

Transformación del hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berk empleando fusión de protoplastos*

Transformation of the phytopathogenic fungus *Sclerotium cepivorum* Berk using protoplasts fusion

Gerardo Acosta-García¹, Miguel Ángel Pantoja-Hernández¹, Claudia Ivonne Muñoz-Sánchez¹, Cristina Pérez-Pérez¹, Ramón Gerardo Guevara-González², Irineo Torres-Pacheco³, Felipe Delgadillo-Sánchez², Mario Martín González-Chavira² y Lorenzo Guevara-Olvera^{1§}

¹Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y A. García Cubas S/N, Celaya, Guanajuato, México, C. P. 38010. Tel. 01 461 6117575, Ext. 324 y Fax, Ext. 402. (gerardo.acosta@itcelaya.edu.mx); (phma001@yahoo.com.mx; civonne@itc.mx; cristina_perez@itc.mx; lorenzogo@yahoo.com). ²Unidad de Biotecnología del Bajío. Campo Experimental Bajío- INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Celaya, Guanajuato, México. (delgadillo.felipe@inifap.gob.mx; gonzalez.mario@inifap.gob.mx). ³Ingeniería de Biosistemas. Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de Querétaro. C. P 76010. Santiago de Querétaro, Querétaro. México; torresirineo@gmail.com §Autor para correspondencia: lorenzogo@yahoo.com.

Resumen

La pudrición blanca, una de las enfermedades más preocupantes para los productores de ajo (*Allium sativum*), es causada por el hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berk. Con el fin de desarrollar procedimientos de biología molecular para el hongo, en este trabajo se describe un método de transformación empleando fusión de protoplastos en presencia de polietilenglicol 3350 (PEG). Se empleó el plásmido pAN7-1 que confiere resistencia a higromicina B, el cual contiene el gen higromicina fosfotransferasa B (*hph*) de *Escherichia coli* bajo el promotor gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*gpdA*) y el terminador antranilato sintetasa (*trpC*) del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Las transformantes recuperadas en el medio de cultivo de regeneración papa dextrosa agar-sorbitol (PDA-S) en presencia de 200 µg mL⁻¹ de higromicina B se analizaron amplificando un fragmento del gen bacteriano *hph* mediante PCR con oligonucleótidos específicos: Hig 1, Sentido 5' GAC CTG CTG AGG TCC CTC 3' y Hig 2, antisentido 5' GCC CTC GGA CGA GTG CTG 3'. Se obtuvieron frecuencias de 12-18 transformantes de *S. cepivorum* por µg de ADN vector. Los resultados descritos en el presente

Abstract

White rot, a disease of most concern to the producers of garlic (*Allium sativum*), is caused by the phytopathogenic fungus *Sclerotium cepivorum* Berk. In order to develop procedures of molecular biology to the fungus, in this paper we describe a transformation method using fusion of protoplasts in the presence of polyethylene glycol 3350 (PEG). We used the plasmid pAN7-1 which confers resistance to hygromycin B, which contains the hygromycin phosphotransferase gene B (*hph*) from *Escherichia coli* under the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase promoter (*GPDA*) and the anthranilate synthase terminator (*trpC*) of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. The recovered transformants in the regeneration medium potato dextrose agar-sorbitol (PDA-S) in the presence of 200 µg mL⁻¹ of hygromycin B were analyzed by amplifying a fragment of the bacterial gene *hph* by PCR with specific oligonucleotides: Hig 1, Sentido 5' GAC CTG CTG AGG TCC CTC 3' and Hig 2, antisentido 5' GCC CTC GGA CGA GTG CTG 3'. Obtaining 12-18 frequencies of transformants of *S. cepivorum* per µg of vector DNA. The results described in

* Recibido: febrero de 2012
Aceptado: julio de 2012

trabajo contribuirán en la caracterización molecular de genes involucrados en el fenómeno de patogénesis de *S. cepivorum* sobre el ajo.

Palabras clave: *Allium sativum*, gen *hph* de *Escherichia coli* *Sclerotium cepivorum*, señales de expresión de *Aspergillus nidulans*, pudrición blanca.

Introducción

El ajo (*Allium sativum* Linnaeus) es uno de los cultivos vegetales económicamente más importantes en diferentes países incluyendo México. En nuestro país el estado de Guanajuato se destaca por su producción. La pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk, es la enfermedad predominante en las cosechas de ajo en México. El hongo produce estructuras de resistencia denominadas esclerocios, éstos pueden sobrevivir en el suelo hasta por 20 años y su germinación se induce por la presencia de exudados de la raíz del ajo, específicamente por los disulfuros de dialilo (Coley-Smith *et al.*, 1990). Entre los métodos empleados para el control de la pudrición blanca, destacan la aplicación intensiva de fungicidas (Delgadillo-Sánchez *et al.*, 2004); sin embargo, éste enfoque es cada vez menos práctico dado que los microorganismos del suelo adquieren tolerancia degradando los compuestos aplicados. Se han empleado varias estrategias alternativas para el control de la pudrición blanca como parte de un programa de control integrado que incluye prácticas culturales como solarización del suelo y control biológico (McLean *et al.*, 2001; Delgadillo-Sánchez *et al.*, 2004), desafortunadamente, se requiere la aplicación de fungicidas para un manejo efectivo con estos sistemas.

Por otro lado, el análisis de los eventos moleculares que conducen a la patogénesis de hongos que afectan cultivos de importancia en México y el mundo son prácticamente desconocidos, una de las limitantes es la ausencia de un método de transformación que permita determinar la función de los genes involucrados en el fenómeno. Se han descrito diferentes procedimientos de transformación para los hongos, incluyendo tratamientos por medio de iones metales alcalinos (Ito *et al.*, 1983), perlas de vidrio (Costanzo y Fox, 1988), electroporación (Sánchez *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 2011), biobalística (Klein *et al.*, 1987), integración mediada por enzimas de restricción (REMI) (Kim *et al.*, 2002; Turgeon *et al.*, 2011) y *Agrobacterium tumefaciens* (Gouka

this paper will contribute to the molecular characterization of the genes involved in the phenomenon of pathogenesis of *S. cepivorum* on garlic.

Key words: *Allium sativum*, *hph* gene of *Escherichia coli*, *Sclerotium cepivorum*, expression signals of *Aspergillus nidulans*, white rot.

Introduction

Garlic (*Allium sativum* Linnaeus) is one of the most economically important crops in different countries including Mexico. In our country, the State of Guanajuato is known for its production. The white rot caused by the fungus *Sclerotium cepivorum* Berk is the predominant disease in Mexico. This fungus produces resistance structures called sclerotia, they can survive in soil for up to 20 years and germination is induced by the presence of root exudates of garlic, specifically by diallyl disulfides (Coley-Smith *et al.*, 1990).

The methods used for the control of white rot, highlight the extensive use of fungicides (Delgadillo-Sánchez *et al.*, 2004); however, this approach is increasingly less practical, because the soil microorganisms become tolerant, degrading the compounds applied. Several alternative strategies have been used for controlling white rot as part of an integrated control program including cultural practices such as soil solarization and biological control (McLean *et al.*, 2001, Delgadillo-Sánchez *et al.*, 2004), unfortunately, it requires the application of fungicides to effectively manage these systems.

