

Efecto de la delección de potenciales factores de virulencia en el ciclo de vida de *Metarhizium*

Effect of the deletion of potential virulence factors in the *Metarhizium* life cycle

Eder Santiago Gutiérrez Jasso¹, María Alejandra Osornio González¹, María Fernanda Pantoja Trujillo¹, Mariela Zarazúa Rivera¹, Araceli López Andrade¹, Gloria Angélica González Hernández¹ y Juan Carlos Torres Guzmán¹.

¹Universidad 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; torguz@ugto.mx

Resumen

Las especies del género *Metarhizium* son hongos con distintos estilos de vida, que pueden crecer como saprófitos, endófitos de plantas y entomopatógenos, estas características han permitido su uso en el control biológico de insectos plagas de cultivos de importancia agroeconómica. La capacidad entomopatógena de las especies de *Metarhizium* no depende de un solo factor, sino de la interacción coordinada de distintos determinantes de patogenicidad del hongo y factores del insecto hospedero. Dentro de estos factores se encuentran las enzimas nitronato monooxigenasas (NMO). Estas enzimas 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 la interacción entre hongos y 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 se analizó la influencia del gen *NMO6* en la capacidad entomopatógena de *Metarhizium* hacia el insecto *Plutella xylostella* y la promoción del crecimiento de plantas de brócoli, mediante el estudio de tres mutantes nulos del gen *NMO6*. Los resultados nos muestran que los mutantes tienen una menor capacidad de conidiación y una disminución en su virulencia al insecto. La inoculación de *Metarhizium brunneum* en semillas de brócoli aumentó la longitud de la raíz, con diferencias significativas entre cepas silvestres y las mutantes nulas.

Palabras clave: *Metarhizium*, nitronato monooxigenasas, *Plutella xylostella*, *Brassica oleracea*.

Antecedentes

***Metarhizium*: Aspectos generales**

Las especies del género *Metarhizium* tienen estilos de vida multifuncionales y se encuentran en varios nichos ecológicos (Gotti et al., 2023). Estas especies tienen la capacidad de habitar el suelo como saprófitos, colonizar la rizosfera, actuar como endófitos e incluso ser patógenos de insectos. Las especies del género *Metarhizium* son de los hongos entomopatógenos mejor estudiados a nivel molecular y bioquímico (Gao et al., 2011), los cuales han sido reconocidos por su papel esencial en el control de poblaciones de insectos en ambientes naturales y artificiales (González et al., 2020). Los análisis filogenéticos sobre este género han revelado que *Metarhizium* está más relacionado con los endosimbiontes de gramíneas que con patógenos animales, lo que sugiere una evolución a partir de un linaje de simbiontes de plantas (Spatafora et al., 2007). A pesar de que muchas de estas especies siguen manteniendo su rol como simbiontes de plantas, recientes estudios se han enfocado en la capacidad de este género para infectar y matar insectos, permitiéndoles acceder a una fuente especializada de elementos como nitrógeno y carbono. Un ejemplo es *Metarhizium anisopliae*, que ha demostrado el poder degradar los hidrocarburos de insectos para su utilización en la producción de energía y la biosíntesis de componentes celulares (Cervantes et al., 2020).

El ciclo de vida de *Metarhizium* como entomopatógeno

El conidio de *Metarhizium* es la forma infectiva; se adhieren a la cutícula del hospedero y germinan para iniciar el proceso de infección. En presencia de nutrientes y agua, los conidios de *Metarhizium*, forman tubos de germinación. Los tubos de germinación continúan el crecimiento hifal sin diferenciación mientras la cantidad y calidad de los nutrientes no sean suficientes para la diferenciación. En la cutícula del hospedero, la elongación apical se detiene y forma el apresorio, el cual, es el sitio principal de adhesión y produce enzimas que ayudan a penetrar la cutícula del huésped (González et al., 2020). Este proceso requiere de enzimas y metabolitos que permiten la degradación del exoesqueleto para permitir la penetración de las hifas (Ortiz-Urquiza et al., 2015). Una vez dentro del hemocele, el micelio crece a través del huésped, formando cuerpos hifales llamados blastosporas. Poco después, el insecto muere por una combinación de factores como toxinas fúngicas, invasión de órganos, etc. una vez muerto, las hifas emergen del cadáver y producen conidios que serán esparcidos por el viento o agua (Scholte et al., 2005).

