

INTERACCIÓN HONGO-PLANTA, EXPRESIÓN DE UN GEN 2NP

Diana Karina Rangel Salazar, Gloria Angélica González Hernández, Claudia Erika Morales Hernández

¹ [Bachillerato General, Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato] |

² [Departamento de Biología, DCNyE, Campus Guanajuato] | [gonzang@ugto.mx] |

³ [Colegio de Nivel Medio Superior, Campus Guanajuato, Escuela de Nivel Medio Superior] | [clauerimh7@gmail.com]

Resumen

Metarhizium es uno de los hongos entomopatógenos más estudiado por su capacidad de infección hacia las plagas presentes en la agricultura. Interesantemente también favorece el crecimiento de algunas plantas como el sorgo. De las cepas probadas en nuestro laboratorio, CARO19 es la cepa silvestre que mayormente estimula el crecimiento de la planta de sorgo. Previamente se ha observado que *Metarhizium* contiene seis genes tipo 2np en su genoma. De ellos, el gen 2np1 es el que tiene mayor expresión en presencia de nitroalcano el cual puede usarlo como fuente de carbono y/o nitrógeno. En el presente trabajo fue de nuestro interés analizar el efecto de mutantes nulos del gen 2np1 ($\Delta 2np1$) al enfrentarse el hongo con semillas de *Sorghum vulgare* en tierra estéril y no estéril, observando que los mutantes nulos del gen 2np1 estimulan menos el crecimiento de la planta de sorgo en comparación con la estimulación observada cuando la planta se expone a la cepa silvestre del hongo, indicando que el gen 2np1 es importante en la interacción hongo-planta.

Abstract

Metarhizium is one of the entomopathogenic fungi most studied for its ability to infection to the pests in agriculture. Interestingly also it favors the growth of some plants such as sorghum. Previously were tested some wild type strains of *Metarhizium* in our laboratory, observing that the strain CARO 19 is the best in the stimulation of plant growth sorghum. It was previously observed that *Metarhizium* contains six genes 2np in its genome. Of these, the 2np1 gene has the highest expression in the presence of nitroalkane which can be used as carbon and/or nitrogen source. In the present work we analyzed the behavior of mutants of the 2np1 gene of *Metarhizium* during the interaction of the fungus with sorghum plant in sterile and non-sterile soil. We observed that seeds of *Sorghum vulgare* exposed to null mutants of the 2np1 gene ($\Delta 2np1$) of *Metarhizium*, showed a lower stimulation on the plant growth in comparison with the growth of the plants exposed to wild type strain of the fungus. This result suggest that this fungal gene is important in the fungus-plant interaction.

Palabras Clave

Metarhizium; gen 2np1.

INTRODUCCIÓN

El sorgo representa el grano forrajero con mayor presencia en nuestro país, ya que es el principal ingrediente en la formulación de alimentos balanceados en el sector pecuario siendo Guanajuato el segundo estado en producirla [1]. Este grano también es utilizado para consumo humano, y en la industria de la extracción se emplea fundamentalmente para la obtención de almidón y glucosa, además de la obtención de tres importantes solventes: alcohol, acetona y butanol. La producción del sorgo no está exenta del efecto nocivo de las plagas, las cuales suelen ser el mayor problema en la producción agrícola. [2]

Los hongos entomopatógenos son un amplio grupo de microorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos [3]. La actividad más conocida de estos hongos es su capacidad de actuar como controladores biológicos de insectos plaga. Siendo los géneros *Metarhizium*, *Beauveria* y *Verticillium* los más conocidos, y por décadas han sido utilizados por su efectivo mecanismo de infección al insecto hospedero siendo capaces de causar su enfermedad y muerte. Adicionalmente, recientemente se ha encontrado que *Metarhizium* no sólo tiene una asociación con el insecto sino también se encuentra en la rizósfera de las plantas beneficiando el crecimiento de la misma tanto en raíces, hojas y tallos como se observó en experimentos realizados en frijol y pasto. [4, 5, 6].

Se conoce que *Metarhizium* tiene en su genoma seis genes tipo 2-nitropropano dioxigenasa, de los cuales dos se expresan mayormente en presencia de nitroalcanos y otros dos en presencia de la cutícula del insecto hospedero [7]. Hemos visto que *Metarhizium* puede utilizar los nitroalcanos como fuente de carbono y/o nitrógeno [8,9] y mediante la interacción del micelio con las raíces de la planta, el hongo podría exponerse a los nitroalcanos producidos por las plantas, siendo posiblemente necesaria la expresión de uno o varios genes 2np.

Sabemos que la cepa CARO19 del género *Metarhizium* ha presentado una mejor interacción benéfica con *Sorghum vulgare* observándose un mayor incremento de la biomasa de las plantas, mayor número de semillas germinadas y mayor crecimiento de la raíz principal [5] en comparación de otras cepas o bien de la ausencia del hongo. Para saber si los genes 2np participan de alguna manera en esta interacción benéfica hongo-planta, en trabajo previo (Comunicación Personal Padilla-Guerrero y Medina-Garnica) se deletó el gen 2np1 de *M. brunneum*, siendo la finalidad de este trabajo evaluar si la interrupción de la expresión de 2np1 afecta la interacción benéfica del hongo con la planta de Sorgo.