On the other hand, the analysis of the molecular events leading to the pathogenesis of fungi that affect important crops in Mexico and the world are virtually unknown, one of the limitations is the absence of a transformation method that allows determining the role of genes involved in the phenomenon. Different procedures have been described for transformation of fungi, including treatment by means of alkali metal ions (Ito *et al.*, 1983), glass beads (Costanzo and Fox, 1988), electroporation (Sánchez *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 2011), biolistics (Klein *et al.*, 1987), mediated integration by restricting enzymes (REMI) (Kim *et al.*, 2002; Turgeon *et al.*, 2011) and *Agrobacterium tumefaciens* (Gouka *et al.*, 1999; Cardoza *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Sharma and Kuhad, 2010), among others. The most common method for transformation of fungi requires the production of

et al., 1999; Cardoza *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Sharma y Kuhad, 2010), entre otros. El procedimiento comúnmente empleado para la transformación de hongos requiere la producción de esferoplastos o protoplastos, los cuales, se mezclan con un plásmido adecuado que posee el gen de interés y una secuencia promotora apropiada, entonces las células se fusionan usando polietilenglicol (PEG) y el ADN transformante frecuentemente se integra dentro del genoma del hongo (Fincham, 1989; Sivan *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 2010; Turgeon *et al.*, 2011). La incorporación del ADN transformante dentro del hospedante depende de la construcción del plásmido de expresión (Esser y Mohr, 1986). Dado que los orígenes de replicación de procariotes no funcionan en organismos eucariotes, se han descrito algunos plásmidos de hongos.

El primero de ellos se descubrió en *Saccharomyces cerevisiae* (Beggs, 1978), posteriormente, se han aislado plásmidos de hongos filamentosos como *Podospora anserina* (Javerzat *et al.*, 1993) y orígenes de replicación autónoma del hongo basidiomiceto patógeno de maíz *Ustilago maydis* (Tsukuda *et al.*, 1988), entre otros. El desarrollo de los sistemas de transformación requiere marcadores de selección que permitan el reconocimiento de la cepa transformada. Los marcadores auxotróficos se han empleado para complementar un gen del hospedante no funcional con el gen previamente *vgr* clonado, los genes *trpC* y *argB* en *Aspergillus nidulans* (John y Peberdy, 1984; Yelton *et al.*, 1984) y el gen *Pyr4* de *Neurospora crassa* para complementar la mutante *Pyr4* de *A. nidulans* (Balance *et al.*, 1983).

Por lo tanto, el empleo de marcadores de selección auxotróficos requiere que la cepa hospedante posea la mutación apropiada. Los marcadores de selección dominantes permiten el reconocimiento de la cepa transformada en base a la resistencia a antibióticos. Los genes neomicina *Tn5* (Rambosek y Leach, 1987), *higromicina fosfotransferasa B (hph)*; Punt *et al.*, 1987) y *OliC3* de *A. niger*, el cual, confiere resistencia a oligomicina (Ward *et al.*, 1988) son ejemplos de tales sistemas. El gen *amdS* (acetamidasa) de *A. nidulans* se ha usado como un marcador de selección dominante en *A. niger*, el cual, es incapaz de emplear la acetamida como única fuente de carbono (Kelly y Hynes, 1985). El vector de expresión también incluye el promotor, las secuencias regulatorias de la transcripción y un sitio de clonación múltiple, en el cual la región codificante heteróloga se inserta. Se han reportado una amplia variedad de promotores y secuencias regulatorias de la transcripción en la construcción de los plásmidos

spheroplasts or protoplasts, which are mixed with a suitable plasmid possessing the gene of interest and an appropriate promoter sequence, then the cells are fused using polyethylene glycol (PEG) and transforming DNA, often integrated into the genome of the fungus (Fincham, 1989; Sivan *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 2010; Turgeon *et al.*, 2011). The incorporation of the transforming DNA into the host depends on the construction of the plasmid expression (Esser and Mohr, 1986). Since the prokaryotic origin of replication does not work in eukaryotic organisms, some plasmids have been described in fungi.

The first one was discovered in *Saccharomyces cerevisiae* (Beggs, 1978), subsequently, plasmids of filamentous fungi have been isolated, such as *Podospora anserina* (Javerzat *et al.*, 1993) and autonomous replication origins of the basidiomycete fungal pathogen of maize *Ustilago maydis* (Tsukuda *et al.*, 1988), among others. The development of transformation systems requires selectable markers that allow recognition of the transformed strain. Auxotrophic markers were used to complement a host gene with the nonfunctional previously gene *vgr* cloned, *argB* and *trpC* gene in *Aspergillus nidulans* (John and Peberdy, 1984; Yelton *et al.*, 1984) and the *Pyr4* gene of *Neurospora crassa* to complementing the mutant *Pyr4* of *A. nidulans* (Balance *et al.*, 1983).

Therefore, the use of auxotrophic selectable markers requires that, the host strain possesses the appropriate mutation. Dominant selection markers allow the recognition of the transformed strain based on antibiotic resistance. The *Tn5* neomycin genes (Rambosek and Leach, 1987), *hygromycin phosphotransferase B hph*; Punt *et al.* (1987) and *OliC3* of *A. niger*, which confers resistance to oligomycin (Ward *et al.*, 1988) are examples of such systems. *AmdS* gene (acetamidase) of *A. nidulans* has been used as a dominant selectable marker in *A. niger*, which is unable to use acetamide as sole carbon source (Kelly and Hynes, 1985). The expression vector also contains the promoter, the regulatory sequences of transcription and a multiple cloning site, wherein the heterologous coding region is inserted. A variety of promoters and transcription regulatory sequences have been reported in the construction of plasmids and transformants have reported different inducible and constitutive promoters. The choice for the promoter depends on the conditions under which it is intended to produce the heterologous protein.

The regulatory sequences promoters of the gene *AlcA* which encodes for the alcohol dehydrogenase I of *A. nidulans* (Gwynne *et al.*, 1987) and the *glucoamylase* gene of *A. niger*

transformantes y se han descrito diferentes promotores inducibles y constitutivos. La elección del promotor depende de las condiciones bajo las cuales se pretende producir la proteína heteróloga. La secuencias regulatorias promotoras del gene *AlcA*, que codifica para la alcohol deshidrogenasa I de *A. nidulans* (Gwynne *et al.*, 1987) y del gen *glucoamilasa* de *A. niger* (Gwynne *et al.*, 1987) son ejemplos de promotores inducibles. Los promotores de los genes α -amilasa de *A. oryzae* (Christensen *et al.*, 1988), *adhA* de *A. niger* (Saunders *et al.*, 1989), *triosa-fosfato isomerasa (tpi)* y *gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (gpdA)* de *A. nidulans* (Van Gorcom *et al.*, 1986; Upshall *et al.*, 1987) se han usado para la expresión constitutiva. El presente trabajo tuvo el objetivo de proponer un protocolo para la transformación de *S. cepivorum* mediante fusión de protoplastos con polietilenglicol (PEG) empleando el plásmido pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987), el cual posee el gen *hph* de *Escherichia coli* bajo el promotor *gpdA* y el terminador de la transcripción *trpC* del hongo filamentoso *A. nidulans*.

