

Influencia del gen *XPP1* en la interacción de *Metarhizium brunneum* con *Brassica oleracea*

Influence of the *XPP1* gene in the interaction of *Metarhizium brunneum* with *Brassica oleracea*

Alexa Naomi Carrasco Mendoza¹, Carolina Olvera Torres¹, Guadalupe Araceli López Andrade¹, Gloria Angélica González Hernández¹

¹ Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. México.
gonzang@ugto.mx

Resumen

El género *Metarhizium* incluye hongos entomopatógenos, conocidos por ser controladores de plagas agrícolas mediante la aplicación de conidios en cultivos. Además, *Metarhizium* también puede formar relaciones simbióticas con plantas, actuando como endófitos, colonizando tejidos de la planta sin causar daño aparente, proporcionando diversos beneficios a las plantas hospedadoras, tales como la mejora del crecimiento y biomasa vegetal, estimulación del crecimiento radicular, adquisición de nitrógeno derivado de insectos, antagonismo frente a patógenos vegetales y tolerancia a estrés salino. Los hongos pueden producir una gran variedad de compuestos bioactivos mediante metabolismo secundario, que cumplen funciones clave como: defensa ante depredadores y condiciones hostiles, comunicación, competencia y toxicidad frente a bacterias y otros hongos y participación en procesos de patogenicidad. En *Trichoderma reesei*, se identificó un factor de transcripción denominado Xpp1 que actúa como interruptor entre el metabolismo primario y secundario, actuando como regulador negativo del metabolismo secundario. En el presente trabajo, se evaluó la influencia del gen *XPP1* en la interacción entre *Metarhizium brunneum* y las plantas *Brassica oleracea* y *Sorghum vulgare*. Se emplearon una cepa silvestre, mutantes nulos, reintegrantes y sobreexpresantes del gen *XPP1* para analizar su efecto en el crecimiento vegetal, la germinación y el desarrollo radicular, tanto en condiciones in vitro como en suelo agrícola. Los resultados sugieren que la delección del gen *XPP1* afecta el desarrollo de *Brassica oleracea*, particularmente a la raíz, en cambio, para *Sorghum vulgare* afecta la retención y absorción del agua.

Palabras clave: *Metarhizium*, *XPP1*, *Brassica oleracea*, *Sorghum*,

Antecedentes

El género *Metarhizium* se caracteriza por su actividad como hongos entomopatógenos ubicuos en el suelo, conocidos por su capacidad para controlar plagas agrícolas mediante la aplicación de conidios en semillas o cultivos. Además de su rol como biopesticida, *Metarhizium* proporciona diversos beneficios a las plantas hospedadoras: mejorando el crecimiento y biomasa vegetal, estimulación del crecimiento radicular, adquisición de nitrógeno derivado de insectos, antagonismo frente a patógenos vegetales y/o tolerancia a estrés salino (Barelli *et al.*, 2020). Estas propiedades, combinadas con su patogenicidad hacia insectos, hacen de *Metarhizium* un candidato prometedor como inóculo rizosférico en agricultura.

Metarhizium desempeña un papel clave en el control natural de insectos. Su patogenicidad no depende de un único factor, sino de una interacción coordinada entre varios determinantes fúngicos y factores del hospedero (González Hernández *et al.*, 2019). Los conidios son la forma infecciosa del hongo: se adhieren a la cutícula del insecto y germinan al encontrar nutrientes y humedad. En la superficie del hospedero, el tubo germinativo se diferencia formando un apresorio, que permite la adhesión, secreción de enzimas líticas, penetración cuticular y establecimiento en el hemocele del insecto. Tras invadir los tejidos, el micelio emerge formando una cubierta blanca formando finalmente nuevos conidios listos para reiniciar el ciclo (González Hernández *et al.*, 2019).

