

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

**Evaluación fenotípica y expresión génica diferencial de
Lasiodiplodia theobromae (teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*) en
presencia de madera de vid**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Liliana Lizbeth López Zambrano

Ensenada, Baja California, México
2012

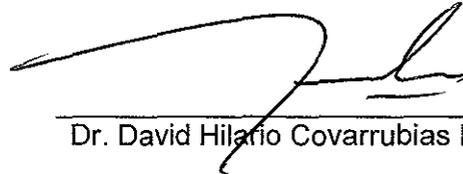
TESIS DEFENDIDA POR
Liliana Lizbeth López Zambrano
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



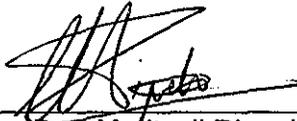
Dra. Rufina Hernández Martínez
Director del Comité



Dr. José Luis Stephano Hornedo
Miembro del Comité



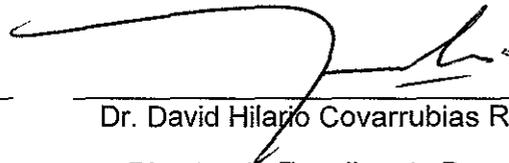
Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Miembro del Comité



Dra. Mefitxell Riquelme Pérez
Miembro del Comité



Dra. Rufina Hernández Martínez
*Coordinador del programa de posgrado
en ciencias de la vida*



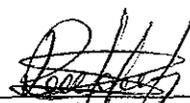
Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

29 de Marzo de 2012

RESUMEN de la tesis de **Liliana Lizbeth López Zambrano**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en MICROBIOLOGÍA. Ensenada, Baja California, México. Marzo del 2012

Evaluación fenotípica y expresión génica diferencial de *Lasiodiplodia theobromae* (teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*) en presencia de madera de vid

Resumen aprobado por:



Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de tesis

El hongo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae* es uno de los agentes causales del cancro de Botriosferia en vid; es considerado como una especie altamente virulenta y se ha encontrado en plantas con síntomas de declinamiento progresivo en los viñedos de Baja California, ocasionando importantes pérdidas económicas. Los hongos fitopatógenos emplean diversos mecanismos de patogenicidad y virulencia para infectar a su hospedero, entre ellos se encuentran la producción de enzimas hidrolíticas y toxinas. En *L. theobromae* se ha estudiado la actividad enzimática que presenta en sustratos específicos como celulosa, xilano, pectina, etc.; además, se ha encontrado que produce toxinas, como lasiodiplodina, entre otras. Sin embargo, poco se conoce sobre el comportamiento de este hongo a nivel fenotípico y genotípico durante su interacción con vid, por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y la expresión génica de este hongo en presencia de madera, e identificar genes putativos relacionados con la patogenicidad y virulencia. Los ensayos biométricos *in vitro* realizados en medio mínimo de Vogel y sales de Vogel, con y sin madera de vid, revelaron un mayor índice de ramificación, biomasa y crecimiento en presencia de madera, indicando que ésta induce un cambio en la expresión génica. Adicionalmente, en el estudio de la expresión génica en presencia de madera, utilizando la técnica de hibridación sustractiva por supresión, se logró identificar una secuencia parcial de 125 bases, que presenta un 65% de similitud con una enzima extracelular llamada arabinanasa presente en el genoma de *Aspergillus fumigatus*. Las arabinanasas son enzimas extracelulares hidrolíticas que forman parte del grupo de las hemicelulasas, las cuales, junto con celulasas, ligninasas y pectinasas degradan la pared celular vegetal. Este trabajo es el primero en indicar que *L. theobromae* produce arabinanasa, la cual, en conjunto con las otras enzimas hidrolíticas podría participar en la degradación de la pared celular de vid.

Palabras Clave: *Lasiodiplodia theobromae*, expresión fenotípica, hibridación sustractiva de supresión, arabinanasa, patogenicidad, virulencia.

ABSTRACT of the thesis presented by **Liliana Lizbeth López Zambrano** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in LIFE SCIENCES with orientation in MICROBIOLOGY. Ensenada, Baja California, México. March 2012

Phenotypic evaluation and differential gene expression of *Lasiodiplodia theobromae* (teleomorph *Botryosphaeria rhodina*) in presence of grapevine wood

The filamentous fungus *Lasiodiplodia theobromae* is one of the causal agents of bot canker in grapevine; it is considered a highly virulent species and it has been found in plants with symptoms of progressive decline in vineyards of Baja California, causing important economic losses. Plant pathogenic fungi employ various mechanisms of pathogenicity and virulence to infect its host; including the production of hydrolytic enzymes and toxins. Previous studies have shown that *L. theobromae* produces enzymes able to hydrolyze specific substrates (cellulose, xylan, pectin, etc.), and also it is able to produce toxins, such as lasiodiplodin. However, little is known on the behavior of this fungus at phenotypic and genotypic level during its interaction with grapevine; thus the objective of this work was to evaluate the growth and gene expression of this fungus in the presence of wood, and to identify putative genes related with pathogenicity and virulence. *In vitro* assays performed in Vogel's minimal medium and Vogel's salts, with and without grapevine wood, revealed higher rate of branching, biomass, and growth in the presence of wood, indicating that wood induces a change in gene expression. Additionally, the study of differential gene expression with or without wood, using the technique of suppression subtractive hybridization, identified a partial sequence of 125 bp, showing 65% similarity to an arabinanase present in the genome of *Aspergillus fumigatus*. Arabinanases are hydrolytic enzymes, part of the hemicellulases, which, together with cellulases, pectinases and ligninases degrade the plant cell wall. This work is the first to indicate that *L. theobromae* produces an arabinanase which, together with other hydrolytic enzymes may be involved in cell wall degradation of grapevine.

Keywords: *Lasiodiplodia theobromae*, phenotypic expression, suppression subtractive hybridization, arabinanase, pathogenicity, virulence.

Dedicatoria

*A mis padres, José de Jesús López y Graciela Zambrano Urías.
Mi ejemplo y fortaleza.*

A mis hermanos: Lizbeth López y Jesús López.

A ti, por luchar contra toda adversidad.

“No permitas que lo que no puedes hacer interfiera con lo que sí puedes lograr” (John Wooden).

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada,

A la Universidad Autónoma de Baja California y

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Departamento de Microbiología,

A todas las personas que participaron he hicieron posible este trabajo

Muchas gracias por su apoyo y enseñanza:

Dra. Rufina Hernández Martínez, directora y asesora,

Dra. Riquelme, Dr. Covarrubias y Dr. Stephano, sinodales,

Integrantes del laboratorio de fitopatología, los que estuvieron y los que están,

Amigos de generación y del laboratorio de microbiología,

Sin ustedes no hubiera sido posible...

Gracias a todos...

Agradecimientos (continuación)

Mamá y papá, gracias por forjarme hacer la persona que ahora soy, por hacerme sentir que no estoy sola, por confiar en mí, por sus palabras de aliento y por su amor.

Jesús, gracias por ser el hermano mayor, por apoyarme en todo y hacerme sentir que siempre estas a mi lado a pesar de la distancia.

Lizeth, gracias por ser más que una hermana, por escucharme cuando mas lo necesitaba y por todas tus palabras de aliento.

Abraham, gracias por acompañarme en esta odisea, por formar parte de mi crecimiento profesional y personal, por estar siempre ahí, por compartir y por los buenos momentos.

A Laura, por sus palabras, amiga gracias por decir las palabras exactas cuando lo necesitaba. A Ana Lucia, por escucharme y por apoyarme incondicionalmente; A Francisco, por su apoyo y por compartir su conocimiento conmigo; A Félix, Sergio A., Carlos y Lucia, por brindarme su apoyo, por dar todo sin esperar nada a cambio. A Nancy, Cinthia, Lolis y Rocío, gracias por compartir sus experiencias y escucharme una y otra vez; Sergio D., Brito, Melisa, Aurora, Alejandro, Ofelia, Alex, Abigail y los que faltan gracias por los buenos momentos. A todos ustedes muchas gracias por su apoyo, entusiasmo y a mitad, gracias por hacerme sentir en casa.

Dra. Rufina, gracias por enseñarme a ser paciente y ha no desistir cuando las cosas van mal, por aceptarme e integrarme a su equipo de trabajo, por sus enseñanzas y por confiar en mí.

A la Dra. Meritxell y al Dr. David, por su disponibilidad sugerencias y comentarios, por hacer posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Stephano, por ser clave fundamental en este trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y por hacerme sentir que formaba parte de su equipo, muchas gracias por brindarme su apoyo.

Al departamento de microbiología, a las Doctoras Rosa y Ernestina por sus clases y consejos. A Adriana por su apoyo en todos los trámites habidos y por haber. A Olga, por compartir sus conocimientos y apoyarme siempre en lo que necesite. Al Tec. Guillermo González, por su gran apoyo dentro y fuera del laboratorio.

CONTENIDO

	Página
Resumen	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xiii
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes	4
II.1 Generalidades de la vid	4
II.2 Estructura de la madera de vid	5
II.3 Principales factores de patogenicidad y virulencia	8
II.3.1 Enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas.....	8
A) Celulasas.....	8
B) Hemicelulasas.....	9
C) Ligninasas	9
D) Pectinasas	10
II.3.2 Toxinas (fitotoxinas)	10
II.3 Enfermedades de la vid	11
II.3.1 Enfermedades de la madera	11
A) Eutipiosis	12
B) Yesca y enfermedad de Petri	13
C) Pie negro.....	13
D) Cancro de Botriosferia en vid.....	14
II.4 Especies de <i>Botryosphaeria</i>	15
II.4.1 Estudios de patogenicidad y virulencia en especies de <i>Botryosphaeria</i>	16
II.4.2 Factores de patogenicidad y virulencia (Enzimas y Toxinas) en especies de <i>Botryosphaeria</i>	18

CONTENIDO (Continuación)

II.5 Especies de <i>Botryosphaeria</i> en México	20
II.6 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	20
II.7 Estudios en <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	21
II.8 Justificación	23
II.9 Hipótesis	23
II.10 Objetivos.....	24
II.10.1 Objetivo general	24
II.10.2 Objetivos específicos	24
III. Materiales y métodos.....	25
III.1 Descripción del material biológico	25
III.2 Crecimiento y mantenimiento de la cepa de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	25
III.2.1 Reactivación.....	25
III.2.2 Cultivo inicial para ensayos <i>in vitro</i>	26
III.3 Evaluación del crecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en ausencia y presencia de madera de vid.....	26
III.3.1 Índice de ramificaciones.....	27
III.3.2 Determinación de biomasa por peso seco	27
III.3.3 Tasa de crecimiento.....	28
III.3.4 Comparación del crecimiento usando microscopía óptica	29
III.3.5 Análisis estadístico.....	29
III.4 Técnicas moleculares.....	30
III.4.1 Extracción de ARN total y purificación de ARNm	30
A) Extracción de ARN	31
B) Evaluación de la Integridad y cuantificación del RNA total	31
C) Purificación de ARN mensajero (ARNm)	32
III.4.2 Construcción de una biblioteca de ADN complementario (ADNc) utilizando la técnica de hibridación sustractiva por supresión.....	32
A) Síntesis de ADN complementario (ADNc)	33
B) Digestión utilizando la enzima de restricción <i>RsaI</i>	33
C) Ligación de adaptadores	33
D) Primera hibridación	34
E) Segunda hibridación	34

CONTENIDO (Continuación)

F) Amplificación por PCR de las secuencias expresadas en la presencia de madera	34
III.4.3 Clonación del ADNc amplificado	37
III.4.4 Análisis de la biblioteca de ADNc sustractivo.....	38
A) PCR de colonia.....	38
B) Crecimiento de las colonias y extracción de plásmido	39
C) Análisis de restricción.....	41
3.5 Secuenciación y análisis bioinformático.....	41
IV Resultados	42
IV.1. <i>Mediciones Biométricas</i>	42
IV.1.1 Índices de ramificación.....	42
IV.1.2 Biomasa	42
IV.1.3 Tasas de crecimiento.....	45
IV.2 Microscopía óptica.....	47
IV.3 Construcción de una biblioteca de ADNc sustractivo	49
IV.3.1 Extracción de ARN total.....	49
IV.3.2 Purificación de ARN mensajero.....	50
IV.3.3 Hibridación sustractiva por supresión (SSH, por sus siglas en inglés).	50
a) Amplificación del ADNc sustractivo.....	50
IV.3.4 Clonación del ADNc sustractivo	51
a) Ligación y transformación	51
IV.3.3 Comprobación de la clonación.....	52
a) PCR colonia	52
b) Extracción de plásmido de las clonas seleccionadas.....	53
c) Análisis de restricción	54
IV.4 Secuenciación de clonas y análisis de las secuencias.....	54
V. Discusión.....	56
VI. Conclusiones	61
VII. Literatura citada.....	62
Anexos.....	75
1. Extracción de ARN total (Trizol).....	75
2. Purificación de ARNm (Oligotex mRNA mini Kit).....	77

CONTENIDO (Continuación)

3. Biblioteca de ADNc de genes expresados diferencialmente. (PCR-select cDNA Subtraction Kit).....	78
4. Transformación de células competentes	85
5. Extracción de ADN plasmídico (QIAprep Spin Miniprep Kit).....	86
5. Medios de cultivos y soluciones.....	87

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Capas que conforman la pared celular de las plantas: Lamela media (LM), pared primaria (PP), y las 3 paredes secundarias: La externa (S1), la media (S2) y la interna (S3). Modificado de Schwarze, 2007. 6
- Figura 2. Distribución relativa de cada uno de los componentes de la pared celular a través de sus diferentes capas. Lamela media (LM), pared primaria (PP). Modificado de Schwarze, 2007. 7
- Figura 3. Corte transversal de un troco de madera de vid que muestra un cancro en forma de cuña, síntoma característico de la enfermedad de cancro de Botriosferia. 15
- Figura 4. Forma en que se inoculó y registró del crecimiento periódico del hongo *L. theobromae*. Las líneas azules indican el margen del crecimiento periódico y las líneas rojas los trazos marcados para promediar los datos. 28
- Figura 5. Representación esquemática de la técnica del bloque invertido (Beltrán-Aguilar, 2006; Hickey et al., 2004). 29
- Figura 6. Comparaciones realizadas durante el análisis estadístico del índice de ramificaciones, biomasa y tasas de crecimiento..... 30
- Figura 7: Esquema de las hibridaciones realizadas con el PCR-select cDNA Subtraction Kit. (Modificado de Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996). 36
- Figura 8: Estrategia de clonación T/A..... 37
- Figura 9. Mapa de vector pCR 2.1 linearizado. Los cuadros rojos señalan las regiones donde se unen los oligonucleótidos M13F y M13R utilizados para realizar los PCR de colonias. Los recuadros azules indican en donde se realiza el corte por la enzima de restricción *EcoRI* en el análisis de restricción..... 40
- FIGURA 10. Ramificaciones/mm de *L. theobromae* cepa UCD256Ma. A) medio mínimo de Vogel (MMV) en presencia (CM) y ausencia (SM) de madera de vid, B) sales de Vogel (SV) en CM y SM, C) Comparación de las ramificaciones/mm en CM en los dos medios, D) ramificaciones/mm en SM en los dos medios. Los distintos superíndices (a>b) indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).. 43

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- FIGURA 11. Biomasa (gramos) producida por *L. theobromae* cepa UCD256Ma a las 48 horas de incubación. A) medio mínimo de Vogel (MMV) en presencia (CM) y ausencia (SM) de madera de vid, B) sales de Vogel (SV) en CM y SM, C) Biomasa en CM en los diferentes medios, D) producción de biomasa en SM. Los distintos superíndices (a>b) indican diferencia significativa entre los tratamientos (p<0.05).. 44
- FIGURA 12. Crecimiento de *L. theobromae* cepa UCD256Ma. A) medio mínimo de Vogel (MMV) en presencia (MMV-CM) y ausencia (MMV-SM) de madera de vid; B) sales de Vogel (SV) en presencia (SV-CM) y ausencia (SV-SM) de madera de vid; C) comparación de crecimiento en presencia de madera de vid en MMV y SV; D) comparación de crecimiento en ausencia de madera de vid en MMV y SV. El análisis de ANOVA reveló diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05)..... 45
- Figura 13. Morfología colonial de *L. theobromae* cepa UCD256Ma, crecida en medio mínimo de Vogel con madera, A) con madera, B) sin madera y sales de Vogel 1X, C) con madera, D) sin madera después de tres días de incubación a 30°C. 46
- Figura 14. Micrografías del hongo *L. theobromae* cepa UCD256Ma crecido en medio mínimo de Vogel. Crecimiento con madera a una, A) magnitud 20X y B) magnitud 40X. Crecimiento sin madera C) magnitud 20X, D) magnitud 40X. En las cuatro micrografías se puede observar las diferencias en el número de ramificaciones en MMV con o sin madera. 47
- Figura 15. Micrografías de *L. theobromae* cepa UCD256Ma creciendo en sales de Vogel. Crecimiento con madera a una, A) magnitud 20X; B) magnitud 40X. Crecimiento sin madera, C) magnitud 20X, D) magnitud 40X. Flechas negras indican trozos de madera difundidos en el medio. En las cuatro micrografías se puede observar las diferencias en el número de ramificaciones presentes en SV con o sin madera. 48
- Figura 16. Micrografías del crecimiento de *L. theobromae* cepa UCD256Ma en sales de Vogel en presencia de madera de vid A) y B) magnitud 100X. Las puntas de flecha negra indican los puntos de ramificación..... 48
- Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñida con BrEt (1mg/ml), carril 1 (M), marcador de peso molecular (100pb), carril 2 ARN extraído de la condición con madera (CM) y carril 3 ARN extraído de la condición sin madera (SM). Triángulo ARN ribosomal 28S, y estrella ARN ribosomal 18S..... 49

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con BrEt (0.1 μ g/ml), carril 1 (M) marcador de peso molecular (1kb), carril 2 ADNc diferencial amplificado. La línea punteada indica la presencia de fragmentos amplificados por PCR..... 51
- Figura 19. Ejemplos de fragmentos amplificados por PCR de colonias transformadas. Los números en los carriles corresponden al número de clonas analizadas y M el marcador de peso molecular (1kb). Los asteriscos indican las clonas seleccionadas cuyo fragmento amplificado por PCR se encontraban por arriba de 200 pb..... 52
- Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico extraído de clonas. Seleccionadas por PCR de colonia. Los números arriba de los carriles indican el número de la clona seleccionada y M el marcador molecular (1kb). 53
- Figura 21. Análisis de restricción en gel de agarosa al 1.5% con BrEt (0.1mg/ml). Los carriles 7, 8 y 9, representan a las colonias analizadas marcadas con ese número, y M el marcador de peso molecular (1kb). 54
- Figura 22. Resultado de la búsqueda de secuencias en la base de datos de genomas de hongos del NBCI..... 55

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla I. Enfermedades de la madera en vid más comunes y sus agentes causales.....	12
Tabla II. Especies de la familia Botryosphaeriaceae aisladas de vid alrededor del mundo.	16
Tabla III. Enzimas degradadoras de pared celular vegetal asociadas a las especies de <i>Botryosphaeria</i>	19
Tabla IV. Tratamientos utilizados para la evaluación <i>in vitro</i> del crecimiento de <i>L. theobromae</i>	27
Tabla V: ciclos empleados para la amplificación de los ADNc expresados diferencialmente.	35
Tabla VI. Concentraciones obtenidas de ARN total y ARNm procedente de la condición con madera y sin madera.	50
Tabla VII. Concentración de DNA plasmídico extraído de las clonas positivas.	53
Tabla VIII. Secuencia identificada en la biblioteca de ADNc expresado diferencialmente..	55

Introducción

La vid (*Vitis vinifera* L) es un arbusto caducifolio perteneciente a la familia de las Vitáceas. Es el cultivo frutal más importante a nivel mundial. Con más de ocho millones de hectáreas, su producción es destinada principalmente al consumo fresco (uva de mesa), seco (pasa) y a la producción de vino.

En América, los principales productores de vid son Chile y Estados Unidos; en este último, el Estado de California encabeza la producción, generando alrededor de \$2.3 billones de dólares anuales (USDA, 2005). En México, cerca de 26,000 hectáreas son utilizadas en el cultivo de vid (Úrbez-Torres et al., 2006), con un total de 651 mil toneladas de uva producidas (SIAP, 2006). Los Estados con mayor extensión cultivada son Sonora y Baja California. Estas regiones son las principales productoras de uva de mesa y de vino en el país, respectivamente, y generan un valor anual del cultivo cotizado en alrededor de \$152 millones de dólares (SIAP, 2006).

Baja California es el líder en producción de vino del país, con una superficie de 4,569 hectáreas, en las cuales el volumen de producción es de 30,759.85 toneladas, representando el 18% y 13.2% de la superficie y producción nacional, respectivamente. En esta zona existen un total de 148 productores activos que producen el 95% de los vinos de mesa de México (Sepúlveda-Betancourt, 2009; Sistema Producto Vid, 2009). Esto coloca a la vid como uno de los cultivos con mayor importancia económica, industrial y alimenticia del Estado.

El cultivo de vid puede verse afectado por enfermedades provocadas por diversos microorganismos, comprometiendo la calidad y cantidad de la cosecha. Entre las enfermedades más devastadoras están las causadas por hongos que colonizan el sistema vascular e interrumpen el transporte de agua y nutrientes en la planta. Estas enfermedades son conocidas genéricamente como enfermedades de la madera, entre las cuales, se encuentra el cancro de Botriosferia (antes conocida como enfermedad de brazo muerto). Esta enfermedad es ocasionada por varias especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae, los cuales son organismos cosmopolitas, cuya presencia ha sido reportada en diversos lugares alrededor del mundo (Úrbez-Torres, 2011). En México, hasta ahora se ha reportado la presencia de las especies: *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* (Úrbez-Torres, 2008), *Neofusicoccum vitifusiforme*, *N. australe* y *D. corticola* (Candolfi-Arballo, 2009).

Una de las especies más virulentas de esta familia es *L. theobromae*, un ascomiceto pleomórfico y plurívoro con un amplio rango de hospederos, que tiene la capacidad de colonizar rápidamente al hospedero. Este hongo puede ocasionar decaimiento y muerte de la planta, debido a la interrupción de la conductividad del xilema y/o a la producción de toxinas (Pascoe, 1998).

