

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**VARIABILIDAD EN AISLAMIENTOS DE
Sclerotium cepivorum Berk. Y SU RELACIÓN
CON ARN DE CADENA DOBLE**

**TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**



**PRESENTA
NOEL REYES PÉREZ**

Chapingo, México, mayo del 2000



VARIABILIDAD EN AISLAMIENTOS DE *Sclerotium cepivorum* Berk. Y SU RELACIÓN CON ARN DE CADENA DOBLE

Tesis realizada por **Noel Reyes Pérez** bajo la dirección del comité asesor indicado, siendo aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



DR. NAHUM MARBÁN MENDOZA

ASESOR:



DR. FELIPE DELGADILLO SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

VARIABILIDAD EN AISLAMIENTOS DE *Sclerotium cepivorum* Berk. Y SU RELACIÓN CON ARN DE CADENA DOBLE

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **Noel Reyes Pérez**, autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE:



DR. NAHUM MARBÁN MENDOZA

ASESOR:



DR. FELIPE DELGADILLO SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

DEDICATORIA

A mi familia, mis cuatro pilares fundamentales:

A mi Madre, fuente de enseñanza de amor inagotable e incondicional y de sacrificio.

A mi Padre, mi más grande ídolo, por que aun quisiera un día ser como tu, y por que me enseñaste a nunca darme por vencido.

A mi hermana Herlinda, consejo, apoyo y ejemplo de dedicación al estudio.

A mi hermana Verónica, apoyo, aliento, consejo y alegría (mi ejemplo de tenacidad).

A mi tía Cristina, apoyo y cariño incondicional.

A Marycruz (Mi Chapis), amor y apoyo incondicional, fuente de inspiración, por que no me dejaste caer, por que crees en mí, por que me enseñaste a usar la fuerza del corazón y por que tu amor es el más hermoso regalo que me ha dado la vida.

A mis compañeros del CP:

Victorino, amigo de siempre en las buenas y en las malas (¡nos levantamos cuate!).
Madariaga, Poot-Matu, Ricardo, Tere, Marycruz, Rosa, Isabel, Ceja, Daniel, Hilda, Luis,
Juan Carlos, Ramiro. Además Vero, Panchito, Elisa, Lupita, por los momentos hermosos.

A Lourdes (Dudú), cariño, apoyo, siempre amiga.

A mis compañeros de Chapingo:

Ángel, amigo, hermano, compadre, en las buenas y en las malas, ejemplo y apoyo.
Letty, paciencia y cariño, amistad por encima de todo.
Chío: por estar ahí donde sabes estar, amistad constante.

Venegas, Joaquín, Rodolfo, Lucas, Deras, Mota, Víctor, Higinio, Lilia, Edwin y Martín.
Además Richardo y Marissa. Por hacer más agradable mi estancia en Chapingo, por su amistad.

Al Colegio Josep Marcort i Ribot:

A la Maestra Sarita⁺, donde quiera que esté, gracias.
A los profesores, por recibirme y permitirme desarrollar algo de mí.
A mis alumnos, por su alegría, aprecio, amistad y cariño que me hizo más fuerte.

A todo aquello que formó parte de esta aventura y que me llevo en el corazón.

A ti que pese a todo siempre creíste en mí.

AGRADECIMIENTOS

A DIÓS, por esta vida que me complace vivir.

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO, por permitirme esto.

A MIS ASESORES:

DR. NAHUM MARBÁN MENDOZA
DR. FELIPE DELGADILLO SÁNCHEZ
DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ
DR. GERARDO LEYVA MIR

Por la dirección y asesoría del presente trabajo. Por sus consejos personales.

AL DR. HÉCTOR FELIX ALVIZO VILLASANA, por la idea y apoyo para el presente trabajo

A LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA, mi alma Mater, principio de mi formación.

A MI FAMILIA:

NOEL REYES HERNÁNDEZ (PADRE)
ADELA PÉREZ DE REYES (MADRE)
HERLINDA REYES PÉREZ (HERMANA)
VERÓNICA REYES PÉREZ (HERMANA)
CRISTINA ESTEVES MENDOZA (TÍA)

Por el apoyo incondicional, en todos los sentidos, por creer en mí.

A LA M.C. MARYCRUZ ÁBATO ZÁRATE, por su apoyo incondicional y desinteresado.

AL DR. DANIEL TÉLIZ ORTÍZ
AL DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MONTESSORO
A LA DRA. ELIZABETH CÁRDENAS SORIANO
A LA M.C. ELIZABETH ESTAÑOL BOTELLO

Por su apoyo cuando más lo necesitaba.

A mis profesores de Chapingo: M.C. Emilio, Dr. Guillermo Mondragón, Dra. Ma. Cristina Fuentes, Dr. Roney, Dr. Alvizo, Dr. Nahum, Dr. Nestor, Dr. Reséndiz, M.C. Victor M. Pinto, Dra. Ernestina Valadez, M.C. Calixto.

A mis profesores del CP: Dr. Rguez. Vallejo, Dr. Seiji Osada, Dr. Montessoro, Dr. Téliz, Dr. Mora, Dra. Zavaleta, M.C. Liz.

A Mario Salazar y Elías Piedra por su apoyo y amistad.

A Irma Mondragón, por su ayuda paciente y desinteresada

A Ángel, Lourdes, Chío y Leticia. Por su ayuda, apoyo en el momento preciso y apurado.

A los que creyeron en mí.

!!!! GRACIAS !!!!

DATOS BIOGRÁFICOS

Noel Reyes Pérez, nació el 20 de mayo de 1971 en la Congregación de Higueral Tuxpan, Ver. Estudió la secundaria y la preparatoria en la ciudad de Tuxpan, Ver. De 1987 a 1999 cursó la Carrera de Técnico Programador Analista en el Centro de Computación Profesional de Tuxpan. En 1988 ingreso a la Unidad Docente Interdisciplinaria de Ciencias Biológico-Agropecuarias de la Universidad Veracruzana, donde curso el Propedéutico, de 1989 a 1993 cursó la Carrera de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana de la zona Poza Rica-Tuxpan. Presentó su examen profesional el 10 de diciembre de 1993, defendiendo la tesis "Evaluación de 8 variedades de maíz (*Zea mays* L.) en condiciones de temporal en el municipio de Tuxpan, Veracruz". De enero a diciembre de 1996 inició cursos de posgrado en el Colegio de Posgraduados. En agosto de 1997 ingresó al programa de maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo. Actualmente labora en el Laboratorio de Hongos del departamento de Fitopatología del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario, Sanidad vegetal.

“Fracasar es la oportunidad de empezar de nuevo, pero con más experiencia” (Henry Ford), pues “la adversidad agudiza el talento, en tanto la prosperidad lo limita” (Horacio), y “si esta es una mala época, estamos aquí para hacerla mejor” (Thomas Carlyle); sin embargo, el fracaso a veces engendra resentimientos, pero nunca se debe olvidar que “se pueden odiar actitudes pero nunca personas” (Reyes Hdez.), y que “nadie puede hacerte sentir inferior sin que tu lo consientas” (Roosevelt), así que ánimo que “la peor bancarrota de una persona es cuando pierde el ánimo” (H. W. Arnold), “lo que no te destruye te hace más fuerte” (Nietzsche), y “el peor error que podemos cometer no es el que nos hace caer, sino el que nos impide levantarnos” (Reyes Pérez), “no te arrepientas de tus errores, arrepíentete de no aprender de ellos” (Reyes Pérez), haz de tripas corazón, y “si ves venir problemas, sonríeles, que es la mejor manera de empezar a afrontarlos” (Reyes Pérez); siempre arriba y adelante, “siempre es preferible un barco hundido en la travesía, que uno que nunca zarpó” (Anónimo), y sonríe que “el que no sabe sonreír no ha aprendido a vivir” (Anónimo), y “se feliz hoy que la felicidad no es una meta, sino una forma de vida” (Reyes Pérez). “Si cada vez que tropiezas, te sabes levantar, llegará un día en que ya no caerás” (Anónimo), Sueña, sueña, que “el verdadero hombre, es aquel que pese a sus éxitos y fracasos, siempre tiene sueños que satisfacer” (Anónimo). Ten fé, nunca dejes de creer en Dios y en ti.

**“...Y ES TANTA MI FE QUE AUNQUE NO TENGO JARDÍN, YA
COMPRÉ UNA PODADORA...”**

(R. Arjona).

**“EL VERDADERO VALOR DE UNA IDEA CIENTÍFICA NO
RADICA EN SI ES CIERTA O ERRADA, SINO EN SI ES CAPAZ
DE LLEARNOS A NUEVAS IDEAS”**

(Johanes Keppler)

RESUMEN

Se evaluaron 15 aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk., agente causal de la “pudrición blanca” en ajo y cebolla, procedentes de la zona productora de ajo en Guanajuato, Méx., con el objetivo de determinar la relación entre la presencia de ácido ribonucleico de cadena doble (ARNcd) y la variabilidad entre los diferentes aislamientos, atribuyendo la presencia de ARNcd a posibles micovirus. Se hizo la caracterización de los aislamientos, en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) a partir de esclerocios considerando las variables días a producción de esclerocios (DPE), número de esclerocios (NE), diámetro de colonia (DC) y virulencia (VIR) en bulbos de cebolla. Se hizo extracción de ARNcd con una técnica específica (Valverde, 1990) y se corrió electroforesis. Se encontraron diferencias significativas en todas las variables evaluadas, y hubo una correlación positiva entre las variables DPE y número de esclerocios, en tanto las demás correlaciones no resultan significativas. Se observaron bandas electroforéticas que correspondieron a ARNcd de alto peso molecular (1.46×10^6 daltones) en los aislamientos M4, M7, M13, M14 y M17. Lo anterior nos permite concluir que la presencia de ARNcd no parece estar directamente relacionada con la variabilidad en los aislamientos evaluados debido a que la presencia de ARNcd no tiene relación con las variables evaluadas, sin embargo, por su peso molecular este ARNcd puede ser ubicado como un posible micovirus.

Palabras claves: *Sclerotium cepivorum*, ARNcd,

ABSTRAC

Fifteen isolates of *Sclerotium cepivorum* Berk. (onion white rot disease) from Guanajuato, México, were evaluated to determine the presence of RNAdc as a variability factor among isolates and its possible relation with micovirus. Pathogenic characterization and RNAdc of each isolates were performed. Individual petri dishes with PDA were inoculated with sclerotia. To measure: colony diameter (DC), sclerotia number (NE), Time (days) needed for first sclerotia (DPE) and virulence (VIR). There were five replicates for each isolation. RNAdc extraction was done with Valverde (1990) technique and electrophoresis analysis afterward. Significant differences ($\alpha=0.05$ Tukey) were founden all parameters and a positive correlation between time needed for first sclerotia (DPE) and sclerotia number (NE). No other correlation was founded. Electrophoretic bands were observed corresponding to RNAdc with high molecular weigth (1.46×10^6 daltons) for isolates M4, M7, M13, M14 and M17. It appears that the presence of RNAdc is not correlated with the pathogenic variability among isolates.

Key words: *Sclerotium cepivorum*, ARNdc, Mycovirus.