Materiales y métodos

Cepas, plásmido y reactivos

La cepa C2 de *Sclerotium cepivorum* (un aislado de Cortazar, Guanajuato), actualmente ubicada en el cepario del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas Pecuarias (INIFAP), fue mantenida en agar papa dextrosa (PDA). Las células químicamente competentes de *Escherichia coli* TOP 10 fueron adquiridas de Invitrogen (Carlsbad, CA), almacenadas a -80 °C y empleadas para la amplificación del plásmido pAN7-1 (número de acceso Z32698), Punt *et al.* (1987) el cual, se usó para la transformación de protoplastos de *S. cepivorum*. Para el crecimiento del hongo se usaron los medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y papa dextrosa líquido (PDB) de DIFCO (Detroit, MI). *E. coli* TOP 10 se cultivó en el medio Luria Bertani (LB), adicionado de ampicilina a una concentración final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la selección del plásmido. De Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) se adquirieron ampicilina (A2804), enzimas líticas (L 1412), polietilenglicol 3 350 (P 2139), sorbitol (S 7547), higromicina B (H 3274), ácido 3-(N-morfolino)-propanolsulfónico (MOPS; M 9024) y perlas de vidrio (425-600 μm , G 8772). De Promega (Madison, WI) se obtuvo la enzima de restricción *Hind* III empleada para linealizar el plásmido pAN7-1.

(Gwynne *et al.*, 1987), examples of inducible promoters. The promoters of the α -amylase genes of *A. oryzae* (Christensen *et al.*, 1988), *Adha* of *A. niger* (Saunders *et al.*, 1989), *triose-phosphate isomerase (tpi)* and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD)* of *A. nidulans* (Van Gorcom *et al.*, 1986; Upshall *et al.*, 1987) have been used for constitutive expressions. The present work aimed to propose a protocol for the transformation of *S. cepivorum* by fusion it with protoplasts polyethylene glycol (PEG) using the plasmid pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987), which has the *hph* gene of *Escherichia coli* under the *GPD* promoter and *trpC* transcription terminator of the filamentous fungus *A. nidulans*.

Materials and methods

Strains, plasmids and reagents

The strain C2 of *Sclerotium cepivorum* (an isolate of Cortazar, Guanajuato) located in the culture collection of the National Research Institute of Agricultural Forestry Research (INIFAP) was maintained in potato dextrose agar (PDA). Chemically competent cells of *Escherichia coli* TOP 10 were acquired from Invitrogen (Carlsbad, CA), stored at -80 °C and used for amplification of the plasmid pAN7-1 (accession number Z32698), Punt *et al.* (1987), which was used for transformation of Protoplasts of *S. cepivorum*. For the growth of the fungus culture media potato dextrose agar (PDA) and potato dextrose liquid (PDB) were used from DIFCO (Detroit, MI). *E. coli* TOP 10 were cultured in Luria Bertani (LB), ampicillin added at a final concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for the plasmid selection. From Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) were purchased ampicillin (A2804), lytic enzymes (L 1412), polyethylene glycol 3 350 (P 2139), sorbitol (S 7547), hygromycin B (H 3274), acid 3- (N-morpholino)-propanolsulphonic (MOPS; M 9024) and glass beads (425-600 μm , G 8772). From Promega (Madison, WI) was obtained *Hind* III restriction enzyme used to linearize the plasmid pAN7-1.

Hygromycin B effect on the development of *S. cepivorum*

Petri dishes were prepared containing 28 mL of PDA medium and different concentrations of hygromycin B (0, 50, 100, 200, 300 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), subsequently placed a disk of 1 cm^2 of mycelium in the center of each box. The dishes were incubated at 16 °C and observed every 12 hours to register the growth of the fungus.

Efecto de la higromicina B en el desarrollo de *S. cepivorum*

Se prepararon cajas de Petri conteniendo 28 mL de medio PDA y diferentes concentraciones de higromicina B (0, 50, 100, 200, 300 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), posteriormente se colocó un disco de micelio de 1 cm^2 en el centro de cada caja. Las cajas se incubaron a 16 °C y se observaron cada 12 h para registrar el crecimiento del hongo.

Obtención de micelio

El micelio de *S. cepivorum* se obtuvo transfiriendo 200 esclerocios procedentes de una caja de Petri conteniendo PDA a 100 mL de caldo PDB, incubando a 16 °C y 75 rpm durante 96 h. El micelio se cosechó empleando un dispositivo de filtración Corning (Acton, MA) de 150 mL para la obtención de 1 g de micelio.

Obtención de protoplastos

El micelio se resuspendió y lavó con 15 mL de medio osmótico MO (fosfato de sodio, 10 mM; sulfato de magnesio, 1.2 M; pH= 5.8), centrifugando a 5 000 rpm a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se descartó y se repitió el procedimiento de lavado tres veces (3X). El micelio se resuspendió en 10 mL de regulador MO conteniendo 200 mg de enzimas líticas (Lysing Enzymes; L 1412, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; con actividades reportadas de celulasa, proteasa y quitinasa) incubando a 28 °C durante 5 h hasta la obtención de los protoplastos.

Los protoplastos fueron cosechados por centrifugación a 2 100 rpm a 4 °C durante 10 min y resuspendidos en 10 mL de medio osmótico MO empleando una micropipeta de 1 000 μL con puntas estériles. 10 mL de regulador de atrapamiento RA (Ácido 3-(N-morfolino)-propanesulfónico, 100 mM; Sorbitol, 0.6 M; pH= 6.5) fueron adicionados suavemente por la pared interna del tubo. Los protoplastos fueron centrifugados a 5 000 rpm a 4 °C durante 10 min, atrapados en la interfase (aprox. 5 mL), cosechados con la ayuda de una micropipeta de 1 000 μL y colocados en un tubo Falcon de 50 mL. Inmediatamente después, se adicionaron 45 mL de regulador MS (MOPS, 10 mM; sorbitol, 1 M; pH= 6.5) y fueron sometidos a centrifugación a 2 100 rpm a 4 °C durante 10 min.

Posteriormente, los protoplastos fueron resuspendidos suavemente en 15 mL de regulador MSC (MOPS, 10 mM; sorbitol 1 M; cloruro de calcio, 20 mM; pH= 6.5) y centrifugados a 2 100 rpm a 4 °C durante 7 min repitiendo la operación dos veces (2x). La viabilidad de los protoplastos fue determinada en el medio de cultivo PDA-S (papa

Preparation of mycelium

The mycelium of *S. cepivorum* was obtained by transferring 200 sclerotia from a Petri dish containing PDA, 100 mL PDB broth, incubated at 16 °C and 75 rpm for 96 h. The mycelium was harvested using a filtration device Corning (Acton, MA) of 150 mL to obtain 1 g of mycelium.

