

1. Descripción:	
Nivel de tesis o pasantía	Pregrado ___ Maestría <u>X</u> Doctorado _____
Tema de la tesis o pasantía	Obtención de un ingrediente activo (conidios de <i>Metarhizum rileyi</i>) tolerante a altas temperaturas a partir de la producción de compuestos endógenos y/o a la alteración de los lípidos de membrana mediante la manipulación de la composición del medio de producción
Duración del proyecto de tesis o pasantía	Pregrado: _____ (hasta 10 meses) Maestría: <u>X</u> (hasta 18 meses) Doctorado _____ (hasta 36 meses)
Perfil del estudiante solicitado que realizará el proyecto de tesis o pasantía	Estudiante de maestría con énfasis en microbiología, biotecnología ó bioquímica
Proponente (Investigador Co-director)	Ginna Milena Quiroga Erika Paola Grijalba
Centro de Investigación-Sede	Sede Central
Macroproyecto y Producto de la AQ al cual se relaciona (Cuando aplique)	Desarrollo, cambio de escala y registro de bioproductos con potencial de vinculación
2. Resumen del proyecto de tesis o pasantía:	
<p>Dentro del marco del proyecto “Desarrollo de bioplaguicidas y su validación para el control de plagas de lepidópteros en cultivos agrícolas anuales en Colombia y Brasil” se planteó el desarrollo de una formulación a base de <i>M. rileyi</i>, Nm017, como uno de sus ingredientes activos, con miras al control de insectos Noctuidos, la cual será aplicada en regiones con una temperatura promedio igual o superior a 25°C. Por lo tanto, este trabajo de grado tiene como propósito obtener conidios termotolerantes de Nm017 mediante fermentación sólida.</p> <p>Teniendo en cuenta que para los hongos entomopatógenos, la termotolerancia se puede inducir en los conidios adicionando compuestos en el medio de producción, que favorezcan la acumulación de sustancias endógenas (polioles y/o disacáridos), o alteren la composición de los lípidos de la membrana celular (Kim <i>et al.</i>, 2010), en la primera actividad de este trabajo se pretende seleccionar sustancias que adicionadas a un medio de producción estandarizado en estudios anteriores, permitan obtener conidios que sean estables a temperaturas iguales o mayores a 25°C. Dichas sustancias serán seleccionadas a partir de una matriz de decisión donde se tendrán en cuenta los siguientes parámetros: La función como inductor de termotolerancia, la concentración en la que deben utilizarse, la facilidad de adquisición y el costo en el mercado.</p> <p>En la segunda etapa se adicionarán las sustancias seleccionadas en al menos dos concentraciones diferentes, al medio de producción y bajo las condiciones de fermentación preestablecidas para Nm017 a escala laboratorio. En la tercera etapa, al término de la fermentación, los conidios obtenidos serán sometidos a una prueba de termotolerancia en la cual se incubarán a 30, 35, 40, 45 y 50°C por un tiempo definido, después del cual se evaluará su germinación, vigor y esporulación. A partir de los resultados se seleccionarán las sustancias con las que se obtengan los valores más altos en las variables analizadas.</p>	

En la cuarta etapa se hará la validación y ajuste de la fermentación con las sustancias seleccionadas, llevando a cabo un diseño experimental que evalúe las sustancias de manera individual y combinada. También se realizará el análisis de la composición del medio de producción para establecer la relación carbono nitrógeno. Mediante la prueba de termotolerancia descrita anteriormente, se determinará el efecto de la interacción entre ellas y se seleccionará la mejor opción.

Finalmente, en la quinta etapa se producirán los conidios siguiendo el sistema de producción seleccionado y se hará la caracterización a nivel microbiológico (germinación, vigor y esporulación), bioquímico (análisis de compuestos endógenos y/o lípidos de membrana) y biológico (actividad biológica empleando como insecto modelo *Heliothis zea*). Con estos resultados esperamos obtener un sistema de producción que permita obtener un ingrediente activo (conidios) con un valor agregado, que les confiera mayor estabilidad microbiológica y biológica en los procesos involucrados antes, durante y después de la formulación, que puedan llegar a alcanzar temperaturas iguales o superiores a 25°C, así como bajo condiciones de campo.

