



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ESTUDIO DE LOS MICROESCLEROCIOS FORMADOS
POR EL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium
robertsii* Mt004: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
ACTIVIDAD INSECTICIDA**

Jennifer Lorena García Riaño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2022

**ESTUDIO DE LOS MICROESCLEROCIOS
FORMADOS POR EL HONGO
ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium robertsii*
Mt004: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN
Y ACTIVIDAD INSECTICIDA**

Jennifer Lorena García Riaño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Químicas

Director:

Leonardo Castellanos Hernández Dr. Sc.

Codirectora:

Laura Fernanda Villamizar Rivero Dr. Sc

Asesora:

Gloria Patricia Barrera Ph.D

Línea de Investigación:

Control Biológico de Plagas Agrícolas

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2022

Dedicatoria

A Dios y a mis padres, Sandra y Roberto

A mis hermanos, Manuel, Sebastian

A Simón que nos cuidas desde el cielo

Por hacer mi sonrisa más brillante y mi risa más sonora

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Jennifer Lorena García Riaño
Fecha 16/05/2022

Agradecimientos

A mis directores, Dra. Laura Fernanda Villamizar, Dra. Gloria Patricia Barrera y Dr. Leonardo Castellanos. Muchas gracias por su tiempo, compromiso, formación personal y profesional, consejos invaluableles y apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

La Dra. Maria Dennis Lozano, Edgar Alonso y a todo su grupo de investigación de la sede de Agrosavia Nataima, quienes contribuyeron en todo el proceso de obtención de la destruxinas y generosamente compartieron sus metodologías y conocimiento para el desarrollo de este trabajo.

A Lady Sepulveda, Lorena Miranda y Daniel León, quienes con su valioso conocimiento y tiempo aportaron al desarrollo de este trabajo.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Corporación Colombiana de investigación agropecuaria, Agrosavia, que mediante los proyectos “Diagnóstico y desarrollo de prácticas de manejo integral de las principales limitantes fitosanitarias del cultivo de arracacha en Colombia” y “Desarrollo de bioplaguicidas potenciados de nueva generación para el mejoramiento de la productividad e inocuidad del cultivo de tomate y crucíferas en el departamento de Cundinamarca” financiaron y facilitaron los espacios físicos para el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al laboratorio de productos naturales y todos sus integrantes por la utilización de los equipos, su orientación y apoyo.

A mis amigos, especialmente a Brayan Morales, Cindy Gómez, Cindy Mejía, Cindy Pachón y Liz Uribe por sus palabras motivacionales y apoyo incondicional durante la realización de la tesis.

A todas las personas que de alguna forma hicieron parte de este trabajo y estuvieron en este proceso de crecimiento personal y profesional.

Este trabajo se realizó en el marco del contrato RGE00229-2 (No. 168) para el acceso de recursos genéticos y sus productos derivados en Colombia.

Resumen

Estudio de los microesclerocios formados por el hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* Mt004: producción, caracterización y actividad insecticida

Los conidios son las estructuras fúngicas más comúnmente utilizadas como ingrediente activo para el desarrollo de bioplaguicidas. Sin embargo, diferentes problemas asociados con su producción masiva en fermentación sólida, su manipulación a gran escala, y la susceptibilidad a condiciones ambientales, que resulta en una baja persistencia en campo, han motivado la investigación en torno al uso alternativo de otros propágulos fúngicos. Los microesclerocios (ME) son propágulos con gran potencial para el desarrollo de bioplaguicidas más persistentes y fáciles de producir, debido a sus características de resistencia, capacidad de germinación y de producción de conidios infectivos de insectos. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue inducir la producción de microesclerocios con la cepa de *Metarhizium robertsii* Mt004 y estudiar el proceso de formación, estructura, composición, fisiología y potencial insecticida. Para ello, inicialmente se realizó la identificación a nivel de especie la cepa de *Metarhizium* sp. Mt004 (previamente seleccionada por su alta virulencia frente varios insectos plaga) y se desarrollaron las condiciones para inducir la formación de microesclerocios en cultivo sumergido. Los ME se caracterizaron en cuanto a su estructura, composición, fisiología y actividad biocontroladora; y finalmente se buscó la identificación de metabolitos producidos durante la producción de los ME que puedan tener actividad insecticida.

El aislamiento Mt004 fue identificado molecularmente como *Metarhizium robertsii* mediante el análisis basado en las secuencias de la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS), el factor de elongación 1-alfa (EF-1 α) y la región beta tubulina (β -tubulina). Para la producción de ME se evaluaron cuatro medios de cultivos con diferentes relaciones Carbono:Nitrógeno (C:N). El medio de cultivo "D" fue seleccionado por producir el mejor rendimiento de ME ($2,04 \times 10^3$ ME/mL) con posterior producción de conidios ($6,02 \times 10^5$

conidios/ME). Los ME obtenidos en cultivos de 20 días se caracterizaron morfológica, ecofisiológica, química y biológicamente.

La observación ultraestructural de los ME evidenció la presencia de hifas intrincadas en el inicio de su formación, hasta conformar una estructura compacta cimentada en una matriz extracelular amorfa. En el análisis composicional de las estructuras no se detectó la presencia de trehalosa, pero si se confirmó la presencia de pequeñas concentraciones de manitol; y los espectros de Resonancia Magnética Nuclear sugirieron la presencia de otros carbohidratos que podrían servir como reservas energéticas para garantizar la sobrevivencia de los ME.

En comparación con los conidios, los ME presentaron mayor resistencia a condiciones de estrés ambiental como temperatura y la radiación UV. De forma similar, los ME fueron más estables que los conidios bajo condiciones de almacenamiento a diferentes temperaturas (8, 18 y 28 °C), manteniéndose viables después de ser almacenados por 6 meses a 8°C, mientras que los conidios no germinaron después de 2 meses a ninguna de las temperaturas evaluadas. La actividad insecticida de los conidios producidos por los ME fue evaluada utilizando larvas de *Diatraea saccharalis* como insecto modelo, con el cual se obtuvo un 78% de eficacia que sugiere que los conidios producidos por estas estructuras son propágulos altamente virulentos. La evaluación de la actividad insecticida de los metabolitos liberados al medio de fermentación durante la producción de los ME mostró una eficacia cercana al 50% sobre larvas de *D. saccharalis* cuando se utilizaron el medio libre de células y la fracción orgánica FO.

Los datos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) obtenidos para la FO fueron usados en la construcción de redes moleculares utilizando la plataforma GNPS (*Global Natural Product Molecular Networking Social*). Los análisis identificaron compuestos con homología con la familia de los ciclodepsipéptidos sugiriendo la presencia de 24 destruxinas, entre las que se encuentran la destruxina A, A₂, B reconocidas por su actividad insecticida.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran el potencial de los ME de *M. robertsii*, y de los metabolitos liberados al medio durante su producción, para ser usados como

principio activo de un bioplaguicida con óptimas características de eficacia, estabilidad y tolerancia a condiciones abióticas. Esto sumado a que su producción se realiza mediante fermentación sumergida que es un proceso sencillo, escalable, replicable y de fácil control, hace que esta tecnología sea ideal para el futuro desarrollo de un bioplaguicida novedoso, eficiente y con alta factibilidad técnica y económica.

Palabras clave: *M. robertsii*, microesclerocios, destruxinas, control biológico, redes moleculares.

Abstract

Study of microsclerotia formed by *Metarhizium robertsii* Mt004: production, characterization and insecticidal activity

Conidia are commonly used as the active ingredient for biopesticide development. However, conidia performance in field is drastically affected by abiotic factors, which added to its laborious production using solid fermentation (SSF) have motivated the search for novel fungal propagules. Microsclerotia (ME) are fungal propagules formed by compact and pigmented aggregates of mycelium, highly tolerant to desiccation, and able to produce infective conidia. In this work, the main objective to induce the *Metarhizium robertsii* microsclerotia production and study the ME formation process, ME structure, composition, physiology, and insecticidal activity. Firstly, we identified the strain of *Metarhizium* sp. Mt004 (previously selected for its high virulence against several insect pests) and developed the conditions to induce the formation of microsclerotia in submerged culture. We also studied the ME formation process, ME structure, composition, physiology, and insecticidal activity; as well as the metabolites with insecticidal potential produced during MS formation.

The isolate Mt004 was clustered in the same clade with *Metarhizium robertsii* based on genomic multilocus (ITS, EF-1 α , and β -tubulin). For ME production, four culture media with different Carbon: Nitrogen (C:N) ratios was evaluated. Culture medium "D" was selected for reaching the highest yield (2.04×10^3 ME/mL) with subsequent production of conidia of 6.02×10^5 conidia/ME. ME harvested after 20-day of fermentation were then morphologically, ecophysiologicaly, chemically and biologically characterized.

The ultrastructural analysis revealed the presence of intricate hyphae at the beginning of the formation process and a few live cells embedded in a compact extracellular matrix were observed in mature structures. The compositional analysis showed the presence of small concentrations of mannitol whereas trehalose was not detected, but Nuclear Magnetic Resonance spectra suggested the presence of other carbohydrates that could serve as energy reserves to guarantee the ME survival.

ME were more tolerant to heat and UV radiation than conidia produced by SSF. Similarly, ME were more stable than conidia under storage conditions at different temperatures (8, 18 and 28 °C), remaining viable after 6 months of storage at 8 °C, while conidia produced by SSF died after 2 months of storage at all temperatures evaluated. The ME-derived conidia caused 78% mortality of *Diatraea saccharalis* larvae, suggesting that conidia produced by ME are highly virulent propagules. Insecticidal activity of metabolites released into the broth during microsclerotia formation showed efficacies around 50% against *D. saccharalis* larvae when the fungus-free supernatant and the organic fraction were used.

The tandem mass spectrometry (MS/MS) data obtained for the organic fraction were used in the construction of molecular networks using the GNPS (Global Natural Product Molecular Networking Social) platform. The majority of compounds in the organic fraction were from the cyclodepsipeptide family, suggesting the presence of 24 destruxins, including destruxin A, A₂ and B, which have been previously recognized for their insecticidal activity.

The results obtained in this work show the potential of ME from *M. robertsii* and the metabolites released during their production, to be used as an active ingredient of a biopesticide with optimal characteristics of efficacy, stability and tolerance to abiotic conditions. This, added to the fact that its production is carried out by submerged fermentation, which is a simple, scalable, replicable and easily controlled process, makes this technology ideal for the future development of a novel, efficient biopesticide with high technical and economic feasibility.

Keywords: *M. robertsii*, microsclerotia, destruxins, biological control, molecular networking.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras	XVII
Lista de tablas	XX
Lista de Símbolos y abreviaturas	1
Abreviatura/Símbolos Término	1
Introducción	2
1. Capítulo 1: El hongo entomopatógeno <i>Metarhizium robertsii</i>.....	7
1.1 Mecanismo de acción	8
1.2 Metabolitos secundarios de interés insecticida producidos por <i>Metarhizium</i> spp. 10	
1.3 Propágulos fúngicos utilizados para el desarrollo de bioplaguicidas	14
1.3.1 Micelio.....	15
1.3.2 Clamidosporas	15
1.3.3 Blastosporas	15
1.3.4 Conidios	16
1.3.5 Microesclerocios.....	17
1.3.5.1 Reservas endógenas y pigmentos de los microesclerocios.....	19
1.3.5.2 Potencial insecticida de los microesclerocios producidos por <i>Metarhizium</i> spp. 22	
1.4 Bibliografía.....	24
2. Capítulo 2: Identificación de la cepa Mt004 de <i>Metarhizium</i> sp. y estudio de las condiciones para inducir la formación de microesclerocios.....	31
2.1 Introducción	32
2.2 Materiales y métodos.....	34
2.2.1 General	34
2.2.2 Microorganismo y medio de cultivo.....	35
2.2.3 Identificación molecular del microorganismo	35

2.2.4	Evaluación de medios de cultivo para la producción de microesclerocios con la cepa <i>Metarhizium robertsii</i> Mt004	36
2.2.4.1	pH y Biomasa	37
2.2.4.2	Consumo de sustrato (azúcares y proteínas).....	37
2.2.4.3	Rendimiento de microesclerocios, blastosporas y conidios.....	38
2.2.4.3.1	Prueba de hidrofobicidad	38
2.2.4.4	Cosecha y viabilidad de los microesclerocios	38
2.2.4.5	Análisis del perfil proteico de los medios de cultivo.....	39
2.2.4.5.1	Electroforesis SDS- PAGE	39
2.2.5	Análisis estadístico	40
2.3	Resultados	40
2.3.1	Análisis filogenético de la cepa Mt004	40
2.3.2	Evaluación de medios de cultivo para la producción de microesclerocios con la cepa Mt004.....	42
2.3.3	Selección del medio de cultivo para la producción de microesclerocios.....	50
2.4	Discusión	56
2.5	Conclusiones y recomendaciones	65
2.6	Bibliografía	65
3.	Capítulo 3: Caracterización estructural, fisiológica, química y biológica de los microesclerocios producidos por <i>Metarhizium robertsii</i> Mt004 en fermentación sumergida	73
3.1	Introducción.....	74
3.2	Materiales y métodos	76
3.2.1	General.....	76
3.2.2	Microorganismo y medio de cultivo	77
3.2.3	Producción de microesclerocios y conidios de la cepa <i>M. robertsii</i> Mt004	77
3.2.4	Análisis ultraestructural de los microesclerocios mediante microscopía electrónica.....	78
3.2.4.1	Microscopía electrónica de transmisión	78
3.2.4.2	Microscopía electrónica de barrido	78
3.2.5	Tolerancia a la radiación ultravioleta.....	79
3.2.6	Tolerancia a la temperatura	80
3.2.7	Estabilidad en almacenamiento	81
3.2.8	Caracterización biológica (actividad insecticida)	81
3.2.9	Caracterización Química.....	82
3.2.10	Análisis estadístico	85
3.3	Resultados	85
3.3.1	Análisis ultraestructural de los microesclerocios mediante microscopía electrónica.....	85
	90	
3.3.2	Caracterización ecofisiológica de los microesclerocios de <i>M. robertsii</i> Mt004 91	
3.3.2.1	Tolerancia a la radiación ultravioleta.....	91
3.3.2.2	Tolerancia a temperatura.....	93
3.3.2.3	Estabilidad en almacenamiento	97
3.3.3	Caracterización biológica.....	99
3.3.3.1	Determinación de la actividad insecticida de los conidios producidos por los microesclerocios de <i>M. robertsii</i> Mt004 sobre larvas de <i>D. saccharalis</i> bajo condiciones de laboratorio.....	99

3.3.4	Caracterización química	101
3.3.4.1	Análisis de reservas endógenas.....	101
3.4	Discusión	103
3.5	Conclusiones y recomendaciones.....	111
3.6	Bibliografía.....	112
4.	Capítulo 4: Identificación de metabolitos con potencial actividad insecticida producidos durante la formación de microesclerocios por la cepa de <i>Metarhizium robertsii</i> Mt004.	119
4.1	Introducción	120
4.2	Materiales y métodos.....	125
4.2.1	General	125
4.2.2	Producción de ME con la cepa <i>M. robertsii</i> Mt004.....	125
4.2.3	Producción de destruxinas a partir de la cepa Mt008 de <i>M. robertsii</i> (Control positivo)	126
4.2.4	Extracción de metabolitos	126
4.2.5	Determinación de actividad insecticida de los metabolitos producidos por la cepa Mt004 de <i>M. robertsii</i> sobre larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> bajo condiciones de laboratorio.....	127
4.2.5.1	Obtención de insectos.....	127
4.2.5.2	Evaluación de actividad insecticida	127
4.2.6	Análisis de las fracciones orgánicas por HPLC-DAD	129
4.2.7	Análisis de la fracción orgánica por HPLC-MS/MS	130
4.2.7.1	Derreplicación	132
4.2.7.2	Construcción de redes moleculares	132
4.3	Resultados.....	133
4.3.1	Producción de microesclerocios con la cepa Mt004 de <i>M. robertsii</i> y extracción de metabolitos	133
4.3.2	Determinación de actividad insecticida de los metabolitos producidos por <i>M. robertsii</i> Mt004 sobre larvas de <i>D. saccharalis</i> bajo condiciones de laboratorio	134
4.3.3	Análisis de la metodología de extracción por HPLC-DAD.....	137
4.3.4	Análisis HPLC- MS/MS de las fracciones orgánicas.....	142
4.3.5	Redes moleculares.....	149
4.4	Discusión	174
4.5	Conclusiones y recomendaciones.....	181
4.6	Bibliografía.....	182
5.	Conclusiones y recomendaciones generales.....	189
A.	Anexo: Análisis estadísticos.....	193
B.	Anexo: Análisis de espectrometría de masas y construcción de redes moleculares.....	203
C.	Anexo: Producción académica	210
	Bibliografía.....	213

Lista de figuras

Figura 1-1. Observación macroscópica (izquierda) y microscópica (Tomada en microscopio óptico 100X) (derecha) de <i>M. robertsii</i> cepa Mt004.	8
Figura 1-2. Esquema general del mecanismo de acción de hongos entomopatógenos (Cotes 2018).	10
Figura 1-3. Estructura de destruxinas producidas por <i>Metarhizium</i> spp.	12
Figura 1-4. Estructura de la citocatalasina C (izquierda) y D (derecha) producida por <i>Metarhizium</i> spp.	13
Figura 1-5. Estructura de la serinociclina A producida por <i>M. anisopliae</i>	14
Figura 2-1 Árbol filogenético construido con las secuencias concatenadas con el método de Neighbour-Joining.	41
Figura 2-2. Morfogénesis de los ME formados por <i>M. robertsii</i> Mt004 en diferentes medios de cultivo.	42
Figura 2-3. Rendimiento de microesclerocios formados por <i>M. robertsii</i> Mt004 durante ocho días de fermentación en diferentes medios de cultivo líquido.	44
Figura 2-4. pH (A) y consumo de glucosa (B) de <i>M. robertsii</i> Mt004 durante 8 días de fermentación sumergida en diferentes medios de cultivo.	46
Figura 2-5. Perfil proteico de los medios de cultivo A, B, C y D durante ocho días de fermentación. M: Marcador de peso molecular.	48
Figura 2-6. Germinación miceliogénica de ME formados por <i>M. robertsii</i> Mt004.	49
Figura 2-7. Estructuras formadas por <i>M. robertsii</i> Mt004 en fermentación sumergida en diferentes medios de cultivo después de 20 días de cultivo.	51
Figura 2-8. Morfogénesis de ME formados por <i>M. robertsii</i> Mt004 durante 20 días de fermentación en el medio de cultivo D.	53
Figura 2-9. Producción de microesclerocios y biomasa durante 20 días de fermentación en el medio D.	54
Figura 2-10. Perfil proteico del medio de cultivo D durante 20 días de fermentación para la producción de ME de <i>M. robertsii</i> Mt004	55

Figura 2-11. Germinación miceliogénica y conidiogénica de un microesclerocio rehidratado mediante inoculación en agar agua. (A) ME sin germinar, (B) ME germinado a las 48 horas de incubación, (C) ME esporulado después de 8 días de incubación.....	56
Figura 3-1. Montaje de exposición a radiación ultravioleta en condiciones de laboratorio.....	79
Figura 3-2. Reacción de DNS en presencia de trehalosa	84
Figura 3-3. Microesclerocios en formación (4 días de fermentación).....	86
Figura 3-4. Microesclerocios en formación (8 días de fermentación).....	87
Figura 3-5. Microesclerocios en formación (16 días de fermentación).....	88
Figura 3-6. Microesclerocios formados después de 20 días de fermentación.....	89
Figura 3-7. Micrografía TEM de los ME de <i>M. robertsii</i> Mt004.....	90
Figura 3-8. Germinación miceliogénica (Barras) y conidiogénica o esporulación (Línea) de los ME expuestos a la radiación ultravioleta.....	92
Figura 3-9. Germinación miceliogénica de los ME después de diferentes tiempos de exposición a radiación ultravioleta.....	93
Figura 3-10a. Germinación de conidios y ME (48 horas de incubación) expuestos a 30°C durante 0, 1, 2 y 3 horas	94
Figura 3-11. Germinación miceliogénica de ME almacenados durante 6 meses a 8°C, 18°C y 28°C.....	98
Figura 3-12. Producción de conidios a partir de ME almacenados durante 6 meses a 8°C, 18°C y 28°C.....	99
Figura 3-13. Análisis del extracto intracelular de ME por ¹ H RMN.....	101
Figura 3-14. Comparación entre el espectro de ¹ H RMN del contenido intracelular de los ME (línea roja), patrón de manitol (línea verde) y patrón de trehalosa (azul).	102
Figura 4-1. Estructura de la destruxina A	121
Figura 4-2. Larva de <i>D. saccharalis</i> a) antes, b) durante y c) después de la ingestión de los tratamientos.....	128
Figura 4-3a. Mortalidad de larvas de <i>D. saccharalis</i> causada por el sobrenadante crudo del medio D.....	134
Figura 4-4. Larvas muertas después de 15 días de la ingesta del tratamiento FO. a): Larva sana, b y c): tratadas con FO.	137
Figura 4-5. Cromatograma de HPLC-DAD de la fracción control obtenida partir del caldo de cultivo de la cepa <i>M. robertsii</i> Mt008 en medio G ₂₀ P ₂₀	138

Figura 4-6. Cromatograma de HPLC-DAD de la fracción control obtenida a partir del caldo de cultivo de la cepa <i>M. anisopliae</i> Mt008.	139
Figura 4-7. a) Cromatograma de HPLC del extracto obtenido mediante fraccionamiento con solventes del sobrenadante crudo del caldo de cultivo la cepa <i>M. robertsii</i> Mt008 en el medio G ₂₀ P ₂₀ . b) Comparación entre cromatogramas.....	141
Figura 4-8. Cromatograma de HPLC del extracto obtenido mediante fraccionamiento con solventes a partir del sobrenadante del caldo de cultivo de la cepa <i>M. robertsii</i> Mt004 en el medio D.....	142
Figura 4-9. Monitoreo de los iones de interés, a) Destruxina A, b) Destruxina B, c) Destruxina A ₂ a partir de la FO (Fracción orgánica Medio D) del caldo de cultivo de la cepa <i>M. robertsii</i> Mt004 en medio D.....	144
Figura 4-10. Espectro Full MS/MS de la destruxina A (<i>m/z</i> 578.3596)	145
Figura 4-11. A) Ruptura de la destruxina por AA4 y AA5; B) Vía de fragmentación propuesto para la Destruxina A	145
Figura 4-12. Espectro Full MS/MS de la destruxina B (<i>m/z</i> 594.3901)	147
Figura 4-13. Vía de fragmentación propuesto para la destruxina B.....	147
Figura 4-14. Espectros Full MS/MS de la destruxina A ₂ (<i>m/z</i> 564.3433)	149
Figura 4-15. Vía de fragmentación propuesto para la destruxina A ₂	149
Figura 4-16. Redes moleculares de la fracción orgánica del caldo cultivo de <i>M. robertsii</i> Mt004 en medio D.	151
Figura 4-17. Redes moleculares para <i>M. robertsii</i> Mt008 (fracción control) (Disco morado) y la fracción orgánica del caldo de cultivo de <i>M. robertsii</i> Mt004 en medio D (Disco rosado)..	160

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Composición de los medios de cultivo evaluados para la producción de ME de <i>M. robertsii</i> Mt004	36
Tabla 2-2. Biomasa, blastosporas (blas), conidios (con) y microesclerocios (ME) producidos por <i>M. robertsii</i> Mt004 en fermentación sumergida en diferentes medios de cultivo.	43
Tabla 2-3. Concentración de proteínas producidas por la cepa Mt004 en fermentación sumergida obtenido con cada medio de cultivo.....	47
Tabla 2-4. Viabilidad de ME formados por <i>M. robertsii</i> Mt004 en fermentación sumergida en diferentes medios de cultivo.....	50
Tabla 3-1. Germinación conidiogénica de ME incubados a diferentes temperaturas..	97
Tabla 3-2. Análisis <i>Probit</i> para determinación de concentraciones letales media de conidios provenientes de ME y de fermentación en arroz, sobre larvas de <i>D. saccharalis</i>	100
Tabla 4-1. Tratamientos evaluados sobre larvas de <i>D. saccharalis</i>	128
Tabla 4-2. Condiciones de espectrometría de masas	130
Tabla 4-3. Parámetros de adquisición AutoMS/MS.....	131
Tabla 4-4. Valores de parámetros usados para el programa <i>MZmine</i>	131
Tabla 4-5. Parámetros establecidos para la construcción de redes moleculares en la plataforma GNPS.....	133
Tabla 4-6. Mortalidad de <i>D. saccharalis</i> después de 15 días de inoculación.	136
Tabla 4-7. Identificaciones putativas obtenidas a partir de la plataforma de GNPS para la fracción orgánica del cultivo de <i>M. robertsii</i> Mt004 inoculado en el medio D.	151

Tabla 4-8. Identificaciones putativas obtenidas a partir de la búsqueda de la masa exacta en el SIRIUS: CSI Finger con un margen de error de 10 ppm para la fracción orgánica del caldo de cultivo de *M. robertsii* Mt004 en medio D.154

Tabla 5-9. Identificaciones putativas obtenidas a partir de la plataforma de GNPS para la fracción control obtenida después de la fermentación de *M. robertsii* Mt008 en el medio G₂₀P₂₀.....154
63

Tabla 5-10. Identificaciones putativas obtenidas a partir de la búsqueda de la masa exacta en el SIRIUS: CSI Finger con un margen de error de 10 ppm para el sobrenadante crudo del medio de cultivo G₂₀P₂₀ producido por *M. robertsii* Mt008.....15469

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura/Símbolos Término

Símbolo	Término
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
C:N	Relación carbono y nitrógeno
DAD	Detector de arreglo de diodos (<i>Diodo Array Detector</i>)
DCM	Diclorometano
DNS	3,5- ácido dinitrosalicílico
FMNB	<i>Feature-Based Molecular Networking</i> (Redes moleculares basadas en nodos)
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i> (Redes moleculares de productos naturales globales)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
ME	Microesclerocio
MS	Espectrometría de masas (Mass spectrometry)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
PDA	Agar Papa Dextrosa
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta

Introducción

El uso indiscriminado de los agroquímicos para el control de plagas y enfermedades ha traído consigo una gran preocupación debido a sus consecuencias negativas sobre el medio ambiente, efectos nocivos sobre la cadena alimentaria y la salud de los seres humanos. Estos factores han incrementado la conciencia del consumidor sobre el consumo de alimentos libres de agroquímicos, concediéndole una gran importancia al uso de productos biológicos; tanto así, que se proyecta que el mercado de los bioplaguicidas alcanzará un valor estimado de 8,4 billones de dólares en el año 2025 (Markets and Markets, 2020). Su éxito se atribuye a que estos productos son naturales, ambientalmente amigables, y pueden ser incluidos como alternativas al uso de agroquímicos y/o dentro de los planes de manejo integrado de plagas (Mascarin et al. 2019, Markets and Markets, 2020); y son mejor aceptados por el consumidor.

En el mercado actual de bioplaguicidas basados en hongos, los conidios son las estructuras más utilizadas como ingrediente activo debido a su alta infectividad sobre el organismo blanco que se quiere controlar. Para el desarrollo de estos bioplaguicidas generalmente se diseñan formulaciones granulares y/o acuosas, donde se debe asegurar su estabilidad, persistencia y virulencia. Sin embargo, en muchos casos, los conidios presentan problemas de estabilidad, persistencia y una limitada eficacia en campo debido a su susceptibilidad a condiciones ambientales adversas (temperatura, radiación solar, precipitaciones, etc) impidiendo que se alcancen y mantengan las concentraciones adecuadas para causar una mortalidad importante del insecto blanco (Jackson y Jaronski 2009; Villamizar et al. 2018).

En general, la producción masiva de los conidios se hace mediante fermentación sólida. Este proceso utiliza sustratos sólidos sencillos (o en algunos casos complejos), y produce rendimientos variables dependiendo de la composición del medio de cultivo, pH, humedad, aireación, luz, entre otras (Song et al. 2014; Villamizar et al. 2018). Actualmente, factores como los grandes volúmenes de sustrato y residuos, la alta demanda de mano de obra, el largo tiempo de fermentación, y la difícil cosecha de los conidios; además de los altos costos de producción y su baja estabilidad en almacenamiento, han llevado a la búsqueda de alternativas más económicas y sencillas (Villamizar et al. 2020).

En este marco, la fermentación sumergida ofrece varias ventajas en comparación con la fermentación sólida, como por ejemplo un menor costo de los medios de cultivo, menor tiempo de proceso y mayores rendimientos, además de permitir la recuperación fácil de metabolitos extracelulares que puedan ser de interés en aplicaciones farmacéuticas, industriales y agrícolas (Behle y Jackson 2014; Song 2018; Villamizar et al. 2018). Sin embargo, los propágulos producidos mediante la fermentación sumergida presentan una persistencia limitada en campo. Para superar estas limitaciones, en los últimos años la investigación se ha dirigido al desarrollo de estrategias de producción masiva más económicas y sencillas, así como a la evaluación de estructuras fúngicas alternativas a los conidios para su aplicación como insecticidas biológicos.

En el contexto anterior, los microesclerocios (ME) se han considerado como una alternativa de interés, pues son estructuras de resistencia y cuya producción puede ser inducida artificialmente durante la fermentación sumergida en algunos hongos entomopatógenos como *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. Por estas razones, en la actualidad los ME han sido descritos como los propágulos fúngicos más promisorios para el control de plagas del suelo, y el desarrollo de bioplaguicidas con mayor vida útil (Jackson y Jaronski 2012; Song et al. 2016; Song 2018; Villamizar et al. 2018). Los microesclerocios son agregados hifales, frecuentemente pigmentados (Paixão et al. 2021), cuya producción es inducida bajo condiciones de estrés nutricional o ambiental, que tienen la característica de ser resistentes a factores ambientales adversos. Por ejemplo, en hongos fitopatógenos se ha demostrado que los esclerocios son estructuras capaces de sobrevivir alrededor de 10 años en el suelo bajo condiciones desfavorables, pudiendo geminar y producir conidios infectivos en cualquier momento, cuando las condiciones son adecuadas (Song, 2018).

Hongos del género *Metarhizium* han sido ampliamente reconocidos por su actividad insecticida sobre numerosos insectos foliares y del suelo, y han sido aplicados como bioinsecticidas con resultados promisorios. Estudios recientes han demostrado la capacidad que tienen de producir ME bajo condiciones de estrés nutricional en fermentaciones sumergidas obteniendo rendimientos entre 10^3 y 10^5 ME/mL (Jackson y Jaronski 2009; Mascarín et al. 2014; Song et al. 2014; Kobori et al. 2015; Lira et al. 2020). Estos estudios han evidenciado el potencial de los ME, siendo más estables en el tiempo, resistentes frente a factores de estrés ambiental e igualmente infectivos en comparación con otros propágulos fúngicos, por lo que pueden ser considerados como principio activo de un bioplaguicida estable, eficiente y persistente. Por otro lado, en los últimos años se ha incrementado el interés en estudiar su biología básica y la capacidad para producir metabolitos secundarios, lo que ha contribuido a la comprensión de algunos mecanismos moleculares y características como la persistencia ambiental, germinación y virulencia (Carollo et al. 2010). Algunas especies de *Metarhizium* spp. producen ciclopepsipéptidos como las destruxinas, las cuales se destacan por su potencial insecticida sobre numerosos insectos (Pedras et al. 2002). Actualmente se desconocen los metabolitos producidos por cepas de *Metarhizium* sp. durante la formación de microesclerocios en fermentación sumergida, algunos de los cuales podrían tener actividad insecticida y representar potenciales aditivos para mejorar el desempeño del producto final, por lo que hacer aportes en este aspecto es uno de los objetivos de la presente tesis.

En trabajos previos en Agrosavia se evidenció el potencial biocontrolador del hongo entomopatógeno *M. robertsii* Mt004 sobre diferentes insectos como la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*, la chiza *Ancognatha scarabaeoides* y el barrenador del tallo *Diatraea saccharalis*; pertenecientes a los órdenes Ortóptera, Coleóptera y Lepidóptera respectivamente, lo cual demuestra el altísimo potencial que tiene esta cepa para ser usada como principio activo de un bioplaguicida con amplio espectro de acción.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue inducir la producción artificial de microesclerocios con la cepa de *M. robertsii* Mt004, y estudiar su proceso de formación y caracterizar algunos metabolitos asociados. Además, se buscó caracterizar a los microesclerocios tanto estructural como fisiológicamente, y determinar su actividad insecticida sobre larvas de *D. saccharalis*. Esta tesis está organizada en capítulos

autocontenidos, con el fin de que el lector los pueda leer de manera independiente, en el primero se hace una revisión de la biología y la química del hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii*; en el segundo se hizo la identificación de la cepa Mt004 de *Metarhizium* sp. y se estudiaron las condiciones para inducir la formación de microesclerocios; en el tercero se realizó la caracterización estructural, fisiológica, química y biológica de los microesclerocios producidos por *M. robertsii* Mt004 en fermentación sumergida; y en el último se hizo la identificación de metabolitos con potencial actividad insecticida producidos durante la formación de microesclerocios por la cepa de *M. robertsii* Mt004. Finalmente, se compilan las conclusiones y recomendaciones generales en el apartado número cinco.

1. Capítulo 1: El hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii*.

Metarhizium robertsii J.F. Bisch., Rehner & Humber (Clavicipitaceae) es un hongo perteneciente a la división Ascomycota, orden Hypocreales y familia Clavicipitaceae; es cosmopolita y reconocido por su actividad biocontroladora sobre un amplio rango de hospederos (Donzelli y Krasnoff 2016). Al igual que otras especies de *Metarhizium* presenta hábitos de saprófito del suelo, patógenos de insectos y colonizador de rizósfera. Este microorganismo crece vegetativamente como hifa produciendo micelio, posteriormente, esporula y produce conidios que son considerados propágulos infectivos que afectan diferentes rangos de hospederos como artrópodos, lepidópteros, coleópteros, entre otros (Schrank y Vainstein 2010).

Morfológicamente, este hongo crece con una tonalidad verdosa oliva, y textura pulvulenta sobre cuerpos de insectos o en medio de cultivos anéxicos (Figura 1). Microscópicamente se observa un crecimiento enteroblástico fialíadico, donde el conidio sale a través de una abertura en la pared de la célula madre, rodeándose de una nueva pared y dejando una cicatriz. La célula conidiogénica es una fiálide, los conidios son ameroconidios, cilíndricos, hialinos a verdosos en cadenas basípetas que se adhieren para formar columnas (Zimmermann 1993) (Figura 1-1).



Figura 1-1. Observación macroscópica (izquierda) y microscópica (Tomada en microscopio óptico 100X) (derecha) de *M. robertsii* cepa Mt004. Fotos suministradas por el Banco de Germoplasma de Agrosavia.

1.1 Mecanismo de acción

Generalmente los conidios (estructuras de reproducción asexual) son la forma infectiva de los hongos entomopatógenos, y comparten el mismo ambiente que los hospederos de interés. Si el conidio entra en contacto con la cutícula del hospedero susceptible, se da inicio al proceso de infección (Schrank y Vainstein 2010) que culmina con la muerte del insecto y generación de epizootias. En resumen, el mecanismo de acción de *Metarhizium* sp. puede ser descrito mediante la secuencia de seis eventos principales (1) Reconocimiento del hospedero susceptible, (2) Adherencia y germinación de conidios a la cutícula del insecto, (3) Desarrollo de estructuras específicas (apresorio y tubo germinativo), (4) Penetración a través de la cutícula del hospedero, (5) Proliferación y crecimiento del hongo y muerte del insecto, y finalmente (6) Producción de conidios después de la emergencia de las hifas a través de la cutícula del hospedero (Beys-da-Silva et al. 2020) (Figura 2).

La adherencia es un paso crucial para el proceso de infección, los conidios interactúan con la capa lipídica de la cutícula del hospedero mediante la expresión de proteínas apolares como hidrofobinas y adhesinas; así también, el hongo produce enzimas lipídicas que contribuyen al reconocimiento y adherencia a la cutícula del hospedero (Schrank y

Vainstein 2010; Wang et al. 2019; Beys-da-Silva et al. 2020). Una vez en contacto, el conidio se expande y se da la formación del tubo germinativo y posteriormente del apresorio, la cual es una estructura encargada de generar la presión mecánica necesaria para penetrar la cutícula del hospedero, su formación depende de la hidrofobicidad y la dureza de la cutícula del hospedero, así como también de las señales derivadas de los insectos, como de los niveles de nutrientes y características topográficas. Cuando se inicia el proceso de penetración, además del daño mecánico causado por el apresorio también intervienen enzimas degradadoras de cutícula tipo proteasas, quitinasas, lipasas que facilitan la penetración hacia el hemocele (Schrank y Vainstein 2010; Wang et al. 2019; Beys-da-Silva et al. 2020). Estas enzimas, además de ejercer una función sobre la degradación de la cutícula, proveen nutrientes asimilables para el hongo obteniendo energía durante el proceso de infección (Beys-da-Silva et al., 2020).

Después de atravesar completamente la cutícula, el hongo forma hifas y blastosporas con las cuales empieza a adquirir nutrientes del medio, proliferar masivamente y producir metabolitos secundarios y toxinas (destruxinas, citocalasinas, ácido cítrico y oxálico) que tienen efectos deletéreos en el sistema inmunológico, muscular y nervioso que conducen a la muerte del hospedero. Seguido de esto, las hifas salen por los espacios intersegmentales y promueven la esporulación que facilita la transmisión horizontal de la enfermedad (Schrank y Vainstein 2010; Wang et al. 2019; Beys-da-Silva et al. 2020) (Figura 1-2).

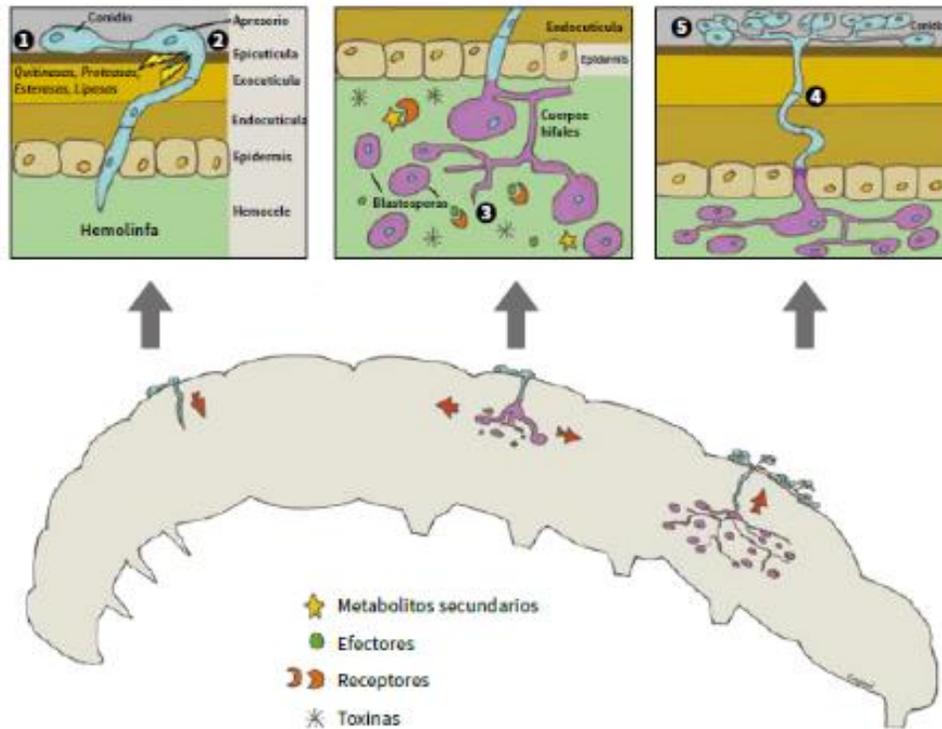


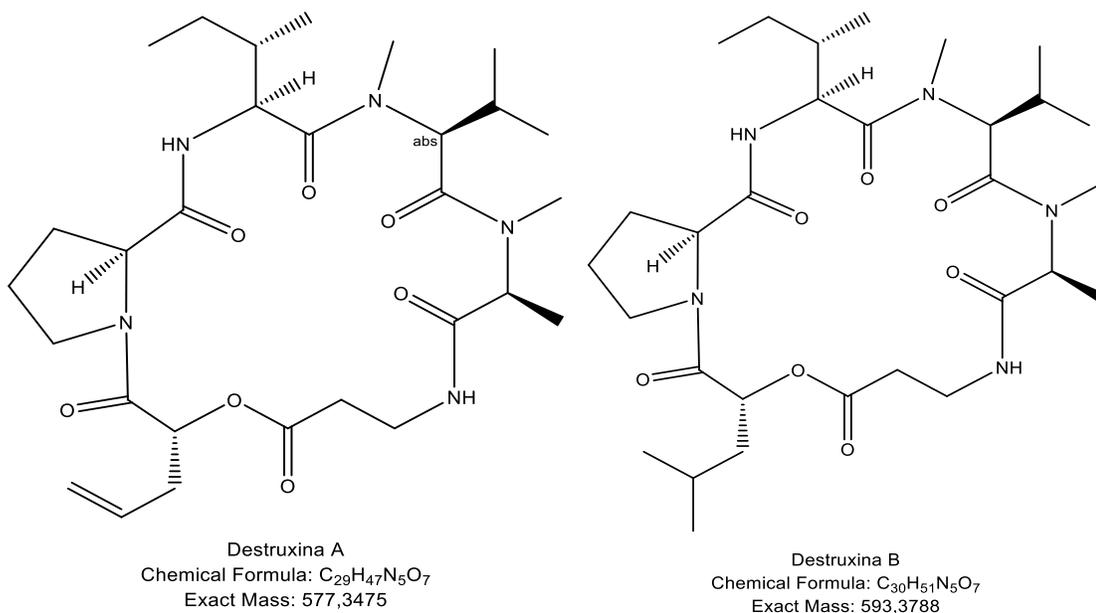
Figura 1-2. Esquema general del mecanismo de acción de hongos entomopatógenos (Cotes 2018).

1.2 Metabolitos secundarios de interés insecticida producidos por *Metarhizium* spp.

Los hongos entomopatógenos han sido ampliamente estudiados para ser empleados como controladores de insectos plaga debido a su alta eficacia y seguridad para el ambiente y salud humana (Kleespies y Zimmermann 1992; Roberts y St Leger 2004). Su mecanismo de acción está influenciado por la intervención de enzimas, además de algunos metabolitos que ejercen una función dentro del proceso de infección del hospedero (Schrank y Vainstein 2010). Dentro de los metabolitos identificados en los hongos entomopatógenos se ha demostrado que algunos actúan como antimicrobianos, otros interfieren en el sistema neuronal y fisiológico reduciendo la respuesta inmune del hospedero para finalmente causar su muerte (Roberts y St Leger 2004; Donzelli y Krasnoff 2016).

Las destruxinas son una familia de ciclodepsipéptidos los cuales han demostrado actividad insecticida, antiviral, fitotóxica, y también se ha identificado su potencial tóxico sobre células cancerígenas (Schrank y Vainstein 2010). Estos compuestos son los metabolitos secundarios más prevalentes producidos por especies de *Metarhizium* spp. en fermentación; y de lejos, son las toxinas más estudiadas y caracterizadas en hongos entomopatógenos. Lo anterior por su importancia como factor de virulencia que acelera la muerte de los insectos infectados (Schrank y Vainstein 2010; Wang et al. 2019; Yadav et al. 2019).

Se han reportado más de 40 destruxinas, incluyendo sus análogos, que han sido clasificadas en 5 grupos, y han sido etiquetados desde la A hasta la E. La fórmula general de las destruxinas es $-D\text{-HA}1\text{-L-Pro}2\text{-L-Ile}3\text{-L-MeVal}4\text{-L-MeAla}5\text{-}\beta\text{-Ala}6\text{-}$ donde HA es el residuo del α -hidroxiácido (Liu y Tzeng 2012). Las destruxinas más abundantes, y de interés insecticida, son las destruxinas A (DA), B (DB) y E (DE) (Pedras et al. 2002) (Figura 1-3).



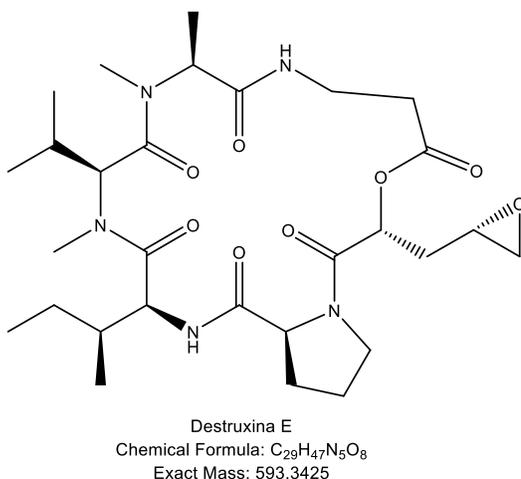


Figura 1-3. Estructura de destruxinas producidas por *Metarhizium* spp. En la figura se destacan las estructuras de la destruxina A; la destruxina B; y la destruxina E que tienen actividad insecticida.

Estos péptidos son tóxicos, y causan debilitamiento del sistema inmune del huésped, afectando el sistema muscular y los túbulos de Malpighi, afectan la excreción y conducen al insecto a limitar su alimentación, movilidad y mecanismo de defensa conductual (Schrank y Vainstein 2010; Wang et al. 2019; Yadav et al. 2019).

En *Metarhizium* spp. además de las destruxinas, existen reportes de otros metabolitos con actividad insecticida como las citocalasinas C y D, producidas por *M. anisopliae* (Aldridge y Turner 1969) y que fueron estudiadas por Roberts (1981) sobre larvas *Galleria mellonella*. Estos alcaloides son isómeros entre sí, con una fórmula estructural de $C_{30}H_{37}NO_6$, y se producen con un rendimiento bajo (Aldridge y Turner 1969) (Figura 1-4). Actúan inhibiendo la interacción entre la actina y la cofilina (Yadav et al. 2019), así, la citocalasina se une a filamentos de actina y afecta directamente los procesos de citocinesis (Schümann y Hertweck 2007). En células de insectos se ha encontrado que inhiben el acoplamiento de plasmátocitos, y causa alteraciones morfológicas afectando la funcionalidad del citoesqueleto (Mukherjee y Vilcinskis 2018; Yadav et al. 2019). A pesar de la demostrada actividad biológica de las citocalasinas, los estudios sobre ellas han sido menos extensos que los llevados a cabo sobre las destruxinas.

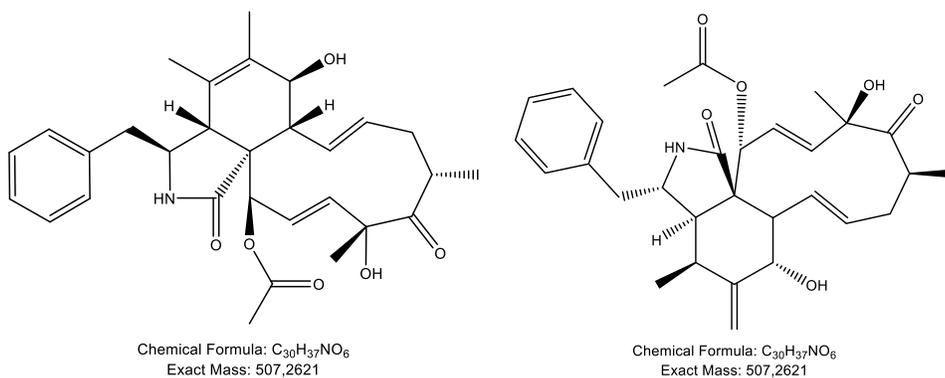


Figura 1-4. Estructura de la citocatalasina C (izquierda) y D (derecha) producida por *Metarhizium* spp.

Otro compuesto producido por *M. anisopliae* es el péptido serinociclina A (Krasnoff et al. 2007), que estructuralmente es un ciclo heptapéptido compuesto de tres unidades de serina, una hidroxiprolina (Hyp), β -alanina y dos aminoácidos poco comunes no proteínogénicos: 1- aminociclopropano-1- ácido carboxílico (Acc) y γ -hidroxilisina (HyLys), la secuencia peptídica es ciclo-(Acc-Hyp-Ser1-HyLys- β -Ala-Ser2-Ser3) (Figura 1-5). Esta molécula ha sido poco estudiada, pero se ha demostrado su actividad insecticida sobre el mosquito del dengue, *Aedes aegypti*, causando incapacidad para nadar. Lo anterior porque lleva a dificultad para moverse y mantener la cabeza, cola y primer segmento abdominal en estado normal. Dicha locomoción depende de propulsores como los “cepillos bucales” de las larvas, por lo que se ha propuesto que ella puede estar involucrada en este proceso; sin embargo, es necesario profundizar los estudios en su mecanismo de acción (Krasnoff et al. 2007; Yadav et al., 2019).