Protoplasts gathering

The mycelium was suspended and washed with 15 mL of MO osmotic medium (sodium phosphate, 10 mM magnesium sulfate, 1.2 M, pH= 5.8), centrifuged at 5000 rpm at 4 °C for 10 min. The supernatant was discarded and the washing procedure was repeated three times (3x). The mycelium was suspended in 10 mL of MO regulator, containing 200 mg of lytic enzymes (Lysing Enzymes, L 1412, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; reported activities of cellulase, protease and chitinase) incubating at 28 °C for 5 h to obtain the protoplasts.

The protoplasts were harvested by centrifugation at 2100 rpm at 4 °C for 10 min and suspended in 10 mL of MO osmotic medium using a micropipette of 1 000 μL with sterile tips. 10 mL of RA entrapment regulator (acid 3-(N-morpholino)-propanesulphonic, 100 mM sorbitol, 0.6 M, pH= 6.5) were added slowly by the inner wall of the tube. The protoplasts were centrifuged at 5 000 rpm at 4 °C for 10 min, trapped at the interface (approximately 5 mL), harvested with the aid of a micropipette of 1 000 μL and placed in a 50 mL Falcon tube. Immediately thereafter, 45 mL of regulator MS were added (MOPS, 10 mM sorbitol, 1 M, pH= 6.5) and underwent centrifugation at 2 100 rpm at 4 °C for 10 min.

Then, the protoplasts were suspended gently in 15 mL of MSC regulator (MOPS, 10 mM sorbitol 1 M calcium chloride, 20 mM, pH= 6.5) and centrifuged at 2 100 rpm at 4 °C for 7 min, repeating the operation two times (2x). The viability of the protoplasts was determined in the culture medium PDA-S (potato dextrose agar, 0.7% sorbitol, 1 M). The morphology of the protoplasts was recorded in a light microscope Carl Zeiss using the target of 40 x.

Hygromycin B effect on the development of protoplasts

The protoplasts contained in 100 μL of aliquots (approx. $5\text{-}25 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) were placed in 15 mL Falcon tubes, adding 14 mL of soft PDB-S (potato dextrose liquid, 2.4% sorbitol, 1M,

dextrosa agar, 0.7%; sorbitol, 1 M). La morfología de los protoplastos se registró en un microscopio de luz Carl Zeiss empleando el objetivo de 40 x.

Efecto de la higromicina B en el desarrollo de los protoplastos

Los protoplastos contenidos en alícuotas de 100 μL (aprox $5\text{-}25 \times 10^7 \text{mL}^{-1}$) se colocaron en tubos Falcon de 15 mL, se adicionaron 14 mL de PDB-S suave (papa dextrosa líquido, 2.4%; sorbitol, 1M; agar, 0.7%), se mezclaron suavemente por inversión, se colocaron en placas de Petri y se incubaron a 16 °C durante 48 h para la regeneración de su pared celular. Posteriormente, se adicionaron 14 mL de medio de cultivo PDA-S, adicionado de higromicina B dando una concentración final de: 0, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las placas inoculadas por triplicado, se incubaron a 16 °C y se observaron cada 12 h para registrar el crecimiento.

Transformación

Para tratar de aumentar la eficiencia de transformación en el hongo, 1 μg de ADN del plásmido pAN7-1 se linearizó con la enzima de restricción *Hind* III en un volumen de 15 μL . Como control de la transformación a los protoplastos se le adicionaron 2 μL de agua desionizada estéril. El plásmido pAN7-1 linearizado fue precipitado, resuspendido en 2 μL de agua desionizada estéril y adicionado suavemente a los protoplastos e inmediatamente se agregaron 30 μL de PEG 3350 (60%, p/v) a temperatura ambiente, se mezcló suavemente y se incubaron en baño de hielo durante 30 min. A la mezcla de transformación se adicionaron gota a gota 900 μL de PEG 3350 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

La mezcla de transformación se cosechó centrifugando a 8 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta de 1 000 μL . Nuevamente, el paquete celular se sometió a centrifugación a 8 000 rpm durante 2 min y el sobrenadante se removió con la ayuda de una micropipeta de 200 μL . La mezcla de transformación se resuspendió en 500 μL de regulador MSC empleando la micropipeta de 1 000 μL . Se prepararon alícuotas de 100 μL en tubos Falcon de 15 mL y se adicionaron 14 mL de PDB-S.

El medio PDB-S conteniendo la mezcla de transformación se distribuyó por triplicado en placas de Petri para la selección de transformantes, en tanto como testigo se inocularon los protoplastos sin transformar. Los

agar, 0.7%), gently mixed by inversion, placed in Petri dishes and incubated at 16 °C for 48 h for the regeneration of the cell's wall, subsequently adding 14 mL of culture medium PDA-S added of hygromycin B giving a final concentration of 0, 50, 100, 200 and 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The inoculated plates by triplicate were incubated at 16 °C and were observed every 12 h to record its growth.

Transformation

For trying to increase the efficiency of the transformation in the fungus, 1 μg of DNA of the plasmid pAN7-1 was linearized with the restriction enzyme *Hind* III in a volume of 15 mL. As a control of transformation, protoplasts were added 2 L of sterile deionized water. The linearized plasmid pAN7-1 was precipitated, suspended in 2 L of sterile deionized water and added to the protoplasts, and immediately added 30 L of PEG 3 350 (60% w/v) at room temperature, mixed and incubated in an ice bath for 30 min. To the transformation mixture, 900 μL of PEG 3350 were added and incubated at room temperature for 30 min.

The transformation mixture was harvested by centrifuging at 8 000 rpm for 15 min at room temperature, discarding the supernatant with the aid of a micropipette 1 000 μL . Again, the cell pellet was subjected to centrifugation at 8 000 rpm for 2 min and the supernatant was removed with the aid of a micropipette with 200 μL . The transformation mixture was suspended in 500 L of regulator MSC using the micropipette 1 000 μL . Aliquots of 100 μL were prepared in 15 mL Falcon tubes, adding 14 ml of PDB-S.

PDB-S medium containing the transformation mixture was distributed in triplicate in Petri dishes for selection of the transformants, while as a control were inoculated untransformed protoplasts. Protoplasts were regenerated for 48 h, subsequently adding 14 mL of culture medium PDA-S, hygromycin B added giving a final concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The plates were incubated at 16 °C and were observed every 12 h until the appearance of colonies.

Selection of transformants by PCR

The transformants recovered on PDA added with hygromycin B were analyzed by PCR using the following specific oligonucleotides: Hig 1, Sentido 5' GAC CTG CTG AGG TCC CTC 3'; basis from 1911 to 1928 (10 microns); Hig 2, Antisentido 5' GCC CTC GGA CGA

protoplastos se regeneraron durante 48 h, posteriormente se adicionaron 14 mL de medio de cultivo PDA-S, adicionado de higromicina B dando una concentración final de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las placas se incubaron a 16 °C y se observaron cada 12 h hasta la aparición de colonias.