CONTENIDO

DATOS BIOGRÁFICOS.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	ix
ABSTRAC.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. El cultivo del ajo y cebolla.....	4
2.2. <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk.....	5
2.2.1. Importancia de la "pudrición blanca".....	5
2.2.2. Agente causal de la "pudrición blanca" (<i>S. cepivorum</i>).....	5
2.2.3. Control de la "pudrición blanca" (<i>S. cepivorum</i>).....	7
2.3. Los micovirus.....	8
2.3.1. Clasificación de los micovirus.....	11
2.3.1.1. Los hipovirus y la hipovirulencia.....	11
2.3.1.1.1. Evaluación de la hipovirulencia.....	17
2.3.1.2. Transmisibilidad de de hipovirulencia.....	18
2.3.1.2.1. Evaluación de la transmisibilidad de la hipovirulencia....	20
2.3.1.3. Mecanismos de los hipovirus para la inducción de la hipovirulencia.....	21
2.3.1.4. Variabilidad de los hipovirus.....	22
2.4. Otros micovirus.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Evaluación de 15 aislamientos de <i>S. cepivorum</i>	25
3.1.1. Caracterización de los aislamientos de <i>S. cepivorum</i>	26
3.1.2. Extracción de ARNcd y electroforesis en geles de Acrilamida...	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1. Caracterización de los aislamientos de <i>S. cepivorum</i>	30
4.2. Extracción de ARNcd y electroforesis.....	42
V. CONCLUSIONES.....	48
VI. LITERATURA CITADA.....	49

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	Relación de aislamientos de <i>S. cepivorum</i> evaluados	25
CUADRO 2.	Agrupamiento Tukey de la variable días a producción de esclerocios (DPE) de 15 aislamientos de <i>S. cepivorum</i>	31
CUADRO 3.	Agrupamiento Tukey de la variable número de esclerocios (NE) de 15 aislamientos de <i>S. cepivorum</i> evaluados.....	33
CUADRO 4.	Agrupamiento Tukey de la variable diámetro de colonia acumulado (DC) de 15 aislamientos de <i>S. cepivorum</i> evaluados.....	35
CUADRO 5.	Agrupamiento Tukey de la variable virulencia (VIR) de 15 aislamientos de <i>S. cepivorum</i> evaluados	37
CUADRO 6	Comparación de resultados de extracción del ARNcd con otros reportes.....	43

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Comportamiento de los aislamientos en relación a la variable días a producción de esclerocios (DPE).....	32
FIGURA 2.	Comportamiento de los aislamientos en relación a la variable número de esclerocios (NE).....	34
FIGURA 3.	Comportamiento de los aislamientos en relación a la variable diámetro de colonia, donde se utilizaron los acumulados de las mediciones realizadas en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 después de la siembra.....	36
FIGURA 4.	Comportamiento de los aislamientos en relación a la variable virulencia (VIR).....	38
FIGURA 5	Evaluación de la variable virulencia (VIR) de aislamientos de <i>S. cepivorum</i>	39
FIGURA 6.	Gel electroforético de las pruebas de extracción de ARNcd de los aislamientos M2, M4, M5, M6, M7, M13 y M14. Marcadores de peso molecular: Virus del mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus del Mosaico del pepino (CMV) y Virus Criptico de girasol.....	45
FIGURA 7.	Gel electroforético de las pruebas de extracción de ARNcd de los aislamientos M15, M16, M17, M18, M19, M27 y M45. Marcadores de peso molecular: Virus del mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus del Mosaico del pepino (CMV) y Virus Criptico de girasol	46

I. INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.) y el ajo (*Allium sativum* L.), son las dos especies del género *Allium* más cultivadas en México, en donde Guanajuato se destaca por ser el estado que mayor superficie dedica a estas dos especies, con 10,206 hectáreas de cebolla y 3,945 hectáreas de ajo. En superficie cultivada con cebolla, también destacan los estados de Tamaulipas con 7,472 hectáreas, Morelos con 4,056 hectáreas, Michoacán con 2,878 hectáreas y Puebla con 2,323 hectáreas; en tanto en ajo destacan por la superficie dedicada a este cultivo los estados de Zacatecas con 2,132 hectáreas, Aguascalientes con 974 hectáreas, Puebla con 608 hectáreas y Sonora con 587 hectáreas (SAGAR, 1997). La productividad de estas hortalizas es mermada por la presencia de patógenos entre los que destaca es el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk., agente causal de la "pudrición blanca", una de las enfermedades de mayor importancia. *S. cepivorum* es patógeno exclusivo del género *Allium*, este hongo, se caracteriza por producir esclerocios que pueden llegar a permanecer viables en campo hasta por 20 años en ausencia de tejido hospedante (Redondo *et al.*, 1993). Aunque se han utilizado diferentes tácticas para reducir la incidencia de esclerocios en el suelo, los que logran permanecer son suficientes para ocasionar una incidencia de la enfermedad

similar a donde no se aplica control sobre los esclerocios, ya que sólo es necesario 0.1 esclerocios por gramo de suelo para ocasionar una incidencia del 100 % (Delgadillo, 1998). Lo anterior lleva a la conclusión de que el manejo de esta enfermedad debe hacerse no con una práctica aislada, sino con la integración de diferentes tácticas. Es por tanto deseable desarrollar un programa de manejo integral de esta enfermedad.

Se ha observado variabilidad en la virulencia de diferentes aislamientos de este patógeno, tales aislamientos han sido recolectados en la zona productora de ajo en Guanajuato. Esta característica parece explicarse, en parte, por el fenómeno de hipovirulencia (Bharathan y Tavantzis, 1990), descrito por primera vez en *Endothia parasitica* (*Cryphonectria parasitica*) (Van Alfen *et al.*, 1975). Este fenómeno fue definido como la disminución en la habilidad patogénica debido a la presencia de ARNcd (Acido Ribonucleico de cadena doble), este ácido nucleico ha sido relacionado con los hipovirus (Boland, 1992), característica aprovechada por Heininger y Rigling (1994), como una forma de controlar hongos fitopatógenos como *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Burr., agente causal del tizón del castaño. Sospechamos que la variabilidad patogénica de *S. cepivorum* posee características similares a las antes descritas, por lo que el presente estudio se justifica para empezar a entender su naturaleza.

1.1. Objetivos

- Caracterizar 15 aislamientos de *S. cepivorum*
- Determinar la relación entre la variabilidad de 15 aislamientos de *S. cepivorum* con la presencia de ARN cadena doble.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo del ajo y la cebolla

El ajo (*A. sativum* L.) y la cebolla (*A. cepa* L.) son las dos especies del género *Allium* más cultivadas en México y en el mundo, en el caso del ajo la producción mundial en 1999 fue de 9,042,167 ton, en tanto en México fue de 65,000 ton. En lo relativo a la cebolla en 1999 se produjeron 41,527,877 ton a nivel mundial, y en México se produjeron 102,000 ton (FAO, 1999), tales cifras de producción, así como la utilidad que se les ha dado a estas especies en la alimentación como en otros ámbitos, las ubican como cultivos de importancia.

En México, el estado de Guanajuato es el que mayor superficie dedica al cultivo de ajo y cebolla (SAGAR, 1997), y como cultivos importantes se ha puesto especial atención a sus limitantes de producción, entre los que destacan las enfermedades. La SARH (1976) en su primer catálogo de enfermedades de las plantas mexicanas, reporta, entre otros hongos fitopatógenos a *Alternaria*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Sclerotium* como patógenos de ambas especies.

2.2. *Sclerotium cepivorum* Berk.

2.2.1. Importancia de la “pudrición blanca”

Esta enfermedad tiene gran importancia en México por los daños severos que causa en el rendimiento y calidad del ajo y cebolla. El problema fundamental para el control de la “pudrición blanca” se debe a que el hongo forma esclerocios en grandes cantidades que constituyen su forma de supervivencia y pueden permanecer viables en el suelo hasta por 20 años (Redondo *et al.*, 1993).

2.2.2. Agente causal de la “pudrición blanca” (*S. cepivorum*)

S. cepivorum es patógeno exclusivo del género *Allium* (Brix and Zinkernagel, 1992 y Crowe *et al.*, 1980). Este hongo produce la enfermedad conocida como “pudrición blanca”, este nombre se debe al micelio blanco que cubre raíces, bulbos y base del tallo de las plantas atacadas. Este hongo forma esclerocios por anastomosis los cuales son esféricos de color negro con diámetro de 0.3 a 0.6 mm. La pudrición de los tejidos es suave y acuosa. El hongo crece bien en medio de cultivo, de 4 a 29° C, y para infectar requiere de 10 a 24° C con óptima de 15-18° C (Romero, 1988). No se conoce si este hongo presenta la reproducción sexual.

Los esclerocios son una forma propagativa de este patógeno, los cuales tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo por periodos largos, aún en ausencia de tejido hospedante (Redondo *et al.*, 1993), lo cual dificulta su control. Se ha descubierto que estos esclerocios germinan cuando son estimulados por los exudados del hospedante, los sulfoxidos de alil cisteina presentes en los exudados de las plantas del género *Allium*. Tales sulfóxidos son precursores del alil volátil y sulfatos de propil, los cuales son los estimulantes directos para este patógeno (Somerville, *et al.*, 1987). Sin embargo Coley-Smith (1985) afirma que los esclerocios deben pasar por un período corto de dormancia antes de que puedan responder a estimulantes de plantas o del suelo para germinar; en tanto Brix y Zinkernagel (1992) afirman que la dormancia de los esclerocios obtenidos axénicamente se rompe en el suelo después de 12 semanas. Coley-Smith (1985), reporta que a 20° C los esclerocios germinan en 3 o 4 días, y que sólo es necesario 0.1 esclerocios por gramo de suelo para inducir una incidencia del 100 % tanto en plantas de ajo (*Allium sativum* L.) como de cebolla (*Allium cepa* L.). Crowe y colaboradores (1980), afirman que al germinar el esclerocio, inicia su crecimiento, y si no encuentra un hospedante, el micelio morirá; por el contrario, si encuentra raíces, penetra y las hifas invaden inter e intracelularmente a los tejidos del hospedante. Una vez en el hospedante, lo cubre con un micelio blanco para formar por anastomosis nuevamente esclerocios, lo que implica la muerte de los órganos invadidos y posteriormente, la muerte de la planta; la enfermedad se presenta en campos nuevos en pequeños agregados pero puede llegar a

matar grandes áreas de la plantación, y al parecer se puede transmitir entre plantas que tienen contacto con sus raíces (Crowe y Hall, 1980b).

La variabilidad entre aislamientos de *S. cepivorum* a partir de esclerocios provenientes de campo y los obtenidos axénicamente fue registrada por Coley-Smith (1985), quién además afirmó que no existe comportamiento homogéneo entre esclerocios en un mismo aislamiento, en tanto Brix y Zinkernagel (1992) aseguran que algunos esclerocios entran en dormancia después de su maduración mientras otros germinan cuando logran su maduración. En México también se ha encontrado enorme variabilidad en aislamientos de *S. cepivorum*, los que por su comportamiento, presentan grandes dificultades para su evaluación (Dr. Luis Pérez, comunicación personal).

2.2.3. Control de *S. cepivorum*

El control de este importante patógeno se ha intentado por diversas tácticas, sin embargo, la enorme capacidad de sus formas propagativas para permanecer en el suelo por largos periodos, aun en ausencia de tejido hospedante han hecho infructuosos la mayoría de los intentos de control, por lo que recientemente los trabajos sobre el control de la enfermedad se han

centrado en el estudio y manejo de sus formas propagativas más eficientes, los esclerocios (Coley-Smith, 1985; Crowe y Hall, 1980, y Delgadillo, 1998).

2.3. Los micovirus

La ICTV (Universal System of Virus Taxonomy), ha agrupado a los virus tomando diferentes criterios, una forma de agrupación de los virus es por gama de hospedantes y el taxón a que estos pertenecen, así los virus que parasitan a los miembros del reino fungi se les conoce como micovirus los cuales fueron descritos por primera vez por Hollings en 1962 (Hollings, 1982).