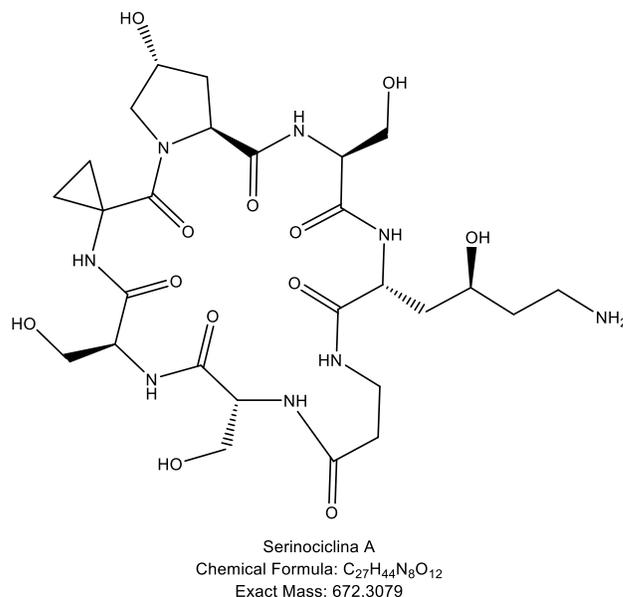


Figura 1-5. Estructura de la serinociclina A producida por *M. anisopliae*.

1.3 Propágulos fúngicos utilizados para el desarrollo de bioplaguicidas

Los hongos son organismos multicelulares capaces de formar estructuras vegetativas y reproductivas variadas, que en el caso de los hongos entomopatógenos pueden ser utilizadas como principio activo de un bioplaguicida. La selección del propágulo infeccioso a utilizar dependerá de la facilidad de producción, la virulencia y la estabilidad de este, así como de los requerimientos del bioinsecticida (de aplicación foliar o en suelo). El proceso de producción masiva puede ser manipulado nutricional y ambientalmente para obtener propágulos fúngicos eficaces o dirigir la diferenciación celular hasta obtener el propágulo deseado para su uso específico (Jackson et al. 2010).

Los propágulos fúngicos más reconocidos y ampliamente utilizados como principios activos de bioproductos son los conidios, seguidos de las blastosporas y menos conocidos, pero de uso interesante, el micelio y las clamidosporas. Recientemente se ha descrito que los microesclerocios también pueden ser interesantes en el desarrollo de bioproductos. A continuación, se describen brevemente cada uno de ellos.

1.3.1 Micelio

Se conoce como micelio al conjunto de hifas que forman la parte vegetativa de un hongo. El micelio se produce de manera abundante en cultivos por lo que se ha considerado su utilización en forma de pellets/agregados para el control de insectos, ya que bajo condiciones adecuadas de humedad podrían producir esporas infectivas (Roberts y St Leger 2004). Sin embargo, el micelio presenta menor virulencia, así como menor tolerancia a factores ambientales de estrés que otros propágulos (Amsellem et al. 1999).

1.3.2 Clamidosporas

Se definen como células en reposo hinchadas y con paredes gruesas que les permite sobrevivir en condiciones cálidas o secas (Ment et al. 2010). Las clamidosporas se forman dentro de las hifas o en la punta de las hifas, y son consideradas como estructuras de supervivencia de algunos hongos patógenos de plantas y animales, así como también por algunos entomopatógenos (Ment et al. 2010). Las formulaciones basadas en estas estructuras pueden ofrecer resistencia al calor y bajas temperaturas, tolerancia a antibióticos presentes en el suelo y extensión del tiempo de almacenamiento (Li et al. 2016), las clamidosporas formadas por el hongo antagonista *Trichoderma* sp. han sido evaluadas como ingrediente activo de bioformulados demostrando ser estables en almacenamiento hasta 270 días y pueden sobrevivir en el suelo incluso mejor que los conidios (Jagtap et al., 2000, Mishra et al. 2012, Li et al. 2016). Aunque las clamidosporas han sido poco estudiadas en especies de *Metarhizium* spp., se ha demostrado que cepas de este hongo son capaces de formarlas y de desarrollarse y producir conidios infecciosos (Ment et al. 2010).

1.3.3 Blastosporas

Las blastosporas son consideradas como propágulos vegetativos, y son utilizadas por la mayoría de los hongos entomopatógenos para su crecimiento dentro del hemocele del insecto, ya que les permite una mejor utilización de los nutrientes (Mascarin et al. 2019). Algunos hongos entomopatógenos de los géneros de *Isaria* spp., *Beauveria* spp.,

Lecanicillium spp. y *Metarhizium* spp. forman estas estructuras cuando son crecidos en cultivos sumergidos (Mascarin et al. 2019).

En laboratorio, las fermentaciones en cultivo sumergido permiten la obtención de altas concentraciones de estos propágulos en pocos días de fermentación a bajo costo (Bernardo et al. 2018). Son de rápida germinación (aprox. 6 horas) que se traduce mayor velocidad de acción con respecto a los conidios (Mascarin et al. 2019), pero la pared celular es más delgada y esto los hace más susceptibles a la desecación, radiación solar y demás factores ambientales (Roberts y St Leger 2004). En los últimos años, se han dirigido los esfuerzos en desarrollar formulaciones adecuadas que puedan proteger las blastosporas de daños por estrés abiótico (Mascarin et al. 2019).

1.3.4 Conidios

Los conidios son estructuras aéreas de reproducción asexual y son los responsables de la infección primaria en los insectos plagas y de la dispersión ambiental de la mayoría de los hongos entomopatógenos (Cotes et al. 2018). Son los propágulos más utilizados como principio activo en la mayoría de los bioinsecticidas, pues son naturalmente infecciosos y su producción se realiza con sustratos simples y económicos mediante en fermentación sólida (Mascarin et al. 2019). Aunque la producción masiva es simple, es bastante demandante y laboriosa, desde la preparación del sustrato y la cantidad de volumen utilizado, el tiempo de fermentación para el crecimiento del hongo y los métodos de separación de los conidios del sustrato (Fronza et al. 2017; Mascarin et al. 2019). Los costos de producción se incrementan debido a la alta demanda de mano de obra, la utilización de grandes espacios y la generación de grandes volúmenes de desechos sólidos (Cotes 2018; Villamizar et al. 2018; Mascarin et al. 2019). Además, el escalamiento de las fermentaciones sólidas es difícil de implementar por el complicado manejo de condiciones como temperatura, transferencia de oxígeno, pH y humedad (Cotes et al. 2018). Estos problemas impactan negativamente la factibilidad técnica y económica de diferentes bioinsumos a base de conidios (Cotes et al. 2018).

1.3.5 Microesclerocios

Los ME son estructuras de resistencia de los hongos, son compactas y frecuentemente pigmentadas, de tamaño promedio entre 200 a 900 μm , y estructuralmente similares a los esclerocios difiriendo en su tamaño (superior a 1000 μm) (Jackson y Schisler 1995; Song 2018). Estas estructuras en la naturaleza son formadas principalmente por hongos fitopatógenos como *Verticillium* spp. (Fan et al. 2017), *Sclerotinia* spp. (Bullock et al. 1980), y *Botrytis* spp. (Gomez-Miranda y Leal 1979) como estrategia de supervivencia bajo condiciones ambientales adversas como desecación, temperaturas extremas, ausencia de nutrientes, radiación ultravioleta, contacto con metales pesados, etc. (Willettts y Bullock 1992; Abo Ellil 1999; Georgiou et al. 2006). Estas estructuras son capaces de sobrevivir hasta 10 años en el suelo, y una vez las condiciones ambientales son favorables, pueden germinar e infectar hospederos susceptibles (Song 2018). La producción de los esclerocios en hongos fitopatógenos ocurre de forma espontánea en la naturaleza como respuesta a las condiciones del entorno; no obstante, en hongos entomopatógenos no se ha observado lo mismo, y es necesario inducir su producción de manera artificial mediante limitación de nutrientes y/o estrés abiótico en fermentación sumergida bajo condiciones de laboratorio (Jackson & Jaronski, 2009; Mascarín et al., 2014). Dentro de las investigaciones más relevantes sobre ME, ya sea para prevenir su formación en hongos fitopatógenos o para incrementar su producción durante la fermentación de agentes fúngicos biocontroladores, se ha dado paso al estudio de la estructura, formación y desarrollo y actividad biológica (Shearer y Jackson 2006; Jackson y Jaronski 2009; Mascarín et al. 2014; Song 2018).

Morfológicamente, la formación de los ME está dividida en 3 etapas: (1) iniciación de formación donde las hifas se hinchan y se agregan; (2) desarrollo donde dichas agregaciones se agrandan y producen el pigmento; y (3) maduración donde el pigmento se deposita dentro de la pared celular (Georgiou et al. 2006; Song et al. 2013). Estructuralmente los esclerocios (tamaño superior a 1 mm) tienen una anatomía que consta de tres capas, una externa que corresponde a un anillo pigmentado; una capa siguiente denominada corteza, compuesta de múltiples capas de células parenquimatosas pigmentadas; y una capa interna, denominada médula, compuesta de células incoloras (Song et al. 2013, Song 2018). Durante las etapas iniciales de formación de los ME, una matriz pigmentada gelatinosa es depositada en la capa externa, esta pigmentación está influenciada por la nutrición, edad del cultivo y los antioxidantes, y le confiere a la célula la

habilidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo, ya que la protege de la radiación ultravioleta, desecación y temperaturas extremas, confiere resistencia a fungicidas y agentes químicos, incrementa la rigidez celular y virulencia (Song 2018).

Los ME han sido exitosamente producidos artificialmente *in vitro* en fermentación líquida sobre un número limitado de microorganismos como *Colletotrichum truncatum* (Jackson y Schisler 1995), *Trichoderma harzianum* (Kobori et al. 2015), *Beauveria* sp. (Villamizar et al. 2018), *Mycocleptodiscus terrestres* (Shearer y Jackson 2006), *Purpureocillium lilacinum* (Song et al. 2016), *Metarhizium* sp. (Jackson y Jaronski 2009; Song et al. 2013; Mascarin et al. 2014; Song et al. 2014), entre otros.

La producción de ME en fermentación líquida puede variar dependiendo de la composición nutricional, aireación, temperatura, actividad de agua, densidad del inóculo, así como puede variar entre especies fúngicas o cepas (Mascarin et al. 2014). En general, para la producción de los ME se requieren medios de cultivos ricos en carbono, con bajo contenido de nitrógeno, junto con unas condiciones de fermentación que suplan las tasas de oxígeno necesarias para su formación y diferenciación (Jackson y Payne 2016).

Durante la formación de los ME, las bajas concentraciones de nitrógeno en el medio favorecen la agregación hifal así como maduración de los microesclerocios; mientras que la glucosa está íntimamente relacionada con la melanización de los microesclerocios (Jackson y Schisler 1995). Estudios con diferentes medios de cultivo para la producción de microesclerocios a partir de cepas de *Metarhizium* spp. han evidenciado rendimientos por el orden entre 10^4 y 10^6 microesclerocios/mL (Jackson y Jaronski 2009; Mascarin et al. 2014; Song et al. 2014). También ha sido notable su estabilidad manteniéndose activos incluso después de 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente (Song et al. 2014). La actividad insecticida de los conidios producidos a partir de microesclerocios de cepas de *Metarhizium* spp. también ha sido estudiada, obteniendo buenos resultados como los presentados por Song et al. (2014) quienes estudiaron la actividad insecticida de microesclerocios producidos por *M. rileyi*, obteniendo una actividad virulenta del 89.25% de sobre larvas de la polilla *Etiella zinckenella*. En los estudios presentados por Jackson y Jaronski (2009) se observó un 100% de sobre larvas de tercer instar del gusano de raíz de remolacha azucarera *Tetanops myopaeformi*.

1.3.5.1 Reservas endógenas y pigmentos de los microesclerocios

Durante el desarrollo y maduración de los microesclerocios, la formación de reservas endógenas es fundamental para su supervivencia, estabilidad de estructuras proteicas, turgencia celular, etc (Wang y le Tourneau 1971; Dunlap et al. 2011). Se ha evidenciado la presencia de solutos compatibles como los polioles que pueden contribuir a la regulación osmótica al disminuir el agua intracelular cuando hay baja disponibilidad de agua, mientras que la trehalosa puede reemplazar el agua y favorecer la estabilidad de estructuras proteicas bajo diferentes condiciones de estrés. También se ha sugerido que estos compuestos pueden ser utilizadas como reservas endógenas durante la germinación de los conidios a partir de los microesclerocios (Wang y le Tourneau 1971; Dunlap et al. 2011).

Polioles y Trehalosa

Los polioles, y el disacárido trehalosa son reconocidos como solutos compatibles, ya que su acumulación en el citoplasma celular no afecta las funciones celulares vitales de la célula, y pueden ser acumulados en grandes cantidades favoreciendo la estabilidad celular y turgencia de la célula (Hallsworth y Magan 1996; Liu et al. 2009). Cuando la célula reconoce factores de estrés ambiental y/o nutricional, activa su potencial osmótico desencadenando una serie de eventos de transducción y señalización molecular que dan paso a la formación de reservas endógenas tales como el disacárido trehalosa, y los polioles manitol, arabitol y eritrisol que contrarrestaran el efecto causado por factores tales como desecación, altas temperaturas, salinidad y ausencia de nutrientes (Jennings 1985; Hallsworth y Magan 1996; Argüelles et al. 2017).

Trehalosa: (α -D-glucopiranosil (1-1) α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de glucosa unidos por su carbono anomérico. La trehalosa está ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo un carbohidrato esencial para una variedad de organismos procariontas y eucariotas, como bacterias, hongos, plantas e invertebrados (Hallsworth y Magan 1996; Argüelles et al. 2017). El enlace α,α , 1-1 glicosídico le confiere a la molécula su carácter no reductor y hace que la trehalosa sea altamente resistente a hidrólisis ácida, y ataque por enzimas glicosidasas no específicas. Esta molécula se destaca por ser hidrofílica, estable en un amplio rango de temperatura y pH; además, en soluciones acuosas la trehalosa tiene la capacidad de estar en un estado

no higroscópico a altas temperaturas y desecación, esta cualidad hace que la trehalosa pueda proteger las membranas y estructuras biológicas reemplazando el agua durante periodos de deshidratación, exposición tóxica y/o congelación (Hallsworth y Magan 1996; Argüelles et al. 2017).

Los polioles, o alcoholes de azúcares, son alcoholes acíclicos polihidroxiados que se forman por la reducción del grupo carbonilo de una aldosa o cetosa a un grupo hidroxilo (Dijksterhuis y de Vries 2006; Solomon et al. 2007). Los más reconocidos son el glicerol, eritritol, arabitol y manitol los cuales son acumulados intracelularmente cuando las condiciones de actividad de agua se ven disminuidas (Hallsworth y Magan 1996, Dunlap et al. 2011). Su acumulación intracelular reduce la actividad de agua en el citoplasma, y no interrumpe las estructuras y funcionalidad de las enzimas, manteniendo una actividad metabólica durante periodos de baja disponibilidad de agua. Estos polioles derivan de la disponibilidad de sustrato extracelular o producto de la glicólisis (Hallsworth & Magan, 1995, 1996, Solomon et al., 2007). Estos cumplen diversas funciones biológicas en los organismos como (1) reserva de carbohidratos; (2) compuestos translocatorios; (3) funcionan en la osmorregulación y en la (4) regulación co-enzimática (Jennings, 1985, Solomon et al., 2007). El manitol, que químicamente es la forma reducida de la manosa, es un monosacárido encontrado en estructuras fúngicas como esporas, cuerpos fructíferos, micelio y esclerocios. El manitol tiene funciones como fuente de energía y sustancia osmoprotectante, y es considerado esencial en el proceso de germinación de las esporas, además se ha evidenciado su papel en resistencia a condiciones de estrés y dispersión de esporas (Solomon et al. 2007).

Melanina

En las etapas iniciales de la formación de microesclerocios también se ha evidenciado la presencia de pigmentos depositados sobre la capa externa. A medida que los propágulos maduran, las paredes celulares de los ME se melanizan. La melanina fúngica ha sido referida como “la armadura de los hongos” dado su habilidad de protegerlos frente a la radiación UV del sol, la desecación, la lisis enzimática, los antibióticos, las condiciones ambientales extremas y los metales pesados, entre otras (Pal et al. 2014; Fan et al. 2017). La biosíntesis de los pigmentos durante la producción de ME está influenciado por las

condiciones nutricionales, edad de cultivo y/o disponibilidad de antioxidantes, entre otros factores (Song 2018).

La melanina es un conjunto de pigmentos oscuros hidrofóbicos de alto peso molecular estable, amorfa cargada negativamente, formada por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos e indólicos. Aunque está presente en muchos organismos procariontas y eucariontas, su estructura exacta no ha sido definida (Belozerskaya et al. 2017). Históricamente, la melanina ha sido difícil de definir y categorizar debido a su diversidad y complejidad estructural. La definición general de los pigmentos fúngicos como la melanina, con base en criterios químicos, fue propuesta por Nicolaus et al. (1964) como: color oscuro, insoluble en agua caliente o fría y solventes orgánicos, resistente a degradación por ácidos concentrados (frío o caliente), blanqueado por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, y soluble y degradado en soluciones alcalinas concentradas calientes. Dado su complejidad estructural, su identificación se basa en características generales de sus propiedades químicas, que hasta el día de hoy ha sido bastante útil para el reconocimiento de la melanina (Buttler y Day, 1998, Belozerskaya et al. 2017, Selvakumar et al. 2008).

Por otro lado, la melanina es un biopolímero que participa en muchas funciones biológicas: virulencia, morfogénesis, transducción de energía, almacenamiento de energía, entre otras (Cordero y Casadevall 2017; Toledo et al. 2017). Se ha evidenciado que la melanina incrementa la tolerancia de los hongos a estrés ambiental mejorando de esta manera su supervivencia, protege las estructuras de la radiación ultravioleta, temperatura, agentes oxidantes, enzimas líticas producidas por otros microorganismos, metales pesados, antibióticos. Dado que la melanina tiene una población estable de radicales libres, se ha propuesto que las propiedades radioprotectoras son debidas a la eliminación de radicales libres generados por la radiación. La presencia de grupos quinoides dentro de la macromolécula podría explicar los centros paramagnéticos y la habilidad de la melanina de desactivar radicales libres y peróxidos, y absorber metales pesados y metabolitos electrofílicos tóxicos (Selvakumar et al. 2008; Gessler et al. 2014; Belozerskaya et al. 2017; Cordero y Casadevall 2017).

1.3.5.2 Potencial insecticida de los microesclerocios producidos por *Metarhizium* spp.

El suelo es un ambiente favorable para la supervivencia de los agentes biocontroladores, especialmente de los hongos ya que proporciona una temperatura y humedad adecuada, así como protección de los efectos causados por la radiación ultravioleta y lluvia (Jackson y Jaronski 2009; Mascarín et al. 2014). Para la aplicación de los hongos entomopatógenos en campo, se han desarrollado formulaciones como suspensiones acuosas de conidios, *pellets* de micelio, biomasa encapsulada, soportes granulados nutritivos o no nutritivos con conidios. El objetivo de cualquiera de estos enfoques es garantizar una zona con una alta concentración de conidios infectivos, de tal forma que, cuando el hospedero atraviese esa zona, adquiera suficientes conidios que resultarían en una infección letal para el insecto plaga (Jackson y Jaronski 2009; Mascarín et al. 2014).

Las principales dificultades cuando las suspensiones acuosas basadas en conidios se aplican al suelo son su distribución y homogeneidad. Una alternativa para solucionarlos es el uso de formulaciones granuladas aplicadas *in planta*, que permiten desarrollar numerosos focos de conidios para infectar los hospederos susceptibles, sin embargo, estos tipos de formulaciones son costosas y tienen baja estabilidad en almacenamiento (Jackson y Jaronski 2009).

Los ME son una excelente alternativa para ser aplicados en campo, las condiciones del suelo favorecen su germinación produciendo conidios secundarios, los cuales mantienen una alta tasa de infectividad sobre algunos insectos. Los requerimientos para su formulación son más sencillos, económicos y son procesos más rápidos en comparación con formulaciones granuladas debido a las características propias de estas estructuras (Jackson y Jaronski 2009; Villamizar et al., 2018; Song, 2018).

En el año 2009 Jackson y Jaronski (2009) presentaron el primer trabajo de microesclerocios producidos a partir de diferentes cepas de *M. anisopliae*, allí evaluaron el potencial insecticida, encontrando que, los conidios germinados ejercieron un control entre 90 y 100% sobre larvas de *Tetanops myopaeformis* (Diptera: Ulidiidae) después de 14 días de inoculación. A partir de este trabajo, se desencadenaron diferentes investigaciones que

demonstraron el potencial de los ME de diferentes especies de *Metarhizium*. Por ejemplo, Behle et al. (2013) evaluaron la eficacia de microesclerocios producidos por *M. brunneum* F52 sobre ninfas de la garrapata *Ixodes scapulari* (Acari: Ixoididae), obteniendo mortalidades entre 56 y 74%. En otro trabajo, esta misma cepa fue capaz de causar un 100% de mortalidad sobre el escarabajo *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) (Clifton et al. 2019). Song et al. (2014) optimizaron un medio para la producción de microesclerocios a partir de una cepa de *M. rileyi* (clasificado anteriormente como *Nomuraea rileyi*) y evaluaron su actividad insecticida sobre larvas de tercer instar del gusano de las vainas *Etiella zinckenella* Treitschke (Lepidoptera: Pyralidae) obteniendo un 89,25% de mortalidad después de 14 días de inoculación.

Metarhizium spp está ampliamente distribuido en diversos cultivos alrededor del mundo; de hecho, ha sido aislado de muchas especies de insectos, y se ha reportado en más de 200 hospederos de diferentes órdenes. Los aislamientos más frecuentes se han dado en especies del orden Coleóptera, principalmente a las familias Curculionidae, Elateridae y Scarabaeidae; y, en menor medida Diptera y Hymenoptera (Zimmerman 1993). En el caso de larvas de chizas, pertenecientes a la familia Scarabaeidae, se ha reportado una eficacia superior al 80%. La utilización de diferentes cepas de *Metarhizium* spp. así como la producción de microesclerocios, no sólo demuestran el potencial insecticida, sino su amplio espectro de acción sobre diferentes órdenes de insectos plaga.

En conclusión, teniendo en cuenta lo anterior, se describe ampliamente el potencial del uso del hongo *Metarhizium* sp. como agente biocontrolador de insectos plagas para ser incluido como principio activo de un bioplaguicida. Para garantizar un bioplaguicida altamente estable, persistente en condiciones ambientales adversas y mantener una alta eficacia en campo, los microesclerocios resultan ser una opción bastante viable debido a sus características de resistencia y la capacidad de producir conidios infectivos, asimismo, la producción de compuestos extracelulares con potencial insecticida durante su formación podrían ser aprovechados e incluidos dentro del bioinsecticida ofreciéndole un mayor efecto virulento sobre el insecto plaga.

1.4 Bibliografía

Abo Ellil AHA (1999) Sclerotial development, melanin production and lipid peroxidation by *Sclerotium rolfsii*. *Folia Microbiologica* 44(2):181-186

Aldridge DC, Turner WB (1969) Structures of cytochalasins C and D. *Journal of the Chemical Society C: Organic* (6):923-928. <https://doi.org/10.1039/j39690000923>

Amsellem Z, Zidack NK, Quimby PC, Gressel J (1999) Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms. *Crop Protection* 18(10):643-649. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00070-8)

Argüelles J-C, Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R (2017) Trehalose: A Crucial Molecule in the Physiology of Fungi. *Reference Module in Life Sciences* :1-9. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.12084-9>

Behle RW, Jackson MA (2014) Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *Journal of Economic Entomology* 107(2):582-590. <https://doi.org/10.1603/EC13426>

Behle RW, Jackson MA, Flor-Weiler LB (2013) Efficacy of a Granular Formulation Containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) Microsclerotia Against Nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixoididae). *Journal of Economic Entomology* 106(1):57-63. <https://doi.org/10.1603/ec12226>

Belozerskaya TA, Gessler NN, Aver'yanov AA (2017) Melanin Pigments of Fungi. *Fungal Metabolites* (July):263-291. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_29

Bernardo CC, Barreto LP, e Silva C de SR, Luz C, Arruda W, Fernandes ÉKK (2018) Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 9(5):1334-1342. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.001>

Beys-da-Silva WO, Rosa RL, Berger M, Coutinho-Rodrigues CJB, Vainstein MH, Schrank A, Bittencourt VREP, Santi L (2020) Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to

control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 208(October 2019):107812. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>

Bullock S, Ashford AE, Willetts HJ (1980) The structure and histochemistry of sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger - II. Histochemistry of extracellular substances and cytoplasmic reserves. *Protoplasma* 104(3-4):333-351. <https://doi.org/10.1007/BF01279777>

Butler MJ, Day AW (1998) Fungal melanins: A review. *Canadian Journal of Microbiology* 44(12):1115-1136. <https://doi.org/10.1139/w98-119>

Carollo CA, Calil ALA, Schiave LA, Guaratini T, Roberts DW, Lopes NP, Braga GUL (2010) Fungal tyrosine betaine, a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp. fungi. *Fungal Biology* 114(5-6):473-480. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.03.009>

Clifton EH, Gardescu S, Behle RW, Hajek AE (2019) Asian longhorned beetle bioassays to evaluate formulation and dose-response effects of *Metarhizium* microsclerotia. *Journal of Invertebrate Pathology* 163:64-66. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.03.005>

Cordero RJB, Casadevall A (2017) Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews* 31(2):99-112. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.003>.

Cotes A. M. (Ed.). (2018). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros (Vol. 1 y Vol 2). Primera, ed. Agrosavia editorial, Mosquera, Cundinamarca, Colombia, pp. 344, 928-930.

Silva, R., Quintela, E., Mascarin, G., Barrogossi, J., Moraes, L., 2013. Compatibility of conventional agrochemicals used in rice crops with the Cotes AM (2018) Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaro V1

Dijksterhuis J, de Vries RP (2006) Compatible solutes and fungal development. *The Biochemical journal* 399(2):3-5. <https://doi.org/10.1042/BJ20061229>

Donzelli BGG, Krasnoff SB (2016) *Molecular Genetics of Secondary Chemistry in Metarhizium Fungi*. Elsevier Ltd

Dunlap CA, Jackson MA, Saha BC (2011) Compatible solutes of sclerotia of *Mycleptodiscus terrestris* under different culture and drying conditions. *Biocontrol Science and Technology* 21(2):113-123. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.534551>

Fan R, Klosterman SJ, Wang C, Subbarao K V., Xu X, Shang W, Hu X (2017) Vayg1 is required for microsclerotium formation and melanin production in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* 98:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.11.003>

Fronza E, Specht A, Heinzen H, de Barros NM (2017) *Metarhizium* (*Nomuraea*) *rileyi* as biological control agent. *Biocontrol Science and Technology* 27(11):1243-1264. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1391175>

Georgiou CD, Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G (2006) Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 46(6):691-712. <https://doi.org/10.1093/icb/icj034>

Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA (2014) Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 50(2):105-113. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020094>

Gomez-Miranda B, Leal JA (1979) Chemical composition of *Botrytis cinerea* sclerotia. *Transactions of the British Mycological Society* 73(1):161-164. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(79\)80089-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(79)80089-3)

Hallsworth JE, Magan N (1996) Culture Age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7):2435-2442. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2435-2442.1996>

Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* 55(1):129-145. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y>

Jackson MA, Jaronski ST (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research* 113(8):842-850. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>

Jackson MA, Jaronski ST (2012) Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology* 22(8):915-930. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.696578>

Jackson MA, Payne AR (2016) Liquid Culture Production of Fungal Microsclerotia. En: Glare TR, Moran-Diez ME (eds) *Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*,. New York, pp 71-83

Jackson MA, Schisler DA (1995) Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. *Mycological Research* 99(7):879-884. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80745-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80745-4)

Jennings DH (1985) Polyol Metabolism in Fungi. *Advances in Microbial Physiology* 25(C):149-193. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60292-1)

Kleespies RG, Zimmermann G (1992) Production of Blastospores by Three Strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in Submerged Culture. *Biocontrol Science and Technology* 2(2):127-135. <https://doi.org/10.1080/09583159209355226>

Kobori NN, Mascarin GM, Jackson MA, Schisler DA (2015) Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* 119(4):179-190. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>

Krasnoff SB, Keresztes I, Gillilan RE, Szebenyi DME, Donzelli BGG, Churchill ACL, Gibson DM (2007) Serinocyclins A and B, cyclic heptapeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Natural Products* 70(12):1919-1924. <https://doi.org/10.1021/np070407i>

Li Y qian, Song K, Li Y chai, Chen J (2016) Statistical culture-based strategies to enhance chlamyospore production by *Trichoderma harzianum* SH2303 in liquid fermentation. *Journal of Zhejiang University: Science B* 17(8):619-627. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500226>

Lira AC de, Mascarin GM, Delalibera Júnior Í (2020) Microsclerotia production of *Metarhizium* spp. for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda*

through corn seed coating. *Fungal Biology* 124(8):689-699.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.011>

Liu BL, Tzeng YM (2012) Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances* 30(6):1242-1254.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.006>

Liu Q, Ying SH, Feng MG, Jiang XH (2009) Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 95(1):65-75. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9288-1>

Mascarin GM, Kobori NN, de Jesus Vital RC, Jackson MA, Quintela ED (2014) Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(5):1583-1590.
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1581-0>

Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Í, Fernandes ÉKK, Luz C, Faria M (2019) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 165(August 2017):46-53.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>

Ment D, Gindin G, Glazer I, Perl S, Elad D, Samish M (2010) The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biology* 114(1):49-56. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.005>

Mukherjee K, Vilcinskis A (2018) The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection. *Virulence* 9(1):402-413. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1405190>

Nicolaus RA, Piattelli M, Fattorusso E (1964) The structure of melanins and melanogenesis-IV. On some natural melanins. *Tetrahedron* 20(5):1163-1172.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)98983-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)98983-5)

Pal AK, Gajjar DU, Vasavada AR (2014) DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical Mycology* 52(1):10-18.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2013.826879>

- Pedras MSC, Irina Zaharia LI, Ward DE (2002) The destruxins: Synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* 59:579-596
- Roberts DW. (1981) Toxins of Entomopathogenic Fungi. In *Microbial Control of Pests* (Ed. Burges H. D.), pp. 441-464. Academic, London
- Roberts DW, St Leger R (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology* 54:1-70
- Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56(7):1267-1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Schümann J, Hertweck C (2007) Molecular basis of cytochalasan biosynthesis in fungi: Gene cluster analysis and evidence for the involvement of a PKS-NRPS hybrid synthase by RNA silencing. *Journal of the American Chemical Society* 129(31):9564-9565. <https://doi.org/10.1021/ja072884t>
- Selvakumar P, Rajasekar S, Periasamy K, Raaman N (2008) Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (Telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(10):2125-2131. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9718-2>
- Shearer JF, Jackson MA (2006) Liquid culturing of microsclerotia of *Mycoleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla. *Biological Control* 38(3):298-306. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.04.012>
- Solomon PS, Waters ODC, Oliver RP (2007) Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in Microbiology* 15(6):257-262. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.002>
- Song Z (2018) Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors, and molecular mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(23):9873-9880. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9400-z>
- Song Z, Shen L, Zhong Q, Yin Y, Wang Z (2016) Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematology* 18(6):719-726. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002987>

Song Z, Yin Y, Jiang S, Liu J, Chen H, Wang Z (2013) Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. BMC Genomics 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-411>.

Song Z, Yin Y, Jiang S, Liu J, Wang Z (2014) Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. BioControl 59(5):597-605. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9589-4>

Toledo AV, Franco MEE, Yanil Lopez SM, Troncozo MI, Saparrat MCN, Balatti PA (2017) Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. Physiological and Molecular Plant Pathology 99:2-6. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.04.004>

Villamizar LF, Barrera G, Marshall SDG, Richena M, Harland D, Jackson TA (2020) Three-dimensional cellular aggregates formed by *Beauveria pseudobassiana* in liquid culture with potential for use as a biocontrol agent of the African black beetle (*Heteronychus arator*). Mycology 00(00):1-14. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1754953>

Villamizar LF, Nelson TL, Jones SA, Jackson TA, Hurst MRH, Marshall SDG (2018) Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. Biocontrol Science and Technology 28(12):1097-1113. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1514584>

Wang J, Lovett B, St. Leger RJ (2019) The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi. Fungal Ecology 38:7-11. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.04.001>

Wang SYC, le Tourneau D (1971) Carbon sources, growth, sclerotium formation and carbohydrate composition of *Sclerotinia sclerotiorum*. Archiv für Mikrobiologie 80(3):219-233. <https://doi.org/10.1007/BF00410123>

Willettts HJ, Bullock S (1992) Developmental biology of sclerotia. Mycological Research 96(10):801-816. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81027-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81027-7)

2. Capítulo 2: Identificación de la cepa Mt004 de *Metarhizium* sp. y estudio de las condiciones para inducir la formación de microesclerocios

Resumen

Los microesclerocios (ME) han sido considerados los propágulos fúngicos más promisorios para ser utilizados como principio activo de un bioplaguicida. Estas estructuras son agregados hifales, compactos y pigmentados, cuya formación en cultivo sumergido puede ser artificialmente inducida en algunos hongos entomopatógenos como *Metarhizium* spp., mediante el uso de condiciones de estrés durante la fermentación. Con base en esta información, el objetivo de este trabajo fue inducir la formación de ME en la cepa colombiana de *Metarhizium* sp. Mt004, previamente seleccionada por su actividad entomopatógena frente a diferentes plagas agrícolas de interés. Para iniciar con este trabajo, se realizó la identificación molecular de la cepa que mediante el análisis basado en las secuencias ITS, EF-1 α y β -tubulina y se determinó que este hongo corresponde a la especie *Metarhizium robertsii*. Posteriormente, se evaluaron cuatro medios de cultivo reportados en la literatura para la producción de ME con diferentes cepas de *Metarhizium* sp. y se estudió el proceso de formación a nivel estructural.

Todos los medios de cultivos evaluados indujeron la formación de ME en la cepa de *M. robertsii* Mt004, después de 8 días de fermentación. Los dos medios de cultivo en los que se utilizó extracto de levadura como fuente nitrógeno (A y D) alcanzaron los mayores rendimientos con concentraciones finales de $1,64 \times 10^3$ y $1,43 \times 10^3$ ME/mL y producción de biomasa de 21,88 y 17,74 g L⁻¹ respectivamente. El consumo de glucosa fue superior al 70% y el pH se mantuvo en un rango entre 4 a 5, el cual se ha reportado como favorable

para la producción de ME. Los ME presentaron poca pigmentación a los 8 días de fermentación, lo que se sugirió que las estructuras necesitaban un tiempo mayor de incubación para alcanzar la madurez. Por tal razón, el tiempo de fermentación se extendió a 20 días. El medio de cultivo con la mayor relación C:N (55:1) y en el que se empleó extracto de levadura como fuente de nitrógeno (D) produjo el mayor rendimiento, con una concentración final de $2,04 \times 10^3$ ME/mL, estructuras con un tamaño entre 356 y 1348 μm que fueron capaces de germinar y producir $6,02 \times 10^5$ conidios por ME. Basados en estos resultados, el medio D y un tiempo de fermentación de 20 días fueron las condiciones seleccionadas en términos de mayor rendimiento de ME y por permitir la formación de las estructuras más compactas y pigmentadas

2.1 Introducción

El hongo *Metarhizium* sp. ha sido ampliamente estudiado por su potencial insecticida especialmente sobre insectos que habitan el suelo. Este género consta de aprox. 200 especies con una amplia gama de hospederos que abarcan casi todos los órdenes de insectos e incluso arácnidos (Patel 2020). La infección se inicia cuando los conidios del hongo se adhieren sobre la cutícula del insecto. Una vez adheridos, los conidios germinan y ocurren numerosos procesos físicos y bioquímicos que culminan con la muerte del insecto (Schrank y Vainstein 2010; Wang et al. 2019; Beys-da-Silva et al. 2020; Patel 2020).

Los propágulos fúngicos más utilizados para el desarrollo de los bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos son los conidios, los cuales, si bien son eficaces, también son susceptibles a condiciones ambientales que reducen su eficacia y persistencia en campo (Jackson y Jaronski 2009; Cotes 2018; Song 2018; Villamizar et al. 2018). Además, los procesos de producción mediante fermentación sólida son difíciles de escalar y altamente demandantes de mano de obra, lo que sumado a una baja estabilidad bajo condiciones de almacenamiento generan una baja relación beneficio-costos (Mascarín et al. 2019).

En este sentido, la investigación en esta área se ha enfocado en los últimos años en la búsqueda de otros propágulos alternativos a los conidios que mantengan una igual o mayor

eficacia y que sean más persistentes en campo y estables bajo condiciones en almacenamiento como los microesclerocios (Song 2018).

Los microesclerocios (ME) han sido descritos como agregados hifales, compactos con pigmentación oscura, que pueden o no presentar una zona interior diferenciada, los cuales son producidos bajo condiciones de estrés ambiental y nutricional (Song 2018; Paixao et al., 2021). Estos son producidos de forma natural por hongos fitopatógenos, siendo estructuras que les permite sobrevivir por largos periodos de tiempo y una vez las condiciones son favorables, estos pueden germinar, producir conidios e infectar tejidos susceptibles (Song 2018). En hongos entomopatógenos, los ME fueron producidos por primera vez con éxito por Jackson y Jaronski en 2009, en una cepa de *M. anisopliae* utilizando fermentación sumergida con medios de cultivo que inducían estrés nutricional (C: N 30:1, 50:1). A partir de ahí, se ha generado mucha información acerca de la producción de ME con diferentes especies fúngicas y se han estudiado los mecanismos bioquímicos y genéticos involucrados en la formación de estas estructuras (Jackson y Schisler 1992; Jaronski y Jackson 2008; You-ping et al. 2012; Song et al. 2013a; Song et al. 2014; Kobori et al. 2015; Fan et al. 2017; Song 2018; Villamizar et al. 2018).

Estructuralmente los ME comprenden principalmente dos zonas celulares, una externa de células parenquimatosas y una interna compuesta de células incoloras entreteljadas con una médula (Song 2018). Generalmente, durante la formación de los ME ocurre la biosíntesis de melanina (pigmento fúngico), el cual está influenciado por la nutrición, la edad del cultivo y los antioxidantes producidos (Song 2018). Dicha pigmentación ha demostrado estar involucrada en la tolerancia frente a la radiación ultravioleta y fungicidas, además mejora la rigidez celular y la virulencia, y protege a las células del calor. Estas características le permiten una mayor tolerancia condiciones ambientales y mayor estabilidad en almacenamiento. Los ME no son propágulos infecciosos, pero al germinar tienen la capacidad de producir miles de conidios infectivos, lo que, sumado a las características de resistencia mencionadas, hacen que estos propágulos fúngicos se consideren ideales para el desarrollo de bioinsecticidas (Jackson y Jaronski 2009; Jackson y Jaronski 2012; Kobori et al. 2015; Villamizar et al. 2020).

En trabajos previos realizados en Agrosavia, se evaluó el potencial de diferentes aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de larvas de melolóntidos

(Coleoptera: Scarabaeoidea). Para ello, se aislaron diferentes microorganismos destacándose la cepa Mt004 del género *Metarhizium*, que fue aislada de una larva de *Ancognatha scarabaeoides*.

La cepa Mt004 de *Metarhizium* sp. ha sido evaluada frente a diferentes hospederos como *Rhammatocerus schistocercoides*, *A. scarabaeoides* y *Diatraea saccharalis* (Torres-Torres, 2020), pertenecientes a los órdenes Ortóptera, Coleóptera y Lepidóptera respectivamente. En todos los casos este hongo presentó una eficacia superior al 50% cuando se inoculó una suspensión de conidios ajustada a una concentración de 1×10^7 conidios/mL, lo que, sumado a su amplio espectro de acción, evidenció el potencial de esta cepa para ser desarrollada como un bioinsecticida para el control diferentes insectos plaga.

En ese contexto, el propósito del presente capítulo fue identificar la molecularmente la cepa colombiana de *Metarhizium* sp. Mt004 e inducir la formación de ME mediante la evaluación de diferentes medios de cultivo líquido previamente reportados, con miras a estudiar su proceso de formación a nivel estructural y seleccionar el medio más eficiente para la producción de dichas estructuras.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 General

Para los medios de cultivo se utilizaron Glucosa (Merck), Extracto de levadura (Scharlau), Caseína acida hidrolizada (Merck), Citrato de amonio (Scharlau), Peptona (Merck), KH_2PO_4 (Sigma Aldrich), CaCl_2 (Sigma), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (Merck), MgSO_4 (Merck) CoCl_2 (Merck), MnSO_4 (Merck), ZnSO_4 (Roda Química Ltda), Tween 80 (Merck), y PDA (Oxoid).

Los equipos utilizados en este capítulo fueron un microscopio ZEISS Axio, estereoscopio ZEISS Stemi 508, potenciómetro Mettler Toledo S220 (SevenCompact™), un agitador orbital MaxQ™ 4000 (Thermo Fisher Scientific), una centrifuga Biofuge *stratos* SORVALL, un Vacufuge® plus Eppendorf, Balanza analítica Kern ABS 220-4N, balanza de humedad Precisa® XM60 y una cabina de flujo laminar BIOBASE.

2.2.2 Microorganismo y medio de cultivo

El microorganismo utilizado fue la cepa de *Metarhizium* sp. codificada como Mt004. Este hongo fue aislado de una larva de *Ancognatha scarabaeoides* Erichson (Coleóptera: Melolonthidae) colectada en Rionegro (Antioquia), y se encuentra conservado en la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Agrosavia mediante criopreservación a -80°C. La cepa fue reactivada y cultivada en agar papa-dextrosa (PDA) suplementado con 0,1% de cloranfenicol e incubada durante 7 días a 25°C.

2.2.3 Identificación molecular del microorganismo

El ADN genómico se extrajo directamente de los conidios macerados con N₂ líquido. La extracción de ADN se realizó mediante el sistema Fungal DNA MiniPrep (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones y recomendaciones del fabricante para la extracción de ADN fúngico.

Para el análisis, se obtuvieron secuencias de genes parciales para tres regiones; la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosómico nuclear (ITS), factor de elongación 1-alfa (EF-1 α) y beta tubulina (β -tubulina). La región de ITS se amplificó usando los cebadores, ITS 1 (5'-TCGGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990)), la región β -tubulina se amplificó usando los cebadores degenerados betatubF (5'-TGGGCYAARGGYCACTACACYGA-3') y betatubR (5'-TCAGTGAACCTCATCTCRTCCAT-3') (Tartar et al., 2002) y la región EF-1 α se amplificó utilizando los cebadores EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGTAC) y EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (Rehner y Buckley, 2005).

Las secuencias se editaron y alinearon para obtener una secuencia consenso que se comparó con las secuencias representativas de diferentes de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (*M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. guizhouense*, *M. majus*, *M. acridum*, *M. álbum*, *Beauveria bassiana*, *B. rudraprayagi*, *B. brongniartii*, *B. pseudobassiana*). Las secuencias fueron concatenadas para los análisis, los cuales se realizaron con el software MSGA 11 (Tamura et al., 2021). El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987). El árbol consenso fue inferido con un Bootstrap de 1000 réplicas. Las distancias genéticas se

estimaron con el método de Kimura 2-parameter (Kimura, 1980). En total se analizaron 12 secuencias con 2616 nucleótidos.

2.2.4 Evaluación de medios de cultivo para la producción de microesclerocios con la cepa *Metarhizium robertsii* Mt004

Se estudiaron cuatro medios de cultivos previamente reportados como exitosos para la producción de ME con otros aislamientos de *Metarhizium* sp., cuya composición se describe a continuación (Tabla 1).

Tabla 2-1. Composición de los medios de cultivo evaluados para la producción de ME de *M. robertsii* Mt004

Medio A (Song et al. 2013)		Medio B (Jackson y Jaronski, 2009)		Medio C (Song et al. 2014)		Medio D (Mascarin et al. 2014)	
Ingrediente	g/L	Ingrediente	g/L	Ingrediente	g/L	Ingrediente	g/L
Glucosa	40,0	Glucosa	75,0	Glucosa	32,0	Glucosa	36,0
Peptona	2,5	Caseína hidrolizada ácida	15,0	Citrato de amonio	2,0	Extracto levadura	3,6
Extracto levadura	5,0						

Todos los medios fueron suplementados con una solución de sales con la siguiente cantidad de cada componente por Litro: KH_2PO_4 : 4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,8 g, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2g*, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,6 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 37 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 16 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 14 mg.
*El $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ en el medio B: 0,1 g; en el medio C: 0,15 g; y en el medio D: 0,1 g.

Tabla 2-1b. Concentración de carbono (C) y nitrógeno (N) y relación C:N de los medios de cultivo evaluados para la producción de ME de *M. robertsii* Mt004

Medios	Concentración de carbono (g/L)	Concentración de nitrógeno (g/L)	C:N
A	18	0,65	28:1
B	37,95	1,20	32:1
C	13,11	0,25	54:1
D	16	0,29	55:1

La fermentación se realizó en Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio. El inóculo se preparó a partir de cultivos esporulados en agar de 10 días de edad. Los conidios fueron lavados superficialmente con una solución de Tween 80 al 0,5%. La suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^8 conidios/mL mediante recuento en cámara de Neubauer y posteriormente se utilizó para inocular los Erlenmeyers que se ajustaron a una concentración inicial de 1×10^6 conidios/mL. Se utilizaron tres unidades experimentales (Erlenmeyers) por tratamiento, que fueron incubadas en un agitador orbital MaxQ™ 4000 (Thermo Fisher Scientific) a 200 rpm y 25°C durante 8 días.

Durante el proceso de fermentación, se tomaron muestras cada dos días retirando asepticamente 1 mL de cada Erlenmeyer para la evaluación de los siguientes parámetros:

2.2.4.1 pH y Biomasa

El pH de cada medio de cultivo se determinó utilizando un potenciómetro Mettler Toledo S220 (SevenCompact™). Para estimar la biomasa seca, el medio de cultivo fue centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos, recuperando el pellet que fue secado a 40°C hasta peso constante.

2.2.4.2 Consumo de sustrato (azúcares y proteínas)

Se tomaron 400 µL del medio de cultivo y se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos. La cuantificación de azúcares reductores se realizó siguiendo el protocolo descrito por Miller (1959). Se elaboró una curva patrón de glucosa, para las que se prepararon concentraciones de 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 1,7 y 2,0 g/L. Muestras de 125 µL de soluciones de glucosa de concentraciones conocidas y de las muestras de los tratamientos, se dispensaron en tubos Eppendorf de 2 mL. Posteriormente, se adicionaron 125 µL de reactivo 3,5- ácido dinitrosalicílico (DNS) y se calentaron a ebullición por 5 minutos. La reacción se detuvo sumergiendo los tubos en hielo durante 5 minutos. Luego se adicionaron 1,25 mL de agua destilada, protegiendo los tubos de la luz y se determinó la absorbancia a 540 nm utilizando agua destilada como blanco.

La cuantificación de proteína total se realizó con el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD). La curva de calibración se estandarizó usando solución de suero de albúmina bovina (BSA) como patrón con concentraciones entre 0 y 1000 µg/mL. Muestras de 2 µL

de cada concentración del patrón, o de las muestras, se mezclaron con 98 μ L del reactivo de Bradford y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. La absorbancia se determinó en espectrofotómetro a 595 nm (Bradford, 1976) utilizando agua destilada como blanco.

2.2.4.3 Rendimiento de microesclerocios, blastosporas y conidios

Muestras de 50 μ L del medio de cultivo se colocaron sobre láminas portaobjeto de vidrio, se cubrieron con una laminilla de 25x25 mm y se dejaron reposar por 30 segundos. Los ME fueron enumerados en toda el área de la laminilla mediante observación en microscopio con aumento de 40x. Paralelamente, se tomaron 10 μ L del medio de cultivo y se diluyeron en 90 μ L de solución de Tween 80 (0,1%). Se realizaron diluciones seriadas y la cantidad de blastosporas y conidios presentes en la muestra se cuantificó en una cámara de Neubauer.

2.2.4.3.1 Prueba de hidrofobicidad

Para cuantificar los conidios y las blastosporas formadas durante el proceso de fermentación, se siguió la metodología descrita por Villamizar et al. (2020). Se tomaron 300 μ L del caldo de fermentación y se mezclaron con un volumen igual de Xylol (fracción orgánica). Los tubos se agitaron mediante 10 inversiones manuales y se dejaron en reposo a 4°C toda la noche, permitiendo la separación de las fases. Posteriormente se tomaron muestras de la fracción acuosa y se cuantificaron las estructuras fúngicas mediante recuento en cámara de Neubauer. El rendimiento fue definido como la concentración de ME/mL.

2.2.4.4 Cosecha y viabilidad de los microesclerocios

Los ME fueron cosechados siguiendo la metodología descrita por Villamizar et al. (2018). Terminada la fermentación se adicionaron 5 gramos de tierra de diatomeas (TD) por cada 100 mL de medio de cultivo y se agitó vigorosamente. Posteriormente, la mezcla se filtró al vacío con un embudo Buchner a través de papel filtro Whatman No.1. La torta resultante fue granulada a través de una malla con tamaño de poro de 1 mm y los gránulos se colocaron en cajas de Petri para ser secados toda la noche a 22°C dentro de una cabina

de flujo laminar. Una vez finalizado el tiempo de secado se midió la humedad en una balanza Precisa® XM60.

Para determinar la viabilidad de los ME, se tomaron 250 mg de gránulos y se adicionaron a 1 mL de Tween 80 al 0,1%. Los gránulos fueron desintegrados con ayuda de una micropipeta con punta estéril que se introdujo dentro de la muestra para agitar succionando varias veces. Las muestras se dejaron reposar durante 30 segundos y se retiraron 500 µL del sobrenadante, los cuales se reemplazados con 500 µL de Tween 80 al 0,1%. Este proceso de lavado para retirar la tierra de diatomeas fue repetido tres veces y finalmente se inocularon 100 µL de la muestra en cajas Petri con medio agar agua. Los ME limpios se removieron de cada caja de Petri con ayuda de una pinza de punta fina y se transfirieron a otra caja de Petri con agar agua registrando la cantidad. Las cajas se incubaron durante 48 horas a 25°C.