El papel de *Metarhizium* como hongo endófito y promotor del crecimiento en plantas

Muchos hongos entomopatógenos además actúan como endófitos, colonizando tejidos de la planta sin causar un daño aparente, promoviendo el crecimiento vegetal, mejorando la productividad y la vitalidad de la planta (Ortiz-Espinosa et al., 2020). En el caso de *Metarhizium*, este transfiere nitrógeno derivado de insectos a la planta, además de producir ácido indol-3-acético que estimula el desarrollo de los pelos radiculares y el crecimiento de las radículas laterales que se sugiere proporcionan una superficie de raíz para la colonización de *Metarhizium* (Lahey et al., 2020). Varios estudios han demostrado que *M. anisopliae* puede colonizar las raíces de diferentes cultivos y aumentar el crecimiento de *Arabidopsis*, tomate, judía, frijol, yuca y maíz (González-Pérez et al., 2022). Existe evidencia que sugiere que la mejor forma de inocular los hongos endófitos entomopatógenos es desde la semilla, lo que aduce a la importancia del método de inoculación (Ortiz-Espinosa et al., 2020). Por ejemplo, los aislamientos de *M. brunneum*, *M. anisopliae* y *M. robertsii* son componentes de la rizósfera y tienen la capacidad de estimular el crecimiento de trigo, maíz y cebolla, cuando se aplicaron como tratamientos de semillas (Liao et al., 2014). La asociación simbiótica de raíces con *Metarhizium* beneficia tanto a plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, lo cual tiene aplicaciones agrícolas potenciales, como el biocontrol de insectos y la promoción del crecimiento de las plantas.

Nitronato monooxigenasas (NMO)

En la naturaleza, se pueden encontrar nitroalcanos como resultado de actividades antropogénicas (Balogh-Hergovich et al., 2007; Gadda y Fitzpatrick, 1999), pero también pueden ser sintetizados por algunos microorganismos, por ejemplo, el 3-nitropropionato (3NPA) producido por los hongos *Penicillium atrovenetum* y *Aspergillus flavus* (Porter y 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 mrakii* (Kido y 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, tales como desintoxicación, promoción del crecimiento o el establecimiento de la infección del hospedero. En *Magnaporthe oryzae* la proteína NMO2, es necesaria para resistir el estrés nitrooxidativo estimulado durante la colonización de su planta huésped, y convierte los compuestos tóxicos inducidos por el estrés nitrooxidativo (nitroalcanos) en otras fuentes de nitrógeno que podrían promover la proliferación fúngica (Nguyen et al., 2022).

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, 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*. 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). Para determinar la función de estos genes en los estilos de vida del hongo, se generaron mutantes nulos sencillos de ambos (*MbC19Δnmo1* y *MbC19Δnmo5*). 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). Adicionalmente se han generado los mutantes nulos de los genes *NMO2* (Guerrero Carrera, 2020), *NMO3*

(Esquivias Varela, 2023), *NMO4* y *NMO6*. En este trabajo se pretende determinar la influencia del gen *NMO6* en los distintos estilos de vida de *Metarhizium*.

Resultados

Crecimiento radial y conidiación de *Metarhizium brunneum* silvestre y mutantes $\Delta nmo6$

Previamente en el laboratorio, se construyeron mutantes nulos del gen *NMO6* mediante reemplazo génico del marco de lectura abierto del gen *NMO6* 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 *NMO6* en los mutantes, así como la integración de una única copia del casete de delección (Padilla Martínez, 2024; comunicación personal).

Un parámetro importante de evaluar es determinar si la usencia del gen *NMO6* afecta el crecimiento y conidiación de los mutantes. Para el análisis se sembraron 20 μ l conteniendo 1000 conidios frescos de los mutantes MbC19- $\Delta nmo6$ -14.1, MbC19- $\Delta nmo6$ -14.2 y MbC19- $\Delta nmo6$ -14.3 y del parental silvestre (MbCARO19), en el centro de tres placas Petri con medio PDA y tres placas Petri con medio M100; se incubaron las placas 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.

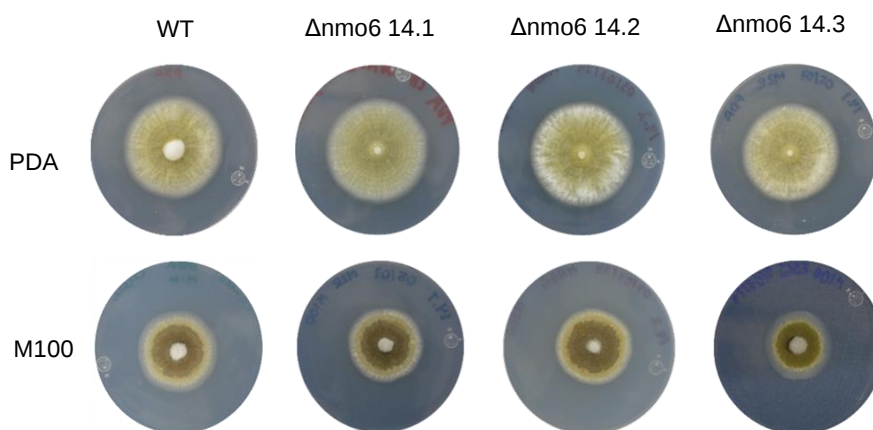


Figura 1. Fenotipo del crecimiento de la cepa MbCARO19 y las mutantes nulas MbC19- $\Delta nmo6$ -14.1, MbC19- $\Delta nmo6$ -14.2 y MbC19- $\Delta nmo6$ -14.3 en medio PDA y M100 luego de 10 días de incubación a 28°C con fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad.