Los micovirus son elementos extracromosómicos nucleoproteicos con ARNcd, cuyo diámetro oscila entre los 25 y 40 nm, con un peso de 2.0×10^6 daltons (Mier, 1994), y con 1-8 segmentos de ARNcd, muy pocos son de genoma no dividido (Hollings, 1982), siendo muy heterogéneos electroforética e inmunológicamente (Mier, 1994).

Hollings (1982) afirma que se han encontrado a los micovirus en alrededor de 100 especies de hongos y sugiere que otras 5,000 especies los podrían contener, lo que significa que muy pocos han sido debidamente caracterizados y sólo reciben el nombre de "partículas parecidas a virus". Agrega que su genoma es posiblemente una adaptación a las condiciones de

la célula del hongo. Tanto los micovirus como las "partículas parecidas a virus" se propagan por anastomosis o mediante esporas asexuales, y no existe correlación entre la presencia de micovirus y la producción de micotoxinas, pero si con la presencia del fenómeno "killer". Los tipos de micovirus encontrados son: tipo tobamovirus (en *Peziza ostracoderma*), tipo potexvirus (en *Bolero edulis*), tipo herpesvirus (en *Thraustochytrium* sp y *Phytophthora infestans*), tipo mosaico de la alfalfa (en *Agaricus bisporus*) y posiblemente del tipo geminivirus en el mismo hongo (Hollings, 1982).

Los micovirus han sido asociados con enfermedades degenerativas y alteraciones morfológicas de sus hospedantes entre los que destacan el fenómeno "Killer" y la producción de Interferón. El fenómeno "killer" se presenta en hongos fitopatógenos, en tanto "la producción de interferón" se presenta en hongos que atacan a mamíferos (Mier, 1994).

Fenómeno "Killer"

Se ha conectado a los micovirus y al ARNdc con la presencia del fenómeno "killer". Este consiste en que ciertas cepas del hongo secretan toxinas extracelulares que matan o suprimen el crecimiento de razas sensibles o de algunas de las especies de los hongos relacionados taxonómicamente (Hollings, 1982), ésta toxina ha sido determinada como una glicoproteína, y las cepas capaces de producirla (cepas "killer") son inmunes a su propia toxina. Esta toxina es capaz de aniquilar a las cepas sensibles que son incapaces de

producir esta toxina, las cepas neutrales no producen la toxina ni son inhibidas por ella (Mier, 1994). También se han encontrado cepas “killer” sensibles a toxinas producidas por otras cepas (Hollings, 1982).

Producción de interferón

El interferón es conocido como parte de los mecanismos de defensa de un individuo, mediado por la inducción viral de síntesis de proteínas celulares, las cuales inhiben la replicación del virus, y se ha catalogado a los micovirus por su capacidad de inducir la producción de interferón, ejemplos de especies donde se ha registrado son *Penicillium stoloniferum* y *P. funiculosum*. Este fenómeno sólo ha sido registrado en células animales (Mier, 1994).

De manera general, los micovirus que afectan a sus hospedantes parecen interferir en la traducción de los mensajes genéticos a nivel ribosomal (Hollings, 1982 y Mier, 1994).

Replicación de los Micovirus

Existen diferencias en cuanto a la forma de replicación de los micovirus con otros virus, la más notable es que los virus se replican paralelamente a la célula del hospedante, se ha descubierto la existencia de un ARN-polimerasa que interviene en los procesos de replicación viral (Mier, 1994).

2.3.1. Clasificación de los micovirus

Los virus cuyo hospedante es un hongo (micovirus), se encuentran agrupados en 4 familias, un género no incluido en ninguna familia, y algunos virus satélites tampoco incluidos en ninguna familia. Las cuatro familias son 1) Barnaviridae, con el género Barnavirus, cuya especie tipo es el Mushroom bacilliform virus; 2) Hypoviridae con el género Hypovirus cuya especie tipo es *Cryphonectria hypovirus* 1-EP713; 3) Partitiviridae con dos géneros, el género Partivirus tiene como especie tipo a *Gaeumannomyces graminis* virus 019/6^a, y el género Chrysovirus con la especie tipo *Penicillium chrysogenum* virus; 4) Totiviridae, con el género Totivirus cuya especie tipo es *Saccharomyces cerevisiae* virus L-A; el género que no se encuentra incluido en ninguna familia es Rhizidiovirus cuya especie tipo es *Rhizidiomyces* virus; y por último virus Satélites de ARN de cadena simple, cuya especie tipo es el Tobacco necrosis satellite (ICTV, 1999).

2.3.1.1. Los hipovirus y la hipovirulencia

Dentro de los micovirus, la familia Hypoviridae según el ICTV (1999), se caracterizan por formar vesículas que dan aspecto rugoso, en las células del hospedante infectado, tales vesículas miden entre 50-80 nm de diámetro. Contienen una molécula lineal de ARNcd. Tal cadena es de una longitud que

va de 10,000 a 13,000 pares de nucleótidos. A ellos se atribuye el fenómeno de hipovirulencia en algunos hongos fitopatógenos (ICTV, 1999).

Boland (1992), define a la hipovirulencia como la reducción en la habilidad de un patógeno para infectar, colonizar, matar y reproducirse en el tejido del hospedante susceptible. Este fenómeno ha sido reportado en diferentes hongos fitopatógenos, más de 30 especies según Castanho y colaboradores (1978), de las cuales quizás el caso más estudiado sea el del hongo *Endothia parasitica* (*Cryphonectria parasitica*), que es el agente causal del tizón del castaño (Shapira, *et al.*, 1991; Heiniger y Rigling, 1994; Smart y Fulbright, 1995; Schafleitner y Wilhelm, 1997; Peever *et al.* 1997; Anagnostakis *et.al*, 1998; Peever *et al.*, 1998), en el que Van Alfen y colaboradores (1975) reportan el fenómeno de hipovirulencia. Estos autores afirman que la variante virulenta puede ser modificada en la naturaleza por la transmisión de la hipovirulencia, la cual atribuyen a un determinante de transmisibilidad, además describen las colonias hipovirulentas sembradas en medio de cultivo, afirmando que disminuye la producción de pigmentos y la apariencia es más lechosa que las colonias virulentas. Nuss (1992) afirma que los aislamientos hipovirulentos tiene menor producción de esporas, es decir, en general los aislamientos hipovirulentos presentan características morfológicas que los distinguen de los virulentos. Otro hongo fitopatógeno muy estudiado en cuanto al fenómeno de hipovirulencia es *Rhizoctonia solani* el cual Castanho y Butler

(1978) investigaron llamando "Decline" de *Rhizoctinia* al fenómeno de hipovirulencia.

El fenómeno de hipovirulencia se ha asociado con la presencia de ARNcd (Castanho y Butler, 1978; Shapira y Nuss, 1991; Smart y Fulbright, 1995; entre otros). En su trabajo sobre el "Decline" de *Rhizoctonia solani*, Castanho *et al.* (1978), a partir de aislamientos hipovirulentos purificaron tres diferentes partículas parecidas a virus de ARN con pesos moleculares de 2.2, 1.5 y 1.1 x 10⁶ daltones; sugiriendo a los micovirus como responsables de esas partículas parecidas a virus, sin embargo, afirman que no se puede atribuir la sintomatología a estas partículas.

Bharathan y Tavantzis (1990), encontraron que existe una enorme diversidad genética en los ARNcd presentes en *Rhizoctonia solani*, y al analizar esta diversidad genética por hibridación Northern blot encontraron un alto grado de heterogeneidad entre aislamientos; sin embargo, no encontraron las bases para asociar de manera general las cadenas dobles de ARN con la hipovirulencia, pero si parece haber cierta relación entre cadenas dobles de ARN específicas y la hipovirulencia, es decir, no todos las cadenas dobles de ARN presentes en un aislamiento hipovirulento son responsables de la hipovirulencia.

Boland y Smith (1991) estudiaron la hipovirulencia en *Sclerotinia sclerotiorum* al igual que Boland (1992), los primeros analizaron la morfología de las colonias en medio de cultivo, afirmando que el método de regeneración por protoplasto permitió obtener cultivos similares a los iniciales, es decir con las mismas características de hipovirulencia.

Boland (1992), caracterizó morfológicamente los aislamientos de *Sclerotinia sclerotiorum* y relacionó estas características con la reducción en la capacidad para infectar tejido hospedante. También detectó ARNcd y transmitió la hipovirulencia por anastomosis hifal. De la misma manera Zhou y Boland (1997) estudiaron la hipovirulencia en *Sclerotinia homeocarpa*, la cual en cultivos en PDA formó colonias atípicas, también relacionaron estas características de colonias atípicas y crecimiento lento, con la presencia de ARNcd y lo transmitieron a otros cultivos no hipovirulentos, consiguiendo su transformación a hipovirulentos. Con lo anterior se demostró la relación entre las variaciones morfológicas, la hipovirulencia y la presencia de ARNcd.

Posteriormente Boland y colaboradores (1993), caracterizaron aislamientos hipovirulentos, en medio de cultivo y analizaron sus estructuras subcelulares al microscopio de luz y electrónico. En general los resultados del estudio de microscopía de luz, indicaron que los cultivos hipovirulentos fueron prácticamente iguales con los virulentos, salvo que los hipovirulentos presentaron aspecto granuloso en el citoplasma, este aspecto granuloso,

según el microscópio electrónico se debió a la presencia de corpúsculos de doble membrana, encontrados tanto en los esclerocios como en las hifas. Estos corpúsculos no fueron observados en cultivos virulentos, su diámetro se calculó en 70 nm y están presentes cerca del núcleo, además estos corpúsculos al ser vistos a mayor aumento, mostraron que la membrana interna demarcaba los corpúsculos, en algunos casos dos o tres de ellos, y la membrana externa los envolvía en grupo. No observaron partículas típicas de un micovirus por lo que afirmaron que el ARNcd y la hipovirulencia no están asociadas con los micovirus en *Sclerotinia sclerotiorum*, pero quizás los corpúsculos que encontraron representen un micovirus sin encapsidación o que funcionen como sitios de replicación del ARNcd, o quizás como un mecanismo de defensa del hospedante en el que las partículas tipo viral sólo sean una forma de encapsular y eliminar el ácido nucleico exógeno.

Peever y colaboradores (1997), también encontraron una enorme diversidad genética en los ARNcd presentes en *C. parasítica*, el más estudiado en cuanto al fenómeno de hipovirulencia.

El caso de *C. parasítica* ha tenido un uso directo, ya que se ha logrado transmitir el ARNcd de cepas hipovirulentas a cepas virulentas, transformando estas últimas en hipovirulentas, tal situación se ha probado incluso en condiciones de campo, obteniendo un control gradual del tizón del castaño en Norteamérica, aunque cabe mencionar que dentro del gran número de

micovirus encontrados en este patógeno, no todos son responsables del fenómeno de hipovirulencia, es decir, este patógeno posee una gran diversidad de ARNcd, los cuales han sido encontrados en diferentes cepas aisladas en América del Norte, Europa y Asia, algunas de las cuales, incluso están relacionadas con diferencias fenotípicas del patógeno en medio de cultivo, pero no están relacionadas con el fenómeno de hipovirulencia (Heiniger y Rigling, 1994); estos autores también determinaron que las ascosporas no son un medio importante de diseminación de la hipovirulencia en el caso de *C. parasitica*.