La germinación miceliogénica definida como el crecimiento hifal se determinó mediante observación en estereoscopio. La germinación conidiogénica definida como la producción de conidios a partir de los ME, se evaluó después de 7 días de incubación a 25°C. Para tal fin, se adicionó un volumen determinado de Tween 80 al 0,1% en cada caja y se lavó la superficie con ayuda de un rastrillo. El líquido se recuperó y el volumen fue medido con una pipeta. Se realizaron diluciones seriadas a partir de esta suspensión y se cuantificó la concentración de conidios en cámara de Neubauer. Cada variable fue determinada por triplicado para cada medio de cultivo.

2.2.4.5 Análisis del perfil proteico de los medios de cultivo

En cada tiempo de muestreo, se tomaron 100 mL de los diferentes medios de cultivo y se realizó la separación de la biomasa mediante filtración al vacío con filtros de 0,22 µm. Para la determinación de las proteínas producidas durante el proceso de fermentación, inicialmente éstas fueron concentradas utilizando filtros Amicon® y centrifugación a 7000 g por 20 minutos. La muestra retenida fue concentrada 10 veces utilizando un Vacufuge® plus Eppendorf a 30°C durante 45 min.

2.2.4.5.1 Electroforesis SDS- PAGE

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% (gel de separación) y uno al 4% (gel de concentración). Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 15 µL de muestra y 5 µL

de Buffer Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, 0,004 % Azul de bromofenol, 0,125 M Tris HCl pH 6.8). Las muestras fueron previamente calentadas a 95°C durante 5 minutos y dispuestas en cada uno de los pozos, se utilizó marcador Opti-Protein X como referencia de peso molecular.

2.2.5 Análisis estadístico

La homogeneidad de varianzas y la normalidad de los resultados se determinaron mediante las pruebas de Bartlett y Shapiro Wilk con una confiabilidad del 95%. Las diferencias entre los tratamientos fueron determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey (95%) utilizando el programa estadístico Statistix (8.0). Cuando no se cumplieron estos principios, los datos fueron analizados realizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

2.3 Resultados

2.3.1 Análisis filogenético de la cepa Mt004

El árbol filogenético consenso fue construido con las secuencias concatenadas bajo el método de Neighbor-Joining utilizando 12 secuencias representativas depositadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (en inglés: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mostró el agrupamiento del aislamiento Mt004 con cepas de *Metarhizium* con un valor de réplica del 100% y específicamente con *M. robertsii* con un valor de réplica del 99% (Figura 2-1).

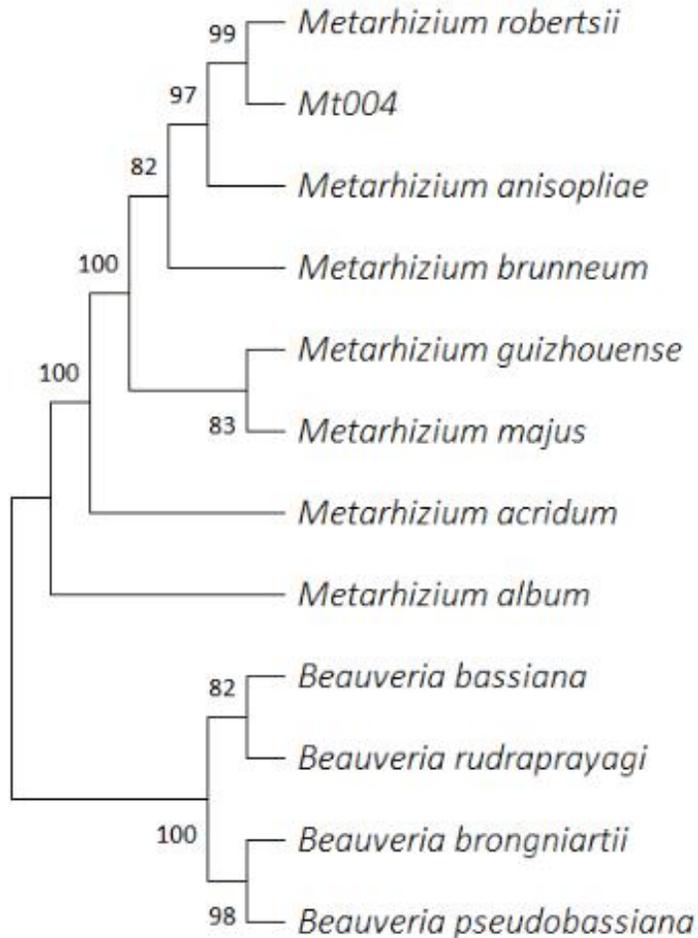


Figura 2-1 Árbol filogenético construido con las secuencias concatenadas con el método de Neighbour-Joining.

La distancia genética analizada calculada con el método de Kimura 2-parameter mostró una distancia de 0,00094 entre el aislamiento Mt004 comparado con un aislamiento de *M. robertsii* ARSEF23, mientras que las distancias con otras especies de *Metarhizium* estuvieron entre 0,01 y 0,3 (datos no mostrados). Considerando sus características morfológicas y su identificación molecular, el aislamiento Mt004 fue clasificado como *M. robertsii*.

2.3.2 Evaluación de medios de cultivo para la producción de microesclerocios con la cepa Mt004

Formación de microesclerocios

Durante los dos primeros días de fermentación se observó una alta densidad micelial y el inicio de la formación de agregados hifales en los medios A y D mientras que en los medios B y C se produjo desarrollo hifal sin agregación (Figura 2.2).

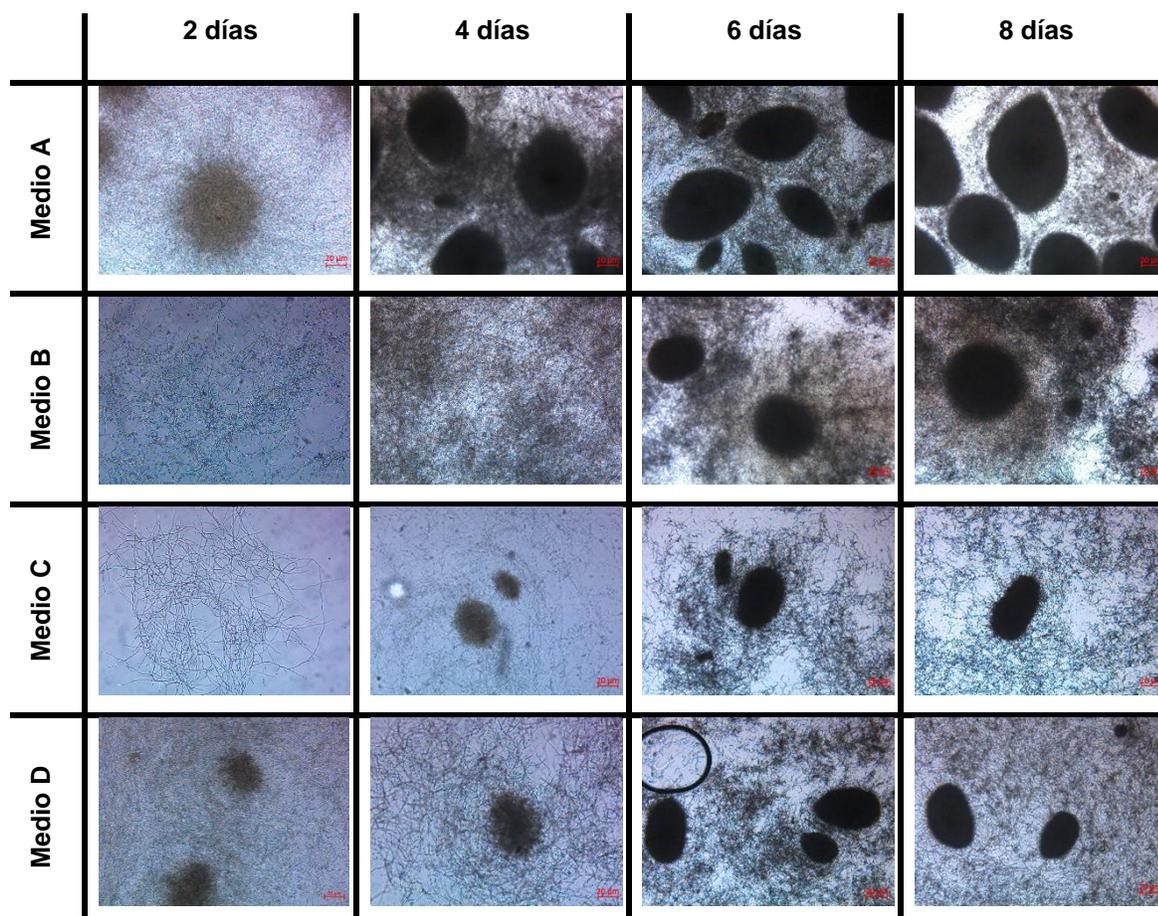


Figura 2-2. Morfogénesis de los ME formados por *M. robertsii* Mt004 en diferentes medios de cultivo. Fotografías tomadas en microscopio óptico con el objetivo 5X. El tamaño de la barra corresponde a 20 μ m.

Al cuarto día de fermentación, los agregados formados en el medio A se observaron de mayor tamaño y densidad, con bordes más definidos y color oscuro, que sugiere la melanización de las estructuras e indica la formación de microesclerocios. Además de

estas estructuras, se observaron blastosporas y conidios, al igual que una alta densidad de micelio libre. En el medio D, los agregados formados presentaron mayor tamaño, pero mantuvieron una apariencia fofo y poco densa al igual que las estructuras encontradas en el medio C a este mismo tiempo de evaluación. En el medio B se observó un aumento de la densidad micelial pero no se produjo la formación de agregados de micelio.

Después de 6 días de fermentación, se observaron ME compactos, con borde definido (pocas hifas alrededor) e intensa coloración café, en los medios de cultivo A, C y D. Los microesclerocios formados en el medio B se observaron más pequeños y rodeados por una alta densidad de micelio. Es importante resaltar que los medios de cultivo A y D presentaron un aumento progresivo de la viscosidad durante el proceso de fermentación.

Pasados 8 días de fermentación se observaron ME más compactos en todos los medios de cultivo, con rendimientos de $1,64 \times 10^3$, $1,72 \times 10^2$, $1,20 \times 10^2$ y $1,43 \times 10^3$ ME/mL para los medios A, B, C y D respectivamente (Tabla 2.2).

Tabla 2-2. Biomasa, blastosporas (blas), conidios (con) y microesclerocios (ME) producidos por *M. robertsii* Mt004 en fermentación sumergida en diferentes medios de cultivo. Los análisis estadísticos se realizaron de manera independiente para cada tipo de propágulo. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según prueba de comparación de medias Tukey (95%). Para la variable ME, las diferencias significativas entre tratamientos fueron determinadas mediante prueba de Kruskal-Wallis (95%).

	Días	Medios de cultivo			
		A	B	C	D
Biomasa (g/L)	0	0 e	0 e	0 e	0 e
	4	23,33 a	20,89 ab	9,39 d	16,14 c
	8	21,88 ab	19,44 bc	8,65 d	17,74 bc
Blastosporas (blas/mL x 10⁶)	0	0 e	0 e	0 e	0 e
	4	2,50 abc	1,69 cd	0,46 d	2,36 abc
	8	3,66 a	2,08 bcd	0,41 d	3,46 ab
Conidios (con/mL x 10⁶)	0	1 a	1 a	1 a	1 a
	4	0,72 c	1,72 b	0,13 c	1,69 b
	8	0,24 c	0,55 c	0,30 c	0,54 c
Microesclerocios (ME/mL x 10³)	0	0 e	0 e	0 e	0 e
	4	0,049 cd	0 e	0,027 cde	0,047 de
	8	1,64 a	0,172 abc	0,120 bc	1,43 ab
Tamaño de ME (µm)	8	321,76 - 976,69	193,45 - 987,16	126,52 - 945,06	120,92 - 799,78

La cepa de *M. robertsii* Mt004 desarrolló estructuras consistentes con microesclerocios en los cuatro medios de cultivos evaluados, sobresaliendo los medios A y D, en los cuales se obtuvieron rendimientos significativamente superiores en comparación con los medios de cultivo B y C ($F_{3,58}=108$, $p=0,0000$) (Figura 2.3).

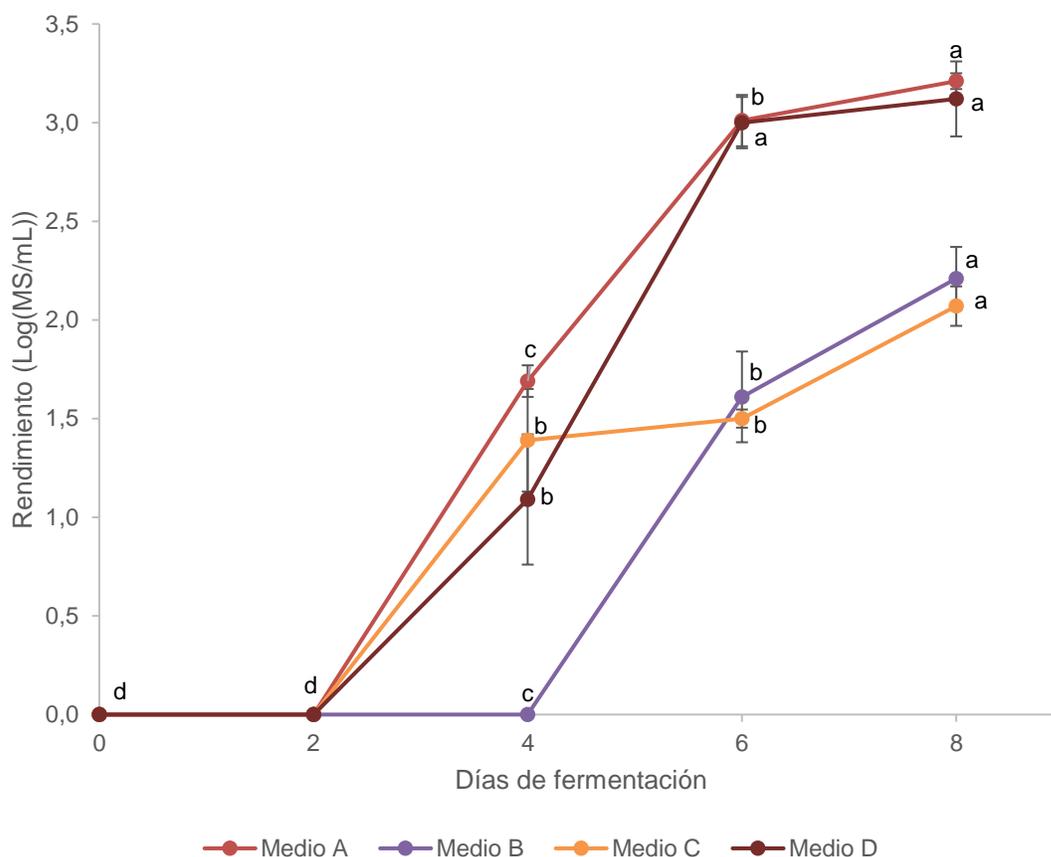


Figura 2-3. Rendimiento de microesclerocios formados por *M. robertsii* Mt004 durante ocho días de fermentación en diferentes medios de cultivo líquido. El análisis fue realizado de manera independiente para cada medio de cultivo. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

Biomasa: La biomasa total producida no varió significativamente entre el día 4 y el día 8 después de la inoculación para ninguno de los medios evaluados. Al día 8 de fermentación, el mayor nivel de biomasa con 21,88 g/L se obtuvo en el medio A, seguido del medio B y D (Tabla 2.2), tratamientos que no fueron significativamente diferentes entre sí ($F_{7,104} = 37,2$, $p = 0,0000$).

La relación C:N de los medios A y B que presentaron los mayores niveles de biomasa es aproximadamente 30:1, mientras que los medios C y D tienen una relación C:N de aproximadamente 50:1 (Tabla 2.1b). Este resultado sugiere que la producción de biomasa está determinada por la concentración de dichos nutrientes elementales, siendo mayor al utilizar una menor relación C:N (mayor contenido de nitrógeno).

Producción de blastosporas y conidios: La producción de blastosporas alcanzó concentraciones entre $2,08$ y $3,6 \times 10^6$ blas/mL con los medios A, B y D, sin observarse variaciones significativas entre los días 4 y 8 de fermentación para cada medio. La producción de blastosporas fue significativamente inferior ($F_{7,94} = 9,55$, $p = 0,0000$) en el medio C, que alcanzó un máximo de $4,19 \times 10^5$ blas/mL al día 8 de cultivo (Tabla 2.2).

La concentración de conidios disminuyó durante el tiempo de fermentación, con concentraciones entre $2,4$ y $5,5 \times 10^5$ con/mL a los 8 días, sin detectarse diferencias significativas entre los medios de cultivo ($F_{7,92} = 18,3$, $p = 0,0000$). Esta reducción se debe en parte a que los conidios inoculados germinaron dando lugar a la formación de hifas y posteriormente la diferenciación celular originó diferentes propágulos fúngicos como blastosporas, microesclerocios y micelio.

Consumo de sustrato y pH: El consumo de glucosa fue dependiente de la composición del medio de cultivo. Con los medios A, B y D se evidenció un consumo superior al 70% de la glucosa total, mientras que con el medio de cultivo C, el consumo estuvo alrededor del 39% (Figura 2.4b).

El pH cambió durante la formación de los ME y presentó un comportamiento diferente en cada medio de cultivo. El medio de cultivo A presentó variaciones significativas entre el tiempo inicial y final ($F_{4,70} = 3,91$, $p = 0,0064$), con valores entre 4,80 y 4,20. Los medios B y D presentaron ligeras variaciones no significativas, en tanto que en el medio C se observó una rápida acidificación después de 2 días con pH 3,70 y posteriormente una alcalinización del medio llegando a un valor final de 4,42 ($F_{4,60} = 30,8$, $p = 0,000$). Todos los medios de cultivo mantuvieron un rango entre 3,5 y 4,7, favorable para la producción de ME (Figura 2.4a).

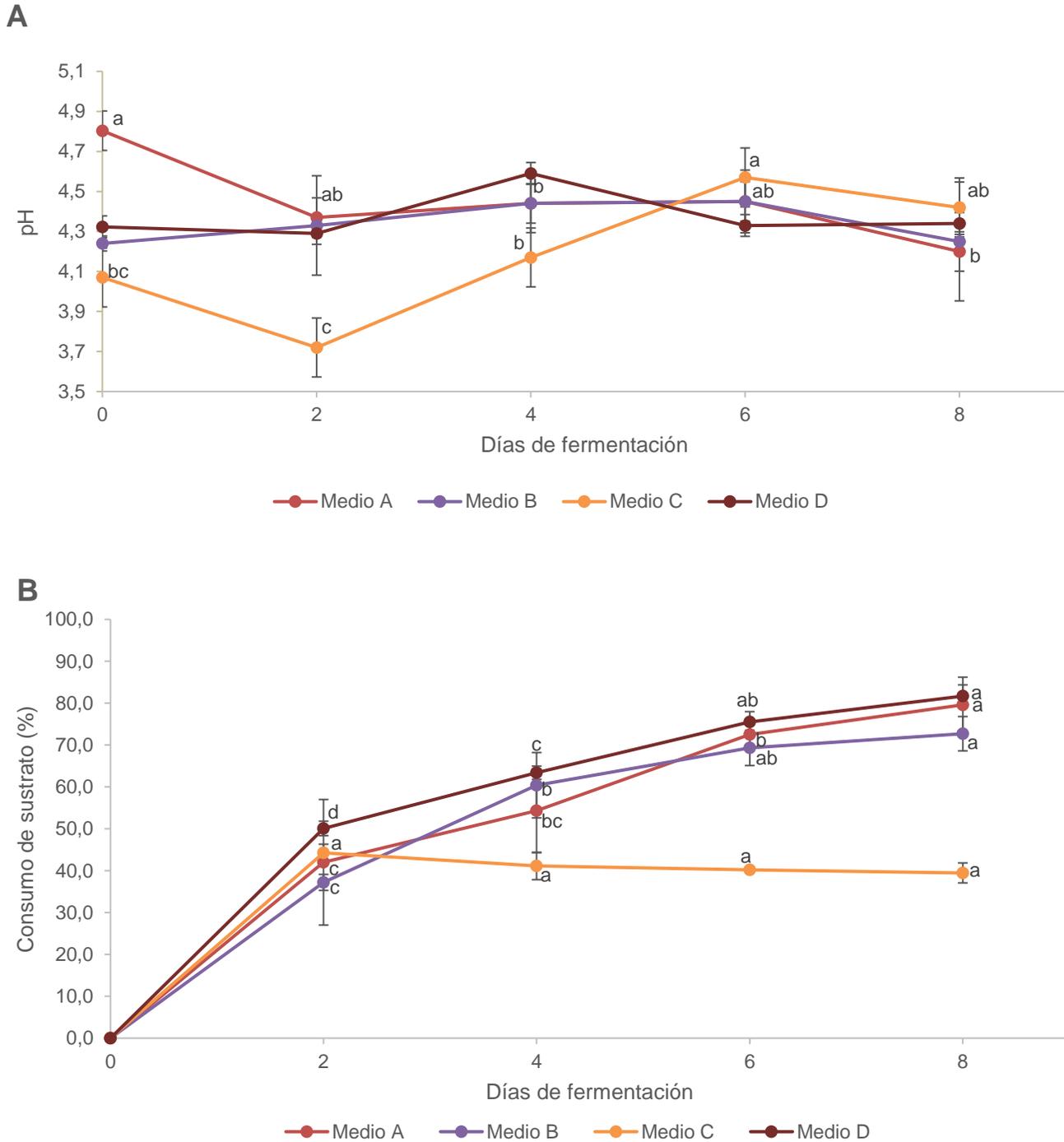


Figura 2-4. pH (A) y consumo de glucosa (B) de *M. robertsii* Mt004 durante 8 días de fermentación sumergida en diferentes medios de cultivo. El análisis fue realizado de manera independiente para cada medio de cultivo. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

El contenido de proteína total en los medios de cultivo se incrementó con el tiempo de fermentación (Tabla 2.3) y su expresión fue evidenciada mediante un perfil proteico que se presenta en la Figura 2.5.

Tabla 2-3. Concentración de proteínas producidas por la cepa Mt004 en fermentación sumergida obtenido con cada medio de cultivo. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

Medios	Concentración de proteína total (µg/mL)	
	Día 0	Día 8
A	17,85	53,52a
B	5,71	46,52ab
C	5,81	27,35b
D	9,18	35,68ab

M. robertsii Mt004 expresó diferentes proteínas durante la formación de ME (Figura 2.5). En los perfiles proteicos de los cuatro medios analizados se observaron cuatro proteínas principales que fueron comunes entre ellos. Estas proteínas presentaron niveles de expresión evidentes en cada gel analizado y se denominaron *1 (78 kDa), *2 (49 kDa), *3 (32 kDa) y *4 (17 kDa) según el orden de tamaño aproximado.

En el medio A se observaron dos proteínas que se expresaron durante toda la fermentación. La proteína *3, con un peso molecular cercano a los 32kDa presentó una disminución en el día 8 de fermentación, similar a la proteína *2 con un peso molecular cercano a los 49 kDa, la cual se expresó más intensamente en el día 6 y disminuyó en el día 8. Otras proteínas con pesos moleculares aproximados de 18,9; 91,4; 106,8 kDa se expresaron levemente al finalizar el tiempo de fermentación.

Con el medio B, se evidenciaron proteínas con pesos moleculares similares al medio A, especialmente *2 y *3 durante todo el proceso de fermentación, observándose bandas de mayor intensidad a los 8 días de cultivo. También se observaron proteínas con pesos aproximados de 22,2 y 78 kDa (*1) que se expresaron durante los últimos 4 días de fermentación y la proteína de 17 kDa (*4) que se evidenció solo al día 8.

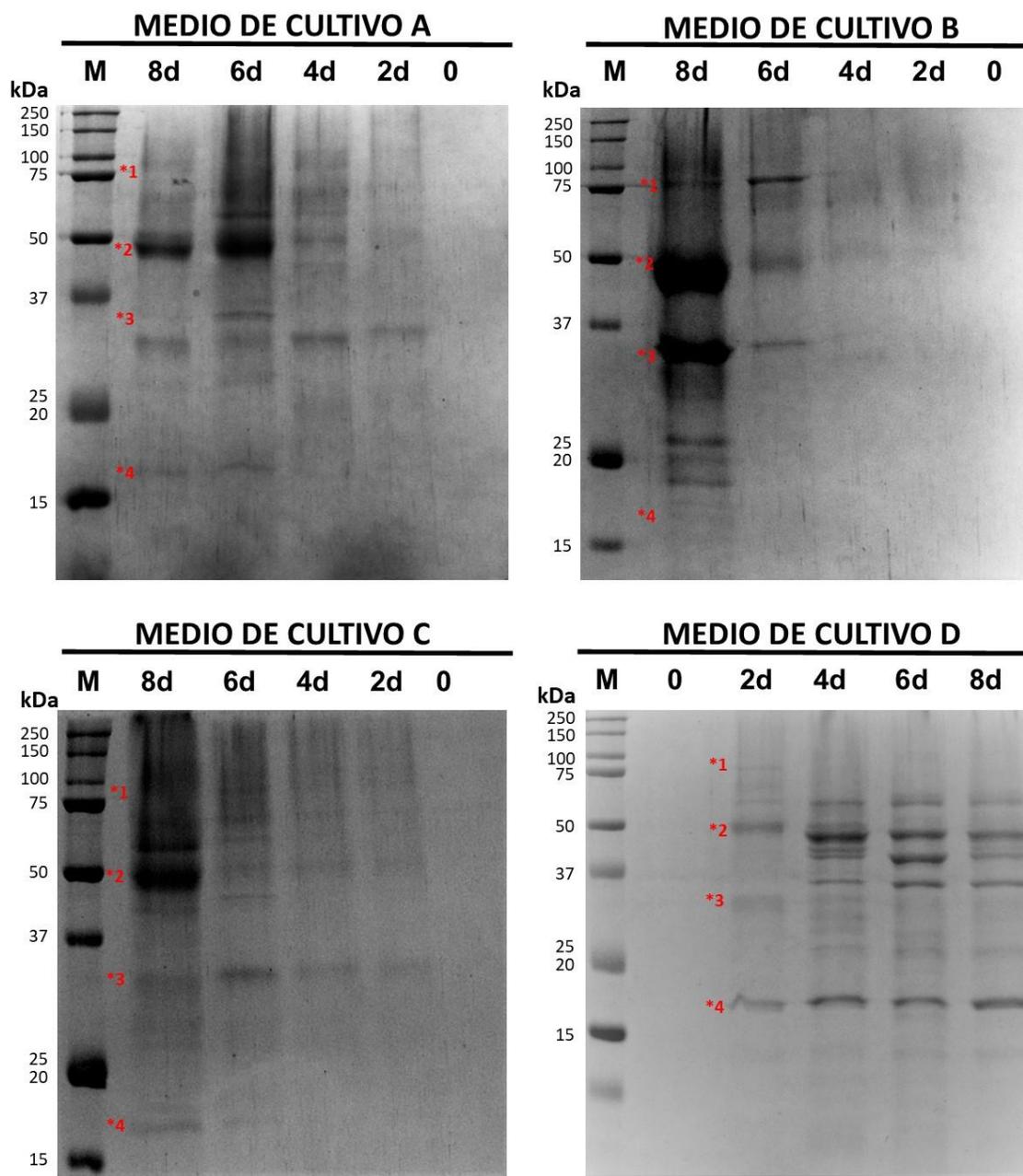


Figura 2-5. Perfil proteico de los medios de cultivo A, B, C y D durante ocho días de fermentación. M: Marcador de peso molecular. En rojo se indican las proteínas más evidentes y comunes en los perfiles de los cuatro medios.

Con el medio C, al igual que con los medios anteriores, se expresaron proteínas desde el segundo día de fermentación, distinguiéndose cuatro con pesos moleculares aproximados de $68,4 \pm 2,31$; $50,4 \pm 1,09$ (*2); $32,17 \pm 0,29$ (*3) y $28,33 \pm 0,26$ kDa. La proteína *2 presentó

un aumento significativo de expresión en el día 8, mientras que la proteína *3 mantuvo una expresión con leve disminución.

Finalmente, con el medio de cultivo D las proteínas *1, *2 y *3 disminuyeron su expresión hasta el día 8, en contraste con la proteína *4 que presentó expresión claramente visible en todos los días de fermentación con aumento leve desde el día 4.

Viabilidad miceliogénica y conidiogénica de los microesclerocios

Como se observa en la Figura 2.6, los ME recuperados de todos los medios de cultivo presentaron 100% de germinación después de 48 horas de incubación, lo que fue evidenciado por la formación de hifas alrededor del microesclerocio (Tabla 2.4).

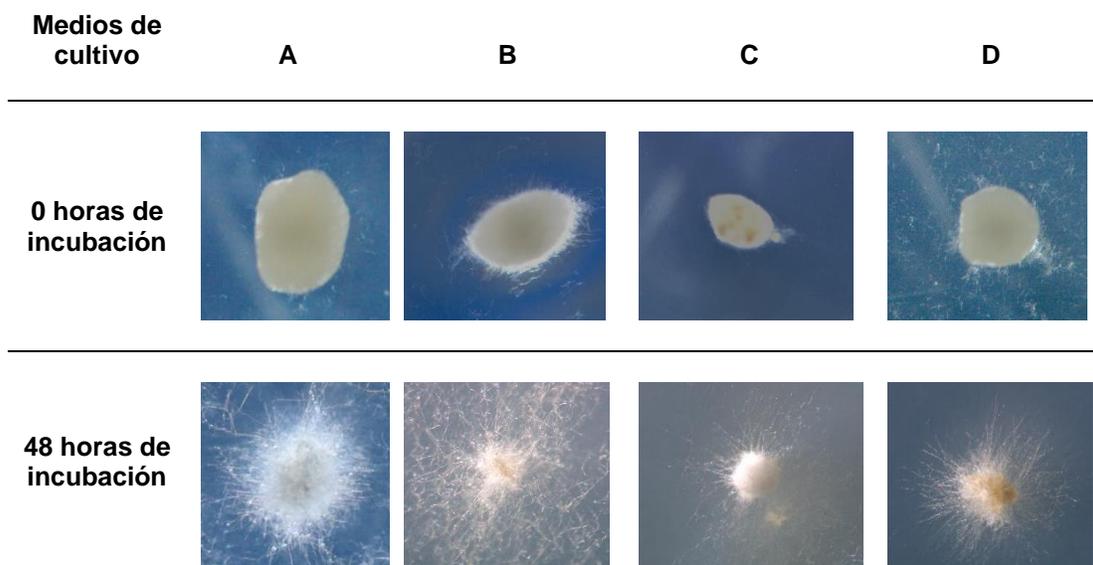


Figura 2-6. Germinación miceliogénica de ME formados por *M. robertsii* Mt004.

Observaciones realizadas en estereoscopio con objetivo 1.6X.

Los ME producidos en todos los medios de cultivo produjeron conidios después de su germinación miceliogénica. Los ME de los medios A, C y D alcanzaron rendimientos alrededor de 10^5 conidios por ME, valores significativamente mayores que los obtenidos con el medio B que presentó una esporulación 10 veces menor ($F_{3,8} = 20,9$, $p = 0,0004$).

Tabla 2-4. Viabilidad de ME formados por *M. robertsii* Mt004 en fermentación sumergida en diferentes medios de cultivo. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

Variable	Medio A	Medio B	Medio C	Medio D
Germinación miceliogénica (%)	100%	100%	100%	100%
Germinación conidiogénica (conidios/ME)	1,05x10 ⁵ b	3,79x10 ⁴ c	1,26x10 ⁵ ab	1,60x10 ⁵ a

2.3.3 Selección del medio de cultivo para la producción de microesclerocios

Debido a la poca pigmentación de los ME producidos en todos los medios después de una semana de cultivo (Figura 2.6), se decidió extender el tiempo de fermentación a 20 días con el fin de permitir la maduración de las estructuras, fenómeno que ha sido asociado con tiempos largos de fermentación (Rivas-Franco, 2020).

Al día 20 de fermentación se observó mayor pigmentación con todos los tratamientos (Figura 2.7). Con el medio de cultivo A se observaron estructuras compactas de tamaños heterogéneos (428 a 977 μm), algunas de ellas altamente pigmentadas, mientras que otras solo mostraron pigmentación en la zona central (Figura 2.6). Adicionalmente, es importante resaltar que la viscosidad del medio se redujo considerablemente.

Con el medio de cultivo B, se obtuvieron estructuras esféricas, con abundante micelio suelto en la superficie y de tamaños entre 1064 y 1876 μm ; diámetros que superaron la escala micrométrica. En el medio de cultivo C se obtuvieron estructuras con tamaños entre 448 y 2059 μm , algunas pigmentadas y compactas y otras frágiles y sin pigmentación.

Por último, con el medio de cultivo D, se obtuvieron estructuras completamente pigmentadas y compactas con tamaños variados entre 352 y 1752 μm (Figura 2.7) y al igual que con el medio de cultivo A, la viscosidad de este medio se redujo a través del tiempo.

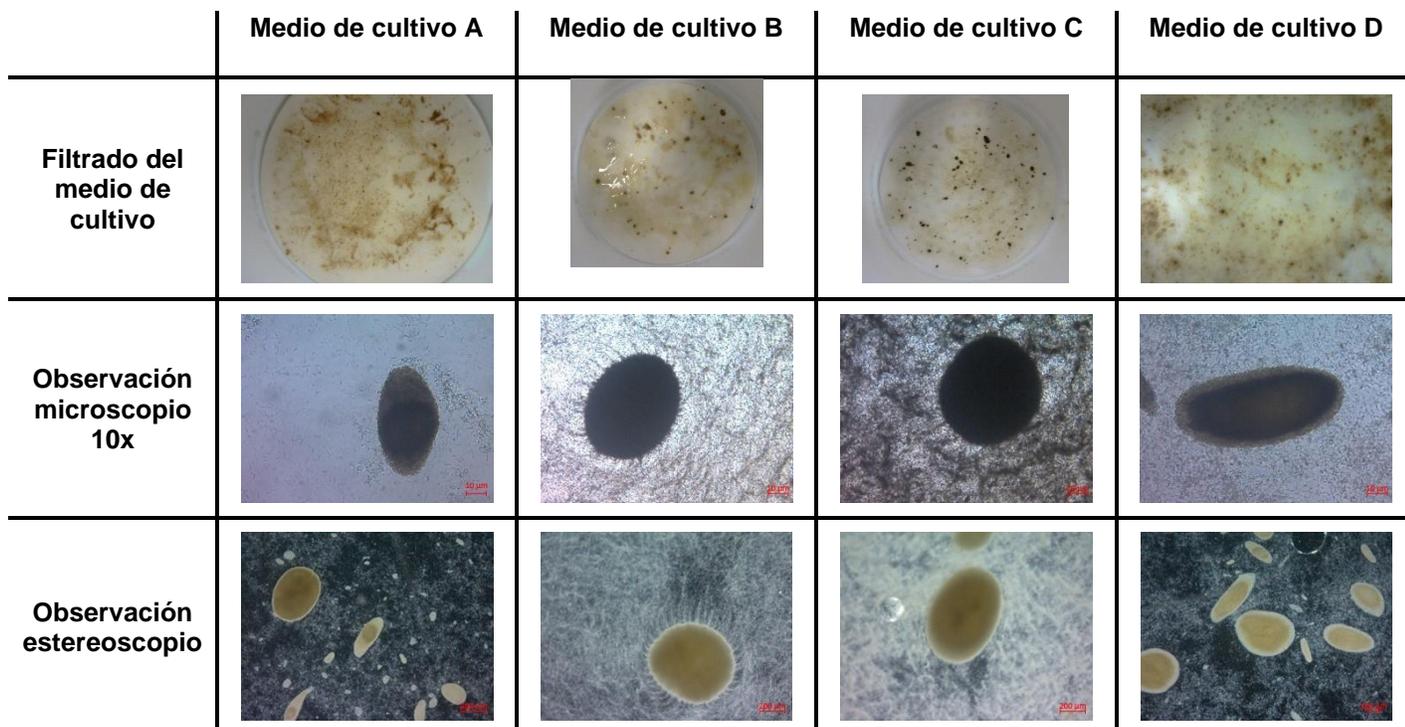


Figura 2-7. Estructuras formadas por *M. robertsii* Mt004 en fermentación sumergida en diferentes medios de cultivo después de 20 días de cultivo.

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó el medio de cultivo D para continuar con los estudios posteriores principalmente por tres factores i) un rendimiento superior de $1,43 \times 10^3$ ME/mL, el cual no presentó diferencias significativas con el medio de cultivo A, ii) pigmentación homogénea de los ME obtenidos, contrario a lo observado con el medio de cultivo A, donde se observaron ME con centro pigmentado principalmente, iii) mayor relación beneficio/costo debido a la utilización de un solo componente como fuente de nitrógeno.

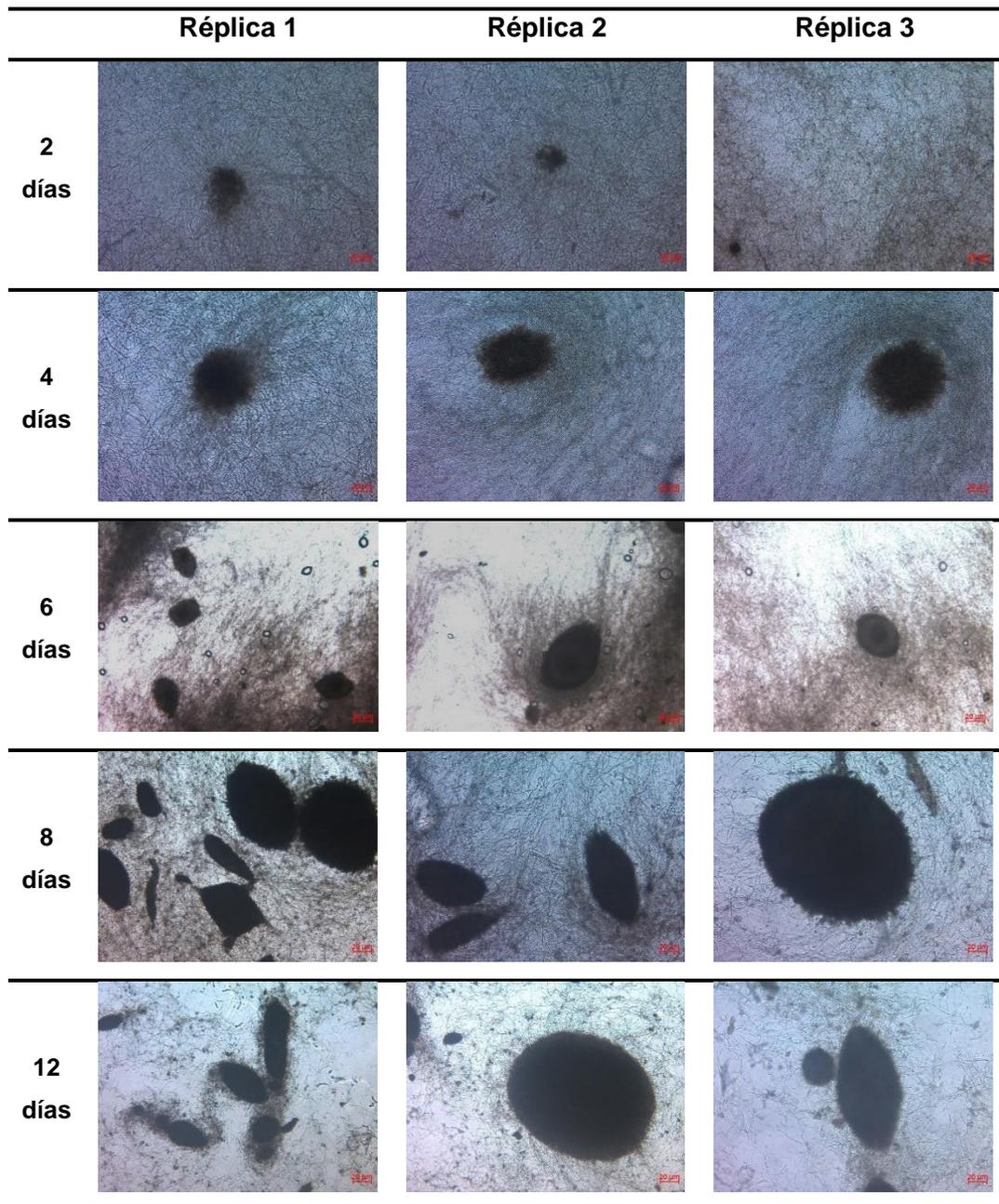
Formación de microesclerocios, blastosporas y conidios y evaluación de parámetros de eficiencia con el medio seleccionado

Para estudiar en detalle el proceso de morfogénesis de los microesclerocios en el medio de cultivo seleccionado (D), se realizó otra corrida y se tomaron muestras a los 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 20 días de fermentación (Figura 2.8).

Una vez los conidios germinaron, se formó una alta densidad de micelio durante los primeros dos días de fermentación, observándose pequeños agregados hifales (Figura

2.8). Después de 4 días se observó micelio suelto y agregados hifales no definidos que iniciaron la formación de los ME.

Conforme pasó el tiempo (entre 6 y 8 días), los agregados hifales se fueron compactando y pigmentando desde el interior de la estructura hacia la parte externa (Figura 2.8). La concentración de los ME a los 8 días de fermentación fue de $1,20 \times 10^3$ ME/mL, valor similar al obtenido previamente con este mismo medio.



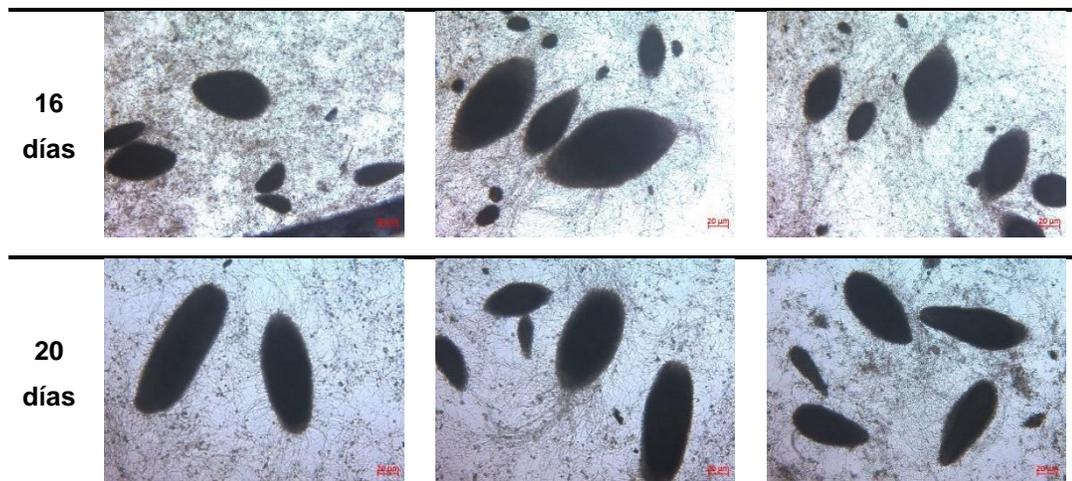


Figura 2-8. Morfogénesis de ME formados por *M. robertsii* Mt004 durante 20 días de fermentación en el medio de cultivo D. Fotografías tomadas en microscopio óptico con el objetivo 5X. El tamaño de la barra corresponde a 20 μm .

A partir de los 12 días de fermentación, la densidad de micelio y la viscosidad del medio empezaron a disminuir, así como la concentración de blastosporas y conidios. También se observaron ligeros cambios en la pigmentación y tamaño de los microesclerocios. Entre los 16 y 20 días de fermentación se incrementó la concentración de ME alcanzando un rendimiento final de $2,04 \times 10^3$ ME/mL. Los microesclerocios formados presentaron borde definido, aspecto compacto y con mayor pigmentación en comparación a los 8 días (Figura 2.6). Vale la pena mencionar que el caldo de fermentación también se fue oscureciendo durante el proceso (datos no mostrados).

La concentración final de blastosporas fue de $7,07 \times 10^4$ blastosporas/mL y la concentración final de conidios fue de $2,73 \times 10^5$ conidios/mL.

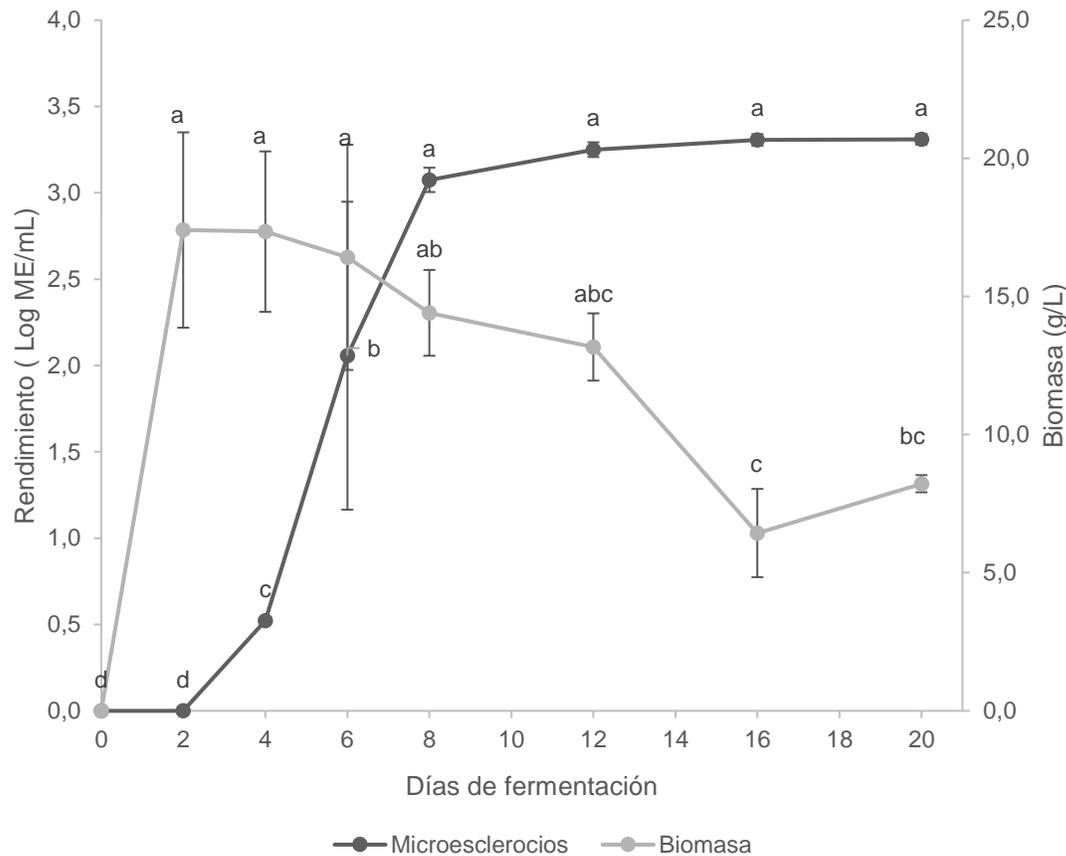


Figura 2-9. Producción de microesclerocios y biomasa durante 20 días de fermentación en el medio D. Para cada parámetro, las letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

La biomasa total incrementó durante los dos primeros días de fermentación y luego se mantuvo constante hasta el día 12. Después, la biomasa se redujo significativamente hasta una concentración final de 8,22 g/L ($F_{7,16} = 21$, $p < 0,00$) (Figura 2-9). Al final del proceso de fermentación, se obtuvieron ME con tamaños variados entre 356 y 1348 μm . El medio de cultivo presentó un pH final de 5,14. El consumo de glucosa alcanzó el 98,8%.

La concentración de proteína total a los 20 días fue de 181,11 $\mu\text{g/mL}$, valor siete veces más alta que la obtenida a los 8 días de fermentación con este mismo medio. El perfil proteico del medio seleccionado hasta los 20 días de fermentación es presentado en la Figura 2.10. La banda que evidencia una proteína con peso molecular aproximado de $44,84 \pm 0,34$ kDa inició su expresión en el día 4 e incrementó su intensidad después de los

12 días de fermentación, con drástica disminución al día 16, mientras que, que la proteína con un peso molecular aproximado de $28,37 \pm 0,23$ kDa, incremento su intensidad después de los 16 días de fermentación. Las bandas de las proteínas con pesos moleculares de $57,8 \pm 0,83$, $45,2 \pm 0,68$, $39,3 \pm 0,56$, $34,3 \pm 0,35$, $25,7 \pm 0,29$ kDa disminuyeron su intensidad. Para las proteínas de pesos moleculares de $21,64 \pm 0,20$ y $17,36 \pm 0,32$ kDa la intensidad de las bandas se mantuvo constantes durante todo el proceso de fermentación.