Aunque se reconoce principalmente por su capacidad entomopatógena, *Metarhizium* también puede formar relaciones simbióticas con plantas, colonizando sus raíces (Pavone, 2021) actuando como endófitos, colonizando tejidos de la planta sin causar daño aparente, promoviendo el crecimiento, mejorando la productividad y la vitalidad de la planta (Ortiz Espinoza *et al.*, 2020). *Metarhizium* es capaz de crecer internamente dentro del tejido vegetal, y la evidencia ha demostrado que *M. robertsii* coloniza endófitamente las raíces del pasto de varilla, así como el trigo, el frijol y la soja (Barelli *et al.*, 2016).

Estudios recientes muestran que tanto *Metarhizium* como *Beauveria* mejoran la estructura del suelo y el microbioma, actúan como probióticos desplazando microorganismos nocivos, funcionan como hongos similares a micorrizas, mejorando la absorción de agua y nutrientes, así como estimulan resistencia sistémica inducida en las plantas hospedadoras (Pavone, 2021).

Los hongos pueden producir una gran variedad de compuestos bioactivos mediante metabolismo secundario, muchos de ellos con aplicaciones potenciales en medicina y biotecnología. Sin embargo, en condiciones de laboratorio, la mayoría de los genes que regulan estas rutas están silenciados, lo que limita el descubrimiento y la producción de nuevos metabolitos. Los metabolitos secundarios cumplen funciones clave como: defensa ante depredadores y condiciones hostiles, comunicación con otros organismos con los cuales se interacciona, competencia y toxicidad frente a bacterias y otros hongos y participación en procesos de patogenicidad. Para el hongo el enfrentarse a plantas y el suelo puede significar condiciones estresantes que pueden modificar su metabolismo para responder y adaptarse.

En *Trichoderma reesei*, se identificó un factor de transcripción denominado Xpp1 (Xylanase promoter-binding protein 1) que actúa como interruptor entre el metabolismo primario y secundario, y se describió que la delección de Xpp1 disminuye el metabolismo primario y aumenta significativamente la producción y diversidad de metabolitos secundarios (Derntl *et al.*, 2017).

Dado que se han identificado ortólogos del gen **Xpp1** en hongos como *Metarhizium*, estos hallazgos abren la posibilidad de que, manipular este gen en *Metarhizium* pueda influir en la producción de metabolitos. En el laboratorio de Genética Molecular de Hongos se generó el mutante nulo $\Delta xpp1$ en *M. brunneum* (Cervantes Quintero, 2020) así como los respectivos reintegrantes y sobreexpresantes del gen **XPP1** (García-Fernández, comunicación personal). Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar la interacción de dichos mutantes de *Metarhizium brunneum* con plantas de brócoli y sorgo.

Materiales y métodos

Cepas utilizadas

Cepa	Especie	Simbología
Silvestre <i>MbCARO19</i>	<i>M. brunneum</i>	C19
Mutante nulo <i>MbC19$\Delta xpp1$-17</i>	<i>M. brunneum</i>	$\Delta 17$
Mutante nulo <i>MbC19$\Delta xpp1$-46</i>	<i>M. brunneum</i>	$\Delta 46$
Reintegrante <i>MbC19$\Delta xpp1$-17/XPP1</i>	<i>M. brunneum</i>	$\Delta 17$ -R
Reintegrante <i>MbC19$\Delta xpp1$-46/XPP1</i>	<i>M. brunneum</i>	$\Delta 46$ -R
Sobreexpresante <i>MbC19OEXPP1-2</i>	<i>M. brunneum</i>	OEX2
Sobreexpresante <i>MbC19OEXPP1-7</i>	<i>M. brunneum</i>	OEX7

Medios de cultivo

Agar agua: se agregaron 15 g de agar bacteriológico (Bioxon) en 1 litro de agua destilada.

Obtención de conidios

Para la cuantificación de conidios, se prepararon diluciones seriadas en base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-3} a partir de la suspensión inicial de conidios. Posteriormente, se procedió al conteo colocando 10 μL de cada dilución en ambos lados de una cámara de Neubauer, y se realizó la cuenta al microscopio de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . La concentración de conidios se expresó en número de conidios por mililitro (conidios/mL), calculándose mediante la aplicación del factor de dilución correspondiente (10^2 o 10^3), así como el factor de la cámara de Neubauer (1×10^4).