De la gran diversidad genética encontrada en los ARNcd presentes en aislamientos de *C. parasitica*, dos han sido recientemente clasificados dentro de la familia Hypoviridae, y estos son: 1 (CHV1)-EP713 y CHV2-NB58, en tanto CHV3-GH2 sólo tentativamente ha sido incluido en esta familia, en el caso de los dos primeros son considerados hipovirus por estar plenamente determinada su relación con el fenómeno de hipovirulencia, además de ser considerados los virus tipo de la familia Hypoviridae. Se encuentra también relación filogenética entre los hipovirus y ARNcd presentes en aislamientos de *C. parasitica* en Norteamérica, Europa y Asia, aunque no necesariamente estén ligados al fenómeno de hipovirulencia (Peever, *et al.*, 1998).

2.3.1.1.1. Evaluación de la hipovirulencia

Debido a que la hipovirulencia se define como la disminución de la habilidad patogénica de un organismo agente causal de una enfermedad, su evaluación debe medir el grado en que se ve disminuida esta virulencia en relación a un aislamiento normal. Esta hipovirulencia además ha sido relacionada con variaciones morfológicas en el desarrollo de los patógenos como lo sugirieron Van Alfen (*et al.*, 1975), Castanjo y Butler (1978), y Boland y Smith (1991), así, estos autores hicieron también una evaluación morfológica de los aislamientos en estudio. Boland y Smith (1991), evaluaron la morfología del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, patógeno de diversos cultivos en Norteamérica, incubándolo en medio papa-dextrosa-agar (PDA), y observando características tales como el desarrollo de la colonia, coloración, producción de pigmentos y otros. De igual manera, Zhou y Boland (1997) estudiaron al hongo *Sclerotinia homoeocarpa* (patógeno de pastos), encontrando diferencias morfológicas en los 32 aislamientos estudiados. Tales diferencias a nivel morfológico regularmente son de menor velocidad de crecimiento y/o producción de pigmentos, o apariencias lechosas para los aislamientos hipovirulentos, e inversos para los virulentos, es decir, los aislamientos hipovirulentos forman colonias atípicas. También evaluaron los aislamientos sobre tejido vegetal.

Castanho y Butlet (1978), usaron plántulas de repollo, las cuales fueron expuestas en cajas petri a aislamientos de *Rhizoctonia solani*, tanto virulentos como posiblemente hipovirulentos, posteriormente evaluaron el daño en porcentaje de plántulas afectadas. Enseguida evaluaron estos aislamientos en invernadero donde se inoculó micelio del patógeno al suelo en macetas, donde a las dos semanas se colocaron semillas de remolacha azucarera a 2.5 cm de profundidad y se midieron la incidencia de la enfermedad a la preemergencia y postemergencia. Boland y Smith en 1991 y Boland en 1992, evaluaron la hipovirulencia de *S. sclerotiorum* al colocar rodajas de medio con micelio en desarrollo sobre peciolo de apio, y medir el diámetro de las lesiones. Al parecer, encontraron una relación estrecha entre las características morfológicas en medio de cultivo con la hipovirulencia, sin ser estas características un indicativo de la existencia de hipovirulencia en los aislamientos que las poseen.

2.3.1.2. Transmisibilidad de la hipovirulencia

Desde los primeros reportes de la hipovirulencia en *C. parasitica* (Castanho *et al.*, 1978 y Van Alfen *et al.*, 1975), se afirma que esta puede ser transmitida a aislamientos virulentos, y que este fenómeno existe en la naturaleza. Esta transmisibilidad se atribuyó en un principio, a un factor de transmisión, sólo comprobada por la transmisión de las características

morfológicas a las cepas transformadas y por la disminución de su virulencia. Posteriormente se comprobó que la hipovirulencia es transmitida de manera citoplasmática a través de la anastomosis hifal a cepas adyacentes y a través de algunas formas propagativas a la descendencia (Boland y Smith, 1991).

De igual manera, las características morfológicas observadas en el microscopio óptico y electrónico, como son los corpúsculos de doble membrana observados en la membrana nuclear, se comprobó que también se transmiten a colonias virulentas adyacentes o descendientes (Boland *et al.*, 1993).

Zhou y Boland (1997) estudiaron la hipovirulencia en *S. homeocarpa*, la cual en cultivos en PDA forma colonias atípicas, también relacionaron estas características de colonias atípicas y crecimiento lento, con la presencia de ARNcd y lo transmitieron a otros cultivos no hipovirulentos, consiguiendo su transformación a hipovirulentos.

Smart y Fulbrigh (1995) demostraron que la hipovirulencia en *C. parasitica* puede ser transmitida por segregación asexual. Heiniger y Rigling (1994), no encontraron ARNcd en ascosporas de *C. parasitica*, por lo que estas no resultan importantes en la diseminación de la hipovirulencia, pero determinan que si se puede transmitir por conidios en este hongo. Posteriormente Anagnostakis (1998), logró la transmisión de la hipovirulencia por ascosporas en *C. parasitica*, al obtener un ADN copia del hipovirus CHV1-

EP713 y mediante manipulación la hicieron llegar al ADN nuclear, con lo que se logra vencer la barrera de la incompatibilidad que podría presentarse en la anastomosis.

Sin duda la mejor prueba de la transmisibilidad de la hipovirulencia es en condiciones naturales, y esta se evaluó en 20 has de Castaño (Heiniger y Rigling, 1994), donde se liberó un aislamiento hipovirulento de *C. parasitica*, y después de 4 años se evaluó la incidencia del hipovirus en los diferentes aislamientos del patógeno recolectado, comprobándose su diseminación ya que la incidencia de la enfermedad se redujo del 41 al 25 %.

2.3.1.2.1. Evaluación de la transmisibilidad de la hipovirulencia

Para comprobar la trasmisibilidad de la hipovirulencia, Boland (1992), sembró en medio de cultivo en una misma caja petri, tanto a un aislamiento hipovirulento como a uno virulento, dejando que en su desarrollo interactuaran los micelios y se llevara cabo la anastomosis, posteriormente tomó micelio de la zona de interacción, le proporcionó las condiciones óptimas de desarrollo y lo sometió a la evaluación de la hipovirulencia sobre tejido vegetal. Esta transmisión por anastomosis también se lleva acabo en *R. solani*, con lo que Castano *et al.*, (1978), pudieron convertir aislamientos virulentos en hipovirulentos.

2.3.1.3. Mecanismos de los hipovirus para la inducción de la hipovirulencia

El hipovirus más estudiado es sin duda CHV1-EP713, del que Shapira y colaboradores (1991), presentaron su secuenciación de 12, 712 pb, que presenta dos Marcos de Lectura Abierta (A y B), codificando para diferentes polipeptidos y a los cuales se les ha atribuido inferencia en la inducción de la hipovirulencia. Por su parte Heiniger y Rigling (1994), afirmaron que la presencia del ARNcd reduce la acumulación de ARNm específico y la de polipéptidos, a la vez que produce acumulación del metabolito oxalato, e induce varias proteínas, cutinasa y lacasa, al parecer el ARNcd perturba señales de procesos celulares que normalmente terminan en la inducción de la lacasa, en cuanto al oxalato, se le incluye en el proceso de patogenicidad de *C. parasitica*.

Schfreitner y Wilhelm (1997), afirman que las especies no virulentas rápidamente incitan las reacciones de defensa del hospedante, por lo tanto el factor clave es el tiempo de reconocimiento del patógeno y el establecimiento de las barreras físicas o bioquímicas. Entre las proteínas PR se incluye a las β -1,3-glucanasas y quitinasas, las cuales se ha demostrado inhiben a varios hongos patógenos, y juegan un papel importante en las reacciones de defensa de la planta, así en plantas inoculadas con el patógeno que porta al hipovirus, las actividades de quitinasa y β -1,3-glucanasas son mayores que en las

inoculadas con aislamientos virulentos, lo cual se atribuye a la elicitación por parte del hongo, quizás los aislamientos virulentos tienen la capacidad para suprimir la acción de los elicitores tempranos. Cada especie de hipovirus produce diferentes proteínas.

2.3.1.4. Variabilidad de los hipovirus

En los diferentes hongos donde se han detectado hipovirus se han encontrado diversos fragmentos de ARNcd, (Van Alfen *et al.*, 1975; Shapira *et al.*, 1971) de diversos pesos moleculares. Castanho y colaboradores (1978) encuentra en *R. solani* 3 segmentos de ARNcd, de los cuales no todos pueden ser considerados hipovirus, o inductores de la hipovirulencia, regularmente este fenómeno se encuentra asociado a un fragmento.

De la enorme diversidad de ARNcd encontrados en *C. parasitica*, sólo se les considera hipovirus a Cryphonectria hypovirus 1-EP713 (CHV1-EP713), Cryphonectria hypovirus 1-EP747 (CHV1-EP747), y Cryphonectria hypovirus 2-NB58 (CHV2-NB58), y como especie tentativa de este género Cryphonectria hypovirus 3-GH2 (CHV2-NB58) según la ICTV (1999).

2.4. Otros micovirus

Los micovirus en general, no necesariamente están asociados a alteraciones en las características morfológicas o a enfermedades degenerativas, esto se ve más en Deuteromicetes, y parece ser que en algunos casos se logra una relación tal entre parásito y hospedante logrando aparentemente no afectarse de manera significativa. Se han encontrado micovirus tanto en hongos comestibles como contaminantes y fitopatógenos (Hollings, 1982 y Mier, 1994).

Mier (1994) menciona que entre otros hongos, se han encontrado micovirus en *Penicillium funiculosum* y *P. stolonifer*, en este último fue donde se encontró la primera evidencia de la existencia de estos virus. También menciona la presencia de micovirus en un hongo no fitopatógeno pero si de importancia comercial, *Agaricus bisporus*, conocido comercialmente como "champiñón". La presencia de un micovirus en este hongo, propicia la enfermedad degenerativa conocida como "Enfermedad de Francia"; otros hongos en donde se han encontrado los micovirus son: *Ustilago maydis*, *P. chrysogenum*, *P. cyaneo-fulvum*, *Plasmopara halstedii*, *Peziza ostracoderma*, *Entomophaga auliceae*, *Basidiobolus haptosporus*, *B. ranarum*, *Leucostoma personii*, *Agrocybe aegerita*, *Trichophyta mentagrophytes*, *Phialophora pedrosoi* y *Thraustochytrium* sp. Por su parte Zhang y colaboradores (1994), mencionan

a algunos hongos fitopatógenos con presencia de ARNcd entre los que destacan *Gaeumennomyces graminis*, *Ophiostoma ulmi*, *Helminthosporium victoriae*, *Puccinia coronata*, *P. striiformis*, *P. recondita*, *P. hordei*, *P. graminis*, *P. malvacearum*, *P. suaveolens*, *P. sorghi*, *P. helianthi*, *Uromyces phaseoli*, *Coleosporium solidaginis* y *Linum usitatissimum*, en algunos se ha registrado alguno de los fenómenos antes descritos, o aun no se ha estudiado a fondo el efecto la presencia de micovirus en el comportamiento del hongo.

Lo anterior nos lleva a la conclusión de que el campo de los micovirus y en especial el de los hipovirus está poco explorado, pero sentimos que esto debe intensificarse ya que las evidencias anteriormente citadas muestran el gran potencial biocontrolador en algunos hongos fitopatógenos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Evaluación de 15 aislamientos de *S. cepivorum*

Se evaluaron 15 aislamientos de *S. cepivorum* procedentes de la zona productora de ajo en Guanajuato, Mex. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación de aislamientos de *S. cepivorum* evaluados.