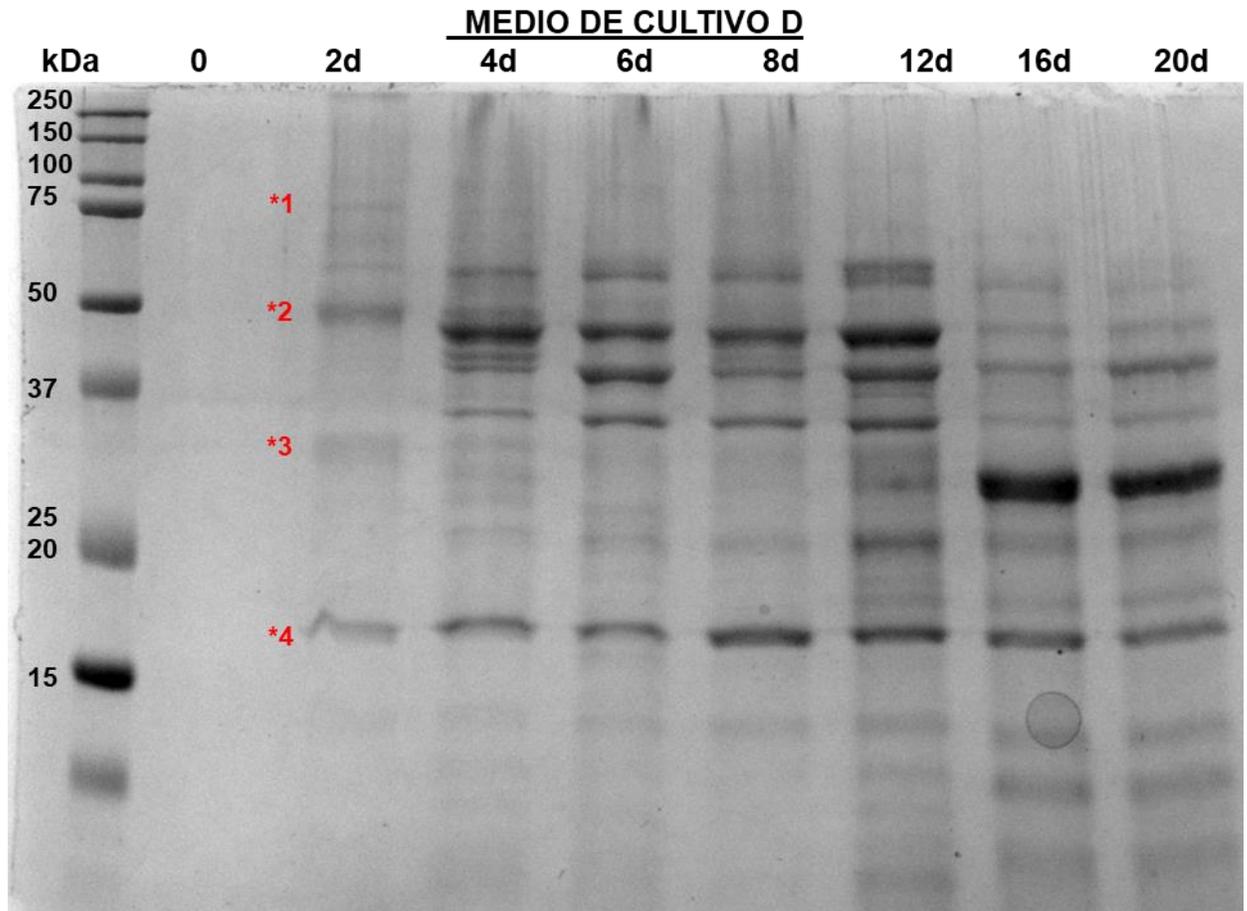


Figura 2-10. Perfil proteico del medio de cultivo D durante 20 días de fermentación para la producción de ME de *M. robertsii* Mt004

Viabilidad miceliogénica y conidiogénica de ME formados en el medio seleccionado

Los ME presentaron una germinación del 100% a las 48 horas de incubación, lo que fue evidenciado por la formación de hifas alrededor de la estructura (Figura 2.11). La producción de conidios fue de $6,02 \times 10^5$ conidios/ME, una concentración más alta que la obtenida con los ME jóvenes cosechados los 8 días de fermentación.



Figura 2-11. Germinación miceliogénica y conidiogénica de un microesclerocio rehidratado mediante inoculación en agar agua. (A) ME sin germinar, (B) ME germinado a las 48 horas de incubación, (C) ME esporulado después de 8 días de incubación.

2.4 Discusión

La identificación molecular de los diversos géneros de hongos entomopatógenos tiene un especial interés teniendo en cuenta su potencial para el desarrollo de bioplaguicidas. Específicamente, el género *Metarhizium* ha sido objeto reciente de una extensa revisión sistemática, lo que ha dado lugar a un gran número de cambios de nombre e introducción de nuevas especies (Mongkolsamrit et al., 2020). El acceso a métodos de secuenciación de alto procesamiento ha generado un crecimiento exponencial de información en las bases de datos públicas, lo cual permite la comparación de gran número de muestras agudizando los elementos de diferenciación. El uso de secuencias concatenadas de diferentes regiones genómicas, similar al realizado en este trabajo, permite un análisis más sensible para la determinación de especies, especialmente cuando están estrechamente relacionadas, lo cual permitió la identificación de la cepa Mt004 como *Metarhizium robertsii* con un alto valor predictivo.

La producción de microesclerocios en fermentación sumergida con la cepa de *M. robertsii* Mt004 fue inducida con todos los medios de cultivo evaluados, sin embargo, la relación C:N, las diferentes fuentes de nitrógeno y el tiempo de fermentación tuvieron un papel determinante en la morfogénesis y el rendimiento de los mismos.

Los máximos rendimientos de ME se obtuvieron en los medios de cultivo A y D, medios que contienen extracto de levadura dentro de su composición, el cual es una fuente de vitaminas del complejo B y aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, lisina, leucina y valina (Merck 2000). En la literatura se ha descrito que el ácido

glutámico, la alanina, y la leucina están involucrados en el crecimiento de células fúngicas, mientras que la lisina y el ácido aspártico favorecen la esporulación de *M. anisopliae* (Li y Holdom 1995). Adicionalmente el medio de cultivo A contiene peptona que proporciona una amplia gama de aminoácidos principalmente ácido glutámico, prolina, leucina, ácido aspártico y lisina (Merck 2000).

La fuente de nitrógeno en el medio de cultivo B fue caseína ácida hidrolizada (CAS), reconocida por permitir un rápido crecimiento de microorganismos, ya que contiene principalmente ácido glutámico, prolina, lisina, ácido aspártico, leucina y serina (Merck 2000), aminoácidos reportados como esenciales para el crecimiento y desarrollo de *Metarhizium* sp. (Li y Holdom 1995).

En el caso del medio de cultivo C, fue el único que incluyó una fuente de nitrógeno inorgánico (citrato de amonio), compuesto que en otro trabajo fue utilizado para optimizar la producción de ME en una cepa de *M. rileyi* (Song et al. 2014). Sin embargo, los hongos en su mayoría asimilan mejor las fuentes de nitrógeno orgánico que contienen una mezcla de aminoácidos que les permite llevar a cabo sus procesos de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos necesarios para buen funcionamiento celular y crecimiento rápido (Griffin, 1981). Generalmente, los medios de cultivo con fuentes de nitrógeno inorgánico deben ser suplementados con algunos aminoácidos como el ácido glutámico y el ácido aspártico que promueven procesos de transaminación a partir de estos (Griffin, 1981). En este sentido, los bajos rendimientos obtenidos en el presente trabajo con el medio C sugieren que el citrato de amonio no brinda los requerimientos de nitrógeno necesarios para inducir la formación de ME en la cepa Mt004. Este efecto del tipo de la fuente de nitrógeno en la formación de agregados fúngicos ha sido demostrado en otros trabajos como el del Bennett et al. (1979), quienes determinaron que el amonio no induce la formación de esclerocios en *Aspergillus flavus*, mientras que el nitrato sí induce su producción. Shearer y Jackson (2006) evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno para la producción de ME con una cepa de *Mycocleptodiscus terrestris*, aunque todos los sustratos afectaron significativamente la formación y producción de ME, la harina de semilla de algodón fue el sustrato con el que se obtuvo una mayor concentración de $1,5 \times 10^3$ ME/mL, en tanto que, con licor de maíz, extracto de levadura y CAS se produjeron $7,2 \times 10^2$, $4,5 \times 10^2$ y $1,5 \times 10^2$ ME/mL respectivamente. Las diferencias en los resultados obtenidos con diferentes especies fúngicas sugieren que la formación de esclerocios y microesclerocios, descrito como un

proceso de regulación compleja, es totalmente dependiente de los requerimientos nutricionales específicos de cada especie y cepa hongo (You-ping et al. 2012).

Los medios de cultivo A y D, que presentan las relaciones C:N mínima y máxima evaluadas correspondientes a 28:1 y 55:1 (Tabla 2.1b) respectivamente, alcanzaron los máximos rendimientos de microesclerocios después de 8 días de fermentación, mientras que con los medios de cultivo B y C que presentan relaciones C:N de 32:1 y 54:1 (Tabla 2.1b) respectivamente, se obtuvieron los menores rendimientos. Esto sugiere que el tipo de fuente de nitrógeno, que fue común en los medios A y D (extracto de levadura), fue determinante en la producción de ME, incluso más que la relación C:N, que ha sido descrita como un factor importante para la morfogénesis de estas estructuras (Jackson y Jaronski, 2009, Kobori et al., 2015)

Se ha descrito que la fuente de nitrógeno puede influenciar sobre diferentes características durante la formación de los microesclerocios, tales como la compactación, melanización y concentración de los mismos. Esto fue demostrado por Kobori et al (2015) donde evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno para la producción de ME a partir de una cepa de *T. harzianum*. En este estudio, ellos observaron que, cuando utilizaron harina de semilla de algodón, los ME obtenidos eran más oscuros y compactos, en comparación con los ME obtenidos utilizando CAS como fuente de nitrógeno. Por otro lado, cuando evaluaron el licor de maíz, el número de ME disminuyó considerablemente en comparación con las otras fuentes de nitrógeno evaluadas (Shearer y Jackson, 2006).

Los rendimientos de ME obtenidos en el presente trabajo con los medios de cultivo A y D estuvieron alrededor de 10^3 ME/mL, concentración que se alcanzó desde los 8 días de fermentación. Rendimientos similares fueron reportados por Lira et al. (2020), quienes evaluaron diferentes cepas de *Metarhizium* spp. en medios con relación C:N de 10:1. Dichos autores obtuvieron un rendimiento de $1,8 \times 10^3$ ME/mL con la cepa ESALQ2459 de *M. robertsii* después de 4 días de fermentación. Mascarin et al. (2014) obtuvieron rendimientos ligeramente superiores después de 5 días de fermentación utilizando un medio de cultivo que contenía glucosa y extracto de levadura en una relación de 50:1. En dicho estudio, la cepa CG632 de *M. robertsii* alcanzó un rendimiento de 7×10^3 ME/mL.

Mayores rendimientos, de hasta 2 unidades logarítmicas más, han sido reportados para otras especies de *Metarhizium* sp. como en el trabajo de Jackson y Jaronski (2009),

quienes obtuvieron rendimientos de 2,7 y 2,9 $\times 10^5$ ME/mL con la cepa de *M. anisopliae* F52 después de 8 días de fermentación en medios de cultivo compuestos de glucosa y caseína hidrolizada con una relación C:N de 30:1 y 50:1 respectivamente. En otro estudio, Song et al. (2014) obtuvieron una máxima producción de 2,1 $\times 10^5$ ME/mL con una cepa de *M. rileyi* en un medio optimizado que contenía 32 g de glucosa, 2 g de citrato de amonio y 0,15 g de sulfato ferroso. Con base en estos resultados se puede sugerir que el medio de cultivo y las condiciones de fermentación determinadas en el presente estudio deben ser optimizadas para mejorar los rendimientos y reducir el tiempo de fermentación.

La mayor acumulación de biomasa se obtuvo con los medios de cultivo A, B y D (17 a 21 g/L) con niveles similares a los obtenidos por Mascarin et al. (2014), Jackson y Jaronski (2009) y Jackson y Jaronski (2012), quienes obtuvieron concentraciones de biomasa entre 9 a 33 g/L con diferentes cepas de *Metarhizium* spp. Otros autores han reportado niveles de biomasa total superiores, como Rivas-Franco et al. (2020) que obtuvo entre 42 y 55 g/L con cepas de *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. novozealandicum* y *M. robertsii*.

En el presente estudio se observó que las bajas relaciones de C:N de los medios A y B favorecieron la formación de biomasa en la cepa Mt004 en comparación con los medios D y C, lo que sugiere que la concentración de la fuente nitrógeno y el balance de estos dos macronutrientes desempeñan un papel fundamental en el crecimiento del hongo, como lo determinaron previamente Jackson y Jaronski (2009) para *M. anisopliae*.

No obstante lo anterior, una alta acumulación de biomasa no asegura altos rendimientos de ME, lo que fue demostrado con el medio de cultivo B, el cual alcanzó una concentración de biomasa de 19,44 g/L y tan sólo una concentración de 1,72 $\times 10^2$ ME/mL, que es 10 veces menos que la obtenida con los medios de cultivo A y D. Varios autores han observado esta misma tendencia (Shearer y Jackson 2006; Jackson y Jaronski 2012; You-ping et al. 2012) que ha sido relacionada con altas concentraciones de carbono en el medio de cultivo, las cuales favorecen el crecimiento vegetativo de hifas y diversas formas de flóculos o gránulos de micelio (Brown, 1988, Issaly et al. 2005), pero no la formación de microesclerocios que requiere medios nutricionalmente pobres para que induzcan una condición de estrés nutricional.

La formación de otros propágulos fúngicos como las blastosporas también fue evidenciada durante la fermentación de la cepa Mt004 con todos los medios de cultivo. Estos

propágulos descritos como células levaduriformes que poseen una pared celular delgada y superficie hidrofílica, propiedades que le permiten desarrollarse en medios acuosos como la hemolinfa del insecto o medios de cultivos líquidos, fueron observados durante todo el proceso. En cultivos sumergidos se han reportado altas concentraciones de estos propágulos en tiempos muy cortos de fermentación con medios relativamente sencillos. Por ejemplo, Iwanicki et al. (2018) reportó una concentración de $3,6$ y $3,8 \times 10^8$ blastosporas/mL a los 4 días de fermentación con dos cepas de *M. robertsii* ESALQ1426 and ESALQ4130, Kleespies y Zimmermann (1992) produjeron $2,77 \times 10^8$ blastosporas/mL en 72 horas con una cepa de *M. anisopliae* 57. Issaly et al. (2005) produjeron $1,1 \times 10^9$ blastosporas/mL después de 6 días con una cepa de *M. flavoviride*.

La producción de blastosporas en fermentación líquida es más sencilla en comparación con la producción de conidios aéreos en fermentaciones sólidas, por lo cual estos propágulos han sido considerados como una alternativa para el control de insectos plaga. Sin embargo, la alta susceptibilidad a la radiación UV y cambios bruscos de temperatura, así como la limitada sobrevivencia en almacenamiento ha limitado su desarrollo como bioplaguicidas (Mascarin et al. 2018). Esta es una de las razones por la que se busca la producción de ME como alternativa para el desarrollo de bioinsumos.

En el presente trabajo se observó que las blastosporas aumentaron su concentración paulatinamente con el tiempo de fermentación, lo que ha sido evidenciado durante el proceso de formación de ME con varios hongos (Jackson y Jaronski 2009 y Rivas-Franco et al. 2020). Sin embargo, las concentraciones obtenidas en el presente trabajo (10^6 blastosporas/mL) fueron inferiores a las obtenidas por Rivas-Franco et al. (2020) con una cepa de *M. guizhouense* ($9,1 \times 10^8$ blastosporas/mL) y por Jackson y Jaronski (2009) con la cepa de *M. anisopliae* MA1200 ($1,6$ y $4,3 \times 10^8$ blastosporas/mL). Estas diferencias en la producción de blastosporas pueden estar relacionado con diferencias en las composiciones de los medios de cultivo y diferencias intrínsecas entre las cepas evaluadas (Rivas-Franco et al. 2020).

En el presente estudio, se evidenciaron cambios en el pH de los medios de cultivo evaluados que variaron entre 3,5 y 4,8, un rango favorable para la biogénesis de los ME (Georgiou et al. 2006; Raman y Muthukathan 2015). Se ha descrito que ambientes ácidos favorecen procesos de generación de radicales libres, peroxidación de lípidos y proteínas

y diferenciación celular que desencadenan el estrés oxidativo induciendo la formación esclerotial (Baker & Gebicki, 1984, Georgiou, 2006).

Durante el cultivo de la cepa Mt004, el contenido de proteína total aumentó en todos los medios de cultivo. Este comportamiento es opuesto al observado por Jackson y Schisler (1995) quienes evidenciaron un consumo total de los aminoácidos después de 3 días de fermentación, lo que estuvo asociado con la iniciación de la agregación hifal. Dicha agregación es la primera etapa en la formación de microesclerocios, ya que después de que éstas entran en contacto, tienden a adherirse y fusionarse de diferentes formas (Erental et al. 2008).

Si bien, los esclerocios son estructuras esencialmente latentes metabólicamente, se ha evidenciado que, durante las etapas tempranas de su morfogénesis, especialmente durante la fusión hifal se producen metabolitos que han demostrado tener actividad biológica (Calvo y Cary 2015), como es el caso de la ergolina producida por *Clavipalpus* sp., y la asparasona A y las aflatoxinas producidas por varias especies de *Aspergillus* spp. (Calvo y Cary 2015).

En este sentido, es probable que durante la formación de los microesclerocios producidos por Mt004, se produjeran y excretaran proteínas extracelulares. Es interesante notar que, con los medios de cultivo A, B y C, las proteínas expresadas aumentaron su concentración mientras que el medio de cultivo D, solo una de ellas se mantuvo constante y las demás disminuyeron su expresión, lo que se podría sugerir que las proteínas liberadas al medio de cultivo D probablemente están involucradas en el proceso de la formación de los microesclerocios, hipótesis que deberá ser confirmada en futuros estudios.

En hongos entomopatógenos, las proteínas extracelulares han demostrado tener actividad insecticida sobre diferentes insectos plaga, por ejemplo, las proteínas extracelulares producidas por una cepa de *M. anisopliae* tuvieron una eficacia entre 55 y 80% sobre *Ceratitis capitata* (Ortiz-Urquiza et al. 2009); la proteína Hirsutellina A producida por el hongo *Hirsutella thompsonii* causó una mortalidad del 100% sobre larvas de *Galleria mellonella* y larvas neonatas de *Aedes aegypti*; mientras la proteína Basiacridina, producida por el hongo *Beauveria bassiana*, alcanzó una mortalidad del 50% sobre ninfas de cuarto instar *Locusta migratoria*.

Los gránulos de ME producidos con todos los medios de cultivo evaluados presentaron 100% de viabilidad miceliogénica, coincidiendo con lo reportado en diferentes trabajos similares (Jackson y Jaronski 2009; Mascarín et al. 2014; Song et al. 2014; Kobori et al. 2015; Song et al. 2017; Lira et al. 2020; Rivas-Franco et al. 2020). Este resultado confirma que estas estructuras son capaces de sobrevivir al proceso de secado que generalmente afecta la viabilidad de otros propágulos fúngicos (Jackson et al. 2010; Jackson y Jaronski 2012; Mascarín et al. 2018).

Al estimar la germinación conidiogénica de los ME formados por la cepa Mt004 se determinó que cada ME es capaz de producir alrededor de 10^5 conidios. Según la literatura, la dosis de aplicación de conidios de *Metarhizium* spp. por hectárea está alrededor de 10^{12} a 10^{13} conidios (Lomer et al. 1993; Peng et al. 2008; Pilz et al. 2011; Ansari y Butt 2013). Con base en esta dosis y considerando que los ME aplicados en campo son capaces de germinar (bajo condiciones adecuadas de humedad) y de producir alrededor de $\sim 10^5$ conidios/ME, se podría sugerir que la dosis de aplicación requerida para estas estructuras es de aproximadamente 2×10^7 ME por hectárea. Esta menor necesidad de propágulos por unidad de área, sumado a la reducción en los costos de producción y formulación (tipo de fermentación, condiciones de mantenimiento y mano de obra, menor utilización de excipientes), se podría sugerir una mayor factibilidad técnica y económica, así como un mayor balance beneficio/costo en comparación con los bioinsecticidas a base de conidios.

En trabajos similares, se ha estimado la producción de conidios a partir de los gránulos de ME obtenidos después de su cosecha y formulación con tierra de diatomeas. Dichos resultados no indican necesariamente la producción de conidios por ME, ya que en cada gránulo puede haber varios ME además de otros propágulos como blastosporas e hifas. Los rendimientos reportados en la literatura para gránulos de ME están entre 10^8 y 10^9 conidios/g (Jackson y Jaronski 2009; Mascarín et al. 2014; Song et al. 2014; Kobori et al. 2015; Song et al. 2017; Villamizar et al. 2018; Lira et al. 2020; Rivas-Franco et al. 2020).

Las estructuras obtenidas en este trabajo después de 8 días de cultivo fueron poco pigmentadas, lo que podría estar relacionado con el consumo parcial de la glucosa del medio (75%) a este tiempo de fermentación. Cuando la fermentación se extendió, los ME se tornaron más pigmentados, lo que podría sugerir un proceso de melanización inducido por el agotamiento de las fuentes nutricionales, ya que la alta disponibilidad de

glucosa inhibe la activación de las rutas metabólicas asociadas con la síntesis de melanina, como lo reportó Jackson y Schisler (1995). Estos autores evidenciaron que el agotamiento de la glucosa suministrada a un medio de cultivo para la producción de ME con una cepa de *Colletotrichum truncatum* se asoció con la aparición de la melanización de los ME. Asimismo, ellos describieron que, cuando el consumo de la glucosa fue inhibido por una reducción en la aireación del medio, el proceso de melanización también fue inhibido.

Un factor importante durante la producción de los microesclerocios es el proceso de maduración que está muy asociado con melanización completa de las estructuras (Rivas-Franco et al. 2020). Se ha descrito que la melanina fúngica es un biopolímero hidrofóbico formado por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos los cuales pueden mitigar los efectos deletéreos de la luz ultravioleta, fluctuaciones de temperatura y humedad, radicales libres y metales pesados. La melanización en esclerocios ha sido asociado a una persistencia prolongada en el suelo y resistencia a la desecación en varios hongos filamentosos (Jackson y Jaronski 2012; Gessler et al. 2014; Kobori et al. 2015; Cordero y Casadevall 2017).

Existen algunas especies fúngicas constitutivamente melanizadas, mientras que otras especies solo desarrollan este pigmento bajo condiciones especiales de crecimiento en respuesta a las señales ambientales como fluctuaciones drásticas de temperatura, elevada exposición a radiación ultravioleta, alta presión osmótica, estrés oxidativo, baja actividad de agua y disponibilidad de nutrientes (Cordero y Casadevall 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior y basados en los reportes de Jackson y Jaronski (2012) y Rivas-Franco et al. (2020), quienes mencionan que procesos largos de fermentación incrementan la melanización de los microesclerocios, el tiempo de fermentación se extendió hasta los 20 días con todos los medios de cultivo. Con el medio de cultivo D se obtuvieron los ME más oscuros a dicho tiempo, cuando el consumo de glucosa fue casi total, corroborando lo sugerido anteriormente con respecto a la melanización. Sumado a esto, un alto rendimiento y la utilización de una única fuente de nitrógeno, permitieron seleccionar el medio de cultivo D para la producción de ME con la cepa de *M. robertsii* Mt004.

A pesar de que 20 días de fermentación se consideraría un periodo largo para este proceso de producción, es importante producir microesclerocios maduros que sean tolerantes a los

procesos de secado, formulación y a condiciones ambientales adversas (Jackson y Jaronski 2012; Rivas-Franco et al. 2020), lo que reitera la necesidad de optimizar las condiciones desarrolladas en el presente trabajo.

Los ME maduros recuperados después de 20 días fueron completamente viables y produjeron significativamente más conidios por ME que aquellos recuperados a los 8 días de fermentación, lo que sugiere que el consumo de casi la totalidad de la glucosa también pudo incrementar la acumulación de reservas energéticas dentro de la matriz extracelular del ME (Willettts y Bullock 1992), favoreciendo una germinación con alto vigor y una mayor esporulación. Se ha descrito que las reservas energéticas son acumuladas cuando las fuentes exógenas son abundantes y sirven como sustratos endógenos durante periodos de inanición. Asimismo, se ha evidenciado que, medios con alto contenido de carbono, así como, fuentes de carbono y nitrógeno apropiadas para cada especie fúngica producen un mayor número de conidios en comparación con medios con bajo contenido de carbono (Jackson y Jaronski 2009; Kobori et al. 2015).

El rendimiento obtenido con el medio de cultivo seleccionado estuvo en un rango de 10^3 ME/mL, inferior al reportado por la mayoría de los autores que han alcanzado concentraciones $>10^4$ ME/mL en tiempos más cortos de fermentación de entre 4 y 8 días (Jackson y Jaronski 2009; Jackson y Jaronski 2012; Kobori et al. 2015; Rivas-Franco et al. 2020). Sin embargo, este trabajo es la primera fase en el desarrollo de un sistema de producción de ME con la cepa Mt004 de *M. robertsii* y, por lo tanto, el medio como las condiciones de fermentación desarrolladas son susceptibles de optimización (Villamizar et al. 2018), y serán el objeto de trabajos posteriores.

Desde el punto de vista estructural, los microesclerocios tienen una estructura similar a los esclerocios difiriendo principalmente en su tamaño. En general, los microesclerocios son considerados como estructuras que tienen un tamaño inferior a $1000 \mu\text{m}$ (Smith et al. 2015) y para especies de *Metarhizium* spp. se han reportado tamaños entre 50 y $600 \mu\text{m}$ (Jackson y Jaronski 2009; Jackson y Jaronski 2012; Jackson y Payne 2016; Rivas-Franco et al. 2020). En el presente trabajo se observaron estructuras dentro de ese rango, pero también se observaron tamaños superiores incluso a $1000 \mu\text{m}$. Cabe destacar que el diámetro, el tamaño y la forma de los ME difiere entre especies fúngicas y depende de las condiciones durante su formación (Cotes 2018; Song 2018).

2.5 Conclusiones y recomendaciones

La cepa Mt004 fue identificada como *M. robertsii* y formó agregados miceliales compactos y completamente pigmentados con un rendimiento de $2,04 \times 10^3$ ME/mL después de 20 días de fermentación en un medio de cultivo con alta relación C:N (50:1). Las estructuras formadas presentaron tamaños entre 352 y 1752 μm y su estructura fue consistente con la descrita para los esclerocios, presentando un borde/capa exterior compacta y el interior con menor densidad celular. Todos los ME permanecieron viables después del proceso de secado y fueron capaces de producir alrededor de 10^5 conidios por ME después de germinar. Esto representa una ventaja económica en comparación con los bioplaguicidas a base de conidios, puesto que, bajo condiciones adecuadas, pueden multiplicarse y liberarse lentamente en campo garantizando una igual o mayor eficacia frente a insectos plagas. Las condiciones de fermentación (25°C, 200 rpm) y medio de cultivo seleccionado (Medio D) en el presente estudio para la producción de ME a partir de una cepa de *M. robertsii* son la base para una futura etapa de mejora y optimización del proceso, con miras al desarrollo de un bioplaguicida altamente estable, virulento y persistente en campo

2.6 Bibliografía

Ansari MA, Butt TM (2013) Influence of the application methods and doses on the susceptibility of black vine weevil larvae *Otiorhynchus sulcatus* to *Metarhizium anisopliae* in field-grown strawberries. *BioControl* 58(2):257-267. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9491-x>

Baard SW, Van Wyk PWJ, Pauer GDC (1981) Structure and lysis of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 77(2):251-260. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(81\)80027-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(81)80027-7)

Bennett JW, Horowitz PC, Lee LS (1979) Production of Sclerotia by Aflatoxigenic and Nonaflatoxigenic Strains of *Aspergillus Flavus* and *A. Parasiticus*. *Mycologia* 71(2):415-422. <https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021019>

Beys-da-Silva WO, Rosa RL, Berger M, Coutinho-Rodrigues CJB, Vainstein MH, Schrank A, Bittencourt VREP, Santi L (2020) Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to

control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 208(October 2019):107812. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>

Bullock S, Ashford AE, Willetts HJ (1980) The structure and histochemistry of sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger - II. Histochemistry of extracellular substances and cytoplasmic reserves. *Protoplasma* 104(3-4):333-351. <https://doi.org/10.1007/BF01279777>

Calvo AM, Cary JW (2015) Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Frontiers in Microbiology* 6(FEB):1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00062>

Cheng XH, Guo SX, Wang CL (2006) Factors influencing formation of Sclerotia in *Grifola umbellata* (Pers.) Pilát under artificial conditions. *Journal of Integrative Plant Biology* 48(11):1312-1317. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00349.x>

Choi K-D, Kwon J-K, Shim JO, Lee S-S, Lee T-S, Lee MW (2002) Sclerotial Development of *Grifola umbellata*. *Mycobiology* 30(2):65. <https://doi.org/10.4489/myco.2002.30.2.065>

Cordero RJB, Casadevall A (2017) Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews* 31(2):99-112. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.003>

Cotes A. M. (Ed.). (2018). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros (Vol. 1 y Vol 2). Primera, ed. Agrosavia editorial, Mosquera, Cundinamarca, Colombia, pp. 928-930.

Erental A, Dickman MB, Yarden O (2008) Sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*: awakening molecular analysis of a dormant structure. *Fungal Biology Reviews* 22(1):6-16. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.10.001>

Fan R, Klosterman SJ, Wang C, Subbarao K V., Xu X, Shang W, Hu X (2017) Vayg1 is required for microsclerotium formation and melanin production in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* 98:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.11.003>

Georgiou CD, Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G (2006) Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 46(6):691-712. <https://doi.org/10.1093/icb/icj034>

Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA (2014) Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 50(2):105-113. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020094>

Griffin (1981) Fungal physiology. A while-intercience publication., USA. New York. pp 102-227,260-279.

Griffiths DA (1970) The fine structure of developing microsclerotia of *Verticillium dahliae* Kleb. Archiv für Mikrobiologie 74(3):207-212. <https://doi.org/10.1007/BF00408881>

He P, Wang K, Cai Y, Hu X, Zheng Y, Zhang J, Liu W (2018) Involvement of autophagy and apoptosis and lipid accumulation in sclerotial morphogenesis of *Morchella importuna*. Micron 109(March):34-40. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.03.005>

Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Fargues J, Durand A (2005) Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. Process Biochemistry 40(3-4):1425-1431. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.029>

Iwanicki NSA, Ferreira B de O, Mascarin GM, Júnior ÍD (2018) Modified Adamek's medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae. Fungal Biology 122(9):883-890. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.05.004>

Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. BioControl 55(1):129-145. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y>

Jackson MA, Jaronski ST (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. Mycological Research 113(8):842-850. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>

Jackson MA, Jaronski ST (2012) Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. Biocontrol Science and Technology 22(8):915-930. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.696578>

Jackson MA, Payne AR (2016) Liquid Culture Production of Fungal Microsclerotia. En: Glare TR, Moran-Diez MS (eds) Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, New York, pp 71-83

Jackson MA, Schisler DA (1992) The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied and Environmental Microbiology* 58(7):2260-2265

Jackson MA, Schisler DA (1995) Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicide propagules. *Mycological Research* 99(7):879-884. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80745-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80745-4)

Jaronski ST, Jackson MA (2008) Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology* 18(8):849-863. <https://doi.org/10.1080/09583150802381144>

Kleespies RG, Zimmermann G (1992) Production of Blastospores by Three Strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in Submerged Culture. *Biocontrol Science and Technology* 2(2):127-135. <https://doi.org/10.1080/09583159209355226>

Kobori NN, Mascarin GM, Jackson MA, Schisler DA (2015) Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* 119(4):179-190. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>

Li D., Holdom D. (1995) Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 65:235-260

Lira AC de, Mascarin GM, Delalibera Júnior Í (2020) Microsclerotia production of *Metarhizium* spp. for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda* through corn seed coating. *Fungal Biology* 124(8):689-699. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.011>

Lomer CJ, Bateman R, Godonou I, Kpindou D, Shah P., Paraiso A, Prior C (1993) Field Infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology* 3(3):337-346

Mascarin GM, Kobori NN, de Jesus Vital RC, Jackson MA, Quintela ED (2014) Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture

fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(5):1583-1590. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1581-0>

Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Í, Fernandes ÉKK, Luz C, Faria M (2019) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 165(August 2017):46-53. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>

Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Í, Fernandes ÉKK, Luz C, Faria M (2018) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* (August 2017):0-1. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>

Merck (2000) Merck Microbiology Manual. Disponible en: http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/MERCK_Manual_de_microbiologia_12a_edicion.pdf.

Patel TK (2020) Chapter 29: *Metarhizium*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology. 593-610. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00029-0>

Peng G, Wang Z, Yin Y, Zeng D, Xia Y (2008) Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop Protection* 27(9):1244-1250. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.03.007>

Pilz C, Enkerli J, Wegensteiner R, Keller S (2011) Establishment and persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in maize fields. *Journal of Applied Entomology* 135(6):393-403. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01566.x>

Raman T, Muthukathan G (2015) Field suppression of *Fusarium* wilt disease in banana by the combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates possessing multiple functions. *Phytopathologia Mediterranea* 54(2):241-252. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>

Rivas-Franco F, Hampton JG, Altier NA, Swaminathan J, Rostás M, Wessman P, Saville DJ, Jackson TA, Jackson MA, Glare TR (2020) Production of Microsclerotia From Entomopathogenic Fungi and Use in Maize Seed Coating as Delivery for Biocontrol Against

Fusarium graminearum. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4(December):1-13. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.606828>

Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56(7):1267-1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>

Shearer JF, Jackson MA (2006) Liquid culturing of microsclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla. *Biological Control* 38(3):298-306. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.04.012>

Smith ME, Henkel TW, Rollins JA (2015) How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecology* 13(December 2018):211-220. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.010>

Song Z (2018) Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors, and molecular mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(23):9873-9880. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9400-z>

Song Z, Lin Y, Du F, Yin Y, Wang Z (2017) Statistical optimisation of process variables and large-scale production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycetes: Hypocreales) microsclerotia in submerged fermentation. *Mycology* 8(1):39-47. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1279688>

Song Z, Yin Y, Jiang S, Liu J, Chen H, Wang Z (2013a) Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. *BMC Genomics* 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-411>

Song Z, Yin Y, Jiang S, Liu J, Wang Z (2014) Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. *BioControl* 59(5):597-605. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9589-4>

Villamizar LF, Barrera G, Marshall SDG, Richena M, Harland D, Jackson TA (2020) Three-dimensional cellular aggregates formed by *Beauveria pseudobassiana* in liquid culture with potential for use as a biocontrol agent of the African black beetle (*Heteronychus arator*). *Mycology* 00(00):1-14. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1754953>

Villamizar LF, Nelson TL, Jones SA, Jackson TA, Hurst MRH, Marshall SDG (2018) Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a

prototype granular formulation. *Biocontrol Science and Technology* 28(12):1097-1113. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1514584>

Wang J, Lovett B, St. Leger RJ (2019) The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi. *Fungal Ecology* 38:7-11. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.04.001>

Willetts HJ, Bullock S (1992) Developmental biology of sclerotia. *Mycological Research* 96(10):801-816. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81027-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81027-7)

Wyllie TD (1970) Ultrastructural Formation of Sclerotia of *Macrophomina phaseoli*. *Phytopathology* 60:524

Xing XK, Guo SX (2008) The structure and histochemistry of sclerotia of *Ophiocordyceps sinensis*. *Mycologia* 100(4):616-625. <https://doi.org/10.3852/07-007R2>

You-ping YIN, Shan H, Zhang-yong S, Zhong-kang W (2012) Microsclerotia Artificial Inductions of *Nomuraea rileyi* CQNr01. *Scientia Agricultura Sinica* 45(23):4801-4807. <https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2012.23.006>

3. Capítulo 3: Caracterización estructural, fisiológica, química y biológica de los microesclerocios producidos por *Metarhizium robertsii* Mt004 en fermentación sumergida

Resumen

Los microesclerocios (ME) son estructuras de resistencia cuya formación puede ser artificialmente inducida en algunos hongos entomopatógenos utilizando fermentación sumergida. Estas estructuras son tolerantes a condiciones ambientales de estrés, sobreviven largos periodos de almacenamiento y son capaces de producir conidios infectivos para diferentes especies de insectos, por lo que pueden ser usados en formulaciones de bioinsecticidas. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los ME producidos en medio D seleccionado en capítulo anterior y cosechados después de 20 días de fermentación. Para tal fin se estudió la ultraestructura de los propágulos y la acumulación de los solutos intracelulares manitol y trehalosa. También se estudió la tolerancia de los ME a la radiación ultravioleta UV-B, la temperatura y el almacenamiento y se determinó la actividad insecticida de los conidios producidos por los ME sobre larvas de *Diatraea saccharalis*.

El análisis ultraestructural mostró que la superficie de los ME maduros está completamente cubierta por un material gelatinoso conocido como matriz extracelular. También se identificó la zona interna de la estructura caracterizada por una baja densidad de células sueltas y viables embebidas en la matriz extracelular, cuya densidad aumenta hacia la superficie del ME, zona donde se observan más células y algunas hifas entrelazadas. El análisis composicional no detectó la presencia de trehalosa, pero detectó presencia de

manitol y los resultados sugieren también la presencia de otros azúcares y carbohidratos que podrían hacer parte de la matriz extracelular.

En general, los ME fueron más tolerantes que los conidios cuando fueron expuestos a la luz ultravioleta, manteniendo una germinación del 88% después de 4 horas de exposición a radiación UVB equivalente a una dosis de 50,44 kJ/m². Los conidios no sobrevivieron después de una hora de irradiación, lo que fue evidenciado por una pérdida total de la capacidad para germinar. Con respecto a la termotolerancia de los propágulos, ambos mantuvieron una germinación superior al 84% cuando fueron expuestos a 30 y 40°C por 3 horas. A 50°C, los ME mantuvieron un 84% de germinación, mientras los conidios fueron negativamente afectados reduciendo su viabilidad al 58%.

Los ME mantuvieron su germinación (miceliogénica y conidiogénica) durante 6 meses de almacenamiento a 8°C; y mostraron una reducción progresiva de su viabilidad a través del tiempo cuando fueron almacenados a 18 y 28°C, con germinaciones finales del 24% y 9,33% respectivamente. Los conidios fueron más inestables y perdieron completamente su capacidad de germinar después de 2 meses de almacenamiento a las diferentes temperaturas evaluadas.

Los conidios producidos por los ME germinados fueron patogénicos para las larvas de *D. saccharalis* alcanzando un 77,99% de eficacia en un bioensayo bajo condiciones de laboratorio, resultado similar al obtenido con conidios producidos por el método tradicional de fermentación sólida (84,23%). En general, los ME demostraron ser más tolerantes a condiciones de estrés ambiental que los conidios obtenidos de fermentación sólida y fueron capaces de producir propágulos igualmente infectivos que éstos, resultados que demuestran su potencial para ser utilizados como principio activo de un bioinsecticida.

3.1 Introducción

El desarrollo de los bioinsecticidas basado en hongos entomopatógenos es un proceso complejo que implica la evaluación del potencial del microorganismo para producir un propágulo estable, económicamente viable y, lo más importante, que sea altamente

infectivo bajo las condiciones donde se encuentre el hospedero a controlar (Jackson et al. 2010; Mascarín et al. 2018).

Sin embargo, factores ambientales como la radiación solar, altas temperaturas y baja humedad¹ pueden afectar el desempeño ecofisiológico de los hongos y limitar su habilidad biocontroladora (Corval et al. 2021). La luz solar (especialmente la radiación UV-B) es uno de los factores más limitantes para la viabilidad de los microorganismos en campo, la cual puede retrasar su germinación y desarrollo, disminuir su persistencia y la eficacia en campo (Braga et al. 2006; Fernandes et al. 2015; Corval et al. 2021). La absorción de la radiación por el ADN afecta principalmente la dimerización entre las bases de pirimidina adyacentes (Braga et al. 2006; Braga et al. 2015). La temperatura también puede causar daños en el ADN generando la pérdida de bases nitrogenadas conduciendo a la depuración (Li y Feng 2009).

Metarhizium spp. es un hongo entomopatógeno ampliamente estudiado por su potencial biocontrolador sobre numerosas especies de insectos plaga. Este microorganismo es capaz de producir al menos tres tipos de propágulos infectivos bajo condiciones naturales y/o artificiales (Corval et al. 2021), siendo los conidios, los propágulos más comúnmente utilizados como principio activo en la mayoría de bioinsecticidas debido a su alta infectividad y fácil producción en fermentación sólida (Jackson et al. 2010; Mascarín et al. 2018). Este sistema de producción es sencillo, y se realiza principalmente en bolsas con sustrato humedecido y esterilizado, pero exige una intensa labor de ejecución, demanda gran cantidad de mano de obra, e incubación por largos periodos de tiempo que se traducen en altos costos de producción (Jackson et al. 2010; Villamizar et al. 2020). Los conidios pueden ser drásticamente afectados por condiciones de estrés ambiental cuando son aplicados en el campo, y pueden presentar algunos problemas de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento. Para superar estas dificultades se ha recurrido a estrategias como el incremento de las reservas endógenas durante la fermentación (Mejía et al. 2020); la optimización de la formulación; la adición de coadyuvantes durante la aplicación; el mejoramiento genético o la búsqueda de otros propágulos alternativos (Jackson et al. 2010; Song et al. 2016).

¹ Esta condición no fue evaluada directamente en este trabajo, sin embargo, los ME fueron secados hasta reducir su humedad al 5% para estudios de estabilidad en almacenamiento.

Los microesclerocios son estructuras de resistencia formadas bajo condiciones de estrés nutricional y ambiental producidas naturalmente por algunos hongos, incluyendo fitopatógenos, como *Verticillium* sp. (Baard et al. 1981), *Botrytis* sp. (Gomez-Miranda y Leal 1979), *Rhizoctonia* sp. (Wang et al. 2018), y *Sclerotinia* sp. (Colotelo et al. 1971). También pueden ser inducidos de manera artificial en hongos entomopatógenos como *Metarhizium* sp. (Jackson y Jaronski 2009) y *Beauveria* sp. (Villamizar et al. 2018) utilizando fermentación sumergida.

Los ME de varios hongos han demostrado potencial para ser utilizados como ingrediente activo de bioproductos como por ejemplo *Purpureocillium lilacinum* (Song et al. 2016), *M. rileyi* (Song et al. 2014), *Trichoderma harzianum* (Kobori et al. 2015), *M. anisopliae* (Jackson y Jaronski 2009), *M. brunneum* (Jackson y Jaronski 2012) y *B. pseudobassiana* (Villamizar et al. 2020). Algunos autores sugieren que la resistencia de los ME se deriva de la melanización de dichas estructuras y su compactación (Willets y Bullock 1992; Song 2018; Rivas-Franco et al. 2020). La melanina fúngica está involucrada en la virulencia, tolerancia a estrés oxidativo, a la luz UV y a las enzimas hidrolíticas, así como a la resistencia a agentes antifúngicos (Belozerskaya et al, 2015). Por otro lado, se ha evidenciado que la presencia de polioles y trehalosa favorecen la estabilidad de la célula, y favorecen su germinación cuando las condiciones son favorables para su desarrollo (Wang y le Tourneau 1971; Willets y Bullock 1992; Dunlap et al. 2011).

En este capítulo, se buscó determinar el potencial de los ME formados por *M. robertsii* Mt004 para el desarrollo de un bioplaguicida. Así, se estudió su termotolerancia, estabilidad en almacenamiento y susceptibilidad a la radiación ultravioleta; así como su capacidad para producir conidios con actividad insecticida, y el contenido de reservas endógenas (manitol y trehalosa).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 General

Para los medios de cultivo se utilizaron Glucosa (Merck), Extracto de levadura (Scharlau), Caseína acida hidrolizada (Merck), Citrato de amonio (Scharlau), Peptona (Merck),

KH_2PO_4 (Sigma Aldrich), CaCl_2 (Sigma), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (Merck), MgSO_4 (Merck) CoCl_2 (Merck), MnSO_4 (Merck), ZnSO_4 (Roda Química Ltda), Tween 80 (Merck), PDA (Oxoid), Agar Bacteriológico (Merck).

Los equipos utilizados en este capítulo fueron un microscopio ZEISS Axio, estereoscopio ZEISS Stemi 508, potenciómetro Mettler Toledo S220 (SevenCompact™), un agitador orbital MaxQ™ 4000 (Thermo Fisher Scientific), una centrifuga Biofuge *stratos* SORVALL, un Vacufuge® plus Eppendorf, Balanza analítica Kern ABS 220-4N, balanza de humedad Precisa® XM60, lámpara monocromática UVP® 95-0343-01 3UV™ Modelo 3UV-38 Handheld UV Lamp, una cabina de flujo laminar BIOBASE.

3.2.2 Microorganismo y medio de cultivo

El microorganismo utilizado fue la cepa de *M. robertsii* codificada como Mt004 proveniente de Rionegro (Antioquia), aislada de *A. scarabaeoides* Erichson (Coleóptera: Melolonthidae) y conservada a -80°C en la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Agrosavia. La cepa fue reactivada y cultivada en agar papa-dextrosa (PDA) suplementado con 0,1% de cloranfenicol e incubada durante 7 días a 25°C .

3.2.3 Producción de microesclerocios y conidios de la cepa *M. robertsii* Mt004

La producción de ME se realizó en Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio de cultivo denominado D con la siguiente composición (por Litro): Glucosa 36 g; extracto de levadura 3.6 g; KH_2PO_4 4.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.016 g; y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.014 g. El inóculo se preparó a partir de cultivos esporulados en agar de 10 días de edad que fueron lavados superficialmente con una solución de Tween 80 al 0,5%. La suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^8 conidios/mL mediante recuento en cámara de Neubauer, y posteriormente se utilizó para inocular los Erlenmeyers que contenía medio de cultivo D. que se ajustaron a una concentración inicial de 1×10^6 conidios/mL. Se utilizaron tres unidades experimentales (Erlenmeyers) por tratamiento, que fueron incubados en un agitador orbital MaxQ™ 4000 (Thermo Fisher Scientific) a 200 rpm y 25°C durante 20 días.

La producción de conidios se realizó mediante fermentación sólida en medio arroz siguiendo la metodología descrita por Villamizar y Cotes (2003) con algunas modificaciones. Se utilizaron bandejas de aluminio (10,5 cm x 17,5 cm) en las que se colocaron 100 g de arroz y 80 mL de agua, posteriormente el sustrato fue homogenizado con ayuda de una espátula estéril, y esterilizado a 121 °C, 15 psi durante 30 minutos. Luego de su esterilización, cada bandeja fue inoculada con 10 mL de una suspensión de conidios ajustado a una concentración de 1×10^7 conidios/mL, y posteriormente fueron selladas con una película plástica. Las bandejas fueron incubadas a 25°C durante 15 días con luz constante. Una vez finalizado el tiempo de fermentación, los conidios fueron recuperados mediante lavado del arroz esporulado con solución de Tween 80 al 0,1%.

3.2.4 Análisis ultraestructural de los microesclerocios mediante microscopía electrónica

3.2.4.1 Microscopía electrónica de transmisión

Los microesclerocios producidos en medio D fueron colectados a los 4, 8, 16 y 20 días de fermentación. Las estructuras se lavaron con agua destilada estéril y se fijaron con Glutaraldehído 2,5% preparado en buffer fosfato (pH 7,4) por 12 horas a 4°C. Posteriormente se realizó una post fijación con tetraóxido de osmio (1%) y deshidratación con concentraciones ascendentes de etanol (50, 70, 80, 90, 99, 100%). Las muestras fueron incluidas en resina acrílica LR White (London Resin Company, Reading, U.K.) mediante polimerización a 60°C. Los bloques se cortaron en secciones ultradelgadas (40 nm) y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Villamizar et al. 2020). Las muestras fueron observadas en microscopio electrónico electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 plus.

3.2.4.2 Microscopía electrónica de barrido

Los microesclerocios colectados a los 4, 8, 16 y 20 días de fermentación fueron fijados con glutaraldehído 2,5% (pH 7.4) y deshidratados con etanol en concentraciones ascendentes. Las muestras se recubrieron con oro coloidal y se observaron en microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM 6490-LV (Villamizar et al, 2020).

3.2.5 Tolerancia a la radiación ultravioleta

Para este experimento se utilizó una lámpara monocromática UVP® 95-0343-01 3UV™ Modelo 3UV-38 Handheld UV Lamp, con potencia de 8-watt y una longitud de onda de 302 nm, la cual se ubicó a una distancia aproximada de 20 cm de las muestras. Cincuenta ME, (previamente separados del medio del cultivo y lavados con agua estéril y que producen alrededor de 1×10^6 conidios/mL) se ubicaron en 15 cajas de Petri con agar-agua (Por litro: 18 g agar bacteriológico) y las cajas abiertas se expusieron a radiación UV por diferentes periodos de tiempo correspondientes a 0, 1 (12,61 kJ/m² equivalente a 7 días de radiación solar directa), 2 (25,55 kJ/m² equivalente a 15 días de radiación solar directa), 3 (37,83 kJ/m² equivalente a 22 días de radiación solar directa) y 4 horas (50,44 kJ/m² equivalente a 30 días de radiación solar directa) de exposición (Figura 3-1). Pasado cada uno de estos tiempos, tres cajas fueron retiradas y fueron cubiertas con la tapa y papel aluminio para terminar la irradiación. Como control se utilizaron conidios del hongo producidos en arroz, con los cuales se preparó una suspensión ajustada a 1×10^7 conidios/mL, la cual se inoculó en 15 cajas de Petri con agar-agua suplementado con 0,1% de extracto de malta y 0,00005% de Benomil (100 µL/caja), tres por cada tiempo de irradiación.