Para que un hongo se considere patógeno debe tener la capacidad de penetrar, invadir, colonizar y dañar el tejido de la planta (Benito et al., 1998). Los factores involucrados en dichos procesos se denominan factores de patogenicidad, y aquellos factores que determinan el grado de patogenicidad se conocen como factores de virulencia, no obstante la confusión entre ambos es muy común, ya que los factores de virulencia y patogenicidad dependerán de las características de la planta y del hongo. Los factores de patogenicidad y virulencia son: enzimas, toxinas y genes (Idnurm y Hamlet, 2001).

Existe escasa información sobre los factores relacionados con la de patogenicidad y virulencia del hongo *L. theobromae*, y los estudios relacionados se han dirigido al conocimiento de enzimas y toxinas, por lo cual el propósito de este trabajo fue abordar el estudio de estos factores con una perspectiva molecular. Así, en el presente trabajo, primero se evaluaron las diferencias *in vitro* del crecimiento de *L. theobromae* en ausencia y presencia de madera de vid, y posteriormente, se construyó una biblioteca de ADNc expresado diferencialmente en presencia de madera, con el fin de contribuir en el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad empleados por este hongo para afectar la madera de vid.

II

Antecedentes

II.1 Generalidades de la vid

La vid (*Vitis vinífera* L.), también denominada planta de la uva o parra; es un arbusto caducifolio, de tronco leñoso, retorcido y de corteza rugosa. Se propaga vegetativamente ya sea por esquejes y acodos, o por injerto de púa o de yema.

La vid es cultivada en todos los continentes y es de gran importancia económica, industrial y alimenticia. Los cultivos se concentran principalmente en regiones templadas. Italia y Francia son los principales países productores de vino, mientras que España cuenta con las extensiones más grandes del cultivo, abarcando el 15% del total de la tierra cultivada con vid en el mundo (OIV, 2004).

Los países con mayor producción en el continente americano son Chile y Estados Unidos. En Estados Unidos, el Estado de California es el principal productor de vid, en donde el cultivo y la producción representan la tercera actividad agrícola más importante, con 345,200 hectáreas y una producción anual valuada en alrededor de \$2.3 billones de dólares (USDA, 2005).

México produce más de 651 mil toneladas de vid. Los Estados con mayor extensión cultivada son Sonora y Baja California. En Sonora, el cultivo de vid se destina principalmente a la producción de uva de mesa y pasa, mientras que en el Estado de Baja a la producción de vino (SAGARPA, 2005).

El Estado de Baja California emplea 4,569 hectáreas en el cultivo de vid, la uva se destina principalmente a la producción de vino. Alrededor de 148 productores de esta región fabrican el 95% de los vinos de mesa de México (Sepúlveda-Betancourt, 2009; Sistema Producto Vid, 2009).

II.2 Estructura de la madera de vid

La vid presenta un tallo leñoso, constituido básicamente por un tronco grueso de color castaño claro (Izco et al., 2004); éste contiene el tejido vascular de la planta, responsable del transporte del agua, minerales y sustancias nutritivas. El sistema vascular se encuentra desde las raíces hasta las nervaduras foliares y se divide en dos sistemas de transporte: el xilema que moviliza agua y minerales en dirección acrópeta y el floema que transporta azúcares, solutos y metabolitos de la fotosíntesis en dirección basípeta (Gola et al., 1965). Histológicamente, el tejido vascular está conformado por células alargadas en forma de tubo y sin contenido plasmático. Las paredes son engrosadas y con relieves que proporcionan solidez y resistencia a la presión hídrica y osmótica de los líquidos y sustancias que contienen, y además impiden que éstos se obstruyan por los movimientos de flexión (Flores-Vindas, 1999).

El componente característico externo de las células vegetales es la pared celular. Dicha estructura está conformada por varias capas (Figura 1): La lamela media, que es la capa que une las paredes de células adyacentes, una pared delgada primaria, seguida de una pared secundaria interna que está compuesta de 3 subcapas. Esta pared secundaria es añadida después de la formación de la pared primaria (Schwarze, 2007).

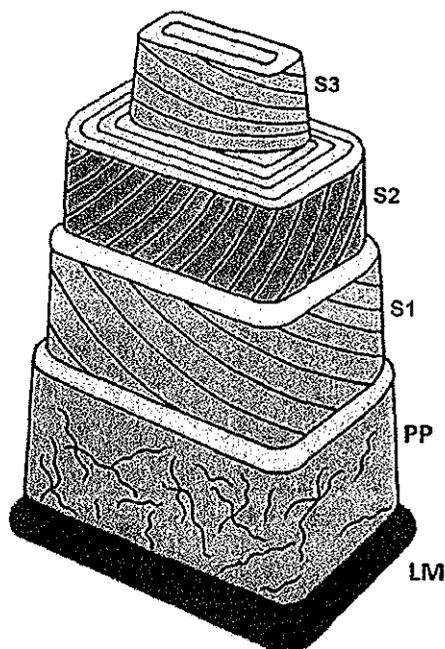


Figura 1. Capas que conforman la pared celular de las plantas: Lamela media (LM), pared primaria (PP), y las 3 paredes secundarias: La externa (S1), la media (S2) y la interna (S3). Modificado de Schwarze, 2007.

La proporción de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina es diferente en cada una de estas capas (Figura 2). La lamela media está compuesta por una matriz de lignina y pectina. Además, la pectina, formada por ácido poligalacturónico, interactúa con iones de calcio y sirve para mantener la adherencia con las paredes celulares adyacentes (Fengel y Wegener 1989). La proporción de hemicelulosa y pectina disminuye conforme se interioriza de la pared primaria a cada una de las paredes secundarias, pero se incrementa la proporción de celulosa (Schwarze, 2007).

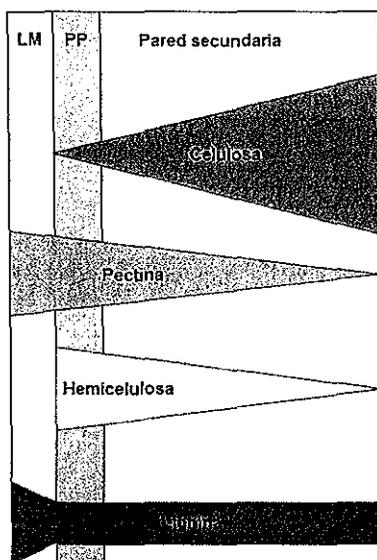


Figura 2. Distribución relativa de cada uno de los componentes de la pared celular a través de sus diferentes capas. Lamela media (LM), pared primaria (PP). Modificado de Schwarze, 2007.

La celulosa, el mayor componente de la pared celular, es un polímero de glucosas con uniones hidroxilo en un enlace alfa y sin ramificaciones. La ultraestructura de este polímero muestra la formación de fibrillas de 3-4 nm de diámetro que le da resistencia mecánica a la pared celular, así mismo la deposición en diferente arreglo angular de las microfibrillas le confiere propiedades resilientes a la madera. Las microfibrillas de celulosa están rodeadas de lignina y hemicelulosa en diferentes proporciones, según la capa de la pared celular (Green et al. 1996; Schwarze 2007).

La madera es de difícil degradación para los hongos, debido a que es una fuente de nitrógeno pobre. El nitrógeno es una fuerte limitante para el crecimiento micelial, debido a que se requiere para la síntesis protéica y, consecuentemente, para la producción enzimática (Hutchison y Barron, 1997; Barron, 1992, 2003; Schwarze 2007). Además, la madera puede contener sustancias antifúngicas, como polifenoles y taninos, que pueden afectar la invasión por hongos. Sin embargo, los hongos que puedan colonizar la madera, tienen la habilidad para degradar estos compuestos tóxicos, aunque cada especie difiere en sus

habilidades (Boddy y Rayner 1983; Schwarze 2007). Por otra para los hongos también secretan enzimas que le permiten degradar la pared celular vegetal e invadir el tejido de la planta, dichas enzimas extracelulares son consideradas como factores de patogenicidad y/o virulencia (Agrios 2005).

II.3 Principales factores de patogenicidad y virulencia

Un factor de patogenicidad es esencial para que el patógeno infecte y cause la enfermedad en el hospedero. Por otra parte los factores que contribuyen en el desarrollo de la enfermedad pero que no son esenciales son denominados factores de virulencia (Agrios, 2005). Los patógenos que infectan a las plantas poseen una gama de genes que son esenciales para que se genere la enfermedad (genes de patogenicidad) o para incrementar la virulencia en uno o varios hospederos (genes de virulencia) (Agrios, 2005).

II.3.1 Enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas

A) Celulasas

Son un grupo de enzimas que participan en la degradación de la celulosa, entre ellas se encuentran las endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas o celobiohidrolasas y β -glucosidasas.

Algunos ejemplos de hongos en los cuales se han caracterizado genes que codifican para celulasas son: *Trichoderma reesei* (Teeri et al., 1983), *Penicillium janthinellum* (Koch et al., 1993), *Phanerochaete chysosporium* (Covert et al., 1992), *Humicola grisea* (Takashima et al., 1996), *Trichoderma viride* (Cheng et al., 1990), *Agaricus bisporus* (Raguz et al., 1992) y *Neurospora crassa* (Teleb y Radford, 1995).

B) Hemicelulasas

La hemicelulosa consiste en polisacáridos relativamente complejos. Su estructura y organización variable requiere la acción de diversas enzimas para su degradación completa, tales como xilanasas, galactanasas, manasas y arabinanasas.

Al igual que las celulasas, las hemicelulasas han sido identificadas en diversos hongos incluyendo hongos fitopatógenos, en los cuales se ha podido identificar los genes que codifican para xilanasas y arabinanasas. Algunos genes que codifican para xilanasas han sido encontrados en *Penicillium* spp. (Kimura et al., 2000), *Agaricus bisporus* (De Groot et al., 1998), y *Magnaporthe grisea* (Wu et al., 1995). Por otra parte, genes que codifican para la arabinanasa se han identificado en *Penicillium chrysogenum* (Sakamoto et al. 2005), *Aspergillus niger* (Flipphi et al., 1993), *Aspergillus fumigatus* (Nierman et al., 2005), y *Fusarium graminearum* (Carapito et al, 2009).

C) Ligninasas

La lignina contiene enlaces hidrolizables, por lo cual, el sistema de enzimas con actividad ligninolítica está conformado por enzimas oxidativas, y dada la irregularidad de la estructura de la lignina, los ataques enzimáticos no son específicos. Las principales enzimas involucradas en la degradación de la lignina son la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y las lacasas (Hattaka, 1994).

Algunos ejemplos de hongos de los que se han identificado los genes que codifican para ligninasas son: *Trametes versicolor* (Black y Reddy, 1991), *Phlebia radiata* (Saloheimo et al., 1989), *Bjerkandera adusta* (Kimura et al., 1991), y *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Duenas et al., 1999).

D) Pectinasas

La degradación de la pectina involucra un complejo de enzimas con actividad hidrolítica, de las cuales las más importantes son la pectinmetilesterasa, la endopoligalacturonasa y la exopoligalacturonasa. Ambas poligalacturonasas, son consideradas de gran importancia en el ataque de patógenos a las plantas (Agrios, 2005).

Algunos ejemplos de hongos de los que se han aislado los genes que codifican para poligalacturonasas son: *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet et al., 1995; Reymond et al., 1994), *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig et al., 1990), *Fusarium moniliforme* (Caprari et al., 1993), *Colletotrichum lindemuthianum* (Centis et al., 1996), *Cryphonectria parasitica* (Gao et al., 1996), *Aspergillus flavus* (Whitehead et al., 1995), *A. oryzae* (Kitamoto et al., 1993), *A. parasiticus* (Cary et al., 1995) y *A. tubigenis* (Bussink et al., 1991).

II.3.2 Toxinas (fitotoxinas)

Las fitotoxinas son sustancias nocivas que se caracterizan por ser muy efectivas a baja concentración y con la capacidad de dañar las membranas celulares (Schäfer, 1994). Las fitotoxinas tienen la capacidad de afectar el transporte de agua y nutrientes y/o inactivar o interrumpir las reacciones enzimáticas del hospedero (Tabacchi et al. 2000) y son consideradas como importantes factores de patogenicidad y/o virulencia (Howlett, 2006).

Algunos hongos producen toxinas que interrumpen las funciones celulares o matan las células de la plantas antes o durante la infección (Agrios, 2005). Se han aislado genes de hongos fitopatógenos que codifican para algunas toxinas, entre estos se encuentra *Cochliobolus heterostrophus* (Lu et al., 1994; Yang et al., 1996), *C. carbonum* (Panaccione et al., 1992), *Alternaria alternata* (Tanaka et al.,

1999), *Mycosphaerella zeae-maydis* (Yun et al., 1998), *Gibberella zeae* (Proctor et al., 1995) y *Pyrenophora tritici-repentis* (Ballance et al., 1996).

II.3 Enfermedades de la vid

El cultivo de vid puede ser afectado por enfermedades provocadas por bacterias, fitoplasmas, nematodos, virus y hongos; estos últimos son los que provocan las enfermedades más devastadoras. Los síntomas de las enfermedades pueden manifestarse en hojas, tronco y raíz. Por ejemplo, en las hojas se pueden observar manchas, necrosis, clorosis, defoliación y marchitamiento, mientras que en troncos y raíces se observan pudriciones, disminución del crecimiento y caída prematura de frutos y los racimos pueden desecarse o momificarse (Agrios, 2005).

II.3.1 Enfermedades de la madera

Las enfermedades de la madera constituyen un gran problema fitosanitario, ya que generan importantes pérdidas económicas alrededor del mundo (Gubler et al., 2005); estas enfermedades son ocasionadas por hongos fitopatógenos que infectan a través de las heridas producidas especialmente durante la poda (Úrbez-Torres, 2006) y que colonizan el sistema vascular de la planta, interrumpiendo el flujo de nutrientes. Los síntomas de estos padecimientos incluyen un decaimiento gradual y la muerte progresiva de la planta, debido a la interrupción del transporte de nutrientes a través del xilema o la producción de toxinas por parte del hongo (Pascoe, 1998).

Las principales enfermedades de la madera de vid son causadas por varias especies de hongos: *Eutypa lata*, que ocasiona eutipiosis o muerte progresiva (*Eutypa dieback*) y que es una de las enfermedades más destructivas del tejido leñoso en cultivos de vid (Pearson, 1998); *Phaeomoniella chlamydospora*,

Phaeoacremonium spp. y *Fomitiporia punctata*, que forman parte de un complejo de hongos que se asocian a la enfermedad de Petri y yesca (Manning et al., 2007); *Phomopsis* spp., que produce excoriosis; y varias especies de *Botryosphaeria*, que ocasionan el cancro de Botriosferia (Úrbez-Torres, 2011). En la Tabla I se enlistan las enfermedades de la madera más comunes y sus agentes causales.

Tabla I. Enfermedades de la madera en vid más comunes y sus agentes causales.

Enfermedad	Hongos asociados
Enfermedad de Petri	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .
Yesca	<i>P. aleophilum</i> , <i>P. chlamydospora</i> , <i>Fomitiporia punctata</i> , <i>Stereum hirsutum</i> , <i>Phomopsis viticola</i> .
Pie negro	<i>Cylindrocarpon</i> spp., <i>Campylocarpon</i> spp.
Eutipiosis	<i>Eutypa lata</i>
Excoriosis	<i>Phomopsis</i> spp
Cancro de Botriosferia	<i>Botryosphaeria</i> spp.*

*En la Tabla II se enlistan las especies de *Botryosphaeria* encontradas en vid.

A) Eutipiosis

La eutipiosis es una enfermedad que produce lesiones parecidas a las ocasionadas por los patógenos de la familia Botryosphaeriaceae: una lesión necrótica en forma de cuña. *Eutypa lata* es el agente causal de esta enfermedad (Pascoe, 1998). *E. lata* penetra a la planta por heridas de poda. Se ha encontrado en la mayor parte de las regiones vitícolas del mundo, particularmente en regiones donde las precipitaciones anuales superan los 600 mm (Pearson y Goheen, 1988). Los síntomas que ocasiona en la vid son la presencia de brotes raquíuticos y débiles, con entrenudos cortos, hojas pequeñas, aserradas y cloróticas, a veces con necrosis marginales y muerte intervenal del tejido. Los síntomas foliares se observan mejor en primavera. Muchas de las flores suelen secarse antes de la floración y los frutos que se desarrollan son pequeños y dispersos (Pérez-Marín, 2001).

B) Yesca y enfermedad de Petri

La distinción entre yesca y enfermedad de Petri depende de la edad de la parra y el hongo involucrado. La enfermedad de Petri y yesca joven, se presentan principalmente en plantas muy jóvenes, de alrededor de 1 año, cultivadas en vivero, por lo que puede afectar al establecimiento de viñedos nuevos. Los hongos involucrados son *Phaeoconiella chlamydospora* y/o *Phaeoacremonium aleophilum*. La enfermedad de Petri, se manifiesta con clorosis moderada, injertos fallidos, poco crecimiento, muerte de brotes, deterioro progresivo y hasta la muerte de la planta. Cuando se realiza un corte transversal del tallo, se aprecia la aparición de puntos color marrón oscuro a negro en el xilema (Edwards y Pascoe, 2004).

La yesca, también conocida como apoplejía, es un complejo de enfermedades causadas por un consorcio de patógenos. Los tres principales son *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* y *F. mediterránea* (Graniti et al., 2000; Surico et al., 2008). La enfermedad se caracteriza por la decoloración y deterioro de la madera y por la presencia de hojas "atigradas", o con manchas amarillentas entre las venas que pueden llegar a convertirse en tejido necrosado (Di Marco et al., 2000; Surico et al., 2008). La yesca se manifiesta principalmente en plantas maduras, disminuyendo su producción y longevidad (Gubler et al., 2005; Pottinger et al., 2002; Ascunia et al., 2004; Surico et al., 2008).

C) Pie negro

Las especies del género *Cylindrocarpon* y *Campylocarpon* son responsables de la enfermedad conocida como pie negro (Hallen et al., 2007; Grasso y Magnano di San Lio, 1975; Maluta y Larignon, 1991). Debido a que las plantas afectadas se tienen que remover del campo de cultivo, causa importantes pérdidas económicas. Las vides infectadas muestran un lento crecimiento, disminución del vigor, hojas

pequeñas, escasas y cloróticas. El tronco adquiere una coloración oscura en la zona de la unión patrón-injerto, y aparecen manchas que van de color marrón a negras principalmente en la parte basal del patrón, además se observan lesiones en las raíces, las cuales se vuelven negras, hundidas y necróticas (Rego et al., 2000; Rego et al., 2006; Halleen et al., 2006; Scheck et al., 1998).

D) Cancro de Botriosferia en vid

Esta enfermedad, antes conocida como brazo muerto, fue descrita por primera vez en viñedos de Hungría (Lehoczky, 1974). Desde entonces se ha encontrado con frecuencia en viñedos alrededor del mundo (Úrbez-Torres, 2011). El cancro de Botriosferia en vid es producido por diversas especies de *Botryosphaeria* (Tabla II). El síntoma que caracteriza esta patología, es una necrosis sectorial en forma de cuña (Figura 3), la cual inicia en el centro del tronco y eventualmente se extiende hacia la periferia (van Niekerk et al., 2004). Los síntomas que se observan cuando una planta está infectada con algunas de las especies de esta familia, se pueden expresar en forma lenta o en forma rápida. En su forma lenta, los síntomas incluyen brazos con poco vigor y hojas cloróticas y pequeñas. En su forma rápida, eventualmente uno de los brazos de la planta muere. Por eso último, la enfermedad adquirió el nombre de enfermedad de brazo muerto (Castillo-Pando et al., 2001; van Niekerk et al., 2006). En recientes estudios se han encontrado una gran cantidad de especies de *Botryosphaeria* causando canchros en madera de vid y de muchas otras plantas, manifestando síntomas parecidos tanto a yesca como a eutipiosis (Úrbez-Torres et al., 2008, Dubos et al., 2001). *Lasiodiplodia theobromae* ha sido aislada de la mayoría de los canchros severos, de plantas de vid con muerte progresiva y brazos muertos, y por lo mismo, localmente se le ha llamado "bot canker" o "cancro de Botriosferia" y recientemente esta la propuesta de nombrarla decaimiento por Botriosferia (Úrbez-Torres et al., 2011).

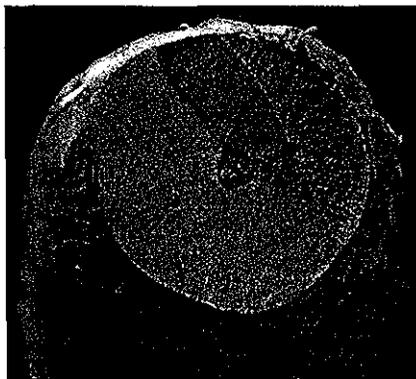


Figura 3. Corte transversal de un troco de madera de vid que muestra un cancro en forma de cuña, síntoma característico de la enfermedad de cancro de *Botryosphaeria*.

II.4 Especies de *Botryosphaeria*

El género *Botryosphaeria* se clasifica dentro de los Ascomicetos como perteneciente a la familia Botryosphaeriaceae (Schoch et al., 2006). Estos hongos tienen una distribución cosmopolita y contienen géneros que presentan formas de vida saprobias, parásitas (Smith et al., 1996; Denman et al., 2000), y endófitas (Slippers y Wingfield, 2007; Úrbez-Torres et al., 2010; van Niekerk et al., 2004). Las especies de esta familia, se distribuyen en zonas de climas templados y tropicales alrededor del planeta, encontrándose en numerosas monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Barr, 1972). Estos hongos poseen un ciclo de vida que comprende una fase asexual (anamorfo) y otra sexual (teleomorfo) (Denman et al. 2000). La fase asexual es la que comúnmente se encuentra en la naturaleza; los géneros pertenecientes a esta fase son: *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Lasiodiplodia* y *Guignardia* (Úrbez-Torres, 2011). En la Tabla II se enlistan las especies de *Botryosphaeria* aisladas de vid alrededor del mundo.

Tabla II. Especies de la familia Botryosphaeriaceae aisladas de vid alrededor del mundo (Modificado de Úrbez -Torres, 2011).

