

# INTERACCIÓN HONGO-PLANTA-INSECTO; PARTICIPACIÓN DE GENES 2NP1 y 2NP5 EN LA INTERACCIÓN DE *Metarhizium* CON *Brassica oleracea* Y *Medicago sativa*

López Gaeta, Juan Manuel (1), Juan Carlos Torres Guzmán, Israel Enrique Padilla Guerrero, Yadira Sarahí Guerrero Carrera, Gloria Angélica González Hernández (2)

<sup>1</sup> [Bachillerato General, Escuela de Nivel Medio Superior Centro Histórico León] | [juanlg143@hotmail.com]

<sup>2</sup> [Departamento de Biología, Campus Guanajuato] | [gonzang@ugto.mx]

## Resumen

El hongo *Metarhizium brunneum* es conocido por sus propiedades entomopatógenas y por desarrollar una interacción benéfica con las raíces de algunas plantas. Esta interacción ha llevado a experimentar la relación de este hongo con otras plantas, en este caso se analizaron las interacciones entre algunas cepas de *Metarhizium*; CARO19 silvestre, B2 mutante del gen 2np1,  $\Delta 2$ ,  $\Delta 7$  y  $\Delta 9$  mutantes nulas del gen 2np5, estas se enfrentaron con semillas de las plantas de *Medicago sativa* y *Brassica oleracea*. Los resultados del presente trabajo demuestran que en la interacción de *Brassica oleracea* con cepas ausentes del gen 2np5 se perjudica el crecimiento de las raíces secundarias. En el caso de *Medicago sativa*, la interacción de las semillas con las diferentes cepas del hongo fue deletérea para la germinación y crecimiento de la planta.

## Abstract

The fungus *Metarhizium brunneum* is known for its entomopathogenic properties and for developing a beneficial interaction with the roots of some plants. This interaction has led to experience the relationship of this fungus with other plants, in this case we analyzed the interactions between some strains of *Metarhizium*; CARO19 wild type, B2 null mutant of the gene 2np1; and null mutants of the gene 2np5, the strains  $\Delta 2$ ,  $\Delta 7$  and  $\Delta 9$ , they clashed with seeds of the plants of *Medicago sativa* and *Brassica oleracea*. The results of the present work demonstrate that in the interaction of *Brassica oleracea* with null mutants of 2np5 gene, the growth of the secondary roots is impaired. In the case of *Medicago sativa*, the interaction of the seeds with the different strains of the fungus *Metarhizium* was deleterious for the germination and growth of the plant.

## Palabras Clave.

*Metarhizium*. Brocoli; Alfalfa; genes 2np1 y 2np5

## INTRODUCCIÓN

### Brócoli, alfalfa y hongos entomopatógenos

En el país los cultivos de brócoli (*Brassica oleracea*) y alfalfa (*Medicago sativa*) son muy importantes, el primero para consumo humano y el segundo es un forraje importante para el ganado por su alto nivel nutricional. Actualmente en la república mexicana se siembra una superficie de 214 mil hectáreas de brócoli con un rendimiento de hasta 15 mil toneladas por ha. Sonora y Guanajuato son los principales exportadores de brócoli [2]. Los insectos plaga que más afectan a estos cultivos son el gusano trozador, el pulgón y el minador para el brócoli; y el nemátodo *M. incognita*, la pulguilla *S. virides* y chinche de la alfalfa *N. viridula para la alfalfa*, los cuales se combaten principalmente mediante la aplicación de pesticidas químicos los cuales son muy tóxicos [1, 3] con graves consecuencias sobre el ecosistema.

Los hongos entomopatógenos representan una alternativa amable y eficiente para el control de plagas (4). Entre ellos, algunos de los más estudiados son *Metarhizium spp* y *Beauveria bassiana*. Estos dos géneros son capaces además de estimular el crecimiento de algunas plantas y de vivir saprófitamente en el suelo (5).

