisis *in silico* para confirmar la identidad de los candidatos y elegir la que más se ajusta al objetivo. Para ello, se compararon los resultados de Blastx de las clona con mayor tamaño del banco SSH con la primera alinasa (*Allium sativum*) reportada por Van Damme en 1992 y la primera alinasa reportada en *Allium ampeloprasum* por Sayadi *et al.* en 2017 . Se realizó la comparación de aminoácidos de la primer alinasa respecto a la clona candidato (716), lo anterior, empleando el algoritmo de ClustalW2, los resultados se muestran en la **Tabla 3.1** y **Figura 3.3**.

Tabla 3. 1 Resultados de la búsqueda en Blastx.

Descripción		Accesión	Valor E
Alinasa (<i>Allium sativum</i>)		Q01594.1	5e-140
Alinasa (<i>Allium ampeloprasum</i>)		AYN25506.1	1e-135

sp Q01594.1	1	MVESYKKIGSCNKMPCLVILTCIIMSNSLIVNNNNMVQAKVTWTKAAEEAAEAVANINCS
AYN25506.1	1	MVESYKKIGS-NKMPCLVILTCIIMS-SLIVNNNNMVQAKVTWTKAAEEAAEAVANINCSG
716	1	-----
consensus	1
sp Q01594.1	61	HGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQQCSADVASGDGLFLEEYWKQKHEASAV
AYN25506.1	59	HGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQQCSADVASGDGLFLEEYWKQKHEASAV
716	1	-----
consensus	61
sp Q01594.1	121	LVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVIS
AYN25506.1	119	LVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVIS
716	1	-----
consensus	121
sp Q01594.1	181	LSPNMTATFDAPESKVVAAHAPFYPVFREQTKYFNKGYVWAGNAANYVNVSNPEQYIEMV
AYN25506.1	179	LSPNMTATFCAPESKVVAAHAPFYPVFREQTKYFDKGYVWAGNAANYVNVSTPEQYIEMV
716	1	-----
consensus	181
sp Q01594.1	241	TSPNNPEGLLRHAFVIKGCCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILFTMSKFTGHSGSRFGW
AYN25506.1	239	TSPNNPEGLLRKQVIKDCCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILFTMSKFTGHSGSRFGW
716	1	-----HAFVIKGCCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILFTMSKFTGHSGSRFGW
consensus	241***.*****.*****.*****.*****
sp Q01594.1	301	ALIKDESVDNLLNYMTKNTTEGTPRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGTMRDLNDFGFRKL
AYN25506.1	299	ALIKDESVDNLLNYMTKNTTEGTSRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGTMRDLNDFGFRKL
716	50	ALIKDESVDHKLLEVMVKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGTMRDLNDFGFRKL
consensus	301	**.******.***.******.*****.*****.*****.*****.***
sp Q01594.1	361	RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDKDCYQTFQN
AYN25506.1	359	RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDKDCYQTFQN
716	110	RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDKDCYQTFQN
consensus	361	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
sp Q01594.1	421	GRINTQNGVGFEESSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMMKAKRKTPLIKQLFSDQETETA
AYN25506.1	419	GRINTQSGEFCFEAGCRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMMKAKRKTPLIKQLFSDQETETA
716	170	GRINTQSGVGFEEAGSRVRLSLIKTQDDFDQLM-----
consensus	421	*****.*.***.******.*****.*****.*****.*****.*****
sp Q01594.1	481	SRRPFI
AYN25506.1	477	SRRPFI
716		-----
consensus	481

Figura 3.3 Resultados del alineamiento múltiple de la clona 716 de alinasa, respecto a la primer secuencia reportada en *Allium sativum* (Van Damme, 1992) y la primera reportada en *Allium ampeloprasum* (Sayadi *et al.*, 2017).

De las 5 clonas se decidió trabajar con la rotulada en el banco SSH como 716, debido a que es la que comparte mayor identidad con la primera secuencia del gen codificante para alinasa. Además, se identificó que el fragmento del banco SSH se encuentra en el extremo carbono terminal y tiene un valor E de $5e-140$ lo cual garantiza que se trata de un fragmento del gen alinasa.

3.3 Construcción de V-VIGS

Una vez seleccionada la clona, se recuperó del banco y mediante transformación en células químicamente competentes, se sembró en agar LB con ampicilina, de las colonias que crecieron se sembraron 4 en caldo LB y de dicho crecimiento se realizó extracción de ADN plasmídico. Los resultados de la extracción de ADN plasmídico se muestran a continuación:

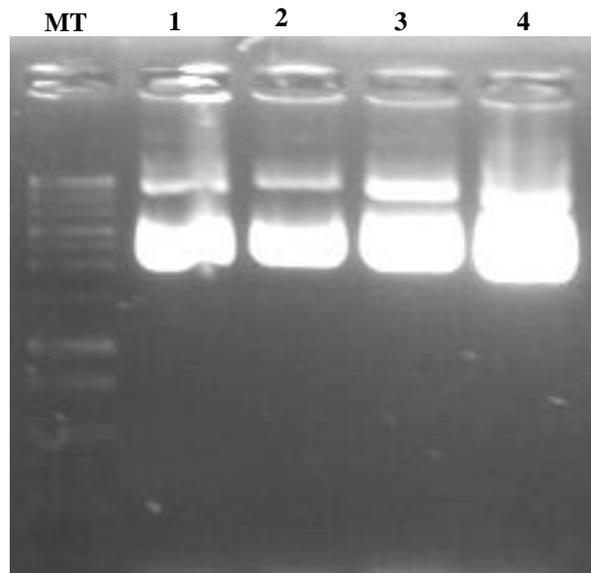


Figura 3.4 Electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-4, ADN plasmídico.

Se puede observar en la **Figura 3.4** las diferentes formas del ADN plasmídico de las 4 colonias seleccionadas.

Una vez determinado que la extracción fue correcta, se confirmó que el ADN obtenido correspondiera a la clona 716. Para ello, se digirió el ADN plasmídico con la enzima de restricción *Eco* RI para liberar el fragmento *AaAlli* del vector pGEM T-Easy. La digestión se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa como se muestra a continuación.

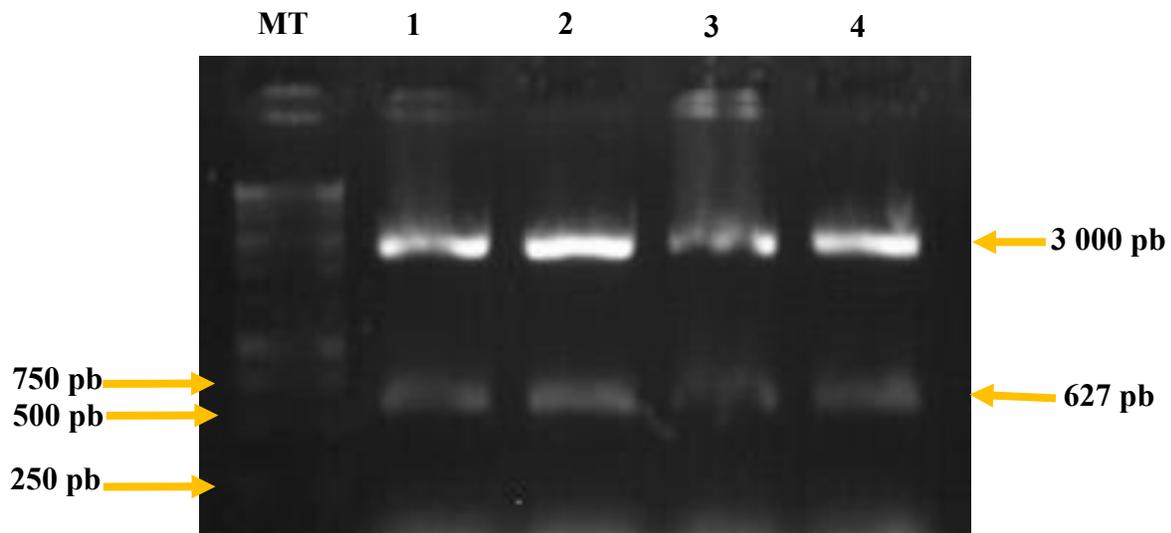


Figura 3.5 Comprobación del inserto *AaAlli* mediante digestión. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-4, producto de la digestión con *Eco* RI.

La digestión con la enzima de restricción *Eco* RI liberó el fragmento del vector, por lo tanto, se observa la banda de aproximadamente 3 000 pb correspondiente al vector y la banda de 627 pb correspondiente al fragmento del gen *AaAlli*. Lo anterior, confirma que las colonias seleccionadas contienen el inserto correspondiente al gen que codifica para la Alinasa.

Una vez confirmado que se contaba con la clona correcta; se procedió a definir la temperatura óptima de alineamiento para los oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento de 323 pb del gen *AaAlli*, cabe mencionar que en los oligonucleótidos se generaron por Ingeniería Genética los sitios de restricción *Bam* HI y *Sma* I, los cuales son necesarios para la ligación del fragmento en antisentido en el V-VIGS. La ficha técnica proporcionada por el proveedor, indica una temperatura de alineamiento de 68 °C y se confirmó realizando un gradiente (60 °C -70 °C)

Las condiciones programadas en el termociclador, se indican en la **Figura 3.6**.

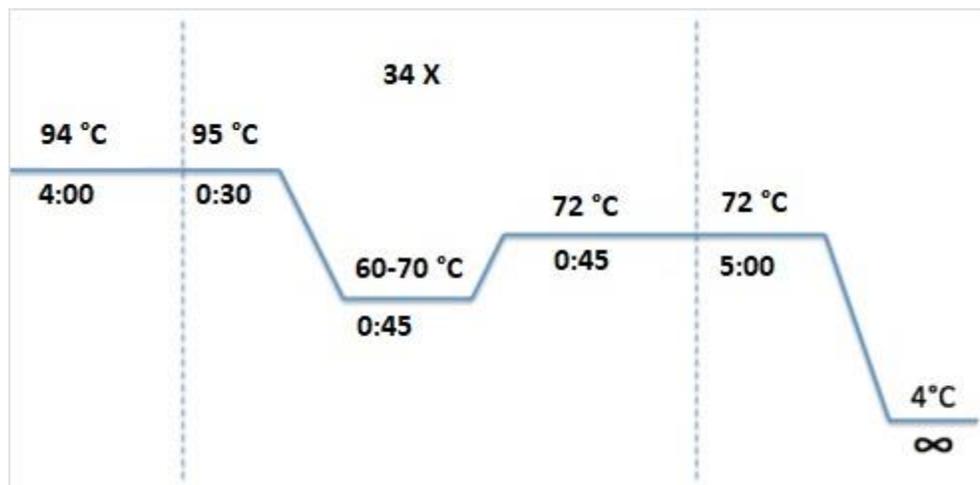


Figura 3.6 Condiciones programadas para el gradiente de temperatura de alineamiento.