Anamorfo	Teleomorfo	Sítios de aislamiento
<i>Fusicoccum aesculi</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Australia, Canadá, China, España, Estados Unidos de América (EUA), Portugal, Francia, Nueva Zelanda.
<i>Diplodia corticola</i>	<i>Botryosphaeria corticola</i>	México, EUA
<i>Diplodia mutila</i>	<i>Botryosphaeria stevensii</i>	Australia, Nueva Zelanda, Canadá, EUA, Portugal, Hungría
<i>Diplodia seriata</i>	<i>Botryosphaeria obtusa</i>	Australia, China, Italia, EUA, Bolivia, Egipto, México, Sudáfrica, España, Nueva Zelanda, Líbano, Canadá, Francia, Portugal, Chile
<i>Dothiorella iberica</i>	<i>Botryosphaeria iberica</i>	Australia, EUA
<i>Dothiorella americana</i>	Desconocido	EUA
<i>Guignardia bidwellii</i>	Desconocido	EUA, Sudáfrica
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	Desconocido	EUA
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Australia, China, Italia, EUA, Bolivia, Egipto, México, Sudáfrica, España.
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	Desconocido	EUA
<i>Eofusicoccum australe</i>	<i>Botryosphaeria australe</i>	Australia, EUA, México, Sudáfrica
<i>Neofusicoccum luteum</i>	<i>Botryosphaeria lutea</i>	Australia, Nueva Zelanda, España, EUA, Portugal, Sudáfrica
<i>Neofusicoccum macrocalvatum</i>	Desconocido	Nueva Zelanda
<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>	Desconocido	EUA
<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Botryosphaeria parva</i>	Australia, España, Portugal, Sudáfrica, Canadá, Nueva Zelanda,
<i>Neofusicoccum ribis</i>	<i>Botryosphaeria ribis</i>	EUA, Australia
<i>Neofusicoccum viticlavatum</i>	Desconocido	Sudáfrica
<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	Desconocido	España, EUA, México, Sudáfrica
<i>Phaeobotryosphaeria porosa</i>	Desconocido	Sudáfrica
<i>Spencermartinsia viticola</i>	<i>Botryosphaeria viticola</i>	Australia, España EUA

II.4.1 Estudios de patogenicidad y virulencia en especies de *Botryosphaeria*

Varios autores han reportado diversos niveles de patogenicidad y virulencia entre las distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae. Phillips (2002) aisló especies de *Botryosphaeria* de vides que presentaban diferentes síntomas, pero solamente hizo la asociación de las especies con el tipo de lesión, sin comprobar

los postulados de Koch para determinar si dichas especies eran las causantes de las lesiones o si sólo eran oportunistas que invadieron tejido necrosado.

van Niekerk y colaboradores (2004) determinaron la patogenicidad de 8 especies de *Botryosphaeria* en tejido verde y plantas maduras de vid de la varietal Periquita y 12 especies en plantas maduras de Cabernet Sauvignon y Chardonnay, encontrando que en Periquita, las especies más patógenas fueron *Botryosphaeria australis* (*Neofusicoccum australe*) y *B. parva* (*N. parvum*), seguida de la especie *B. rhodina* (*L. theobromae*), pero que en las variedades Cabernet Sauvignon y Chardonnay la más patógena fue *Botryosphaeria ribis* (*Neofusicoccum ribis*) y la menos patógena *B. rhodina*.

Taylor y colaboradores (2005) también realizaron ensayos de patogenicidad de 4 especies de *Botryosphaeria* en vid de la varietal Red Globe, encontrando que *B. australis*, *B. rhodina* y *B. stevensii* (*Diplodia mutila*) produjeron lesiones necróticas, siendo *B. australis* y *B. rhodina* las que produjeron mayor lesión, mientras *B. obtusa* (*Diplodia seriata*) no se extendió más allá del punto de inoculación.

Úrbez-Torres y colaboradores (2008) determinaron la patogenicidad de las especies de *L. theobromae* y *Diplodia seriata* en vides de las variedades Chardonnay y Thompson Seedless, encontrando que ambas produjeron lesiones necróticas en ambas variedades, pero en Chardonnay, *D. seriata* no produjo síntomas tan evidentes como *L. theobromae*.

Finalmente, Úrbez-Torres y Gubler (2009), hicieron una evaluación de la virulencia de diversas cepas de *Botryosphaeria* aisladas de viñedos de California, a partir de 5 diferentes ensayos de patogenicidad en tejido verde y plantas maduras de vid en las variedades Syrah, Red Globe y Thompson Seedless, y encontraron que las cepas de *L. theobromae* fueron las más virulentas de todas las especies analizadas.

II.4.2 Factores de patogenicidad y virulencia (Enzimas y Toxinas) en especies de *Botryosphaeria*

Se han estudiado las enzimas involucradas en la degradación de la pared celular vegetal secretadas por las especies de *Botryosphaeria*. En la tabla III se muestran las especies de *Botryosphaeria* y las enzimas que se han encontrado en estos hongos.

La producción de toxinas también se ha encontrado en algunas especies de *Botryosphaeria*. Venkatasubbaiah y Chilton (1990) encontraron que *B. obtusa* (*D. seriata*) produce meleína, 4-hidroximeleína, 5- hidroximeleína, tirosol y p-hidroxibenzaldehído, con diferentes actividades fitotóxicas. Venkatasubbaiah y colaboradores (1991) extrajeron toxinas de *B. obtusa* (de un cultivo micelial, de esporas germinadas y directamente de manzana), volviendo a encontrar meleína, -hidroximeleína, 5- hidroximeleína, tirosol y 4- hidroxibenzaldehído. Además, evaluaron la fitotoxicidad de los compuestos extraídos y la patogenicidad de *B. obtusa* en hojas de manzano, encontrando que estos compuestos producían lesiones necróticas; sin embargo no encontraron correlación significativa entre la virulencia de las cepas y la producción de fitotoxinas. Djoukeng y colaboradores (2009) también encontraron en *B. obtusa* las toxinas meleína, 4-hidroximeleína, 7- hidroximeleína y 4,7-dihidroximeleína. Evidente y colaboradores (2010) encontraron que *N. parvum* produjo dos formas estereoisómeras de 4- hidroximeleína, así como isoscrelona y tirosol. Así mismo, realizaron ensayos de fitotoxicidad en tomate encontrando que la forma estereoisómera 3R,4R de la 4- hidroximeleína, así como la isoscrelona, fueron las más tóxicas.

Tabla III. Enzimas degradadoras de pared celular vegetal asociadas a las especies de *Botryosphaeria*

Patógeno-Hospedero	Enzimas degradadoras de pared celular evaluadas	Observaciones	Referencia
<i>L. theobromae</i> , <i>Fusicoccum aesculi</i> , <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>N. australe</i> , <i>Diplodia mutila</i> , <i>N. luteum</i> , <i>D. seriata</i> <i>N. vitifusiforme</i> , <i>D. corticola</i> - vid	Presencia de lipasas, proteasas, pectinasas, poligaracturonasas y xilanasas	Ensayos de actividad enzimática a 3, 5 y 10 días <i>in vitro</i> en medios con sustratos específicos	Ayllón-Gutiérrez y Hernández-Martínez 2011
<i>L. theobromae</i> , <i>Fusicoccum aesculi</i> , <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>N. australe</i> , <i>Diplodia mutila</i> , <i>N. luteum</i> , <i>D. seriata</i> <i>N. vitifusiforme</i> - vid	Actividad proteolítica, lipolítica, amilolítica, poligalacturonasa, pectolítica y xilanolítica	Ensayos de actividad enzimática <i>in vitro</i> en medios con sustratos específicos	Velázquez-Liaño y Hernández-Martínez 2011
<i>Diplodia seriata</i> - vid	Presencia de glucosidasas	Trabajo de proteómica en presencia de carboximetil celulosa	Cobos et al. 2010
<i>Neofusicoccum luteum</i> , <i>N. parvum</i> , <i>N. australe</i> , <i>N. mediterraneum</i> , <i>N. vitifusiforme</i> , <i>N. ribis</i> , <i>Dothiorella iberica</i> , <i>Dothiorella sp.</i> , <i>Do. viticola</i> , <i>Do. sarmentorum</i> , <i>Diplodia seriata</i> , <i>D. pinea</i> , <i>D. cupressi</i> , <i>D. mutila</i> , <i>D. phoenicum</i> , <i>D. scrobiculata</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> , <i>B. melanops</i> , <i>B. corticis</i> , <i>L. theobromae</i> , <i>L. gonubiensis</i> , <i>B. parva</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> – varias especies maderables y vid	Presencia de celulasas, xilanasas y pectinasas	Estudio cualitativo de la presencia de enzimas extracelulares mediante medios con sustratos específicos y cuantitativo del conjunto de enzimas extracelulares y ensayos de actividad a diferentes temperaturas.	Maia Saraiva, 2009
<i>L. theobromae</i> – eucalipto y frutales	Presencia de lacasas, pectinasas y β -1,3-glucanasas	Inducción de lacasas con veratril alcohol en medio basal y relación filogenética genética entre las cepas y la cantidad de producción de lacasas y glucanasas	Saldanha et al. 2007
<i>Botryosphaeria sp.</i>	Presencia de lacasas	Inducción de lacasas con veratril alcohol	Barbosa et al. 1996
<i>B. ribis</i> - manzano	Presencia de pectinasas	Inducción de la producción de enzimas con fibra de trigo	Collins y Sledjeski, 1960

II.5 Especies de *Botryosphaeria* en México

En México, plantas con síntomas de canchales se registraron por primera vez en los estados de Aguascalientes, Coahuila y Durango, aunque en aquel tiempo se asociaron con la especie *Eutypa lata* (Teliz y Valle, 1979). Años más tarde, se reportó la presencia de *L. theobromae* y *D. seriata* en los Estados de Sonora y Baja California (Úrbez-Torres et al., 2008) y, posteriormente se reportaron las especies *D. corticola*, *Neofusicoccum australe* y *N. vitifusiforme*. (Candolfi-Arballo, 2009),

El análisis filogenético realizado por Úrbez-Torres y colaboradores (2008), reveló que las especies encontradas en México presentaron mayor similitud a las cepas que fueron aisladas en California, en comparación con cepas aisladas en otras partes del mundo, proponiendo la posibilidad de una introducción accidental de California a México o viceversa. Con los trabajos de Candolfi-Arballo (2009) se reportó por primera vez la presencia de 3 nuevas especies: *D. corticola*, *N. vitifusiforme* y *N. australe*, y se corroboró la presencia de *D. seriata* como la especie más abundante en el sitio de estudio, en este caso, el Valle de Guadalupe. Debido a que anteriormente se ha reportado a *L. theobromae* como una especie muy patógena (Punithalingam, 1980; Taylor et al., 2005; Úrbez-Torres et al., 2008; Úrbez-Torres y Gubler, 2009), es necesario estudiar su biología más a fondo, sobre todo, sus factores de virulencia.

II.6 *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae (teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*) es un hongo patógeno ascomiceto pleomórfico, que puede estar presente en plantas tropicales y subtropicales (Mohali et al., 2005). Ha sido reportado en más de 500 hospederos, incluyendo frutales, vegetales y plantas ornamentales (Punithalingam,

1980). En vid, se ha reportado como uno de los agentes causales de enfermedades de la madera y es reconocido como un patógeno con un alto nivel de colonización y virulencia (Úrbez-Torres et al., 2008). *L. theobromae* se reproduce principalmente por picnidiosporas que son producidas en picnidios que se pueden encontrar en tejido necrótico de vides infectadas y en restos de plantas muertas. La dispersión de las picnidiosporas está altamente correlacionada con las épocas de lluvias (Kuntzmann et al., 2009; van Niekerk et al., 2010; Úrbez-Torres et al., 2010). La época de poda de las vides en el Hemisferio Norte es entre diciembre y febrero, coincidiendo con el inicio de la temporada de lluvias (Úrbez-Torres et al., 2010). La presencia de estas esporas en aire durante la época de poda juega un papel importante en el proceso de infección, pues *L. theobromae* puede infectar a la planta en un periodo de 12 a 36 días (periodo de riesgo) antes de que cicatricen las heridas de poda (Úrbez-Torres y Gubler, 2011).

II.7 Estudios en *Lasiodiplodia theobromae*

Aldridge y colaboradores (1971) encontraron en *L. theobromae* la producción de varias fitotoxinas, entre ellas lasiodiplodina, de-O-metil-lasiodiplodina, cis-4-hidroxi-meleína, indol-3-ácido carboxílico, 3-formilindol, etil-hidrógeno fumarato, meleína, así como ácido jasmónico, conocido como una hormona inhibitoria del crecimiento en plantas. Siete años después, Umezurike (1978) caracterizó 5 celulasas y 4 beta-glucosidasas de diferentes tamaños moleculares para la especie *Botryodiplodia theobromae* (sinonimia de *L. theobromae*), encontrando que la aparición y desaparición de algunas de estas enzimas dependía de la edad del cultivo. Más adelante, Florence y colaboradores (2002) utilizando microscopía electrónica de barrido mostraron que *B. theobromae* (sinonimia de *L. theobromae*) fue capaz de degradar la pared celular lignificada del árbol del caucho. Posteriormente, Dekker y colaboradores (2007) estudiaron la producción de lacasas en *B. rhodina* (*L. theobromae*), encontrando que el tipo de inóculo, el punto en que se agrega el inductor (veratril alcohol), el pH inicial, la proporción

C:N y el tipo de fuente de N estimulan su producción. En el mismo año, Veiga y colaboradores (2007), encontraron que la toxina lasiodiplodina inhibe la síntesis de ATP y afecta el transporte de electrones de los tilacoides y; Saldanha y colaboradores (2007), reportaron que las especies *L. theobromae* y *B. ribis*, producen pectinasas, lacasas y β -1,3 glucanasas. Dos años más tarde, Candolfi-Arballo (2009), reportó que *L. theobromae* es una de especies que tiene capacidad de producir mayor cantidad de celulasas, proteasas y amilasas con respecto a otras especies de la misma familia. Finalmente, Obrador-Sánchez (2011) reportó la presencia de halos de degradación presentes alrededor de la hifa de *L. theobromae* durante la interacción con madera de vid en un análisis de microscopia de epifluorescencia que indican la posible presencia de celulasas.

Como puede verse, los estudios realizados hasta ahora en *L. theobromae*, se han dirigido hacia la identificación de factores de virulencia que concierne a la producción y liberación de enzimas y toxinas, por lo tanto si construimos una biblioteca de ADN complementario de ADNc de los genes expresados diferencialmente podremos contar con un banco de genes de *L. theobromae*, que permita en el futuro identificar cuáles son los genes que están relacionados con la patogenicidad.

II.8 Justificación

Los hongos de la familia Botryosphaeriaceae han sido reportados como agentes causales de enfermedades en la madera de vid, causando daños importantes en todo el mundo. *L. theobromae* ha sido reportada como una de las especies más virulentas y se ha encontrado en viñedos de Baja California. Se conoce poco sobre los genes y los factores patogenicidad y virulencia que este hongo emplea para infectar, colonizar e inducir síntomas en plantas de vid, y no se tiene conocimiento de los genes responsables y su regulación, por lo que en este trabajo se estudió el comportamiento del hongo *L. theobromae* y la expresión de genes diferencialmente expresados en la presencia de madera de vid mediante la construcción de una biblioteca de ADNc. Los resultados de esta biblioteca permitirán determinar algunos de los genes relacionados con la patogenicidad y/o virulencia en el hongo *L. theobromae*.

II.9 Hipótesis

El crecimiento de *L. theobromae* se verá influenciado por la presencia de madera de vid en el medio de cultivo.

Existe una mayor expresión de genes relacionados a virulencia y/o patogenicidad en el hongo *L. theobromae* en presencia de madera de vid.

II.10 Objetivos

II.10.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento y la expresión de genes de *L. theobromae* en presencia de madera de vid.

II.10.2 Objetivos específicos

1. Evaluar las diferencias en crecimiento de *L. theobromae* en presencia y ausencia de madera de vid en ensayos *in vitro*.
2. Obtener una biblioteca de ADNc de genes de *L. theobromae* expresados diferencialmente en presencia de madera de vid.
3. Identificar genes en *L. theobromae* diferencialmente expresados y relacionados putativamente con la patogenicidad y/o virulencia.

III

Materiales y métodos

III.1 Descripción del material biológico

La cepa utilizada en este trabajo fue *L. theobromae* UCD256Ma, la cual fue proporcionada amablemente por el Dr. Douglas W. Gubler de la colección de hongos de su laboratorio perteneciente al Departamento de Fitopatología de la Universidad de California, Davis.

III.2 Crecimiento y mantenimiento de la cepa de *Lasiodiplodia theobromae*

III.2.1 Reactivación

Antes de su utilización y para reactivarla, la cepa UCD256Ma se inoculó en el tejido de una planta de vid. Primeramente, se creció en Papa Dextrosa Agar (PDA) a 30°C por 36 horas. Al terminar el tiempo de incubación, utilizando una navaja estéril se hizo un orificio de aproximadamente 2 mm² en una de las ramas verdes de una planta de vid de 1 año de edad. Se cortó un disco micelial del margen de crecimiento del hongo y se colocó en la herida. Después de la inoculación, se selló con parafilm. La planta se mantuvo en el invernadero por un periodo de 20 días, posteriormente se realizaron cortes de la zona infectada y se procedió a la esterilización por superficie sumergiendo rápidamente en alcohol al 90% y pasando por la flama del mechero. Finalmente se cortaron trozos de madera del margen necrótico de la lesión y se inocularon en cajas Petri con PDA

suplementado con cloranfenicol a 25 mg/ml para evitar la contaminación bacteriana. Para preservar la cepa, las cajas se incubaron a 30 °C por 36 horas. Se cortaron discos miceliales de aproximadamente 5 mm de diámetro del margen de crecimiento del hongo en PDA, y se pasaron a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml que contenían glicerol estéril al 10% y se almacenaron a 4 °C.

III.2.2 Cultivo inicial para ensayos *in vitro*

Cada vez que se iniciaba un experimento y con el fin de contar con inóculo fresco para la realización de los ensayos *in vitro*, se tomaron discos de micelio que se encontraban en glicerol y se colocaron en el centro de las cajas Petri con PDA. Las cajas se incubaron a 30 °C por dos días. Un disco micelial de este cultivo se inoculó en cajas de Petri con Medio Mínimo de Vogel (MMV) como se indica en los anexos y se incubó a 30 °C por 48 horas. Este último cultivo se utilizó como inóculo para los ensayos *in vitro* y para la extracción de RNA.

III.3 Evaluación del crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en ausencia y presencia de madera de vid

En ensayos *in vitro*, se evaluó el comportamiento de *L. theobromae* en cuatro tratamientos, MMV adicionado con madera (MMV-CM), MMV sin madera (MMV-SM), Sales de Vogel 1X sin madera (SV-SM) y SV con madera (SV-CM). Para los tratamientos con madera se utilizó 1 g de madera de vid por cada 25ml de medio. La madera fue cortada de plantas certificadas de tres años de edad, lavada con agua purificada estéril, molida en licuadora Osterizer 541® y esterilizada junto con el medio de cultivo correspondiente. En la tabla IV se resumen los tratamientos. Para la evaluación de *L. theobromae* en las diferentes condiciones se realizaron las biometrías de crecimiento: índice de ramificación, biomasa y tasa de crecimiento. Para poder medir algunos de estos parámetros, se analizaron las

colonias por microscopía óptica. Anteriormente se determinó que la temperatura óptima de crecimiento de *L. theobromae* en PDA es 30.8 °C (Úrbez-Torres et al., 2006), por ello en este trabajo se utilizó una temperatura de 30 °C en todos los ensayos subsecuentes.

Tabla IV. Tratamientos utilizados para la evaluación *in vitro* del crecimiento de *L. theobromae*.

Tratamiento	Características del tratamiento	Clave
1	Medio mínimo de Vogel adicionado con madera*	MMV-CM
2	Medio mínimo de Vogel	MMV-SM
3	Sales de Vogel 1X adicionada con madera*	SV-CM
4	Sales de Vogel 1X	SV-SM

*Se agregó un gramo de madera de vid molida y seca por cada 25 mililitros de medio de cultivo.
Nota: Para conocer las formulaciones de los medios ver anexo 5.

III.3.1 Índice de ramificaciones

Para cuantificar el número de ramificaciones, se realizaron cultivos de *L. theobromae* sobre cajas Petri que contenían MMV-SM, MMV-CM, SV-SM y SV-CM, que se incubaron a 30°C por 48 horas. Una vez concluido el tiempo se contaron las ramificaciones presentes en 30 hifas a lo largo de 1 mm a partir del ápice. La cuantificación se realizó con el apoyo de un microscopio estereoscópico SZX12, Olympus, las imágenes se capturaron con una cámara DP70, Olympus, integrada al microscopio y se usó el software computacional DPController para la medición.

III.3.2 Determinación de biomasa por peso seco

Dos discos miceliales de 5 mm de diámetro del cultivo inicial de *L. theobromae* se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de MMV-SM, MMV-CM, SV-SM o SV-CM. Los cultivos se incubaron 30°C por dos días; al término de la incubación se pasaron a tubos de 50 ml previamente pesados (Peso 1), se centrifugaron para eliminar el sobrenadante y se incubaron a 60°C hasta

obtener un peso constante (Peso 2), este último se registró y la biomasa se determinó por diferencia de pesos (Peso 2–Peso 1). Para el caso de los tratamientos con madera al total de biomasa se le restó el peso de la madera. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

III.3.3 Tasa de crecimiento

Del cultivo inicial se cortaron discos de micelio con un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro. Usando una plantilla previamente diseñada para el propósito, se colocó un disco del micelio de *L. theobromae* a una distancia de 5 mm del borde de la caja de Petri de 15 cm de diámetro conteniendo MMV-SM, MMV-CM, SV-SM o SV-CM. Las cajas se incubaron a 30°C y se midió el margen de la colonia cada 12 horas durante 3 días. Posteriormente, se trazaron 10 líneas a partir del centro del disco micelial (Figura 4) y se midieron 10 puntos de cada margen colonial, con el fin de obtener un promedio del crecimiento periódico. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

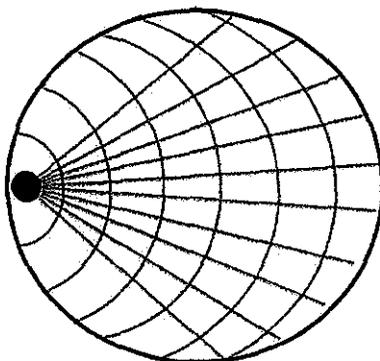


Figura 4. Forma en que se inoculó y registró del crecimiento periódico del hongo *L. theobromae*. Las líneas curvas indican el margen del crecimiento periódico y las líneas rectas los trazos marcados para promediar los datos.

