

Influencia de genes NMO de *Metarhizium brunneum* en la promoción del crecimiento de *Brassica oleracea*

Growth promotion of *Brassica oleracea* by the *nmo* null mutant of *Metarhizium brunneum*

Linnet Alondra Barrientos Martínez¹, Renata Luna Baeza¹, Mario Moreles Martínez¹, Arantza Vargas Sánchez¹, Ximena Esquivias Varela¹, Araceli Lopez¹, Azul Martínez Vazquez¹, Gloria Angélica González Hernandez¹ y Juan Carlos Torres Guzmán¹

¹ Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, DCNyE, Departamento de Biología, Laboratorio de Genética Molecular de Hongos. Noria Alta s/n, CP 36050, México.

Email: gonzang@ugto.mx; torquz@ugto.mx

Resumen

Metarhizium es uno de los hongos entomopatógenos que han sido más extensamente estudiados a nivel bioquímico y molecular, su patogenicidad no se encuentra influenciada por un solo factor, sino que depende de una interacción coordinada de distintos determinantes de patogenicidad del hongo y factores del insecto hospedero. Varias de las diferentes especies de *Metarhizium* patógenas de insectos, de manera adicional, establecen asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas, promoviendo su crecimiento. En la búsqueda de nuevos factores de virulencia y/o que participan en el establecimiento de la asociación con las plantas, se han identificado varios genes, entre ellos genes que codifican para enzimas con actividad de nitronato monooxigenasa (NMO). Estas enzimas son flavoproteínas que catalizan la desnitrificación oxidativa de los nitroalcanos a sus correspondientes compuestos carbonilo y nitro. Las proteínas NMO cumplen distintas funciones en los organismos que las poseen, no solo están involucradas en los mecanismos de defensa contra el efecto tóxico de los nitroalcanos, sino que pueden cumplir distintos papeles en la promoción del crecimiento o el establecimiento de la infección a plantas. En los genomas de las especies del género *Metarhizium* se encuentra una familia de seis genes que codifican para proteínas con actividad de nitronato monooxigenasa. En este trabajo para ahondar en la influencia que tiene el gen *NMO3* en la capacidad de *Metarhizium* en estimular la promoción del crecimiento en plantas, se tomaron tres mutantes nulos independientes del gen *NMO3* y se evaluó su capacidad de crecimiento y conidiación así como su interacción con la planta de brócoli *Brassica oleracea*.

Palabras clave: Interacción hongo – planta, *Metarhizium*, Nitronato monooxigenasa, *Brassica oleracea*

Antecedentes

El hongo benéfico del género *Metarhizium*

Las especies del hongo del género *Metarhizium* son de los hongos más abundantes que se pueden aislar del suelo (Lomer et al. 2001). Se encuentran distribuidos de manera global desde el Ártico hasta los trópicos y colonizan una impresionante variedad de ambientes, incluyendo bosques, sabanas, pantanos, áreas costeras y desiertos (Roberts and St Leger 2004). Las distintas especies de *Metarhizium* pueden infectar a un amplio rango de insectos hospederos, se han descrito más de 300 especies de insectos que pueden ser infectados por *Metarhizium* de manera natural, pertenecientes a siete órdenes: ortópteros, dermápteros, hemípteros, dípteros, himenópteros, lepidópteros y coleópteros. De manera adicional establecen asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas (St Leger and Wang 2020). Así, por ejemplo, *M. robertsii* es atraído por señales químicas, particularmente rafinosa, liberadas por las raíces de las plantas (Fang and St Leger 2010). Esta asociación promueve el crecimiento de las raíces (Sasan and Bidochka 2012), activa el sistema de defensa en las plantas, protegiéndolas de fitopatógenos; e incrementa la resistencia a factores abióticos como la

salinidad (Behie and Bidochka 2014; Khan et al. 2012; Sasan and Bidochka 2012). *Metarhizium* transfiere Nitrógeno, proveniente de los insectos que infecta, a las raíces de las plantas (Behie and Bidochka 2014), a cambio la planta le transfiere compuestos de carbono al hongo, estableciendo una simbiosis mutualista (Behie et al. 2017).