Selección de transformantes por PCR

Las transformantes recuperadas en PDA adicionado de higromicina B se analizaron por PCR empleando los siguientes oligonucleótidos específicos: Hig 1, Sentido 5' GAC CTG CTG AGG TCC CTC 3'; bases 1911-1928 (10 μm); Hig 2, antisentido 5' GCC CTC G GAC GAG TG CTG 3'; bases 3235-3252 (10 μm). El ADN de las transformantes y de la cepa control C2 se aisló empleando el método de extracción por hervido, adaptado de Holmes y Quigley (1981).

Para cada transformante y la cepa control se prepararon tubos Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 100 mg de perlas de vidrio de 450-600 μm y 150 μL de TE (Tris base, 50 mM; EDTA, 2 mM). Se transfirieron 2-3 mg de micelio con asa metálica a cada tubo y agitaron por vortex durante 2 min. Los tubos se sellaron con papel parafilm, se hirvieron durante 5 min y se sometieron a vortex durante 1 min. A cada tubo se le adicionaron 150 μL de una mezcla fenol: cloroformo (1:1, v:v), se agitó con la ayuda de un vortex por 1 min y se centrifugó a temperatura ambiente a 12 000 rpm durante 5 min.

Cada sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, se adicionaron 100 μL de cloroformo, se sometió a vortex por 1 min y se centrifugó como en el paso anterior. 1 μL de cada sobrenadante (aprox 50 ng) se empleó como templado para la reacción de PCR la cual, constó de 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: desnaturalización 94 °C, 60 seg; alineamiento 56 °C, 90 seg; síntesis 72 °C, 60 seg. Como control positivo fue empleado el plásmido pAN7-1 (50 ng). Los productos de PCR fueron revelados en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio y usando como marcador de tamaño 1 kb DNA Ladder, de promega.

Resultados

Sensibilidad *S. cepivorum* al antibiótico higromicina B

El micelio del hongo *S. cepivorum* mostró inhibición total de su crecimiento en medio PDA sólido a una concentración de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina B. En tanto, los protoplastos

GTG CTG 3'; bases 3235-3252 (10 μm). The DNA from the transformants and the control strain C2 was isolated using the boiling extraction method adapted from Holmes and Quigley (1981).

For each transformant and the control strain Eppendorf tubes were prepared 1.5 mL containing 100 mg of glass beads of 450-600 μm and 150 μL of TE (Tris base, 50 mM EDTA, 2 mM). 2-3 mg of mycelium were transferred with metal handle to each tube and shaken by vortex for 2 min. The tubes were sealed with parafilm, boiled for 5 min and subjected to vortexing for 1 min. To each tube were added 150 μL of a mixture phenol: chloroform (1:1, v:v) stirred with the aid of a vortex for 1 min and centrifuged at room temperature at 12 000 rpm for 5 min.

Each supernatant was transferred to a sterile Eppendorf tube adding 100 μL of chloroform, subjected to vortexing for 1 min and centrifuged as in the previous step. 1 μL of each supernatant (approximately 50 ng) was used as template for the PCR reaction, which consisted of 35 cycles with the following temperatures and times: denaturation 94 °C, 60 sec; alignment 56 °C, 90 sec; synthesis 72 °C, 60 sec. As a positive control was used the plasmid pAN7-1 (50 ng). PCR products were revealed by agarose gel stained with 1.2% ethidium bromide, using as a size marker 1 kb DNA ladder of Promega.

Results

Sensitivity of *S. cepivorum* to the antibiotic hygromycin B

The mycelium of the fungus *S. cepivorum* showed complete inhibition of growth on solid PDA medium at a concentration of 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of hygromycin B. While the fungal protoplasts showed a complete inhibition of growth on solid PDA-S medium to a final concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 2A), confirming that this antibiotic may be used for selection of transformants of the fungus obtained with the plasmid pAN7-1.

Formation of protoplasts of *S. cepivorum*

It was found that, in an incubation period of 5 h at 30 °C we had the highest formation of protoplasts (5-25 $\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) (Figure 1B), recommended amount to achieve the transformation of fungi (Birch and Denning, 1998). The

del hongo mostraron una inhibición total de su crecimiento en medio PDA-S sólido a una concentración final de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 2B), confirmando que este antibiótico se puede emplear para la selección de transformantes del hongo obtenidas con el plásmido pAN7-1.

Formación de protoplastos de *S. cepivorum*

Se encontró que en un periodo de incubación de 5 h a 30 °C se obtuvo la mayor formación de protoplastos ($5\text{-}25 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) (Figura 1B), cantidad recomendada para lograr la transformación de los hongos (Birch y Denning, 1998). Los resultados mostraron que la acción de las enzimas celulasa, proteasa y quitinasa contenidas en el producto Lysing Enzymes, es suficiente para la generación de protoplastos en *S. cepivorum* a diferencia de otros hongos como *Coccidioides immitis* (Reichard *et al.*, 2000) o *Aspergillus fumigatus* (Birch y Denning, 1998) donde es necesario suministrar adicionalmente driselase (InterSpex, Foster City USA, con actividades reportadas de celulasa, pectinasa, laminarina, xylanasa, amilasa, entre otras) y kilatase (ICN FLOW, High Wycombe UK), con actividades reportadas de β -glucanasa, proteasa, pectinasa y amilasa), respectivamente, para la remoción de la pared celular de ambos hongos patógenos de humano.

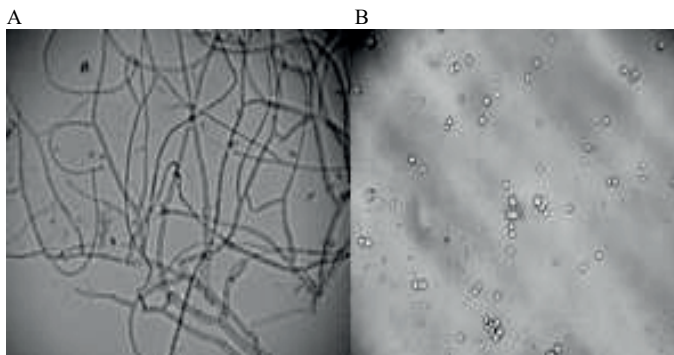


Figura 1. *S. cepivorum* Berk mostrando: a) micelio de 96 h en medio PDB; y b) protoplastos en regulador MSC, obtenidos después de 5 h de incubación con 200 mg de enzimas líticas.

Figure 1. *S. cepivorum* Berk showing: a) mycelium of 96 h in PDB; and b) protoplasts on MSC regulatory obtained after 5 h of incubation with 200 mg of lytic enzymes.

Transformación de *S. cepivorum* mediante fusión de protoplastos

Los protoplastos transformados se recuperaron en cajas de Petri conteniendo el medio de regeneración PDA-Sorbitol (conteniendo 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina B (Figura 2A), en

results showed that, the action of cellulase enzymes, protease and chitinase contained in the product Lysing Enzymes is enough to generate protoplasts of *S. cepivorum* unlike the other fungi such as *Coccidioides immitis* (Reichard *et al.*, 2000) or *Aspergillus fumigatus* (Birch and Denning, 1998) where it's necessary to additionally provide driselase (InterSpex, Foster City, USA, with reported activities of cellulase, pectinase, laminarinase, xylanase, amylase, etc.) and kilatase (ICN FLOW, High Wycombe, UK), reported activities of β -glucanase, protease, pectinase or amylase, respectively for the removal of the cell's wall of both human-pathogenic fungi.