3. Justificación:

Metarhizium rileyi (Farlow) Kepler S.A. Rehner & Humber: (Ascomycetes: Hypocreales), denominado anteriormente como *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Kepler *et al.*, 2014), es un hongo entomopatógeno que tiene gran potencial como agente de control biológico, sobre insectos plaga de la familia Noctuidae (Ignoffo, 1981; Ignoffo & Boucias, 1992; Martins *et al.*, 2005; Sánchez-Peña, 2000), los cuales afectan diversos cultivos de importancia económica a nivel mundial. Sin embargo, *M. rileyi* es altamente sensible a condiciones nutricionales y ambientales, comparado con otros hongos entomopatógenos (Edelstein *et al.*, 2004), condiciones entre las que se destaca el efecto negativo de la temperatura sobre sus características microbiológicas y la actividad biológica de los conidios.

Teniendo en cuenta el potencial que este microorganismo tiene como biocontrolador, se hace necesario evaluar alternativas que permitan conferir a los conidios utilizados como posible ingrediente activo en el desarrollo de un bioplaguicida, una mayor tolerancia a la temperatura; ya que los cultivos afectados por los insectos blanco sobre los que puede actuar este hongo, se encuentran en regiones con una temperatura superior a los 25°C.

Las estrategias frecuentemente utilizadas para aumentar la tolerancia de los conidios a diferentes factores abióticos se pueden centrar en el desarrollo de formulaciones o en los sistemas de producción masiva (Jackson, 1997; Wraight *et al.*, 2001). En el caso de las formulaciones se busca que le confieran protección a los conidios mediante la integración de excipientes funcionales de acuerdo con la condición ambiental cuyo efecto se desea aminorar (radiación ultravioleta, temperatura, humedad, entre otras). De esta manera, en trabajos previos realizados en Corpoica se desarrolló una formulación correspondiente a un concentrado emulsionable con el aislamiento Nm006, la cual permitió mantener la estabilidad de los conidios a nivel microbiológico y biológico durante 6 meses a 18°C de almacenamiento (Informe Colciencias, 2015). En otro estudio donde se evaluó esta formulación a 28°C su estabilidad fue menor a 3 meses de almacenamiento (Céspedes, 2013). Lo que permite evidenciar el efecto de altas temperaturas sobre la viabilidad y actividad de los conidios.

Con los sistemas de producción masiva se pretende incluir diferentes factores nutricionales a la composición del medio de cultivo, y/o a hacer uso de condiciones de estrés durante la fermentación (temperatura, humedad relativa, intensidad lumínica, entre otras), para inducir la producción de metabolitos endógenos o exógenos en el conidio, que le confieran mayor tolerancia bajo condiciones adversas (López-Pérez *et al.*, 2014). A este respecto, en Corpoica se ha evaluado el uso de condiciones de estrés durante el proceso de fermentación (Santos, 2014) y la adición de nutrientes en el medio de cultivo para obtener mayor rendimiento y calidad microbiológica y biológica de los conidios (Caro, 2005). Sin embargo, no se ha buscado la obtención de conidios termotolerantes mediante la

suplementación del medio con sustancias que induzcan esta característica, permitiendo que estos conidios al ser utilizados como ingrediente activo de una formulación puedan ser más estables en el almacenamiento y/o al ser aplicados en campo. Asimismo, es posible que los conidios termotolerantes no se vean afectados en los procesos llevados a cabo durante la producción del bioplaguicida, los cuales pueden llegar a presentar temperaturas iguales o mayores a 25°C, siendo esta una condición crítica.

Por lo tanto, en este trabajo de grado se plantea la evaluación de sustancias que adicionadas al medio de producción del hongo Nm017, enmarcado en el proyecto “Desarrollo de bioplaguicidas y su validación para el control de plagas de lepidópteros en cultivos agrícolas anuales en Colombia y Brasil”, permitan la obtención de conidios termotolerantes que mantengan óptimas sus características microbiológicas y biológicas, con miras a ser utilizados como ingrediente activo de un bioplaguicida.