Ensayo de interacción *Metarhizium-Brassica oleracea* en agar agua.

Para cada cepa en medio agar agua se colocaron 10 semillas en línea recta y a 2 cm de distancia se inoculó 1×10^8 conidios, el ensayo se realizó por quintuplicado y se incubaron a 28°C en condiciones de fotoperiodo luz/oscuridad por 5 días. Pasado el periodo de incubación las plántulas se extrajeron con ayuda de unas pinzas y posteriormente se midió la longitud total de la planta y la longitud de la raíz.

Preparación de semillas para ensayo de interacción *Metarhizium-planta* en suelo agrícola

Con base en la concentración de conidios obtenida (conidios/mL), se calcularon los volúmenes necesarios para obtener una suspensión con una concentración final de 1×10^8 conidios, correspondiente a cada una de las cepas utilizadas. Dicho volumen fue centrifugado, el sobrenadante fue decantado y los conidios se resuspendieron en 625 μL de carboximetilcelulosa al 0.05%, con el propósito de favorecer la adherencia de los conidios a las semillas. En el caso de las semillas control, se les adicionó solo carboximetilcelulosa al 0.05%. Para cada tratamiento, se utilizaron 44 semillas de *Brassica oleracea*, las cuales se colocaron en cajas Petri y se dejaron secar bajo condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. El procedimiento descrito se repitió para semillas de *Sorghum vulgare*.

Ensayo de interacción *Metarhizium-planta* en suelo agrícola

Previamente, se preparó la tierra de uso agrícola mediante un tamizado con el fin de eliminar piedras y otros materiales de gran tamaño. Después, se realizó una mezcla de tierra y arena en una proporción 2:1, la cual fue esterilizada tres veces. Una vez esterilizada, se procedió al llenado de los semilleros, que fueron humedecidos, las 44 semillas tratadas con cada cepa fueron sembradas a una profundidad aproximada de 1 cm. Durante los primeros dos días posteriores a la siembra, no se regaron con el objetivo de permitir el establecimiento de *Metarhizium*. Transcurrido este periodo, se regaron diariamente. En el caso de *Sorghum vulgare*, las plantas se dejaron crecer durante 10 días, mientras que para *Brassica oleracea*, el periodo fue de 14 días.

Finalizado el tiempo de crecimiento, las plántulas fueron cuidadosamente extraídas y lavadas para eliminar el exceso de tierra. Posteriormente, se midió la longitud total de la planta y de la raíz por separado. Las muestras se colocaron en papel aluminio previamente pesado para registrar el peso húmedo, y luego se secaron en una estufa con el fin de determinar el peso seco.

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó el software GraphPad Prism 10.1.1 donde se aplicó el ANOVA de una vía.

Resultados y discusión

Interacción *Metarhizium brunneum* - *Brassica oleracea* en agar-agua

Para ver el efecto del gen **XPP1** de *Metarhizium* sobre la germinación se sembraron semillas de *B. oleracea* y conidios de las diferentes cepas mutantes de *M. brunneum* como se indica en Materiales y Métodos (MyM). En la Figura 1C se observa que si bien el control (semillas sin hongo) presenta un menor porcentaje de germinación en comparación con la observada al tratar las semillas con la cepa silvestre de *M. brunneum*, no parece haber efecto por la ausencia del gen (D17, D46) ni cuando se reintegra ectópicamente (D17-R) ni cuando se sobreexpresa en un fondo silvestre (OX2, OX7). Solo se ve una diferencia en las semillas tratadas con D46-R. Esto sugiere que el gen **XPP1** no participa en la estimulación de la germinación de la semilla de *B. oleracea*, con excepción del reintegrante *MbΔxpp1-46/XPP1* (D46-R), en el cual se detecta una afectación en el porcentaje de germinación, lo que podría indicar una alteración asociada al sitio de la reintegración del gen **XPP1**.