Visualmente, las placas muestran colonias sin diferencias fenotípicas significativas entre la cepa de tipo silvestre y las mutantes nulas. A partir del análisis de los datos del crecimiento radial en medios PDA y M100, se puede observar que las áreas de las colonias de las cepas MbCARO19 y de las mutantes nulas son mayores en medio PDA (promedio de 16.08 cm²) en comparación con el medio M100 (promedio de 8.86 cm²), sin una diferencia significativa entre ellas en ambos medios de cultivo. Podemos observar la conidiación en las colonias cultivadas en medio M100, mientras que en PDA únicamente se observa micelio sin conidiación. Esta diferencia puede explicarse por las variaciones en la composición nutricional de los medios de cultivo. El medio PDA es rico en nutrientes que favorecen el crecimiento vegetativo del hongo, lo que resulta en una mayor producción de micelio. Por otro lado, el medio M100 es un medio mínimo, favorece la conidiación, resultando en una mayor conidiación observada en las placas.

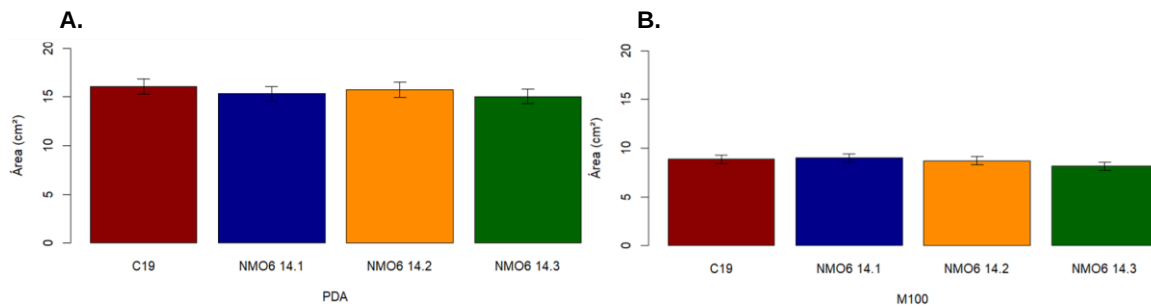


Figura 2. Comparación entre el promedio del área colonial de la cepa silvestre MbCARO19 y las mutantes nulas MbC19-Δnmo6-14.1, MbC19-Δnmo6-14.2 y MbC19-Δnmo6-14.3. A. En medio PDA, B. En medio M100.

Para determinar la concentración de conidios presentes por centímetro cuadrado en cada cepa, se realizó la recolección de los conidios producidos por las cepas cultivadas en los medios PDA y M100. Posteriormente, se realizó el conteo de conidios utilizando una cámara de Neubauer, una herramienta estándar para la cuantificación precisa de células y esporas (Bustillo, 2010). Para obtener una estimación precisa de la cantidad de conidios por centímetro cuadrado, se prepararon suspensiones de los conidios recolectados. En el caso del medio M100, se realizó una dilución seriada base 10 para asegurar una adecuada dispersión y contabilidad de los conidios. En contraste, para el medio PDA, las suspensiones se tomaron directamente del tubo sin dilución adicional, dado que la concentración de conidios era manejable para el conteo directo tanto para la cepa MbCARO19 como para las mutantes nulas. Las figuras 3 y 4 muestran la concentración de conidios/cm² entre la cepa silvestre MbCARO19 y las mutantes nulas en los medios PDA y M100 respectivamente.

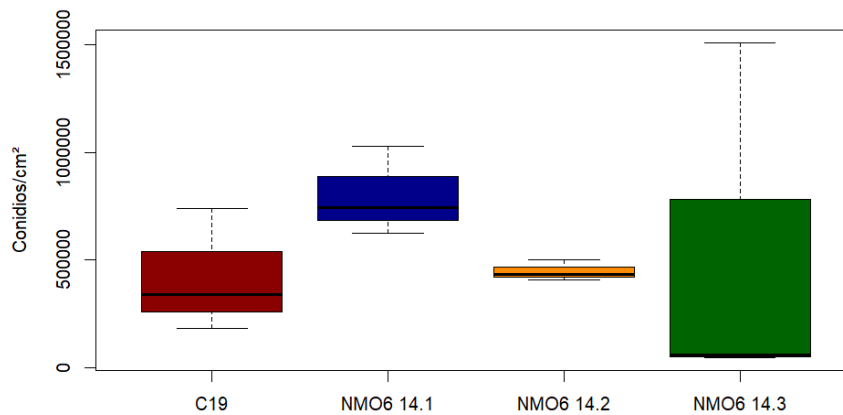


Figura 3. Comparación de los promedios de la concentración de conidios/cm² entre la cepa MbCARO19 y las mutantes nulas MbC19-Δnmo6-14.1, MbC19-Δnmo6-14.2 y MbC19-Δnmo6-14.3 en medio PDA.