AISLAMIENTO	PROCEDENCIA
M2	San Miguel de Allende, Gto.
M4	Salamanca, Gto.
M5	Salamanca, Gto. (Los Aguilares)
M6	Celaya, Gto. (Roque)
M7	Apaseo El Grande, Gto. (CEBETIS 175)
M11	Celaya, Gto. (Turrubiarres)
M13	Celaya, Gto. (Santa Elena)
M14	Apaseo El Alto, Gto. (El Nacimiento)
M15	Apaseo El Grande, Gto. (El Moral)
M16	Apaseo El Grande, Gto. (Cantabria)
M17	Apaseo El Grande, Gto. (Ejido 2)
M18	Villagrán, Gto.
M19	Cortazar, Gto. (Guadalupe)
M27	Juventino Rosas, Gto. (provedora)
M45	Apaseo El Grande, Gto. (Escuela)

Para evaluar estos aislamientos se procedió en dos fases, la caracterización y la detección de ARNcd.

3.1.1. Caracterización de 15 aislamientos de *S. cepivorum*

Para la caracterización *in vitro* de estos aislamientos se planteó la evaluación de las variables: días a producción de esclerocios (DPE), número de esclerocios (NE), diámetro de colonia (DC) a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, y 14 días después de la siembra y virulencia (VIR), con estas variables se buscó tener las principales características fenotípicas de los aislamientos, donde es de destacar la variable virulencia. Por realizarse en condiciones de laboratorio la evaluación se llevó a cabo en un diseño completamente al azar.

Para evaluar las variables DPE, NE y DC, se preparó medio papa-dextrosa-agar (PDA) y se colocaron 20 mL en cajas petri de 9 cm de diámetro, se sembraron los 15 aislamientos colocando sólo un esclerocio por caja en el centro de las mismas con cinco repeticiones para cada aislamiento, los esclerocios fueron previamente desinfectados en su superficie colocándolos por 1-2 minutos en hipoclorito de sodio al 1%, para después ser lavados brevemente en agua destilada estéril y entonces fueron colocados en el medio. Las cajas fueron colocadas en la oscuridad dentro de una incubadora donde

la temperatura osciló estrictamente entre 16 y 22° C. A los 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días se evaluó el diámetro de la colonia, procediendo a medir en 2 posiciones, en forma perpendicular y tomando como valor el promedio de ambas. La variable DPE fue tomada en cada una de las cajas como el número de días después de la siembra hasta la aparición del primer esclerocio. En tanto la variable NE fue evaluada a los 24 días considerando en cada caja tres puntos en forma de círculo de ocho mm de diámetro, los cuales se ubicaron uno en el centro de la caja, otro a la mitad de su radio y el tercero en el margen, tomándose como valor de la variable el promedio de estos tres puntos.

Para evaluar la variable VIR se colocaron bulbos de cebolla de tamaño y peso similar (210-230 g) en cámaras húmedas individuales, las cuales fueron elaboradas con recipientes de unicel de 2 L, con un fragmento del mismo material en el fondo para evitar que el bulbo tuviese contacto directo con la humedad. A los bulbos se les hizo una herida de 8 mm de diámetro con una profundidad de dos brácteas, tal herida fue hecha en la región ecuatorial del bulbo. A estos bulbos heridos se les colocó una rodaja de medio de cultivo con micelio en crecimiento de cada uno de los aislamientos (cinco repeticiones), se colocaron en los recipientes a los cuales se les colocó previamente 40 mL de agua estéril en papel absorbente y los recipientes fueron cerrados herméticamente y colocados en la oscuridad. La evaluación se hizo a los 24 días. La forma de llevar a cabo esta evaluación fue precedida de diversos ensayos para determinar el tamaño y profundidad de la lesión, cantidad de

humedad necesaria, tiempo de evaluación, y crecimiento del micelio para inóculo. Los bulbos se pesaron al inicio y final del experimento, después de retirar el tejido dañado por el hongo. Su peso inicial fue corregido por un factor por pérdida de humedad el cual se obtuvo del promedio del porcentaje de peso perdido en el testigo, para posteriormente obtener el porcentaje en peso de tejido dañado. El testigo consistió en un bulbo herido únicamente. Se realizaron análisis de varianza con los datos obtenidos de todas las variables y pruebas de comparación de medias así como de correlaciones mediante el programa estadístico SAS.

3.1.2. Extracción de ARNcd y electroforesis en geles de Acrilamida

Par tal fin se preparó medio PD (papa dextrosa) del cual se colocaron 75 mL en matraces de 125 mL y se colocaron esclerocios para ser puestos a oscilar en un agitador a una velocidad de 4500 ciclos por hora. A los 21 días, cuando se consideró que se contaba con el micelio suficiente, este fue recuperado eliminando el fluido. De este micelio se pesaron 3 g de cada aislamiento para ser procesados mediante la técnica de extracción de ARNdc propuesta por Valverde (1990).

Posteriormente estas muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, donde se colocaron 30 μ L de muestra de cada aislamiento, el gel se corrió a 100 volts durante 3 h.

Posterior a lo anterior el gel se reveló, para tal efecto primero se colocó durante 20 minutos en agitación en una solución fijadora compuesta de 5 mL de alcohol etílico aforado a 49 mL, agregando 1 mL de ácido acético glacial; enseguida, se enjuagó varias ocasiones con agua destilada. Luego fue pasado por una solución de Nitrato de plata 0.011 M y se tuvo en agitación durante 20 minutos, luego se enjuagó nuevamente. Por último se colocó el gel en una solución de 3 g de hidróxido de sodio en 50 mL de agua destilada en agitación por 20 minutos, y se enjuagó varias veces.

El gel se seco en papel celofán dulce para su conservación. En este proceso se utilizaron como marcadores de peso molecular el Virus del mosaico de la alfalfa (AIMV), Virus del Mosaico del Pepino (CMV), y un virus críptico de girasol.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de los aislamientos de *S. cepivorum*

La caracterización de aislamientos de hongos es difícil, sobre todo en especies donde la variabilidad es enorme, tal es el caso de *S. cepivorum*, por lo que la mejor forma de evaluar las diferentes variables es aquella cuyos resultados proporcionan la menor variabilidad dentro de las repeticiones de un mismo aislamiento, es decir, cuya r^2 sea aceptable.

En la evaluación de las variables DC, DPE, NE y VIR (Figura 1), mediante la metodología descrita en este trabajo, las r^2 fueron aceptables, por lo se puede concluir que esta metodología es adecuada para evaluar estas variables.

Se encontraron diferencias significativas en todas las variables evaluadas a un $\alpha=0.05$, lo que indica la presencia de variabilidad entre los aislamientos de *S. cepivorum*. Esta variabilidad ya había sido mencionada por Crowe y Hall (1980) y Coley y Smith (1985).

Mediante la prueba de comparación de medias de Tukey se encontró que el aislamiento M16 produce esclerocios (DPE) en menos días (14.333), en tanto el aislamiento M7 requirió de más días para producirlos (28.667) (Cuadro 2 y Figura 1).

Cuadro 2. Agrupamiento Tukey de la variable días a producción de esclerocios (DPE) de 15 aislamientos de *S. cepivorum* evaluados.

AISLAMIENTO	MEDIA (DÍAS)	AGRUPAMIENTO TUKEY ($\alpha=0.05$)
M7	28.667	A
M45	24.333	B
M2	22.667	BC
M27	22.000	BCD
M17	22.000	BCD
M11	21.333	BCD
M18	21.000	BCD
M4	21.000	BCD
M14	20.333	BCDE
M6	19.667	CDE
M19	18.667	CDEF
M5	18.333	DEFG
M13	16.667	EFG
M15	15.333	FG
M16	14.333	G

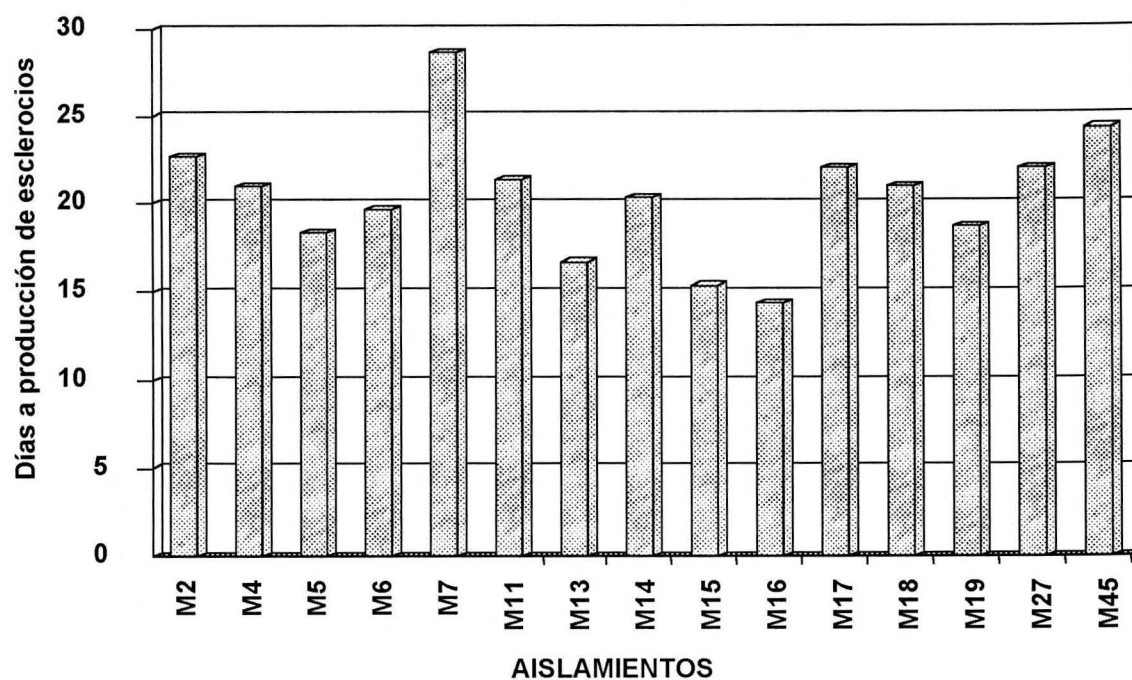


Figura 1. Comportamiento de los aislamientos en relación a la variable días a producción de esclerocitos (DPE).

Para la variable NE el aislamiento M7 se destacó por producir mayor número de esclerocitos, en tanto el aislamiento M45 fue el que produjo menos (Cuadro 3 y Figura 2).

Cuadro 3. Agrupamiento Tukey de la variable número de esclerocios (NE) de 15 aislamientos de *S. cepivorum* evaluados.