Los nitroalcanos y las nitronato monooxigenasas

En la naturaleza, se pueden encontrar nitroalcanos como resultado de actividades antropogénicas (Balogh-Hergovich et al. 2007; Gadda and Fitzpatrick 1999), pero también pueden ser sintetizados por algunos microorganismos, por ejemplo, el 3-nitropropionato (3NPA) producido por los hongos *Penicillium atrovirenum* y *Aspergillus flavus* (Porter and Bright 1987), y por plantas leguminosas del género *Astragalus*, *Coronilla*, entre otras (Agniswamy et al. 2018). Los nitroalcanos son tóxicos ya que pueden inhibir actividades enzimáticas como la fumarasa y la succinato deshidrogenasa mitocondrial, comprometiendo la producción de energía en la célula y algunos son cancerígenos.

Diferentes enzimas de plantas, hongos y bacterias pueden convertir los nitroalcanos en compuestos menos dañinos y pueden servir como fuentes de carbono y nitrógeno. Entre ellas están las nitronato monooxigenasas (NMO) de *Hansenula mrakki* (Kido and Soda 1978) y *Neurospora crassa* (Gorlatova et al. 1998). Las nitronato monooxigenasas (NMO) son flavoproteínas que catalizan la desnitrificación oxidativa de los nitroalcanos a sus correspondientes compuestos carbonilo y nitro (Gorlatova et al. 1998). Las nitronato monooxigenasa cumplen distintas funciones en los organismos que las poseen; desintoxicación, promoción del crecimiento o el establecimiento de la infección del hospedero.

En el análisis de los genomas disponibles de las especies de *Metarhizium* encontramos que poseen seis genes distintos cuya secuencia de aminoácidos muestra un alto porcentaje de similitud con proteínas con actividad de nitronato monooxigenasa. En nuestro grupo de trabajo, recientemente, se aislaron los seis genes de la cepa *M. brunneum* CARO19, se expresaron en *E. coli*, demostrando que los seis genes codifican enzimas con actividad de nitronato monooxigenasa, sus características bioquímicas muestran que tienen diferente afinidad para su sustrato. El crecimiento de los conidios de *Metarhizium* en dosis bajas de nitroalcanos aumenta la virulencia hacia el insecto *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante, PDD). Adicionalmente se analizó la expresión de los seis genes durante el proceso de infección a *P. xylostella*, los resultados mostraron que los genes con mayor expresión durante el ciclo de infección corresponden a los genes *NMO1* y *NMO5* (Cervantes Quintero et al. 2020). Con el propósito de determinar la función de estos genes en los estilos de vida del hongo, se generaron los mutantes nulos sencillos de ambos genes (*MbC19nmo1Δ* y *MbC19nmo5Δ*). Los resultados mostraron que, en ambas cepas, la ausencia de *NMO1* o *NMO5* disminuye la virulencia del hongo a los insectos *P. xylostella* y *Tenebrio molitor* y se revierte la promoción del crecimiento que produce *Metarhizium* en la interacción con la planta de sorgo (Cerdeira de Loera, 2018; Guerrero Carrera, 2018). En el laboratorio también generamos los mutantes nulos del gen *NMO2* (Guerrero Carrera, 2020) y del gen *NMO3* (Esquivias Varela, 2023).

En este trabajo se pretende ahondar en la influencia que tiene el gen *NMO3* que codifica para una enzima con actividad de nitronato monooxigenasa en la simbiosis planta – *Metarhizium*, eligiendo la planta de brócoli para quien la Palomilla Dorso de Diamante representa un grave problema en la producción pudiendo causar la pérdida parcial o total de la cosecha.

RESULTADOS

Crecimiento radial y conidiación de *Metarhizium brunneum* silvestre y mutantes Δ nmo3

Previamente en el laboratorio, se construyeron mutantes nulos del gen *NMO3* mediante reemplazo génico del marco de lectura abierto del gen *NMO3* por el casete de delección que contiene el gen de resistencia a glufosinato y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Estos mutantes fueron comprobados por fenotipo de resistencia a glufosinato y fluorescencia verde de las colonias y por métodos moleculares, comprobando tanto la ausencia del gen *NMO3* en los mutantes, así como la integración de una única copia del casete de delección (Esquivias Varela, 2023).