Los resultados obtenidos muestran que en medio PDA la deletante MbC19-Δnmo6-14.1 parece producir una mayor cantidad de conidios en comparación con la cepa silvestre MbCARO19 y los otros mutantes. Si bien, estudios han comprobado que las mutaciones pueden aumentar o disminuir la expresión de genes involucrados en la conidiación modificando la señalización. Un ejemplo es *M. robertsii*, en donde se observó que la eliminación del gen de poliubiquitina (*MrUBI4*), esencial en el desarrollo de hongos, redirigió el flujo metabólico hacia otras rutas biosintéticas, disminuyendo la disponibilidad de precursores y energía para la conidiación (Wang et al., 2019).

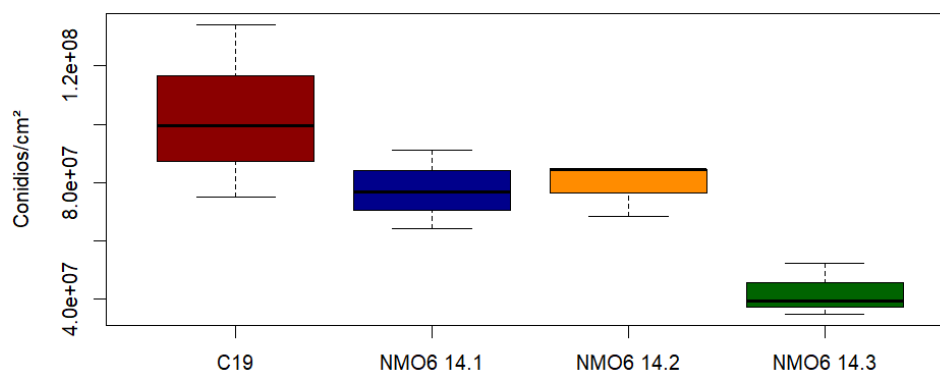


Figura 4. Comparación de los promedios de la concentración de conidios/cm² entre la cepa MbCARO19 y las mutantes nulas MbC19-Δnmo6-14.1, MbC19-Δnmo6-14.2 y MbC19-Δnmo6-14.3 en medio M100.

En lo que respecta a resultados del medio M100, la figura 4 muestra un aumento en la producción de conidios/cm² de todas las cepas, con una aparente mayor producción en la cepa silvestre MbCARO19. Se puede observar igualmente que la deletante Δnmo6-14.3, es en la que se observa menor concentración de conidios. Es importante mencionar que estos resultados son de un experimento por triplicado y es necesario realizar más repeticiones para determinar si estas diferencias observadas son estadísticamente significativas. Estas diferencias si resultasen significativas, pueden indicar variaciones en la eficiencia de producción de conidios entre las cepas, posiblemente relacionadas con sus características genéticas o su adaptación al medio utilizado. Retomando el artículo de Wang y colaboradores, se sugiere que la manipulación de rutas metabólicas puede tener un impacto significativo en la conidiación. Por otro lado, el aumento de la conidiación podría estar dado por el estrés nutricional. Tal y como se mencionó con anterioridad, el medio M100, con su composición limitada de nutrientes en comparación con el medio PDA, puede inducir una respuesta de estrés en *M. brunneum*, activando rutas de señalización que promueven la conidiación como una estrategia de supervivencia.

Infección en *Plutella xylostella*

Para conocer las implicaciones que tiene la delección del gen *NMO6* en la interacción hongo-insecto, se realizaron pruebas de infección en el lepidóptero *Plutella xylostella* en el estadio del tercer instar, utilizando un control tratado únicamente con Tritón X-100 al 0.01%, la cepa silvestre MbCARO19 y las mutantes nulas MbC19-Δnmo6-14.1, MbC19-Δnmo6-14.2 y MbC19-Δnmo6-14.3. Se evaluó el porcentaje de supervivencia en cada una de las variantes en un lapso de 5 días, este ensayo se realizó por triplicado. Por cepa, en 4 cajas Petri se colocaron 12 larvas de *P. xylostella*, las cuales, se infectaron con 250 μL de una solución de concentración de 10⁷ conidios en Tritón X-100 al 0.01% rociados por medio de un aerógrafo, en el caso del control se rociaron únicamente con 250 μL de Tritón X-100 al 0.01%, se colocó en todas, una hoja de brócoli y algodón previamente humedecido con agua como fuentes de alimento y se incubaron a 22° C, monitoreando diariamente el % de supervivencia durante 5 días. Una vez que se alcanzaba el deceso total de la población larval utilizada para el ensayo, se recolectaron todas las larvas muertas e infectadas en una caja Petri, se colocaron algodones previamente humedecidos con agua y se incubaron las cajas en condiciones de temperatura controlada de 27° C, esto con la finalidad de observar de manera más detallada el progreso de la infección en estereoscopio (Fig. 5).