Se comprobaron las reacciones de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (**Figura 3.7**), e interpretando la imagen, se determinó 66 °C como temperatura óptima de alineamiento.

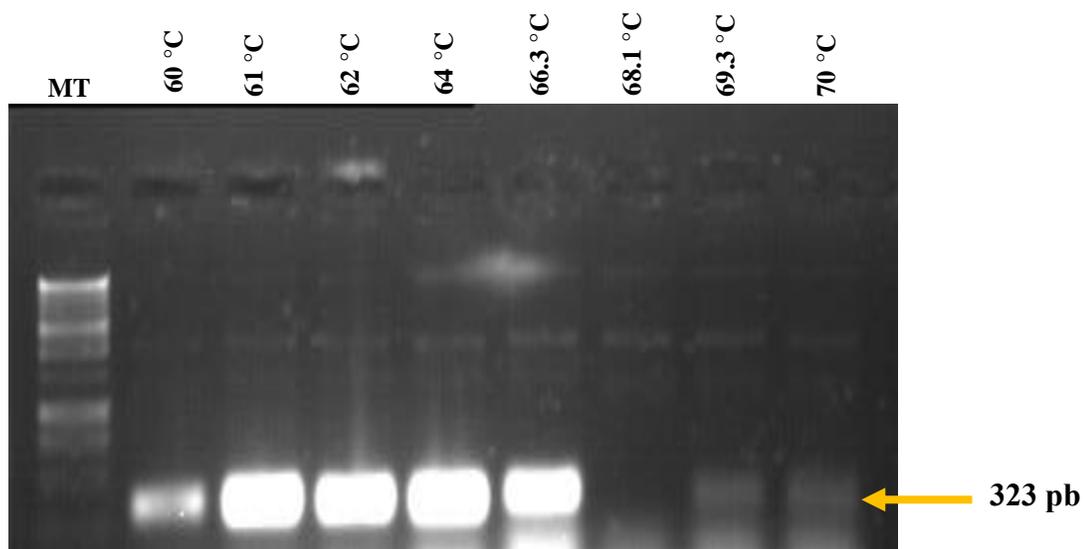


Figura 3.7 Determinación de temperatura de alineamiento Carriles: MT, Marcador de tamaño, 2-9; temperaturas de 60-70 °C.

A temperatura de 66.3 °C es la temperatura más elevada en la que se observa mayor amplificación del producto de PCR, por lo cual se decidió trabajar a un Tm de 66 °C.

Se realizó PCR empleando el ADN plasmídico como templado, se realizaron 4 repeticiones para que fuera reproducible y de esta manera obtener mayor cantidad del fragmento amplificado.

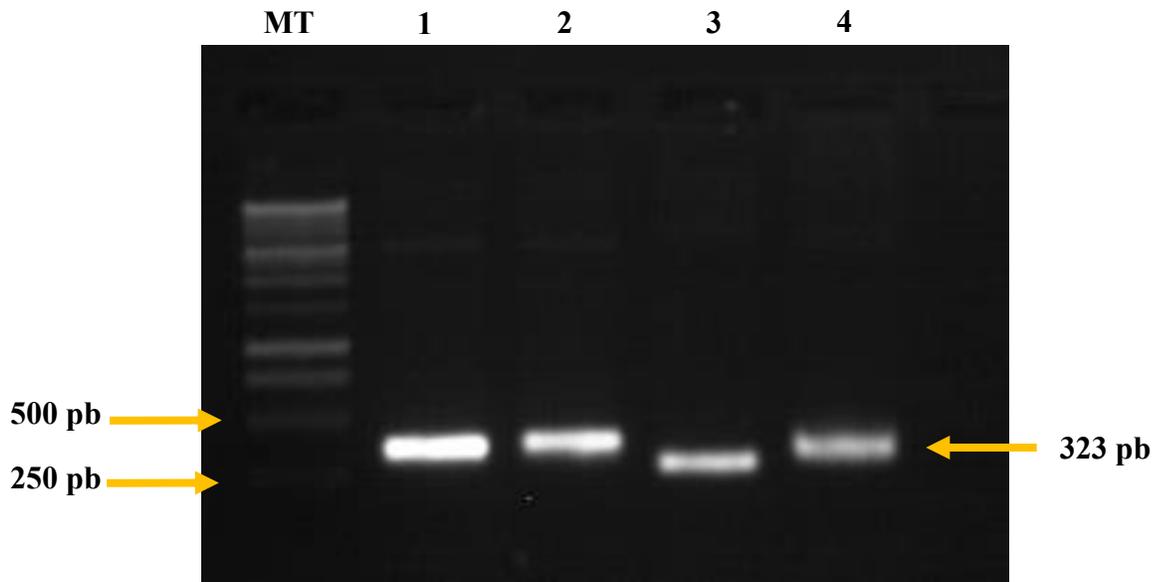


Figura 3. 8 Electroforesis de los productos de PCR a 66 °C. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-4, producto de PCR.

Del producto de PCR se corrieron 20 μ L en electroforesis en gel de agarosa y de ellos se purificó mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, a dicho producto eluído se le realizó electroforesis y el resultado se muestra en la **Figura 3.9**.

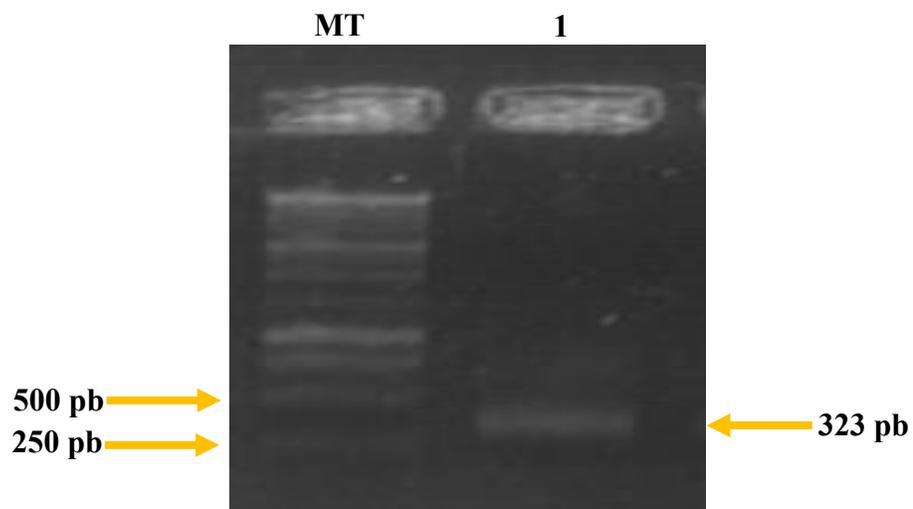


Figura 3. 9 Electroforesis en gel de agarosa del producto de elución. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1, producto de elución del fragmento del gen *AaAlli*.

Se puede observar en la **Figura 3.9** una banda de 323 pb, correspondiente al fragmento del gen *AaAlli* y no se observan impurezas ni dímeros.

Se utilizó 1 μ L del producto de elución para realizar la ligación en pGEM como se describe en la metodología.

De la reacción de ligación una vez transcurridas las 16 h, se tomaron 2 μ L para transformar células químicamente competentes (DH5 α). De las transformantes se seleccionaron 4 colonias blancas y se realizó extracción de ADN plasmídico. Para comprobar que la ligación fuera realizada correctamente; fueron digeridas las 4 muestras con la enzima *Eco* RI esperando observar dos bandas.

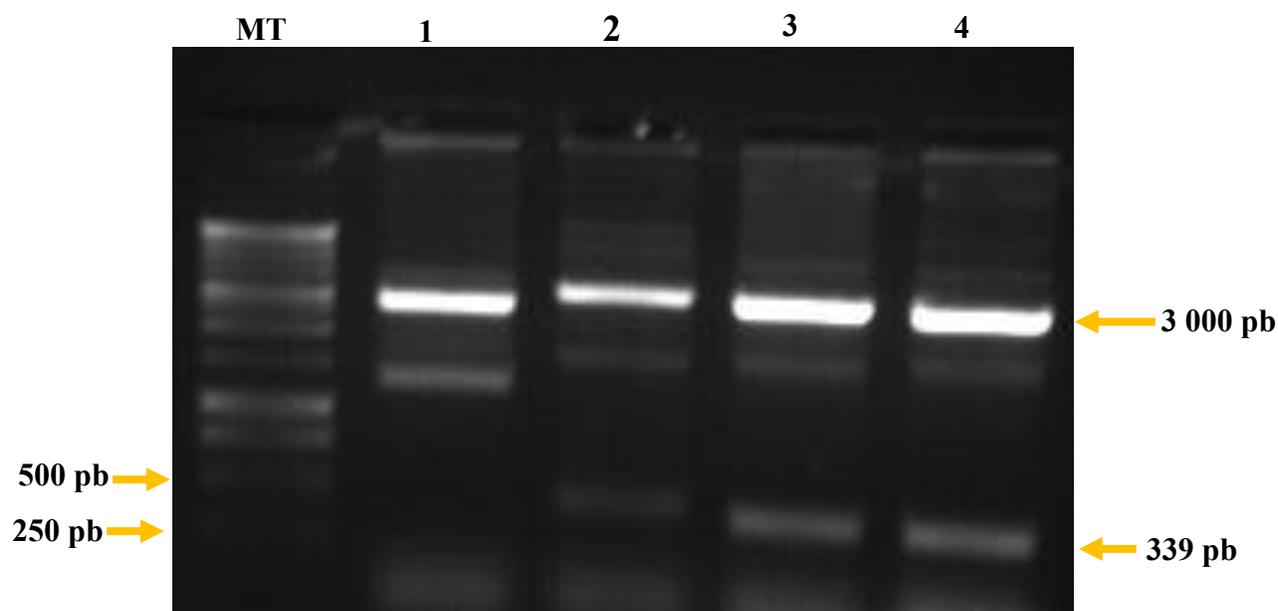


Figura 3. 10 Digestión con *Eco* RI. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-4, digestiones con *Eco* RI.