Transformation of *S. cepivorum* through protoplast fusion

The transformed protoplasts were recovered in Petri dishes containing the regeneration medium PDA-Sorbitol, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ containing hygromycin B (Figure 2A), while, the control protoplasts were unable to exhibit the same phenotype (Figure 2B). Each possible transformant colony was transferred into Petri dishes with PDA medium supplemented with 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of hygromycin B and, the development was recorded after 7 days of incubation at 16 °C. The transformed colonies 12-18 showed slow growth on PDA medium in selection conditions (Figure 3A), compared to the wild strain C2 in the absence of hygromycin B (Figure 3C), whereas the wild strain was incapable of growth under the selection display (Figure 3B), showing that the fungus *S. cepivorum* was transformed.

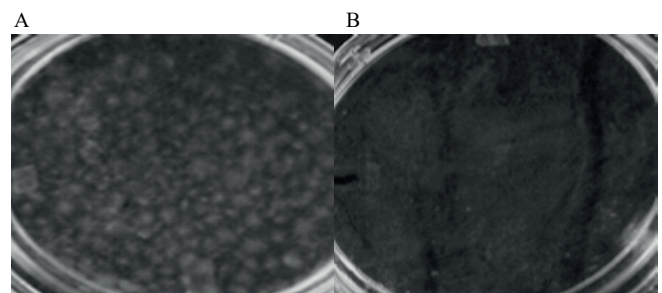


Figura 2. Fenotipo de *S. cepivorum* Berk después de 7 días de incubación a 16 °C en medio PDA-Sorbitol adicionado con 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina B: a) posibles transformantes; y b) protoplastos de la cepa silvestre C2 sin transformar.

Figure 2. *S. cepivorum* Berk phenotype after 7 days of incubation at 16 °C on PDA-Sorbitol medium supplemented with 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of hygromycin B: a) possible transformants; and b) wild strain protoplasts C2 unprocessed.

tanto, los protoplastos control fueron incapaces de exhibir el mismo fenotipo (Figura 2B). Cada posible colonia transformante se transfirió a cajas de Petri con medio PDA adicionado con $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina B y el desarrollo se registró a los 7 días de incubación a 16°C . 12-18 colonias transformadas mostraron lento desarrollo en el medio PDA en condiciones de selección (Figura 3A), comparada con la cepa silvestre C2 en ausencia de higromicina B (Figura 3C), en tanto la cepa silvestre fue incapaz de mostrar crecimiento bajo selección (Figura 3B), mostrando que el hongo *S. cepivorum* se ha transformado.

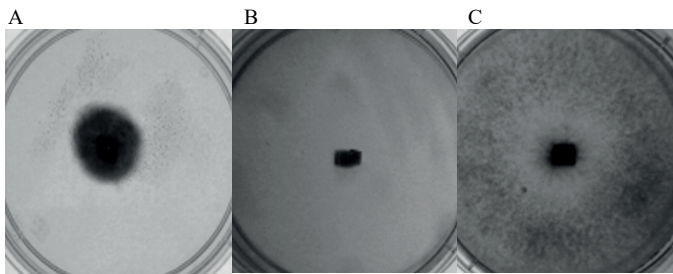


Figura 3. Fenotipo de *S. cepivorum* Berk después de 7 días de incubación a 16°C en medio PDA adicionado con $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina B: a) transformante seleccionada maph1; b) cepa silvestre C2; y c) cepa silvestre C2 sin adición de higromicina.

Figure 3. *S. cepivorum* Berk phenotype after 7 days of incubation at 16°C on PDA medium supplemented with $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ of hygromycin B: a) transforming selected maph1; b) wild strain C2; and c) wild strain C2 without the addition of hygromycin.

Confirmación de la transformación por PCR

Para demostrar que el plásmido pAN7-1, el cual confiere resistencia a higromicina B, se encuentra en las transformantes obtenidas, se llevó a cabo un análisis por PCR. Así, el ADN de las transformantes se aisló por el método de hervido el cual fue adaptado por Holmes y Quigley (1981) y dispone como molde. Adicionalmente, dos oligonucleótidos anidados, sentido y anti-sentido que cubren respectivamente, parte del promotor *gpdA* y el marco de lectura abierto del gen *hph* (Punt *et al.*, 1987), se emplearon como iniciadores. A los 35 ciclos, en el gel de agarosa al 1.2% se observa la amplificación de una banda de 1.342 kbp empleando como moldes los ADN del plásmido pAN7-1 y el ADN genómico de la transformante MAPH1 de *S. cepivorum* (Figura 4, líneas 1 y 2). En tanto, empleando el ADN genómico de la cepa silvestre como templado, el producto de PCR no amplificó (Figura 4, línea 3), confirmando que el gen *hph* forma parte del ADN de las cepas transformantes.

Confirmation of the transformation by PCR

In order to demonstrate that the plasmid pAN7-1, which confers resistance to hygromycin B is in the transformants obtained, an analysis was carried out using PCR. Thus, the DNA of the transformants was isolated by the boiling method which was adapted by Holmes and Quigley (1981) and available as a template. Additionally, two nested oligonucleotides, sense and antisense respectively covering part of the *GPDA* promoter and open reading frame of the *hph* gene (Punt *et al.*, 1987) were used as initiators. At 35 cycles, in the agarose gel at 1.2% is observed an amplification of a band of 1 342 kbp using as templates DNAs of the plasmid pAN7-1 and, the genomic DNA of the transformant MAPH1 of *S. cepivorum* (Figure 4, lines 1 and 2). Meanwhile, using genomic DNA from the wild strain as template, PCR product did not amplified (Figure 4, line 3), confirming that, the *hph* gene is part of the DNA of the transformant strains.

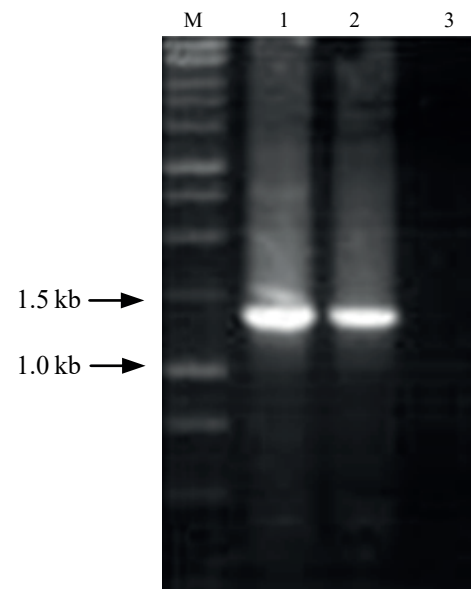


Figura 4. Productos de PCR en gel de agarosa. Se muestra la amplificación de la región de 1.3 kbp del gen *hph* (carriles 1 y 2) empleando los iniciadores específicos Hig1 y Hig2: carril M, marcador de tamaño molecular en kpb (1 kb DNA Ladder, promega). Carriles 1-3: plásmido pAN7-1, cepa transformante *S. cepivorum* MAPH1 y cepa silvestre C2, respectivamente; en las tres se usó ADN como templado.