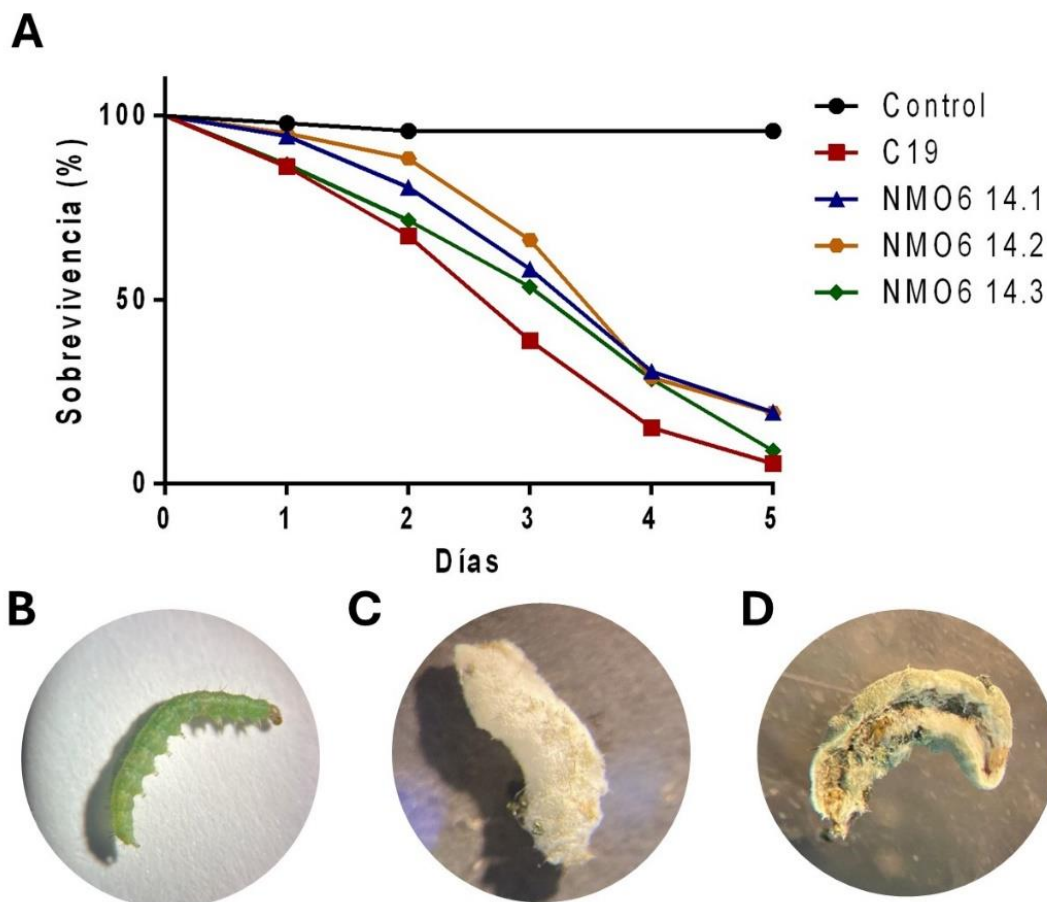


Figura 5. Progreso del proceso infeccioso a *Plutella xylostella*. A. Gráfico de sobrevivencia total de CARO19 y las mutantes nulas del gen NMO6 en la interacción con *Plutella xylostella* en un plazo de 5 días. El control corresponde al tratamiento con Tritón X-100 al 0.01%hongo. MbCARO19, cepa silvestre; MbC19- Δ nmo6, mutantes 14.1, 14.2 y 14.3 B. C. *P. xylostella* sana en estadio larval D. *P. xylostella* después de 5 días de infección por *M. brunneum*. E. *P. xylostella* después de 10 días de infección por *M. brunneum*.

En la tabla 1 se muestra los datos del tiempo de letalidad media (TL50), esto es el tiempo que le tomó al hongo matar al 50 % de la población de insectos. Se puede observar que mientras la cepa silvestre MbCARO19 tiene un LT50 de 2.6 días, las mutantes tienen una LT50 de entre 3.1 a 3.4 días, lo que implica que la delección del gen NMO6 afecta la efectividad de *M. brunneum* como entomopatógeno.