4. Objetivos	
Objetivo general	Establecer un sistema de producción de conidios de <i>M. rileyi</i> (Nm017) tolerantes a altas temperaturas
Objetivos específicos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Seleccionar sustancias que favorezcan la acumulación de compuestos termotolerantes en los conidios de Nm017 2. Caracterizar a nivel microbiológico, bioquímico y biológico, los conidios de Nm017 obtenidos a partir de los sistemas de producción seleccionados
Actividades	<ol style="list-style-type: none"> 1. Selección de sustancias que favorezcan la acumulación de compuestos termotolerantes, incrementen la presión osmótica en el medio o alteren la composición lipídica de la membrana celular de los conidios, de acuerdo a su factibilidad 2. Producción a escala laboratorio de los conidios de <i>M. rileyi</i> en un medio sólido con las sustancias seleccionadas 3. Prueba de termotolerancia de los conidios obtenidos, evaluando como variables respuesta la germinación, el vigor y la esporulación de los conidios 4. Validación, ajuste y caracterización de los sistemas de producción seleccionados a partir de la prueba de termotolerancia 5. Caracterización de los conidios de Nm017 obtenidos a partir de los sistemas de producción seleccionados (A nivel microbiológico: Germinación, vigor y esporulación; a nivel bioquímico: Extracción y detección de metabolitos asociados con la termotolerancia y a nivel biológico: actividad biológica)

Requisitos:

1. Cumplir con el perfil adjunto
2. Contar con un promedio ponderado acumulado del pregrado igual o mayor a 3.6 en escala de 0 a 5.
3. Contar con autorización de la institución de educación Superior
4. Contar con un docente, director, o tutor de la tesis
5. Presentar el proyecto de tesis aprobado por la institución de educación superior.

Referencias

- Caro, L.F., Villamizar, L.F., Espinel, C., Cotes, A.M. 2005. Efecto del medio de cultivo en la virulencia de *Nomuraea rileyi* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 31: 79–88.
- Céspedes, E. 2013. Caracterización y estabilidad en almacenamiento de un bioinsecticida concentrado emulsionable a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Edelstein, J.D., Lecuona, R., Trumper, E. 2004. Selection of culture media and *in Vitro* assessment of temperature dependent development of *Nomuraea rileyi*. *Biological Control*. 33:737–742.
- Ignoffo, C.M. 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* a microbial insecticide. En: Burges HD. (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980*. Academic Press, New York & London. p. 513–538.
- Ignoffo, C.M., Boucias, D.B. 1992. Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea* bioassayed against the cabbage looper and velvetbean caterpillar. *Journal Invertebrate Pathology*. 59: 215–217.
- Informe Colciencias “Escalamiento y evaluación de la vida útil y la eficacia de dos bioinsecticidas para el manejo de *Spodoptera frugiperda* en el sistema productivo del maíz”.2015. Corpoica
- Jackson, M. A. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *J Ind Microbiol Biot*, 19, 180–7.
- Kepler, R., Humber, R., Bischoff, J., Rehner, S. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*. 106:4, 811-829. DOI:10.3852/13-319
- Kim, J., Je, Y., Roh, J. 2010. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*. 37:419-423
- López-Pérez, M., Rodríguez-Gómez, D., Loera, O. 2014. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-stage culture: current status and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*, pp. 1-8

Martins, T., Oliveira, L., Garcia, P. 2005. Larval mortality factors of *Spodoptera littoralis* in the Azores. *Biocontrol*. 50: 761–770

Sánchez-Peña, S.R. 2000. Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in Mexico. *Biocontrol*. 45: 63–78.

Santos, A. 2014. Potenciación ecofisiológica de conidios de *Nomuraea rileyi* mediante el uso de factores abióticos de estrés. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Wright, S. P, Jackson, M. A, Kock, S. L. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt, T., Jackson, C., Magan, N., eds. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Bristol, UK: CAB International, 253–88.