Como se observa en la **Figura 3.10**; en las muestras 2-4 aparece 1 banda de 3 000 pb correspondiente al vector pGEM y en la parte inferior una banda de aproximadamente 339 pb correspondiente al fragmento del gen *AaAlli* más los sitios de restricción de *Eco* RI.

Una vez comprobados el vector e inserto, se procedió a realizar la liberación del fragmento de 323 pb, al cual, por Ingeniería Genética se les generaron los sitios de restricción *Bam* HI y *Sma* I, para la digestión con ambas enzimas, se tomaron las muestras de los carriles con número 3 y 4.

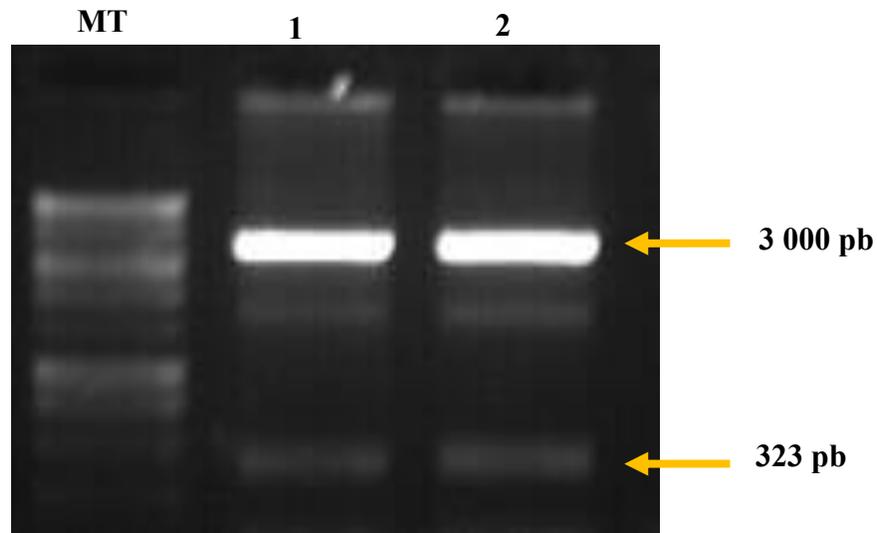


Figura 3. 11 Digestión con el par de enzimas *Bam* HI, *Sma* I. Carriles: MT; Marcador de tamaño, 1-2; digestiones con *Bam* HI y *Sma* I.

En la **Figura 3.11** se observa que en los carriles marcados con los números 1 y 2 la banda superior de 3 000 pb correspondiente al vector pGEM y una banda inferior correspondiente al fragmento del gen *AaAlli* con los sitios que se generaron *Bam* HI y *Sma* I

Una vez confirmadas las clonas que contenían el fragmento, se procedió a trabajar en la obtención del vector PHYVV A, desde la construcción de V-VIGS::*AaPR*.

Se tomó 1 μ L de V-VIGS::*AaPR* almacenado a -20 °C y se transformaron células químicamente competentes de *Escherichia coli* (DH5 α), las transformantes se sembraron en agar LB y ampicilina. Se seleccionaron las colonias más aisladas y se resembraron en caldo LB. Al cultivo se le realizó extracción de ADN plasmídico, el resultado se muestra en la siguiente **Figura 3.12**.

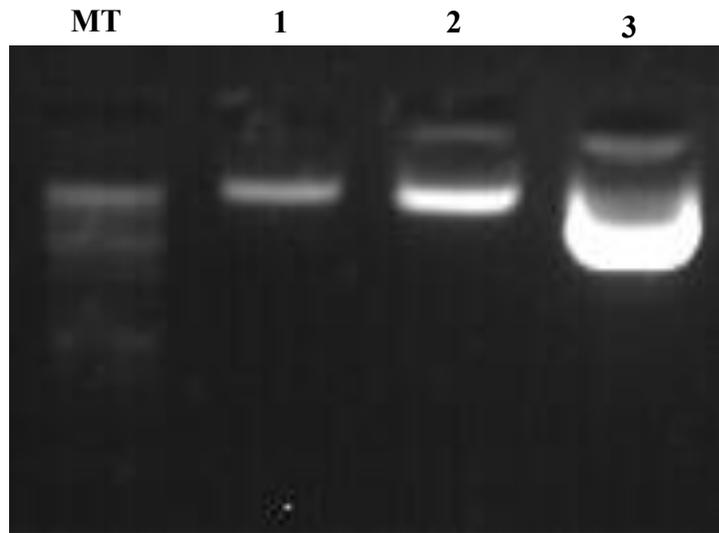


Figura 3. 12 ADN plasmídico de la construcción V-VIGS::*AaPR*. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-3, muestras de ADN plasmídico.

Como se observa en la **Figura 3.12**, se obtuvo ADN plasmídico en las 3 clonas seleccionadas, se eligió la muestra 3 para las pruebas posteriores.

Para confirmar que la muestra 3 corresponde a la construcción V-VIGS::*AaPR* se realizó digestión con el par de enzimas *Bam* HI y *Sma* I (**Figura 3.13**), sitio en el cual fue clonado el fragmento del gen *AaPR*.

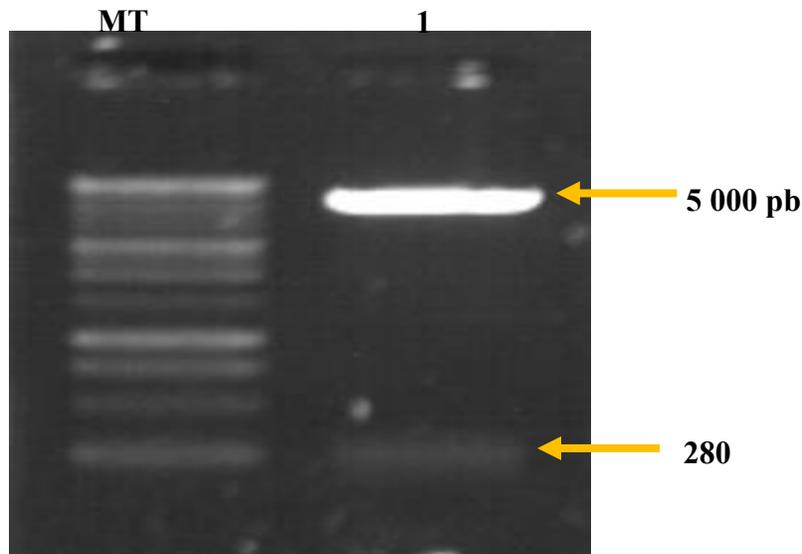


Figura 3. 13 Digestión con *Bam* HI y *Sma* I. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1, ADN plasmídico digerido.

La **Figura 3.13** muestra el resultado de la digestión con el par de enzimas, se observa una banda en la parte superior correspondiente al vector PHYVVV A de 5 000 pb aproximadamente y en la parte inferior la banda de 280 pb correspondiente al fragmento del gen *AaPR*.

Una vez comprobados la liberación de los fragmentos por parte de los vectores pGEM y PHYVVV A, se procedió a digerir ambos elementos con el par de enzimas *Bam* HI y *Sma* I, para obtener PHYVVV A linealizado y el fragmento del gen *AaAlli* con los sitios *Bam* HI y *Sma* I (**Figura 3.14**).

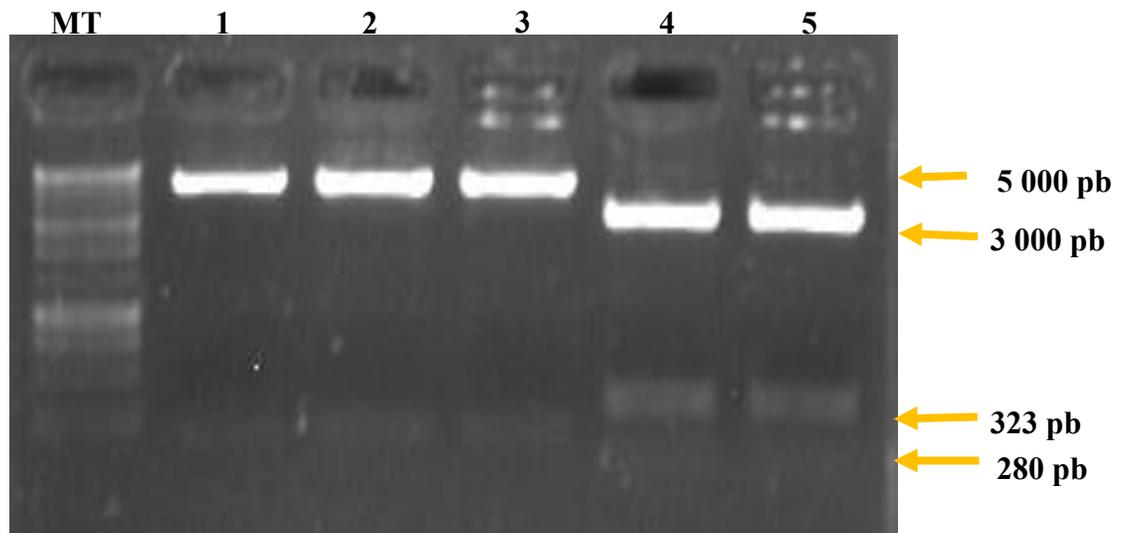


Figura 3. 14 Digestión de V-VIGS::*AaPR* y pGEM::*AaAlli* con *Bam* HI y *Sma* I. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-3, digestión de V-VIGS::*AaPR*; 4-5, digestiones de pGEM::*AaAlli*.

En la **Figura 3.14** se observan en los carriles marcados 1-3 la digestión de V-VIGS::*AaPR* con las enzimas *Bam* HI y *Sma* I, en la parte superior la banda de 5 000 pb corresponde al vector PHYVVVA y en la parte inferior una banda de 280 pb correspondiente al fragmento del gen *AaPR*, de los carriles 1-3 fueron escindidas las bandas de 5 000 pb para su purificación. Los carriles rotulados como 4-5 corresponden a la digestión de pGEM::*AaAlli*, con el mismo par de enzimas y aparece en la parte superior una banda de 3 000 pb correspondiente al vector pGEM y en la parte inferior la banda del gen *AaAlli* de 323 pb, ésta fue escindida del gel de agarosa para su purificación.