III.3.4 Comparación del crecimiento usando microscopía óptica

Para la comparación del crecimiento en los diferentes tratamientos, se tomó un disco micelial de 0.5 mm de diámetro del cultivo inicial de *L. theobromae* y se colocó en el centro de una caja Petri conteniendo MMV-SM, MMV-CM, SV-SM o SV-CM. Las cajas se incubaron a 30 °C por 48 horas. La morfología del micelio se observó por medio de la técnica de bloque invertido (Figura 5). Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio invertido modelo Axiovert 200 (Zeiss®), fueron capturadas con una cámara AxioCam HRc y se procesaron usando el software Axiovision ver. 2.7 (Zeiss®). Cada tratamiento se hizo por triplicado.

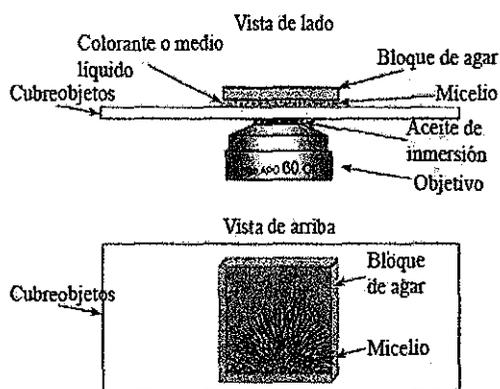


Figura 5. Representación esquemática de la técnica del bloque invertido (Beltrán-Aguilar, 2006; Hickey et al., 2004).

III.3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de las biometrías se realizó comparando los cuatro tratamientos en diferentes combinaciones. Las combinaciones de los tratamientos se ilustran en la Figura 6. Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos probados, los datos fueron analizados con la prueba paramétrica ANOVA y en caso de ser necesario se realizó una prueba *posteriori* de Tukey para determinar qué tratamientos eran diferentes entre sí. Los análisis estadísticos

fueron realizados con el programa estadístico STATISTICA (StatSoft Inc. Versión 7).

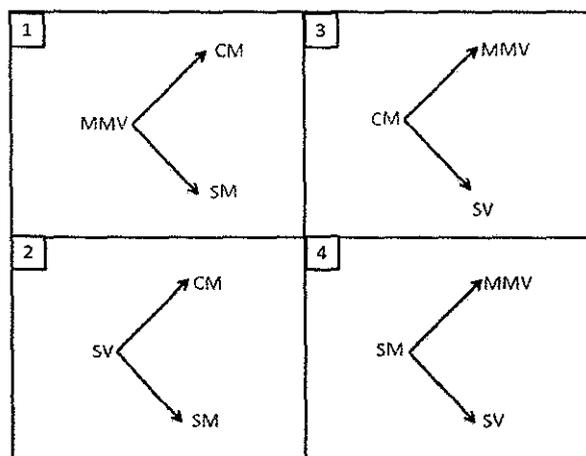


Figura 6. Comparaciones realizadas durante el análisis estadístico del índice de ramificaciones, biomasa y tasas de crecimiento.

III.4 Técnicas moleculares

III.4.1 Extracción de ARN total y purificación de ARNm

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior se seleccionaron las condiciones de SV-CM y SV-SM para elaborar la biblioteca de ADNc siguiendo el siguiente procedimiento. Se usaron matraces Erlenmeyer de 250 ml, que contenían sólo 75 ml de SV-SM o 75 ml de SV con 3 gramos de madera de vid (SV-CM). La madera de vid que se utilizó, se obtuvo del tallo principal de plantas certificadas de 3 años que se limpiaron superficialmente con agua estéril, secaron y finalmente se cortaron en fragmentos de aproximadamente de 1 cm de diámetro por 0.5 mm de ancho. Dichos trozos se esterilizaron junto con los medios antes mencionados. Para la inoculación de los matraces se utilizaron cuatro círculos de micelio de 0.5 mm de diámetro de un cultivo de *L. theobromae* crecido en MMV por 48 horas. Se ensayaron varios tiempos de inoculación. Debido que a las 48 horas la producción de biomasa era baja, y para aumentar el tiempo de interacción

del hongo con la madera, se optó por incubar los cultivos a 30 °C por un periodo de 7 días.

A) Extracción de ARN

Finalizado el tiempo de incubación de los cultivos de *L. theobromae*, se recuperaron por separado el micelio crecido en ambas condiciones, y rápidamente se congeló a -80 °C. El micelio congelado se sometió a pulverización con la ayuda de un mortero y pistilo estériles y usando nitrógeno líquido. La extracción de ARN se realizó utilizando Trizol® (Invitrogen™ No. Catalogo 15596-026) que contiene fenol y tiocianato de guanidina. Para desnaturalizar proteínas e inactivar RNAsas intracelulares, se resuspendieron 3 g de micelio pulverizado en 10 ml de Trizol, se agregaron 2 ml de cloroformo con el propósito de separar el ARN (fase superior) del ADN (interfase) y de las proteínas (fase inferior); se centrifugó la suspensión y se recuperó el ARN proveniente de la fase superior acuosa. Se precipitó con isopropanol (5 ml), se lavó con etanol (1 ml) y finalmente se disolvió en agua estéril tratada con DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 0.1% y se almacenó a -20 °C (para detalles consultar Anexo 1). Para evitar la degradación del ARN por RNAsas, todo el material utilizado para las extracciones, y el trabajo posterior fue tratado con DEPC al 0.1% y/o certificado como libre de RNAsas, y las superficies de trabajo se limpiaron constantemente con RNase AWAY (Invitrogen No. de catalogo 10328011).

B) Evaluación de la Integridad y cuantificación del RNA total

Para evaluar la calidad e integridad del ARN total de ambas condiciones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% disuelta en buffer Tris Acetato 1X (TAE) y se adicionó bromuro de etidio (0.1µg/ml). Las muestras de ARN total (10µl de cada una) se mezclaron con 2µl de buffer de carga Blue/Orange LoadingDye 5X. La electroforesis se realizó manteniendo un voltaje constante

(60V) durante dos horas y media. Finalizada la electroforesis, las bandas de ARN se visualizaron en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta. La imagen obtenida se registró mediante un sistema de documentación de geles. La concentración de ARN se cuantificó en un espectrofotómetro de escaneo con luz visible y ultravioleta utilizando una longitud de onda de 260 y 280 nm, esta última para evaluar la pureza del ARN total.

C) Purificación de ARN mensajero (ARNm)

Utilizando el kit de Oligotex mRNA Mini (Qiagen), se purificó el ARNm del ARN total extraído de ambas condiciones (CM y SM), siguiendo el procedimiento y recomendaciones del fabricante (Ver Anexo 2). Al finalizar la purificación el ARNm se cuantificó en un espectrofotómetro de escaneo con luz visible y ultravioleta utilizando una longitud de onda de 260 y 280 nm, esta última con el fin de determinar la pureza del ARNm.

III.4.2 Construcción de una biblioteca de ADN complementario (ADNc) utilizando la técnica de hibridación sustractiva por supresión

Con el fin de identificar los genes diferencialmente expresados en la presencia de madera de vid, se utilizó la técnica de hibridación sustractiva por supresión (SSH, por sus siglas en inglés).

La técnica SSH, permite comparar el ARN mensajero de dos poblaciones y obtener secuencias de genes que son expresados en una de las poblaciones pero no en la otra (Diatchenko et al., 1996; Diatchenko et al., 1998). Consiste en sintetizar ADNc de las muestras de ARNm a contrastar. Una de las muestras (de la cual se quiere obtener las secuencias expresadas diferencialmente) es denominada como muestra problema o “tester”, mientras que la otra es denominada control o “driver”. El tester y el driver son hibridados, y las secuencias

híbridas son amplificadas. Por consecuencia el ADNc que permanece representa los genes que se expresan únicamente en el tester (Clontech, 2004). Estas secuencias posteriormente son clonadas en una célula huésped para su multiplicación, permitiendo elaborar una biblioteca de ADNc expresados diferencialmente. Esta técnica tiene la ventaja, con respecto a otras, de basarse en el uso de técnicas comunes de biología molecular y de no requerir equipos especializados de detección y análisis.

La técnica de hibridación sustractiva en este trabajo se elaboró usando el kit de PCR-select cDNA Subtraction (Clontech No. de catalogo K1804-1).

A) Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El primer paso para realizar la SSH, fue sintetizar el ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARNm previamente obtenidas, para ello, se utilizaron 1.6 y 1.2 µg de ARNm del cultivo de *L. theobromae* en presencia y ausencia de madera respectivamente. La síntesis del ADNc se realizó utilizando la enzima transcriptasa inversa (Ver Anexo 3, sección A y B).

B) Digestión utilizando la enzima de restricción *RsaI*

Los ADNc considerados tester (con madera) y driver (sin madera) fueron digeridos con la enzima de restricción *RsaI* (Ver Anexo 3, sección C) para generar extremos romos que son necesarios para llevar a cabo la unión de los adaptadores.

C) Ligación de adaptadores

Los adaptadores sólo se ligaron al ADNc tester (con madera). El ADNc tester resultante de la digestión se dividió en dos partes y cada una fue ligada con un adaptador diferente (adaptador 1 y adaptador 2) (Ver Anexo 3, sección D). Los

extremos de los adaptadores carecen de un grupo fosfato, por tanto los adaptadores se pegan en el extremo 5' del ADNc.

D) Primera hibridación

Para llevar a cabo la primera hibridación, se añadió un exceso de ADNc driver digerido (sin madera) a cada muestra de ADNc tester (con madera) resultantes de la ligación (Adaptador 1 y Adaptador 2). Las muestras fueron luego desnaturalizadas y preparadas para el alineamiento (Ver Anexo 3, sección E). Durante esta primera hibridación se generaron diferentes tipos de moléculas (a, b, c y d) en cada una de las muestras (Figura 7).

E) Segunda hibridación

Las dos muestras resultantes de la primera hibridación fueron mezcladas sin desnaturalizar y se les añadió más ADNc driver desnaturalizado con el fin de enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente (Ver Anexo 3, sección F). Como resultado, solamente los ADNc tester de cadena sencilla con adaptador pudieron reasociarse formando híbridos con un adaptador diferente en cada extremo (moléculas tipo e) (Figura 7).

F) Amplificación por PCR de las secuencias expresadas en la presencia de madera

Con el objetivo de amplificar únicamente las secuencias expresadas en presencia de madera, finalizadas las hibridaciones, se realizó una amplificación por PCR utilizando la enzima Advantage cDNA Polymerase mix (Clontech No. de catalogo 639134), bajo las condiciones descritas en la Tabla V. Para más detalles Ver Anexo 3, sección G.

Tabla V: Ciclos empleados para la amplificación de los ADNc expresados diferencialmente.

Paso	No. de ciclos	Temperatura°C	Tiempo (min:seg)
1*	1	75	05:00
2	1	94	00:25
		94	00:10
3	30	66	00:30
		72	01:30
4	1	72	05:00

*Extensión de adaptadores

Durante esta PCR, las moléculas de tipo a y d no tienen lugares de unión de los oligos y no pueden ser amplificadas; las de tipo b forman un bucle sobre si mismas que impide la amplificación exponencial y las de tipo c solo tienen el sitio de unión de uno de los oligos de manera que experimentan una amplificación lineal. Así que, tan solo las moléculas de tipo e pueden ser amplificadas exponencialmente (Figura 7).

Para comprobar la amplificación, el producto resultante de la PCR (20µl), se mezcló con 4µl del buffer de carga Blue/Orange LoadingDye 5X y se cargó en un gel de agarosa al 1.5% disuelta en TAE 1X y bromuro de etidio (0.1µg/ml). Como referencia se utilizó un marcador de 1 KB (Invitrogen). La electroforesis se realizó manteniendo un voltaje constante de 80V durante una hora. Finalizada la electroforesis, el producto de PCR se visualizó en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta. La imagen obtenida se registró en un sistema de documentación de geles. Finalmente, se cuantificó la concentración de ADNc amplificado usando un espectrofotómetro de escaneo con luz visible y ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm.

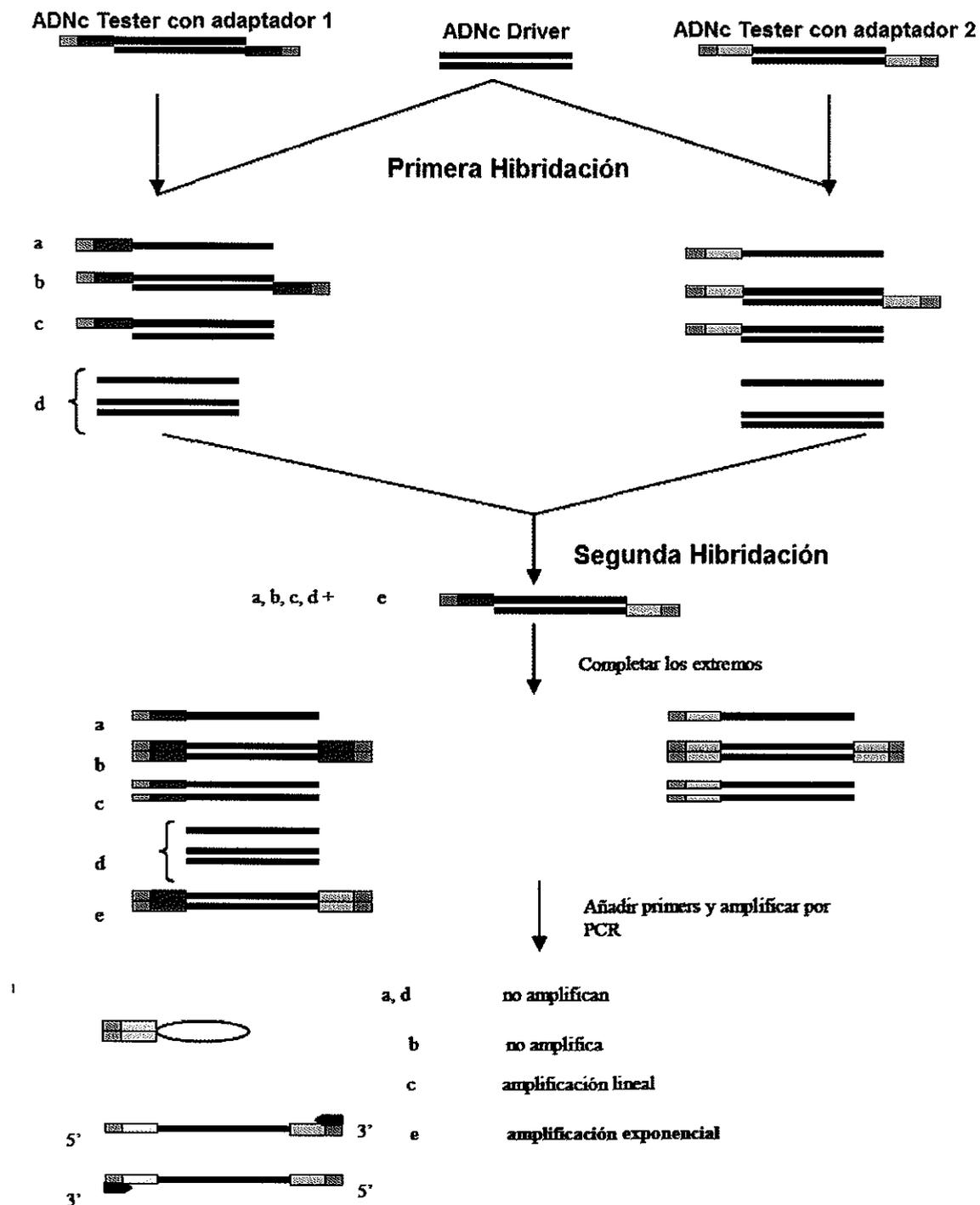


Figura 7: Esquema de las hibridaciones realizadas con el PCR-select cDNA Subtraction Kit. (Modificado de Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996).

III.4.3 Clonación del ADNc amplificado

El producto de PCR procedente de la sustracción, fue ligado al vector pCR 2.1 de TOPO T/A Cloning Kit (Invitrogen No. catalogo K2020-20); este vector contiene extremos cohesivos 3' de timidina (T), que permiten que los fragmentos de ADNc puedan ser ligados al vector, debido a que la *Taq* polimerasa utilizada agrega residuos de adenosina (A) en los extremos 3' de los productos amplificados (Figura 8). El vector confiere a la bacteria *Escherichia coli* la resistencia al antibiótico ampicilina, por lo que su transformación permite seleccionar únicamente aquellas bacterias que hayan incorporado el vector. Además el vector pCR 2.1 está diseñado para que el ADNc se ligue dentro del gen que codifica para *LacZ α* , de tal manera que se vea interrumpido; esta característica permite seleccionar únicamente a las bacterias que tienen el inserto que serán de color blanco, a diferencia de aquellas que no tienen el inserto que serán azules.

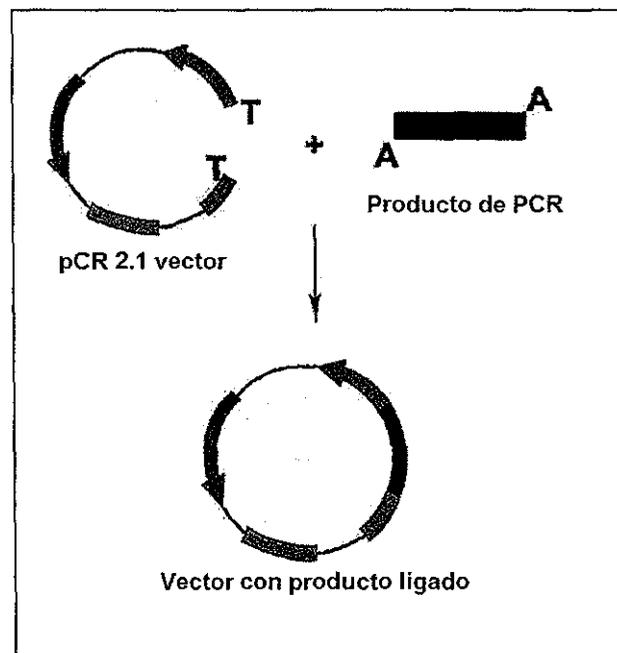


Figura 8: Estrategia de clonación T/A

Brevemente, 3 μ l (48 μ g) del producto de PCR fueron ligados dentro del vector pCR 2.1 (50 μ g) teniendo una relación molar de 1:1 (vector: inserto), la ligación se realizó con la enzima T4 DNA Polimerasa con la cual se incubaron a 15°C durante toda la noche. Terminada la reacción de ligación, se procedió a la introducción del vector en una célula huésped para permitir su propagación, es decir, la transformación de células competentes de *E. coli* TOP 10 (Ver Anexo 4). Las células de *E. coli* transformadas fueron sembradas en placas de medio Luria-Bertani (LB) con agar que contenían 50 μ g/ml de ampicilina y 40 μ g/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactósido (X-gal) y se incubaron a 37 °C toda la noche. El X-gal es degradado por la β -galactosidasa, dando como resultado galactosa y 5-bromo-4-cloro hidroxindol, este último será oxidado en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble, por lo tanto las colonias crecidas en la placa que poseían el gen *lacZ* funcional pudieron ser claramente distinguidas por su coloración azul, dichas colonias fueron descartadas y sólo se seleccionaron las colonias blancas, las cuales tenían potencialmente interrumpido el gen, indicando la existencia del inserto (ADNc).

III.4.4 Análisis de la biblioteca de ADNc sustractivo.

A) PCR de colonia

Para confirmar la presencia de insertos en los clones, la biblioteca sustractiva fue analizada por PCR. El PCR de colonia se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos M13F (Sentido) y M13R (Antisentido) que hibridan a una distancia de 70 y 94 pb en cada uno de los extremos del punto de inserción del fragmento de ADNc (Figura 9). De este modo, analizando el tamaño de los productos de PCR resultantes, fue posible identificar aquellos clones que habían insertado los fragmentos de ADNc de interés.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron las siguientes:

→ M13F: 5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC-3' (17 nucleótidos, $T_m = 62.3^\circ\text{C}$)

→ M13R: 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' (17 nucleótidos, $T_m = 60.3^\circ\text{C}$)

La reacción de PCR se realizó directamente usando las colonias seleccionadas, y añadiendo 1 μl de una mezcla de dNTPs (A, T, G, C) con una concentración de 10 μM cada uno, 0.125 μl de Top Taq DNA polimerasa (Qiagen) (5 unidades/ μl), 2.5 μl de Taq 10X buffer, 1.25 μl de MgCl_2 (25 mM), 1 μl de cada uno de los cebadores (10 μM) en un volumen final de 50 μl .

Las condiciones del PCR fueron las siguientes: Un paso de desnaturalización a 94 $^\circ\text{C}$ durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 $^\circ\text{C}$, 30 segundos a 62 $^\circ\text{C}$ y 1 minuto y medio a 72 $^\circ\text{C}$ y, por último, 10 minutos de extensión final a 72 $^\circ\text{C}$. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y como referencia se utilizó un marcador de 1 KB (Invitrogen).

B) Crecimiento de las colonias y extracción de plásmido

De aquellas colonias en las que se confirmó la presencia de inserto, se extrajo el plásmido para hacer un análisis de restricción y para su posterior secuenciación. Primero, las colonias se inocularon en 4ml de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incubaron a 37 $^\circ\text{C}$ en agitación continua a 250 rpm por 12 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se pasó el cultivo a un tubo de 1.5 ml para su posterior centrifugación (un minuto a máxima velocidad), se retiró el sobrenadante, se colocó la pastilla en hielo y se procedió a la extracción del plásmido usando el kit Miniprep QIAprep® (Qiagen Catalogo No. 27104) (Ver anexo 5). Finalizada la extracción se verificó la calidad del plásmido con un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Como referencia se utilizó un marcador de 1 KB

(Invitrogen). El ADN plasmídico se cuantificó en un espectrofotómetro de escaneo UV/Visible utilizando una longitud de onda de 260 nm.