Tabla 1. Tiempo Letal Medio (TL50)

CEPA	DÍAS
MbCaro19	2.6
MbC19 Δ nmo6-14.1	3.3
MbC19 Δ nmo6-14.2	3.4
MbC19 Δ nmo6-14.3	3.1

Interacción hongo-planta en la germinación in vitro de plantas de brócoli

Para determinar la participación del gen *NMO6* en la promoción del crecimiento de plantas, la cepa silvestre y mutantes nulas del gen *NMO6* de *M. brunneum* se emplearon como tratamiento en la germinación de semillas de brócoli (*Brassica oleracea*) in vitro. Se sembraron 10 semillas de brócoli en medio de agar-agua y, de manera simultánea, se inoculó una dilución de conidios de *Metarhizium* en una solución de Tritón X-100 al 0.01%. Se estableció una concentración de 1×10^8 conidios de la cepa silvestre MbC19 y las mutantes nulas, MbC19- $\Delta nmo6$ 14.1, MbC19- $\Delta nmo6$ 14.2 y MbC19- $\Delta nmo6$ 14.3, la cual se colocó a 2 cm de distancia de las semillas de *B. oleracea* previamente esterilizadas, siguiendo los protocolos descritos por Guerrero Carrera (2018). Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado y se incubó a 28°C durante 10 días, con ciclos de 12 h luz/12 h oscuridad.

Al finalizar el periodo de incubación se evaluaron los resultados obtenidos (figura 6), registrando la longitud total de la raíz y el porcentaje de germinación en cada tratamiento. Estudios previos han reportado que las plántulas de tomate inoculadas con *M. robertsii* (cepa ESALQ 1635) mostraron un aumento en la altura de la planta, la longitud de la raíz y la biomasa seca de los brotes en comparación con las plantas de control a los 10, 15 y 30 días posteriores a la inoculación. También se ha demostrado un efecto beneficioso sobre las plantas de maíz, donde las plantas colonizadas por *M. robertsii* mostraron incrementos en la biomasa en comparación con las plantas no inoculadas (González-Pérez et al, 2022).

En el presente experimento, se observó que la inoculación de *M. brunneum* en las semillas de brócoli se observa un ligero aumento en la longitud de la raíz, si bien este efecto no es estadísticamente significativo ($p = 0.2679$). Sin embargo, al comparar los resultados de la cepa silvestre con las mutantes nulas se obtiene una diferencia significativa en el crecimiento de la raíz entre el tratamiento con la cepa silvestre y las mutantes nulas del gen *NMO6* 14.1 y 14.2 ($p = 0.01706$ y $p = 0.0001345$, respectivamente). Esto sugiere que la expresión de *NMO6* está involucrada en la colonización de la rizósfera y la promoción del crecimiento de la planta, ya que su delección afecta la interacción de *M. brunneum* con la planta.