Figure 4. PCR products on an agarose gel. Showing the amplification of the region of 1.3 kbp of the *hph* gene (lanes 1 and 2) using specific indicators Hig1 and Hig2: lane M, molecular size marker kbp (1 Kb DNA Ladder, promega). Lanes 1-3: plasmid pAN7-1, transformant strain *S. cepivorum* MAPH1 and, wild strain C2, respectively; in the three DNA was used as template.

Discusión

1 µg del plásmido pAN7-1 linearizado con la enzima de restricción *Hind* III, permitió la obtención de 12-18 transformantes de *S. cepivorum* resistentes al antibiótico higromicina B, el cual se usó como marcador de selección dominante. Dado que no se cuenta con promotores de genes homólogos del hongo fitopatógeno, fue necesario emplear el plásmido pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987) el cual, tiene al gen *hph* de *E. coli* bajo el promotor *gpdA* y el terminador *trpC* de *A. nidulans*, así, el aislamiento de transformantes de *S. cepivorum* confirman que el promotor heterólogo *gpdA* dirige la transcripción del gen bacteriano *hph* en el hongo, de manera análoga como se ha demostrado en el hongo fitopatógeno *Neonectria galligena* (Tanguay *et al.*, 2003).

Las transformantes obtenidas mostraron desarrollo lento en medio PDA adicionado con higromicina B, comparada con la cepa silvestre en ausencia del factor de selección, lo cual sugiere la presencia de núcleos sin transformar en el micelio heterocariótico obtenido. Dado que *S. cepivorum* no posee un ciclo de esporulación sólo forma esclerocios, será necesario aislar puntas de hifas para la selección del homocarión.

El empleo de los iniciadores dirigidos contra el promotor (sentido) *gpdA* y contra la parte 3' (antisentido) del gen *hph* y el ADN de las transformantes como molde, permitió la amplificación de un fragmento de 1.342 kpb (bases 1911-3252; Punt *et al.*, 1987), confirmando que el plásmido pAN7-1 se encuentra en el hongo transformado. En conclusión, se presenta un procedimiento de transformación para *S. cepivorum* como una primera etapa para el análisis de la función de genes en el fenómeno de la pudrición blanca en el ajo (*A. sativum*), para la identificación de blancos genéticos que permitan el desarrollo de estrategias de control del patógeno.

Estudios posteriores deberán incluir el aislamiento y empleo de promotores homólogos fuertes, de igual manera el empleo de procedimientos de electroporación (Sánchez *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 2011), biobalística (Parvez *et al.*, 2004), integración mediada por enzimas de restricción (REMI) (Kim *et al.*, 2002; Turgeon *et al.*, 2011) y *A. tumefaciens* (Gouka *et al.*, 1999; Cardoza *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Sharma y Kuhad, 2010), para aumentar la eficiencia de transformación del hongo, tal como se ha demostrado en diferentes hongos.

Discussion

1 µg of the plasmid pAN7-1 linearised with the restriction enzyme *Hind* III, allowed obtaining 12-18 transformants of *S. cepivorum* resistant to the antibiotic hygromycin B, which was used as dominant selectable marker. Considering that there are no promoters of homologous genes of the pathogen, it was necessary to use the plasmid pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987), which has the *hph* gene of *E. coli* under the *GPDA* promoter and *trpC* terminator of *A. nidulans*, thus, isolation of transformants of *S. cepivorum* confirmed that, *GPDA* heterologous promoter directs transcription of the bacterial *hph* gene in the fungus, similarly as it has been demonstrated in the phyto-pathogenic fungus *Neonectria galligena* (Tanguay *et al.*, 2003).

The transformants obtained showed slow growth in PDA medium supplemented with hygromycin B compared with the wild strain in the absence of the target factor, suggesting the presence of untransformed nuclei in the mycelium heterocariótico obtained. Because *S. cepivorum* has no sporulation cycle of sclerotia, only necessary to isolate hyphal tips of the homocariion selection.

The use of indicators directed against the promoter (sense) and against the *GPDA* 3' (antisense) of the *hph* gene and DNA of the transformants as a mold, allowed the amplification of 1 342 kbp fragment (bases 1 911-3 252; Punt *et al.*, 1987), confirming that, the pAN7-1 plasmid is transformed into the fungus. In conclusion, we presented a transformation procedure for *S. cepivorum* as the first step for analyzing the gene's function in the phenomenon of white rot in garlic (*A. sativum*), to identify gene targets that allow the development of pathogen control strategies.

Further studies should include the isolation and use of strong homologous promoters, as well as the use of electroporation procedures (Sánchez *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 2011), biolistic (Parvez *et al.*, 2004) mediated integration of restricting enzymes (REMI) (Kim *et al.*, 2002; Turgeon *et al.*, 2011) and *A. tumefaciens* (Gouka *et al.*, 1999; Cardoza *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Kuhad Sharma, 2010) for increasing fungal transformation efficiency, as demonstrated in several fungi.

Besides, the type of integration should be analyzed, using homologous sequences blank with the intention of performing gene disruption experiments to show the

Adicionalmente, se deberá analizar el tipo de integración empleando secuencias homólogas blanco con la intención de realizar experimentos de disrupción génica para mostrar la función de genes específicos en la patogénesis del hongo, como en el caso de la demostración del papel del gen ornitina descarboxilasa (*Umodc*) durante la transición dimórfica y patogénesis del hongo basidiomiceto patógeno del maíz *Ustilago maydis* (Guevara-Olvera *et al.*, 1997). Una clave importante para el avance de la biología molecular y la genética de un organismo dado es el desarrollo de sistemas de transformación genética, lo cual hace posible el análisis y la manipulación del genoma del organismo de interés. Sin embargo, poco se ha avanzado en el desarrollo de sistemas de etiquetado de genes aplicado a un amplio rango de hongos filamentosos.

Agradecimientos

Al COSNET (666.02-P) y al CONACYT (37546-B) por el apoyo económico otorgado a la presente investigación, así como por la beca otorgada a Miguel Ángel Pantoja-Hernández.

Literatura citada

- Balance, D. J.; Burxton, F. P. and Turner, G. 1983. Transformation of *Aspergillus nidulans* by orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Comm.* 112:284-289.
- Beggs, J. D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature.* 275:104-109.
- Birch, M. and Denning, D. W. 1998. Comparison between five lysing enzymes preparations on protoplast formation in *Aspergillus fumigatus*. http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/laboratory_protocols/birch.htm.
- Cardoza, R. E.; Vizcaino, J. A.; Hermosa, M. R.; Monte, E. and Gutiérrez, S. 2006. A Comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast-and *Agrobacterium*-mediated transformation. *J. Microbiol.* 44(4):383-395.

function of specific genes in the pathogenesis of the fungus, as in the case of demonstrating the role of the ornithine decarboxylase gene (*Umodc*) during the dimorphic transition and pathogenesis of the basidiomycete fungus pathogen of maize, *Ustilago maydis* (Guevara-Olvera *et al.*, 1997). An important key to the advancement of molecular biology and genetics of an organism development of genetic transformation systems, which makes possible the analysis and manipulation of the genome of the organism of interest. However, little progress has been made in the development of gene tagging systems applied to a wide range of filamentous fungi.