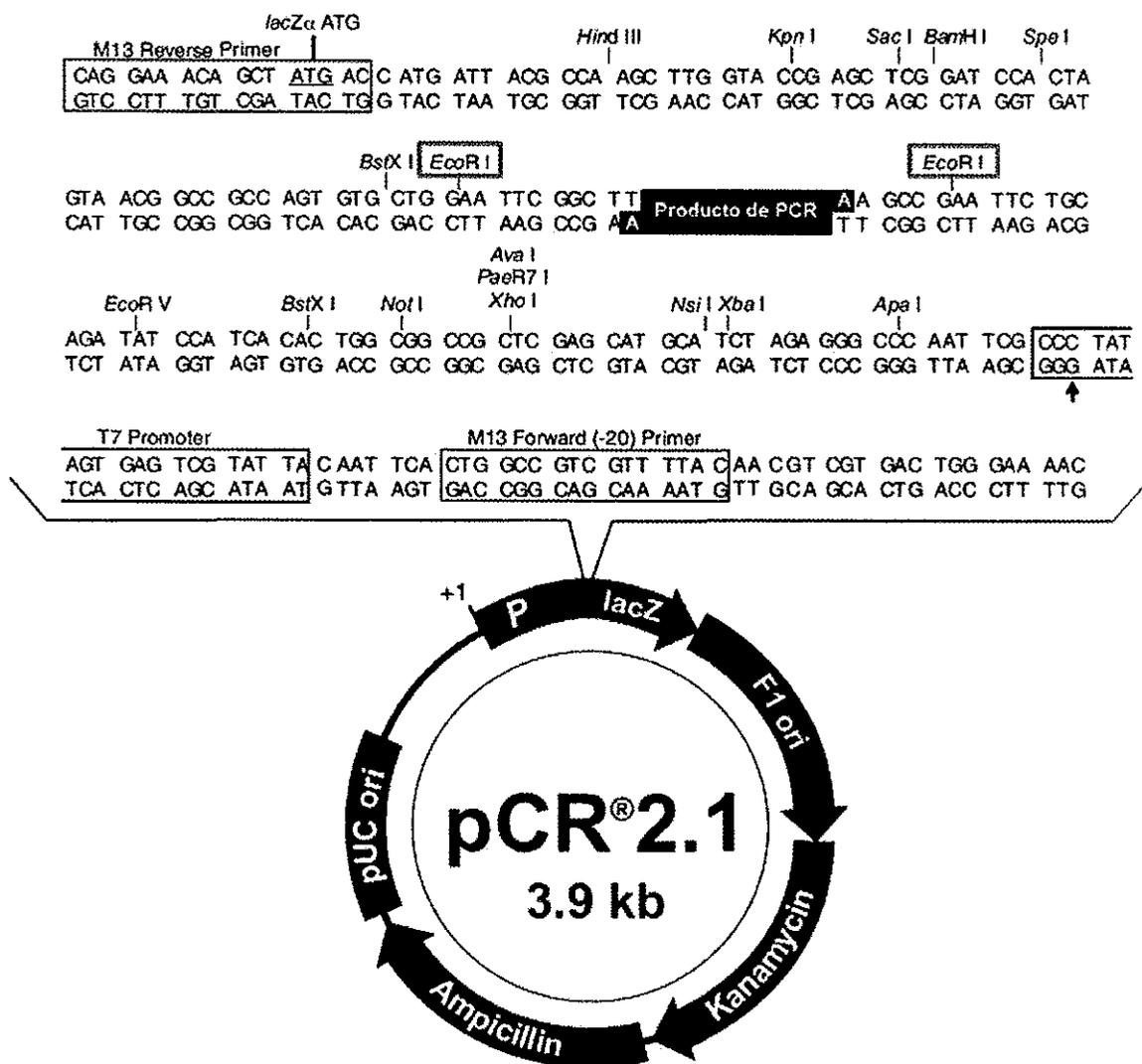


Figura 9. Mapa de vector pCR 2.1 linealizado. Los cuadros rojos señalan las regiones donde se unen los oligonucleótidos M13F y M13R utilizados para realizar los PCR de colonias. Los recuadros azules indican en donde se realiza el corte por la enzima de restricción *Eco*RI en el análisis de restricción.

C) Análisis de restricción

Para confirmar la existencia de inserto en el plásmido, se realizó un análisis de restricción usando la enzima *EcoRI*. En el plásmido usado aquí, esta enzima corta a los extremos en dónde se encuentra insertado el ADNc expresado diferencialmente, liberándolo del plásmido, dicho proceso se puede comprobar mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Brevemente, 3µl (1 µg) de plásmido se digirieron usando 0.5 µl de *EcoRI* (10 u/µl) y 1.5 µl de buffer 10X *EcoRI* en un volumen final de 15 µl, la reacción se incubó a 37 °C por una hora y media. Pasado el tiempo de incubación, el resultado de la restricción se visualizó en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.1µg/ml).

3.5 Secuenciación y análisis bioinformático

Confirmada la presencia de inserto, las muestras seleccionas se enviaron a secuenciar a Eton Bioscience Inc., utilizando los cebadores M13F y M13R. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa sequencher 4.10.1 para eliminar las secuencias pertenecientes al vector y a los adaptadores. El programa Blast del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) fue usado para encontrar las similitudes de las secuencias, usando la base de datos de genomas de hongos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi).

IV

Resultados

IV.1. Mediciones Biométricas

IV.1.1 Índices de ramificación

En el MMV con madera el índice de ramificación fue mayor (11.03 ± 3.08) que en el tratamiento sin madera (5.40 ± 1.84). En las SV con madera también el índice de ramificación fue mayor en presencia de madera (6.16 ± 1.70) que en su ausencia (2.06 ± 0.85). Al comparar las ramificaciones presentes en la presencia de madera con respecto a los medios utilizados, el índice de ramificación fue mayor cuando se utilizó MMV, probablemente debido a la carencia de sacarosa en las SV. El análisis de varianza reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con madera y sin madera y entre los dos medios de cultivo utilizados (Figura 10).

IV.1.2 Biomasa

La biomasa producida por el hongo en el MMV con madera fue mayor (1.1 ± 0.17) que en la ausencia de madera (0.23 ± 0.05). Igualmente, en las SV con madera la biomasa fue mayor (0.71 ± 0.10) que sin madera (0.09 ± 0.01). Al comparar entre los dos medios, la biomasa fue mayor en MMV. El análisis de varianza reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) en la biomasa producida en los tratamientos con madera y sin madera así como entre los dos medios de cultivo utilizados (Figura 11).

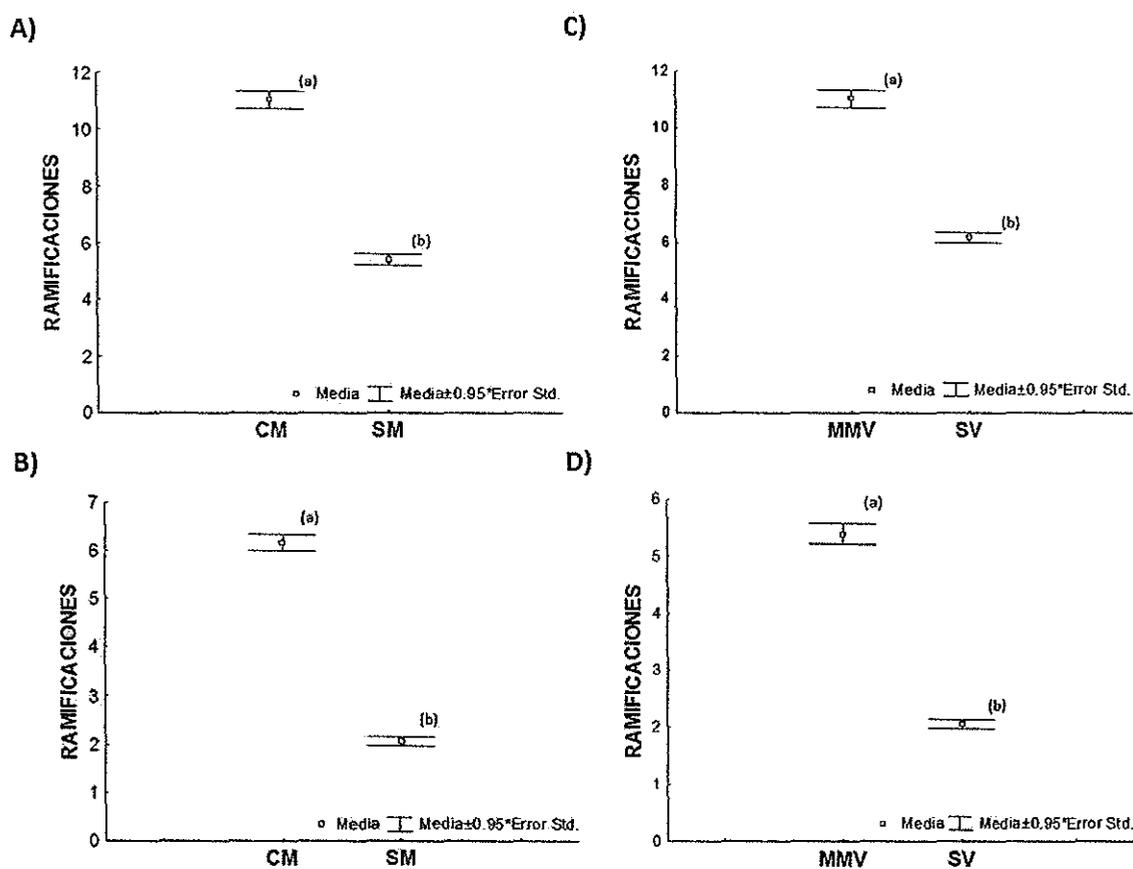


FIGURA 10. Ramificaciones/mm de *L. theobromae* cepa UCD256Ma. A) medio mínimo de Vogel (MMV) en presencia (CM) y ausencia (SM) de madera de vid, B) sales de Vogel (SV) en CM y SM, C) Comparación de las ramificaciones/mm en CM en los dos medios, D) ramificaciones/mm en SM en los dos medios. Los distintos superíndices (a>b) indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p<0.05$).

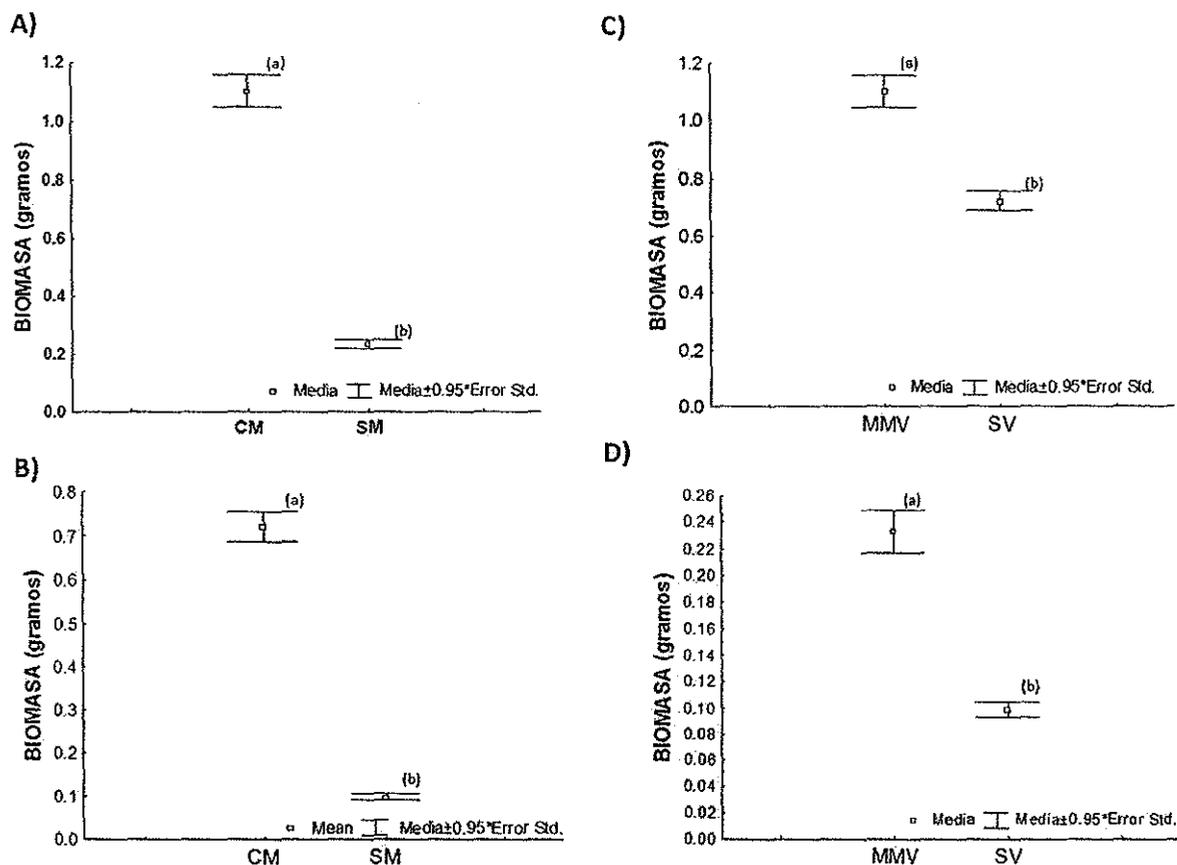


FIGURA 11. Biomasa (gramos) producida por *L. theobromae* cepa UCD256Ma a las 48 horas de incubación. A) medio mínimo de Vogel (MMV) en presencia (CM) y ausencia (SM) de madera de vid, B) sales de Vogel (SV) en CM y SM, C) Biomasa en CM en los diferentes medios, D) producción de biomasa en SM. Los distintos superíndices (a>b) indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p<0.05$).

IV.1.3 Tasas de crecimiento

El crecimiento total de *L. theobromae* en MMV con madera fue mayor (10.74 ± 0.04) que en su ausencia (8.46 ± 0.06). En las SV el crecimiento fue igualmente mayor (6.97 ± 0.07) en presencia de madera que sin madera (5.24 ± 0.11). El análisis de varianza reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) en la biomasa producida en los tratamientos con madera o sin madera así como entre los dos medios de cultivo utilizados (Figura 12).

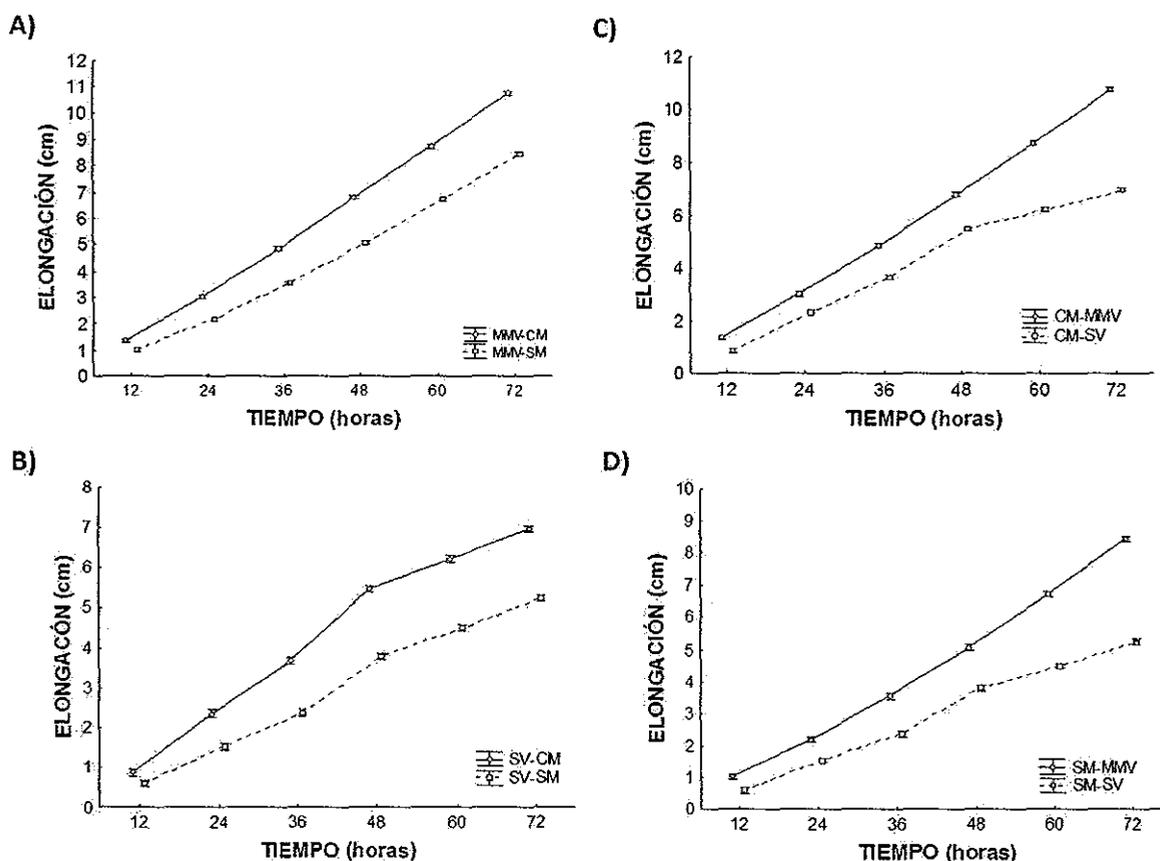


FIGURA 12. Crecimiento de *L. theobromae* cepa UCD256Ma. A) medio mínimo de Vogel (MMV) en presencia (MMV-CM) y ausencia (MMV-SM) de madera de vid; B) sales de Vogel (SV) en presencia (SV-CM) y ausencia (SV-SM) de madera de vid; C) comparación de crecimiento en presencia de madera de vid en MMV y SV; D) comparación de crecimiento en ausencia de madera de vid en MMV y SV. El análisis de ANOVA reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

En la figura 13, se ilustra la morfología colonial de *L. theobromae* crecida en los diferentes tratamientos. En MMV-CM, el hongo presentó micelio blanquecino, algodonoso y abundante (Figura 13A), mientras que en MMV-SM, además de ser algodonoso y blanquecino, presentó tonalidades café claro y fue menos abundante (Figura 13B). Por otra parte el micelio presente en SV-CM fue blanco parduzco y presentó poco micelio aéreo (Figura 13C), y en SV-SM el micelio aéreo fue escaso y blanco parduzco (Figura 13D).

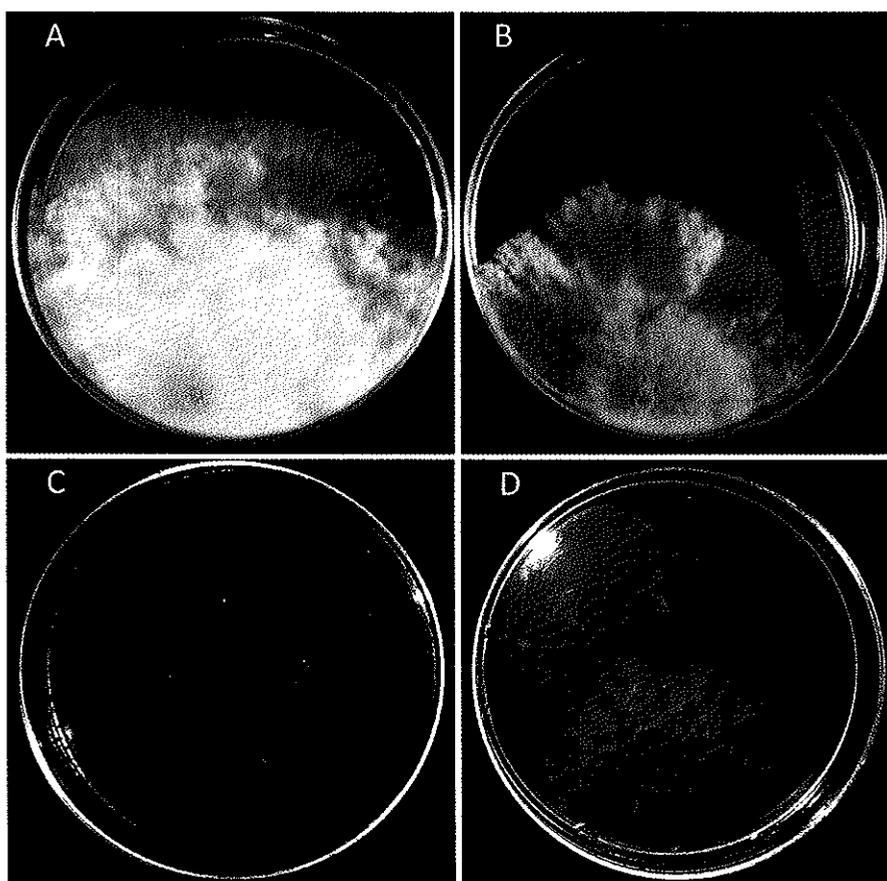


Figura 13. Morfología colonial de *L. theobromae* cepa UCD256Ma, crecida en medio mínimo de Vogel con madera, A) con madera, B) sin madera y sales de Vogel 1X, C) con madera, D) sin madera después de tres días de incubación a 30°C.

IV.2 Microscopía óptica

La observación microscópica reveló diferencias en la ramificación y en la longitud de las hifas. En la presencia de madera se observó un número mayor de ramificaciones por hifa comparadas con el número de ramificaciones observadas en la ausencia de madera. Este comportamiento se observó en ambos medios (MMV y SV) (Figuras 14 y 15). Cuando se utilizó el aumento de 100X, se observó la presencia de múltiples ramificaciones en *L. theobromae* creciendo SV-CM (Figura 16).