Un parámetro importante de evaluar es determinar si la ausencia del gen *NMO3* afecta el crecimiento y conidiación de los mutantes. Para ello en este trabajo, 1000 conidios frescos de los mutantes MbC19- Δ nmo3 2-1, MbC19- Δ nmo3 3-3 y MbC19- Δ nmo3 4-1, y del parental de los mutantes usado como control (MbCARO19), fueron sembrados en gota de 20 μ l en el centro de una caja de medio mínimo M100 y se incubaron 10 días a 28°C con fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad. Transcurrido el tiempo se midieron los diámetros de las colonias. En seguida se colectaron los conidios, se prepararon diluciones seriadas base diez y se contaron al microscopio. El experimento se realizó por triplicado y se hicieron tres experimentos independientes. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos, donde en la Figura 1 se observa que sólo el mutante MbC19- Δ nmo3 4-1 crece un poco más que el parental MbC19. Y solo el mutante MbC19- Δ nmo3 3-3 forma un poco más conidios que la silvestre MbC19. En general, aunque el análisis estadístico sugiere diferencias significativas, al observar la desviación estándar de manera global los mutantes crecen y producen conidios de manera similar a la cepa parental.

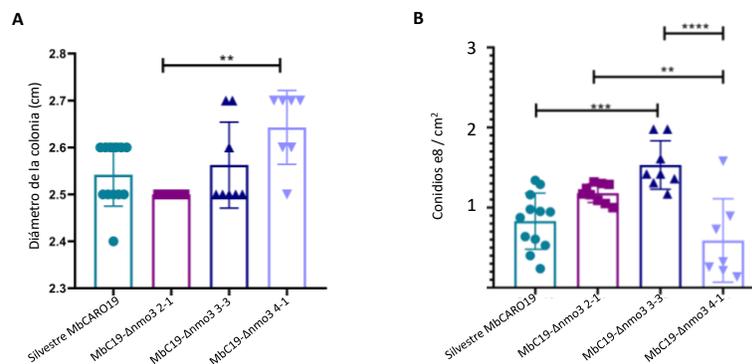


Figura 1. Efecto de la mutación nula del gen *NMO3* en el desarrollo de *Metarhizium brunneum*. A, crecimiento de las colonias, B, conidios formados por cm² de micelio formado. Los datos se analizaron mediante ANOVA F de una sola vía.

Participación del gen *NMO3* de *M. brunneum* en el estilo de vida interacción hongo - planta

Para conocer si el gen *NMO3* participa en la interacción hongo - planta, se utilizaron las cepas silvestre y mutantes del gen *NMO3* de *M. brunneum* y semillas de la planta *Brassica oleracea* (brócoli). Y se abordaron dos estrategias: A) interacción *in vitro* en condiciones controladas (temperatura y humedad) en cámara de incubación en agar-agua o en suelo agrícola, B) interacción en condiciones de invernadero en suelo agrícola.

En la primer estrategia se evaluó tamaño de la raíz, tamaño de la plántula, peso fresco y peso seco. En la segunda estrategia (en invernadero) se dio seguimiento al crecimiento y germinación del brócoli.

En estas interacciones se usaron conidios frescos de las cepas silvestre MbC19 y los mutantes MbC19- Δ nmo3 2-1, MbC19- Δ nmo3 3-3 y MbC19- Δ nmo3 4-1. Se usaron semillas de *Brassica oleracea* convar. botrytis var. cymosa previamente esterilizadas. Se siguieron los protocolos descritos por Guerrero Carrera (2018).

Interacción *in vitro* en agar-agua. Para ello en medio agar agua en cajas de Petri, en una fila se sembraron 10 semillas de brócoli y en una segunda fila paralela se sembraron conidios de *Metarhizium* y se incubaron a 26 °C por 10 días con ciclos de 12 h luz/12 h oscuridad. Cada tratamiento se hizo por quintuplicado. Los datos obtenidos fueron tratados con la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencia entre el tamaño de la plántula ni el peso fresco, entre los mutantes y la cepa silvestre (Figura 2). Solamente el mutante MbC19- Δ nmo3 4-1 mostró un peso seco significativamente mayor que las plantas testigo y las tratadas con la cepa silvestre MbC19 y los mutantes MbC19- Δ nmo3 2-1, MbC19- Δ nmo3 3-3 concordando con el dato de crecimiento en colonia.