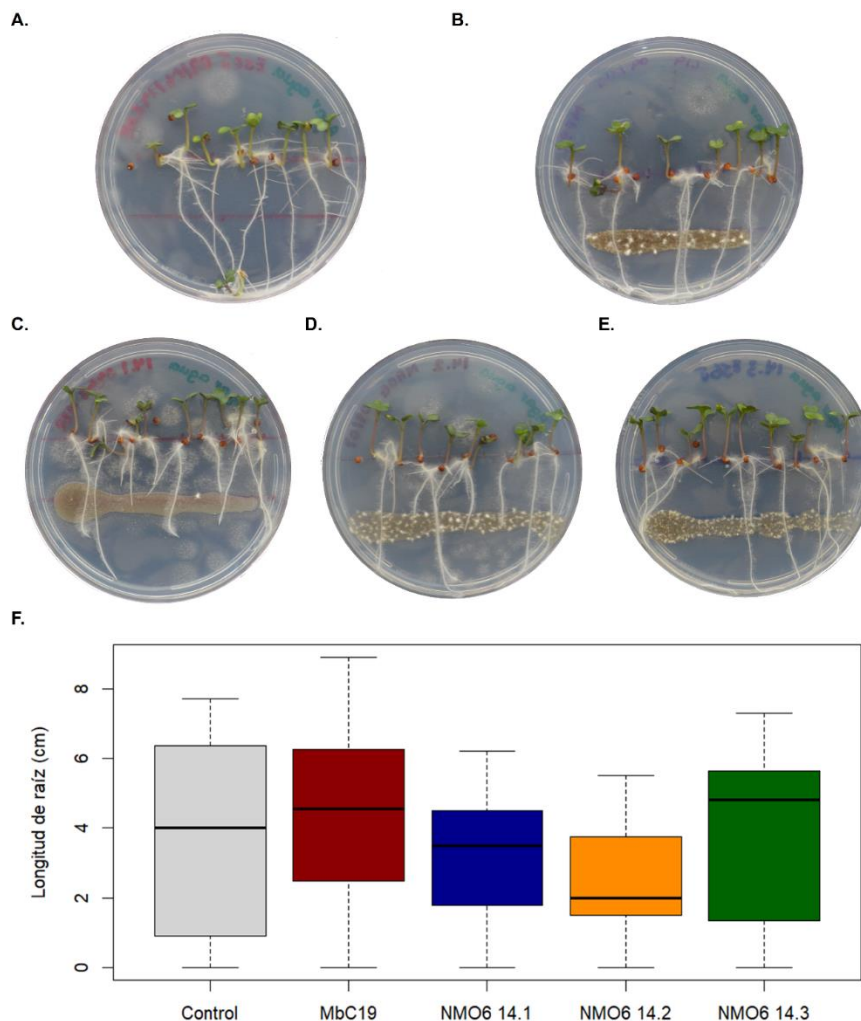


Figura 6. Efecto de la delección del gen *NMO6* en la interacción entre *M. brunneum* – *B. oleracea* en ensayo in vitro en medio agar-agua. A. Control. Sin contacto con el hongo. B. Plántulas tratadas con la cepa silvestre MbCARO19. C, D y E. Plántulas tratadas con las cepas mutantes MbC19-Δnmo6 14.1, MbC19-Δnmo6 14.2 y MbC19-Δnmo6 14.3, respectivamente. Fotografías representativas de cada condición. F. Longitud de raíz (cm) de plántulas de brócoli después de 10 días de tratamiento.

Germinación en suelo agrícola

Para analizar el efecto de la delección del gen *NMO6* en la promoción del crecimiento de plantas, se realizó la interacción de la cepa silvestre MbCARO19 y las mutantes nulas del gen *NMO6* con semillas de brócoli, pero a diferencia del análisis anterior ahora se realizó en suelo agrícola en invernadero, para simular las condiciones que pueden suceder en campo, por lo que posterior a la esterilización de las 40 semillas de brócoli por cepa y del proceso de esterilización de la tierra agrícola, se añadieron a diferentes semilleros en las que la cepa silvestre CARO19 se colocó apartada de las tres cepas deletantes: MbC19-Δnmo6 14.1, MbC19-Δnmo6 14.2 y MbC19-Δnmo6 14.3, así como del semillero de control a manera de evitar contaminaciones. Se añadió un aproximado de 15 ml de agua destilada en cada pocillo de siembra en la que se agregó el suelo agrícola y se sembró una semilla por cada espacio de siembra a una profundidad de dos centímetros; colocando los semilleros a temperatura ambiente en el invernadero 1 de la DCNyE. La observación se realizó durante diez días a partir de la primera observación de brote, la cual se presentó a los cuatro días de la siembra en la cepa CARO19, a los nueve días posteriores a la siembra el control contaba con veintiocho germinaciones. Al término de los diez días de monitoreo se obtuvo que la cepa con mayor germinación y desarrollo de las semillas con un porcentaje de 77.5% sobre las 40 semillas que fueron plantadas fue la cepa MbC19-Δnmo6 14.1. Por otra parte, la cepa CARO19 obtuvo un 75% de germinación; finalmente las cepas deletantes MbC19-Δnmo6 14.2 y MbC19-Δnmo6 14.3, obteniendo el mismo porcentaje de germinación del 72.5%. El número de semillas germinadas en cada semillero en las cepas tiene una

variación entre 31 a 29 con lo que se puede determinar que no existen diferencias significativas en el porcentaje de germinación de las semillas de brócoli entre la cepa silvestre MbCARO19 y las deletantes del gen *NMO6* (Figura 7).

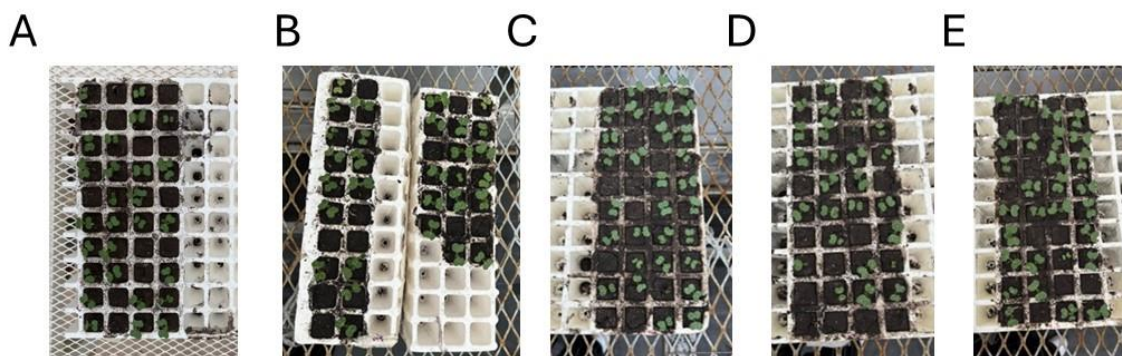


Figura 7. Crecimiento en suelo agrícola de semillas de brócoli en interacción con A Control B la cepa silvestre MbCaro19 y las mutantes nulas C MbC19-Anmo6 14.1, D MbC19-Anmo6 14.2, y E MbC19-Anmo6 14.3.