Los nitroalcanos son compuestos tóxicos ampliamente distribuidos como contaminantes debido su amplio uso en la industria, incluso en la fabricación de algunos pesticidas. Sin embargo, también son producidos en la naturaleza por algunos microorganismos y plantas, por lo que cabría esperar que *Metarhizium* y otros microorganismos del suelo se enfrenten a este tipo de compuestos. Se han descrito en hongos filamentosos y levaduras algunas enzimas implicadas en su catabolismo, como las nitroalcano oxigenasas y nitropropano dioxigenasas (6,7), y aunque se ha descrito su actividad bioquímica no se ha descrito cuál es su función en la fisiología de estos organismos. En nuestro laboratorio hemos visto que *Metarhizium spp* posee al menos 6 genes que codifican enzimas nitropropano dioxigenasas. Con la

finalidad de investigar la función de estos genes se generaron mutantes nulos en los genes 2np1 y 2np5. En estudios previos se vio que la mutación en el gen 2np1 afecta la interacción del hongo con el sorgo, por lo que en este trabajo nos enfocamos a estudiar el efecto que pudieran tener estas mutaciones en la interacción de *Metarhizium* con la alfalfa y el brócoli. Se eligieron estas dos plantas por ser de interés agronómico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo empleado: *Metarhizium brunneum* cepa silvestre CARO19, B2 cepa mutante nula del gen 2np1, y las cepas  $\Delta 2$ ,  $\Delta 7$  y  $\Delta 9$  mutantes nulas del gen 2np5.

Plantas empleadas: semillas de *Medicago sativa* y *Brassica oleracea* var. itálica, mejor conocidas como alfalfa y brócoli respectivamente.

Cultivo y colecta de conidios de *Metarhizium*: Se sembraron 500-1000 conidios de cada cepa por caja de Medio Mínimo y se incubaron a 28°C por 1 semana hasta conidiación color verde oliva característica. Posteriormente se colectaron por raspado con una solución de tritón al 0.1 %, se prepararon diluciones seriadas base 10 y se hizo conteo de conidios al microscopio en cámara de Neubauer.

Interacción hongo-planta in vitro: en medio agar-agua se colocaron 10 semillas previamente esterilizadas por caja distribuidas en línea. Los conidios (50  $\mu$ l de conidios) se sembraron en una línea paralela a las semillas a 2 cm de distancia. Cada cepa del hongo a probar, con las semillas de alfalfa o brócoli, se sembró por triplicado. Las cajas se incubaron a 28 °C por fotoperiodos de luz-oscuridad de 12 h. En el caso del brócoli el periodo de incubación fue de 10 días y para las semillas de alfalfa el periodo de incubación fue de 14 días.

Interacción hongo-planta en suelo: Las cepas a probar se crecieron en arroz durante 14 días hasta conidiación completa. Para la preparación de la tierra se empleó tierra sustrato colocada en charolas de aluminio, a éstas se les adiciono 50ml de agua destilada, después se envolvió en bolsas de plástico, y se esterilizó 3 veces. Usando macetas de plástico de 15x5cm, se adiciona  $\frac{3}{4}$

partes de la tierra, enseguida se mezclaron 25g del hongo crecido en arroz con el  $\frac{1}{4}$  de la tierra restante y se extiende encima, enseguida se sembraron 18 semillas en cada maceta y regando inicialmente con 300ml de agua destilada a cada maceta. Se incubaron por 16 días en el invernadero y fueron regadas con 100ml de agua destilada cada 24 h hasta el día de su extracción.