Figura 3-1. Montaje de exposición a radiación ultravioleta en condiciones de laboratorio.

Terminada la irradiación, todas las cajas fueron incubadas a 25°C durante 48 horas. La germinación miceliogénica definida como el crecimiento hifal se determinó mediante

observación al estereoscopio. La germinación conidiogénica, definida como la producción de conidios a partir de los ME, se evaluó después de 7 días de incubación a 25°C. Para tal fin, se adicionó un volumen determinado de Tween 80 al 0,1% en cada caja y se lavó la superficie con ayuda de un rastrillo. El líquido se recuperó y el volumen fue medido con una pipeta. Se realizaron diluciones seriadas a partir de esta suspensión y se cuantificó la concentración de conidios en cámara de Neubauer. El experimento contó con dos repeticiones en el tiempo y cada variable fue determinada por triplicado.

La producción de conidios fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\text{Producción de conidios: } \frac{\text{conidios totales}}{\text{MS viables}} \times 100$$

La germinación de los conidios se determinó siguiendo la metodología descrita por Grijalba (2018). Para tal fin, terminada la incubación se adicionó una gota de azul de lactofenol sobre la superficie del agar y se realizó el conteo de los conidios germinados y no germinados en un microscopio óptico a 40x. El experimento contó con dos repeticiones en el tiempo, cuyas muestras correspondieron a diferentes lotes de fermentación.

3.2.6 Tolerancia a la temperatura

Cincuenta ME se ubicaron en 12 cajas de Petri con agar-agua y las cajas abiertas fueron expuestas a 30°C, 40°C y 50°C, y cada hora, durante tres horas, se retiraron 3 cajas de cada temperatura por tratamiento. Como control se utilizaron conidios del hongo producidos en arroz, con los cuales se preparó una suspensión ajustada a 1×10^7 conidios/mL, con la cual se inocularon 12 cajas de Petri con agar-agua (100 μ L/caja) por temperatura. Una vez finalizado el tiempo de exposición, las cajas se incubaron por 48 horas a 25°C. La germinación de los propágulos fue evaluada siguiendo las metodologías descritas en el numeral anterior. El experimento contó con dos repeticiones en el tiempo, cuyas muestras correspondieron a diferentes lotes de fermentación.

3.2.7 Estabilidad en almacenamiento

La sobrevivencia de los propágulos bajo condiciones de almacenamiento se determinó siguiendo la metodología descrita por Villamizar *et al.* (2018). Terminada la fermentación, 5 gramos de tierra de diatomeas (TD) fueron agregados a cada erlenmeyer, que contenían 100 mL de medio de cultivo, y se agitó vigorosamente. Posteriormente, la mezcla se filtró al vacío con un embudo Buchner a través de papel filtro Whatman No.1. La torta resultante fue granulada a través de una malla con tamaño de poro de 1 mm, y los gránulos se colocaron en cajas de Petri para ser secados toda la noche a 22°C dentro de una cabina de flujo laminar. Una vez finalizado el tiempo de secado se midió la humedad en una balanza Precisa® XM60.

Muestras de 250 mg de los conidios y de los microesclerocios se almacenaron en tubos Eppendorf® (2 mL) a 4°C, 18°C y 28°C durante 6 meses. Cada dos meses se tomaron 3 muestras por cada tratamiento y se determinó la germinación miceliogénica y conidiogénica siguiendo la metodología descrita en el numeral 3.2.3.1.

3.2.8 Caracterización biológica (actividad insecticida)

3.2.8.1 Obtención de insectos

Los experimentos se llevaron a cabo con larvas de segundo ínstar de *Diatraea saccharalis* de segunda generación (F2) provenientes de la colonia mantenida en la Unidad de Crías de Insectos de AGROSAVIA ubicada en Mosquera, Cundinamarca (Colombia), que se estableció con larvas donadas por Cenicaña (Centro Colombiano de Investigación de la caña de azúcar). La cría fue mantenida en condiciones de temperatura de 25±5°C con una humedad relativa de 60 ± 10% y un fotoperíodo de 16 h de luz: 8 h de oscuridad. Las larvas fueron alimentadas con la dieta artificial descrita por Lastra y Gómez (2006).

3.2.8.2 Determinación de la actividad insecticida de los conidios producidos por los microesclerocios de *M. robertsii* Mt004 sobre larvas de *D. saccharalis* bajo condiciones de laboratorio

Muestras de 250 mg de gránulos de ME se mezclaron con 1 mL de Tween 80 al 0,1% y la suspensión obtenida se inoculó (100 µL) en cinco cajas de Petri con agar-agua que se incubaron durante 7 días a 25°C. Pasado este tiempo, los conidios producidos en cada caja se recuperaron mediante lavado de la superficie con 10 mL de Tween 80 al 0,1%. La suspensión obtenida fue cuantificada en cámara de Neubauer y utilizada para preparar diluciones seriadas con cinco concentraciones correspondientes a 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3 conidios/mL.

Para el bioensayo se siguió la metodología descrita por Torres et al (2020) con algunas modificaciones. Para la inoculación se utilizó la técnica de inmersión, para lo cual tres grupos de 10 larvas de segundo instar (6 días) de *D. saccharalis* fueron sumergidos durante 20 segundos en 10 mL de cada una de las suspensiones de conidios mencionadas anteriormente. Después las larvas fueron recuperadas y ubicadas individualmente en vasos de plástico de media onza que contenían un grano de maíz. Los vasos se ubicaron en grupos de 10 en cajas Selloplus® de 700 mL (unidad experimental) para un total de tres cajas por tratamiento (triplicado). Las cajas se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y 70% de HR. Se contó con un testigo absoluto en el cual las larvas no fueron sometidas a ningún tratamiento. La mortalidad se evaluó cada dos días hasta que todos los individuos murieron o pasaron al estado de pupa y los resultados fueron sometidos a un análisis Probit con el programa POLO Plus 2.0 (LeOra Software) para determinar las concentraciones letales (POLO Plus 2.0). Las larvas muertas se ubicaron en cámara húmeda a 25°C durante siete días para evidenciar los síntomas de la infección fúngica.

3.2.9 Caracterización Química

3.2.9.1 Obtención de microesclerocios libres de micelio

Terminada la fermentación para producir ME (3.2.3), 10 mL del caldo de cultivo fueron diluidos en 100 mL de Tween 80 al 0,1%. Enseguida la suspensión se agitó

vigorosamente en vortex durante 1 minuto, y se filtró a través de un tamiz con tamaño de poro de 150 μm . La muestra se dejó en reposo durante 10 min. Se recuperó el pellet y nuevamente se repitió el procedimiento anterior pasando la muestra a través de un tamiz con tamaño de poro de 75 μm , la muestra obtenida fue observada en el estereoscopio con el fin de confirmar que los ME estaban libres de micelio y éstos se secaron durante 24 horas a 40°C.

3.2.9.2 Obtención del extracto intracelular de los microesclerocios

Los ME libres de micelio (50 mg) fueron suspendidos en 1 mL de agua ultrapura y fueron agitados con un vortex a máxima velocidad durante 10 minutos y almacenados a -80°C durante 24 horas. Posteriormente las muestras se descongelaron y se sonicaron en un sonicador Omni Sonic Ruptor® durante 360 segundos a una amplitud de 60 μm (este proceso se repitió dos veces). Una vez las muestras fueron sonicadas, éstas se sumergieron en un baño de agua hirviendo (80°C aprox. en Bogotá) por 6 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 20 minutos a 0°C para retirar residuos celulares y finalmente se filtraron a través de un filtro de 0,2 μm .

3.2.9.3 Análisis de reservas endógenas de los microesclerocios

La cuantificación de manitol intracelular se realizó con el Kit colorimétrico D- Mannitol (MAK096, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). La cuantificación de trehalosa se realizó siguiendo la metodología de Puttikamonkul et al. (2010) con modificaciones. Inicialmente se tomaron 100 μL del extracto libre de células y se adicionaron 100 μL de citrato de sodio 0,2 M y pH 5.5 (concentración final 0,1 M) con 10 mU de enzima trehalasa porcina pura (Sigma). Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, posteriormente fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos y se cuantificó la concentración de azúcares reductores mediante la técnica de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). La misma reacción sin trehalasa fue usada para determinar el nivel basal de azúcares reductores presentes en cada reacción (Figura 3-3).

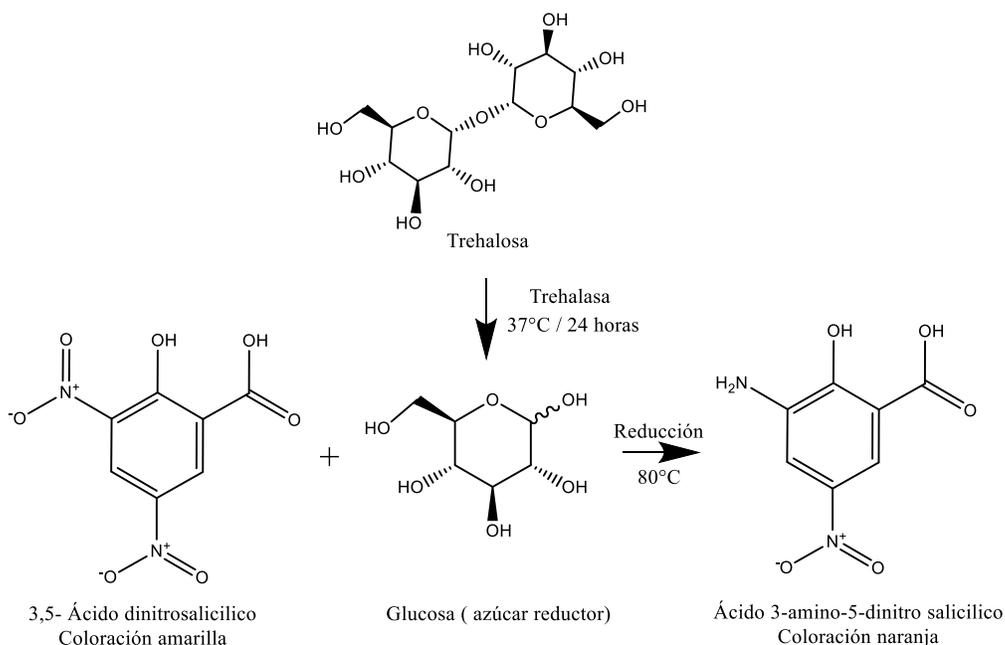


Figura 3-2. Reacción de DNS en presencia de trehalosa

La concentración de trehalosa fue calculada como la diferencia entre la concentración de azúcares reductores presentes en el extracto sin trehalosa y la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra tratada con trehalosa (Puttikamonkul et al. 2010) Previamente se estandarizaron curvas de calibración para cada uno de los carbohidratos empleados.

La presencia de trehalosa y manitol fue confirmada mediante resonancia magnética nuclear (RMN ^1H) como sigue: el extracto intracelular fue liofilizado en un liofilizador PowerDry PL9000 Thermo Scientific® (4 mg), y posteriormente suspendido en 600 μL de agua deuterada. Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro Bruker de 400 MHz equipado con una consola Avance NEO 400 ubicado en la Universidad Nacional de Colombia.

3.2.10 Análisis estadístico

Para los diferentes experimentos, la normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk (95%) y la homocedasticidad se determinó mediante una prueba de Barlett (95%); cumplidos estos principios se realizó un análisis de varianza ANOVA (95%) y una comparación de medias de Tukey. Para los datos que no cumplieran estos principios se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (95%) utilizando el programa estadístico Statistix (8.1). Para los experimentos de germinación se realizaron comparaciones con el tiempo inicial mediante la prueba *t-student one sample* (95%), siendo la $H_0 = 0$ y la $H_A > 0$.

3.3 Resultados

3.3.1 Análisis ultraestructural de los microesclerocios mediante microscopía electrónica

La estructura de los ME durante su morfogénesis fue estudiada mediante microscopía de barrido (MEB) y transmisión (MET) mediante inclusión en resina acrílica. Las micrografías obtenidas a diferentes tiempos de fermentación se presentan en las Figuras 3.3-3.6.

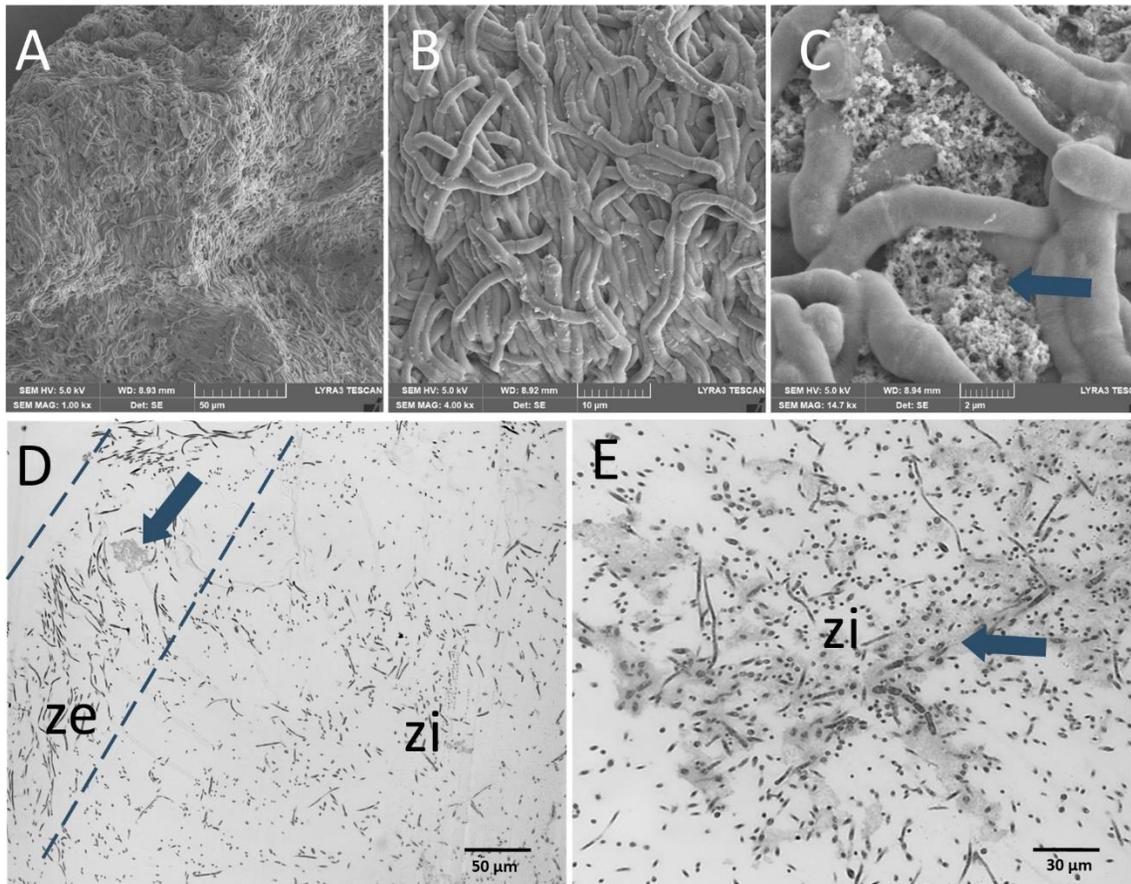


Figura 3-3. Microsclerocios en formación (4 días de fermentación). (A-B). MEB de la superficie del ME. (C) MEB de zona interna. La flecha azul indica formación inicial de matriz extracelular en la zona interna del ME. D-E. Corte de ME incluido en resina. ze: Zona externa. zi: Zona interna. Las flechas azules indican los inicios de formación de matriz extracelular.

En los primeros días de fermentación (día 4) los ME forman un entrelazado de hifas que generan una estructura con baja compactación (Figura 3-3 A-B). La estructura posee una zona externa conformada principalmente por hifas, sin presencia aparente de células sueltas, mientras que la zona interna posee principalmente células sueltas, posiblemente blastosporas o conidios sumergidos, aunque se observa la presencia de algunas hifas (Figura 3-3 D-E). En la superficie de la estructura se observa un componente de aspecto granular irregular formando un enmallado que se adhiere a las hifas (Figura 3-3 C), que posteriormente formará la matriz extracelular característica del ME. Las imágenes sugieren

que la matriz extracelular en formación comienza a cubrir las hifas y su formación se inicia mayormente en la zona interna (zi).

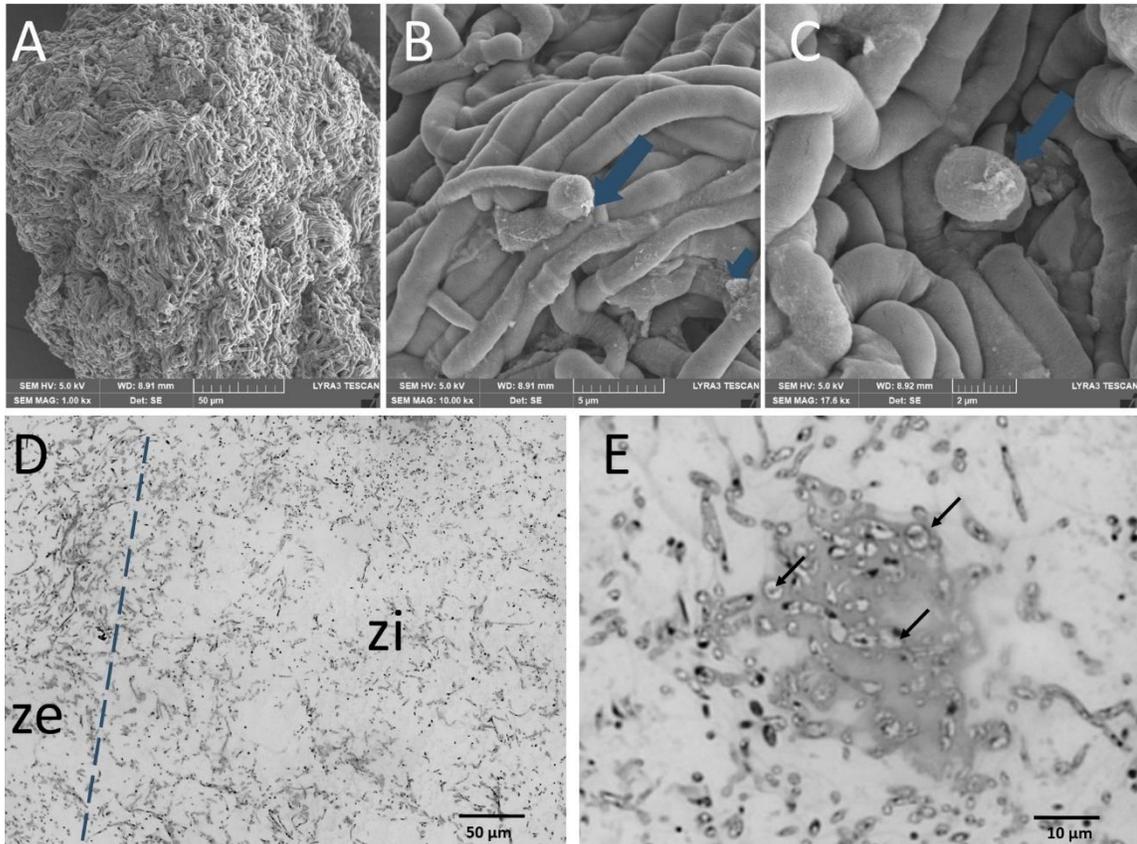


Figura 3-4. Microesclerocios en formación (8 días de fermentación). (A-C). MEB de la superficie del ME. La flecha azul indica una célula suelta con matriz extracelular en su superficie. (D-E). Corte de ME incluido en resina. ze: Zona externa. zi: zona interna. (E). Las flechas negras indican células redondas hinchadas en una zona de formación de matriz extracelular.

Después de 8 días de fermentación, se observa un aumento en la compactación de las hifas en la estructura, las cuales siguen siendo distinguibles en la superficie del ME (Figura 3-4 A-C). Se observaron células sueltas (posiblemente conidios sumergidos) cubiertas con matriz extracelular (Figuras 3-4 B-C). Los cortes sugieren que las células sueltas sufren un proceso de muerte celular, el cual contribuye a la liberación de detritos que se unen a la formación de matriz extracelular. Se destaca la presencia de depósitos electrodensos en el interior de las células.

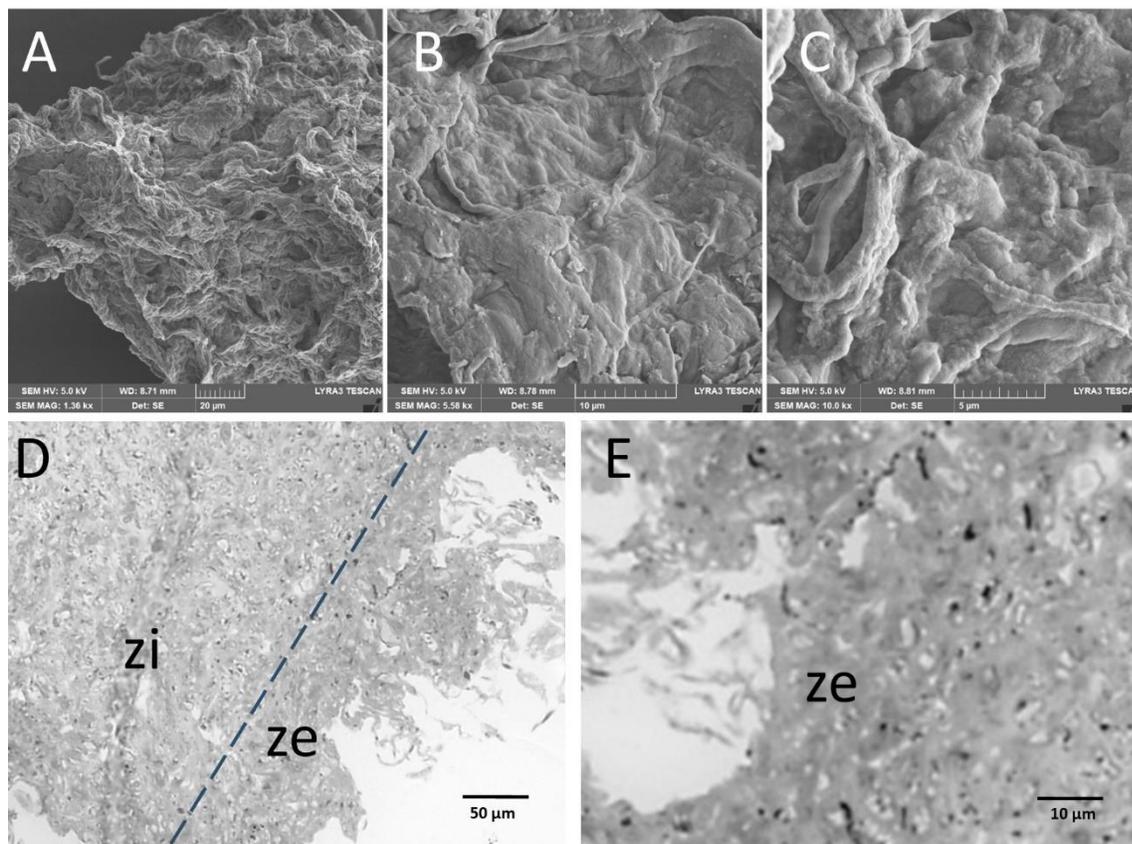


Figura 3-5. Microesclerocios en formación (16 días de fermentación). (A-C). MEB de la superficie del ME. (D-E). Corte de ME incluido en resina. ze: Zona externa. zi: zona interna.

A los 16 días de fermentación la matriz extracelular está completamente formada y no se observa la presencia de hifas distinguibles en la mayoría de la estructura (Figura 3-5 A-C), sin embargo, se observan algunas hifas aisladas en la zona externa (Figura 3-5 C). Los cortes muestran que el interior del ME contiene células en proceso de lisis completamente embebidas en la matriz extracelular. Se evidencia un aumento de depósitos electrodensos en el interior de las células. Las zonas externa e interna presentan la misma apariencia, muy compactas sin presencia de estructuras hifales. No se distinguen capas diferenciadas.

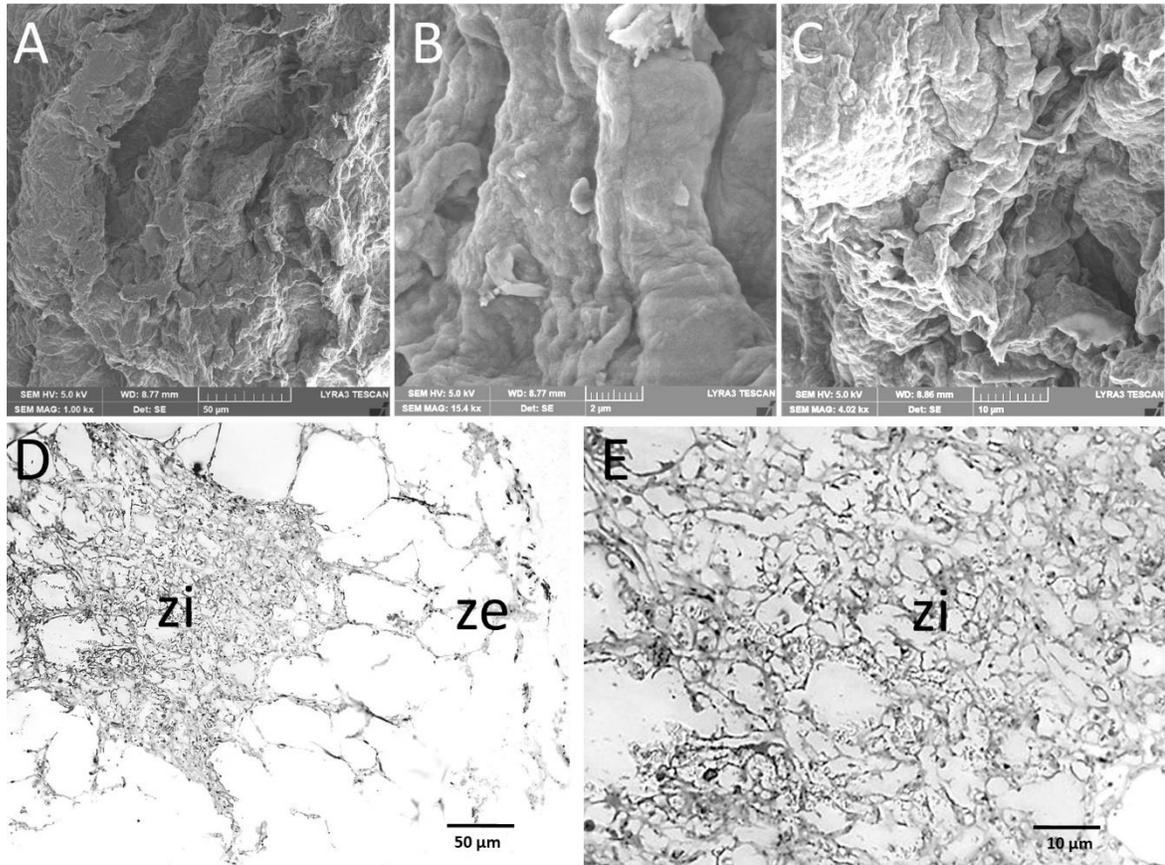


Figura 3-6. Microesclerocios formados después de 20 días de fermentación. (A-C). MEB de la superficie del ME. (D-E). Corte de ME incluido en resina. ze: Zona externa. zi: zona interna.

Los microesclerocios cosechados a los 20 días de fermentación, presentaron la superficie completamente cubierta por la matriz extracelular (Figura 3-6 A-C) y en su interior se evidenció presencia de pocas células, con detritos producidos durante la lisis celular. Se evidencia un proceso generalizado de muerte celular con presencia de pocas células aisladas.

En análisis ultraestructural interno de los ME evidencia que, al día 4 de fermentación existe una amplia densidad de células sueltas (conidios y blastosporas) y con pocas hifas, como se describió anteriormente (figura 3-7 A).

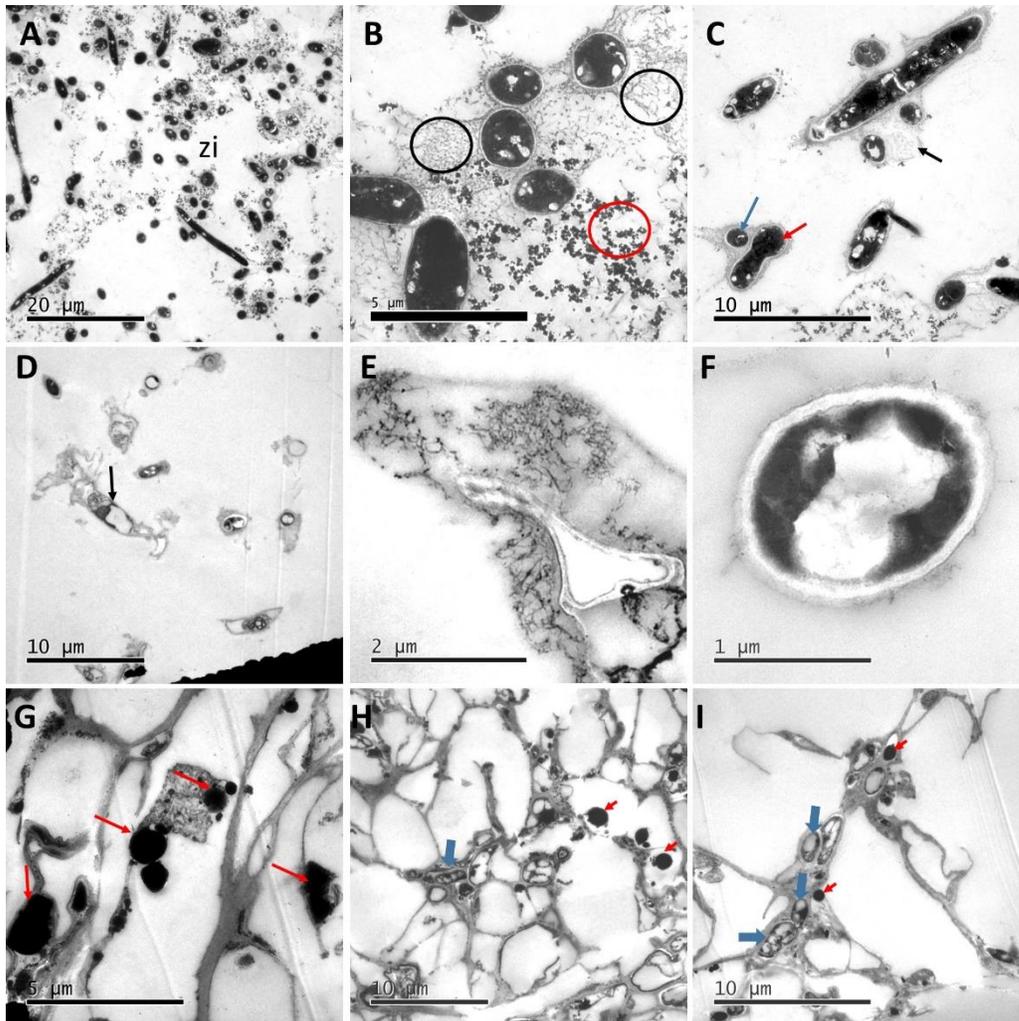


Figura 3-7. Micrografía TEM de los ME de *M. robertsii* Mt004. (A-C) ME después de 4 días de fermentación. (A) células sueltas e hifas en el interior. (B) conidios y blastosporas, círculos negros: matriz extracelular, círculo rojo: componente granular. (C) flecha negra: formación de matriz extracelular, flecha roja: esporas en gemación, flecha azul: conidio. (D-F) ME entre los 8 y 16 días de fermentación. (D) flecha negra: hifa en proceso de lisis celular. (E) formación de matriz extracelular. (F) conidio. (G-I) ME a los 20 días de fermentación (G) flecha roja: depósitos de melanina. (H, I) flechas azules: células internas.

Adicionalmente se observa la presencia de material granular, posiblemente corresponden a componentes tomados del medio y también el inicio de formación de la matriz extracelular

posiblemente a partir de las células (Figura 3-7 B). En este tiempo de fermentación se pueden observar esporas formadas por gemación, conidios e hifas segmentadas (Figura 3-7 C). Como se describió anteriormente, entre los días 8 y 16 se observa un proceso de lisis celular con una reducción drástica de la densidad celular (Figura 3-7 D), asimismo, se observa un incremento en la densidad de la matriz extracelular (Figura 3-7 E). Finalmente, a los 20 días de fermentación, se observa muy baja presencia celular, grandes depósitos completamente electrodensos, sugiriendo depósitos de melanina en el espacio intercelular alcanzando tamaños de hasta 3 μm (Figura 3-7 G). En esta etapa la matriz extracelular está completamente integrada entre los espacios de la estructura (no se observa material particulado) (Figura 3-7 G-I). Adicionalmente, se observa la presencia de una estructura de apariencia en forma de hilos que posiblemente dan sostenimiento al ME como un esqueleto interno (Figura 3-7 H-I).

3.3.2 Caracterización ecofisiológica de los microesclerocios de *M. robertsii* Mt004

3.3.2.1 Tolerancia a la radiación ultravioleta

Los conidios de *M. robertsii* Mt004 no expuestos a la radiación ultravioleta presentaron un porcentaje de germinación del 100% después de 48 horas de incubación, y perdieron completamente su capacidad para germinar después de la primera hora de irradiación. En contraste, los ME presentaron una germinación miceliogénica del 100% antes de la irradiación, valor que se redujo progresivamente a medida que aumentó el tiempo de exposición a la luz UV bajando hasta el 84,7% después de 4 horas de exposición (Figura 3-8).

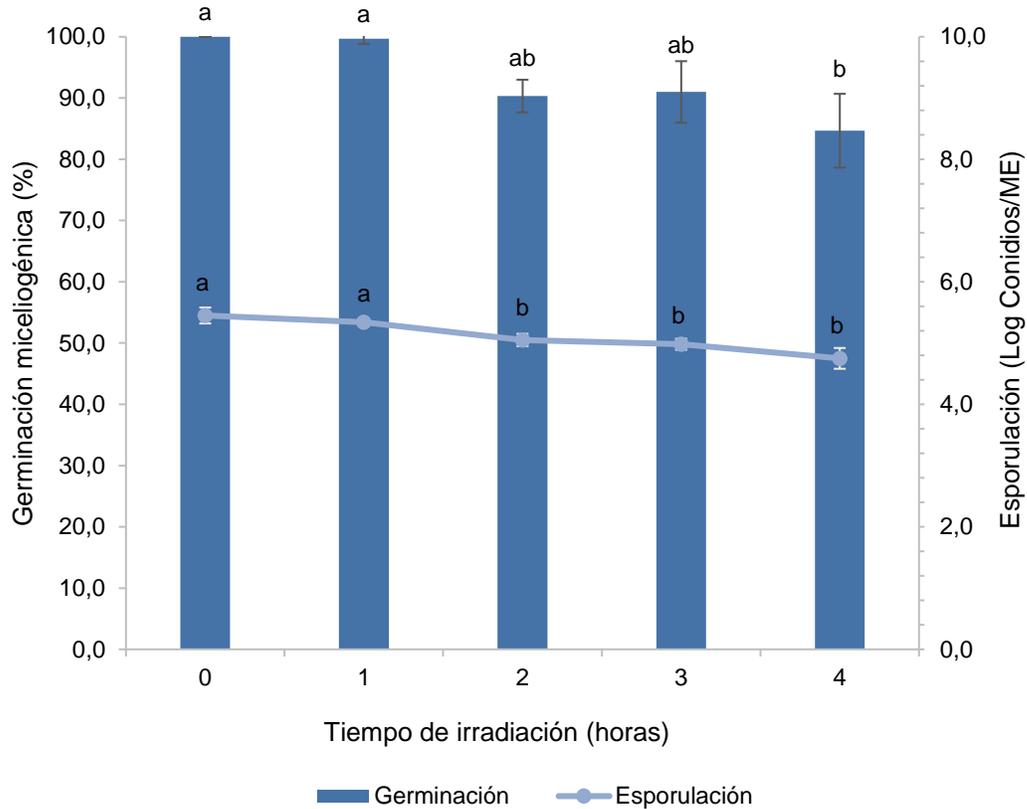


Figura 3-8. Germinación miceliogénica (Barras) y conidiogénica o esporulación (Línea) de los ME expuestos a la radiación ultravioleta. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la prueba de comparación de medias Tukey (95%) para la esporulación y de acuerdo con la prueba de Kruskal- Wallis (95%) para la germinación miceliogénica. Las barras de error representan la desviación estándar de la media entre seis réplicas.

Después de la primera hora de exposición ($12,61 \text{ kJ/m}^2$) los ME presentaron germinación miceliogénica del 99,67% y produjeron $2,90 \times 10^5$ conidios/ME, resultados que no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con los ME antes de la irradiación. Sin embargo, a medida que aumentó la dosis de radiación se evidenció que tanto la germinación miceliogénica como la conidiogénica se redujeron significativamente (Esporulación: $F_{4,25} = 24,9$, $p < 0,0000$) (Figura 3-8). La germinación miceliogénica fue afectada significativamente a partir de las 2 horas, llegando a un 84,67% al finalizar el experimento después de 4 horas de irradiación ($50,44 \text{ kJ/m}^2$). Es importante destacar que, aunque más del 80% de los ME mantuvieron su capacidad de germinar

miceliogénicamente al finalizar el experimento, la densidad micelial producida por cada estructura se vio disminuida en comparación con ME sin irradiar (Figura 3-9). La producción de conidios también se redujo significativamente ($F_{4,25} = 24.9$, $p < 0,0000$) hasta un valor de $6,81 \times 10^4$ conidios/ME a las 4 horas de exposición a la luz UV.

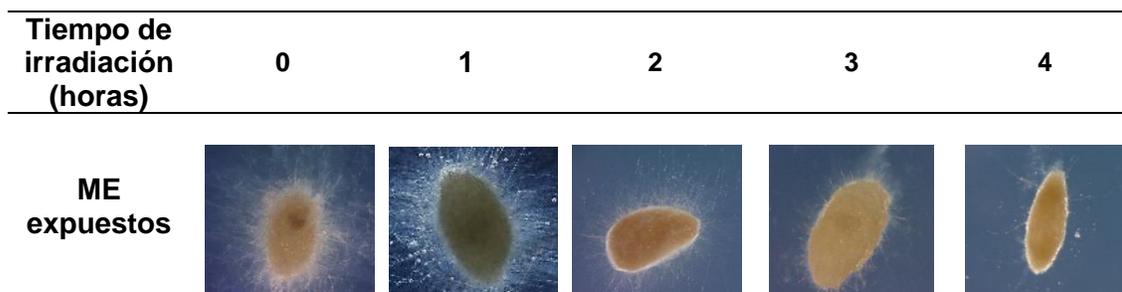


Figura 3-9. Germinación miceliogénica de los ME después de diferentes tiempos de exposición a radiación ultravioleta. Nota: La densidad de micelio suelto (filamentos blancos o hialinos) en la superficie del ME va disminuyendo a medida que incrementa el tiempo de radiación UV.

3.3.2.2 Tolerancia a temperatura

Los conidios fueron más susceptibles que los ME cuando fueron expuestos a las diferentes temperaturas evaluadas. Cuando los ME fueron incubados a 30°C, estos mantuvieron una germinación del 100% durante las 3 horas de exposición (Figura 3-10a) sin cambios significativos en la producción de conidios (Tabla 3-1), manteniendo valores superiores a 10^5 conidios/ME. Por otro lado, los conidios que iniciaron con un 100% de germinación, redujeron significativamente su capacidad germinativa después de la primera hora de exposición ($p=0,0036$) llegando a un valor del 90%, que no varió para los conidios incubados por 2 y 3 horas a esta misma temperatura.

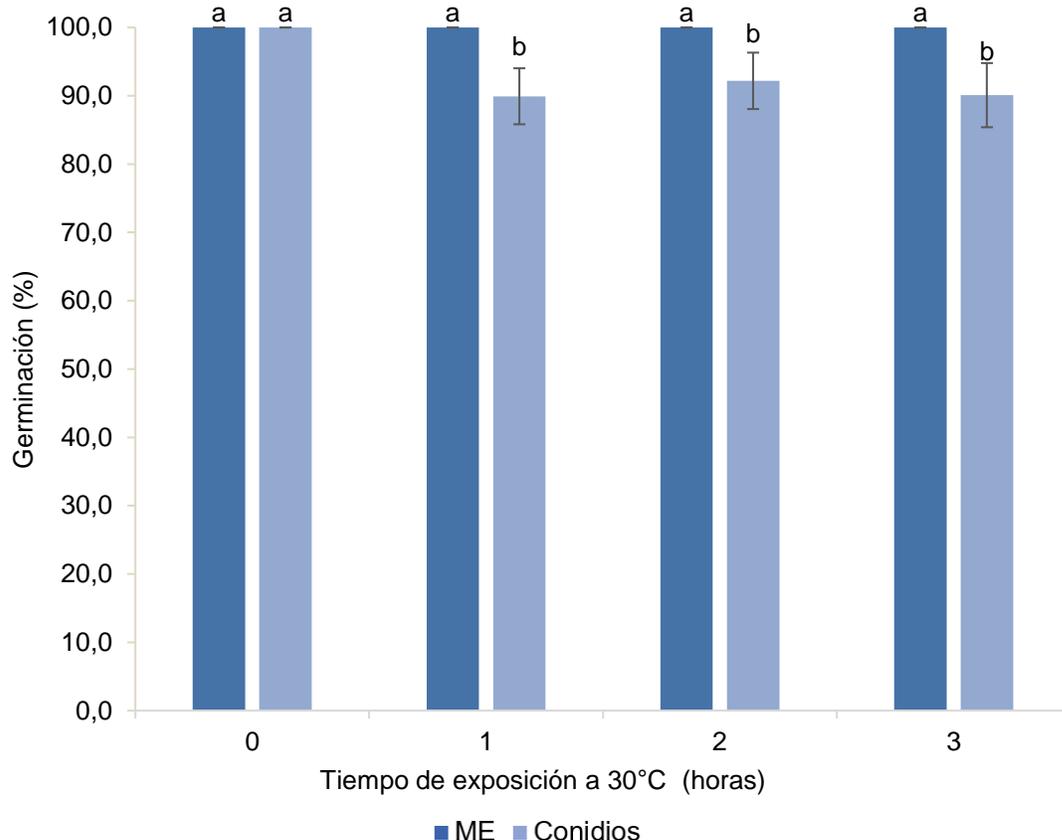


Figura 3-10a. Germinación de conidios y ME (48 horas de incubación) expuestos a 30°C durante 0, 1, 2 y 3 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según comparación de medias Tukey (95%) y prueba *t-student* (95%). Las barras de error representan la desviación estándar de la media entre seis réplicas.

En contraste, los ME a 40°C redujeron su capacidad germinativa presentando un 97% y un 92% de germinación después de una y tres horas de exposición, valores que fueron significativamente inferiores con respecto a la germinación inicial ($p=0,0172$). Los conidios también redujeron su capacidad germinativa a partir de la primera hora de exposición presentando un valor del 87%, que se redujo al 84% después de tres horas de incubación a esta temperatura. Como se observa en la figura 3-10b, no se evidenciaron diferencias significativas entre la germinación de los ME y los conidios en cada tiempo de exposición ($p=0,0890$). La producción de conidios a partir de los ME se mantuvo con valores cercanos a los obtenidos con los conidios no expuestos a la temperatura (Tabla 3-1).

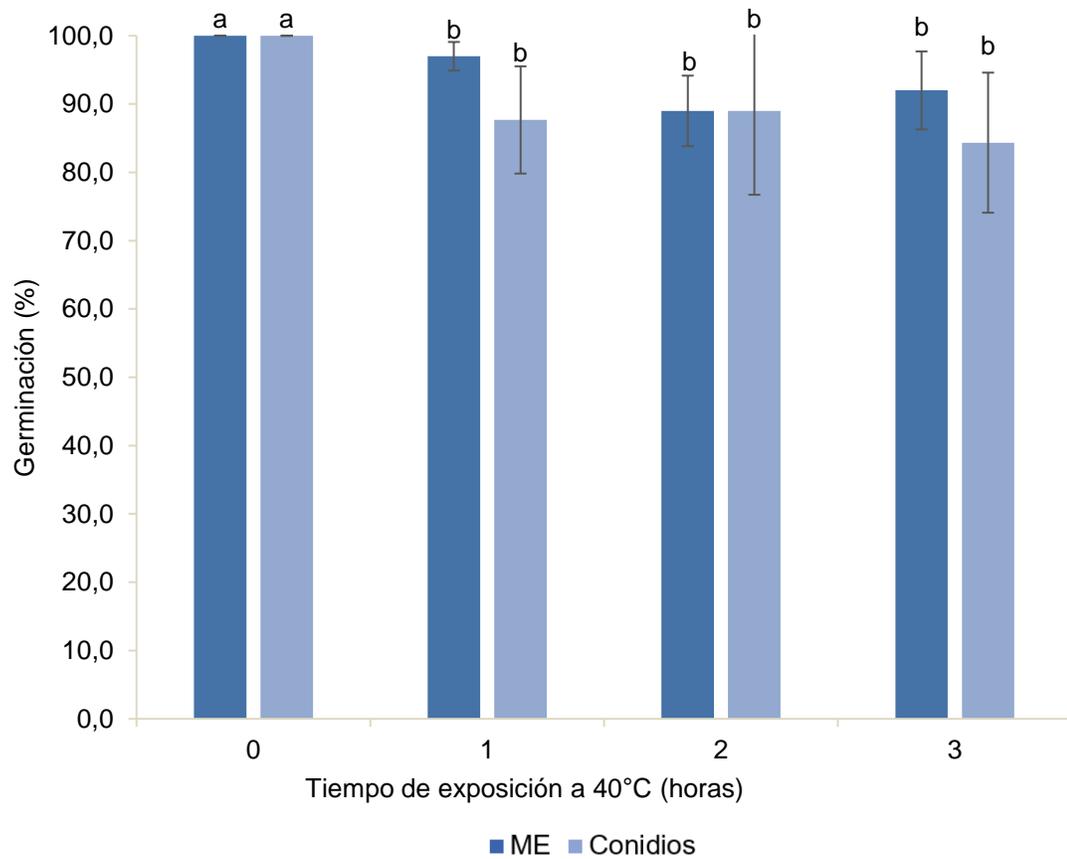


Figura 3-9b. Germinación de conidios y ME (48 horas de incubación) expuestos a 40°C durante 0, 1, 2, 3 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según comparación de medias Tukey (95%) y prueba *t-student* (95%). Las barras de error representan la desviación estándar de la media entre seis réplicas.

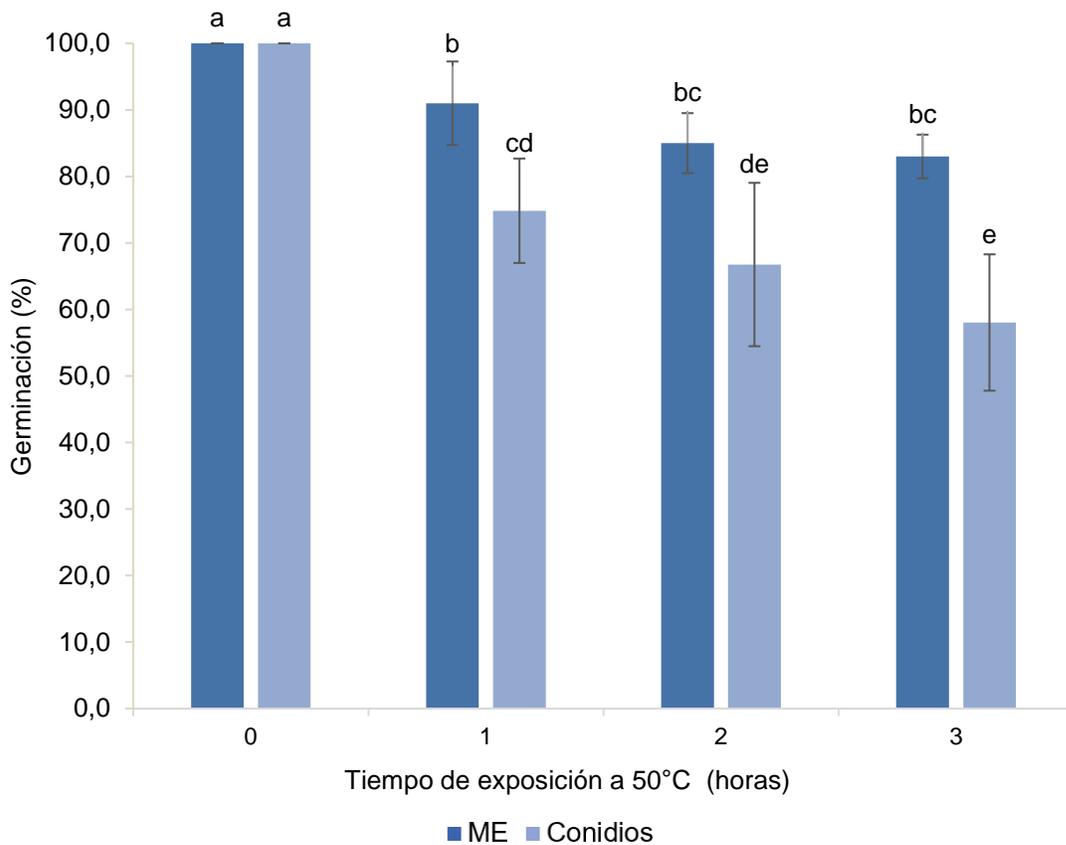


Figura 3-9c. Germinación de conidios y ME (48 horas de incubación) expuestos a 50°C durante 0, 1, 2 y 3 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según comparación de medias Tukey (95%) y prueba *t-student* (95%). Las barras de error representan la desviación estándar de la media entre seis réplicas.