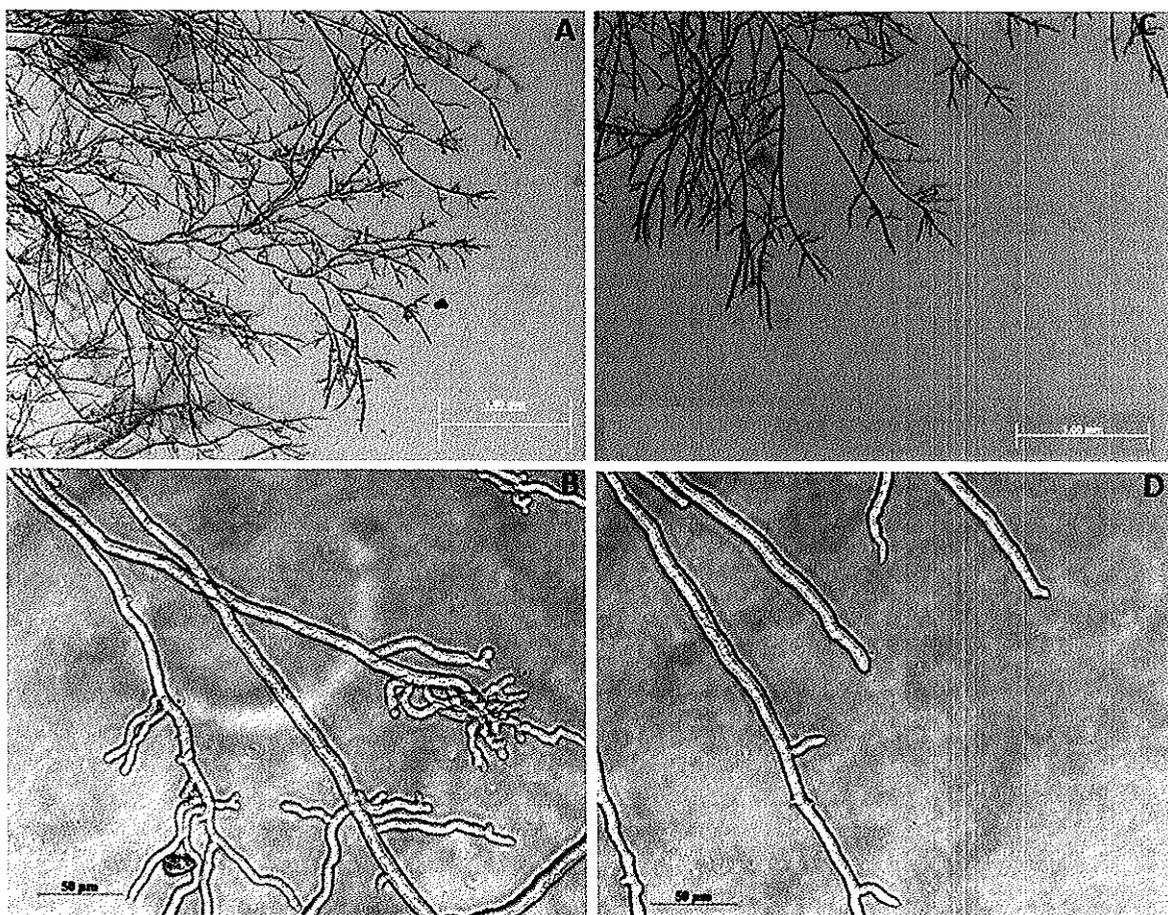


Figura 14. Micrografías del hongo *L. theobromae* cepa UCD256Ma crecido en medio mínimo de Vogel. Crecimiento con madera a una, A) magnitud 20X y B) magnitud 40X. Crecimiento sin madera C) magnitud 20X, D) magnitud 40X. En las cuatro micrografías se puede observar las diferencias en el número de ramificaciones en MMV con o sin madera.

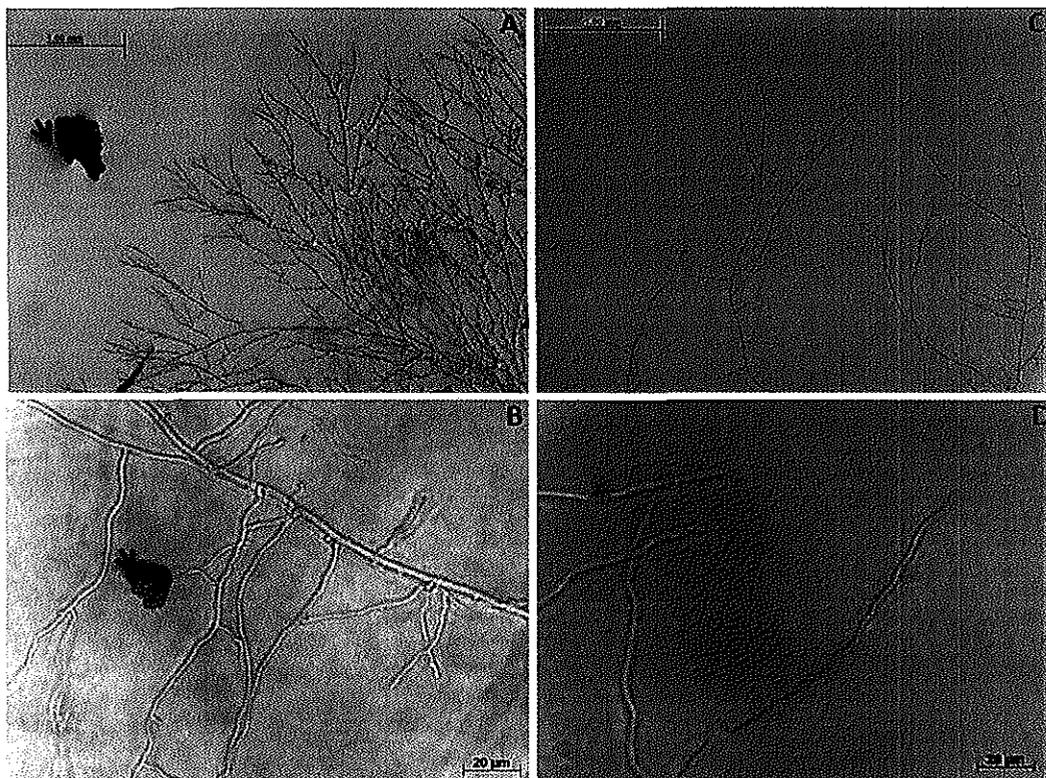


Figura 15. Micrografías de *L. theobromae* cepa UCD256Ma creciendo en sales de Vogel. Crecimiento con madera a una, A) magnitud 20X; B) magnitud 40X. Crecimiento sin madera, C) magnitud 20X, D) magnitud 40X. Flechas negras indican trozos de madera difundidos en el medio. En las cuatro micrografías se puede observar las diferencias en el número de ramificaciones presentes en SV con o sin madera.

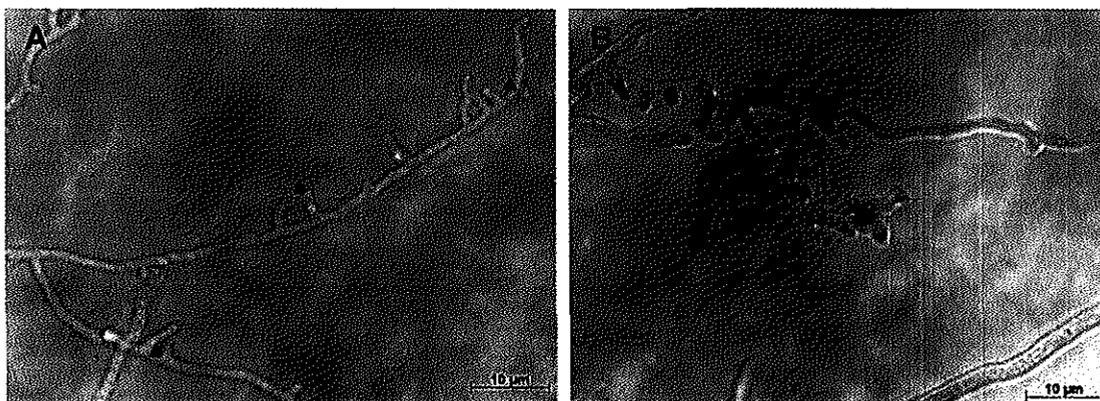


Figura 16. Micrografías del crecimiento de *L. theobromae* cepa UCD256Ma en sales de Vogel en presencia de madera de vid A) y B) magnitud 100X. Las puntas de flecha negra indican los puntos de ramificación.

IV.3 Construcción de una biblioteca de ADNc sustractivo

IV.3.1 Extracción de ARN total

Se aisló el ARN total de *L. theobromae* crecido en presencia y ausencia de madera de vid. La extracción se realizó 24 horas después de los siete días de incubación debido a la necesidad de congelar el micelio obtenido para mejorar el rompimiento celular. Terminada la extracción de ARN total se procedió a verificar su integridad y calidad realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (Figura 17). En el gel se pudo observar el ARN total de ambas condiciones (carriles 2 y 3). Las bandas de mayor intensidad correspondieron al ARN ribosomal 28 y 18S, y el barrido indicó la presencia de ARNm, el cual fue el objeto de interés en este trabajo.

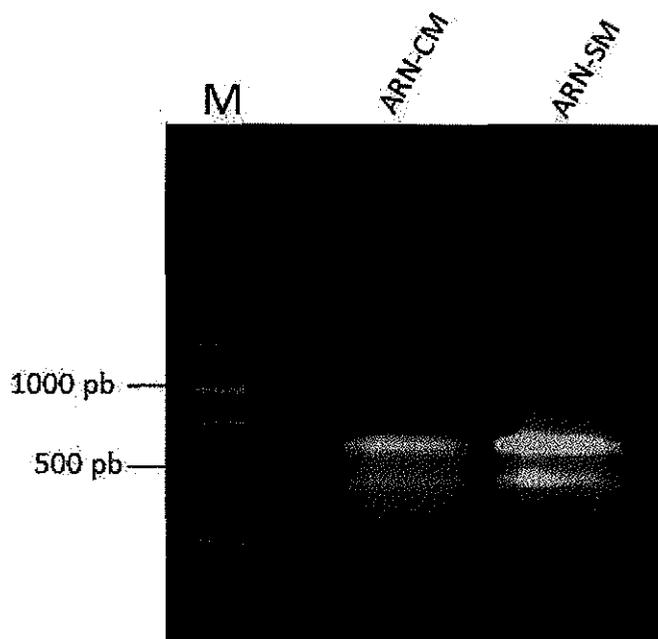


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñida con BrEt (1mg/ml), carril 1 (M), marcador de peso molecular (100pb), carril 2 ARN extraído de la condición con madera (CM) y carril 3 ARN extraído de la condición sin madera (SM). Triángulo ARN ribosomal 28S, y estrella ARN ribosomal 18S.

La concentración de ARN obtenida fue de 1.55 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la condición con madera y de 1.41 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN total en la ausencia de madera. La pureza de ambas extracciones fue 1.9 (ver tabla VI) indicando que las muestras estaban libres de proteínas y de residuos (ej. Fenol) utilizados durante la extracción.

IV.3.2 Purificación de ARN mensajero

Una vez que se confirmó la calidad del ARN total, se procedió a purificar el ARN mensajero (ARNm); durante este proceso la pérdida del ARNm es mayor y su estabilidad es menor. Se logró purificar 0.24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARNm proveniente de micelio crecido en la ausencia de madera y 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ARNm de la condición con madera (ver tabla VI). La calidad de ambas muestras se determinó como buena ya que se estimaron valores de A260/A280 igual a 2.1 para ambos casos.

Tabla VI. Concentraciones obtenidas de ARN total y ARNm procedente de la condición con madera y sin madera.

Muestra	Concentración ARN Total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Pureza	Concentración ARNm ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Pureza
CM	1.98	1.9	0.80	2.1
SM	1.91	1.9	0.24	2.1

IV.3.3 Hibridación sustractiva por supresión (SSH, por sus siglas en inglés).

a) Amplificación del ADNc sustractivo

La construcción de la biblioteca involucró una serie de pasos consecutivos; 1) síntesis de ADNc, 2) digestión con la enzima RsaI, 3) ligación de adaptadores únicamente al ADNc proveniente de la condición con madera (Tester), 4) dos hibridaciones mezclando tester y driver (ADNc de la condición sin madera) y, finalmente 5) la amplificación de los ADNc expresados diferenciablemente. El

producto de esta amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 18). Este gel mostró un barrido a partir de las 800 pb indicando la posible presencia de secuencias expresadas diferencialmente.

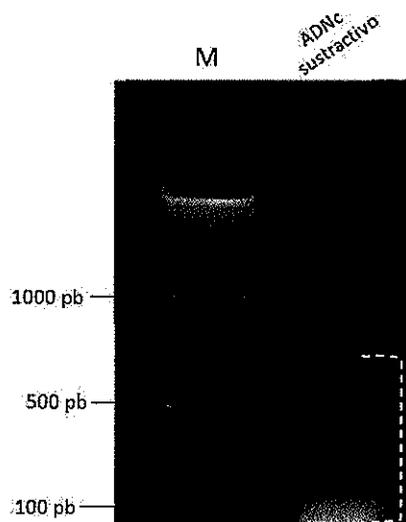


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con BrEt (0.1µg/ml), carril 1 (M) marcador de peso molecular (1kb), carril 2 ADNc diferencial amplificado. La línea punteada indica la presencia de fragmentos amplificados por PCR.

IV.3.4 Clonación del ADNc sustractivo

a) Ligación y transformación

Una vez que se lograron amplificar los ADNc sustractivos se prosiguió a ligar el producto de PCR directamente al vector pCR 2.1. Para la ligación se usaron 48µg del producto de PCR para hacer una ligación en una relación molar 1:1 (vector: inserto). Al finalizar, se realizó una transformación en células calcio competentes, TOP10, dando como resultado un total de 72 colonias blancas.

IV.3.3 Comprobación de la clonación

a) PCR de colonia

Con el fin de verificar si las colonias seleccionadas contenían algún inserto, se realizó una PCR de colonia usando los oligonucleótidos M13F y M13R. Estos oligonucleótidos hibridan a una distancia de 70 y 94 pb a cada uno de los extremos del punto de inserción del fragmento de ADNc, debido a esto, se seleccionaron como clonas positivas sólo aquellas que presentaron una amplificación mayor a 200pb.

Los productos del PCR de colonia se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 %. Con el apoyo visual de estos geles se seleccionaron sólo las clonas que tenían inserto y de éstas, como algunas presentaban el mismo tamaño, se eligieron 8, debido a que de estas clonas se amplificaron fragmentos por arriba de 200 pb. En la Figura 19 se muestran ejemplos de los fragmentos amplificados por PCR.

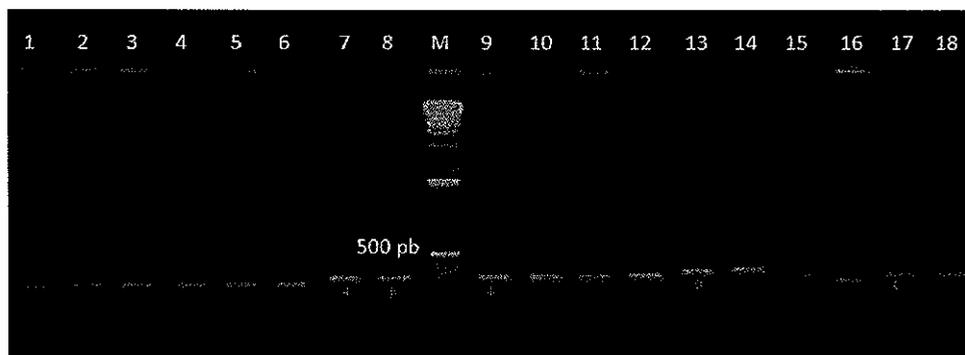


Figura 19. Ejemplos de fragmentos amplificados por PCR de colonias transformadas. Los números en los carriles corresponden al número de clonas analizadas y M el marcador de peso molecular (1kb). Los asteriscos indican las clonas seleccionadas cuyo fragmento amplificado por PCR se encontraban por arriba de 200 pb.

b) Extracción de plásmido de las clonas seleccionadas

Las clonas seleccionadas se crecieron en medio LB con ampicilina (100mg/ml) por 12 horas y se extrajo el plásmido. Las extracciones se visualizaron en geles de agarosa al 1% con el propósito de corroborar la calidad e integridad del plásmido extraído. El gel indicó que el ADN plasmídico era de buena calidad (Figura 20). Finalmente se determinó la concentración del ADN plasmídico obtenida en las 8 clonas (ver tabla VII) para proceder con el análisis de restricción.

Tabla VII. Concentración de DNA plasmídico extraído de las clonas positivas.

No. de clona	Concentración (ng/ul)
7	180
8	225
9	75
13	75
17	230
23	210
26	315
33	80

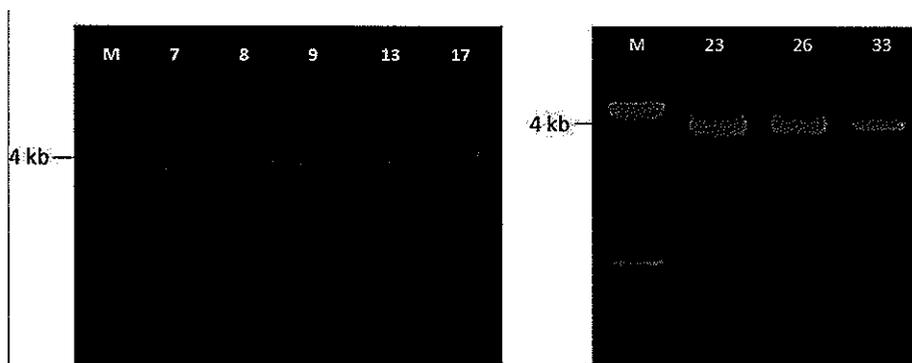


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico extraído de clonas. Seleccionadas por PCR de colonia. Los números arriba de los carriles indican el número de la clona seleccionada y M el marcador molecular (1kb).

c) Análisis de restricción

Para comprobar por segunda vez que se había insertado el ADNc en el vector, se realizó la digestión del plásmido usando la enzima de restricción *EcoRI*. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%, revelando que, de las ocho clonas analizadas, sólo tres presentaban inserto, las clonas 7, 8, y 9 (Figura 21) presentaron un inserto de un tamaño aproximado de 200pb.



Figura 21. Análisis de restricción en gel de agarosa al 1.5% con BrEt (0.1mg/ml). Los carriles 7, 8 y 9, representan a las colonias analizadas marcadas con ese número, y M el marcador de peso molecular (1kb).

IV.4 Secuenciación de clonas y análisis de las secuencias

Los resultados de las secuenciación de las hebras sentido y antisentido de las clonas 7 y 9, no se alinearon correctamente por lo que no fue posible diferenciar las partes correspondientes al vector y a los adaptadores, y se descartaron. El análisis de las secuencias de la clona 8, después de haberse alineado y descartado la parte correspondiente al vector y a los adaptadores, dió como resultado un inserto de 125 pb. El fragmento mostró una similitud del 65% con una enzima extracelular llamada arabinanasa presente en el genoma de *Aspergillus fumigatus* (Figura 22). En la tabla VIII se muestra la secuencia encontrada y los valores resultantes del BLAST el cual fue usado para encontrar las similitudes de las secuencias.

Tabla VIII. Secuencia identificada en la biblioteca de ADNc expresado diferencialmente.

Fragmento	Clona 8
Secuencia	CACTGTCATGCCGTTACGTAGCGTATCGTTGACAGCAAGCCGAATTCTGC AGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCA ATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC
Homología	Arabinanasa Extracelular localizada en el cromosoma 6 de <i>Aspergillus fumigatus</i> .
Query coverage ¹	65%
Max. Ident. ²	100%
Valor de E ³	2x10 ⁻³⁷

¹Es el porcentaje de la longitud de la secuencia introducida, que ha conseguido encontrar en la base de datos.

²Es el porcentaje de identidad que posee la secuencia que se ha introducido con respecto a la secuencia de la base de datos, dentro de la longitud que ha encontrado el programa

³Es un dato estadístico que representa cuanto se parece la secuencia introducida con la que ha encontrado el software. Cuando más se acerque a cero más se parecerán ambas secuencias.

```
>[gb|AAHF01000018.1] [D] Aspergillus fumigatus Af293 chromosome 6 afu1_106, whole genome
shotgun sequence
Length=232723
```

```
Features flanking this part of subject sequence:
41631 bp at 3' side: extracellular arabinanase
```

```
Score = 158 bits (85), Expect = 2e-37
Identities = 85/85 (100%), Gaps = 0/85 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 41 CGAATTCIGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAA 100
|||||
Sbjct 171 CGAATTCIGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAA 112

Query 101 TTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC 125
|||||
Sbjct 111 TTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC 87
```

Figura 22. Resultado de la búsqueda de secuencias en la base de datos de genomas de hongos del NCBI.

V

Discusión

En los últimos años el hongo *Lasiodiplodia theobromae*, junto con otros miembros de la familia Botryosphaeriaceae, ha ganado importancia como patógeno de vid. Sin embargo, existen pocos estudios enfocados a esclarecer los mecanismos que este hongo emplea para infectar a su hospedero, por ello este trabajo se enfocó al estudio *in vitro* del comportamiento y la expresión de genes de *L. theobromae* usando como inductor a la madera de vid.

L. theobromae en ausencia y presencia de madera usando MMV y SV, mostró un mayor número de ramificaciones en su presencia; siendo, el número de ramificaciones mayor en MMV con madera que en SV con madera. Esto puede deberse a que, a diferencia de las SV, el MMV contiene sacarosa, la cual podría ser utilizada por el hongo como primera fuente de carbono. La presencia de fuentes de carbono solubles, tales como glucosa, xilosa, celobiosa, y sacarosa, se ha mostrado que inhibe la utilización simultánea de celulosa en el hongo celulolítico *Myrothecium verrucaria*, que no degrada la celulosa de la madera hasta que ya no es capaz de crecer sobre los azúcares que son una fuente más fácilmente accesible de carbono (Siu y Sinden, 1951). En un estudio previo realizado por Cobos y colaboradores (2010), se reportó que las ramificaciones de *Diplodia seriata* aumentan considerablemente cuando se encuentra en presencia de celulosa, y Obrador-Sánchez (2011) encontró que el número de ramificaciones producidas a partir de esporas germinadas de *L. theobromae* fue mayor en MMV suplementado con madera.

Una característica interesante fue la observación de la presencia de múltiples ramificaciones en SV cuando se suplementó con madera; esto podría deberse a la presencia de componentes presentes en la madera que favorecen el desarrollo del hongo pero se requieren mayores estudios para poder explicar el porque se presentaron. Esta característica de formar mayores ramificaciones podría permitirle al hongo colonizar más rápido el sustrato para obtener los nutrientes.

La biomasa total producida en MMV y SV, ambos suplementados con madera, fue mayor en el primero; esto pudo deberse nuevamente a la presencia de sacarosa en el medio, la cual es una fuente de carbono que es fácilmente asimilable, por lo que el hongo toma ésta como primera fuente de carbono antes de utilizar la pared celular de la madera de vid. Estos resultados coinciden con lo reportado previamente para la misma cepa (Obrador-Sánchez, 2011; Ayllon Gutiérrez y Hernández-Martínez, 2011). Lo novedoso de este trabajo es que se demostró que la presencia de madera en MMV indujo un aumentó de la biomasa producida, por lo que su presencia induce el crecimiento del hongo. En un trabajo previo se demostró que la presencia de sustratos como aserrín de encino y paja de trigo aumentó la producción de biomasa del hongo comestible *Pleurotus eryngii* (Gaitán-Hernández 2005). Así mismo, se encontró que el crecimiento y la producción de biomasa de *Lepista nuda*, un hongo saprófito comestible, cuando se puso en aserrín de encino fue mayor con respecto a bagazo de coco y de caña (Gaitán-Hernández y Báez-Rodríguez, 2008).