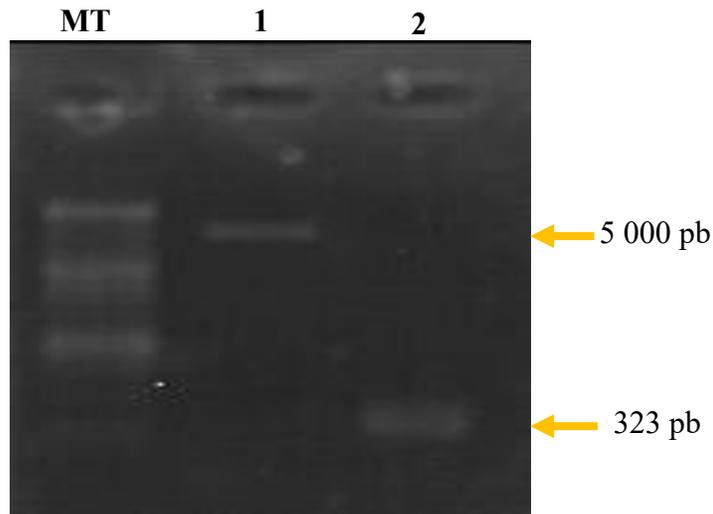


Figura 3. 15 Electroforesis en gel de agarosa del producto de elución del vector PHYVV A y el fragmento del gen *AaAlli*. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1, vector PHYVV A; 2, fragmento del gen *AaAlli*.

En la **Figura 3.15** se observa en el carril 1 la banda de 5 000 pb correspondiente al vector PHYVV A linealizado y purificado; en el carril 2 el fragmento del gen *AaAlli* de la misma manera que el vector, esto para ser ligados en una relación 1/3 de vector/inserto.

Se realizó la ligación y transformación en células de *E. coli*, las transformantes se cultivaron en medio LB con ampicilina para realizar extracción de ADN plasmídico y posteriormente la digestión con *Bam* HI y *Sma* I, además de un PCR para validar el fragmento usando los oligonucleótidos específicos.

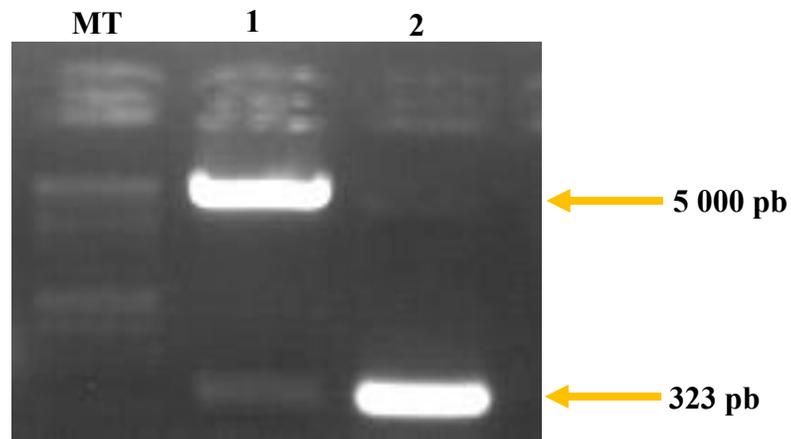


Figura 3. 16 Comprobación de la construcción V-VIGS::*AaAlli*. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1, digestión con *Bam* HI y *Sma* I; 2, PCR de la construcción.

Como se observa en la **Figura 3.16**; en el carril 1 existen dos bandas; la de mayor tamaño (5 000 pb) corresponde al vector PHYVV A, y la de 323 corresponde al fragmento del gen *AaAlli*. En el carril 2 la banda de 323 pb corresponde a la amplificación por PCR del fragmento; comprobándose así la construcción mediante PCR y digestión enzimática.

Par realizar el silenciamiento se requiere también del componente B de PHYVV; por lo tanto, de obtuvo PHYVV B transformando células químicamente competentes de *E. coli* (DH5 α) con ADN almacenado en el laboratorio de Biología Molecular.

Las transformantes se seleccionaron y sembraron en caldo LB con ampicilina, a este cultivo se le realizó extracción de ADN plasmídico y posteriormente electroforesis en gel de agarosa (**Figura 3.17**).

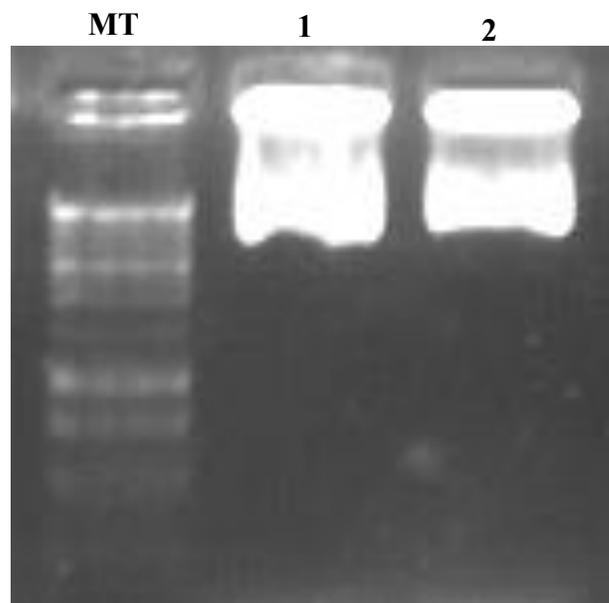


Figura 3. 17 ADN plasmídico de PHYVV B. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-2, ADN plasmídico de PHYVV B.

Las dos colonias seleccionadas muestran alta concentración de ADN plasmídico, de ambas se tomó 1 μ L para confirmar mediante digestión enzimática, empleando la enzima de restricción *Bam* HI. En la **Figura 3. 17** se observa que ambas colonias dos bandas, la banda del vector pBluescript de aproximadamente 3 000 pb, la segunda banda de 2 571 pb que contiene al componente B de PHYVV B.

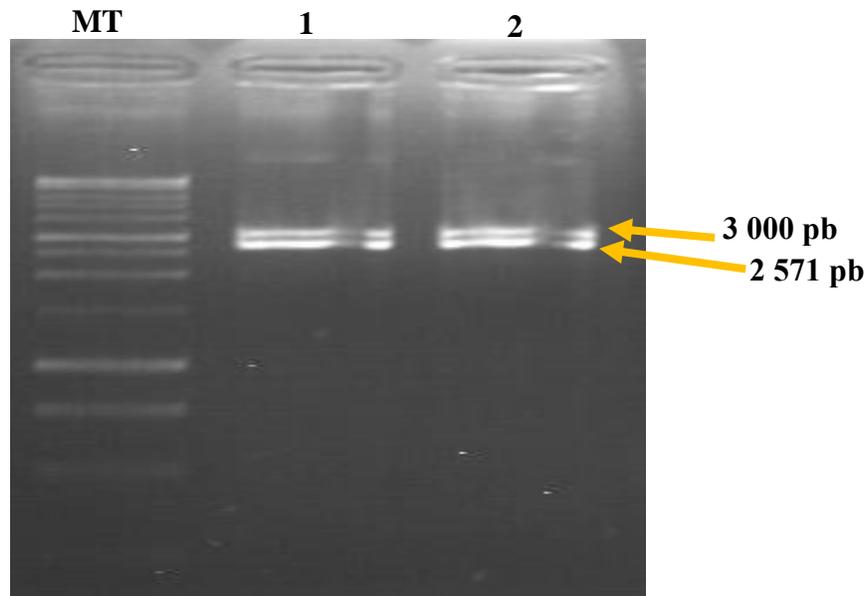


Figura 3. 18 Digestión con *Bam* HI de PHYVV B. Carriles: MT, Marcador de tamaño; 1-2, digestiones de PHYVV B.

3.4 Interacción planta-patógeno

Se realizó una interacción para determinar la incompatibilidad entre *Sclerotium cepivorum* y *Allium ampeloprasum*, utilizando como control, bulbillos de *Allium sativum* var Texcoco tipo Taiwan.

De *Sclerotium cepivorum* crecido en medio Czapeck durante 7 días se tomó un disco de aproximadamente 1 cm y se colocó en un frasco que contenía un diente de ajo elefante o ajo común con raíces generadas durante 3 días; en ese punto se realizó la interacción entre ambos organismos y se incubó a 16 °C, observándose el fenotipo a las 60 h y a los 22 días después de interacción. En la **Figura 3.19** se observan los resultados fenotípicos de dicha interacción.

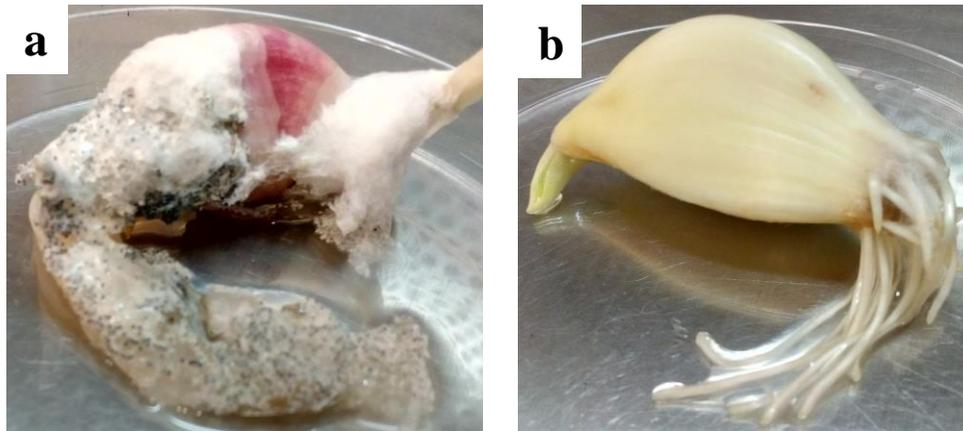


Figura 3. 19 Interacción planta-patógeno a los 15 días. **a:** *Allium sativum* var jaspeado-*Sclerotium cepivorum*, **b:** *Allium ampeloprasum*-*Sclerotium cepivorum*.

Se pudo observar en el panel que el ajo común es susceptible a la pudrición blanca, a los 15 días es notoria la invasión del hongo causándole maceración e incluso comienza con la formación de esclerocios. Por el contrario, en la especie resistente se logra distinguir en la parte radical poco micelio, el cual logra invadir, pero a los 15 días después de interacción no logra infectarlo. Este resultado confirma que *Allium ampeloprasum* L es resistente a la pudrición blanca

3.5 Expresión del gen *AaAlli* a las 60 h

El banco generado por Licona-Juárez en 2016 fue obtenido por Hibridación Sustractiva bajo condiciones de Supresión (SSH); a las 60 h de interacción. Para confirmar la expresión diferencial del gen *AaAlli* en *Allium ampeloprasum*; se realizó la interacción durante el tiempo indicado.