End of the English version



- Christensen, T.; Woeldike, H.; Boel, E.; Mortensen, S. B.; Hjørshøj, K.; Thim, L. and Harnisen, M. T. 1988. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technol* 6:1419-1422.
- Coley-Smith, J. R.; Mitchell, C. M. and Sansford, C. E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant. Pathol.* 39:58-69.
- Constanzo, M. C. and Fox, T. D. 1988. Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics.* 120:667-670.
- Delgadillo-Sánchez, F.; Zavaleta-Mejía, E.; Aguilar-Laguna, A.; Arévalo-Valenzuela, A.; Torres-Pacheco, I.; Valdivia-Alcalá, R. y Garzón-Tiznado, J. A. 2004. Manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) del ajo en Guanajuato, México. *Agric. Téc. Méx.* 30(1):41-52.
- Esser, K. and Mohr, G. 1986. Integrative transformation of filamentous fungi with respect to biotechnological application. *Process Biochem.* 21:153-159.
- Fincham, J. R. S. 1989. Transformation in fungi. *Microbiol Rev.* 53(1):148-170.
- Gouka, R. J.; Gerk, C.; Hooykaas, P. J. J.; Bundock, P.; Musters, W.; Verrips, C. T. and de Groot, M. J. A. 1999. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nature Biotechnol.* 6:598-601.
- Guevara-Olvera, L.; Xoconostle-Cázares, B. and Ruíz-Herrera, J. 1997. Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of *Ustilago maydis*: evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. *Microbiol.* 143:2237-2245.

- Gutiérrez, A.; López-García, S. and Garre, V. 2011. High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J. Microbiol. Meth.* 84(3):442-446.
- Gwyne, D. I.; Buxton, F. P.; Williams, S. A.; Garven, S. and Davies, R. W. 1987. Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technol.* 5:713-719.
- Holmes, D. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analyt. Biochem.* 114:193-197.
- Ito, H.; Fuluda, K.; Murata, K. and Kimura, A. 1983. A transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163-168.
- Javerzat, J. P.; Bhattacharjee, V. and Barreau, C. 1993. Isolation of telomeric DNA from the filamentous fungus *Podospora anserina* and construction of a self-replicating linear plasmid showing high transformation frequency. *Nucleic Acids Res.* 3:497-504.
- John, M. A. and Peberdy, J. F. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* using *argB* gene. *Enzymes Microbiol. Technol.* 6:386-389.
- Kelly, J. M. and Hynes, M. J. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by *amdS* gene of *A. nidulans*. *EMBO J.* 4:475-479.
- Kim, K.; Leem, Y.; Kim, K.; Kim, K. and Choi, H. T. 2002. Transformation of the medicinal basidiomycete *Trametes versicolor* to hygromycin B resistance by restriction enzyme mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 209(2):273-276.
- Klein, T. M.; Wolf, E. D.; Wu, R. and Sanford, J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature.* 327:70-73.
- McLean, K. L.; Swaminathan, J. and Stewart, A. 2001. Increasing soil temperature to reduce sclerotial viability of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. *Soil Biol. Biochem.* 33:137-143.
- Parvez, S.; Mukhtar, Z.; Rashid, F. and Rajoka, M. I. 2004. Biolistic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with β -glucosidase gene from *Cellulomonas biazotea*. *Afr. J. Biotechnol.* 3(1):112-115.
- Punt, P. J.; Oliver, R. P.; Dingemans, M. A.; Pouwels, P. H. and Van den Hondel, C. A. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene.* 56(1):117-124.
- Rambosek, J. A. and Leach, J. 1987. Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. *Rev. Biotechnol.* 6:357-373.
- Reichard, U.; Hung, C. Y.; Thomas, P. W. and Cole, G. T. 2000. Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 68(10):5830-5838.
- Sánchez, M.; Iglesias, F. J.; Santamaría, C. and Domínguez, A. 1993. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(7):2087-2092.
- Saunders, G.; Pickett, T. M.; Tuite, M. F. and Ward, M. 1989. Heterologous gene expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 7:283-287.
- Sharma, K. K. and Kuhad, R. C. 2010. Genetic transformation of lignin degrading fungi facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *BMC Biotechnol.* 10:67.
- Sivan, A.; Stats, T. E.; Hemmat, M.; Hayes, C. K. and Harman, G. E. 1992. Transformation of *Trichoderma spp* with plasmids conferring hygromycin B resistance. *Mycologia.* 84:687-694.
- Tanguay, P.; Coupal, J. and Bernier, L. 2003. Genetic transformation, electrophoretic karyotyping and isolation of insertional mutants in the tree pathogenic fungus *Neonectria galligena*. *For. Pathol.* 33:413-428.
- Tsukuda, T.; Carleton, S.; Fotheringham, S. and Holloman, W. 1988. Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* 9:3703-3709.
- Turgeon, B. G.; Condon, B.; Liu, J. and Zhang, N. 2011. Protoplast transformation of filamentous fungi. *molecular and cell biology methods for fungi methods in molecular biology.* 638:3-19.
- Upshall, A.; Kumar, A. A.; Bailey, M. C.; Parker, M. D.; Fareau, M. A.; Lewison, K. P.; Joseph, M. L.; Maragoneand, J. M. and McKnight, G. L. 1987. Secretion of active tissue plasminogen activator from the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technol.* 5:1301-1304.
- Van Gorcom, R. F. M.; Punt, P. J.; Pouwels, P. H. and Van den Hondel, C. A. 1986. A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene.* 48:211-217.

- Ward, M.; Wilson, J. F.; Carmone, C. L. and Turner, G. 1988. The *OliC3* gene of *Aspergillus niger*: Isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. *Curr. Genet.* 14:37-42.
- Wei, Y.; Zhou, X.; Liu, L.; Lu, J.; Wang, Z.; Yu, G.; Hu, L.; Li, J.; Sun, X. and Tang, K. 2010. An efficient transformation system of taxol-producing endophytic fungus EFY-21 (*Ozonium* sp.). *Afr. J. Biotechnol.* 9(12):1726-1733.
- Yelton, M. M.; Hamer, J. E. and Timberlake, W. E. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* using a *TrpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:1470-1474.
- Zhou, X.; Wei, Y.; Zhu, H.; Wang, Z.; Lin, J.; Liu, L. and Tang, K. 2008. Protoplast formation, regeneration and transformation from the taxol-producing fungus *Ozonium* sp. *Afr. J. Biotechnol.* 7(12):2017-2024.