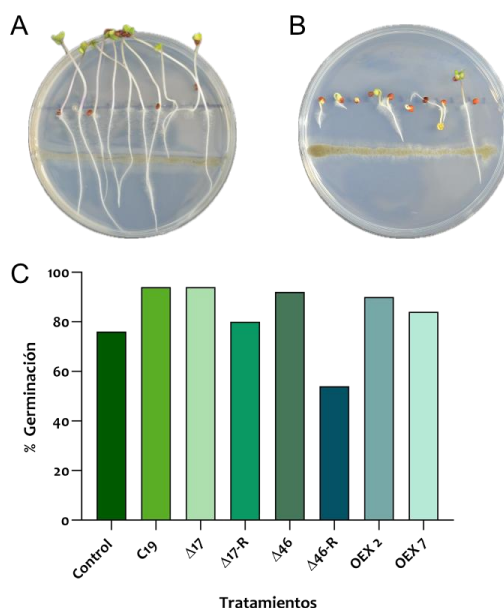


Figura 1. Efecto de XPP1 de *Metarhizium* en la germinación de semillas de brócoli. A. Imagen representativa de la germinación de semillas tratadas con la cepa silvestre MbCARO19. B. Imagen representativa de la germinación de semillas tratadas con la cepa reintegrante $\Delta xpp1-46/XPP1$ (D46-R). C. Efecto de *Metarhizium* en la germinación de *Brassica oleracea* en agar-agua.

Se midió el crecimiento de las plantas desarrolladas en agar-agua y en presencia de las mutantes de *Metarhizium*. En la figura 2A se muestra la longitud de la planta completa y en 2B la longitud de la raíz. En ambas gráficas se aprecia que la ausencia del gen **XPP1** (mutantes $\Delta 17$ y $\Delta 46$) afecta negativamente el crecimiento de la planta, tanto la longitud de la planta completa como la longitud de la raíz, efecto que se ve restaurado cuando se reintegra nuevamente el gen silvestre **XPP1** al mutante nulo $\Delta 17$ ($\Delta 17$ -R), no siendo así en el reintegrante $\Delta 46$ -R. Este resultado sugiere que el gen **XPP1** es importante para el desarrollo de la planta. El efecto observado con el reintegrante *MbC19Δxpp1-46/XPP1* de no-recuperación como ocurre en *MbC19Δxpp1-17/XPP1*, nuevamente sugiere que podría estar afectando el sitio donde se reintegró el gen silvestre **XPP1** en esta cepa, posiblemente se ve afectado por su entorno genético ya sea en la expresión del mismo gen u otro gen implicado en este proceso ya que se observa un resultado desfavorable en el crecimiento de la planta. En 2C se muestra una imagen representativa de las plantas con cada tratamiento.

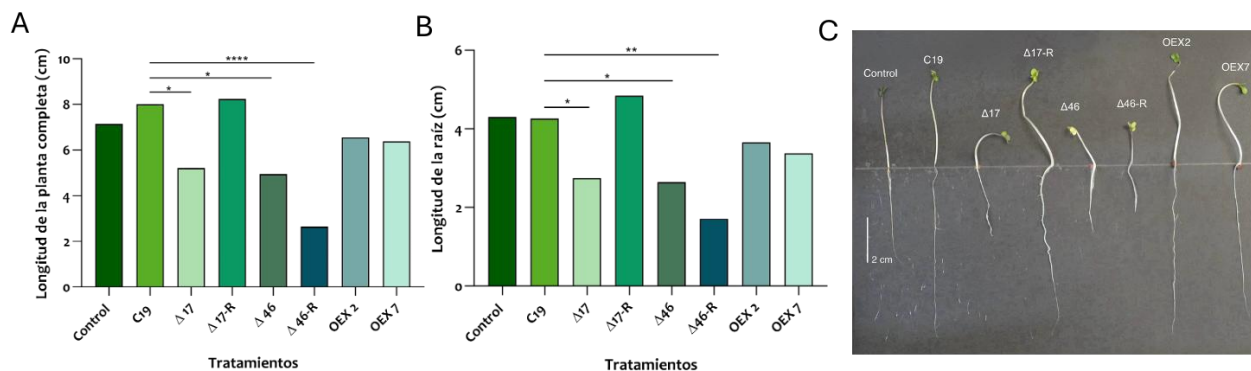


Figura 2. Efecto de XPP1 de *Metarhizium* en el crecimiento de la planta de brócoli. A. Efecto de *Metarhizium* en la longitud de la planta completa en agar-agua. B. Efecto de *Metarhizium* en la longitud de la raíz en agar-agua. C. Fotografía representativa de plantúlas de *Brassica oleracea* tratadas con cepas de *Metarhizium* en agar-agua.