Una vez transcurrido, se extrajo ARN total (**Figura 3.20**) y se corrió en electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1.2 % y se observa la integridad de las subunidades ribosomales 28 S y 18 S.

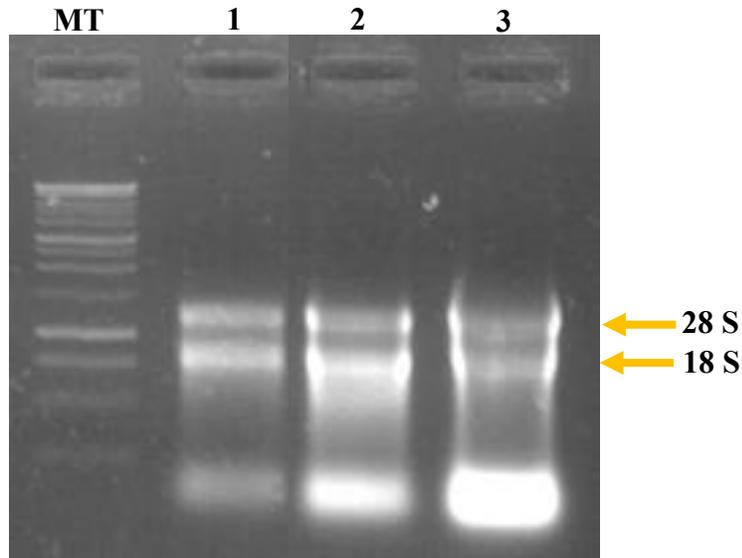


Figura 3. 20 Extracción de ARN total a las 60 h. Carriles; MT, marcador de tamaño; 1-3, ARN de los ajos en interacción.

Por lo tanto, se procedió a la síntesis de ADNc utilizando 1 000 ng de ARN total, se cuantificó en Nanodrop 2000 y del ADN sintetizado se utilizaron 1 000 ng para realizar RT-PCR (**Figura 3.21**).

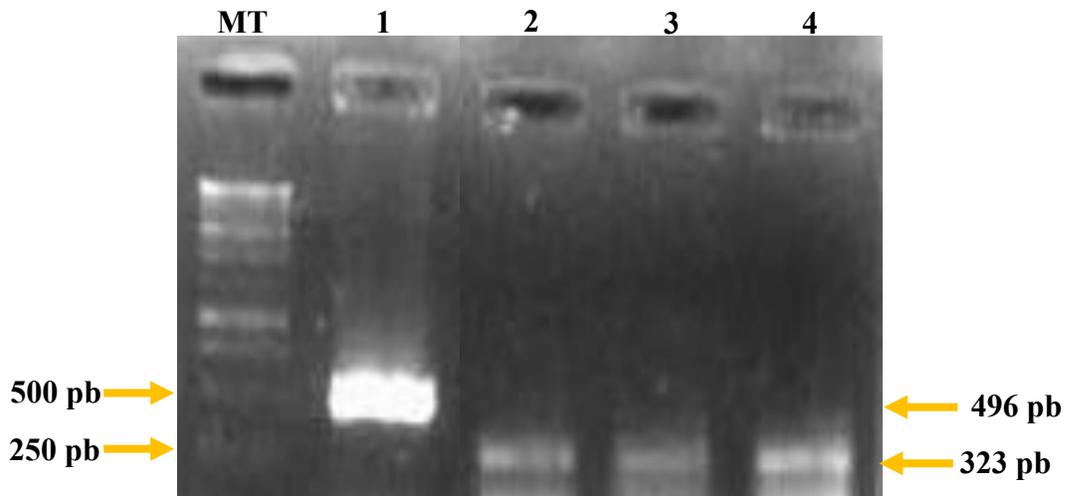


Figura 3. 21 RT-PCR a las 60 h. Carriles; MT, Marcador de tamaño; 1,Control positivo *GAPDH*; 2-4, RT-PCR de ajos en interacción

La banda de 323 pb producto del RT-PCR confirma la expresión diferencial del gen *AaAlli* a las 60 h (Carriles 2-4) aunque comparado con el gen constitutivo *GAPDH*; la expresión de *AaAlli* es menor.

3.6 Silenciamiento del gen *AaAlli*

3.6.1 Confirmación del silenciamiento del gen *AaAlli* a las 60 h mediante RT-PCR

Una vez confirmada la expresión diferencial del gen *AaAlli*, la construcción de V-VIGS::*AaAlli* y los componentes silvestres; se procedió a inocular los ajos (3 silenciados y 3 controles) con 2.5 µg de la construcción + 2.5 µg de PHYVV B silvestre para los ajos silenciados y 2.5 µg de PHYVV A silvestre + 2.5 de PHYVV B silvestre para los controles del silenciamiento.

Una vez inoculados se colocó un disco de micelio de *Sclerotium cepivorum* B para la interacción y se incubaron a 16 °C.

Una vez transcurridas las 60 h se realizó extracción de ARN total de los ajos y se cargó en electroforesis de gel de agarosa desnaturante al 1.2 % (**Figura 3.22**).

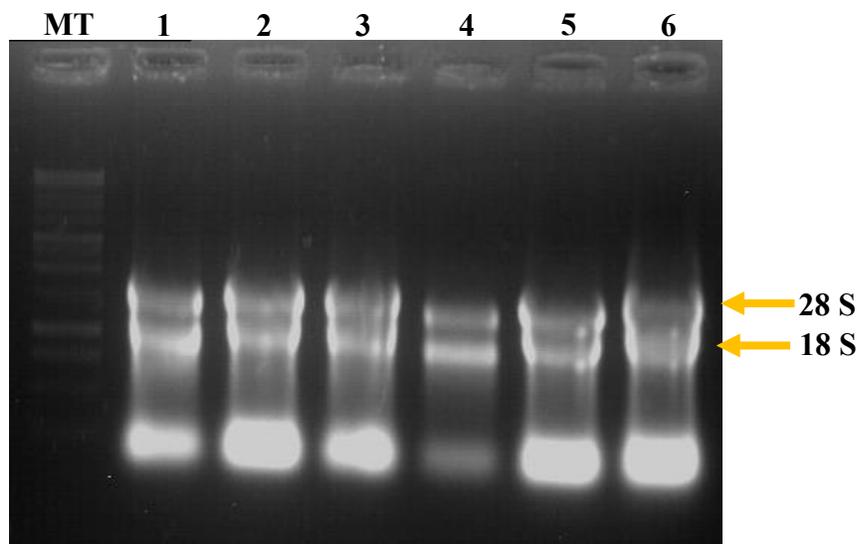


Figura 3. 22 Extracción de ARN a las 60 h. Carriles; MT, Marcador de tamaño; 1-3, ARN de ajos no silenciados; 4-6, ARN de ajos silenciados.

En las 6 muestras las subunidades ribosomales 28 S y 18 S se observan íntegras y la concentración de cada extracción de muestra en la **Tabla 3.2**:

Tabla 3. 2 Cuantificación del ARN obtenido a las 60 h.

Tratamiento	Repetición	Concentración (ng/ μ L)
No silenciado	1	1 182.6
No silenciado	2	2 206.5
No silenciado	3	2 843.4
Silenciado	1	712.6
Silenciado	2	2 872.4
Silenciado	3	6 396.6

Como indica en la metodología se sintetizó ADNc utilizando 1 000 ng de ARN. Dicho ADNc se usó como molde para RT-PCR (**Figura 3.23**) utilizando 1 000 ng de cada muestra y del gen constitutivo *GAPDH* como control.

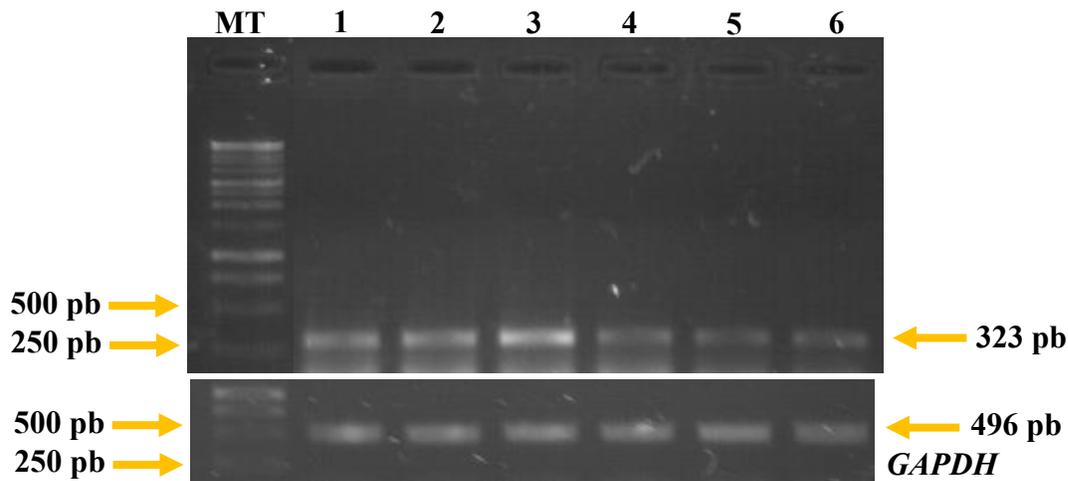


Figura 3. 23 RT-PCR del silenciamiento a las 60 h. Carriles; MT, Marcador de tamaño; 1-3, RT-PCR de ajos no silenciados; 4-6; RT-PCR de ajos silenciados. *GAPDH* en cada carril como control.

Como se observa en la **Figura 3.23** en los carriles 4-6; la expresión del gen *AaAlli* en los ajos silenciados se ve disminuida comparado con los no silenciados, respecto al gen constitutivo

GAPDH se observa un el panel inferior una banda de 496 pb expresándose constitutivamente en todas las muestras silenciadas y no silenciadas.

El resultado de la disminución de la expresión del gen silenciado coincide con lo reportado por Portillo-Nava en 2012 con el gen *AsPPR* silenciado, así como por lo reportado por Meza-Reyes (2017) con los genes *AaPPR*, *AaPR*, ambos con el V-VIGS derivado del vector PHYVV en *Allium sativum* blanco perla y *Allium ampeloprasum* elefante, respectivamente.

3.6.2 Fenotipo de los ajos a los 15 días

Una vez confirmado el silenciamiento del gen mediante RT-PCR; para conocer el fenotipo resultante del silenciamiento del gen *AaAlli*, se incubaron durante 15 días los ajos en interacción a una temperatura de 16 °C en una cámara de crecimiento Biotronette.