Para ello, en este trabajo se analizará el efecto de las cepas mutantes 2np1 de *M. brunneum*, en la germinación y desarrollo de *Sorghum vulgare* en tierra estéril y no estéril.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos utilizados

Las cepas utilizadas en este trabajo son *Metarhizium brunneum*: las cuales son: CARO19 silvestre, C19 mutante A1, C19 mutante B2, C19 mutante C1. Para obtener conidios frescos, se sembraron conidios de cada cepa, en medio mínimo y m-100, por 8 días a una temperatura de 28 ° C. Los conidios se colectaron por raspado y se lavaron con agua estéril por centrifugación, conservándolos a 4 °C. Se usó semilla comercial de *Sorghum vulgare*.

Simbiosis en suelo hongo-planta

Producción a gran escala de conidios. Se preparó cinco bolsas de arroz blanco, sumergiéndolo en agua previamente hervida por 15 min, para después ser colado y secado al aire libre. El arroz se esterilizó en autoclave y se inocularon con 1×10^9 conidios de cada una de las cepas. Se incubaron a 28°C por 7 días.

Tratamiento de tierra.

Se empleó tierra de cultivo porosa y fue cernida hasta llenar 6 charolas de aluminio que correspondían al volumen de 30 macetas de 15x5 cm (el experimento se hizo en triplicado). Tres de ellas fueron esterilizadas en autoclave.

Se mezcló 20 gr del arroz que contenía los conidios de la cepa de *Metarhizium* a probar, junto con $\frac{1}{4}$ de la tierra en un recipiente y se agregó a las $\frac{3}{4}$ partes de la tierra en la maceta.

Se sembraron 18 semillas de Sorgo en cada caja, a un 1 cm de profundidad, se regaron con 100 ml de agua destilada y fueron expuestas al sol por 10 días.

Se midió la altura de la plántula, la longitud de la raíz principal y se registró el número de semillas que germinaron.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para contestar la pregunta si la expresión del gen 2np1 es importante en la interacción del hongo *M. brunneum* con la planta de sorgo, se sembraron semillas de sorgo en suelo esterilizado y suelo no-esterilizado en presencia de conidios frescos de alguna de las mutantes en el gen 2np1 (C19 mutante-A1, C19-mutanteB2 y C19-mutanteC1) y se evaluó el desarrollo de la plántula a los 10 días. Se usó como control positivo de estimulación, conidios de la cepa silvestre CARO19; y como control negativo, suelo carente de conidios del hongo. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 1 y 2, donde se observa que, las semillas en presencia de conidios de *Metarhizium* crecen mejor, medido como longitud total de la plántula (ver tabla 1 y 2), que aquellas semillas que crecieron en ausencia de conidios del hongo, independientemente si el suelo está o no previamente esterilizado. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado por [5].

Interesantemente, las plantas desarrolladas en presencia de los conidios de las cepas mutantes nulas del gen 2np1 (C19-mutanteA1, C19-

mutanteB2, C19-mutanteC1) tienen un desarrollo menor en comparación con el observado en las plantas crecidas en presencia de conidios de la cepa silvestre CARO19 (ver Figuras 1, 2), así como el número de semillas germinadas fue menor (ver tabla 1 y 2). Este resultado es muy interesante porque la única diferencia genética entre los mutantes C19 mutante-A1, C19 mutante-B2 y C19 mutante-C1 y la cepa silvestre CARO19 de *M. brunneum*, es el gen 2np1, es decir, este gen está ausente en los mutantes y en cambio en la cepa silvestre, el gen sí existe y se expresa. Por lo tanto estos resultados sugieren fuertemente que el gen 2np1 el cual codifica para una 2 Nitropropano dioxigenasa participa en la interacción benéfica *Metarhizium brunneum-Sorghum vulgare*. El análisis de los datos numéricos de tamaño y peso de las plántulas están en proceso.

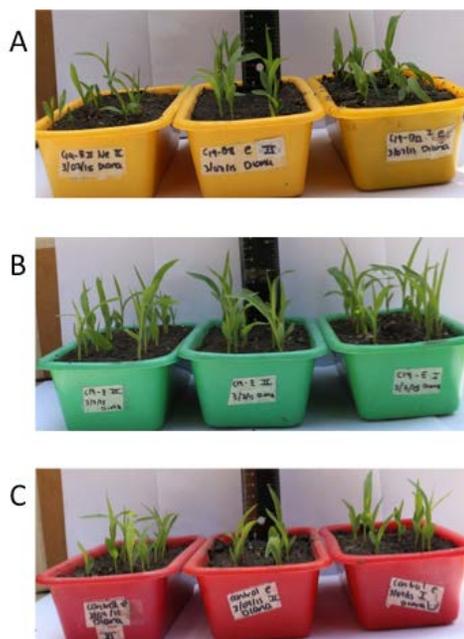


Figura 1. Efecto de *Metarhizium* en el crecimiento del sorgo. A. Plantas en interacción con C19 mutante B2. B. Plantas en interacción con la cepa silvestre CARO19. C. Plantas crecidas en ausencia del hongo.