Interacción de *Metarhizium* - *Brassica oleracea* en suelo agrícola

Para evaluar el efecto de los mutantes del gen **XPP1** de *M. brunneum* al interactuar con *B. oleracea* en condiciones más cercanas a las que se encuentran en campo, se realizó el experimento en suelo agrícola como se menciona en MyM. Como se observa en la figura 3A, solo las semillas tratadas con los sobreexpresantes de **XPP1** presentaron mayor germinación que el observado en las semillas sometidas a los demás tratamientos. Aun cuando el tratamiento con la sobreexpresante *MbC19OEXPP1-2* sobresale a diferencia de la sobreexpresante *MbC19OEXPP1-7*. Como ya se mencionó anteriormente el gen silvestre **XPP1** reprime el metabolismo secundario lo que sugiere que la sobreexpresión del gen y la alteración de los niveles de alguno de dichos metabolitos estimula la germinación de la planta.

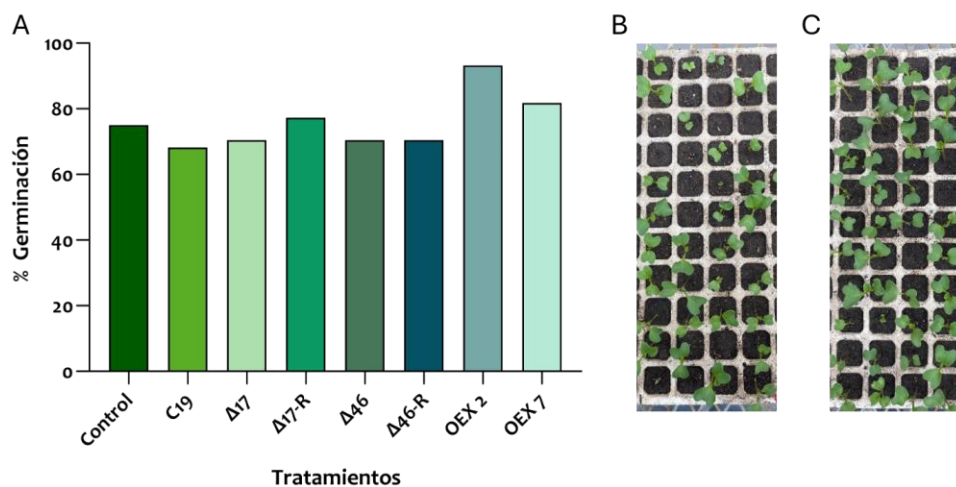


Figura 3. Efecto de XPP1 de *Metarhizium* en la germinación de *Brassica oleracea* en suelo agrícola. A. Porcentaje de germinación de *Brassica oleracea*. B. Imagen representativa de plantas tratadas con la cepa silvestre *MbCARO19* C. Imagen representativa de plantas tratadas con la cepa sobreexpresante *MbC19OEXPP1-2*.

Por otro lado, la ausencia del gen en condiciones de suelo agrícola no parece tener un efecto significativo en el desarrollo de la planta, no obstante, como se observa en la figura 4 el reintegrante *MbC19xpp1-46/XPP1* sigue mostrando un efecto negativo en cuanto al crecimiento de la planta, tanto en la longitud de la planta completa como en la raíz, y como se ha mencionado anteriormente puede deberse al sitio de integración.