En la **Figura 3.24** se muestran los resultados de la evaluación fenotípica a los 15 días después del silenciamiento más interacción, en el panel **a** se observa un ajo susceptible (*Allium sativum* var Texcoco tipo taiwan) infectado y macerado por *Sclerotium cepivorum* B, en el panel **b** se observan la parte radicular necrótica y de la misma forma la parte de la puya pero aún no se macera por completo; en contraste, el ajo elefante no silenciado (**c**) fue resistente y no sufrió maceración alguna.

Para confirmar lo observado se realizó la medición de la fuerza aplicada para deformar a cada uno de los ajos. Para ello; se registró el primer punto en el cual hubo una caída de fuerza durante la medición de fuerza estándar (**Figura 3.25**) respecto a la deformación del ajo.

Los datos de la fuerza necesaria para romper cada muestra de ajo, se registraron en la **Tabla 3.3** y como se observa; los ajos susceptibles presentan mayor maceración y por lo tanto requirió menor fuerza, en contraste, los ajos no silenciados tienen los valores más altos (130 – 161 N).

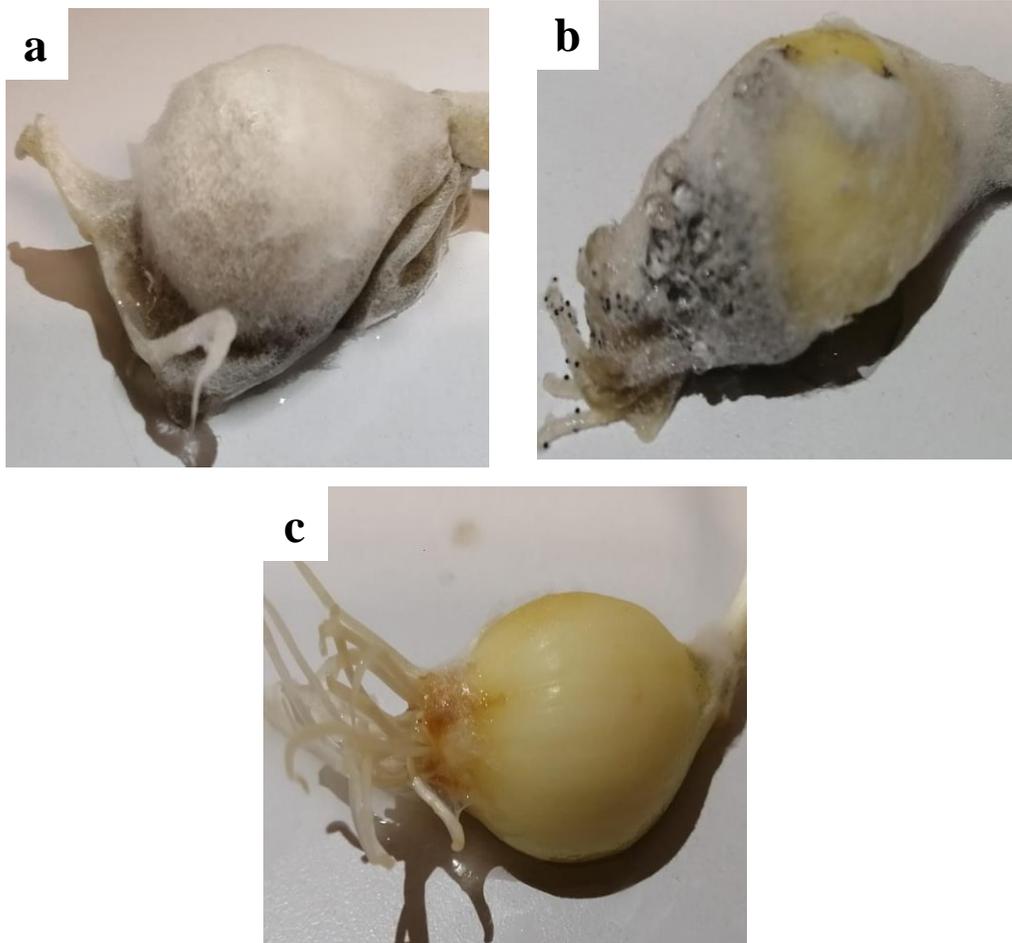


Figura 3. 24 Evaluación fenotípica a los 15 días después de interacción. **a:** *Allium sativum* var Texcoco tipo Taiwan, **b:** *Allium ampeloprasum* silenciado, **c:** *Allium ampeloprasum* no silenciado.

Tabla 3. 3 Resultados de la medición de fuerza aplicada a los 15 días después de interacción.

Tratamiento	Repetición	Fuerza (N)
Control	1	39.20
Control	2	18.69
Control	3	25.42
Silenciado	1	110.62
Silenciado	2	41.45
Silenciado	3	80.23
No silenciado	1	154.73
No silenciado	2	161.34
No silenciado	3	130.62

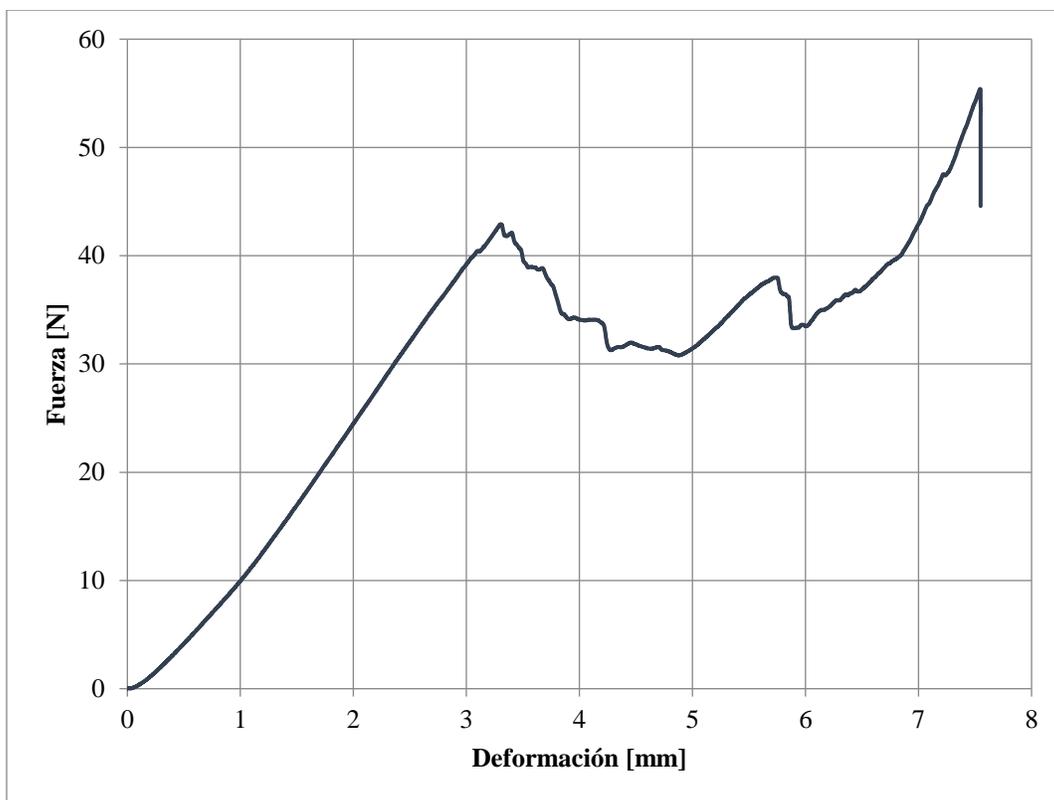


Figura 3. 25 Deformación generada por la fuerza aplicada sobre el ajo utilizando la maquina universal Zwick/Roell Z050.

3.6.3 Fenotipo de los ajos a los 22 días

Bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 3.6.2, se evaluó el fenotipo generado a los 22 días después de la interacción con *Sclerotium cepivorum* B.

En la **Figura 3.26** se muestran los resultados de la evaluación fenotípica a los 22 días después del silenciamiento, en el panel **a** se observa un ajo susceptible invadido y macerado por *Sclerotium cepivorum* B, en el panel **b** el ajo elefante silenciado mostró el mismo comportamiento; en contraste el ajo elefante no silenciado (**c**) fue resistente y no sufrió maceración, solo se observa el micelio comenzando a invadir la raíz.

En comparación con el análisis fenotípico a los 15 días; el ajo susceptible en ambos casos se observa macerado, el ajo elefante silenciado a los 15 días está infectado, macerado y con partes necróticas, similar a los 22 días que se observa maceración incluso en la parte central y la formación de abundantes esclerocios. El ajo no silenciado en ambos casos mostró resistencia observándose solo el inicio de la invasión de la raíz (22 días) por *Sclerotium cepivorum* B.

Este resultado confirma la resistencia de *Allium ampeloprasum* contra *Sclerotium cepivorum* y que la construcción que no contiene ningún EST (PHYVV- Δ Cap) no produce daño (**Figuras 3. 24 y 3.26** panel (c) al ajo).

La efectividad de PHYVV como vector de silenciamiento génico inducido por virus ha sido reportado por Abraham-Juárez en el 2008 al silenciar los genes *Comp*, *pAmt*, y *Kas* en plantas de Chile (*Capsicum annuum*) y no observó síntomas por infección viral al inocular el vector (PHYVV) vacío, resultados similares fueron obtenidos en el presente trabajo (**Figura 3.26**).