En cuanto al crecimiento a las 72 horas, este también aumentó por la presencia de madera en ambos medios. En contraste, Obrador-Sánchez (2011) reportó que no hubo diferencias significativas en el crecimiento de *L. theobromae* en la presencia y ausencia de madera. Las diferencias en los resultados pueden deberse a que el inóculo que Obrador-Sánchez utilizó fueron esporas y la temperatura de incubación fue menor (28 °C), mientras que en este trabajo se partió de micelio y se uso una temperatura óptima de crecimiento del hongo (30 °C).

El comportamiento de *L. theobromae* en la presencia de madera sugiere que la madera de vid no sólo representa una fuente de carbono, sino que también contiene inductores que favorecen el crecimiento del hongo.

El enfoque de este trabajo también fue abordar el estudio de la interacción de *L. theobromae* desde un punto de vista molecular, construyendo una biblioteca de ADNc expresado diferencialmente en presencia de madera. Como resultado se obtuvo la secuencia de un gen candidato. Algunas razones por las cuales se obtuvo sólo una secuencia de ADNc como resultado de las hibridaciones sustractivas son, entre otros, la eficiencia del vector utilizado, ya que aunque había fragmentos entre 100-800pb, el vector pCR2.1 tiene mayor eficiencia de ligado con fragmentos pequeños; por otro lado, a pesar de que en el vector se pudieron ligar secuencias pequeñas, su eficiencia de transformación pudo haber sido baja; otra causa probable fue la presencia de sales en la reacción de ligación ya que se usó el producto directo del PCR, el fabricante (Invitrogen) menciona que esto sólo ocurre cuando se usan volúmenes mayores a 3µl, en este trabajo se usaron 3 µl, con el fin de cumplir con la relación molar (vector : inserto) necesaria para la ligación lo cual aumentó la presencia de sales y por último, la *Taq* polimerasa usada, posiblemente, no fue eficiente en la adición de residuos de adenosina (A) en los extremos 3' de los productos amplificados. Por estas razones, se sugiere que en futuras aplicaciones de la técnica se recuperen y purifiquen las amplificaciones del gel de agarosa antes de proceder a la ligación.

La secuencia de 125 pb que se logró identificar aquí, presentó similitud con una arabinanasa, una enzima extracelular identificada en *Aspergillus*. Las α -L-arabinanasas (EC 3.2.1.) son hemicelulasas accesorias que hidrolizan los enlaces α -L-arabinofuranósicos y que actúan de manera sinérgica con otras glicosil hidrolasas en la degradación total de la hemicelulosa (Margolles-Clark et al., 1996). Por lo cual, en este caso su presencia puede estar relacionada con la degradación de la madera agregada al medio. En trabajos previos se han

identificado genes de hongos filamentosos que codifican para esta enzima (Flipphi et al., 1993; Tatsuju et al., 2005; Nierman et al., 2005; Carapito et al, 2009). Dentro de los múltiples mecanismos de infección que los hongos patógenos emplean, se encuentra la producción de enzimas hidrolíticas. Estas enzimas son consideradas como factores de patogenicidad y/o virulencia (Agrios 2005). Por lo tanto las arabinanasas en hongos filamentosos podrían ser factores de patogenicidad y/o virulencia.

La secuencia del gen que codifica para arabinanasas que se encontró es un fragmento pequeño con respecto al gen completo (~1200pb), esto se debe a que con la técnica de hibridación sustractiva de supresión solamente se obtienen secuencias parciales de los genes, ya que la realización de la misma implica la digestión de ADNc. En trabajos previos en los cuales han utilizado esta técnica para identificar genes expresados diferencialmente para un problema en particular han obtenido secuencias que oscilan entre 45 y 700 bases (Martínez-Llamas, 2005; Poisa-Beiro, 2008; Rodríguez-Pagaza, 2009), por lo cual el fragmento reportado aquí se encuentra dentro de este rango.

En *L. theobromae* se ha encontrado actividad de enzimas como pectinasas (Saldanha et al., 2007; Ayllon-Gutiérrez y Hernández-Martínez, 2011; Velázquez-Liaño y Hernández-Martínez, 2011), poligaracturonasas, xilanasas (Ayllon-Gutiérrez y Hernández-Martínez, 2011; Velázquez-Liaño y Hernández-Martínez, 2011), lacasas (Dekker et al 2007) y celulasas (Umezurike, 1978; Candolfi-Arballo, 2009; Obrador-Sánchez, 2001), sin embargo no se han hecho estudios para evidenciar la actividad de arabinanasas, por lo cual este trabajo es el primero que sugiere que *Lasiodiplodia theobromae* produce arabinanasas, las cuales en conjunto con las otras enzimas hidrolíticas podría participar en la degradación de la pared celular de las plantas hospederas, formando parte de los factores de virulencia o patogenicidad.

Para corroborar que *L. theobromae* es capaz de degradar arabinano, un constituyente de la hemicelulosa es necesario realizar ensayos de actividad enzimática específicos para arabinanasas. Por otra parte para afirmar que la secuencia encontrada en el presente trabajo corresponde a un gen importante en la virulencia y/o patogenicidad de *Lasiodiplodia theobromae* se debe caracterizar el gen completo y realizar metodologías que permitan interrumpir la expresión del gen, con el fin de ver si la ausencia del mismo afecta directamente la capacidad de *Lasiodiplodia theobromae* para infectar o incrementar el daño en el hospedero.

La identificación de genes involucrados en la degradación de la madera de vid; además de ser importante en la contribución del estudio de la patogenicidad y/o virulencia de *L. theobromae*, puede tener una aplicación biotecnológica. Debido a que en los últimos años se ha incrementado el interés en este tipo de enzimas por su rol en la degradación del complejo de lignocelulosa y su aplicación práctica en diversos procesos industriales (Carapito et al., 2009); tales como en el procesamiento de productos agrícolas; en la producción de compuestos medicinales de gran importancia, en el procesamiento y mejoramiento de distintas bebidas de origen frutal, en la producción de bioetanol y en la síntesis de oligosacáridos (Numan y Bhosle, 2006).

VI

Conclusiones

La presencia de madera de vid en medio mínimo de Vogel y sales de Vogel aumenta la producción de biomasa, el índice de ramificaciones y la tasa de crecimiento en *L. theobromae*. Estas diferencias en crecimiento, posiblemente estén asociadas a un cambio en la expresión génica inducida por la madera de vid.

Usando la técnica de hibridación sustractiva de supresión, se logró identificar en *L. theobromae*, una secuencia de 125 pb la cual presentó un 65% de similitud con una arabinanasa de *Aspergillus fumigatus*.

L. theobromae tiene la capacidad de producir al menos una arabinanasa. Esta enzima extracelular al permitir la degradación completa de la hemicelulosa, podría estar relacionada con la patogenicidad y/o virulencia hacia vid.

VII

Literatura citada

Agrios, G. (2005). Plant Pathology. Burlington, Mass, USA, Elsevier Academic Press, 5ta ed., 922 p.

Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D. y Turner, W. B. (1971). Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. Journal of the Chemical Society. Section C: 1623-1627.

Ascunia, J. F.; Eskalen, A. y Gubler, W. (2004). Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. Phytopathologia Mediterranea. 43:66-69.

Ayllón-Gutiérrez, R. R. y Hernández-Martínez, R. (2011). Producción de enzimas hidrolíticas degradadoras de la pared celular vegetal en especies de *Botryosphaeria*. En: U. A. B. C. Memorias del XIV Congreso de Ciencias Agrícolas.

Ballance, G. M., Lamari, L., Kowatsch, R. y Bernier, C. C., (1996) Cloning, expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 35:203-213.

Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H. and St Hardy, G. E. (1996) Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. Applied Microbiology. 23: 93-96.

Barr, M. E. (1972). Preliminary studies on the Dothideales in temperate North America. Contributions to the University of Michigan Herbarium. 9:523-638.

Barron, G.L. (1992). Lignolytic and cellulolytic fungi as parasites and predators. In: Ed. Carroll G. C., Wicklow D. The Fungal Community. Marcel Dekker Inc., New York. 311-326.

Barron, G. L. (2003). Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. Biodiversity. 4:3-9.

- Benito, E. P., Ten Have, A., Van't Klooster, J. W. y Van Kan, J. A. L. (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 104:207-220.
- Black, A. K. y Reddy, C. A. (1991). Cloning and characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179:428-435.
- Boddy, L., Rayner, A. D. M. (1983). Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and a re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytologist*. 94:623-641.
- Bussink, H. J. D., Buxton, F. P. y Visser, J. (1991). Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigensis* genes encoding polygalacturonase II. *Current Genetics*. 19:467-474.
- Candolfi-Arballo, O. (2009). Caracterización de anamorfos de Botryosphaeriaceae asociados a deterioro progresivo en vid (*Vitis vinifera* L.) aislados de la región vitivinícola de Baja California. Tesis de Maestría. CICESE. 98 p.
- Caprari, C., Richter A., Bergmann, C., Lo Cicero, S., Salvi, G., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (1993). Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Mycological Research*. 97:497-505.
- Carapito ,R., Imberty, A., Jeltsch, J. M., Byrns, S. C, Tam, P., Lowary, T. L., Varrot A., Phalip, V. (2009). Molecular Basis of Arabinobio-hydrolase Activity in Phytopathogenic Fungi: crystal structure and catalytic mechanism of *fusarium graminearum* gh93 exo- α -L-arabinanase. *Journal of the Chemical Society*.284(18): 12285-12296.
- Cary, J. W., Brown, R. L., Cleveland, T. E., Whitehead, M. P. y Dean, R. A. (1995). Cloning and characterization of a novel polygalacturonase gene from *Aspergillus parasiticus*. *Gene*. 153:129-133.
- Castillo-Pando, M., Somers, A., Green, C. D., Priest, M., y Sriskanthades, M. (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology*. 30:59-63.

- Centis, S., Dumas, B., Fournier, J., Marolda, M. y Esquerré-Tugayé, M. (1996). Isolation and sequence analysis of *Clpg1*, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Gene*. 170:125-129.
- Cheng, C., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. (1990). Nucleotide sequence of the cellobiohydrolase gene from *Trichoderma viride*. *Nucleic Acids Research*. 18:55-59.
- Cobos, R., Barreiro, C., Mateos, R. M. y Coque, J. J. R. (2010). Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome Science*. 8:46.
- Collins, R. P. y Sledjeski, W. F. (1960). Pectolytic enzymes produced by *Botryosphaeria ribis* and *Penicillium italicum*. *Mycology*. 52:455-459.
- Covert, S. F., Van den Wymelenberg, A. y Cullen, D. (1992). Structure, organization, and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2168-2175.
- De Groot, P. W., Basten, D. E., Sonnenberg, A., Van Griensven, L. J., Visser, J. y Schaap, P. J. (1998). An endo-1, 4- β -xylanase-encoding gene from *Agaricus bisporus* is regulated by compost specific factors. *Journal of Molecular Biology*. 277:273-284.
- Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., Giese, E. C., Godoy, S. D. S. y Covizzi, L. G. (2007). Influence of nutrients on enhancing laccase production by "*Botryosphaeria rhodina*" MAMB-05. *International Microbiology*. 10(3):177-186.
- Denman, S., Crous P. W., Taylor J. E., Kang J. C., Pascoe I. y Wingfield M. J. (2000). An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*. 45:129-140.
- Di Marco, S., Mazzulo, A., Calzarano, F. y Cesari, A. (2000). The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*. 39:232-240.
- Diatchenko, L., Chenchik, A., y Siebert, P. (1998). Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A+) or total RNA. En *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. Ed. Siebert, P. y Larrick, J. (BioTechniques Books, MA), 213-239 p.

Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. y Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 12(9):6025-6030.

Djoukeng, J., Polli, S., Larignon, P. (2009). Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*. 124(2):303-308.

Dubos, B., Bugaret, Y., Bulit J. y Roudet, J. (1983). Maladies du bois: symptomes et méthodes de lutte. *Phytoma*. 344(1):16-19.

Edwards, J. y Pascoe, I.G. (2004). Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology*. 33:273-279.

Evidente, A., Punzo, B., Andolfi, A., Cimmino, A., Melck, D., y Luque, J. (2010). Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia Mediterranea*. 49: 74-79

Fengel D., y Wegener G. (1989). *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Segunda Edición. De Gruyter, Berlin. 613 p.

Flipphi, M. J. A., Panneman, P., van der Veen, P., Visser, J. y de Graaff, L. H. (1993). Molecular cloning, expression and structure of the endo-1,5- α -L-arabinase gene of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40(2):318-326.

Florence, E. J. M., Gnanaharan, R., Singh, P. A. y Sharma, J. K. (2002). Weight Loss and Cell Wall Degradation in Rubberwood Caused by Sapstain Fungus *Botryodiplodia theobromae*. *Holzforschung*. 56(3):225-228.

Flores-Vindas, E. (1999). *La Planta. Estructura y función*. Vol. 1. San José, Costa Rica. Libro Universitario Regional (LUR). 367 p.

Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P. y Fèvre, M. (1995). Characterization of a multigene family encoding endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Genetics*. 29:96-99.

Gaitán-Hernández, R. y Báez-Rodríguez, I. (2008). Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda*, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. *Revista Mexicana de Micología*. 26:41-49.

- Gaitán-Hernández, R., (2005). Evaluación *in vitro* del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología*. 21:77-84.
- Gao, S., Choi, G. H., Shain, L. y Nuss, D. L. (1996). Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major *in vitro* endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:1984-1990.
- Gola, G., Negri, G. y Cappelletti, C. (1965). Tratado de botánica. Barcelona. España. LABOR. Tercera Edición. 1957p.
- Graniti, A., Surico G. y Mugnai L. (2000). Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases. *Phytopathologia Mediterranea*. 39:16-20.
- Grasso, S. y Magnano Di San Lio, G. (1975). Infections of *Cylindrocarpon obtusisporum* on grapevines in Sicily. *Vitis*. 14: 36-39.
- Green, F., Kuster, T. A. y Highley, T.L. (1996). Pectin degradation during colonization of wood by brown rot fungi. *Recent Research Developments in Plant Pathology*. 1: 83-93.
- Gubler, W., Rolshausen, P., Trovillase, F., Úrbez- Torres, J. y Voegel, T. (2005). Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery Vineyard*. January/February. 6-25 p.
- Halleen, F., Fourie P. H. y Crous P. W., (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*. 45:55-67.
- Hallen, P.H, Fourie, P.H., y Crous P.W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology*. 56:637-645.
- Hattaka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-Rot fungi: production and role in lignin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Microbiology Reviews*. 13:125-135.
- Howlett, B.J. (2006). Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:371-375.
- Hutchison, L. T. y Barron, G. L. (1997). Parasitism of pollen as a nutritional source for lignicolous Basidiomycota and other fungi. *Mycological Research*. 101:191-194.

- Idnurm A, y Howlett B. J. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*. 2:241-255.
- Izco, J., Barreno, E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, A., Fernández, F., Gallardo, T., Izco, J., Limona, X., Prada, C., Talavera, S. y Valdés, B. (2004). *Botánica*. Madrid, España. McGraw-Hill-Interamericana. Segunda Edición. 906 p.
- Kimura, T., Ito, J., Kawano, A., Makino, T., Kondo, H., Karita, S., Sakka, K. y Ohmiya, K. (2000). Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* spp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 40(64):1230-1237.
- Kimura, Y., Asada, Y., Oka, T. y Kuwahara, M. (1991). Molecular analysis of a *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35: 510-514.
- Kitamoto, N., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K. y Tsukagoshi, N. (1993). Structural features of a polygalacturonase gene cloned from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 111: 37-42.
- Koch, A., Weigel, C. T. y Schulz, G. (1993). Cloning, sequencing, and heterologous expression of a cellulase-encoding cDNA (cbh1) from *Penicillium janthinellum*. *Gene* 124:57-65.
- Kuntzmann, P., Villaume, S. y Bertsch, C. (2009). Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard. *Phytopathologia Mediterranea*. 48(1):150-154.
- Lehoczky, J. (1974). Black dead arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 9:319-327.
- Lu, S., Lyngholm, L., Yang, G., Bronson, G., Yoder, O. C. y Turgeon, B. G. (1994). Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:12649-12653.
- Maia-Saraiva, M.R. (2009). Enzimas extracelulares de fungos da família Botryosphaeriaceae. Tesis de Maestría. Universidad de Aveiro. 102 p.
- Maluta, D. R. y Larignon, P. (1991). Pied-noir: mieux vaut prévenir. *Viticulture* 11: 71-72.

Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Nakari-Setälä, T. y Penttilä, M., (1996). Cloning of genes encoding α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology. 62:3840-3846.

Martínez-Llamas, M. (2005). Implicaciones de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y las células T en la generación de variantes metastásicas en un modelo tumoral murino. Tesis de doctorado. Universidad de Granada. 196p.

Mohali, S., Burgess, T. I. y Wingfield, M. J. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. Forest Pathology. 35:385-396.

Nierman, W. C., Wortman, J. R., Kim, H. S., Chen, D., Fedorova, N., Feldblyum, T. V., Haas, B., Huang, J., Khouri H., Kulkarni, R., Lu, C., Majoros, W. H., Mohamoud, Y., Mulligan, S., Paulsen, I., Pertea M., Ronning, C.M., Salzberg, S. L., Weidman, J., White, O., Fraser, C., Pain, A., Berriman, M., Collins, M., Davies, R., Fosker, N., Fraser, A., Goble, A., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Harris, D., Humphray, S., Lord, A., Murphy, L., O'Neil, S., Price, C., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.-A., Renauld, H., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Woodward, J., Hall, N., Barrell, B., Anderson, M. J., Bowyer, P., Pritchard, B. L., Robson, G.D., Denning, D. W., Arroyo, J., Bermejo, C., Molina, M., Rodríguez-Peña, J. M., Abe, K., Gomi, K., Archer, D. B., Dyer, P. S., Bennett, J., Coulsen, R., Farman, M., Li, W., Fischer, R., Konzack, S., García, J.L., Peñalva, M. A., Córdoba, S. Rodríguez, D., Sánchez-Ferrero, J. C., García, M. J., Jiménez, J., Sanchez, M., Aldana, C. R. Vazquez, D., Goldman, G. H., Haas, H., Horiuchi, H., Keller, N., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Kumagai, T., Asai, K., Lafton, A., Latgé, J.-P., Mouyna, I., Tekaia, F., May, G. S., Miller, B. L., Monod, M., Reichard, U., Takeuchi, M., Turner, G., Yu, J.-H., Galagan, J. E., y Machida, M. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature. 438:1151-1156.

Numan M.T., y Bhosle N.B. (2006): α -L-Arabinofuranosidasas: the potential applications in biotechnology. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 33:247-260.

Obrador-Sánchez, J.A. (2011). Comportamiento de *Botryosphaeria* spp. en presencia de madera de vid: Inicio de la colonización y características microscópicas. Tesis de Maestría. CICESE. 125 p.

OIV, (2004). Comunicado sobre situación del sector vitivinícola mundial en 2004. Disponible en:

http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/Stat_2004_definitif_ES.pdf Acceso el 01 de Febrero del 2012.

OIV, (2005). C Comunicado sobre situación del sector vitivinícola mundial en 2005. Disponible en:

http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/Stat_2005_definitif_ES.pdf Acceso el 01 de Febrero del 2012.

Panaccione, D. G., Scott-Craig, J. S., Pocard, J.-A. y Walton, J. D. (1992). A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:6590-6594.

Pascoe, I. (1998). Trunk diseases of grapevines, perspectives from a tour of California. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 417:68-71.

Pearson, R. y Goheen, A. (1988). *Compendium of grape diseases*. St. Paul, Nuevo México, USA. APS Press. Tercera Edición. 121 p.

Pérez-Marín, J. (2001). Como reconocer y controlar las enfermedades del viñedo. *Vida rural*. 121:33-37.

Phillips, A. J. L. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*. 41:3-18.

Poisa-Beiro, L. (2008). Genes implicados en la respuesta de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) frente a nodavirus. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. 223 p.

Pottinger, B., Stewart, A., Carpenter, M. y Ridgway, H. J. (2002). Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*. 41: 199-211.

Proctor, R. H., Hohn, T. M. y McCormick, S. P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8:593-601.

Punithalingam, E. (1980). *Plant diseases attributed to Botryodiplodia theobromae* Ed. J. Cramer, Vaduz. 123 p.

Raguz, S., Yague, E., Wood, D.A. y Thurston, C.F. (1992). Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. *Gene* 119:183-190.

Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A. y Oliveira, H. (2006). Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea*. 45:93-100.

Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., y Phillips, A. (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*. 39:76-79.

Reymond, P., Deleage, G., Rasclé, C. y Fevre, M. (1994). Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Gene*. 146:233-237

Rodríguez-Pagaza, Y. (2009). Sobrevivencia de micelio y genes asociados a la germinación no errumpente de *Sclerotium cepivorum* BERK. Tesis de doctorado. Colegio de postgraduados. 87 p.

Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (1999). Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology*. 31(1): 223-235.

SAGARPA, (2005). Ocupa México el quinto lugar mundial como exportador de uva de mesa; envió a los mercados internacionales 123 mil 693 toneladas en el 2004 Boletín no. 215/05. México.

Sakamoto, T., Ihara, H., Shibano, A., Nagahiro, H. y Kawasaki, H. (2005). Molecular identification of a cold-adapted endo-arabinanase of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Glycoscience*. 52(4):369-372.

Saldanha, R. L., Garcia, J. E., Dekker R. F. H., Vilas-Boas, L.A. y Barbosa, A.M. (2007). Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:259-264.

Saloheimo, M., Barajas, V., Niku-Paavola, M. L. y Knowles, J. K. (1989). A lignin peroxidase-encoding cDNA from the whiterot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*. *Gene*. 85:343-351.

Schäfer, W. (1994). Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annual Review of Phytopathology*. 32:461-477.

Scheck, H., Vasquez, S., Fogle, D. y Gubler, W. (1998). Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. *California Agriculture*. 52(4):19-23.

Schwarze, F. W. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*. 1:133-170.

Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Cervone, F. y Walton, J. D. (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell*. 2:1191-1200.

Sepúlveda-Betancourt, J. (2009). Distribución geográfica y estadística de los viñedos en Baja California. VI Seminario Internacional de Vitivinicultura. México. 26 p.