Tanto los ME como los conidios redujeron significativa y progresivamente su capacidad de germinar miceliogénicamente desde la primera hora de incubación a 50°C (Figura 3-10c) con germinaciones de 91% y 74% respectivamente. Después de 3 horas de exposición a esta temperatura, la germinación de los ME se redujo en un 17%, mientras que los conidios perdieron un 42%. El efecto negativo de esta alta temperatura también fue evidenciado en la germinación conidiogénica, con una producción de $8,54 \times 10^4$ conidios/ME para los ME incubados por 3 horas a 50°C, valor significativamente menor ($F_{9,50}=12,7$, $p=0,0000$) que el presentado inicialmente (Tabla 3-4).

Tabla 3-1. Germinación conidiogénica de ME incubados a diferentes temperaturas.

Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias significativas según análisis de varianza ANOVA y comparación de medias Tukey (95%).

Temperatura (°C)	Producción de conidios por ME (x 10 ⁵)			
	0	1 hora	2 horas	3 horas
30	2,01 bc	1,76 bc	2,83 a	1,78 bc
40	2,01 bc	2,18 ab	1,74 bc	2,02 bc
50	2,01 bc	1,955 bc	1,37 cd	0,854 d

3.3.2.3 Estabilidad en almacenamiento

Los ME presentaron 100% de germinación miceliogénica antes de iniciar el almacenamiento, característica que se mantuvo estable durante seis meses de almacenamiento a 8°C con valores superiores al 90% (Figura 3-11). La producción de conidios (esporulación) fue inicialmente de 2,18x10⁵ conidios/ME y se mantuvo estable durante el almacenamiento (Figura 3-12), observándose un aumento significativo ($F_{3,8}=52,1$ $p=0,0000$) de esta variable en los ME almacenados por 6 meses con un rendimiento final de 8,01x10⁵ conidios/ME.

Cuando el almacenamiento se dio a 18°C los ME disminuyeron su germinación progresivamente con el tiempo de almacenamiento, hasta alcanzar valores del 75 y 70% después de 2 y 4 meses respectivamente, los cuales no fueron estadísticamente diferentes entre sí (Figura 3-11). La germinación final después de 6 meses de almacenamiento fue del 24%, valor que fue significativamente inferior a la inicial ($p= 0,0016$). Un comportamiento similar fue observado para la capacidad de producción de conidios, que inició con un rendimiento de 2,01x10⁵ conidios/ME y se redujo significativamente a valores entre 1,69 x 10⁵ y 1,50 x 10⁵ conidios/ME después de 2 y 4 meses respectivamente, sin diferencias estadísticas entre los resultados a estos dos tiempos de almacenamiento. Al final del almacenamiento, la esporulación fue de 9,07x10⁴ conidios/ME, valor que fue significativamente inferior a todos los anteriores ($F_{3,8}=27,5$, $p=0,0001$) (Figura 3-12).

A 28°C, la germinación miceliogénica de los ME se redujo rápida y significativamente ($p<0,001$) a valores del 32%, 24% y 9,33% después de 2, 4 y 6 meses de almacenamiento respectivamente (Figura 3-11). Asimismo, la producción de conidios disminuyó significativamente durante el almacenamiento. Después de 6 meses de almacenamiento

la producción de conidios fue de $5,80 \times 10^4$ conidios/ME, valor que fue significativamente menor que el inicial ($F_{3,8} = 24$, $p = 0,0002$) (Figura 3-12).

Los conidios presentaron una germinación inicial del 100%, variable que se vio significativamente afectada con el almacenamiento, ya que las muestras almacenadas a 8°C, 18°C y 28°C no presentaron ningún conidio germinado (48 horas de incubación) desde los dos meses de las mismas.

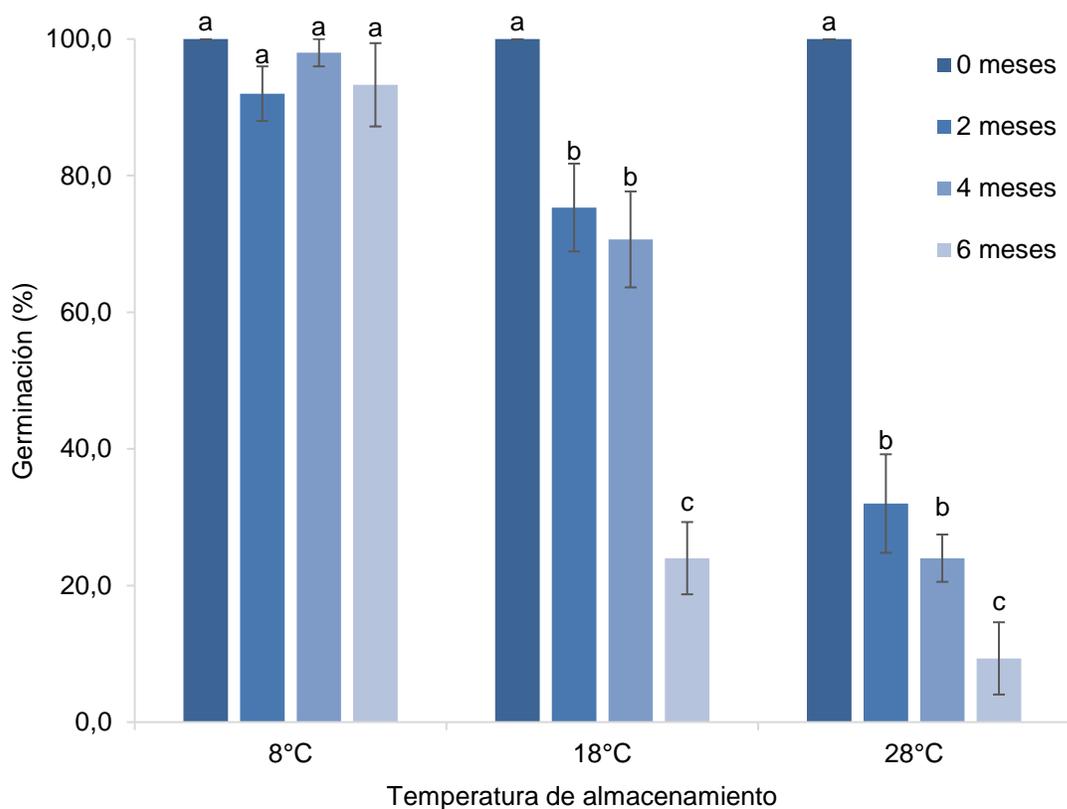


Figura 3-11. Germinación miceliogénica de ME almacenados durante 6 meses a 8°C, 18°C y 28°C. El análisis estadístico fue realizado de manera independiente para cada temperatura (resultados a 8°C analizados con prueba de Kruskal-Wallis al 95% y resultados a 18 y 28°C analizados mediante prueba de comparación de medias Tukey al 95%). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento a cada temperatura. La comparación entre el tiempo inicial (0 meses) y cada tiempo de almacenamiento por temperatura se realizó mediante prueba *t-student* (95%). Las barras de error representan la desviación estándar de la media entre las 3 réplicas.

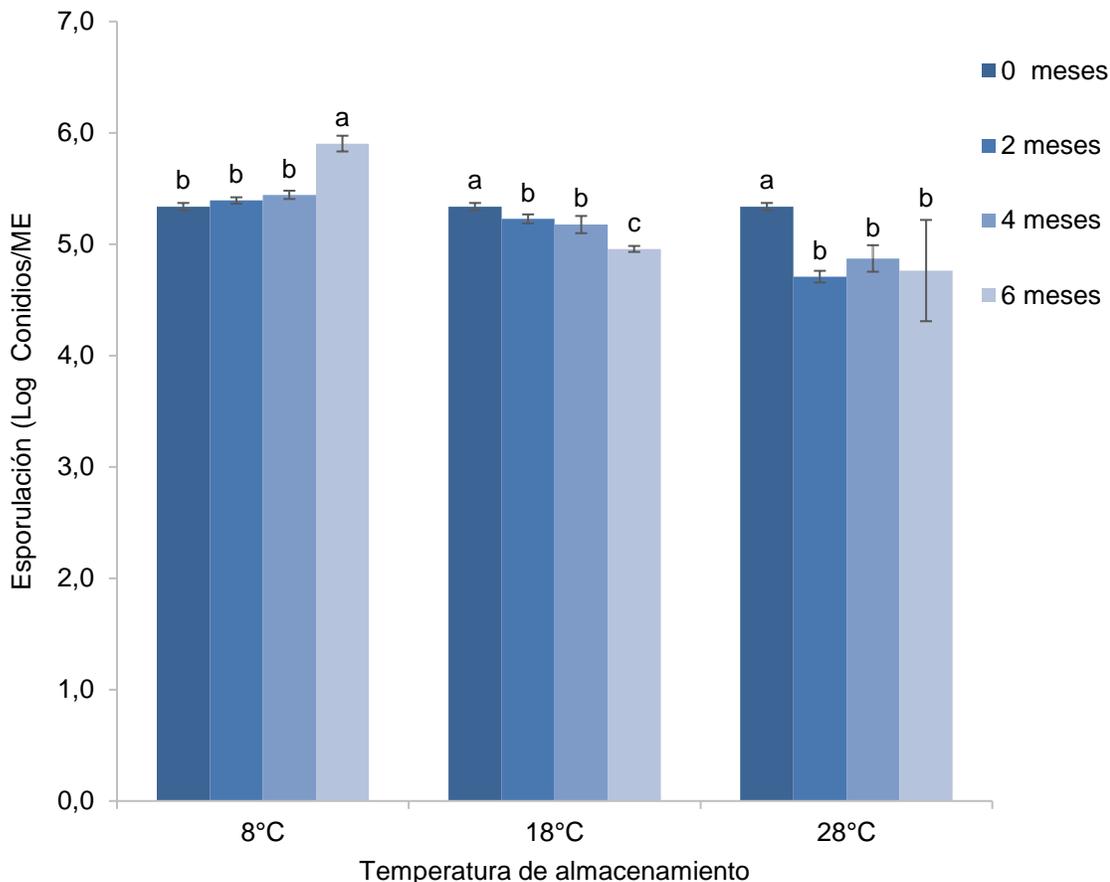


Figura 3-12. Producción de conidios a partir de ME almacenados durante 6 meses a 8°C, 18°C y 28°C. El análisis estadístico fue realizado de manera independiente para cada temperatura.

Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias significativas según análisis de varianza ANOVA y comparación de medias Tukey (95%). Las barras de error representan la desviación estándar de la media de las tres réplicas.

3.3.3 Caracterización biológica

3.3.3.1 Determinación de la actividad insecticida de los conidios producidos por los microesclerocios de *M. robertsii* Mt004 sobre larvas de *D. saccharalis* bajo condiciones de laboratorio

La actividad insecticida de los conidios producidos por los ME sobre larvas de *D. saccharalis* fue comparada con la actividad de los conidios de este hongo producidos en fermentación sólida, para lo que se desarrolló un bioensayo. La mortalidad fue directamente proporcional a la concentración de conidios. Las larvas tratadas con los

conidios de los dos tratamientos presentaron síntomas similares de infección por el entomopatógeno, exhibiendo inicialmente una coloración rosácea y endurecimiento del cuerpo, seguido de crecimiento micelial blanco sobre los cadáveres y finalmente presentando apariencia pulverulenta y coloración verde debido a la esporulación característica de *M. robertsii*.

Los resultados de las dos réplicas en el tiempo de este bioensayo fueron similares, por lo que los datos fueron combinados para el análisis y la determinación de las concentraciones letales, resultados que se presentan en la Tabla 3-2. El análisis *Probit* presentó un valor de *P* superior a 0.05, lo cual permite concluir que hay una correlación lineal entre la dosis de hongo y la mortalidad de las larvas. Las concentraciones letales media fueron estimadas en $9,82 \times 10^4$; y $5,58 \times 10^4$ para conidios producidos por los ME y conidios producidos en arroz respectivamente y no fue posible estimar la concentración letal noventa (CL_{90}) debido a que los tratamientos no alcanzaron dicho nivel de mortalidad.

Aunque la CL_{50} determinada para los conidios producidos por los ME fue 1,75 veces mayor que la de los conidios producidos en arroz, estos valores no fueron significativamente diferentes entre sí de acuerdo con la comparación de los límites de confianza (95%). Este resultado fue confirmado con el programa POLO-PLUS 1.0 (LeOra Software, 2010), el cual determinó valores de $P > 0,05$ para las hipótesis de igualdad y paralelismo, sugiriendo que los dos tratamientos fueron igualmente virulentos.

Tabla 3-2. Análisis *Probit* para determinación de concentraciones letales media de conidios provenientes de ME y de fermentación en arroz, sobre larvas de *D. saccharalis*.

Tratamientos	CI_{50} (conidios/mL)	Límites de confianza (95%)		Chi ²	gl	P
		Inferior	Superior			
Conidios de ME	$9,82 \times 10^4$	$7,94 \times 10^3$	$1,25 \times 10^6$	1,399	3	0,466
Conidios producidos en arroz	$5,58 \times 10^4$	$6,85 \times 10^3$	$3,29 \times 10^5$	1,307	3	0,436

3.3.4 Caracterización química

3.3.4.1 Análisis de reservas endógenas

El análisis de las reservas endógenas realizando las metodologías colorimétricas y enzimáticas en los ME producidos por *M. robertsii* Mt004 y cosechados después de 20 días de fermentación resultó en una concentración de 0,37 mg de manitol y 0,001 mg de azúcares reductores por gramo seco de ME. En contraste, no se detectó trehalosa intracelular con el método utilizado en este trabajo. Para verificar la presencia de estos compuestos se realizaron análisis espectroscópicos utilizando ^1H RMN.

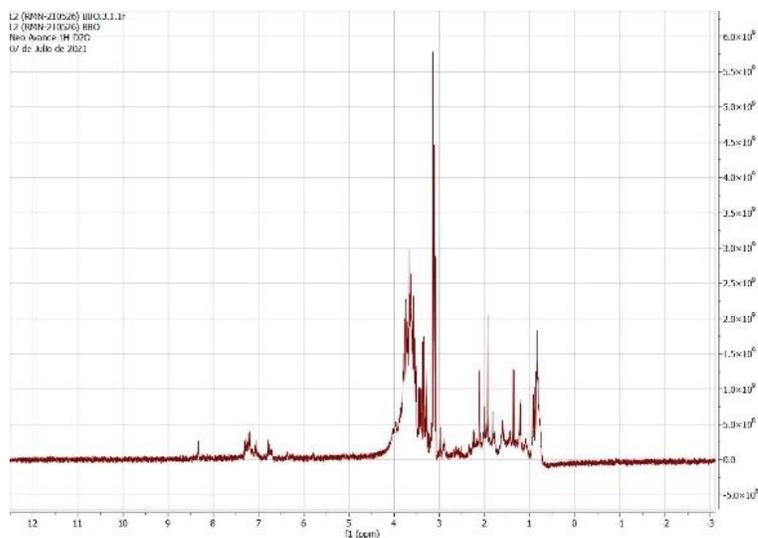


Figura 3-13. Análisis del extracto intracelular de ME por ^1H RMN.

El espectro ^1H RMN (Figura 3-13) del extracto intracelular de estos propágulos fúngicos, mostró señales intensas en la zona de 3 a 4.5 ppm, característico de la presencia de los carbohidratos.

Se realizó un análisis comparativo entre el espectro de ^1H RMN del extracto intracelular de los ME contrastándolo con las señales características del manitol y trehalosa utilizando las librerías del HMDB y el programa *Mnova* NMR (Figura 3-14). Aparentemente, se detectó la presencia del manitol (en bajas concentraciones), con señales en 3.55 ppm (*dd*) 3.63 ppm (*m*), 3.68 ppm (*m*) y 3.75 ppm (*dd*) correspondiente a cada uno de los hidrógenos del manitol. No obstante, en el espectro del extracto se observaron señales solapadas entre sí, particularmente en la zona de interés (3 a 4.5 ppm), por lo que la identificación de este

compuesto no se puede concluir de este análisis. Las señales atribuibles a la trehalosa por ^1H RMN no coincidieron con el espectro del extracto, confirmando los estudios realizados previamente.

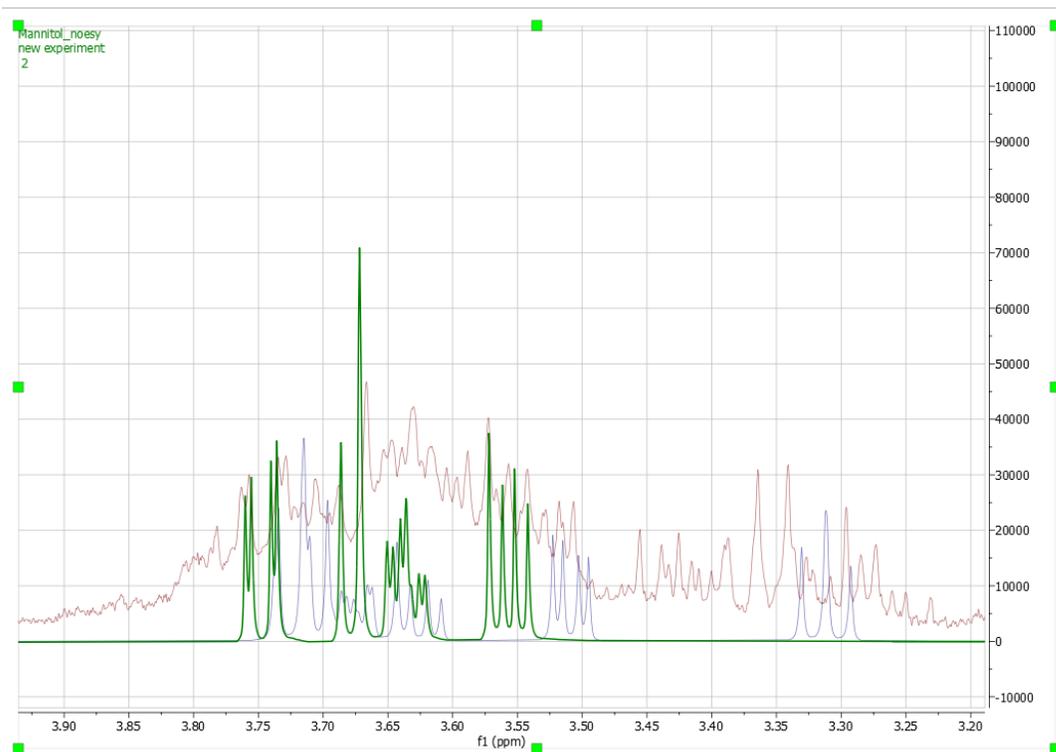


Figura 3-14. Comparación entre el espectro de ^1H RMN del contenido intracelular de los ME (línea roja), patrón de manitol (línea verde) y patrón de trehalosa (azul). El análisis fue realizado en el programa *Mnova NMR*.

Se realizó un experimento bidimensional (^1H -COSY) (datos no mostrados) para confirmar los acoplamientos de los protones, sin embargo, no se pudieron distinguir *crosspeaks* que confirmen de manera inequívoca la presencia de manitol por la gran cantidad de señales presentes en la región. Estos estudios confirman la necesidad de la utilización de otras técnicas más sensibles que permitan la detección e identificación de los azúcares presentes en el contenido intracelular de los ME, tal como cromatografía líquida con un detector ELSD o cromatografía líquida acoplada a masas.

3.4 Discusión

Los hongos que normalmente forman esclerocios en su ciclo de desarrollo en el ambiente forman estructuras consistentes en hifas estrechamente entrelazadas que a menudo forman un tejido similar al parénquima, donde tres zonas concéntricas han sido identificadas y denominadas la cáscara (*rind* en inglés), la corteza (*cortex* en inglés) y la médula (Willettts y Bullock 1992). Los microesclerocios inducidos artificialmente mediante fermentación líquida en algunos hongos entomopatógenos, presentan una estructura un poco diferente, que ha sido descrita por una capa externa de células parenquimatosas pigmentadas (células poco especializadas, de forma variable que forman un tejido o estructura continua) y una capa interna de células medulares poco pigmentadas o incoloras (Song et al 2018).

En las etapas iniciales (4 días) de la formación de ME por la cepa de *M. robertsii* Mt004 se observaron agregados hifales flojos que en su interior empezaron a acumular una matriz extracelular, similar a lo reportado para los esclerocios producidos por *G. umbellata* (Choi et al. 2002) y *Ophiocordyceps sinensis* (Xing y Guo, 2008). Las micrografías sugieren que el inicio de formación de los ME está basado en el entrelazamiento de hifas debido a la señal que envía el entorno de baja disponibilidad de nitrógeno. La malla formada por la estructura de hifas atrapa en su interior blastosporas y conidios sumergidos, además de nutrientes del medio D que se observa como material granular. La lisis celular que inicia en la zona interna de la estructura genera matriz extracelular que será el componente principal del ME y posiblemente servirá de reserva energética para la posterior germinación.

Durante la etapa de desarrollo ocurrieron algunos cambios estructurales entre los 8 y 16 días fermentación, produciéndose una estructura más compacta, con algunas hifas expuestas en la superficie y otras embebidas en la matriz extracelular. Al interior de los ME se evidenció un incremento de la muerte celular, que puede estar relacionado con el aumento de la matriz extracelular en los espacios interhifales. Este proceso ha sido reportado por otros autores (Bullock et al. 1980, Willettts y Bullock 1992, Choi et al. 2002, Xing y Guo 2008) que mencionan una alta acumulación de material energético posiblemente derivado de la lisis celular.

La composición de la matriz extracelular no fue determinada en el presente estudio; sin embargo, en otros trabajos se ha descrito que los esclerocios fúngicos producen y contienen una alta cantidad de compuestos de bajo peso molecular como carbohidratos, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y polioles. A la matriz se le han atribuido muchas funciones que incluye morfogénesis, adhesión celular, almacenamiento de agua para prevenir la deshidratación, reserva de energía y la compactación de la estructura (Willets y Bullock 1992; Choi et al. 2002; Villamizar et al. 2020).

En la etapa de maduración de los microesclerocios de *M. robertsii*, entre los 16 y 20 días, la estructura alcanzó una alta compactación, la capa externa estaba completamente recubierta de la matriz extracelular de textura aparentemente rugosa. Al interior, se diferenciaron una zona central con pocas células y alta densidad de matriz extracelular que podría corresponder con la zona descrita como médula y una zona superficial con una mayor densidad de células que se asemeja a lo descrito como corteza (Song et al 2018).

La radiación solar, la temperatura y la precipitación son factores que afectan la viabilidad y persistencia de los conidios (y/o propágulos fúngicos) de hongos entomopatógenos cuando son aplicados en campo. Dado que estas condiciones son fundamentales para la bioactividad de los hongos entomopatógenos, el efecto de dichos factores debe ser considerados durante el desarrollo de un bioproducto para asegurar su eficacia en campo (Corval et al. 2021).

En términos generales, los ME producidos en el presente trabajo mostraron mayor tolerancia a la temperatura y a la radiación ultravioleta que los conidios producidos por el método convencional de fermentación sólida en granos de arroz, manteniendo la capacidad de germinar después de diferentes periodos de exposición a estas condiciones. Dicha tolerancia ante condiciones de estrés ha sido reportada por otros autores para ME de hongos como *P. lilacinum*, *N. rileyi* y diferentes especies de *Metarhizium* spp. (Song et al. 2014; Song et al. 2016; Corval et al. 2021).

La mayor tolerancia que presentaron los ME frente a la luz ultravioleta puede estar relacionada con la pigmentación de las estructuras (relacionado con el tiempo de fermentación evaluado en el Capítulo I), ya que varios pigmentos como la melanina, son capaces de absorber la radiación UV y transformar esa energía en pequeñas cantidades de calor inofensivo, proceso conocido como conversión interna ultrarrápida (Tseng et al.

2011; Gessler et al. 2014). Para los conidios fúngicos se ha descrito que la variabilidad en la susceptibilidad a la radiación UV está estrechamente relacionada con el color de los mismos (Fernandes et al. 2015). Esto fue estudiado por Braga et al (2006), quienes evidenciaron que conidios mutantes de *M. anisopliae* que no tenían coloración fueron más susceptibles a radiación UV del sol, en comparación con conidios normales con coloración verde oscuro. Ignoffo y Garcia (1992) también observaron que los conidios oscuros (casi negros) de *Aspergillus niger* fueron más tolerantes a condiciones simuladas de luz solar, alcanzando una viabilidad del 40,5% después de 16 horas de exposición, en tanto que los conidios de colores claros de los hongos *M. anisopliae*, *N. rileyi*, *B. bassiana* y *A. niger subsp. cinnamomeus* (conidios sin coloración) presentaron vidas medias entre 1 y 2 horas de exposición.

Al igual que en los microesclerocios, se han identificado varias clases de pigmentos en los conidios, pero la melanina y los carotenos son los pigmentos más reconocidos por conferir protección frente a diferentes condiciones de estrés. La melanina es depositada en las paredes de las hifas y conidios en la mayoría de los hongos y presenta una coloración marrón oscura negra mientras que los carotenos son depositados en el citoplasma y vesículas y dan una pigmentación amarillo-naranja en algunos hongos (Rangel et al, 2006).

Los ME de *M. robertsii* producidos en el presente estudio demostraron una alta fotoestabilidad, ya que mantuvieron una germinación superior al 80% durante 4 horas de irradiación con luz UV-B equivalente a una dosis de radiación de 50,44 kJ/m². Estos ME también mostraron mayor tolerancia a la radiación UV que los ME de *P. lilacinum* producidos por Song et al (2016), ya que estos últimos redujeron drásticamente su germinación a valores inferiores al 25% al ser expuestos a una dosis de luz ultravioleta de 19,44 kJ/m², mientras que los ME producidos en este trabajo mantuvieron una germinación del 92% después de ser irradiados con una dosis mayor de radiación (25,55 kJ/m²). Estas diferencias podrían estar relacionadas con diferencias propias entre las especies fúngicas o con diferencias en la maduración y producción de pigmento en los ME, así como en la acumulación de metabolitos, nutrientes e imbibición del agua (Corval et al. 2021). Esto fue demostrado por Corval et al (2021), quienes evaluaron ME producidos por varias especies de *Metarhizium* spp. y encontraron que la germinación de las estructuras después de una hora de la exposición a una dosis de radiación de 4.0 kJ/m², varió considerablemente en un rango del 9,2% al 100%.

Los ME producidos en este estudio también presentaron alta tolerancia a la temperatura, inclusive mayor que la reportada en otros trabajos. Por ejemplo, Song et al (2014) encontraron que los ME de *N. rileyi* redujeron su germinación hasta un 34% después de 45 minutos de exposición a 50°C y Song et al (2016) reportaron que los ME de *P. lilacinum* redujeron su germinación hasta el 23,5% después de 30 minutos a 50°C; mientras que, tanto los conidios como los ME de *M. robertsii* Mt004 producidos en el presente estudio, mantuvieron una germinación de 74,8 y 91% respectivamente después de una hora de exposición a 50°C.

La tolerancia a la temperatura mostrada por la cepa *M. robertsii* Mt004 posiblemente viene de un proceso adaptativo de la misma al hábitat natural de donde fue aislada (Rionegro, Antioquia), en el cual el rango de temperatura varía entre 11°C y 24°C. Esta adaptación del hongo a la temperatura y a la radiación UV también puede ser resultado de la evolución y selección natural del microorganismo debido a la exposición repetida a dichas condiciones en el campo, considerando el comportamiento del hospedero que frecuentemente toma el sol para elevar su temperatura corporal en respuesta a infecciones por patógenos, fenómeno conocido como fiebre conductual (Corval et al. 2021). Los microorganismos que sobreviven en ambientes adversos tienden a desarrollar mecanismos de protección para co-evolucionar en dichos hábitats (Bernardo et al. 2020). Cuando el microorganismo es expuesto a altas temperaturas, mecanismos fisiológicos y bioquímicos desencadenan la producción de proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) las cuales previenen la denaturación de proteínas y, por ende, incrementan la termotolerancia (Bernardo et al. 2020).

Con respecto a la producción de conidios o esporulación de los ME, esta capacidad disminuyó a medida que aumentó el tiempo de exposición a las condiciones evaluadas (radiación UV y temperatura). Esto podría estar relacionado con daños subletales sufridos por los ME que requirieron que células desencadenaran los mecanismos de reparación retrasando la germinación y esporulación. Este efecto fue evidenciado por Fernandes et al. (2007) con los conidios de diferentes especies de *Beauveria* spp. expuestos a radiación ultravioleta, los cuales retrasaron su germinación para dar paso a los sistemas de reparación de la célula como duplicación del material genético dañado y segregación de cromosomas fracturados.

La reducción en la capacidad de esporulación de los ME expuestos a la temperatura o la radiación observada en el presente trabajo también fue reportada en un estudio reciente realizado por Paixão et al. (2021). En dicho trabajo se evaluó la susceptibilidad de ME y pellets de micelio producidos por *M. robertsii* ARSEF 2575 a radiación ultravioleta y exposición a 45°C. Cuando los ME fueron expuestos a diferentes dosis de radiación, se evidenció una disminución del 83 % en la producción de conidios después de 4 horas de exposición. Los ME expuestos a 45°C también fueron afectados con una reducción del 36 % en la esporulación.

El vigor es un término relativamente nuevo utilizado para describir la fuerza de la germinación de los conidios y el crecimiento del tubo germinativo, el cual está influenciado por factores como el sistema de fermentación y los procesos *downstream*, siendo la velocidad de la germinación uno de los principales indicadores de vigor (Faria et al. 2015). En estudios con ME, el término de vigor no ha sido muy utilizado, pero Villamizar et al (2018) lo mencionó para explicar los resultados de un estudio de estabilidad de microesclerocios de diferentes especies de *Beauveria* spp. almacenados a 20°C. En dicho trabajo, la germinación disminuyó considerablemente después de 4 meses mientras que la producción de conidios se mantuvo constante, sugiriendo una tasa de germinación lenta debido a la inducción de un estado de latencia o a la reducción en el vigor de los ME como resultado de largos tiempos de almacenamiento.

En este trabajo, las condiciones de estrés como altas temperaturas (50°C) y exposición prolongada a radiación ultravioleta debilitaron los ME que al germinar produjeron menos hifas y micelio, y en consecuencia menos conidios después de 8 días de incubación, comportamiento asociado a ME con bajo vigor y que podría resultar en conidios con deficiente actividad insecticida. La relación entre el vigor y la virulencia fue demostrada por Faria et al. (2015) quien comparó la actividad insecticida de conidios de *B. bassiana* debilitados (con baja velocidad de germinación < 16 h) vs conidios con alto vigor (alta velocidad de germinación > 16 h), encontrando que los conidios con alto vigor fueron más virulentos. En este contexto, se hace necesario realizar estudios más profundos de las correlaciones entre el vigor de los ME y el desempeño ecofisiológico de los conidios producidos por estos en relación con la actividad insecticida.

Los conidios producidos por los ME no expuestos a condiciones abióticas de estrés causaron una mortalidad corregida (eficacia) del 77,99% y los conidios producidos en

fermentación sólida alcanzaron un 84,23%, al utilizar una concentración de 1×10^7 conidios/mL para la inoculación de las larvas. Este resultado es similar al obtenido por Torres-Torres et al. (2020) al evaluar los conidios de la misma cepa utilizada en el presente estudio (82,6%), los cuales fueron recolectados después de 12 días de incubación en agar PDA.

Los resultados mostraron que los conidios producidos por los ME no expuestos fueron capaces de causar infección y mortalidad en larvas de *D. saccharalis*, presentando la misma virulencia que los conidios producidos en fermentación sólida. Esta capacidad de los ME de producir conidios altamente infectivos hace de esta estructura una alternativa viable para ser utilizada como principio activo de un bioplaguicida (Jaronski y Jackson 2008; Jackson y Jaronski 2009; Rivas-Franco et al. 2020; Villamizar et al. 2020). Si bien, las tasas de aplicación dependerán del insecto plaga y su hábitat en el suelo (Jackson y Jaronski 2012), se ha demostrado que cuando los ME son aplicados bajo condiciones favorables de campo, estos pueden mantenerse viables e infectivos y producir y liberar grandes cantidades de conidios al ambiente (Jackson y Jaronski 2012; Cotes 2018).

Se ha estimado que un ME es capaz de producir hasta 100.000 conidios en campo (Goble et al. 2016), lo que sugiere que pueden comportarse como sistemas de liberación sostenida. Este efecto fue reportado por Goble et al. (2016), quien evaluó la eficacia y persistencia de una formulación de ME de *M. brunneum* F52 para el control de *Anoplophora glabripennien*. Los gránulos de ME fueron capaces de liberar continuamente conidios altamente infectivos durante 30 días en el campo, indicando que una “re-aplicación” del producto en campo no es necesaria hasta después de 6 semanas. Este resultado es interesante porque sugiere que al utilizar ME se podrían necesitar una menor frecuencia de aplicación del bioplaguicida en campo para garantizar el manejo de la plaga, mejorando la factibilidad económica del bioproducto.

Los análisis químicos por RMN de los ME evidenciaron la presencia de azúcares en la estructura, con picos en la zona de 3,5 y 4 ppm, característica para carbohidratos. Sin embargo, es posible que la compleja matriz extracelular de los ME contenga otros compuestos mayoritarios que solaparan las señales de la trehalosa y manitol.

Los polioles y la trehalosa han sido ampliamente estudiados en propágulos fúngicos, principalmente en los conidios de algunos hongos como *B. bassiana*, *M. anisopliae*,

Paecilomyces farinosus y *A. niger* (Hallsworth y Magan 1995; Hallsworth y Magan 1996; Teertstra et al. 2017). Estos compuestos están involucrados en la protección de proteínas de la membrana, y han sido asociados con la resistencia a factores de estrés ambiental, favorecimiento de una rápida germinación, incremento de la patogenicidad y mejoramiento de la vida útil de los propágulos bajo condiciones de almacenamiento (Hallsworth et al, 1996).

En esclerocios, la acumulación de reservas endógenas se ha evidenciado durante su formación. Las reservas nutricionales participan junto con compuestos de la pared celular y el material interhifal, en el soporte de la estructura durante el periodo de latencia y se utilizan durante el proceso de germinación (Willettts y Bullock 1992). Los principales carbohidratos acumulados son la trehalosa y el β -glucano (posiblemente asociados a la pared), varios polioles y en menor proporción azúcares reductores (Wang y Le Tourneau 1971). En esclerocios del hongo *S. sclerotiorum*, la trehalosa y el manitol han sido los carbohidratos más predominantes, comprendiendo un peso de 4,1 y 4,8% del peso seco total de las estructuras producidas en medio sólido (Le Tourneau 2016). Asimismo, en microesclerocios de *Mycoleptodiscus terrestres* se detectaron principalmente trehalosa (0,38%) y manitol (1,82%) y en menor proporción glucosa y glicerol (Dunlap et al. 2011). En el presente trabajo no se detectó la presencia de trehalosa y se obtuvo una concentración de manitol que fue inferior a la reportada para los ME de *M. terrestres*. Esta baja acumulación de dichos azúcares puede ser resultado de las condiciones de fermentación que favorecieron el estrés oxidativo y no hídrico, como lo reportó Al-Hamdani y Cooke (1987) para esclerocios de *S. sclerotiorum*. Estos autores evaluaron el efecto del potencial hídrico y la acumulación de carbohidratos y glicerol en medios sólidos, evidenciando que el manitol fue el principal carbohidrato presente en los esclerocios y su acumulación incrementó conforme el potencial hídrico disminuyó. En el trabajo realizado por Le Tourneau (1966), el alto contenido intracelular de manitol (4,8%) y trehalosa (4,1%) fue obtenido en esclerocios producidos en medios sólidos donde la disponibilidad de agua fue menor que en medios de cultivos líquidos. En este contexto, el estrés hídrico induce la acumulación de polioles para prevenir la inhibición enzimática por deshidratación, mientras que la trehalosa es capaz de reemplazar el agua en las membranas y estabilizar las estructuras enzimáticas durante la desecación (Hallsworth et al, 1994).

Dunlap et al (2011) obtuvieron una concentración de 3% de manitol y 0,3% aprox. de trehalosa en ME de *M. terrestres* producidos en fermentación sumergida, mientras que, en

el presente trabajo, la concentración de manitol obtenida fue aproximadamente 10 veces menos y nula para la trehalosa. Esto podría ser explicado por diferencias genéticas y fisiológicas entre los dos hongos, además de las diferencias en las condiciones de fermentación empleadas, ya que Dunlap et al (2011) utilizaron un biorreactor de 100 L con impulsores, una agitación de 350 rpm y un flujo de aire de 50 L min⁻¹, mientras que en este trabajo se evaluó a escala de Erlenmeyer con una agitación de 250 rpm. Dentro de nuestro conocimiento, este es el primer estudio reportado del contenido intracelular de los ME producidos por *M. robertsii*.

En este trabajo sólo se cuantificó la concentración de manitol y trehalosa, pero los espectros de RMN sugieren la presencia de otros carbohidratos que pueden participar como reservas energéticas para garantizar la germinación de los ME. Por ejemplo, Wang y le Tourneau (1971) evidenciaron que, con medios con glucosa como única fuente de carbono, los esclerocios de *S. sclerotiorum*, no sólo contenían manitol y trehalosa sino otros azúcares como la glucosa y fructosa. Sin embargo, se deben realizar estudios más profundos para considerar elucidar con precisión todos los carbohidratos acumulados en los ME de *M. robertsii* Mt004.

Los ME almacenados mantuvieron estable la germinación y la producción de conidios por 6 meses a 8°C y por 4 meses a 18°C, mientras que los conidios perdieron completamente su viabilidad después de 2 meses de almacenamiento a todas las temperaturas evaluadas. Esto sugiere que los ME son estructuras más robustas y tolerantes a las condiciones de estrés que se dan durante el secado y almacenamiento. La tolerancia de los propágulos fúngicos a las condiciones de estrés abiótico depende de factores como la humedad y la velocidad del secado (Hong et al. 2000), así como de las condiciones nutricionales y de fermentación que determinan la producción y acumulación de reservas endógenas y/o polioles en las células (Hallsworth y Magan 1995; Hallsworth y Magan 1996; Jackson et al. 2010; Kobori et al. 2015).

Estos resultados son similares a los reportados por Villamizar et al (2018), quienes evidenciaron que después de 6 meses de almacenamiento, los ME producidos por *B. pseudobassiana* AgR-F704 mantuvieron una germinación del 68% con una esporulación cercana a 10⁹ conidios por g de gránulo de ME, mientras que los conidios redujeron su germinación de 40% a 0% después de los 6 meses de almacenamiento, sugiriendo que la

pérdida de viabilidad se debió a las condiciones de secado. En otros trabajos realizados por Song et al (2014, 2016) evaluaron la estabilidad de ME de *P. lilacinum* y *N. rileyi* almacenados durante 12 meses a 25°C y encontraron que ambos microorganismos mantuvieron una germinación superior al 85% (48 horas de incubación). Estos autores consideraron que los gránulos de ME mantuvieron una vida útil “aceptable” y resaltaron el impacto de los protocolos de germinación aplicados en hongos filamentosos.

Cuando los ME de *M. robertsii* Mt004 fueron almacenados a 28°C, estos disminuyeron rápidamente su capacidad germinativa y la producción de conidios. Esto podría deberse al contenido de humedad de los ME (5%), la temperatura de almacenamiento (28°C) y el oxígeno atmosférico descritos como factores críticos que afectan la vida útil de los propágulos fúngicos (Jackson et al. 2010; Mascarín y Jaronski 2016). Estas condiciones deben mantenerse tan bajas como sea posible, ya que temperaturas altas podrían favorecer el crecimiento de contaminantes, activación del metabolismo basal del microorganismo y uso de las reservas energéticas y producción de metabolitos tóxicos, afectando la viabilidad de los ME y producción de conidios (Moore et al. 1996; Jackson y Jaronski 2012).

El contenido de humedad de los propágulos fúngicos ha demostrado tener un impacto importante sobre su sobrevivencia en almacenamiento. Por ejemplo, en un estudio realizado por Jackson y Jaronski (2012) todos los gránulos de ME de *M. brunneum* se secaron hasta obtener una humedad inferior al 5%. Los que contenían una humedad entre 2,5 y 5% produjeron más conidios por litro de caldo de fermentación inmediatamente después del secado en comparación con los ME que contenían una humedad inferior a 2,5%. Sin embargo, estos últimos produjeron una mayor concentración de conidios después de 4 meses de almacenamiento que los ME que contenían humedades entre 2,5 y 5%. En este sentido, la estabilidad de los ME depende en gran medida de la humedad de los mismos, siendo el parámetro más crítico que debe ser controlado durante el secado, formulación, empaque y almacenamiento de los ME.

3.5 Conclusiones y recomendaciones

Los ME producidos por el hongo *M. robertsii* Mt004 demostraron ser más tolerantes a condiciones de almacenamiento y estrés como la radiación ultravioleta y las altas temperaturas en comparación con los conidios producidos en fermentación sólida. Tanto

los conidios producidos a partir de los ME como los conidios producidos en fermentación sólida fueron altamente virulentos sobre larvas de *D. saccharalis* alcanzando >80% eficacia bajo condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos demostraron el potencial que tienen los ME para ser utilizados en el desarrollo de bioplaguicidas con larga vida de almacenamiento, alta persistencia y eficacia en campo.

Para futuros estudios, sería interesante evaluar la actividad insecticida de los conidios producidos después de exposiciones prolongadas a la radiación ultravioleta y temperatura con el fin de evidenciar su vigor. Asimismo, es importante reducir la humedad de los ME por debajo de valores de 2,5% para garantizar una mayor sobrevivencia de los mismos durante el almacenamiento.

3.6 Bibliografía

Al-Hamdani AM, Cooke RC (1987) Effects of water potential on accumulation and exudation of carbohydrates and glycerol during sclerotium formation and myceliogenic germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. Transactions of the British Mycological Society 89(1):51-60. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(87\)80057-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(87)80057-8)

Baard SW, Van Wyk PWJ, Pauer GDC (1981) Structure and lysis of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. Transactions of the British Mycological Society 77(2):251-260. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(81\)80027-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(81)80027-7)

Behle RW, Jackson MA (2014) Effect of Fermentation Media on the Production, Efficacy, and Storage Stability of *Metarhizium brunneum* Microsclerotia Formulated as a Prototype Granule. Journal of Economic Entomology 107(2):582-590. <https://doi.org/10.1603/ec13426>

Bernardo C das C, Pereira-Junior RA, Luz C, Mascarin GM, Kamp Fernandes ÉK (2020) Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. Fungal Biology 124(8):714-722. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.003>

Braga GUL, Rangel DEN, Fernandes ÉKK, Flint SD, Roberts DW (2015) Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics* 61(3):405-425. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0483-0>

Braga GUL, Rangel DEN, Flint SD, Anderson AJ, Roberts DW (2006) Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology* 82(2):418. <https://doi.org/10.1562/2005-05-08-ra-52>

Colotelo N, Sumner JL, Voegelin WS (1971) Chemical studies on the exudate and developing sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DeBary. *Canadian Journal of Microbiology* 17(9):1189-1194. <https://doi.org/10.1139/m71-190>

Corval ARC, Mesquita E, Corrêa TA, Silva C de SR, Bitencourt R de OB, Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP, Roberts DW, Gôlo PS (2021) UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology* 61(1):15-26. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000515>

Cotes A. M. (Ed.). (2018). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros (Vol. 1 y Vol 2). Primera, ed. Agrosavia editorial, Mosquera, Cundinamarca, Colombia, pp. 928-930.

Dunlap CA, Jackson MA, Saha BC (2011) Compatible solutes of sclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris* under different culture and drying conditions. *Biocontrol Science and Technology* 21(2):113-123. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.534551>

Faria M, Lopes RB, Souza DA, Wraight SP (2015) Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 125:68-72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>

Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Braga GUL, Roberts DW (2015) Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>

Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Moraes ÁML, Bittencourt VREP, Roberts DW (2007) Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology* 96(3):237-243. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.05.007>

Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA (2014) Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 50(2):105-113. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020094>

Goble TA, Gardescu S, Fisher JJ, Jackson MA, Hajek AE (2016) Conidial production, persistence and pathogenicity of hydromulch formulations of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia under forest conditions. *Biological Control* 95:83-93. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.003>

Gomez-Miranda B, Leal JA (1979) Chemical composition of *Botrytis cinerea* sclerotia. *Transactions of the British Mycological Society* 73(1):161-164. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(79\)80089-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(79)80089-3)

Hallsworth JE, Magan N (1995) Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology* 141(5):1109-1115. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-5-1109>

Hallsworth JE, Magan N (1996) Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7):2435-2442. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2435-2442.1996>

Hong TD, Jenkins NE, Ellis RH (2000) The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological Research* 104(6):662-665. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001872>

Ignoffo CM, Garcia C (1992) Influence of Conidial Color on Inactivation of Several Entomogenous Fungi (Hyphomycetes) by Simulated Sunlight. *Environmental Entomology* 21(4):913-917. <https://doi.org/10.1093/ee/21.4.913>

Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* 55(1):129-145. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y>

Jackson MA, Jaronski ST (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research* 113(8):842-850. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>

Jackson MA, Jaronski ST (2012) Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology* 22(8):915-930. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.696578>

Jackson MA, Schisler DA (1995) Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicide propagules. *Mycological Research* 99(7):879-884. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80745-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80745-4)

Jaronski ST, Jackson MA (2008) Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology* 18(8):849-863. <https://doi.org/10.1080/09583150802381144>

Kobori NN, Mascarin GM, Jackson MA, Schisler DA (2015) Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* 119(4):179-190. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>

Rangel D, Butler M, Torabinejad J, Anderson A, Braga G, Day A, Roberts D (2006) Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 170–182.

Lastra B, Gómez L a. (2006) La cría de *Diatraea saccharalis* (F.) para la producción masiva de sus enemigos naturales. *Serie Técnica Ceñicaña* 36(3):30.

Le Tourneau D (2016) Mycological Society of America Trehalose and Acyclic Polyols in Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Society of America Stable*, 58(6):934-942. <http://www.jstor.org/stable/3757064>

Li J, Feng MG (2009) Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological Research* 113(1):93-99. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.08.006>

Mascarin GM, Jaronski ST (2016) The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(11):1-26. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>

Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Í, Fernandes ÉKK, Luz C, Faria M (2018) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165: 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>

Mejía C, Espinel C, Forero M, Ramos FA, Pedro FB, Villamizar L, Mejía C, Espinel C, Forero M, Ramos FA, Pedro FB, Mejía C, Brandão FB, Ramos FA (2020) Improving ecological fitness of *Beauveria bassiana* conidia to control the sugar cane borer *Diatraea saccharalis*. *Biocontrol Science and Technology* 0(0):1-18. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1738343>

Moore D, Douro-Kpindou OK, Jenkins NE, Lomer CJ (1996) Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* Conidia. *Biocontrol Science and Technology* 6(1):51-62. <https://doi.org/10.1080/09583159650039520>

Paixão FRS, Huarte-Bonnet C, Ribeiro-Silva C de S, Mascarin GM, Fernandes ÉKK, Pedrini N (2021) Tolerance to Abiotic Factors of Microsclerotia and Mycelial Pellets From *Metarhizium robertsii*, and Molecular and Ultrastructural Changes During Microsclerotial Differentiation. *Frontiers in Fungal Biology* 2(April):1-12. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.654737>

Puttikamonkul S, Willger SD, Grahl N, Perfect JR, Movahed N, Bothner B, Park S, Paderu P, Perlin DS, Cramer RA (2010) Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology* 77(4):891-911. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07254.x>

Rivas-Franco F, Hampton JG, Altier NA, Swaminathan J, Rostás M, Wessman P, Saville DJ, Jackson TA, Jackson MA, Glare TR (2020) Production of Microsclerotia From Entomopathogenic Fungi and Use in Maize Seed Coating as Delivery for Biocontrol Against *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4(December):1-13. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.606828>

Song Z (2018) Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors, and molecular mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(23):9873-9880. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9400-z>

Song Z, Shen L, Zhong Q, Yin Y, Wang Z (2016) Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematology* 18(6):719-726. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002987>

Song Z, Yin Y, Jiang S, Liu J, Wang Z (2014) Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. *BioControl* 59(5):597-605. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9589-4>

Teertstra WR, Tegelaar M, Dijksterhuis J, Golovina EA, Ohm RA, Wösten HAB (2017) Maturation of conidia on conidiophores of *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology* 98:61-70. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.12.005>

Torres-Torres L, Espinel-Correal C, Santos-Díaz AM (2020) Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoinsecticidas. 46(2): e7678.