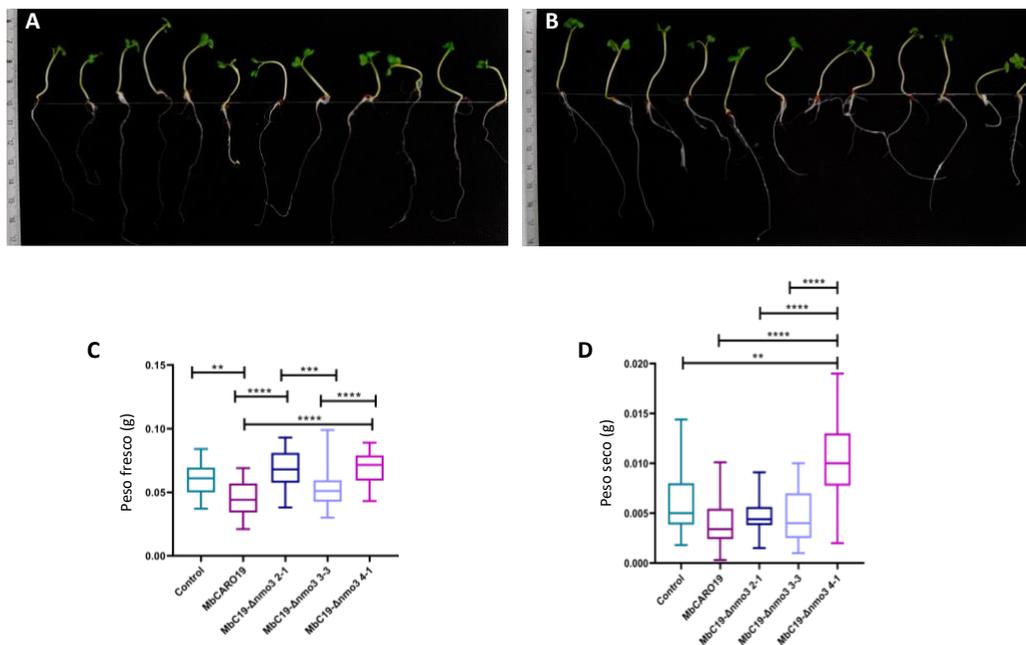


Figura 2. Efecto de la mutación nula del gen *NMO3* en la interacción *M. brunneum* – brócoli *in vitro* agar agua. A, plantulitas tratadas con la cepa silvestre MbCARO19, B, plántulas tratadas con el mutante MbC19 Δ nmo3. C, Peso fresco de las plantas. D, Peso seco de las plantas. Control son las plantas testigo que no estuvieron en contacto con el hongo. MbCARO19, cepa silvestre; MbC19 Δ nmo3, mutantes 2-1, 3-3, y 4-1. Los datos se sometieron a la prueba Kruskal Wallis

Interacción in vitro en suelo agrícola. Tres plántulas de 6 días obtenidas en agar-agua se transfirieron a una caja de Petri conteniendo suelo agrícola. Se inocularon las raíces con 2.2×10^5 conidios contenidos en 100 μL . Se incubaron a 26 °C por 12 días con ciclos de 12 h luz/12 h oscuridad. Se usaron al menos 15 plántulas en total para cada tratamiento incluyendo el testigo. La cuantificación de los datos mostró que en el tamaño de la raíz no hay diferencia significativa entre los distintos tratamientos, mientras que el tamaño de la plántula (tallos y hojas) es menor en las plantas tratadas con las mutantes nulas del gen *NMO3*. En la Figura 3A se muestra las plantas de brócoli tratadas con *M. brunneum* silvestre y en Figura 3B las plantas tratadas con el mutante MbC19- Δnmo3 2-1. Esta diferencia fue significativa según el tratamiento de los datos con la prueba de Kruskal Wallis. En cuanto al peso fresco (formación de biomasa) y peso seco no se aprecia diferencias estadísticamente significativas entre las plantas tratadas con los mutantes MbC19- Δnmo3 y la cepa silvestre según la prueba estadística de Kruskal Wallis (datos no mostrados).