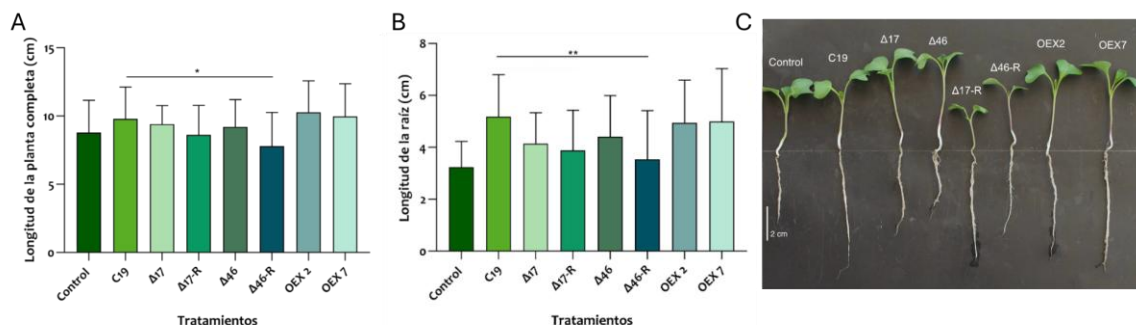


Figura 4. A. Evaluación de la longitud de la planta completa en suelo agrícola. B. Evaluación la longitud de la raíz en suelo agrícola. C. Fotografía representativa de plantas de *Brassica oleracea* tratadas con cepas de *Metarhizium* en suelo agrícola.

En relación con el peso húmedo el mutante *MbC19Δxpp1-17* aunque no existan diferencias significativas visualmente se sugiere que podría estar afectando el peso húmedo ya que se está comportando como el tratamiento control y cuando se reintegra el gen se ve un comportamiento similar a cuando la planta interacciona con la cepa *MbCARO19*, del mismo modo, al igual que en los casos anteriores el reintegrante *MbC19Δxpp1-46/XPP1* tiene un efecto menor. En cuanto al peso seco no se observan diferencias significativas entre los tratamientos indicando que la biomasa de la planta no se ve afectada.

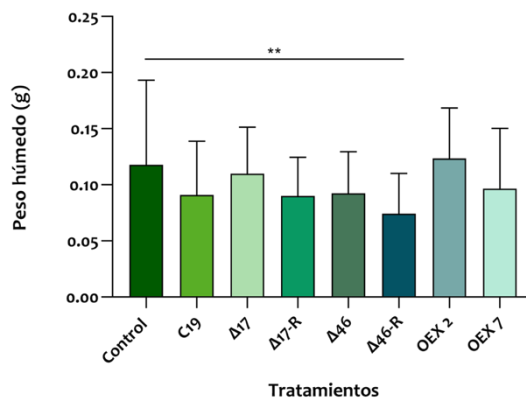


Figura 5. Efecto de XPP1 de *Metarhizium* en el peso húmedo de *Brassica oleracea* en suelo agrícola.

Interacción *Metarhizium brunneum* - *Sorghum vulgare* en suelo agrícola

Con respecto a la interacción entre *M. brunneum* y *S. vulgare*, se evaluó únicamente en suelo agrícola, en donde tanto al porcentaje de germinación y la longitud total de la planta, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Por el contrario, al analizar la longitud de la raíz, se encontró que ni la ausencia del gen **XPP1** ni su reintegración ejercen un efecto notable sobre el crecimiento de la raíz. Sin embargo, en el tratamiento con la cepa *MbC19OEXPP1-2*, que presenta sobreexpresión del gen **XPP1**, se evidenció un incremento en la longitud de la raíz, lo que sugiere un efecto positivo asociado a dicha sobreexpresión. Referente al peso húmedo en la figura 6A se puede observar que hay una diferencia significativa entre las plantas tratadas con *MbCARO19* y *MbC19Δxpp1-17* siendo que en la mutante nula se observa un menor efecto y con la reintegración del gen **XPP1** se comporta de manera similar a la cepa silvestre, en el caso de las plantas tratadas con *MbC19Δxpp1-46* se aprecia una disminución parecida al otro mutante nulo sin embargo no hay diferencias significativas. Por lo tanto, se puede decir que la ausencia del gen **XPP1** puede estar relacionado con procesos de absorción o retención de agua de la planta.