Tseng MN, Chung PC, Tzean SS (2011) Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology* 77(13):4508-4519. <https://doi.org/10.1128/AEM.02033-10>

Villamizar LF, Barrera G, Marshall SDG, Richena M, Harland D, Jackson TA (2020) Three-dimensional cellular aggregates formed by *Beauveria pseudobassiana* in liquid culture with potential for use as a biocontrol agent of the African black beetle (*Heteronychus arator*). *Mycology* 00(00):1-14. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1754953>

Villamizar LF, Nelson TL, Jones SA, Jackson TA, Hurst MRH, Marshall SDG (2018) Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. *Biocontrol Science and Technology* 28(12):1097-1113. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1514584>

Villamizar R LF, Cotes AM (2003) Efecto de las condiciones de cultivo sobre parámetros del modo de acción de *Metarhizium anisopliae*. *Revista Colombiana de Entomología* 29(2):121-126

Wang C, Pi L, Jiang S, Yang M, Shu C, Zhou E (2018) ROS and trehalose regulate sclerotial development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Fungal Biology* 122(5):322-332. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.02.003>

Wang SYC, le Tourneau D (1971) Carbon sources, growth, sclerotium formation and carbohydrate composition of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Archiv für Mikrobiologie* 80(3):219-233. <https://doi.org/10.1007/BF00410123>

Willettts HJ, Bullock S (1992) Developmental biology of sclerotia. *Mycological Research* 96(10):801-816. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81027-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81027-7) Wang C, Pi L, Jian

4. Capítulo 4: Identificación de metabolitos con potencial actividad insecticida producidos durante la formación de microesclerocios por la cepa de *Metarhizium robertsii* Mt004.

Resumen

Actualmente los microesclerocios (ME) son considerados los propágulos fúngicos más promisorios para ser incluidos como ingrediente activo dentro de formulaciones para el control de insectos plaga. Su producción se realiza en fermentación sumergida donde generalmente la biomasa es separada y formulada; no obstante, no se le suele dar uso a los metabolitos (extracelulares) producidos en el caldo de fermentación. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial insecticida de los metabolitos producidos por la cepa Mt004 durante la formación de ME en fermentación sumergida. Lo anterior, con el fin de aprovechar todo el recurso biológico (microesclerocios y caldo de fermentación) con miras al desarrollo de un bioplaguicida altamente activo, que además sea estable y resistente a condiciones de estrés ambiental.

La producción de ME se llevó a cabo en un medio de cultivo que se componía de una relación C:N 55:1 (denominado medio de cultivo D, Capítulo II), su caracterización ecofisiológica y biológica se hizo en el capítulo III, encontrado que son resistentes a la radiación UV y la temperatura, y mantienen su capacidad de infectar insectos plaga. Con el fin de caracterizar los metabolitos producidos durante la formación de los ME, los fermentados libre de células fueron extraídos con solvente orgánico (AcOEt: DCM 1:1). Los extractos fueron analizados por HPLC-MS/MS y posteriormente su actividad

insecticida fue evaluada sobre larvas de *D. saccharalis*. Después de 15 días de la ingestión, tanto el sobrenadante libre de células (SC), como la fracción orgánica (FO), causaron una mortalidad del 48% cuando se usaron en una concentración de 500 ppm, mientras el residuo acuoso mostró una letalidad de 17,2%.

Los datos de MS/MS obtenidos para la FO, activa como insecticida, fueron usados en la construcción de redes moleculares utilizando la plataforma GNPS (*Global Natural Product Molecular Networking Social*), y algunos de los *features* fueron derreplicados. El análisis arrojó que la FO se componía principalmente de compuestos de la familia de los ciclodepsipéptidos sugiriendo la presencia de 24 destruxinas, entre las que se encuentran la destruxina A, A₂, B reconocidas por su actividad insecticida.

Tanto los microesclerocios, como los metabolitos liberados durante su formación, causaron mortalidad sobre el insecto modelo. Lo anterior sugiere que ambos recursos pueden ser usados como ingredientes activos de una formulación y considerando que los mecanismos de acción son diferentes para los propágulos fúngicos y para los metabolitos, es posible que haya efectos aditivos y sinérgicos que resulten en un bioplaguicida de alta eficiencia.

4.1 Introducción

El hongo entomopatógeno *Metarhizium* sp. ha sido profundamente estudiados por su potencial insecticida sobre numerosas especies de insectos patógenos. El interés en la utilización de estos hongos como bioinsecticida se debe principalmente a sus características patogénicas, incluida la producción de metabolitos secundarios (Carollo et al. 2010). La aplicación de compuestos con actividad insecticida para el control de plagas ha sido considerada como alternativa ya que son biodegradables, no son tóxicos frente a poblaciones no diana, son altamente selectivos y tienen un bajo desarrollo de resistencia en la población del insecto plaga (Yadav et al. 2019), contrario a la utilización de agroquímicos.

Los metabolitos producidos por miembros del género *Metarhizium* que han sido más estudiados son las destruxinas, una familia de ciclodepsipéptidos con capacidad insecticida, antiviral, fitotóxica y anticancerígena (Schrank y Vainstein 2010; Wang et al. 2019; Patel 2020). Las destruxinas son ciclodepsipéptidos que comprenden 5 aminoácidos

y un hidroxiaácido que juntos forman un anillo macrocíclico de 19 miembros. Generalmente, el hidroxiaácido forma un enlace amida con la prolina de la posición 2 (AA2), enseguida, desde el *N* al *C* terminal con la isoleucina en la posición 3 (AA3), *N*-metilvalina en posición 4 (AA4), *N*-metilalanina en posición 5 (AA5), que forma un enlace amida con la β -alanina de la posición 6 (AA6) que a su vez esterifica el grupo α -hidroxiaácido para completar el macrociclo (Donzelli et al. 2012; Arroyo-Manzanares et al. 2017; Lodesani et al. 2017) (Figura 4-1)

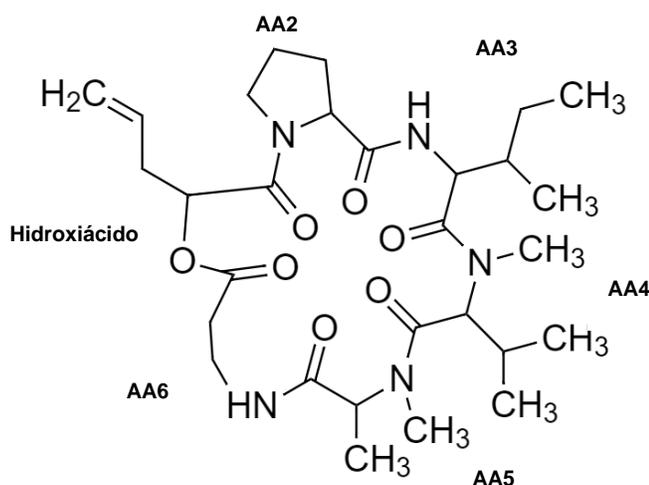


Figura 4-1. Estructura de la destruxina A

Las destruxinas están clasificadas dentro de 5 principales series, según la cadena lateral del α -hidroxiaácido. Otras subseries se dan según las diferencias en el patrón de sustitución de los aminoácidos (Donzelli y Krasnoff 2016; Lodesani et al. 2017). Las destruxinas A, B y E son los compuestos más reconocidos por su actividad biológica y abundancia, tienen la misma secuencia de aminoácidos pero difieren en el grupo radical del hidroxiaácido (Lodesani et al. 2017; Oide y Turgeon 2020) y han mostrado una actividad insecticida importante, causando un debilitamiento de las defensas del insecto hospedero, incluyendo daños en el sistema muscular y los túbulos de Malpighi, afectando la excreción, alimentación y movilidad (Schrank y Vainstein 2010; Lodesani et al. 2017; He et al. 2018; Yadav et al. 2019; Patel 2020). De acuerdo con los aminoácidos que componen cada una de las destruxinas, se asignan diferentes subíndices, el subíndice X_1 , indica el cambio de la prolina (AA₂) por el ácido pipercolico mientras que el subíndice X_2 indica el cambio de la isoleucina por la valina (AA₃) (Arroyo-Manzanares et al. 2017).

También se han identificado en *Metarhizium* spp. otros metabolitos como las citocalasinas (C y D), myroridina, viridoxina, ácido helvónico, serinociclina, entre otros (Donzelli y Krasnoff 2016; Yadav et al. 2019); sin embargo, el estudio de la actividad biológica y química de estos compuestos ha sido menor (Donzelli y Krasnoff 2016).

Tradicionalmente se ha pensado que los microesclerocios son estructuras esencialmente latentes metabólicamente; no obstante, se ha demostrado que se da la producción de compuestos durante la formación de esclerocios bajo condiciones de laboratorio en medios artificiales (Calvo y Cary 2015). Se ha propuesto que, muchos de los metabolitos presentes en los microesclerocios se producen en etapas tempranas de su morfogénesis, especialmente durante la fusión hifal (Calvo et al. 2002; Calvo y Cary 2015).

Entre los grupos de metabolitos más reconocidos, que son producidos durante la formación esclerotial, se encuentran la ergolina (*ergot alkaloid*) que representa una compleja familia derivados de indoles con diversidad de estructuras y con amplio espectro de acción biológica y farmacéutica producida principalmente por el género *Claviceps* spp., otro compuesto es la asparasona A perteneciente a la familia de las antraquinonas, es producida por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, como un intermediario en la síntesis de aflatoxina y reconocida por ser un pigmento muy intenso que tiene funciones fotoprotectoras (Sobolev et al. 1997; Calvo y Cary 2015). La aflatoxina, es una micotoxina perteneciente al grupo de policétidos derivados de furanocoumarinas que se producen a partir de acetatos a través de la vía de policétidos sintasa y dos ácidos grasos sintetasas (Calvo y Cary 2015). La aflatoxina B1 es una de las más importantes debido a sus propiedades cancerígenas en el humano y su presencia frecuente en muchos alimentos a nivel mundial (Caceres et al. 2020).

En cuanto a la función biológica de los metabolitos producidos durante la formación de los microesclerocios, se les ha atribuido un papel en la defensa química frente a insectos depredadores, y en la competencia contra otros organismos; sin embargo, es necesario reforzar investigaciones de otros posibles roles de los metabolitos producidos en la biología de los esclerocios (Calvo y Cary, 2015).

De otro lado, uno de los principales retos en el estudio de productos naturales es la alta tasa de re-descubrimiento de los mismos (Mohimani et al. 2018). El proceso de utilizar la información sobre la estructura química de un producto natural conocido para identificar un

compuesto dentro de una muestra experimental (evitando procesos de aislamiento y determinación de la estructura) se denomina derreplicación (Mohimani et al. 2018). Los primeros enfoques de derreplicación se basaron en la utilización del dato de m/z $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ en el espectro de masas de alta resolución (HRMS), y la búsqueda en bases de datos especializadas de la estructura química con la fórmula química deducida de ese dato. Sin embargo, este enfoque ha perdido interés debido al creciente número de productos naturales que cumplen con la masa molecular sugerida, es decir, de isómeros identificados en la naturaleza (Mohimani et al. 2018). En este sentido, se han propuesto otros enfoques como la construcción de redes moleculares en la plataforma del GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*) a partir de espectrometría de masas en tándem (Wang et al. 2016), que además del dato de m/z $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ incluye la fragmentación MS/MS, que es característica de cada estructura.

GNPS es una plataforma interactiva enfocada en el almacenamiento, análisis y difusión de información de espectros de MS/MS que permite el intercambio de espectros en bruto, realizar anotaciones de los espectros depositados y curar los datos de espectros de referencia, así como de los datos experimentales. Esta plataforma no sólo sirve como repositorio de los espectros obtenidos en estudios no dirigidos de espectrometría de masas en tándem (metadatos), sino que también permite su difusión con todo el público interesado.

Es una plataforma de libre acceso que provee información química de una sustancia de la que se ha obtenido un espectro de masas en tándem. También permite conocer aspectos biológicos de relevancia del compuesto(s) de interés (Wang et al. 2016; Nothias et al. 2020).

Dentro de la plataforma GNPS se puede realizar la derreplicación frente a una gran cantidad de bases de datos especializadas en productos naturales, tanto con las librerías propias de GNPS, así como también con otras conocidas como *MassBank*, *ReSpect*, *MIADB*, *CASMI*, *PNNL lipids*, *Sirenas/Gates* y *EMBL MCF*, entre otras (Vargas, 2020). Esta plataforma puede hacer la detección de “*match*” (coincidencias) significativos con análogos putativos de compuestos conocidos (es decir, puede hacer coincidir moléculas que difieren en algún modificación o sustitución de grupos químicos) o compuestos pertenecientes a una misma clase de moléculas (Wang et al, 2016).

Por otro lado, una de las grandes contribuciones de esta plataforma es la construcción de redes moleculares que permite la visualización de datos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (representados como puntos interconectados) resaltando las similitudes estructurales (que se evidencian como *edges* que conectan puntos) entre los compuestos presentes en un extracto, permitiendo así describir la diversidad química de los metabolitos presentes en un extracto (mezcla compleja) de un sistema biológico (Nothias et al. 2020, Afoullouss et al. 2022).

GNPS usa un algoritmo que le permite comparar similitudes de espectros experimentales de fragmentación generando un “*cosine score*” para cada par de espectros de MS/MS. La detección, comparación y alineamiento de los espectros similares parte del principio de que moléculas estructuralmente similares producirán espectros de MS/MS con fragmentos de iones comunes, por lo que el “*cosine score*” tiene como objetivo medir dicha similitud espectral. Para ello, la plataforma realiza la alineación entre espectros asignando un valor de coseno (0 a 1) (*cosine score*) de cada combinación y así, describir su similitud de acuerdo con los patrones de fragmentación (Nothias et al. 2020, Afoullouss et al. 2022).

Los nodos con espectros de MS/MS similares, y, por lo tanto, con un alto puntaje de consenso “*cosine score*” (valor recomendado ≥ 0.7) y las conexiones entre ellos “*edges*” forman entonces un grupo “*cluster*”, que finalmente representa la “familia molecular” donde los metabolitos comparten la mayoría de sus características químicas (Nothias et al. 2020, Afoullouss et al. 2022). A continuación, cada nodo o familia molecular puede ser anotado mediante bibliotecas o bases de datos internos o públicas (Nothias et al. 2020; Afoullouss et al. 2022).

Para la construcción de redes moleculares y su análisis, la plataforma provee dos herramientas, una clásica denominada *Classical Molecular Networking* (CLMN) y una avanzada, *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN). En este trabajo se utilizó la herramienta FBMN que usa datos de MS¹ (patrón isotópico y tiempos de retención) y los datos de MS/MS creando redes moleculares más reproducibles y precisas (Afoullouss et al. 2022). La visualización de las redes construidas con FBMN cumplen el mismo principio anteriormente mencionado, con la diferencia de que los nodos con esta herramienta son llamados “*features*” (espectro MS/MS y tiempo de retención).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este capítulo fue evaluar, caracterizar e identificar los metabolitos producidos durante la formación de ME mediante espectrometría de masas en tándem y el uso de la plataforma de *GNPS*. Hasta dónde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio de metabolitos producidos por *M. robertsii* Mt004 durante la formación de microesclerocios.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 General

Para la producción de ME a partir de la cepa Mt004 de *M. robertsii* se utilizó el medio de cultivo codificado como Medio D, con la siguiente composición (por Litro): Glucosa 36 g (Merck), Extracto de levadura 3.6 g, (Scharlau), KH_2PO_4 4.0 g (Sigma); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g (Sigma), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g (Merck); $\text{Fe}_2(\text{SO})_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g (Sigma); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 37 mg, (Merck), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.016 g (Merck); y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.014 g (Roda Química Ltda).

Para la producción de destruxinas a partir de la cepa Mt008 de *M. robertsii* se utilizó un medio de cultivo codificado como $\text{G}_{20}\text{P}_{20}$, con la siguiente composición (por Litro): Glucosa 20 g (Merck), Peptona 20 g (Merck).

Para la extracción se utilizó diclorometano grado HPLC (Mol Labs), Acetato de etilo grado GC (Merck), Agua miliQ y sulfato de sodio (Na_2SO_4) (Sigma).

El análisis de HPLC-MS/MS se hizo en un equipo Agilent Technologies 1260 acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF 6545.

Para los ensayos de actividad biológica, se utilizaron recipientes plásticos de media onza (Vacan®), cajas plásticas de 64 onzas (Selloplus®) y maíz tierno convencional.

4.2.2 Producción de ME con la cepa *M. robertsii* Mt004

La producción de ME se realizó en Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio de cultivo D. El inóculo se preparó a partir de cultivos esporulados en agar de 10 días de edad que fueron lavados superficialmente con una solución de Tween 80 al 0,5%. La

suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^8 conidios/mL mediante recuento en cámara de Neubauer; y posteriormente ésta se utilizó para inocular los Erlenmeyers que se ajustaron a una concentración inicial de 1×10^6 conidios/mL usando el mismo medio D. Se utilizaron tres unidades experimentales (Erlenmeyers) por tratamiento, que fueron incubados en un agitador orbital MaxQ™ 4000 (Thermo Fisher Scientific) a 200 rpm y 25°C durante 20 días.

4.2.3 Producción de destruxinas a partir de la cepa Mt008 de *M. robertsii* (Control positivo)

Como control positivo se utilizó una fracción activa que contenía destruxinas confirmadas por análisis de espectrometría de MS/MS a partir de una cepa Mt008 de *M. robertsii* aislada del insecto *Rhammatocerus schistocercoides* (langosta llanera) y conservada en la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Agrosavia mediante criopreservación a -80°C.

La fracción activa fue producida y suministrada por el grupo de investigación del C.I Nataima (Agrosavia) (Lozano et al, 2021). Brevemente, la cepa fue inoculada en el medio G₂₀P₂₀ durante 20 días de fermentación. Pasado ese tiempo, la fracción activa fue obtenida mediante un proceso de diálisis, cromatografía en fase normal (eluyentes: 2-propanol y acetato de etilo 8:2) y cromatografía en fase reversa HPLC semipreparativa empleando un equipo HPLC Agilent 1280 Infinity con detector DAD (204 nm) (Lozano et al, 2021, Angel et al, 2021).

4.2.4 Extracción de metabolitos

Después de 20 días de fermentación en el medio de cultivo D, los microesclerocios fueron separados del medio de cultivo mediante filtración al vacío con un embudo Buchner a través de papel filtro Whatman No.1. El sobrenadante fue centrifugado a 10000 rpm durante 15 minutos, y posteriormente filtrado por un filtro de membrana de 0,22 µm, a este sobrenadante se le denominó “sobrenadante crudo” (SC).

Se tomaron 100 mL del SC, y se sometieron a partición L-L con una mezcla de acetato de etilo: diclorometano (1:1), en un embudo de decantación de 250, la mezcla se dejó reposar

durante 3 minutos hasta evidenciar la separación de las dos fases orgánica (FO) y acuosa (FW), que se recuperaron por separado.

A continuación, la FO fue secada sobre 2 g de sulfato de sodio anhidro, y filtrada al vacío con una membrana de 0,22 μm . La FO fue concentrada en rotaevaporador a 40°C. La muestra concentrada fue resuspendida en 1 mL de agua MiliQ, y posteriormente liofilizada y almacenada a 4°C bajo condiciones de oscuridad hasta su análisis. Por otro lado, la FW fue liofilizada y almacenada a 4°C hasta su respectivo análisis biológico.

Un procedimiento análogo se hizo con el medio de cultivo sin inocular con el fin de obtener los controles correspondientes, denominados como sobrenadante crudo (SC-C), fracción orgánica (FO-C) y fracción acuosa (FW-C).

4.2.5 Determinación de actividad insecticida de los metabolitos producidos por la cepa Mt004 de *M. robertsii* sobre larvas de *Diatraea saccharalis* bajo condiciones de laboratorio

4.2.5.1 Obtención de insectos

Los experimentos se llevaron a cabo con larvas de *D. saccharalis* provenientes de la colonia mantenida en la Unidad de Crías de Insectos de AGROSAVIA ubicada en Mosquera, Cundinamarca (Colombia), que se estableció con larvas donadas por Cenicaña (Centro Colombiano de Investigación de la caña de azúcar). La cría fue mantenida en condiciones de temperatura de 25±5°C con una humedad relativa de 60 ± 10% y un fotoperíodo de 16 h de luz: 8 h de oscuridad. Las larvas fueron alimentadas con la dieta artificial descrita por Lastra y Gómez (2006)

4.2.5.2 Evaluación de actividad insecticida

Para este ensayo, se utilizó el método de ingestión mediante la técnica de la gota (Hughes & Wood, 1981). Los tratamientos se describen en la Tabla 4.1. Se tomó 1 mg de cada tratamiento y se suspendió en 1 mL de agua miliQ (1000 ppm). Posteriormente se diluyó a la mitad con una solución de sacarosa al 4% que contenía el colorante azul de alimentos

Tuska® (Azul No. 1 y Azul No. 2) al 2%, obteniendo una concentración final de cada extracto de 500 ppm.

Tabla 4-1. Tratamientos evaluados sobre larvas de *D. saccharalis*

Tratamiento	Descripción	Concentración de la prueba
FO	Fracción orgánica del medio de cultivo D inoculado con el hongo Mt004	500 ppm
FO-C	Fracción orgánica del medio de cultivo D sin inóculo fúngico (Control Negativo)	500 ppm
FW	Fracción acuosa del medio de cultivo D inoculado con el hongo Mt004	500 ppm
FW-C	Fracción acuosa del medio de cultivo D sin inóculo fúngico (Control Negativo)	500 ppm
FO-Medio G ₂₀ P ₂₀	Fracción orgánica del medio de cultivo G ₂₀ P ₂₀ inoculado con el hongo Mt008 (Control Positivo)	500 ppm
SC	Sobrenadante crudo del medio de cultivo D inoculado con el hongo Mt004	Directo (sin dilución)
SC-C	Medio de cultivo D sin inóculo fúngico (Control Negativo)	Directo (sin dilución)
Testigo absoluto	Sin tratamiento	N.A

Se dispensaron gotas de 2 µL en forma circular en un disco plástico de color blanco, y se ubicaron 40 larvas en el interior del círculo. Se esperó hasta que las larvas bebieran el tratamiento, comportamiento evidenciado por la coloración azul en el cuerpo de éstas como consecuencia de la ingestión del tratamiento (Figura 4-2).



Figura 4-2. Larva de *D. saccharalis* a) antes, b) durante y c) después de la ingestión de los tratamientos.

Se seleccionaron 30 larvas con coloración azul, es decir que habían comido, y se ubicaron individualmente en vasos plásticos con un grano de maíz tierno como sustrato de alimentación. Se ubicaron en grupos de 10 unidades de muestreo en tres cajas Selloplus® (unidad experimental). El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones y un testigo absoluto donde las larvas no se sometieron a ningún tratamiento. Este ensayo fue repetido dos veces en el tiempo.

Como control positivo se usó la cepa Mt008 de *M. robertsii* inoculada en un medio de cultivo líquido G₂₀P₂₀. El sobrenadante crudo fue obtenido después de 20 días de fermentación, y la fracción orgánica (FO-Medio G₂₀P₂₀) fue obtenida como se describe en el ítem 4.2.3.

La mortalidad larval fue evaluada cada dos días durante 15 días. Con los resultados se calculó la eficacia (mortalidad corregida) mediante la fórmula de Schneider-Orelli que se describe a continuación (Zar, 2007):

$$Eficacia = 100 \times \frac{Mortalidad\ del\ tratamiento\ (\%) - Mortalidad\ del\ control\ (\%)}{100 - Mortalidad\ del\ control\ (\%)}$$

4.2.6 Análisis de las fracciones orgánicas por HPLC-DAD

Para el análisis de HPLC según la metodología estandarizada por Angel et al (2021), se empleó una columna C18 Zorbax® Rx18 5 µm (4,6 mm x 250 mm). Los solventes empleados en la elución fueron agua (A) y acetonitrilo (B). El gradiente de elución fue el siguiente: se inició con 5% de la fase B y se llevó hasta el 52,5 % de B en 28 minutos, posteriormente se incrementó hasta 95% de B en el minuto 58, y se mantuvo al 95% durante 12 minutos más (minuto 70). El flujo se modificó de la siguiente manera: desde los 0 y hasta los 28 minutos un flujo de 3,8 mL/min; entre los 28 y 58 minutos, un flujo de 4 mL/min; y finalmente entre los 58 y 70 min un flujo de 4,5 mL/min.

El análisis de HPLC en la UNal se hizo en un equipo HPLC Agilent 1260 Infinity con un detector DAD. Se usó una columna cromatográfica columna Xterra® RP18 5 µm (4,6 mm x 250 mm) y un volumen de inyección de 100 µL (1 mg/ mL) a un flujo de 1,5 mL por minuto. Los solventes empleados fueron agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B, Merck grado HPLC) y el método de análisis fue el siguiente: un gradiente que inició con 2% de la fase B hasta 20% durante 30 minutos, posteriormente un incremento lineal hasta el 95% de la fase B al alcanzar los 45 minutos de corrida.

4.2.7 Análisis de la fracción orgánica por HPLC-MS/MS

El análisis se realizó empleando un sistema de Cromatografía de Líquidos Agilent Technologies 1260 acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF 6545 con ionización por *electrospray*. Se inyectaron 10 μ L de cada muestra en una columna C18 Luna Omega Polar (250 x 4.6 mm, 5 μ m) a 40°C. La elución se hizo con agua acidificada al 0.1 % (v/v) (SIGMA-ALDRICH grado reactivo 98% pureza), usando agua tipo I Milli-Q (Fase A); y acetonitrilo acidificado con ácido fórmico al 0.1 % (v/v) (SUPELCO-MERCK grado LC-MS) (Fase B) a un flujo constante de 0,6 mL/min. El gradiente inició con 2% hasta 20% durante 30 minutos de la fase B, enseguida de 30 a 50 minutos se incrementó hasta 95% de la fase B, y se mantuvo al 95% de B durante 5 minutos. La detección por espectrometría de masas se realizó en modo ESI positivo en *full scan* de 50 a 1100 *m/z* con las condiciones establecidas para el GNPS (Tabla 4-2) (Aaron et al. 2020).

Tabla 4-2. Condiciones de espectrometría de masas

Fuente Dual AJS ESI	
<i>Vcap (V)</i>	3500
<i>Drying Gas (L/min)</i>	12
<i>Gas Temp (°C)</i>	250
<i>Nebulizer (psi)</i>	52
<i>Sheat Gas Temp (°C)</i>	370
<i>Sheat Gas Flow (L/min)</i>	11
MS TOF	
<i>Fragmentor (V)</i>	175
<i>Skimmer (V)</i>	65
<i>OCT RF Vpp (V)</i>	750

Durante todo el análisis, para la corrección de masas se emplearon dos masas de referencia: *m/z* 121.0509 (C₅H₄N₄), y *m/z* 922.0098 (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄).

Para el modo de adquisición auto MS/MS positivo se realizaron inyecciones de cada una de las muestras empleando energía de colisión fijas de 20 eV. Las condiciones empleadas se muestran en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3. Parámetros de adquisición AutoMS/MS

Modo de adquisición Auto MS/MS	
Mass Range (MS): 50-1100 <i>m/z</i>	Mass Range (MS/MS): 50-1100 <i>m/z</i>
Acquisition Range (MS): 1 spectra/s	Acquisition Range (MS/MS): 3 spectra/s
Acquisition Time (MS): 1000 ms/spectrum	Acquisition Time (MS/MS): 333,33 ms/ spectrum
Collision Energy: 20 eV	Isolation Width: Narrow ~ 1.3 <i>m/z</i>

Los datos de HPLC-MS/MS, fueron convertidos a formato .mzXML en el programa *Proteowizard*, luego fueron exportados y analizados en el programa *MZmine 2.51*. Para el tratamiento de datos se utilizaron los siguientes módulos: detección de masas, construcción de cromatogramas, deconvolución de picos individuales, agrupamiento de isótopos y alineamiento. Los parámetros de análisis utilizados son presentados en la Tabla 4-4 y fueron establecidos según el manual del programa (Pluskal et al., 2010), y los usados en nuestro grupo de investigación por Romero (2016), Betancur (2018) y Martínez (2019).

Tabla 4-4. Valores de parámetros usados para el programa *MZmine*

Mass detection (Centroid mass detector)	
<i>Noise level MS1</i>	1.0x10 ⁴
<i>Noise level MS2</i>	5.0x10 ²
Chromatogram ADAP builder	
<i>Min group size in # of scans</i>	5
<i>Group intensity threshold</i>	1.0x10 ⁴
<i>Min highest intensity</i>	3.0x10 ⁴
<i>m/z tolerance</i>	0.05 <i>m/z</i> o 10 ppm
Chromatogram deconvolution (Baseline cut-off)	
<i>Min peak height</i>	3.0x10 ⁴
<i>Peak duration range (min)</i>	0.01-3
<i>Baseline level</i>	1.0x10 ⁴
<i>m/z range for MS2 scan pairing (Da)</i>	0.05
<i>RT range for MS2 scan pairing (min)</i>	0.2
Isotopic peaks grouper	
<i>m/z tolerance</i>	0.05 <i>m/z</i> o 10 ppm
<i>Retention time tolerance (min)</i>	0.2
<i>Maximum charge</i>	3
Alignment (Join aligner)	
<i>m/z tolerance</i>	0.05 <i>m/z</i> o 10 ppm

<i>RT tolerance</i>	0.2
<i>Weight m/z</i>	75
<i>Weight for RT</i>	25

Luego de procesar los datos con los parámetros ejecutados, en la opción de filtrado de picos MS/MS se seleccionó la opción *Keep only peaks with MS2 scan*. En la matriz se eliminaron todos los picos presentes en el blanco del medio y blanco del solvente. La matriz fue exportada empleando la función *Export for/Submit for GNPS-FMBN*, que generó la creación de dos formatos: *Quantification table* (formato .CVS) y *MS2 file* (formato .mgf). Adicionalmente fue creada una *metadata* donde contenía la descripción de los tratamientos (Anexo B).

4.2.7.1 Derreplicación

Para la identificación de los picos obtenidos, la plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>) cuenta con 3 tipos de librerías de espectros: librerías espectrales propias del GNPS (*GNPS-Collections*), las compartidos por la comunidad científica (*GNPS-Community*) y librerías externas como *MassBank*, *ReSpect*, y *NIST* (Vargas et al, 2020, Aaron et al. 2020). En cada de una de ellas se buscaron los espectros de MS/MS obtenidos para los picos eluidos. Los picos que no pudieron ser identificados por la plataforma, se buscaron en el programa SIRIUS+CSI:FingerID GUI and CLI-Versión 4.9.12: (<https://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/>) (Dührkop et al., 2019). SIRIUS analiza los patrones de isótopos de espectros de MS junto con el análisis de patrones de fragmentación de espectros de MS/MS combinados con CSI:Finger ID que deduce la fórmula estructural con búsqueda en bases de datos (Dührkop et al., 2019). Para la búsqueda se aceptó un error máximo de 10 ppm.

4.2.7.2 Construcción de redes moleculares

En la plataforma del GNPS se cargaron los archivos obtenidos en el programa *MZmine*, y fueron procesados teniendo en cuenta los parámetros establecidos por la plataforma GNPS (Wang et al., 2016), los cuales se describen a continuación (Tabla 4-5).

Tabla 4-5. Parámetros establecidos para la construcción de redes moleculares en la plataforma GNPS.

Parámetro	Valor
<i>Precursor Ion Mass Tolerance (Da)</i>	0.05
<i>Fragment Ion Mass Tolerance (Da)</i>	0.05
<i>Min Pairs Cos</i>	0.7
<i>Minimum Matched Fragment Ions</i>	6
<i>Maximum shift between precursors (Da)</i>	500
<i>Network Top K</i>	10
<i>Maximum Connected Component Size (Beta)</i>	100
<i>Library Search Min Matched Peaks</i>	6
<i>Score Threshold</i>	0.7
<i>Search Analogs</i>	Don't Search
<i>Maximum Analog Search Mass Difference (Da)</i>	100.0
<i>Top results to report per query</i>	1

4.3 Resultados

4.3.1 Producción de microesclerocios con la cepa Mt004 de *M. robertsii* y extracción de metabolitos

Para la producción de microesclerocios de la cepa Mt004 de *M. robertsii*, en el medio de cultivo D, se hizo una fermentación de 20 días. Se obtuvo una concentración promedio de los tres lotes de fermentación de 2×10^3 ME/mL. Enseguida, los ME fueron separados del caldo de fermentación por filtración, y el sobrenadante crudo fue fraccionado utilizando una mezcla 1:1 de AcOEt y DCM. Las fracciones acuosa y orgánica fueron secadas por separado. Por cada lote de fermentación, se obtuvieron alrededor de ~5 mg de la FO y ~50 mg de la fracción acuosa.

4.3.2 Determinación de actividad insecticida de los metabolitos producidos por *M. robertsii* Mt004 sobre larvas de *D. saccharalis* bajo condiciones de laboratorio

Se evaluó la actividad insecticida de cada una de las fracciones obtenidas anteriormente sobre larvas de *D. saccharalis*. La concentración de 500 ppm fue seleccionada por revisión bibliográfica donde se han estudiado concentraciones entre 250 ppm y 1000 ppm del extracto crudo de *Metarhizium* spp contra diferentes insectos plaga (Hu et al. 2006, Sree et al. 2008; Lozano-Tovar et al. 2015). Los metabolitos producidos por *M. robertsii* Mt004 durante la formación de ME en el caldo de fermentación D (SC) causaron mortalidad de las larvas a partir del tercer día de ingestión, la cual fue incrementando a medida que el tiempo de incubación aumentó, alcanzando una mortalidad final del 51,1% a los 15 días después de la inoculación de las larvas (Figura 4-3a). Este valor fue significativamente mayor ($F_{1,6}=21.9$, $p= 0.0034$) que el obtenido con el tratamiento utilizado como control negativo para este medio (SC-C), en el cual el hongo no fue inoculado, lo que sugiere que el efecto insecticida en el tratamiento SC se debe a los metabolitos producidos por el hongo y no a los componentes del medio de cultivo.

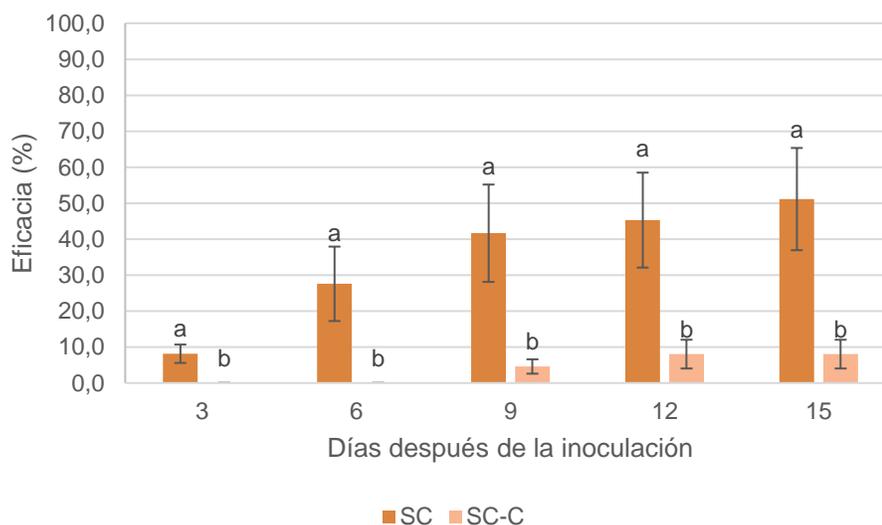


Figura 4-3a. Mortalidad de larvas de *D. saccharalis* causada por el sobrenadante crudo del medio D. (SC) Sobrenadante crudo del medio D después de la producción de ME; (SC-C) Sobrenadante crudo del medio D estéril. El análisis fue realizado de manera

independiente para día de inoculación. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

Con la fracción orgánica del medio de cultivo D (FO) y la fracción orgánica del medio G₂₀P₂₀ (FO Medio G₂₀P₂₀), que corresponde al Control Positivo, también se evidenció un efecto insecticida en las larvas de *D. saccharalis* a partir del tercer día de ingestión (Figura 4-3b), el cual incrementó paulatinamente hasta mortalidades del 48,2% y 54,6 respectivamente, después de 15 días. Estos valores fueron significativamente diferentes del tratamiento control negativo para la fracción orgánica del medio de cultivo D (FO-C) ($F_{2,10} = 16.1$, $p = 0.0007$).

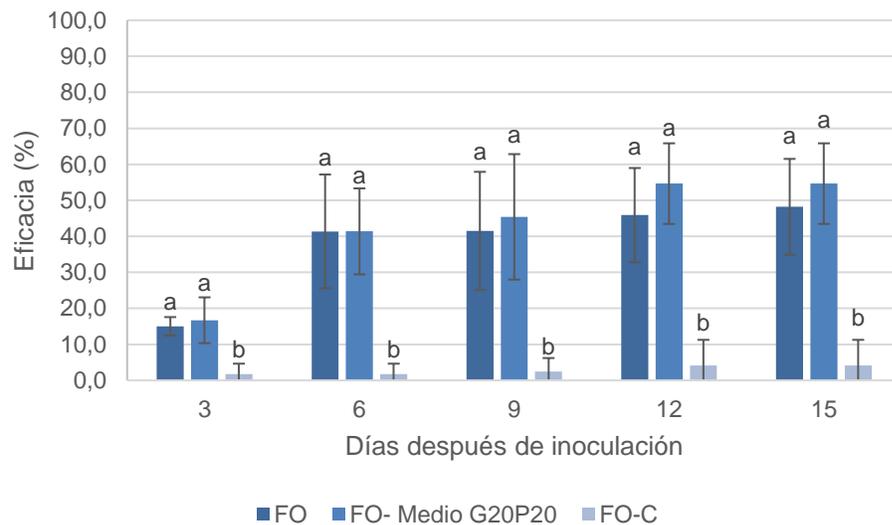


Figura 4-3b. Mortalidad de larvas de *D. saccharalis* causada por las fracciones orgánicas del medio D y el medio G₂₀P₂₀. (FO) Fracción orgánica del medio D después de la producción de ME, (FO-Medio G₂₀P₂₀) Fracción orgánica del medio G₂₀P₂₀ después de la fermentación con Mt008, (FO-C) Fracción orgánica del medio D estéril. El análisis fue realizado de manera independiente para día de inoculación. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

Contrario a lo observado con los dos ensayos mencionados anteriormente, la fracción acuosa del medio de cultivo D (FW) no causó una mortalidad significativa de las larvas de *D. saccharalis*. Después de los 15 días de ingestión, esta fracción causó una mortalidad del 17,3%, valor que no fue significativamente diferente ($F_{1,4} = 4.00$, $p = 0.1162$) del obtenido

con el control negativo, correspondiente a la fracción acuosa del medio antes de ser inoculado con el hongo (Figura 4-3c).



Figura 4-3c. Mortalidad de larvas de *D. saccharalis* causada por las fracciones acuosas del medio D. (FW) Fracción acuosa del medio de después de la producción de ME, (FW-C) Fracción acuosa del medio D estéril. El análisis fue realizado de manera independiente para día de inoculación. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

Tabla 4-6. Mortalidad de *D. saccharalis* después de 15 días de inoculación. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según comparación de medias Tukey (95%).

Tratamientos	Mortalidad (%)
FO Medio G ₂₀ P ₂₀	54,66 a
SC	51,14 a
FO	48,20 a
FW	17,24 b
FW-C	10,34 b
SC-C	8,05 b
FO-C	4,16 b

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la Tabla 4-6, la fracción orgánica del medio de cultivo D extrajo la mayoría de los compuestos con actividad insecticida, esto indica que dichos compuestos son de naturaleza medianamente polar como los oligopéptidos o policétidos; en cualquier caso, no son altamente polares. En este sentido, la fracción orgánica se seleccionó para continuar con los estudios de caracterización de los metabolitos bioactivos.

Con respecto a la sintomatología observada en las larvas de *D. saccharalis* durante el experimento, se puede decir que las larvas que ingirieron los tratamientos correspondientes al SC, FO y FO Medio G₂₀P₂₀ se mostraron débiles y con reducción del consumo de alimento en comparación con las larvas sanas no inoculadas. Los cadáveres de las larvas tratadas con dichos tratamientos fueron también de menor tamaño, y presentaron una coloración oscura, posiblemente debida a la descomposición del cuerpo causada por la acción de microorganismos saprófitos (Figura 4-4).

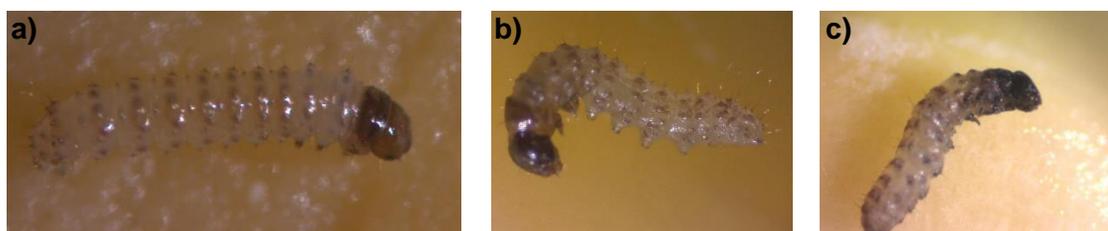


Figura 4-4. Larvas muertas después de 15 días de la ingesta del tratamiento FO. a): Larva sana, b y c): tratadas con FO.

4.3.3 Análisis de la metodología de extracción por HPLC-DAD.

El paso siguiente era evaluar la composición de las fracciones activas (SC, FO y FO Medio G₂₀P₂₀), para lo anterior se usó como patrón una fracción que contenía destruxinas de manera ya probada, y que serviría para implementar los métodos de HPLC a usar. La fracción activa utilizada en este trabajo fue producida por el grupo de investigación del C.I. Nataima (Agrosavia) utilizando la cepa de *M. robertsii* Mt008 cultivada en medio G₂₀P₂₀. Este extracto (que se denominó fracción control) fue obtenido mediante un proceso complejo que involucraba diálisis, y cromatografía en fase normal (eluyentes: 2-propanol y acetato de etilo 8:2), y se usó como control de presencia de destruxinas (Angel et al. 2021).

En la figura 4-5 se observa el cromatograma HPLC-DAD (204 nm) del extracto obtenido a partir del caldo de fermentación de la cepa *M. robertsii* Mt008. Los picos en tiempos de retención 23.04, 25.51 y 29.69 minutos corresponden a las destruxinas A₂, A y B de acuerdo con la caracterización previamente desarrollada por el grupo de investigación del C.I. Nataima de Agrosavia.

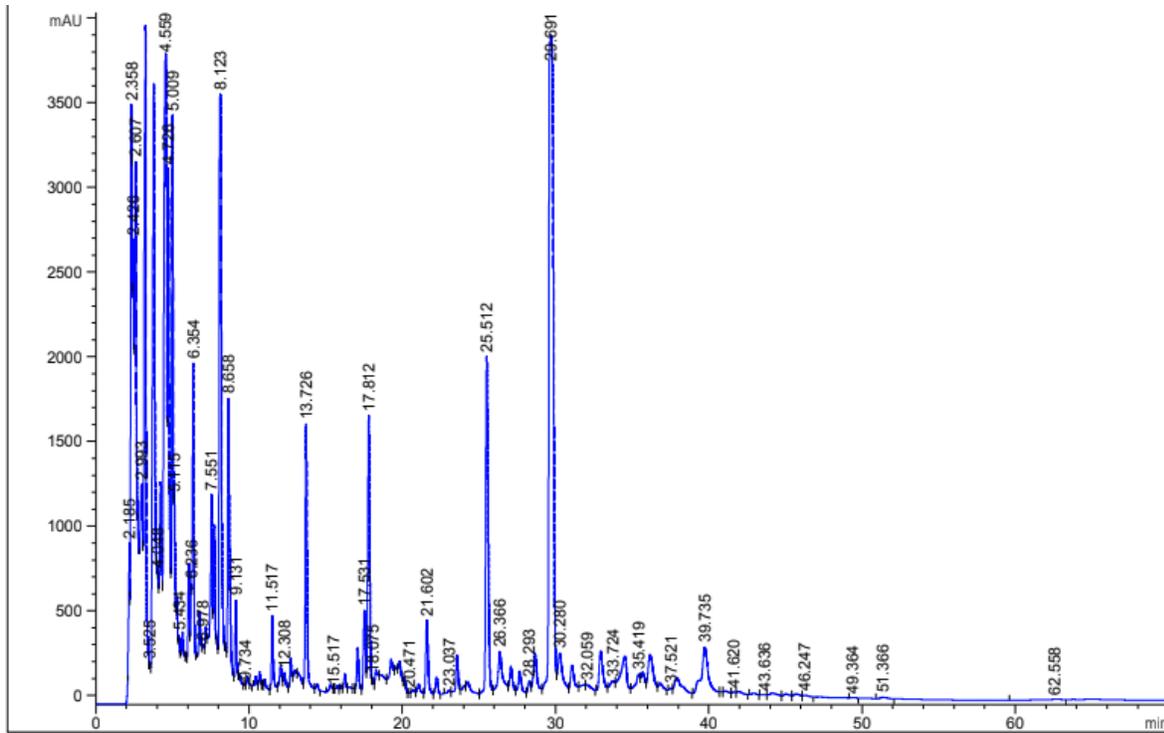


Figura 4-5. Cromatograma de HPLC-DAD de la fracción control obtenida a partir del caldo de cultivo de la cepa *M. robertsii* Mt008 en medio G₂₀P₂₀. Método cromatográfico desarrollado por Agrosavia (C.I. Nataima) en equipo HPLC Agilent 1260 Infinity de Agrosavia CI Nataima.

Para la adaptación de este método a las condiciones de análisis cromatográfico del laboratorio de PNM (Productos Naturales Marinos) de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá. La “fracción control” fue analizada con diferentes columnas en fase reversa y usando diferentes proporciones de ACN, metanol y agua. Las condiciones seleccionadas para análisis fueron columna Xterra® RP18 5 µm (4,6 mm x 250 mm), un volumen de inyección de 100 µL (1 mg/ mL) y fase móvil de Agua y ACN en un equipo de HPLC Agilent 1260 Infinity. Mediante estas condiciones se pudieron evidenciar los picos

característicos de las destruxinas A₂ a los 36,6 min, la destruxina A 38,02 min y la destruxina B a los 39,19 (Figura 4-6). Una vez se contó con un método analítico se buscó evaluar si la extracción con solventes, propuesta en esta tesis, permitía recuperar las destruxinas a partir del sobrenadante crudo de *M. robertsii* Mt008 en el medio de cultivo G₂₀P₂₀ haciendo uso de un procedimiento mucho más simple que el complejo usado en Agrosavia Nataima.

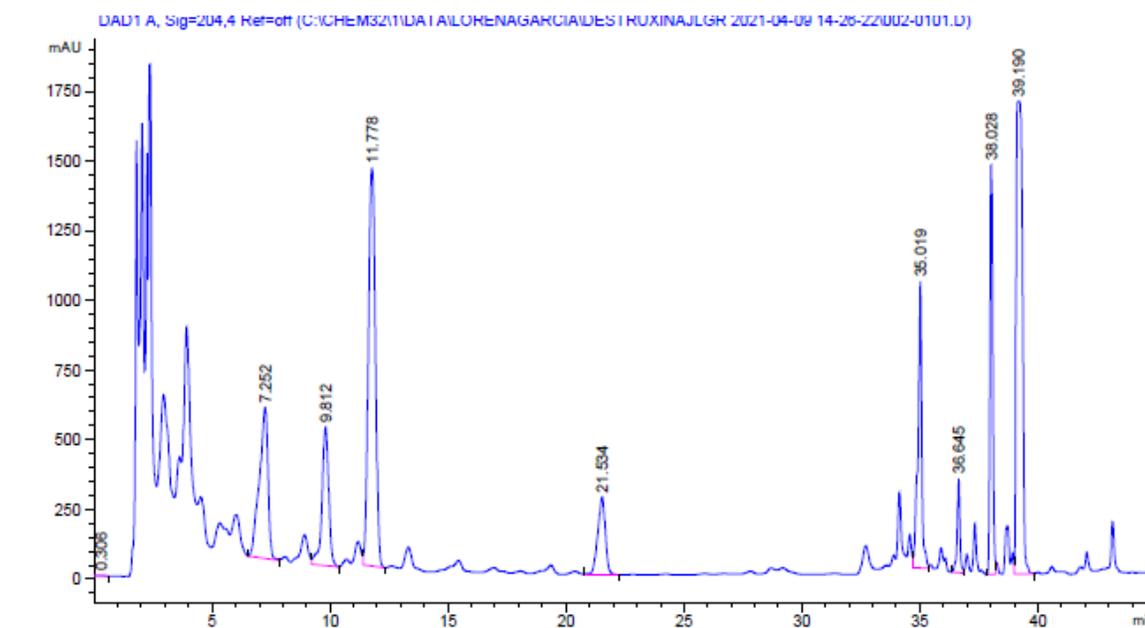


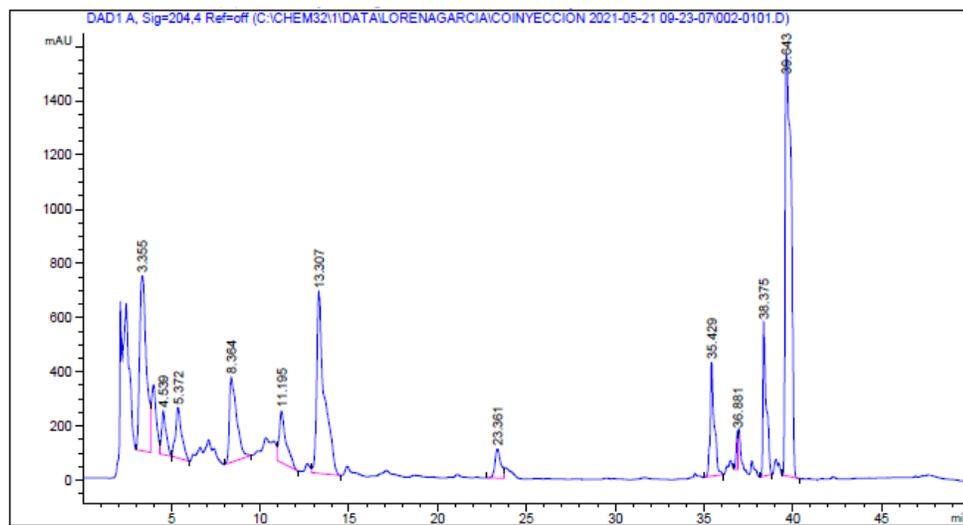
Figura 4-6. Cromatograma de HPLC-DAD de la fracción control obtenida a partir del caldo de cultivo de la cepa *M. anisopliae* Mt008. Método cromatográfico utilizando el equipo HPLC Agilent 1260 Infinity de la Universidad Nacional.