SIAP. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (2006). Ministerio de Agricultura de México, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

Sistema Producto Vid (2009). Disponible en: <http://vidyvino.org/>. Acceso el 01 de Febrero del 2012.

Slippers, B. y Wingfield M. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*. 21:90-106.

Smith, H, Wingfield, M. J., Crous, P. W. y Coutinho, T. A. (1996). *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany*. 62:86-88.

Surico, G., Mugnai, L. y Guido, Marchi. (2008). The esca disease complex. Integrated management of diseases caused by fungi. *Phytoplasma and Bacteria*. 3:119-136.

Siu R. G. H y Sinden J. W. (1951). Effects of pH, temperature, and mineral nutrition on cellulolytic fungi. *American Journal of Botany*. 38(4):284-290.

Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliart, C. y Dubin, G-M. (2000). Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 39:156-161.

- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H. y Uozumi, T. (1996). Cloning, sequencing, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var *thermoidea*. *Journal Biotechnology*. 50:137-147.
- Taleb, F. y Radford, A. (1995) The cellulase complex of *Neurospora crassa*: cbh-1 cloning, sequencing and homologies. *Gene*. 161:137-138.
- Tanaka, A., Shiotani, H., Yamamoto, M. y Tsuge, T. (1999). Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12:691-702.
- Taylor, A., Hardy, G., Wood, P., y Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*. 34(2):187-195.
- Teeri, T., Salovuori, I. y Knowles, J. (1983). The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Biotechnology*. 1:696-699.
- Téliz, D., y Valle, P. (1979). *Eutypa dieback* in Mexican vineyards. *Plant Disease*. 63:312-314.
- Umezurike, G. M. (1978). The beta-glucosidase from *Botryodiplodia theobromae*. Mechanism of enzyme-catalysed reactions. *Biochemical Journal*. 179(3):503-507.
- Úrbez-Torres, J. y Gubler, W. (2011). Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology*. 60:261-270.
- Úrbez-Torres, J., Bruez, E., Hurtado, J., and Gubler, W. (2010). Effect of temperature on conidial germination of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Plant Disease*. 94:1476-1484.
- Úrbez-Torres, J., Leavitt G., Guerrero J., Guevara J., y Gubler W. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*. 92:519-529.
- Úrbez-Torres, J., y Gubler, W. (2009). Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*. 93:584-592.

- Úrbez-Torres, J., Battany, M., Bettiga, L., Gispert, C., McGourty, G., Roncoroni, J., Smith, R., Verdegaal, P; y Gubler, W. (2010). Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Disease*. 94(6):717-724.
- Úrbez-Torres, J., Leavitt, G., Voegel, T. y Gubler, W. (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California *Plant Disease*. 90(12):1490-1503.
- USDA, Californian Agricultural Statistics Service (2005). Californian agriculture overview. United States Department of Agriculture.
- van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., y Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycology*. 96:781-798.
- van Niekerk, J. M., Calitz, F.J., Halleen, F. y Fourie P. H. (2010). Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*. 127(3):375-390.
- van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Hallen, P.H. y Crous P.W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. 45:43-54.
- Veiga, T. A. M., Silva, S. C., Archundia-Camacho, F., Filho, E. R., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Silva, M. F. G. F., Müller, M. W. y Lotina-Hennsen, B. (2007). Inhibition of Photophosphorylation and Electron Transport Chain in Thylakoids by Lasiodiplodin, a Natural Product from *Botryosphaeria rhodina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(10):4217-4221.
- Velázquez-Liaño, L. R. y Hernandez-Martinez, R. (2011). Producción de enzimas hidrolíticas por hongos de la madera de vid. En: U. A. B. C. Memorias del XIV Congreso de Ciencias Agrícolas.
- Venkatasubbaiah, P., Chilton, W. S. (1990). Phytotoxins of *Botryosphaeria obtusa*. *Journal of Natural Products*. 53(6):1628-1630.
- Venkatasubbaiah, P., Sutton, T. B., y Chilton, W. S. (1991). Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot. *Phytopathology*. 81(3):243-247.
- Whitehead M. P., Sheih M. T., Cleveland T. E., Cary J. W. y Dean R. A. (1995). Isolation and characterization of polygalacturonase genes (*pecA* and *pecB*) from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:3316-3322.

Wu, S. C., Kauffmann, S., Darvill, A. G. y Albersheim, P. (1995). Purification, cloning and characterization of two xylanases from *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8:506-514.

Yang, G., Rose, M. S., Turgeon, B. G. y Yoder, O. C. (1996). A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. *Plant Cell*. 8:2139-2150.

Yun, S. H., Turgeon, B. G. y Yoder, O. C. (1998). REMI-induced mutants of *Mycosphaerella zeae-maydis* lacking the polyketide PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52:53-66.

Anexos

1. Extracción de ARN total (Trizol)

Para llevar a cabo una extracción exitosa es necesario mantener el área de trabajo en óptimas condiciones, y el material a utilizar debe estar certificado como libre de RNAsas. Antes de iniciar deben limpiarse las superficies y equipos con una solución que inactive las RNAsas, usar guantes y procurar que estos siempre estén limpios (cambiar constantemente de ser necesario).

1. Triturar el micelio congelado en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y blanco (5 g aprox.).
Nota: Resuspender una pequeña porción de esté polvo, si esta bien molido se disolverá fácilmente, de no ser así seguir triturando el micelio.
2. Resuspender los 5 gramos en 10 a 15 ml de trizol.
Nota: mezclar poco a poco el micelio pulverizado, para evitar que la mezcla se sature.
3. Incubar la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de trizol y agitar vigorosamente por 15 segundos.
5. Incubar de 2-3 min a temperatura ambiente y centrifugar a 5000 rpm por 30 minutos a 4 °C.
6. Colectar la fase acuosa (contiene ARN) y transferir a un tubo nuevo.

Nota: no es necesario recuperar toda la fase esto ayuda a evitar pasar residuos.

7. Adicionar 0.5 ml de isopropanol por cada mililitro de trizol e incubar la muestra a temperatura ambiente de 10-30 min.
8. Centrifugar a 5000 rpm por 25 min a 4 °C y descartar el sobrenadante.
9. Adicionar 1ml de etanol al 75% frio y agitar cuidadosamente evitando que se destruya el sedimento celular.
10. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min y descartar sobrenadante.
11. Secar la pastilla de 5-10 min.

Nota: durante este tiempo estar al pendiente de que el sedimento celular no se torne transparente, de ser así este no podrá diluirse en agua DEPC.

12. Disolver el ARN con 100-150 ml de agua DEPC.
13. Almacenar a -80 °C/-20 °C ó utilizar inmediatamente.

2. Purificación de ARNm (Oligotex mRNA mini Kit)

Antes de iniciar con la purificación de ARNm a partir de ARN total se debe: 1) calentar la suspensión de Oligotex a 37 °C en un bloque térmico o en baño maría, mezclar muy bien, y mantenerlo a temperatura ambiente y 2) calentar un bloque térmico a 70 °C y mantener ahí el buffer OEB.

1. Determinar la concentración del ARN total (0.19 mg/100 µl) y no usar más de 1 mg. Pasar el ARN total a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y ajustar el volumen a 250 µl con agua libre de RNAsas.
2. Agregar 250 µl y 15 µl de la suspensión de Oligotex y mezclar por pipeteo.
3. Incubar la muestra por tres minutos a 70 °C en un bloque térmico (en este paso se destruyen las estructuras secundarias del ARN).
4. Retirar la muestra y dejar a temperatura ambiente por 10 min. (Este paso se lleva a cabo la hibridación entre el oligo dT30 del Oligotex y la cola de poli-A del ARNm).
5. Centrifugar por dos minutos a máxima velocidad y remover cuidadosamente el sobrenadante por pipeteo.
Nota: Guardar el sobrenadante hasta cerciorarse que la unión y elución de ARNm se efectuó satisfactoriamente.
6. Resuspender la pastilla en 400 µl de buffer OW2 mediante pipeteo y pasar a la columna. Centrifugar por un minuto a máxima velocidad.
7. Transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y agregar 400 µl de buffer OW2. Centrifugar a máxima velocidad por un minuto y descartar el sobrenadante.
8. Transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Agregar 20 µl de buffer OEB caliente (a 70 °C), pipetear de arriba a abajo tres o cuatro veces para resuspender la resina y centrifugar por un minuto a máxima velocidad.
9. Almacenar a -80 °C/-20 °C

3. Biblioteca de ADNc de genes expresados diferencialmente. (PCR-select cDNA Subtraction Kit).

En todas las tablas se conservaron los nombres en inglés de los reactivos para evitar confusión

A) Síntesis de ADNc de cadena sencilla.

1. Para cada driver (SM) y tester (CM) en un tubo de microcentrífuga estéril de 0.5 ml (no utilizar un tubo de poliestireno), combinar los siguientes componentes:

	Por reacción
ARNm (2 µg)	2-4 µl*
cDNA Synthesis Primer (10 µM)	1 µl

*Si es necesario, agregar agua estéril hasta un volumen final de 5 µl.

2. Incubar a 70 °C durante 2 minutos en un termociclador, dejar enfriar en hielo durante 2 min y centrifugar brevemente.
3. Agregar lo siguiente a cada reacción:

	Por reacción
5X First-Strand Buffer	2 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
Agua estéril	1 µl
AMV Transcriptasa Reversa (20 unidades/µl)	1 µl

4. Mezclar por pipeteo y centrifugar suavemente.
5. Incubar los tubos a 42 °C durante 1.5 horas en una incubadora de aire.
Nota: No utilizar un baño de agua o termociclador. La evaporación puede reducir el volumen de reacción de la mezcla, y por lo tanto, la eficiencia de reacción.
6. Colocar en el hielo para terminar la síntesis de ADNc de cadena sencilla y de inmediato proceder a la (síntesis de segunda cadena).

B) Síntesis de ADNc de cadena doble.

Realizar este procedimiento para ADNc de cadena sencilla de la condición con madera (tester) y ADNc sin madera (driver).

1. Agregue los siguientes componentes a los tubos con 10 μ l de la primera síntesis.

	Por reacción
Agua estéril	48.4 μ l
5X Second-Strand Buffer	16.0 μ l
dNTP Mix (10 mM)	1.6 μ l
20X Second-Strand Enzyme Cocktail	4.0 μ l

2. Mezclar el contenido y centrifugar brevemente. El volumen final debe ser de 80 μ l.
3. Incubar a 16 °C durante 2 horas en un baño de agua o termociclador.
4. Añadir 2 μ l (6 unidades) de DNA T4 polimerasa y mezclar por pipeteo.
5. Incubar a 16 °C durante 30 minutos en un baño de agua o termociclador.
6. Añadir 4 μ l de EDTA 20X/glucógeno y mezclar por pipeteo, para terminar la segunda síntesis.
7. Añadir 100 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar con Un agitador tipo vórtex o mezclador de vórtice y centrifugar a 14,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (temperatura para separar las fases).
8. Recoger cuidadosamente la capa superior acuosa y colocar en un nuevo tubo de microcentrífuga de 0.5 ml.
9. Añadir 100 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y repetir pasos 8 y 9.
10. Añadir 40 μ l de 4 M Acetato de amonio (NH_4OAc) y 300 μ l de etanol al 95%.
Nota: Proceder inmediatamente con la precipitación. No guardar los tubos a -20 °C, la exposición prolongada a esta temperatura puede precipitar sales no deseadas.
11. Mezclar bien y centrifugar a 14.000 rpm durante 20 min.

12. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender la pastilla con 500 μ l de etanol al 80%.
13. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 min.
14. Eliminar el sobrenadante y dejar secar al aire el precipitado durante 10 minutos para evaporar el etanol residual.
15. Disolver el precipitado en 5.5 μ l de H₂O estéril.

C) Digestión con *Rsa* I

Realizar el siguiente procedimiento para cada ADNc (CM y SM). Este paso genera cortes romos que son óptimos para la sustracción y necesarios para la ligación de los adaptadores.

1. Añadir los siguientes reactivos:

	Por reacción
ADNc	43.5 μ l
10X <i>Rsa</i> I Restriction Buffer	5.0 μ l
<i>Rsa</i> I (10 units/ μ l)	1.5 μ l

2. Mezclar centrifugar brevemente e incubar a 37 °C durante 1.5 horas.
3. Añadir 2.5 μ l de EDTA 20X/glucógeno y mezclar por pipeteo, para terminar la reacción.
4. Añadir 50 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar con Un agitador tipo vórtex o mezclador de vórtice y centrifugar a 14,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (temperatura para separar las fases).
5. Recoger cuidadosamente la capa superior acuosa y colocar en un nuevo tubo de microcentrífuga de 0.5 ml.
6. Añadir 50 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y repetir los pasos 8 y 9.
7. Añadir 25 μ l de 4 M NH₄OAc y 187.5 μ l de etanol al 95%.

Nota: Proceder inmediatamente con la precipitación. No guardar los tubos a -20 °C. La exposición prolongada a esta temperatura puede precipitar sales no deseadas.

8. Mezclar bien y centrifugar a 14,000 rpm durante 20 min.
9. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender la pastilla con 200 µl de etanol al 80%.
10. Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 min.
11. Eliminar el sobrenadante y dejar secar al aire el precipitado durante 10 minutos para evaporar el etanol residual.
12. Disolver el precipitado en 5.5 µl de H₂O estéril.

D) Ligación de los adaptadores

Los adaptadores 1 y 2R, solo se ligan al ADNc digerido proveniente de la condición con madera (Tester).

1. Diluir 1 µl del ADNc digerido (sección C) con 5µl de agua estéril.
2. Preparar una mezcla principal de ligación combinando los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga de 0.5 ml.

	Por reacción
Agua estéril	3 µl
5X Ligation Buffer	2 µl
T4 DNA Ligase (400 unidades/µl)	1 µl

3. Combinar en tubos de 0.5 ml de microcentrífuga los reactivos de la siguiente tabla siguiendo el orden mostrado. Mezclar de arriba a abajo por pipeteo.

	Tubo 1 (Tester 1-1)	Tubo 2 (Tester 1-2)
ADNc diluido (paso 1)	2 µl	2µl
Adaptador 1(10 µM)	2 µl	-
Adaptador 2R (10 µM)	-	2 µl
Mezcla principal (paso 2)	6 µl	6 µl
Volumen final	10 µl	10 µl

4. Centrifugar brevemente e incubar a 16 °C toda la noche.
5. Añadir 1 µl de mezcla de EDTA/GLYCOGEN para parar la reacción de ligación.
6. Calentar las muestras a 72 °C durante 5 minutos para inactivar las ligasas.
7. Centrifugar brevemente los tubos.
8. Almacenar las muestras a -20°C

E) Primera hibridación

Antes de iniciar con la hibridación, debe mantenerse el Buffer de hibridación 4X a temperatura ambiente al menos 20 min. Verificar si hay precipitados, de ser así calentar el buffer a 37°C por 10 min para disolverlos.

1. En un tubo de 0.5 ml combinar los siguientes reactivos:

	Hibridación Adaptador 1	Hibridación Adaptador 2R
ADNc digerido driver (sección C)	1.5 µl	1.5 µl
Producto de ligación del adaptador 1 (tester 1-1)	1.5 µl	-
Producto de ligación del adaptador 2R (tester 1-2)	-	1.5 µl
Buffer de hibridación 4X	1 µl	1 µl
Volumen final	4 µl	4 µl

2. En un termociclador incubar las muestras a 98 °C por 1.5 min (Desnaturalización). Incubar a 68°C por 8 horas y proceder inmediatamente a la siguiente sección.

Nota: la incubación no debe de exceder de 12 horas.

F) Segunda hibridación

Mezclar las dos muestras de la primera hibridación y agregar el ADNc driver desnaturalizado fresco con el fin de enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente.

Importante: No desnaturalizar las muestras de la primera hibridación y no removerlas del termociclador por periodos largos, remover sólo hasta agregar el ADNc driver desnaturalizado.

1. Agregar los siguientes reactivos en un tubo estéril:

	por reacción
ADNc Driver (Sección C)	1 μ l
Buffer de hibridación 4X	1 μ l
Agua estéril	2 μ l

2. Agregar 1 μ L de esta mezcla en un tubo para centrifuga de 0.5 ml e incubar a 98 °C por 1.5 minutos en un termociclador.
3. Remover el tubo del termociclador y mezclarlo con las muestras de hibridación 1 y 2. Centrifugar brevemente si es necesario.
4. Incubar la reacción a 68 °C toda la noche.
5. Agregar 10 μ l del buffer de dilución y mezclar por pipeteo.
6. Calendar a 68 °C por 7 min en un termociclador.
7. Almacenar a -20 °C.

G) Amplificación por PCR

1. Agregar 3 μ l de la reacción resultante de la segunda hibridación a un tubo estéril de 0.2 ml
2. Preparar la mezcla madre, mezclando los componentes de la siguiente tabla:

	Por reacción
Agua estéril	17.5 μ l
10X PCR reaction buffer	2.5 μ l
dNTP mix (10 μ M)	0.5 μ l
PCR primer 1 (0 μ M)	1.0 μ l
50X Advantage cDNA Polymerasa Mix	0.5 μ l
Volumen total	22 μ l

3. Mezclar muy bien y centrifugar brevemente.
4. Agregar 22 μ l de la mezcla madre al tubo del paso 1.
5. Colocar la muestra en el termociclador y programar los siguientes ciclos:

Paso	No. de ciclos	Temperatura°C	Tiempo (min:seg)
1*	1	75	05:00
2	1	94	00:25
		94	00:10
3	30	66	00:30
		72	01:30
4	1	72	05:00

*Extensión de adaptadores.

4. Transformación de células competentes

1. Centrifugar brevemente los tubos que contienen las reacciones de ligación.
2. Transferir 5 μ l del producto de ligación a tubos de centrifuga de 1.5 ml.
3. Descongelar en hielo las células competentes de *Escherichia coli* TOP 10 (mantenidas a -80 °C).
4. Lentamente, transferir 50 μ l de la suspensión celular a cada uno de los tubos que contiene la reacción de ligación, y mezclar cuidadosamente el contenido con la punta de la pipeta (movimientos circulares) y mantener en hielo durante 30 min.
5. Calentar a 42 °C durante dos minutos, y colocar en hielo inmediatamente durante 2 min (choque térmico).
6. Tras la incubación en hielo, añadir a cada tubo 900 μ l de medio LB a temperatura ambiente e incubar los tubos durante una hora a 37 °C en agitación a 200 rpm.
7. Transcurrido el tiempo, centrifugar los tubos a 13,000 rpm y retirar los 850 μ l de medio LB e inocular el resto en cajas petri de LB con 100 mg/ml de ampicilina y X-Gal a 40 μ g/ml.
8. Incubar las cajas a 37 °C durante 12 horas.
9. Para mejorar la diferenciación entre las colonias azules y las blancas, Mantener las cajas a 4 °C por dos horas.

5. Extracción de ADN plasmídico (QIAprep Spin Miniprep Kit)

1. Transferir 1.5 ml de medio LB de un cultivo que contiene la colonia transformada crecida en el antibiótico adecuado por toda la noche a un tubo de 1.5 ml, centrifugar por 10 min a 13,000 rpm y retirar lo más que se pueda del sobrenadante.
2. Resuspender la pastilla celular en 250 μ l de buffer P1.
3. Agregar 250 μ l de buffer P2 e invertir el tubo 4-6 veces para mezclar el contenido.
4. Agregar 350 μ l de buffer N3 y mezclar todo invirtiendo suavemente el tubo de 4-6 veces, centrifugar durante 10 min a 13,000 rpm, y transferir sobrenadante a una columna QIAprep colocada sobre un tubo colector.
5. Centrifugar nuevamente durante 10 min a 13,000 rpm y descartar el contenido del tubo colector para reusarlo.
6. Agregar a la columna 0.5 ml de buffer PB y centrifugar durante un minuto a 13,000 rpm.
7. Lavar la columna añadiendo 0.75 ml del buffer PE y centrifugar durante 1 min a 13 000 rpm.
8. Finalmente, pasar la columna a un tubo limpio. Agregar con 25 μ l del buffer EB (de elución) y esperar 5 min. Centrifugar a 13,000 rpm durante un minuto.

5. Medios de cultivos y soluciones

A) Medio mínimo de Vogel

Reactivo	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	10 ml
Agar	7.5 gr
Sacarosa	10 gr
Agua destilada	Aforar a 500 ml

Mezclar en un frasco resistente al calor de 1000 ml y esterilizar a 120 °C y 15 atm de presión por 20 min.

B) Medio mínimo de Vogel Madera

Reactivo	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	10 ml
Agar	7.5 gr
Sacarosa	10 gr
Madera molida	1gr/25 ml de medio
Agua destilada	Aforar a 500 ml

Mezclar en un frasco resistente al calor de 1000 ml y esterilizar a 120 °C y 15 atm de presión por 20 min.

C) Sales de Vogel 1X

Reactivo	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	10 ml
Agar	7.5 gr
Sacarosa	10 gr
Agua destilada	Aforar a 500 ml

Mezclar en un frasco resistente al calor de 1000 ml y esterilizar a 120 °C y 15 atm de presión por 20 min.

D) Sales de Vogel 1X Madera

Reactivo	Cantidad
Sales de Vogel 50 X	10 ml
Agar	7.5 gr
Sacarosa	10 gr
Madera molida	1gr/25 ml de medio
Agua destilada	Aforar a 500 ml

Mezclar en un frasco resistente al calor de 1000 ml y esterilizar a 120 °C y 15 atm de presión por 20 min.

E) Sales de Vogel 50X (Un litro)

Reactivo	Cantidad
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$	150.0g
KH_2PO_4 , anhídrido	250.0g
NH_4NO_3 , anhídrido	100.0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.0g
Elementos traza	5.0ml
Biotina (0.1 mg/ml)	2.5 ml
Cloroformo	2.0ml

F) Elementos traza para sales de Vogel (100ml)

Reactivo	Cantidad
Acido cítrico $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$	5.0g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25g
$\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	0.05g
H_3BO_3 , anhídrido	0.05g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05g
Cloroformo	1.0ml

G) Medio Luria Bertani (LB)

Reactivo	Medio liquido	Medio solido
	Cantidad (gr)	Cantidad (gr)
Bacto triptona	10	10
Extracto de levadura	5	5
Cloruro de sodio	10	10
Agar	—	15
Agua destilada	Aforar a un litro	Aforar a un litro

Esterilizar a 120 °C y 15 atm de presión por 20 min.

H) solución TAE 50x

Reactivo	Cantidad
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
Na_2 -EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
Agua destilada	Aforar a un litro