Figura 2. Efecto de *Metarhizium* en el desarrollo de la plántula completa de sorgo. A. Plántulas crecidas en suelo no esterilizado. B. Plántulas crecidas en suelo esterilizado. Control sin hongo; en interacción con la cepa silvestre CARO19; y con las mutantes C19 mutanteA1, C19 mutanteB2, y C19 mutanteC1.

Cepas utilizadas de <i>Metarhizium</i>	TIERRA ESTÉRIL		
	SEMILLAS GERMINADAS		
1. CONTROL	11	3	14
2. C19 SILVESTRE	16	16	16
3. C19 MUT A1	11	12	13
4. C19 MUT B2	15	11	10
5. C19 MUT C1	11	3	14

Tabla 1: Medición de datos

CONCLUSIONES

Los experimentos de interacción Hongo-Planta, *Metarhizium brunneum-Sorghum vulgare*, indican que el gen 2np1 es importante en este proceso.

Cepas utilizadas de <i>Metarhizium</i>	TIERRA NO ESTÉRIL		
	SEMILLAS GERMINADAS		
6. CONTROL	11	10	12
7. C19 SILVESTRE	14	7	6
8. C19 MUT A1	8	10	6
9. C19 MUT B2	3	5	5
10. C19 MUT C1	4	13	4

Tabla 2: Medición de datos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a la Dra. Gloria Angélica Gonzales Hernández por darme la oportunidad de desarrollar este asombroso proyecto, a mis asesores: Francisco Cabrera Rangel, Citlali Medina, Abraham Gasca, Adriana García y al Dr. Israel Padilla Guerrero, por tener la paciencia, tolerancia así como la disposición de enseñarme y aconsejarme, gracias por hacerme sentir como si estuviera en una segunda casa. A mi asesora Claudia Erika Morales Hernández por haberme motivado a entrar al Verano Científico, realmente fue una gran experiencia que sin ella no hubiera sucedido, a todo el Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, y a mi familia que sin su apoyo no hubiera logrado cumplir este proyecto, muchísimas gracias.

Se agradece a Citlali Isabel Medina Garnica e Israel Padilla Guerrero por aportar con las cepas mutantes nulas del gen 2np1.

Este trabajo se realizó con el apoyo de los proyectos: Ciencia Básica SEP-CONACYT, convenios 220780 y 388394; Convocatoria Institucional de Investigación Científica, convenios 415/2014, 511/2015 y 641/2015; y Apoyo al Fortalecimiento de la Excelencia Académica, modalidad Infraestructura convenio 005/2014.

REFERENCIAS

1. Fecha de consulta: 8 de Julio de 2014. Recuperado de: <http://www.siap.gob.mx/sorgo-grano/>
2. Fecha de consulta: 6 de Julio de 2014. Recuperado de: [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Sorgo%20\(may%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Sorgo%20(may%202014).pdf)
3. Motta-Delgado, Pablo Andrés; Murcia-Ordoñez, Betselene (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, vol. 6, núm. 2, pp. 77-90, doi:10.4136/1980-993X
4. Behie S. W., Zelisko P. M., Bidochka M. J. (2012). Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. *Science* **336**, 1576 (2012); DOI: 10.1126/science.1222289.
5. Herrera Gutiérrez, Luz Janeth. Universidad de Guanajuato. Padilla Guerrero Israel Enrique, Torres Guzmán, Juan Carlos. Universidad de Guanajuato. Análisis de la interacción de cepas mexicanas del hongo *Metarhizium* con *Sorghum vulgare* (2014). Verano de Investigación Científica, CONCYTEG pág. 1
6. Liao X., O'Brien T. R., Fang W., St. Leger R. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied genetics and molecular biotechnology*, Vol. 98, pp 7089-7096, DOI 10.1007/s00253-014-5788-2
7. Ramírez Cuellar J. (2014). Tesis de Licenciatura. Factores que afectan la expresión de genes 2np y localización peroxisomal de proteínas 2Np de *Metarhizium anisopliae*. Universidad de Guanajuato.
8. Padilla Guerrero I.E. (2010). Tesis Doctorado. Estudio de la participación de genes de expresión diferencial en el proceso patogénico de *Metarhizium anisopliae*. Universidad de Guanajuato.
9. Villa Martínez B.G. (2012). Tesis Maestría. Caracterización de genes 2nitropropano dioxigenasa de *Metarhizium anisopliae*