AISLAMIENTO	MEDIA (ESCLEROCIOS)	AGRUPAMIENTO TUKEY ($\alpha=0.05$)
M7	80.133	A
M13	74.500	AB
M19	70.220	ABC
M27	62.997	BCD
M2	59.533	CDE
M5	59.333	CDE
M4	56.100	DEF
M15	55.733	DEF
M14	54.943	DEF
M11	52.533	DEFG
M16	50.333	DEFG
M17	49.500	EFG
M6	47.333	EFG
M18	45.777	FG
M45	40.187	G

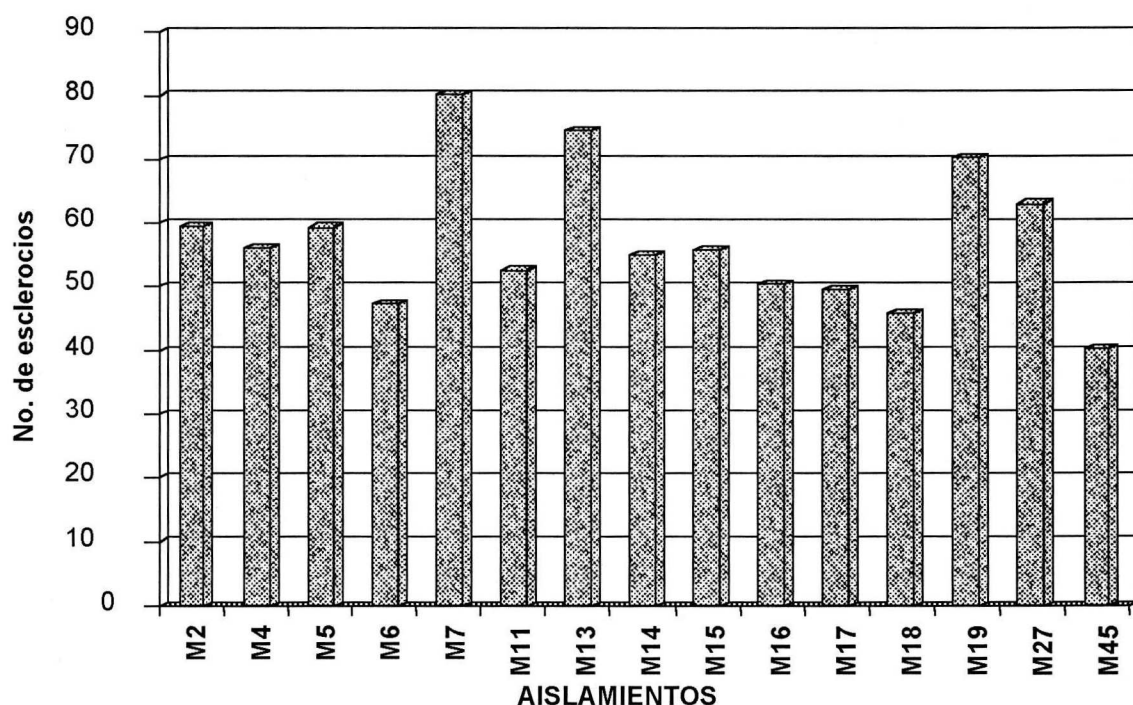


Figura 2. Comportamiento de los aislamientos en relación a la variable número de esclerocios (NE).

Para la variable DC se obtuvo el área bajo la curva del desarrollo de la colonia, resultando los aislamientos M16 (81.28), M15 (81.24), M19 (80.74), M27 (80.70) y M18 (79.94) los de mayor desarrollo de colonia, en tanto los aislamientos M45 (12.56) y M6 (7.38) fueron los de menor desarrollo de la colonia (Cuadro 4 y Figura 3). Las enormes diferencias en esta variable son indicativo de la gran variabilidad que se presenta en este hongo.

Cuadro 4. Agrupamiento Tukey de la variable diámetro de colonia acumulado (DC) de 15 aislamientos de *S. cepivorum* evaluados.

AISLAMIENTO	MEDIA (cm)	AGRUPAMIENTO TUKEY ($\alpha=0.05$)
M16	81.280	A
M15	81.240	A
M19	80.740	A
M27	80.700	A
M18	79.940	A
M14	65.100	B
M2	62.080	B
M4	60.950	B
M7	47.420	C
M11	45.400	C
M5	37.300	D
M13	30.960	D
M17	30.560	D
M45	12.560	E
M6	7.380	E

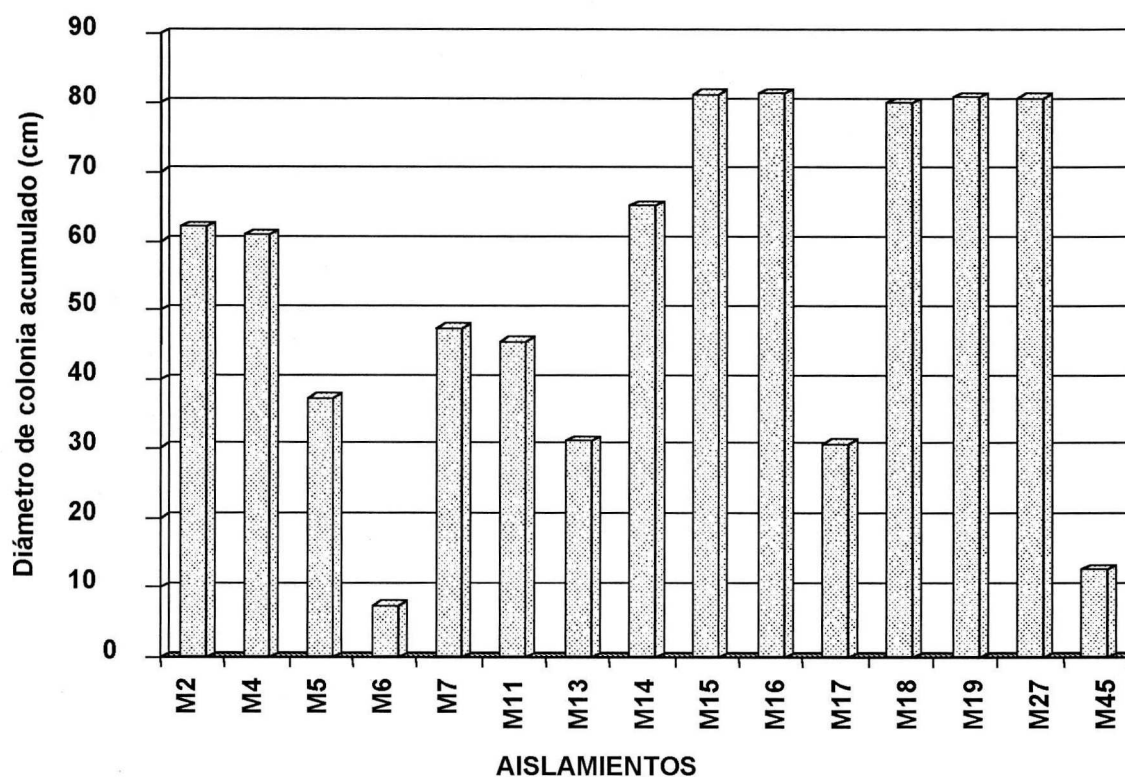


Figura 3. Comportamiento de los aislamientos en relación a la variable diámetro de colonia, donde se utilizaron los acumulados de las mediciones realizadas en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, y 14 después de la siembra.

En la variable VIR, el aislamiento M14 resultó ser significativamente el más patogénico en tanto los aislamientos M6, M45, M16, M17 y M5 fueron los menos patogénicos (Cuadro 5 y Figuras 4 y 5).

Cuadro 5. Agrupamiento Tukey de la variable virulencia (VIR) de 15 aislamientos de *S. cepivorum* evaluados.

AISLAMIENTO	MEDIA (% TEJIDO DAÑADO)	AGRUPAMIENTO TUKEY ($\alpha=0.05$)
M14	26.697	A
M27	19.195	B
M18	12.198	C
M13	11.983	CD
M2	11.605	CDE
M15	11.060	CDEF
M11	8.533	DEFG
M19	8.258	EFG
M4	8.148	EFG
M7	7.657	FG
M6	7.412	G
M45	7.065	G
M16	7.000	G
M17	6.970	G
M5	5.980	G

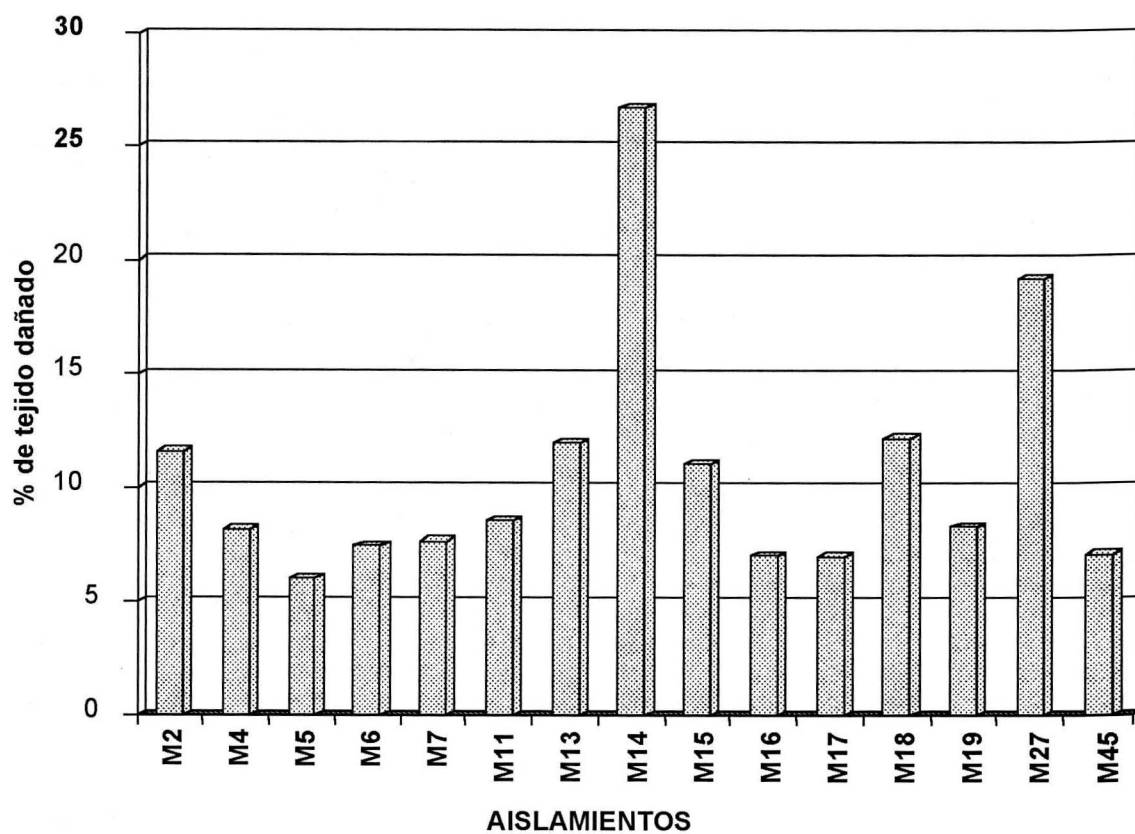


Figura 4. Comportamiento de los aislamientos en relación a la variable virulencia (VIR).