Evaluación de la interacción entre las plantas y las distintas cepas del hongo *Metarhizium*; se tomaron fotos en las que se apreciara las características de la planta, por ejemplo, para la visualización de los pelos radiculares en las plantas se utilizó el estereomicroscopio Carl Zeiss modelo Axion Zoom V16. También se midió el porcentaje de germinación, el tamaño de planta completa, tamaño de la raíz y número de raíces secundarias. Estas se tabularon y graficaron para mayor comprensión de los datos y con ello llegar a una conclusión del experimento realizado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para identificar la importancia de la interacción entre las cepas del hongo y las plantas *Medicago sativa* y *Brassica oleracea* var. *itálica* se emplearon las siguientes cepas de *Metarhizium*: las cuatro mutantes a probar B2( $\Delta$ 2np1);  $\Delta$ 2( $\Delta$ 2np5),  $\Delta$ 7( $\Delta$ 2np5) y  $\Delta$ 9 ( $\Delta$ 2np5); como control positivo de interacción hongo-planta se usó la cepa silvestre *M. brunneum* CARO19, y como control negativo semillas de *Medicago sativa* o *Brassica oleracea* var. *itálica* que no fueron enfrentadas a ningún hongo durante la germinación y crecimiento. Se procedió como se indica en Material y Métodos para realizar los experimentos *in vitro* y en suelo. Cada experimento se realizó por triplicado.

Se promediaron las características de las plantas que se cuantificaron; tamaño de plántula completa, tamaño de raíz, número de raíces secundarias y se registró la densidad de pelos radiculares para cada uno de los experimentos de interacción hongo-planta *in vitro* y en suelo realizados.

Se analizaron y se llegó a los siguientes resultados: En el experimento de interacción *Metarhizium*-brócoli *in vitro* podemos observar un buen índice de germinación en todas las plantas, con un porcentaje entre el 80% y 90 %. En cuanto

el promedio del tamaño completo de las plantas, y tamaño de las raíces no hay diferencia significativa entre los controles negativo y positivo, sin embargo en cuanto al número de raíces secundarias hay casi tres veces más raíces secundarias en el control positivo y en el mutante B2 comparado con el control negativo. De manera interesante los tres deletantes del gen 2np5 no estimulan el desarrollo de raíces secundarias en la planta de brócoli (Tabla 1), o sea la ausencia del gen 2np5 en *Metarhizium* afecta principalmente al crecimiento de las raíces secundarias en el brócoli en la interacción bipartita (Figura 1). Es notorio que la mutante en el gen 2np1 (B2) se comporta igual que la cepa silvestre sugiriendo que 2np1 no es importante en esta interacción específica brócoli - *Metarhizium*.

En contraste, en los experimentos de interacción brócoli - *Metarhizium* en suelo, encontramos que en general los resultados de germinación, independientemente de la cepa usada en la interacción hongo-planta, dieron cifras muy bajas en comparación con los resultados *in vitro* posiblemente por falta de mayor humedad en las etapas tempranas de la germinación en el ensayo en suelo (Figura 2), por lo que no es posible considerar estos resultados.

En cuanto al experimento de interacción de alfalfa - hongo *in vitro* (Tabla 2) se observó una germinación bastante aceptable que oscila entre el 70% y 90%. Sin embargo, cuando se compararon los datos, observamos que las semillas tratadas con el hongo silvestre (CARO19) o mutantes de los genes 2np1 o 2np5, se vieron afectadas negativamente en su crecimiento, como se puede observar en la Tabla 2. Y este efecto negativo es más acusado en los mutantes nulos del gen 2np5. De hecho, en la Figura 3 se puede apreciar la germinación y crecimiento de las plantas de alfalfa en el control negativo (ausencia del hongo), en contraste con las cajas en las cuales las semillas estuvieron en contacto directo con el hongo, donde a simple vista sólo se aprecia el cr

ecimiento del hongo sobre las plántulas. Los datos de la Tabla 2 se obtuvieron después de retirar el hongo, el cual prácticamente ahogó a las plantas.