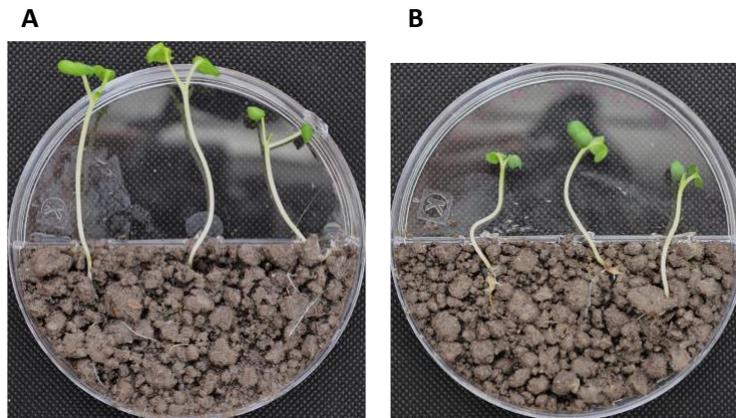


Figura 3. Efecto de la mutación nula del gen *NMO3* en la interacción *in vitro* *M. brunneum* – Brocoli en suelo agrícola. A, plántulas de brócoli tratadas con la cepa silvestre CARO19 de *M. brunneum*. B, plantulas de brócoli tratadas con el mutante Mb Δnmo3 2-1.

Interacción en invernadero en suelo agrícola. En estos experimentos los conidios de *Metarhizium* (silvestre o mutantes) fueron adheridos a las semillas de brócoli mediante carboximetilcelulosa (cmc). Las semillas testigo se trataron solo con carboximetilcelulosa. Treinta semillas de brócoli de cada tratamiento fueron sembradas en las charolas y se incubaron en el invernadero. Se tomó registro fotográfico del crecimiento y la germinación durante 28 días que se incubaron en el invernadero. En la Figura 4A se observa el crecimiento de las plántulas testigo (semillas tratadas con cmc), en la Figura 4B las plántulas control positivo (semillas tratadas con la cepa silvestre MbCARO19), y en la Figura 4C la prueba que corresponde a las plántulas tratadas con el mutante Mb Δ nmo3. Como resultado preliminar a los doce días se observa que mientras la cepa silvestre de *Metarhizium* estimula la germinación de las semillas de brócoli (90%) y el crecimiento de las plántulas (Fig. 4B) en comparación con el testigo que germina solo un 43 % y crece menos (Fig. 4A). Es notorio que la falta del gen *NMO3* en *M. brunneum* causa disminución de la germinación de las semillas (germinando solo el 57 %). Este experimento se terminará en 7 días más, entonces se cuantificará el crecimiento de las plantas, el peso fresco y el peso seco para, mediante análisis estadístico, determinar si realmente el gen *NMO3* de *Metarhizium* participa en la interacción *Metarhizium brunneum* – *Brassica oleracea*.

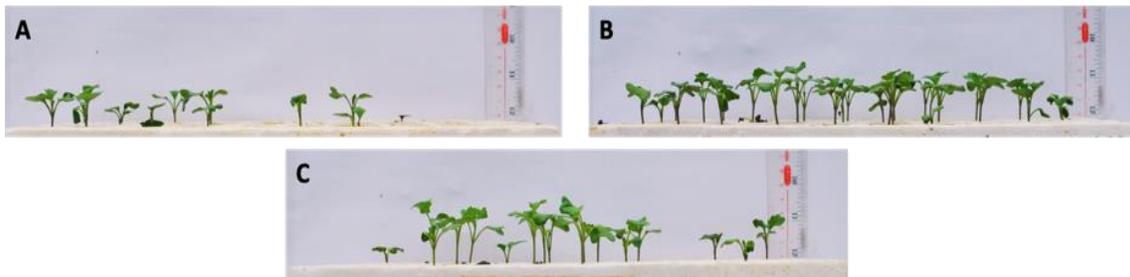


Figura 4. Efecto de la mutación nula del gen *NMO3* de *M. brunneum* en la germinación y desarrollo de la plántula de brócoli a los 12 días en suelo agrícola en invernadero. A, plantas testigo (sin hongo). B, plantas en presencia de la cepa silvestre MbCARO19. C, plantas en presencia del mutante MbC19.Δnmo3.