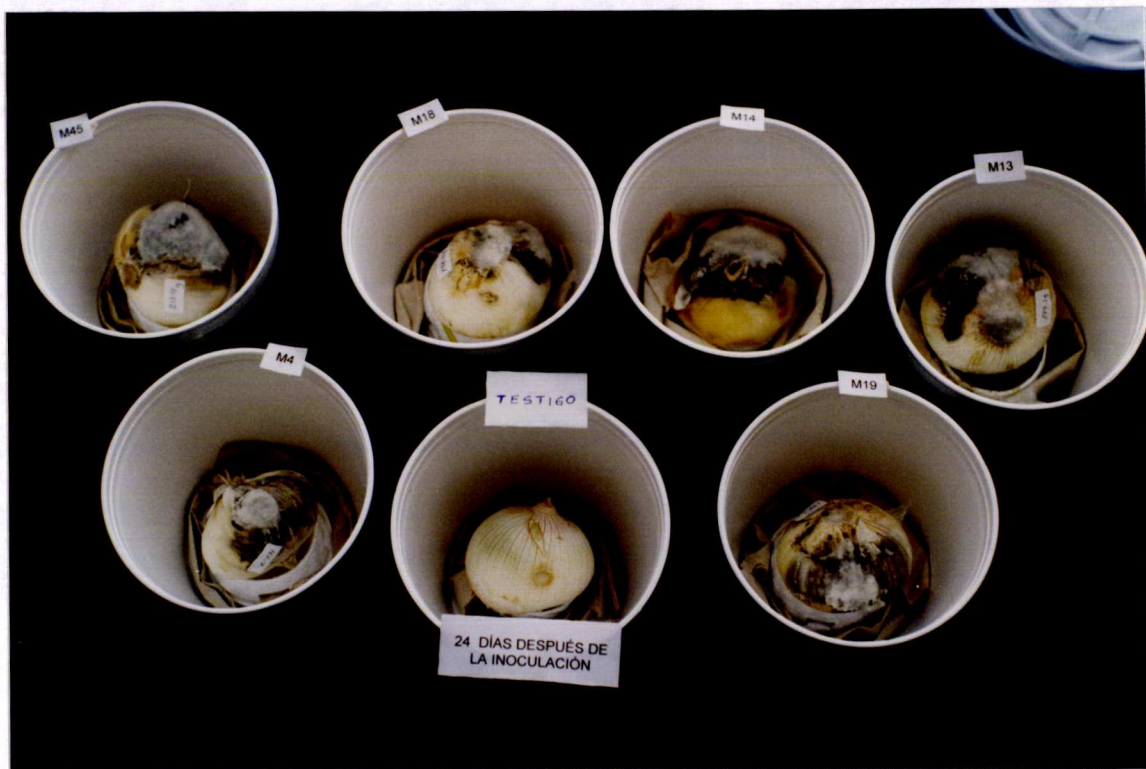


Figura 5. Evaluación de la variable virulencia (VIR) de aislamientos de *S. cepivorum*

En las pruebas de correlación de las variables se encontró una correlación positiva entre las variables DPE y NE y una correlación negativa entre las variables DPE y VIR, NE y VIR, DC y DPE, DC y NE, DC y VIR, estas correlaciones son muy débiles ya que apenas superan el mínimo valor considerado como inexistencia de correlación (0.5). Las correlaciones indican que a más días a producción de esclerocios mayor número de éstos, como se observó en el aislamiento M7 que fue el que más días requirió para producir esclerocios. Sin embargo, fue el que mayor número de esclerocios produjo, debido quizás a que entre más días tarda el micelio en producir los esclerocios, se desarrolla más y por lo tanto tiene mayor área para producirlos, por lo que

estos se producen en mayor número. Sin embargo este efecto parece verse invertido en el aislamiento M45, el cual requirió más días para producir esclerocios y fue el que menos produjo, en este caso cabe mencionar que este aislamiento se caracterizó por producir un micelio más denso y a la vez compacto en comparación con los demás aislamientos evaluados, que quizás igualaría o superaría en cantidad al de un aislamiento que haya tenido un mayor diámetro de colonia. Por lo tanto consideramos que la variable cantidad de micelio producido en medio líquido, quizás, nos habría ayudado a determinar estas relaciones con mayor certidumbre, por lo que se sugiere incluir esta variable en estudios posteriores.

En tanto la variable virulencia tuvo correlación negativa con todas las demás variables, es decir, a más días a producción de esclerocios, mayor número de esclerocios, mayor diámetro de colonia, menor virulencia, esto parece contrario a lo reportado en otros hongos donde se ha evaluado la presencia de micovirus como es el caso de *Sclerotinia sclerotiorum* (Boland y Smith, 1991, y Boland, 1992), y *Rhizoctonia solani* (Castanho y Butler, 1978 y Castanho *et al.*, 1978), donde el incremento de la virulencia esta directamente relacionada con características como la mayor producción de formas propagativas, mayor desarrollo de colonia en medio de cultivo, y en consecuencia mayor rapidez para producir las ya mencionadas formas propagativas. Estas características aseguran la supervivencia de estos aislamientos, sin embargo en el caso de *S. cepivorum* esta relación no se

cumple, quizás debido a que las formas propagativas de este hongo son muy eficientes, cabe recordar que sólo es necesario 0.1 esclerocios por Kg de suelo para producir una incidencia del 100 % (Delgadillo, 1998).

La correlación negativa entre las variables DC y DPE, se manifiesta en el aislamiento M16, el cual fue el que menos días requirió para producir esclerocios (14.33), y el que mayor diámetro de colonia alcanzó (81.280), esto se explica por que al prolongarse el crecimiento en micelio se posterga la producción de formas propagativas.

La correlación negativa DC y NE se complementa con la anterior, ya que al postergarse la producción de formas propagativas, estas se producen en menor cantidad.

La gran variabilidad encontrada en los aislamientos evaluados, se manifestó de manera casi imperceptible en características cualitativas, ya que casi no se presentaron diferencias en color y forma de colonia. A este respecto Peever y colaboradores (1998), demostraron que la morfología no siempre es buen indicativo de la presencia de ARNcd. Sin embargo, la variabilidad se hizo notable de manera significativa en todas las variables cuantitativas, al encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0.05$) entre los aislamientos evaluados.

4.2. Extracción de ARNcd y electroforesis

En cuanto a la prueba de extracción de ARNcd se detectó su presencia en los aislamientos M4, M7, M13 M14 y M17 (Figura 6 y 7). Debido a que en este trabajo se utilizó una técnica de extracción de ARNcd (Valverde, 1990), que proporciona la suficiente seguridad de que sólo se obtiene esta forma de ácido nucleico, y a que su alto peso molecular (1.46×10^6 daltones) evita ubicarlo como ARN endógeno del hongo, sino como exógeno, estos resultados permiten ubicar a este ácido nucleico como un micovirus, ya que su peso es muy próximo a los reportados para estos (Hollings, 1982 y Mier, 1994). Castanho y colaboradores (1978), reportaron en *R. solani* tres fragmentos de ARNcd con pesos moleculares de 2.2, 1.5 y 1.1×10^6 daltones, de manera similar a los fragmentos encontrados en el presente trabajo (Cuadro 6).

En la Figura 7, aislamiento M4, se aprecia la presencia de un fragmento de ARNcd cuyo peso molecular podría ubicarse en el rango de 0.8 a 0.9×10^6 daltones (1.44 Kbp), que por su peso no podría incluirse dentro de los rangos reportados para los micovirus, y quizás por ello podría considerársele como endógeno del hongo. Sin embargo, Mier (1994) y Hollings (1982) reportan que los micovirus pueden estar compuestos por 1-8 fragmentos, los cuales pueden variar en peso molecular, lo cual es frecuente en los hongos que presentan

estos virus. Nuss (1992) reporta en *C. parasitica* un fragmento de peso similar a este.

Cuadro 6. Comparación de resultados de extracción del ARNcd con otros reportes.

HONGO HOSPEDANTE	PESO MOLECULAR DEL ARNcd	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EN MEDIO DEL CULTIVO	AUTOR
<i>Cryphonectria parasitica</i>	2.613 Kbp 0.851 Kbp	Crecimiento lento Perdida de pigmentación	Nuss, 1992
<i>Sclerotinia homeocarpa</i>	2.7 Kpb	Crecimiento lento, margenes atípicos, Micelio tipo cadena	Zhou y Boland, 1997
<i>Rhizoctonia solani</i>	6.4 Kbp	Se encontró el ARNcd tanto en aislamientos virulentos como hipovirulentos	Bharathan y Tavantzis, 1990
<i>Rhizoctonia solani</i>	6.4 Kbp en el aislamiento virulento 3.6 kbp en el hipovirulento	Disminución de taza de crecimiento	Lian, Lakshman y Tavantzis, 1997
<i>Sclerotinia sclerotiotum</i>	Aprox. 9 Kbp	Disminución en crecimiento y pigmentación	Boland, 1992
<i>Sclerotium cepivorum</i>	Aprox. 2.49 Kbp y 1.44 Kbp	Variaciones no ligadas a ARNcd	Presente trabajo

La relación entre la presencia de ARNcd y DPE no fue consistente, ya que el aislamiento que requirió más días para producir esclerocios (M7) presentó ARNcd, sin embargo esto no ocurre con los demás aislamientos que se aproximan a este aislamiento en esta característica, por lo que no se puede considerar una característica ligada a la presencia de ARNcd. De acuerdo a Castanho (1978) y a Boland y Boland y Smith (1991), la presencia de ARNcd

ligada a variaciones morfológicas puede relacionarse con características como alargamiento del periodo a producción de estructuras propagativas. Los mismos autores anteriores también relacionan la disminución en el número de estructuras propagativas producidas con la presencia de ARNcd, lo cual en los resultados obtenidos encontrados en el presente trabajo no tiene consistencia, incluso el aislamiento M7 que fue el que más esclerocios produjo, y a la vez presentó ARNcd, esto además confirma la correlación positiva entre las variables DPE y NE. En cuanto a la variable DC, tampoco tiene consistencia en su relación con la presencia de ARNcd.

La variable VIR resulta ser la de mayor interés para el presente estudio. En esta se observó que el aislamiento M14 es el más patogénico y el M17 uno de los menos patogénicos, lo cual sugiere que la presencia de ARNdc puede estar influyendo en el incremento o decremento de la virulencia (Zhang *et al.*, 1994). Esta situación también se presenta en *C. parasítica*, donde la presencia de ARNcd ha sido muy estudiada y donde se ha encontrado el fenómeno de hipovirulencia tanto en América del Norte, como en Europa y parte de Asia. En Japón y China se han localizado aislamientos conteniendo ARNcd que se encuentran estrechamente relacionados con los hipovirus encontrados en Europa y Norteamérica los que al parecer no tienen un efecto directo en el comportamiento patogénico del hongo (Peever *et al.*, 1998). Podríamos sugerir que a la luz del conocimiento actual, de a gran diversidad de ARNcd presentes en hongos, pocos pueden ser considerados controles

biológicos potenciales, pero su presencia en hongos fitopatógenos puede ser indicativo de la posibilidad de que dentro de su variabilidad genética de dichas partículas pueda encontrarse el fenómeno de hipovirulencia. La presencia en otros aislamientos puede ser explicada por la ya mencionada gran variabilidad de ARNcd que pueden ser encontrados en una sola especie de patógeno sin que en forma general estén asociadas a la hipovirulencia, pero si de manera particular (Bharathan and Tavantzis, 1990).

La presencia de los fragmentos de ARNcd de bajo peso molecular en los aislamiento M4 y M13 tampoco fueron consistentemente relacionados con la variabilidad de las características evaluadas en estos 15 aislamientos de *S. cepivorum*.