Conclusiones

Los datos del presente trabajo nos sugieren que la delección del gen *NMO6* en la cepa CARO19 de *M. brunneum* no tiene un efecto significativo en el crecimiento y producción de conidios del hongo. El aumento del tiempo de letalidad media en los ensayos de infección en el insecto *P. xylostella* nos sugiere que el gen *NMO6* participa en este proceso de infección, ya que al carecer del gen el hongo tarda más en matar al 50 % de la población de insectos. Los ensayos interacción con brócoli no sugiere que este gen participe en el proceso. Por lo tanto, el gen *NMO6* es importante en el estilo de vida como entomopatógeno del hongo.

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
- Bustillo, A. 2010. Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos. 10.13140/RG.2.1.3594.5128.
- Cerda de Loera, 2018. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato.
- 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
- Gadda, G., & Francis, K. (2010). Nitronate monooxygenase, a model for anionic flavin semiquinone intermediates in oxidative catalysis. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 493(1), 53-61. https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.06.018
- Gao Q, Jin K, Ying S-H, Zhang Y, Xiao G, et al. (2011) Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*. 7(1): e1001264 doi: 10.1371/journal.pgen.1001264
- González Hernández GA, Padilla Guerrero IE, Martínez Vázquez A, Torres Guzmán JC. (2020). Virulence factors in the entomopathogen genus *Metarhizium*. *Current Protein & Peptide Science*. 21. 10.2174/1389203721666200116092407.
- González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Bautista, E., Delgado-Sánchez, P., & Jiménez-Bremont, J. F. (2022). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances *Arabidopsis*, tomato, and maize plant growth. *Plant Physiology And Biochemistry*, 176, 34-43. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.008

- 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
- Gotti IA, Moreira CC, Delalibera I Jr., De Fine Licht HH. (2023). Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* Are Not Always as Virulent as Conidia Are towards *Spodoptera frugiperda* Caterpillars and Use Different Infection Mechanisms. *Microorganisms*.11(6):1594. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061594>
- Guerrero Carrera, 2018. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato.
- 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
- Lahey, S., Angelone, S., DeBartolo, M. O., Coutinho-Rodrigues, C., & Bidochka, M. J. (2020). Localization of the insect pathogenic fungal plant symbionts *Metarhizium robertsii* and *Metarhizium brunneum* in bean and corn roots. *Fungal Biology*, 124(10), 877-883. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.07.005>
- Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., & St Leger, R. J. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 98(16), 7089- 7096. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5788-2>
- Nguyen, P. T., Wacker, T., Brown, A. J. P., Da Silva Dantas, A., & Shekhova, E. (2022). Understanding the Role of Nitronate Monooxygenases in Virulence of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Journal Of Fungi*, 8(7), 736. <https://doi.org/10.3390/jof8070736>
- Ortiz-Espinoza, E., Villegas-Rodríguez, F., Ramírez-Tobías, H. M., Hernández-Arteaga, L. E. S., & Marín-Sánchez, J. (2020). La inoculación con hongos endófitos entomopatógenos en semilla genera una respuesta fisiológica y promueve el crecimiento vegetal en plantas de chile poblano en invernadero. *Nova scientia*, 12(25), 00025. <https://doi.org/10.21640/ns.v12i25.2586>
- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., & Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1057–1068. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6270-x>
- Padilla Martínez 2023 (comunicación personal).
- Porter DJ, Bright HJ (1987) Propionate-3-nitronate oxidase from *Penicillium atrovenetum* is a flavoprotein which initiates the autoxidation of its substrate by O₂. *J Biol Chem* 262(30):14428-34
- Spatafora JW, Sung GH, Sung NL, Hywel J, White JF. (2007). Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology*. 16 (8): 1701–1711 doi: 10.1111/j.1365- 294X.2007. 03225.x
- Scholte, E. J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaajmans, K., Abdulla, S., Killeen, G. F., & Knols, B. G. (2005). An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1641–1642. <https://doi.org/10.1126/science.1108639>
- Wang Z, Zhu H, Cheng Y, Jiang Y, Li Y, Huang B. The polyubiquitin gene *MrUBI4* is required for conidiation, conidial germination, and stress tolerance in the filamentous fungus *Metarhizium robertsii*. *PubMed*.10(6):412. doi: 10.3390/genes10060412. PMID: 31146457; PMCID: PMC6627135.