Los datos preliminares sugieren que el gen *NMO3* participa parcialmente en el establecimiento de la interacción hongo – planta, favoreciendo la germinación de la semilla y posiblemente el crecimiento de la planta. Para poder concluir, es necesario contar con más datos experimentales que permitan reducir la desviación estándar y ver más claramente la significancia estadística de los datos.

Bibliografía

- Agniswamy J, Reis RAG, Wang YF, Smitherman C, Su D, Weber I, Gadda G (2018) Crystal structure of yeast nitronate monooxygenase from *Cyberlindnera saturnus*. *Proteins* 86(5):599-605 doi:10.1002/prot.25470
- Balogh-Hergovich É, Kaizer J, Speier G (2007) Chemical models relevant to nitroalkane dioxygenase. *Comptes Rendus Chimie* 10(4):355-365 doi:<https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.01.006>
- Behie SW, Bidochka MJ (2014) Nutrient transfer in plant-fungal symbioses. *Trends Plant Sci* 19(11):734-40 doi:10.1016/j.tplants.2014.06.007
- Behie SW, Moreira CC, Sementchoukova I, Barelli L, Zelisko PM, Bidochka MJ (2017) Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nat Commun* 8:14245 doi:10.1038/ncomms14245
- Cerda de Loera VE (2018) Estudio del gen 2np5 de *Metarhizium brunneum*. Tesis de Maestría en Ciencias Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.6 de febrero de 2018.
- Cervantes Quintero KY, Padilla Guerrero IE, Torres Guzmán JC, Villa Martínez BG, Valencia Félix A, González Hernández GA (2020) Members of the nitronate monooxygenase gene family from *Metarhizium brunneum* are induced during the process of infection to *Plutella xylostella*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(7):2987-2997 doi:10.1007/s00253-020-10450-0
- Esquivias Varela X (2023). Estudio de la influencia de la delección del gen NMO3 en *Metarhizium*. Tesis en proceso para obtener el grado de Licenciada en Biología Experimental. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.
- Fang W, St Leger RJ (2010) Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. *Plant Physiol* 154(3):1549-57 doi:10.1104/pp.110.163014
- Gadda G, Fitzpatrick PF (1999) Substrate Specificity of a Nitroalkane-Oxidizing Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 363(2):309-313 doi:<https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1081>
- Guerrero Carrera YS (2018).Tesis de Licenciatura en QFB.Estudio del efecto de la mutación nula del gen 2np5 en la interacción de *Metarhizium brunneum* con *Sorghum vulgare* y *Brassica oleracea* y detección de peroxisomas del hongo. Licenciatura en QFB. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato..
- Guerrero Carrera YS (2020).Tesis de Maestría en Ciencias. Construcción de la mutante nula NPD2 en *Metarhizium brunneum* y evaluación de promotores para la edición del genoma de *Metarhizium spp.* Tesis Maestría en Ciencias. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.
- Gorlatova N, Tchorzewski M, Kurihara T, Soda K, Esaki N (1998) Purification, characterization, and mechanism of a flavin mononucleotide-dependent 2-nitropropane dioxygenase from *Neurospora crassa*. *Appl Environ Microbiol* 64(3):1029-33
- Khan AL, Hamayun M, Khan SA, Kang SM, Shinwari ZK, Kamran M, Ur Rehman S, Kim JG, Lee IJ (2012) Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World J Microbiol Biotechnol* 28(4):1483-94 doi:10.1007/s11274-011-0950-9
- Kido T, Soda K (1978) Properties of 2-nitropropane dioxygenase of *Hansenula mrakii*. Formation and participation of superoxide. *J Biol Chem* 253(1):226-32
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M (2001) Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu Rev Entomol* 46:667-702 doi:10.1146/annurev.ento.46.1.667
- Porter DJ, Bright HJ (1987) Propionate-3-nitronate oxidase from *Penicillium atrovirens* is a flavoprotein which initiates the autoxidation of its substrate by O₂. *J Biol Chem* 262(30):14428-34
- Roberts DW, St Leger RJ (2004) *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol* 54:1-70 doi:10.1016/S0065-2164(04)54001-7
- Sasan RK, Bidochka MJ (2012) The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Am J Bot* 99(1):101-7 doi:10.3732/ajb.1100136
- St Leger RJ, Wang JB (2020) *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. *Open Biol* 10(12):200307 doi:10.1098/rsob.200307