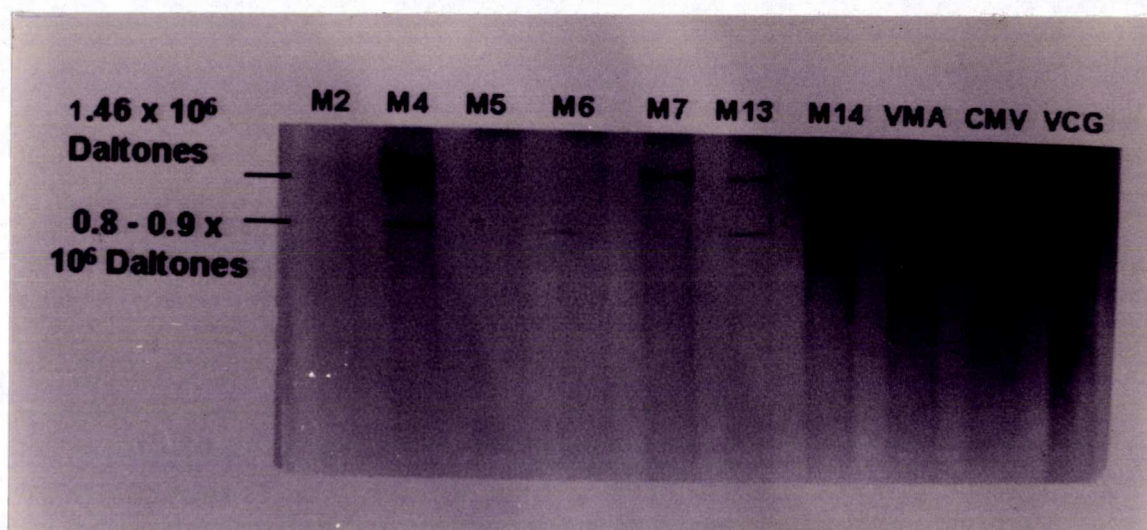


Figura 6. Gel de electroforesis de las pruebas de extracción de ARNcd de los aislamientos M2, M4, M5, M6, M7, M13, M14. Marcadores de peso molecular Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus de Mosaico del pepino (CMV), y Virus críptico de girasol.

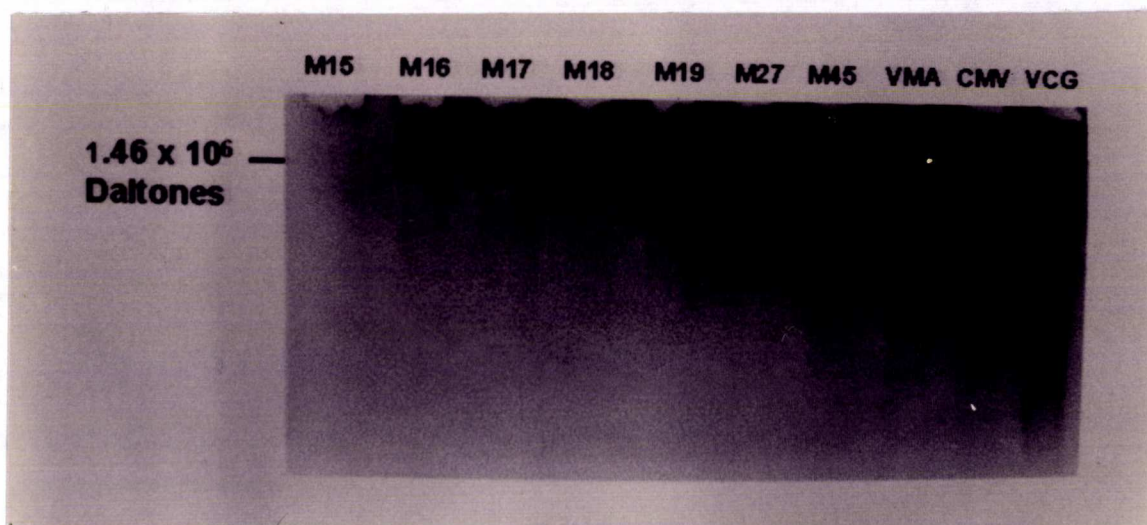


Figura 7. Gel de electroforesis de las pruebas de extracción de ARNcd de los aislamientos M15, M16, M17, M18, M19, M27, M45. Marcadores de peso molecular Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus de Mosaico del pepino (CMV), y Virus críptico de girasol.

Cabe hacer mención la frecuencia con que el ARNcd fue encontrado en estos aislamientos de *S. cepivorum*, (5 de 15 aislamientos estudiados), lo que abre la posibilidad de que en otros aislamientos se encuentre algún ARNcd que corresponda a un hipovirus, como sucede en el caso de *C. parasítica*, donde se ha encontrado gran cantidad de ARNcd, y sólo algunos han sido responsables del fenómeno de hipovirulencia. Sin embargo, estos hipovirus han sido estrechamente relacionados genéticamente con algunas partículas de ARNcd que no tienen relación comprobable con el fenómeno de hipovirulencia, y muchos de estos ARNcd relacionados genéticamente con los hipovirus traídos de Europa, han sido encontrados en aislamientos de *C. parasítica* de Asia, los

cuales se les considera posibles antecesores de los hypovirus en este hongo (Peever *et al.*, 1998). Es decir, el simple hecho de la presencia de ARNcd con tanta frecuencia en este hongo abrió la posibilidad de estudiar otros aislamientos, donde quizás por evolución pudo haberse presentado ARNcd ligado al fenómeno de hipovirulencia. Así la presencia de ARNcd en *S. cepivorum*, puede ser el inicio de la búsqueda, del fenómeno de hipovirulencia en este importante patógeno.

La posible utilización de los micovirus y los hipovirus para el estudio de la trasducción de señales en el proceso de patogénesis (Palese, 1995), ha adquirido mayor importancia en los últimos años, lo que incrementa la importancia de su estudio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten sugerir que se pueden incluir otras variables de caracterización de aislamientos en trabajos posteriores con este u otro hongo, ejemplos de estas variables a incluir son la viabilidad de los esclerocios producidos o cualquier otro tipo de forma propagativa según el caso del patógeno estudiado, la transmisibilidad del ARNcd a su descendencia, así como las características ligadas a este ácido nucleico si las hubiese. Un ejemplo de esto sería la medición de la cantidad de micelio producido en medio de cultivo líquido como se mencionó anteriormente. Estas características ya han sido evaluadas en otros estudios (Castanho *et al.*, 1978 y Boland 1992).

V. CONCLUSIONES

1. Existen partículas de ARNcd en los aislamientos M4, M7, M13, M14 y M17 de *Sclerotium cepivorum* con un peso molecular aproximado de 1.46×10^6 daltones (2.48 kpb).
2. El ARNcd encontrado no parece estar relacionado con la variabilidad en los aislamientos de *S. cepivorum* estudiados.
3. La presencia de ARNcd en *S. cepivorum* es frecuente en un 33.33% (5 de 15 aislamientos).
4. Resulta necesario la evaluación de otras variables en la caracterización de aislamientos, tales como viabilidad de los esclerocios producidos, cantidad de micelio producido y alteraciones morfológicas entre otras.
5. Es necesario evaluar también la transmisibilidad del ARNcd a la progenie.
6. Es necesaria la búsqueda de corpúsculos a nivel celular, como un complemento adecuado al presente trabajo.
7. Es necesaria la caracterización de estos ácidos nucleicos encontrados.

VI. LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C. J., Mims, Ch., W. 1985. Introducción a la Micología. De, Omega S.A. 580 p.
- Anagnostakis, S. L., Chen, B., Geltka, L., M., Nuss, D., L. 1998. Hypovirus Transmission to Ascospore Progeny by Field-Released Transgenic Hypovirulent Strains of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 88:598-604.
- Bharathan, N., and Tavantzis, S. M. 1990. Genetic Diversity of Double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 80: 631-635.
- Boland, G., J., and Smith, E., A. 1991. Variation in Cultural Morphology and Virulence among Protoplast-regenerated Isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81: 766-770
- Boland, G.,J. 1992. Hypovirulence and Double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 10-17.
- Boland, G.,J., Mould⁺ M., J., R., Robb⁺, J. 1993. Ultrastructure of Hypovirulent Isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* containing Double-stranded RNA. *Plant Pathology* 43: 21-32.

- Brix, H., D. and Zinkernagel, V. 1992. Effects of cultivation, conditioning and isolate on *Sclerotium* germination in *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathology. 41: 13-19.
- Castanho, B., Butler, E., E. 1978. Rhizoctonia decline: Studies and hypovirulence and potential use in biological control. Phytopathology 68: 1511-1514.
- Castanho, B., Butler, E., E., Shepherd R., J. 1978. The association of double-stranded RNA with Rhizoctonia decline. Phytopathology. 68: 1515-1519.
- Coley-Smith, J. R. 1985. Methods for the production and use of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in field germination studies. Plant Pathology. 34: 380-384.
- Crowe, F., J. and Hall, D., H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. Phytopathology 70:74-78.
- Crowe, F., J. And Hall, D., H. 1980. Vertical distribution of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and host root systems relative to White rot of onion and garlic. Phytopathology. 70:70-73.

Crowe, D., H., Greathead, A., S. and Baghott, K., G. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology*. 70: 64-69.

Delgadillo, S., F. 1998. "Control integrado de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Texcoco, Méx. 86 p.

FAO. 1999. Estadísticas de producción agrícola. www.fao.org.

Heininger, U. and Rigling, D. 1994. Biological Control of Chestnut Blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology*. 32:581-599.

Hollings, M. 1982. Mycovirus and plant pathology. *Plant Disease*. 66:12 1106-1112.

Nuss, D., L. 1992. Biológico control of Chestnut Blighth: an Example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews*. 56:561-576.

ICTV. 1999. WWW. Virology. Net/Big_virology/Bvhomerpage.htm/.

- Mier, T. 1994. Los micovirus: partículas extracromosómicas de los hongos, un enfoque novedoso dentro de la micología. *Revista Mexicana de Micología*.10:161-179.
- Palese, P. 1995. Genetic engineering of infectious negative.strand RNA viruses. Elsevier Science. 966.
- Peever, T., L., Liu, Y., C., Milroon, M., G. 1997. Diversity of hypoviruses and other Double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasítica* in North America. *Phytopathology* 87: 1026-1033.
- Peever, T. L., Liu, Y. C., Wang, K., Hilman, B., I., Foglia, R., and Milgroom, M. G. 1998. Incidence and diversity of double-stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China and Japan. *Phytopathology* 88:811-817
- Redondo, J., E., Salinas, G., J., Cárdenas, S., E. 1993. Diseminación de *Sclerotium cepivorum* Berkeley por la semilla de ajo. *Rev. Mexicana de Fitopatología* 11: 172-174.
- Romero, C., S. 1988. Hongos Fitopatógenos. UACH. Pag 342.
- SAGAR. 1997. Centro de Estadística Agropecuaria. Producción del Año Agrícola 1997 de Ajo y Cebolla.

SARH. 1976. Primer catálogo de enfermedades de las plantas mexicanas.

Fitofilo 71. Año XXIX. 114-115

Schafleitner, R., and Wilhelm, E. 1997. Effect of virulent and hypovirulent *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. on the intercellular pathogen related proteins and on total protein pattern of chestnut (*Castanea sativa* Mill.).

Shapira, R., Choi, G., H., Nuss, D., L. 1991. Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. The Embo Journal. 10:731-739.

Smart, D.,C., Fulbright, D., W. 1995. Characterization of a strain of *Cryphonectria parasitica* Double infected with Hypovirulence Associated dsRNA viruses. Phytopathology 85: 491- 494.

Somerville, P., A. and Hall, D., H. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation, and germination stimulants to reduce inoculum density. Plant Disease. 71: 229-233.

- Valverde, R., A. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74: 255-258.
- Van Alfen, N., K., Jaynes, R., A., Anagnostakis, S., L., Day, P., R. 1975. Chestnut blight: Biological control by transmissible hypovirulence in *Endothia parasítica*. *Science* 189: 890-891.
- Zhang, R., Dickinson, M., J., and Pryor A. 1994. Double-stranded RNAs in the rust fungi. *Annu. Rev.* 32: 115-133.
- Zhou, T., and Boland, G., J. 1997. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia homeocarpa*. *Phytopathology* 87: 147-153.