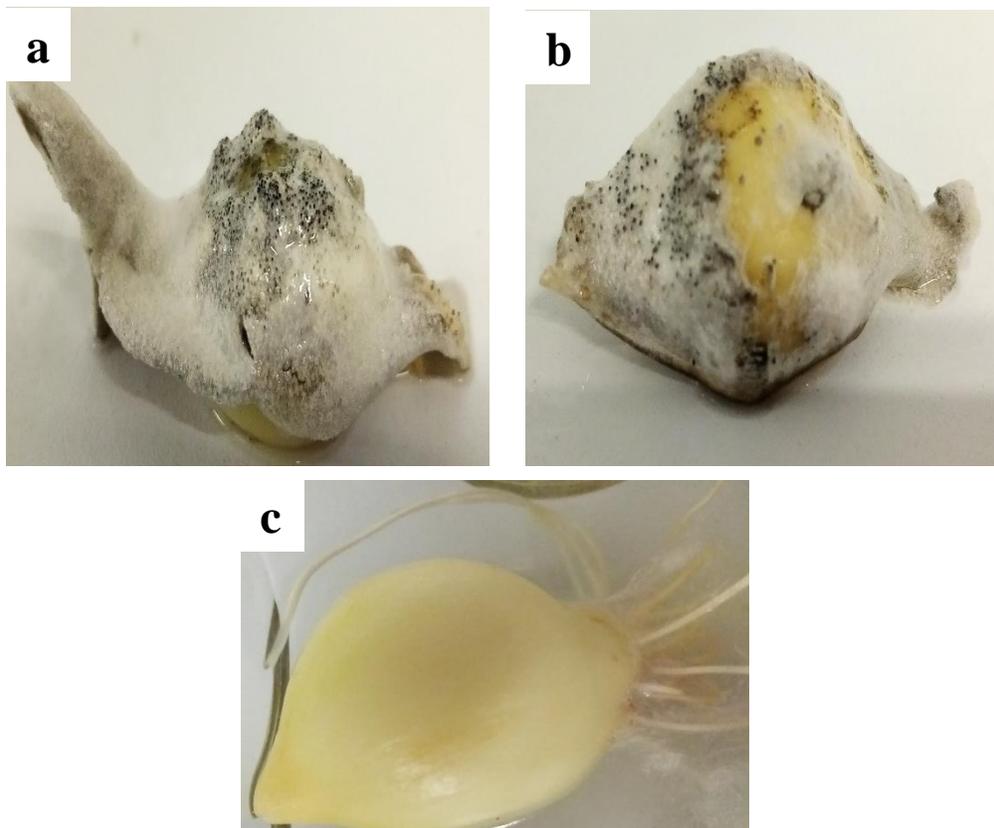


Figura 3. 26 Evaluación fenotípica a los 22 días después de interacción. **a:** *Allium sativum* var Texcoco tipo Taiwan, **b:** *Allium ampeloprasum* silenciado, **c:** *Allium ampeloprasum* no silenciado.

Como se indicó el análisis fenotípico a los 15 días; se realizó la medición de la fuerza aplicada para deformar a cada uno de los ajos.

Tabla 3. 4 Resultados de la medición de fuerza aplicada a los 22 días después de interacción.

Tratamiento	Repetición	Fuerza (N)
Control	1	44.13
Control	2	40.62
Control	3	43.18
Silenciado	1	40.45
Silenciado	2	40.62
Silenciado	3	26.11
No silenciado	1	89.01
No silenciado	2	50.70
No silenciado	3	82.80

Los datos de la fuerza necesaria para romper cada muestra de ajo, se registraron en la **Tabla 3.5** y como se observa; la repetición 1 del ajo elefante no silenciado necesitó mayor fuerza por lo que se confirma la nula maceración ocasionada por *Scerotium cepivorum* B, en contraste, la repetición 3 de los ajos silenciados mostró el mayor signo de maceración y por lo tanto requirió menor fuerza.

3.7 Análisis estadístico

3.7.1 Análisis estadístico de los ajos a los 15 días

Una vez observado el fenotipo resultante al silenciar el gen *AaAlli*, y registrada la fuerza necesaria para deformar a los ajos, se realizó un ANOVA de un solo factor (Fuerza) y comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza de 95 %.

En los resultados de análisis de varianza (**Tabla 3.5**), el valor de $p=0.002$ indica la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos (silenciado, no silenciado y control).

Tabla 3.5 Resultados del análisis de varianza a los 15 días.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Silenciamiento	2	22 159	11 079.6	21.79	0.002
Error	6	3 152	525.4		
Total	8	25 311			

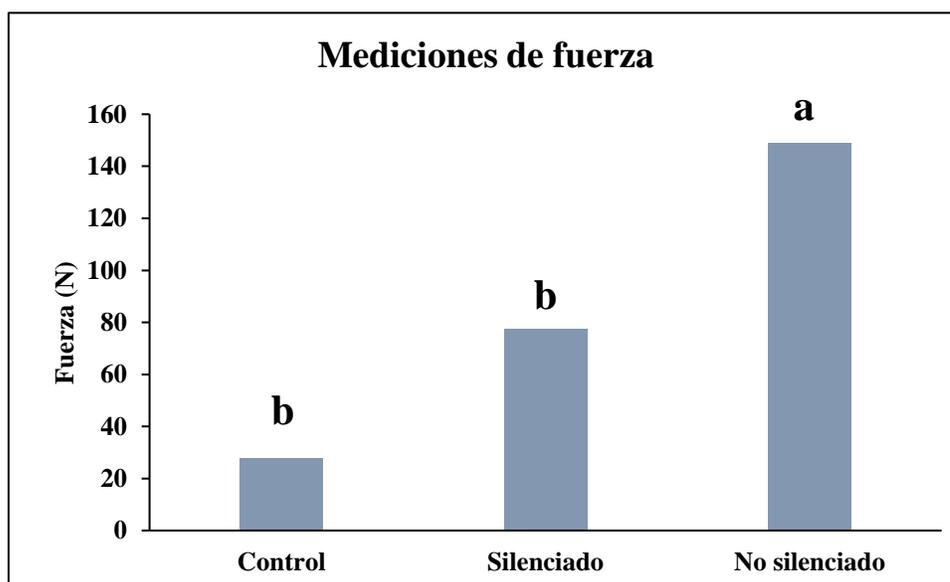


Figura 3. 27 Comparación de medias de Tukey de la variable Fuerza a los 15 días.

Valores con la misma letra son estadísticamente similares ($\alpha=0.05$).

Durante la comparación de medias de Tukey de los 3 grupos; como se indica en la **tabla 3.5**, los datos tienen diferencias altamente significativas. De los cuales, los ajos no silenciados (**Figura 3.27**) tienen los valores más altos (**a**), seguido de los silenciados y el control (**b**). Estadísticamente respecto a la variable fuerza; los ajos silenciados tienen un comportamiento similar al control, lo que confirma el fenotipo susceptible de *Allium ampeloprasum* L al silenciar el gen *AaAlli*.

3.7.2 Análisis estadístico de los ajos a los 22 días

Para confirmar si existen diferencias significativas entre la fuerza necesaria para deformar a los ajos respecto a los tratamientos; se realizó un ANOVA de un solo factor (Fuerza) y comparación de medias de Tukey con un α de 0.05, utilizando el programa estadístico Minitab 19 y graficando en excel.

En los resultados de análisis de varianza (**Tabla 3.6**), el valor de $p=0.022$ indica la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 3. 6 Resultados del análisis de varianza a los 22 días.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Silenciamiento	2	2 519.7	1 259.8	7.63	0.022
Error	6	990.9	165.1		
Total	8	3 510.5			

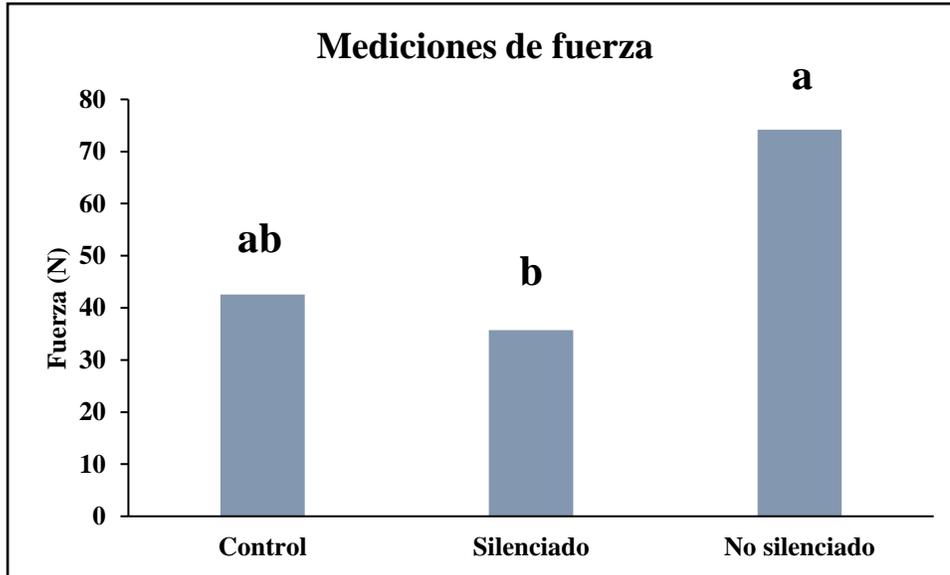


Figura 3. 28 Comparación de medias de Tukey de la variable Fuerza a los 22 días. Valores con la misma letra son estadísticamente similares ($\alpha= 0.05$).

En la comparación de medias de Tukey (**Figura 3.28**), existen diferencias significativas entre los 3 grupos, sin embargo, no entre el ajo control (**ab**) y el ajo elefante.

Entre el ajo no silenciado (**b**) y el silenciado, existen diferencias significativas, lo cual indica la maceración del ajo elefante y por lo tanto el fenotipo susceptible generado a partir del silenciamiento del gen *AaAlli*.

CONCLUSIONES

V-VIGS derivado del begomovirus PHYVV dirige el silenciamiento del gen *AaAlli* en *Allium ampeloprasum* L.

AaAlli le confiere resistencia a *Allium ampeloprasum* L ante *Sclerotium cepivorum* B, el silenciamiento de dicho gen genera un fenotipo susceptible a la pudrición blanca.

PERSPECTIVAS

- Clonar el gen *AaAlli* para su secuenciación.
- Analizar el mecanismo antifúngico de la alicina respecto a *Sclerotium cepivorum* B, mediante el cultivo de dicho hongo a dosis conocidas de alicina y observación al microscopio.
- Analizar la regulación del gen *Alli* en *Allium ampeloprasum* L respecto a *Allium sativum* L.
- Realizar la construcción V-VIGS::*AaAlli* utilizando un fragmento de una región 5' no traducida.