**Tabla 1: Promedios de las características de la planta de brócoli en interacción con *Metarhizium in vitro*.**

Características analizadas en las plantas	Interacción <i>Metarhizium</i> - Brócoli in vitro					
	Contrl (-)	C19	B2	$\Delta 2$	$\Delta 7$	$\Delta 9$
Germinación (%)	90	90	90	80	83	87
Tamaño completo de las plantas (cm)	6.4	5.8	6.0	7.8	5.6	5.3
Tamaño de raíz (cm)	4.9	4.1	4.1	6.0	3.6	3.6
No. raíces secundarias	0.9	2.6	2.6	0.6	0.6	0.6



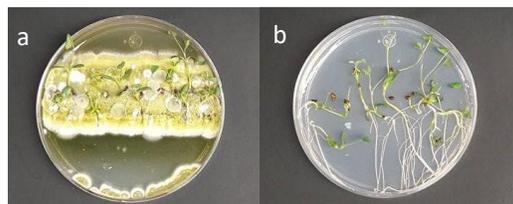
**Figura 1. Germinación del brócoli *in vitro* en interacción con *Metarhizium*. Control sin hongo, CARO19, B2,  $\Delta 2$ ,  $\Delta 7$ ,  $\Delta 9$**



**Figura 2. Germinación del brócoli en interacción con *Metarhizium*. Control sin hongo, CARO19, B2,  $\Delta 2$ ,  $\Delta 7$ ,  $\Delta 9$**

**Tabla 2 Características de la planta de alfalfa en interacción con *Metarhizium in vitro***

Características analizadas en las plantas	Alfalfa en interacción con <i>Metarhizium in vitro</i>					
	Contrl (-)	C19	B2	$\Delta 2$	$\Delta 7$	$\Delta 9$
Germinación (%)	83	80	90	70	83	87
Tamaño completo (cm)	9.7	2.3	2.7	1.4	2.6	3
Tamaño de raíz (cm)	3.5	1.5	1	0.5	1	1.1
No. raíces secundarias	2.5	1.9	1.3	0.2	1.2	1.8



**Figura 3: Comparación entre alfalfa tratada con *Metarhizium* (a), Vs alfalfa sin interacción con ningún organismo (b).**

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que el gen 2np5 del hongo *Metarhizium brunneum*, participa de alguna manera en el desarrollo de las raíces secundarias de la planta *Brassica oleracea* cuando la planta interacciona con el hongo. En el caso de la interacción *Metarhizium* – *Medicago sativa* en las condiciones que se hizo el experimento, el hongo tiene un efecto deletéreo sobre el desarrollo de las plántulas, es posible que la concentración de conidios utilizada para la interacción directa fue muy alta, siendo necesario en un futuro inmediato probar concentraciones mas bajas de conidios del hongo en dicha interacción.

## REFERENCIAS

[1] Fecha de consulta: 16 de julio de 2017. Recuperado de: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estudios/Documents/monografias/brocoli.pdf>

[2] Fecha consulta: 16 de junio de 2017. Recuperado de: [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/ALFALFA.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/ALFALFA.pdf)

[3] De León L., Banchemo L., López Pérez JA, Bello A. 2000. Control de *Meloidogyne incognita* en cultivo de tomate en Uruguay. Bol. San. Veg. Plagas, 26: 401-407

[4] Motta-Delgado, Pablo Andrés; Muarcia-Ordoñez, Betselene. (2011). Hongos entomopatogenos 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

[5] Lovett B, St Leger RJ. (2015). Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. Curr Genet, 61(3):253-61. doi: 10.1007/s00294-014-0447-9.

[6] Kido T, Tanizawa K, Inagaki K, Yoshimura T, Ishida M, Hashizume K, Soda K (1984). 2-Nitropropane dioxygenase from *Hansenula mrakii*: re-characterization of the enzyme and oxidation of anionic nitroalkanes. Agric Biol Chem 48(10):2549–2554.

[7] Gorlatova N, Tchorzewski M, Kurihara T, Soda K, Esak (1998) N Purification, Characterization, and Mechanism of a Flavin Mononucleotide-Dependent 2-Nitropropane Dioxygenase from *Neurospora crassa*. Appl Environ Microbiol 64:1029–1033