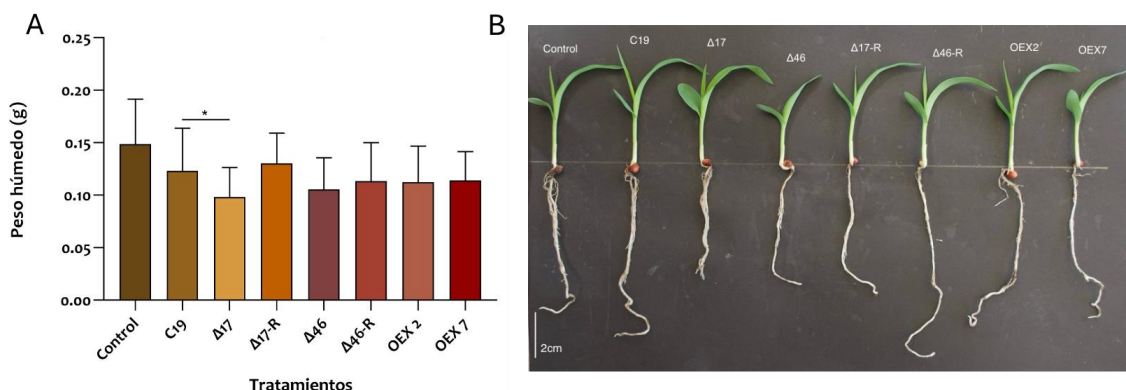


Figura 6. A. Efecto de *Metarhizium* en el peso húmedo de *Sorghum* en suelo agrícola. B. Fotografía representativa de plantas de *Sorghum* tratadas con cepas de *Metarhizium* en suelo agrícola.

Por último, al analizar el peso seco, los resultados arrojan que no hay diferencias significativas entre las plantas de sorgo y su interacción con las cepas de *Metarhizium*, por lo que se sugiere que la ausencia o sobre expresión del gen **XPP1** no afecta la biomasa de la planta.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este ensayo, nos sugiere que la ausencia del gen **XPP1** en la cepa CARO19 de *Metarhizium brunneum* afecta el desarrollo de la planta *Brassica oleracea*, por lo tanto, dicho gen es importante para su interacción con la planta o, mejor dicho, para estimular el desarrollo de la planta en agar-agua. Respecto a los ensayos en suelo agrícola, la ausencia del gen silvestre parece no tener un efecto significativo, recordando que las condiciones nutricionales son totalmente diferentes a los ensayos in vitro. Por otro lado, los datos obtenidos de la interacción con la planta *Sorghum vulgare* sugiere que la ausencia del gen **XPP1** no afecta el crecimiento de la planta, pero sí está involucrado en el absorción y retención del agua. Sin embargo, se requiere repetir el experimento para corroborar los resultados obtenidos y disminuir las desviaciones estándar.

Este proyecto es continuación del proyecto 262 - 2024 CIIC.

Bibliografía

- Barelli, L., Moonjely, S., Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2016). Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Molecular Biology*, 90, 657–664. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0413-z>
- Barelli, L., Waller, A. S., Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2020). Plant microbiome analysis after *Metarhizium* amendment reveals increases in abundance of plant growth-promoting organisms and maintenance of disease-suppressive soil. *PLoS ONE*, 15(4), e0231150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231150>
- Derntl, C., Kluger, B., Bueschl, C., Schuhmacher, R., Mach, R., & Mach-Aigner, A. (2017). Transcription factor Xpp1 is a switch between primary and secondary fungal metabolism.
- González Hernández, G. A., Padilla Guerrero, I. E., Martínez Vázquez, A., & Torres Guzmán, J. C. (2019). Virulence factors of the entomopathogenic genus *Metarhizium*. *Current Protein and Peptide Science*.
- 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>
- Pavone, D. (2021). *Metarhizium* spp: Hongo endófito y patógeno de insectos de plaga. TecnoVita.