REFERENCIAS

- Abraham-Juárez, M.R., Rocha-Granados, M.C., López, M.G., Rivera-Bustamante, R.F., Ochoa-Alejo, N. (2007). Virus-induced silencing of *Comt*, *pAmt* and *Kas* genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chili pepper fruits. *Planta*, 681-695.
- Alonso, J. (2007). Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Editorial CORPUS. Argentina.
- American Phytopathological Society (APS). (1995). Compendium of onion and garlic diseases. Schwartz, H.F., y Mohan, S.K. (eds). *American Phytopathological Society (APS) Press*, Saint Paul, Minesota, USA: 54.
- Atwood, S.E., O'Rourke, J.A., Peiffer, G.A., Yin, T., Majumder, M., Zhang, C., et al. (2014). Replication protein A subunit 3 and the iron efficiency response in soybean. *Plant Cell Environ.* 37: 213–234.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*. 431: 356–63.
- Baulcombe, D.C. (2015). VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Current Opinion in Plant Biology*. 26: 141–146.
- Baum, K., Gröning, B., Meier I. (1997) Improved biobalistic transient transformation conditions for tomato fruit allow identification of organ-specific contributions of I-box and G-box to the RBCS2 promoter activity. *The Plant Journal*. 12:463-469.
- Bender-Bojalil, D., Bárcenas-Pozos, M.E. (2013). El ajo y sus aplicaciones en la conservación de los alimentos. *Revista Temas Selectos Ingeniera en Alimentos*. 7(1): 25-36.
- Bologna, N.G. y Voinnet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*. 65: 473–503.
- Boriss, H. (2006). Commodity Profile: Garlic. Agricultural Issues Center. Pittsboro, NC, USA. 10p.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. y Voinnet, O. (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*. 320: 1185–90.
- Carlsbecker, A., Lee, J.-Y., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueno, M.A., Vatén, A., Thitamadee, S., Campilho, A., Sebastian, J., Bowman, J.L.,

- Helariutta, Y., Benfey, P.N. (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dosedependent root cell fate. *Nature*. 465, 316–21.
- Coley-Smith, J., Mitchell, C., y Sansford, C. (1990). Long term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology*. 39: 58-69.
 - Crowe, F.J. (1995) White rot. In: Compendium of onion and garlic diseases. Eds. H. F. Schwartz y S. K. Mohan. Minnesota *American Phytopathological Society (APS)* Press. 14-16.
 - Crowe, F.J., Hall, D.H., Greathead, A.S. y Baghott, K.G. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology*. 70: 64-69.
 - Chapman, E.J., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V., y Carrington, J.C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Development*. 18: 1179–86.
 - Cheruth, A.J., Gopi, R., Sankar, B., Gomathinayagam, M., Panneerselvam, R. (2008). Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comptes rendus Biologies*. 331(1): 42-47.
 - Davis, R. (2002). Use of a natural product to stimulate sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum* for the control white rot of onions and garlic. Pest Management Grants Final Report. California Department of Pesticide Regulation, University of California.
 - Ding, S.W. (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*. 10: 632–644.
 - Ding, S.W. y Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*. 130: 413–426.
 - Encarnación-Guevara, S. (2006). Genómica y genómica funcional en microbiología. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48 (2): 131-145.
 - Fabara, J. (2012). Cultivo de ajo. Ambato, Ecuador. 18.
 - García J., y Sánchez-Muniz, F. (2000). Revisión: efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos latinoamericanos de nutrición (ALAN)*. 50(3): 219-29.
 - Granados, M.M. (2005). Pudrición Blanca de la cebolla: Una Enfermedad difícil de combatir; *Agronomía Costarricense*. 29(2): 143-156.
 - Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., y Robertson, D. (2000). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 35: 105–40.

- Heinlein, M. (2015) Plant virus replication and movement. *Virology*. 479-480: 657–71.
- Hull, R., Covey, S.N. y Maule, A.J. (1987). Structure and replication of caulimovirus genomes. *Journal of Cell Science*. Supplement. 7: 213–29.
- Ipek, M., Ipek, A., Almquist, S.G., Simon, P.W. (2005). Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic, based on AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 110: 228–36.
- Kang, G., Li, G., Ma, H., Wang, C., Guo, T. (2013). Proteomic analysis on the leaves of *TaBTF3* gene virus-induced silenced wheat plants may reveal its regulatory mechanism. *J. Proteomics*. 83: 130–143.
- Krest, J.G. y Keusgen, M. (2000). Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48: 3753-3760.
- Kuettner, E.B., Hilgenfeld, R., Weiss, M.S. (2002). Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 402: 192–200.
- Lancaster, J.E., Dommissse, E.M., Shaw, M.L. (1988). Production of flavour precursors (S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides) in photo callus of garlic. *Phytochemistry*. 1988; 27(7): 2123–4.
- Lawson, L.D. (1993). Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products; role in reducing blood lipids, In: Human medicinal agents from plants. *American Chemical Society*. 21: 306-330.
- Lawson, L.D. (1998) Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*. *Journal of the American Chemical Society*. 691:176-209.
- Lawson, L.D., y Wang, Z.J. (2005). Allicin and allicin-derived garlic compounds oncrease breath Acetone through Allyl Methyl Sulfide: Use in measuring Allicin bioavailability. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53: 1974-1983.
- Li, F. y Ding, S.W. (2006). Virus Counterdefense: Diverse Strategies for Evading the RNA-Silencing Immunity. *Annual Review of Microbiology*. 60: 503–531.
- Liang, J., Deng, G., Long, H., Pan, Z., Wang, C., Cai, P., *et al.* (2012). Virus-induced silencing of genes encoding LEA protein in Tibetan hullless barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) and their relationship to drought tolerance. *Molecular Breeding*. 30: 441–451.

- Licona-Juárez, K.C. (2016). Aislamiento de genes involucrados en la resistencia de *Allium ampeloprasum* L a la pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* B. Tecnológico Nacional de México en Celaya. Tesis de maestría.
- Lim, T. (2015). *Allium Ampeloprasum*, Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. *Springer*. 103-123.
- Luo, T., Fan, T., Liu, Y., Rothbart, M., Yu, J., Zhou, S., *et al.* (2012). Thioredoxin redox regulates ATPase activity of magnesium chelatase CHLI subunit and modulates redox-mediated signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea plants. *Plant Physiology*. 159: 118–130.
- Martínez, P.L. (2016). Actividad antiviral de pequeños RNAs endógenos y supresión de silenciamiento génico por la proteína 16K del virus del cascabeleo del tabaco (TRV). Universitat Politècnica de València. Tesis doctoral.
- Melnyk, C.W., Molnar, A., y Baulcombe, D.C. (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO Journal*. 30: 3553–3563.
- Meza-Reyes, E.G. (2017). Empleo de V-VIGS para el silenciamiento génico en *Allium ampeloprasum* L resistente a la pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* B. Tecnológico Nacional de México en Celaya. Tesis de maestría.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R., y Baulcombe, D.C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*. 328: 872–5.
- Navarro, C. Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). *Revista de fitoterapia*. 2007; 7(2): 132-35.
- New, C. M., Coley-Smith, J. R., Georgy, N. I. (1984). Scanning electron Microscopy of *Sclerotium cepivorum*. *Transactions British Mycological Society.*, 83, 690-693.
- Park, H.J., Kim, I.S. (2011). Antioxidant activities and anticancer effects of red yeast rice grown in the medium containing garlic. *The Food Science and Biotechnology*. 20(2): 297–302.
- Portillo-Nava, C. (2012). Construcción de un V-VIGS-PPR200 para el silenciamiento del gen *AsPPR* en ajo (*Allium sativum* L) blanco perla resistente a la pudrición blanca. Tecnológico Nacional de México en Celaya. Tesis de licenciatura.
- Prieto, N.L.P. (2016). Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Sclerotium cepivorum* asociados a cultivos de aliáceas. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de maestría.

- Raabinowitch, H.D., Currah, L. (2002). *Allium* Crop Science: Recent Advances. (ed) CABI Publishing. UK: 311-328.
- Rivera-Méndez, W., Obregón, M., Morán-Diez, M.E., Hermosa, R., Monte, E. (2020). *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biological Control* 141 (2020) 104145.
- Sarita, V. (2000). Cultivo de ajo. *Revista de Fundación y Desarrollo Agropecuario*. 3(1): 2-4
- Schwartz, H.F. y S. Mohan. 2008. Compendium of onion and garlic disease. *American Phytopathological Society (APS)*. St Paul, Minnesota. 127 p.
- Schwartz, H.F., Mohan, S. (2008). Compendium of onion and garlic disease. *American Phytopathological Society*. 24: 127-136.
- Shadkchan, Y., Shemesh, E., Mirelman, D., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., y Osherov, N. (2012). Efficacy of allicin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus* spp. *in vitro*, and in a murine model of disseminated aspergilosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 832-836.
- Stoll, A., y Seebeck, E. (1951). Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic. *Advances in Enzymology and related areas of molecular biology*. Willey interscience, Ed. F.F. Nord. 11: 377-400.
- Tiessen, F.A. (2012). Fundamentos de mejoramiento genético vegetal. Editorial Académica Española.
- Till, B.J., Cooper, J., Tai, T.H., Colowit, P., Greene E.A., Henikoff, S., Comail, L. (2007) Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biology*. 7 (19):1-12.
- Till, B.J., Reynolds, S.H., Weil, C., Springer, N., Burtner, C., Young, K., Browsers, E., Codomo, C.A., Enns, L.C., Odden, A.R., Greene, E.A., Comai, L., Henikoff, S. (2004). Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biology*. 4(12):1-8.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrella, L., y. Rivera-Bustamante, R.F. (1993). Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology*. 74: 2225-2231.
- Valle, G.P. (1989). Pudrición blanca del ajo, enfermedad que se extiende en Aguascalientes. Desplegable para productores 12. INIFAP. CIFAP-Aguascalientes. Aguascalientes, México.

- Van Damme, E.J., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (1992). Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. *European Journal of Biochemistry*. 209: 751–7.
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Sciences*. 13: 350–358.
- Velásquez, R., y Medina, M. (2004). Persistencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. en suelos infestado de Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22: 143-146.
- Virk, N., Liu, B., Zhang, H., Li, X., Zhang, Y., Li, D., et al. (2013). Tomato SIMPK4 is required for resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35: 1211–1221.
- Wassenegger, M., y Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Sciences*. 11: 142–51.
- Weiner, L., Shin, I., Shimon, L.J.W, Miron, T., Wilchek, M., Mirelman, D. (2009). Thiol-disulfide organization in alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*). *Protein Science* 18(1): 196–205.
- Young-Sun, K., Kyung, S.K., Ihn, H., Mi-Hyun, K., Min, H.J., Hun-Kuk, P. (2012) Quantitative and Qualitative Analysis of the Antifungal Activity of Allicin Alone and in Combination with Antifungal Drugs. *PLoS ONE*. 7(6): e38242.

REFERENCIAS DE INTERNET

- Food and agricultural organization of the united nations, Statistics division (FAOSTAT). (2016). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.

- Govaerts, R. (2017). WCSP: World Checklist of Selected Plant Families (version Aug 2017). Disponible en: <http://apps.kew.org/wcsp/compilersReviewers.do>.
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). (2018)a. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do.
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). (2018)b. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do.