Se obtuvo la fracción orgánica del cultivo de *M. robertsii* Mt008 en el medio de cultivo G₂₀P₂₀ de acuerdo al método desarrollado en esta tesis, y se corrió bajo las condiciones cromatográficas previamente establecidas.

En términos generales, se observó un comportamiento similar entre los extractos evaluados (FO y fracción control), sin embargo, entre los 0 y 25 min de corrida hubo diferencias en algunas señales así como en las intensidades de las mismas (Figura 4-7b), y esto se debe a que los primeros compuestos que eluyen son los más polares y no son eficientemente extraídos con DCM:AcOEt, dada su baja polaridad. Se debe tener presente

que las destruxinas mayoritarias eluyen después de los 25 min. En cualquier caso, la extracción con solventes parece ser una buena alternativa para recuperar las destruxinas a partir de la fermentación de *M. robertsii* Mt008, sobre todo por ser menos compleja que la metodología usada en Agrosavia. En el cromatograma HPLC del extracto obtenido mediante fraccionamiento (FO Medio G₂₀P₂₀) con solventes a partir del sobrenadante crudo de la cepa *M. robertsii* Mt008 se observaron las señales de interés en los mismos tiempos de retención: la destruxina A₂ se observó a los 36,88 minutos, la destruxina A a los 38,37 min y la destruxina B a los 39,64 minutos (Figura 4-7a). Una vez confirmado que el método de extracción permitía recuperar las destruxinas a partir del cultivo, se decidió analizar la fracción orgánica del cultivo en el medio D de la cepa Mt004 de *M. robertsii*, objeto de esta tesis.

a)



b)

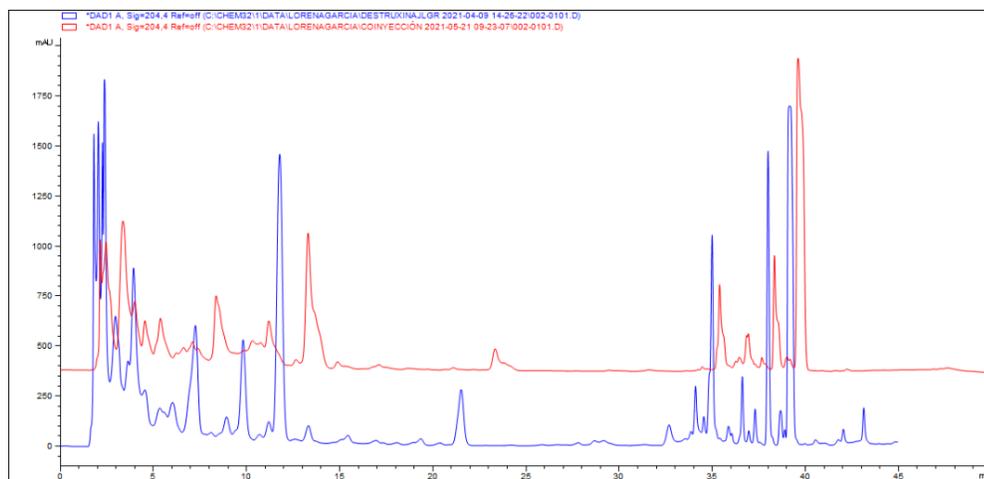


Figura 4-7. a) Cromatograma de HPLC del extracto obtenido mediante fraccionamiento con solventes del sobrenadante crudo del caldo de cultivo la cepa *M. robertsii* Mt008 en el medio G₂₀P₂₀. b) Comparación entre cromatogramas, línea azul: Fracción control. Línea roja: FO Medio G₂₀P₂₀. Método utilizando el equipo HPLC Agilent 1260 Infinity (Universidad Nacional).

En el cromatograma (Figura 4-8) de la fracción orgánica del caldo de cultivo de *M. robertsii* Mt004 en el medio D, es posible identificar señales atribuibles a destruxinas. Estas se observan en tiempos de retención muy similares a los patrones, aparentemente la destruxina A₂ a los 36,1 minutos, la destruxina A a los 37,9 minutos y la destruxina B a los 39,2 minutos con diferentes intensidades en comparación con la fracción control y la fracción orgánica del medio G₂₀P₂₀. Lo cual era de esperarse porque son cultivos de microorganismos diferentes. El paso siguiente fue verificar que las señales atribuidas a las destruxinas si correspondieran a estos compuestos, para lo cual estos extractos se analizaron por HPLC-MS/MS.

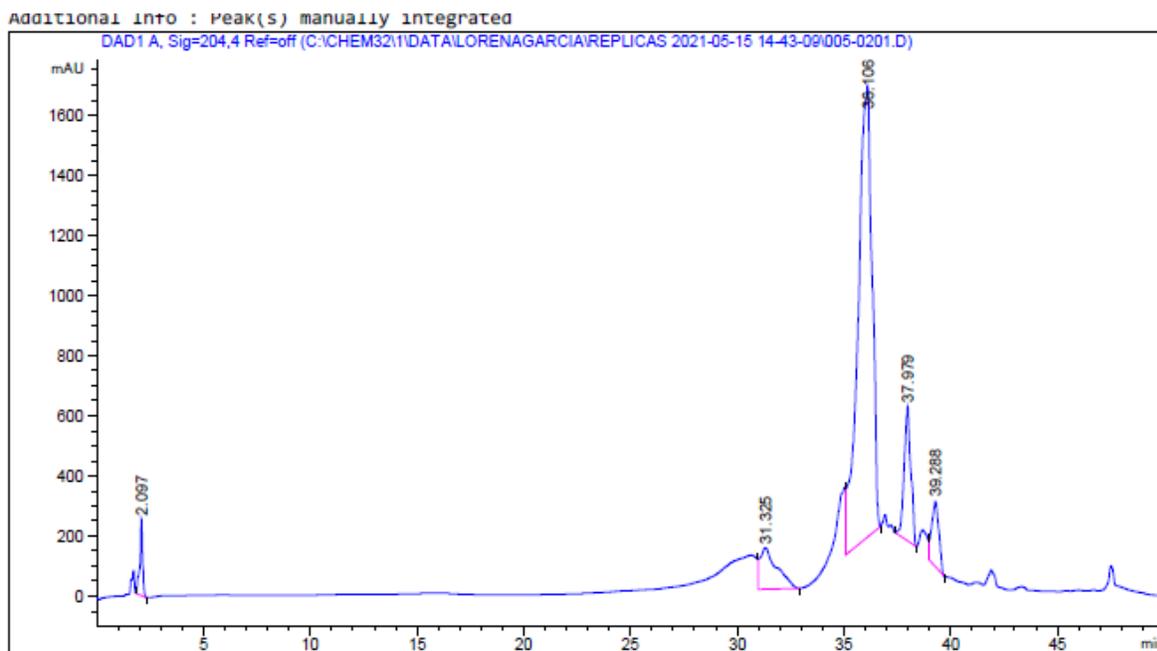


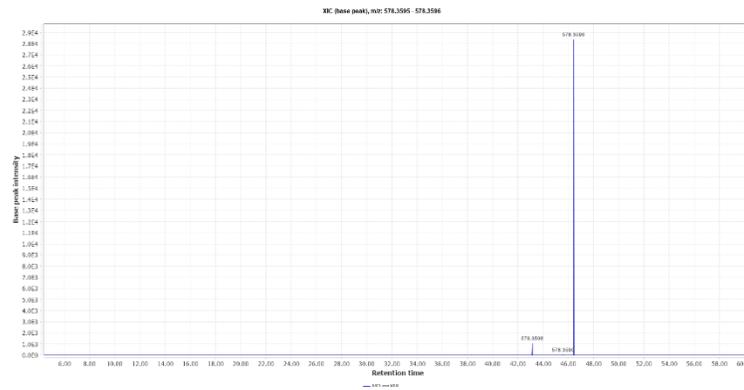
Figura 4-8. Cromatograma de HPLC del extracto obtenido mediante fraccionamiento con solventes a partir del sobrenadante del caldo de cultivo de la cepa *M. robertsii* Mt004 en el medio D. Método utilizando el equipo HPLC Agilent 1260 Infinity (Universidad Nacional).

4.3.4 Análisis HPLC- MS/MS de las fracciones orgánicas

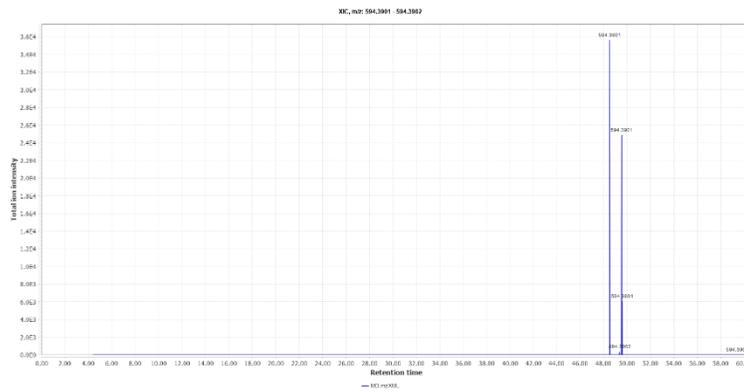
Con el fin de verificar la presencia de las destruxinas A₂, A y B, sugeridas por los análisis de HPLC-DAD se llevó a cabo un análisis por HPLC-MS/MS. Los datos de espectrometría

de masas permitieron identificar picos con iones en m/z de 578.3596; 594.3901 y 564.3433, que corresponderían a las destruxina A, B y A₂, respectivamente (Figura 4-9). El paso siguiente fue analizar los espectros de MS/MS de cada uno de estos picos para verificar la presencia de las destruxinas propuestas.

a)



b)



c)

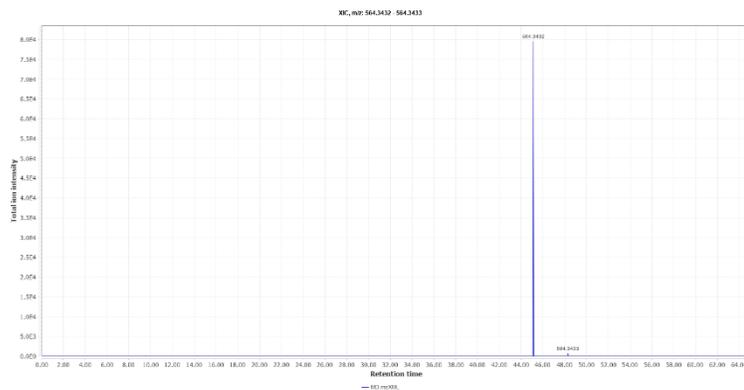


Figura 4-9. Monitoreo de los iones de interés, a) Destruixina A, b) Destruixina B, c) Destruixina A₂ a partir de la FO (Fracción orgánica Medio D) del caldo de cultivo de la cepa *M. robertsii* Mt004 en medio D.

El pico de tiempo de retención a los 46.42 minutos mostró un ion en m/z 578.3596 ($C_{29}H_{47}N_5O_7$, Masa esperada: 578.3554, error: 7.26 ppm), que es consistente con la masa esperada para destruxina A. La fragmentación de este ion produjo iones en m/z 465; 437, y 352 (Figura 4-10) que corresponden a los fragmentos reportados por otros autores como Taibon et al. (2014) y Arroyo-Manzanares et al. (2017) para esta destruxina. Un análisis más profundo del espectro de MS/MS (figura 4.9) permitió proponer una fragmentación (figura 4.10) que inicia con el rompimiento del anillo entre los aminoácidos AA4 y AA5, que luego produce los iones a_6 en m/z 550.3 por pérdida de CO; y el ion b_5 en m/z 465.2 ($C_{23}H_{37}N_4O_6^+$) debido a la pérdida del aminoácido MeVal (113.1 Da). El ion a_5 en m/z de 437.2 podría ser explicado por la pérdida de CO (27,9 Da) a partir del ion b_5 . Se evidenció el ion b_4 en m/z de 352.2 correspondiente a la pérdida del aminoácido isoleucina (113.05 Da) a partir de $C_{23}H_{37}N_4O_6^+$ (b_5). A partir de este último ion (b_4) se originaron tres fragmentos: ion en m/z de 324.1 correspondiente a la pérdida de CO (a_4); el ion en m/z 255.1 debido a pérdida de la prolina (97.09 Da) y denominado b_3 ; y el fragmento en m/z de 178.06 correspondiente a la pérdida de MeAla- β Ala-OH (174.1 Da), y denominado fragmento D^+ . Este fragmento se ha encontrado en la mayoría de los espectros de MS/MS de las destruxinas (Jegorov et al. 1998, Taibon et al. 2014, Arroyo-Manzanares et al. 2017). A partir del ion 255.1 (b_3) ocurrió la pérdida del grupo hidroxiaácido (2-hidroxi-4-pentenoico) obteniendo un pico con una m/z de 157.0762 (b_2). Finalmente, se evidenció un ion en m/z 86.9 (b_1) correspondiente a la pérdida de la β -Ala, y otro ion en m/z de 58.03 correspondiente a la pérdida de CO (a_1) a partir de b_1 . Otro de los iones característicos en los espectros MS/MS es el ion m/z 114.02, denominado frecuentemente como fragmento D_2^+ , y que corresponde al fragmento del aminoácido AA5 (*N*-Metilalanina) enlazado al grupo carbonilo (Jegorov et al. 1998, Taibon et al. 2014, Arroyo-Manzanares et al. 2017) (Figura 4-11).

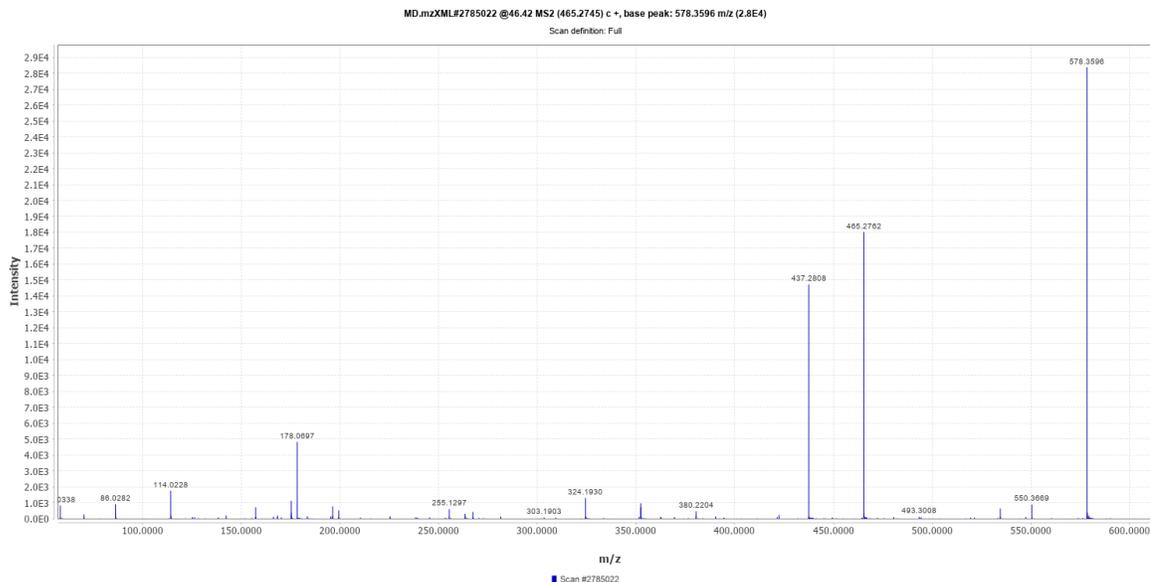


Figura 4-10. Espectro Full MS/MS de la destruxina A (m/z 578.3596)

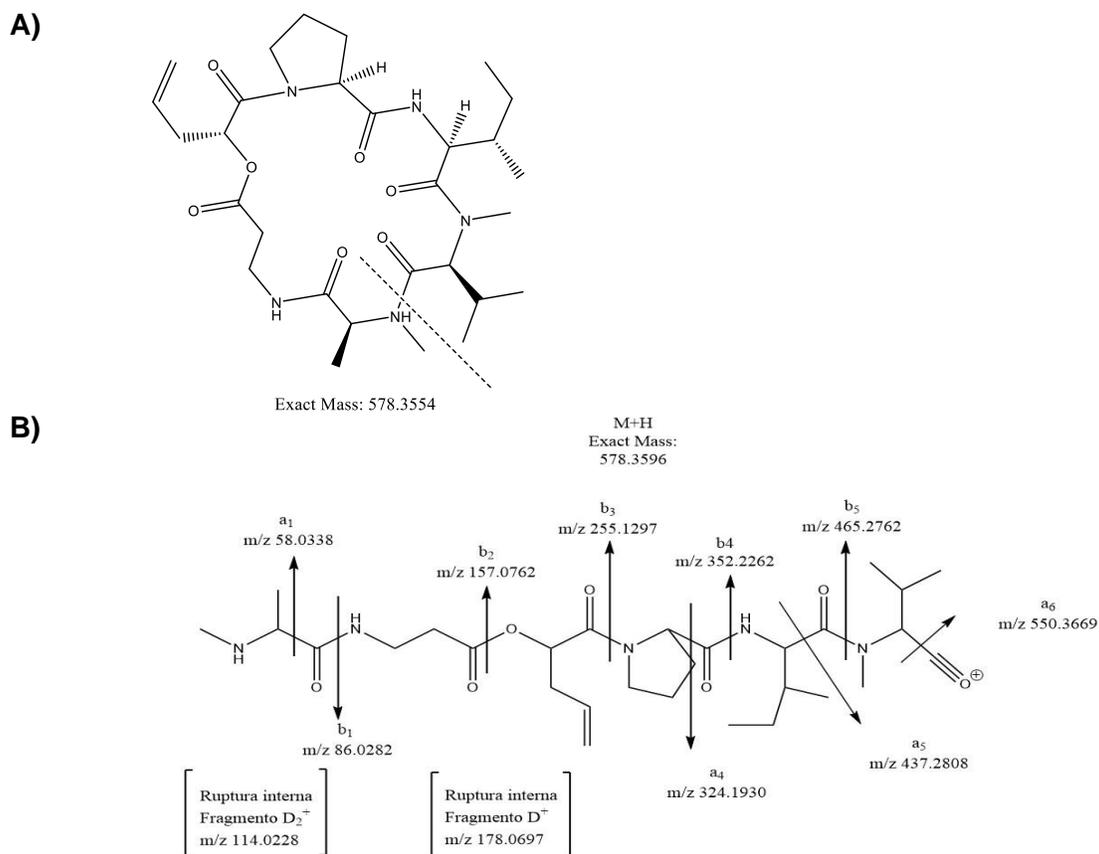


Figura 4-11. A) Ruptura de la destruxina por AA4 y AA5; B) Vía de fragmentación propuesta para la Destruxina A (Arroyo-Manzanares et al. 2017). Los datos de m/z se tomaron a partir de los espectros obtenidos en este trabajo.

En la figura 4-9b se observaron dos picos con la misma m/z (594.3) pero en diferentes tiempos de retención (48.72 y 49.47 minutos). Estos compuestos, por no tener la misma masa exacta no son isómeros, y corresponderían a la destruxina B y E que tienen la misma estructura de péptido y difieren del radical del hidroxiaácido, para la destruxina B: 2-hidroxi-4-metilpentanoico, mientras que para la destruxina E es 4,5-epoxi-2-hidroxipentanoico. Estas destruxinas presentan la misma fragmentación por tener la misma secuencia de aminoácidos; sin embargo, debido a que la polaridad del radical no es la misma exhiben diferentes tiempos de retención, eluyendo primero la destruxina B y luego la destruxina E. Este parámetro ha sido usado para distinguir entre estos dos compuestos (Butt et al. 2009).

El pico de tiempo de retención 48.72 minutos mostró un ion en m/z 594.3901 ($C_{30}H_{51}N_5O_7$, Masa esperada: 594.3867, error: 5.7 ppm), que es consistente con la masa esperada para destruxina B. La fragmentación de este ion (Figura 4-12) produjo iones en m/z 481, 453, y 340 que son característicos para esta destruxina B (Taibon et al., 2014, Arroyo-Manzanares et al., 2017). Esta destruxina se caracteriza por poseer la misma secuencia de aminoácidos que la destruxina A (DHA-Pro-Ile-MeVal-MeAla- β ala) difiriendo solamente en el radical del ácido que en este caso es el 2-hidroxi-4-metilpentanoico (en el caso de la destruxina A es el 2-hidroxi-4-pentenoico), por lo que el patrón de fragmentación es muy similar al de la destruxina A.

Los iones observados en el experimento MS/MS pueden ser explicados por el rompimiento del anillo entre los aminoácidos AA4 y AA5. A partir del ion molecular (m/z 594.3901) se generó el ion b_5 en m/z de 481.3 correspondiente a la pérdida del aminoácido MeVal (113.08 Da). El ion a_5 en m/z de 453.3 podría ser explicado por la pérdida de CO (27,9 Da) a partir del ion b_5 . A partir del ion b_5 ocurrió la pérdida del aminoácido isoleucina (113.04 Da) evidenciándose un pico de m/z de 368.2 y denominado ion b_4 . El ion en m/z de 271.1, denominado b_3 , correspondió a la pérdida de la prolina (97.0 Da) a partir de b_4 ; y el ion en m/z 157.07 (ion b_2) correspondió a la pérdida del hidroxiaácido (m/z 114.08). Por último, el ion b_1 fue detectado en m/z de 86.02, y correspondió a la pérdida del aminoácido β -Ala a partir de b_2 . Finalmente, se evidenció la pérdida de CO obteniendo un fragmento de m/z de 58.03, que corresponde al ion a_1 , a partir de b_1 . Asimismo, se detectaron los fragmentos típicos de las destruxinas, D^+ y D_2^+ . El D^+ corresponde a un m/z en 194.10 originado por la pérdida de AA5-AA6-OH a partir de ion b_4 ; mientras D_2^+ corresponde a m/z en 114.0225 y puede ser explicado por el fragmento AA5 enlazado al grupo carbonilo (Figura 4-13).

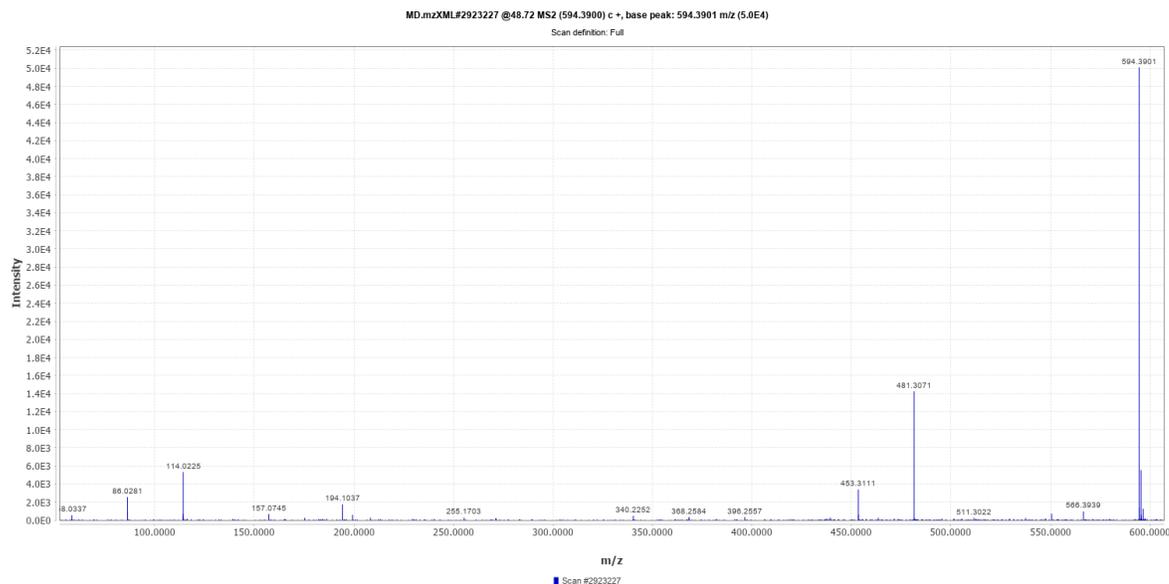


Figura 4-12. Espectro Full MS/MS de la destruxina B (m/z 594.3901)

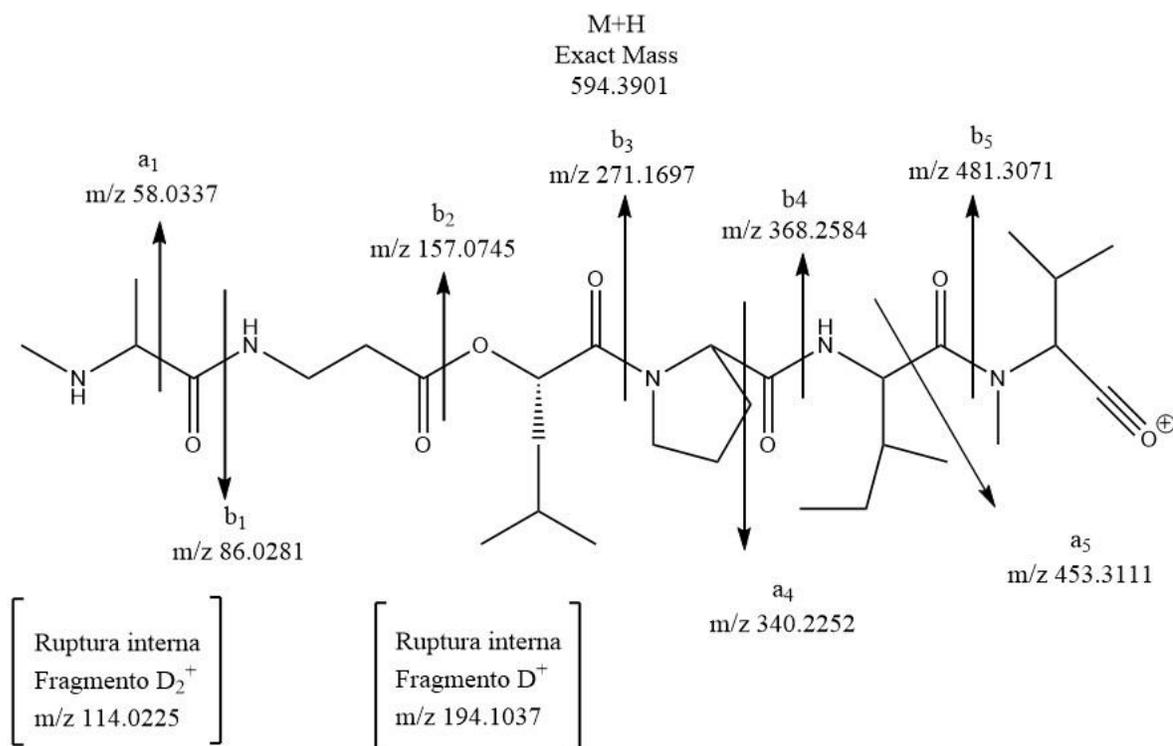


Figura 4-13. Vía de fragmentación propuesto para la destruxina B. Los datos de m/z se tomaron a partir de los espectros obtenidos en este trabajo.

El pico de tiempo de retención 45.45 minutos mostró un ion en m/z 564.3433 ($C_{28}H_{45}N_5O_7$, Masa esperada: 564.3397, error: 6.4 ppm) que es consistente con la masa esperada para destruxina A₂. La fragmentación de este ion produjo iones en m/z 451, 423, y 352 (Figura 4-14) que son característicos para esta destruxina A₂ (Taibon et al., 2014, Arroyo-Manzanares et al., 2017). Esta destruxina conserva la misma secuencia de aminoácidos que la destruxina A, difiriendo únicamente en el aminoácido isoleucina AA3 en la dtx A es reemplazado por la valina en la dtx A₂. (Figura 4-14). A partir del ion $[M+H]^+$ producido por la apertura del ciclo en los AA4 y AA5, se obtiene el ion b_5 en m/z de 451.2 por pérdida de MeVal (113.08 Da); que da origen a los iones a_5 en m/z 423.2 por pérdida de CO; y b_4 en m/z 352.1 correspondiente a la pérdida del aminoácido valina. También se observan los iones en m/z de 255.1 (b_3), 157.07 (b_2), y 86.02 (b_1) que corresponden a las pérdidas de la prolina, el hidroxiaácido y β -alanina, respectivamente (Figura 4-14). Las pérdidas de CO a partir de los iones b_1 , y b_4 también fueron observados y corresponden a los iones a_1 , y a_4 , respectivamente. También se evidenciaron los fragmentos D^+ y D_2^+ en m/z 178.06 y 114.02, respectivamente (Figura 4-15) (Jegorov et al. 1998, Taibon et al. 2014, Arroyo-Manzanares et al. 2017).

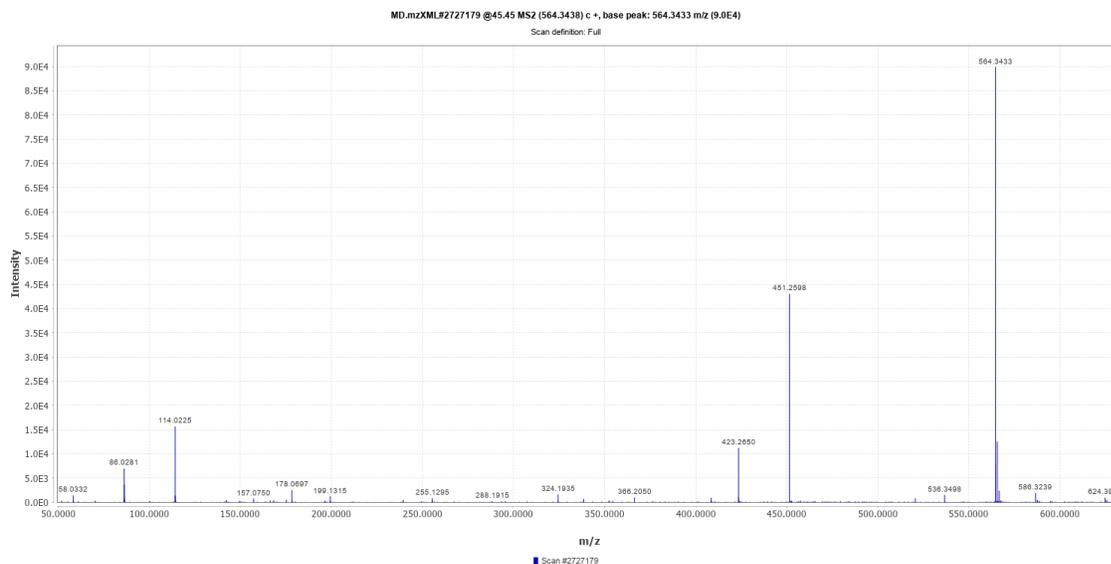
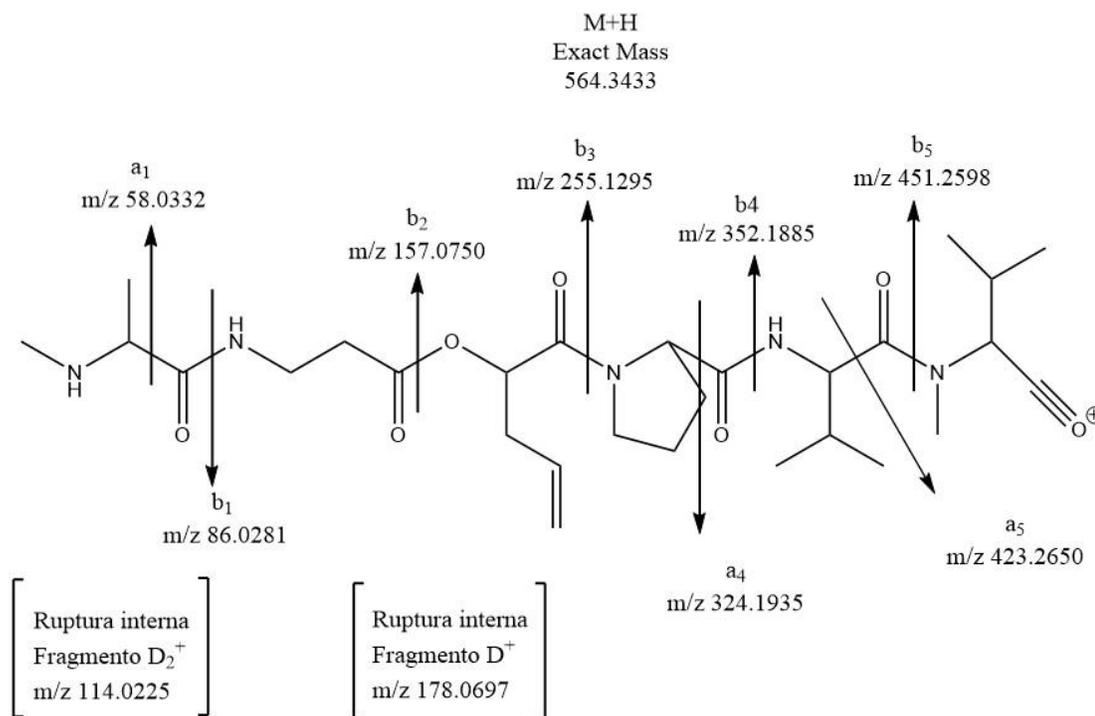


Figura 4-14. Espectros Full MS/MS de la destruxina A₂ (*m/z* 564.3433)**Figura 4-15.** Vía de fragmentación propuesto para la destruxina A₂. Los datos de *m/z* se tomaron a partir de los espectros obtenidos en este trabajo.

4.3.5 Redes moleculares

Una vez establecida la presencia de las destruxinas A₂, A y B, se buscó establecer que otras destruxinas podrían estar presentes en el extracto FO del cultivo del hongo *M. robertsii* Mt004 en el medio de cultivo D. Asimismo, se buscaba observar qué otros compuestos podrían estar presentes en el extracto activo bajo estudio, y que fue obtenido durante la formación de ME por parte del hongo *M. robertsii* Mt004. Para lo anterior se hizo uso de la plataforma del GNPS, buscando construir las redes moleculares. Los datos inicialmente fueron procesados en el programa *MZmine* donde se generó una matriz en la que se eliminaron todos los picos presentes en el blanco del medio (FO-C) y blanco del solvente, de tal manera que solo se observaran compuestos producidos por el hongo.

La red molecular para FO de *M. robertsii* Mt004 cultivado en el medio de cultivo D (Figura 4-16) proporcionó 130 *features* con 174 conexiones entre sí (*edges*). Se evidenció la

presencia de 3 redes, la primera con 17 miembros, la segunda con 5 miembros y la tercera con dos miembros; así como un gran número de *selfloops* (106) que no compartieron ninguna similitud con los demás espectros presentes en la red sugiriendo que son compuestos con estructuras (y por tanto espectros de masas) diferentes a los demás de esta fracción FO (Yuan et al. 2021).

El siguiente paso fue derreplicar los *features* observados en las bases de datos del GNPS, Se estableció que el valor del coseno debería ser $\geq 0,7$ para que los *features* hicieran *match* (coincidencia) en la base de datos. Se pudo establecer que la red 1 está constituida por destruxinas, y se lograron identificar putativamente 7 de ellas, incluyendo las tres previamente identificadas en el numeral anterior. Su identidad, así como su similitud (escala de 0 a 1) se encuentra en la Tabla 4-7, también se pueden observar los *mirror plots* que permiten comparar los datos experimentales con los consignados en las bases de datos.

Los *selfloops* de *m/z* de 612.3641 y 465.2756 también fueron clasificados como ciclodepsipéptidos (resaltados en color rosado en figura 4-15). Interessantemente, estos *selfloops* no fueron ubicados dentro de la red 1 según la plataforma GNPS. Estos *features* son compuestos de tipo ciclodepsipéptidos que no están estructuralmente muy relacionados con las destruxinas, de ahí que no hagan parte de la misma red, y podrían corresponder a modificaciones estructurales de alguna de las moléculas producidas por el hongo *M. robertsii* Mt004.

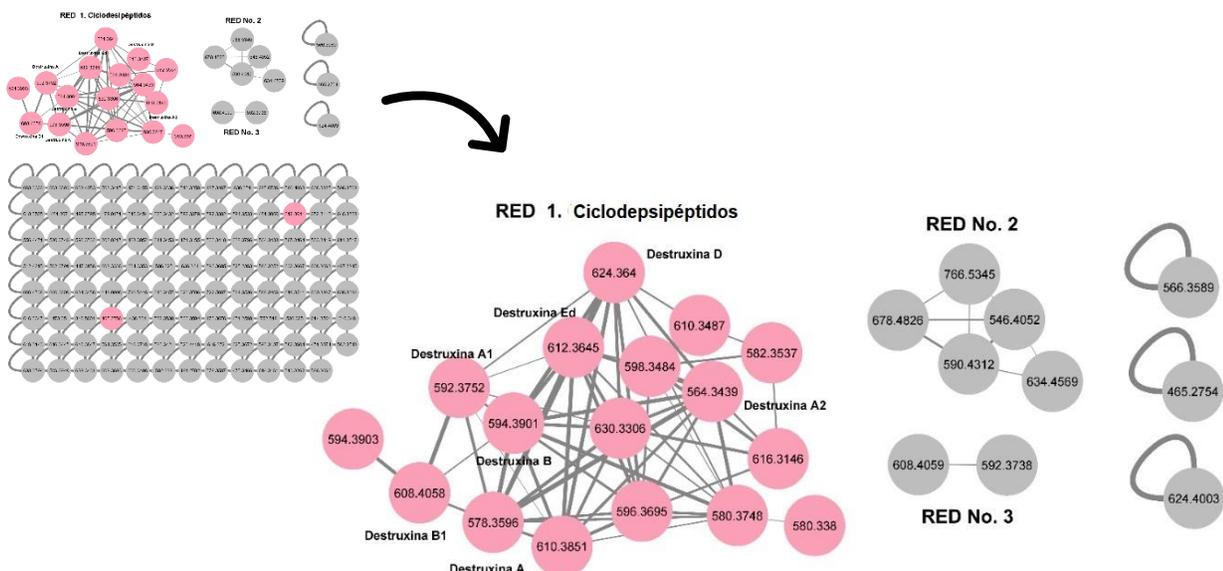
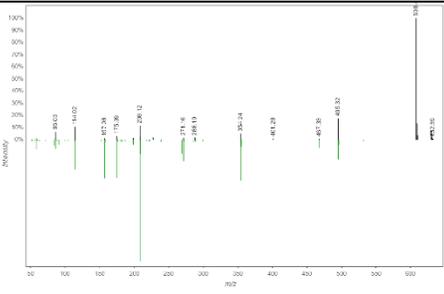
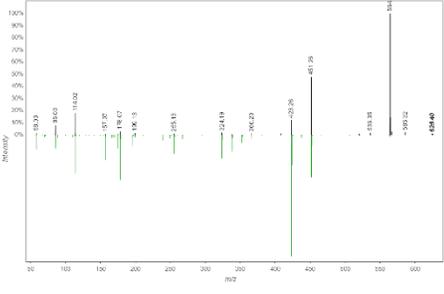
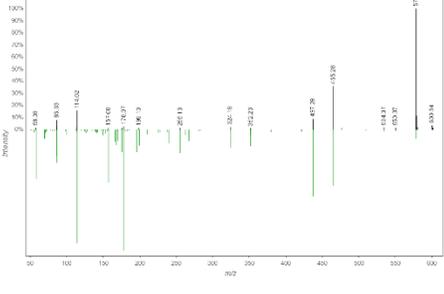
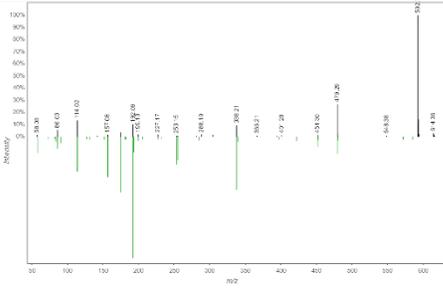
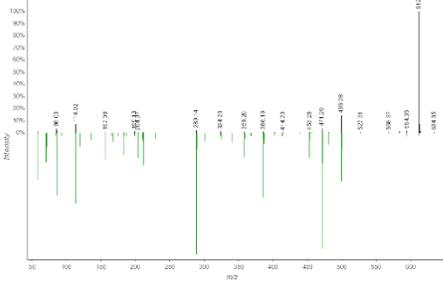
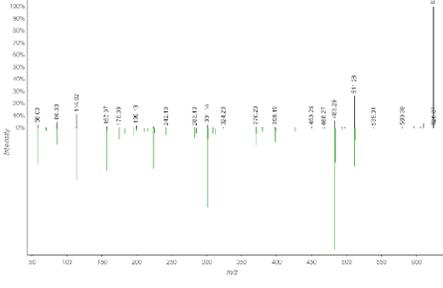
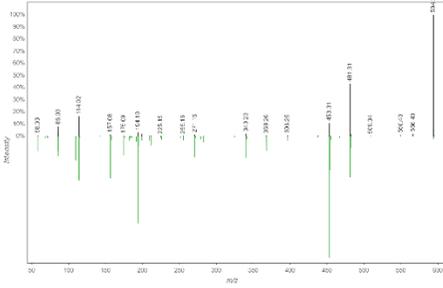


Figura 4-16. Redes moleculares de la fracción orgánica del caldo cultivo de *M. robertsii* Mt004 en medio D. Los círculos en color rosado representan la familia de los ciclodepsipéptidos. Los círculos en gris no generaron coincidencias (*matches*). El análisis realizado en la plataforma GNPS se puede visualizar en el link:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=f7d72edfeb0540b085c47e2255e90f0c>

Tabla 4-7. Identificaciones putativas obtenidas a partir de la plataforma de GNPS para la fracción orgánica del cultivo de *M. robertsii* Mt004 inoculado en el medio D.

Compuesto	[M+H] ⁺	Coseno	Error (ppm)	Espectro Espejo	Código QR
Destruxina B ₁	608.4058	0.72	7		
Destruxina A ₂	564.3439	0.71	8		
Destruxina A	578.3596	0.76	9		

Destruxina A ₁	592.38	0.70	10		
Destruxina E-diol (Ed)	612.3645	0.71	4		
Destruxina D	624.364	0.73	8		
Destruxina B	594.3901	0.76	6		

La baja tasa de derreplicación obtenida por el uso directo de la plataforma del GNPS puede deberse a que esta plataforma es reciente, sólo hasta hace poco los investigadores han reconocido la utilidad de albergar sus espectros en ella. En el año 2016 tan solo el 2% de los espectros de un análisis metabolómico no dirigido lograban ser anotados; este valor ha crecido en promedio un 5-6% (Aaron et al, 2020); no obstante, un gran porcentaje de espectros de MS/MS siguen permaneciendo sin anotación (Aron et al. 2020).

Con el fin de ampliar la derreplicación de los *features* obtenidos para la fracción activa FO se usó la plataforma SIRIUS:CSI Finger tolerando un error de 10 ppm (<https://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/>) (Tabla 4-8). SIRIUS 4 es una plataforma computacional que permite la identificación de metabolitos a partir de datos de LC-MS/MS. Su análisis se realiza principalmente con tres herramientas fundamentales: SIRIUS que permite la anotación de la fórmula molecular, es decir, busca la determinación de la fórmula molecular del compuesto de interés mediante análisis de la masa exacta, los patrones isotópicos y hace uso de árboles de fragmentación arrojando todas las posibles fórmulas moleculares. Los resultados del análisis arrojan diferentes candidatos que se clasifican de acuerdo a la sumatoria de los análisis internos: *isotope score*, *tree score*, *explained peaks*, *total explained intensity*, *median absolute mass deviation* y **ZODIAC** que hace una segunda evaluación de las fórmulas proporcionadas inicialmente por SIRIUS, ZODIAC toma los árboles de fragmentación como entrada y vuelve a clasificar los candidatos a fórmulas moleculares teniendo en cuenta las similitudes de los compuestos en el conjunto de datos (Ludwig et al. 2020).

A continuación, SIRIUS usa CSI:Finger, la segunda herramienta, que predice la estructura molecular a partir de la información del espectro MS/MS dado y del árbol de fragmentación previamente proporcionado por SIRIUS y ZODIAC (Dührkop et al., 2015, Ludwig et al., 2020). Asimismo, esta herramienta realiza un proceso de derreplicación en diversas bases de datos para identificar el candidato más probable, en este trabajo se seleccionaron las bases de datos relacionadas con productos naturales: *Chemical Entities of Biological Interest* (CHEBI), *COllection of Open Natural ProDUcTs* (COCONUT), *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) y *Natural Products*. Finalmente, CANOPUS permite predecir clases de compuestos, a partir de la huella molecular predicha por CSI:FingerID, sin necesidad de realizar ninguna búsqueda en bases de datos; por lo tanto, proporciona información estructural para compuestos que no disponen de datos de referencia espectrales ni estructurales (Dührkop et al. 2019). Con esta información, el usuario puede verificar las anotaciones y derreplicaciones realizadas y, asimismo, seleccionar manualmente el candidato más probable según la naturaleza de su muestra (Ludwig et al., 2020). En esta tesis los iones que no arrojaron ningún resultado fueron comparados con bibliografía.

Con esta metodología se pudieron identificar putativamente los 10 *features* faltantes de la red 1, que también corresponden a destruxinas como era de esperarse por ser parte de la

misma red. Vale la pena mencionar que, cuando se realizó la derreplicación de los *selfloops* se encontraron 7 destruxinas adicionales, la hidroxihomodestruxina B, destruxina D₁, destruxina E₁, hidroxidestruxina B, desmetildestruxina A, desmetildestruxina C, destruxina D₂ (tabla 4-8) para un total de 17 destruxinas derreplicadas por la base de datos SIRIUS: CSI Finger (Anexo B). A pesar de que estos *selfloops* son estructuralmente ciclodepsipéptidos, estos no fueron correlacionados con la red 1 posiblemente por el valor “*min pair cosine*” utilizado en este trabajo en la plataforma de GNPS; o porque los espectros de MS/MS obtenidos para ellos no eran de buena calidad por ser compuestos minoritarios, por lo que no agruparon con las destruxinas que fueron mayoritarias. En la tabla 4-8 sólo se muestran los datos para *features* no dereplicados en el GNPS, los 7 que sí fueron dereplicados por GNPS se lograron confirmar por SIRIUS: CSI Finger, pero no se muestran ya que están en la tabla 4-7. Vale la pena mencionar que, al disminuir el coseno de los parámetros *min pair cosine* (similitud entre espectros de MS/MS para hacer parte de la misma red) y el *score threshold* (similitud entre espectros de MS/MS con espectros de MS/MS de otras librerías) a un valor de 0.5 dentro del análisis para la construcción de las redes moleculares en la plataforma GNPS, se lograron derreplicar las destruxinas anotadas en la plataforma de SIRIUS:Finger; y se agruparon algunas de las destruxinas de los *selfloops* con la red de las destruxinas (Anexo B).

Por otro lado, la Red 2 cuenta con 5 *features* (figura 4-15), que no fueron relacionadas con ninguna familia molecular dentro de la plataforma de GNPS; sin embargo, al realizarse la búsqueda en la base de datos de SIRIUS:CSI Finger, esta plataforma arrojó que dichos *features* presentan estructuras peptídicas que no comparten similitud con las destruxinas, y corresponden putativamente a la familia de aminoácidos y derivados. En el caso de la red 3 que agrupa dos *features*, sólo uno de ellos pudo derreplicarse y corresponde a la destruxina B₄. Si bien, es un ciclodepsipéptido, al igual que en el caso anterior con la red 1, es posible que no hayan sido relacionadas en esa red 1 por el “*cosine score*” utilizado (*cosine score*: 0,70) (Anexo B).

Tabla 4-8. Identificaciones putativas obtenidas a partir de la búsqueda de la masa exacta en el SIRIUS: CSI Finger con un margen de error de 10 ppm para la fracción orgánica del caldo de cultivo de *M. robertsii* Mt004 en medio D.

Red	<i>m/z</i> obtenido	Aducto	Compuesto ^A	Fórmula molecular	Error medio	Sirius (% Total Explained Intensity)	Sirius score (%)	CSI: FINGER (%Similitud)	CANOPUS
1	594.3903 ^m	[M+H]	Destruxin E	C ₃₀ H ₅₁ N ₅ O ₇	4.171	85.329	99.99	68.96	Ciclopeptido
1	610.3851	[M+H]	Destruxin C	C ₃₀ H ₅₁ N ₅ O ₈	4.007	79,57	99.96	72.78	Ciclopeptido
1	630.3306	[M+H]	Chlorodestruxin	C ₂₉ H ₄₈ ClN ₅ O ₈	4.278	58.035	100,00	65,62	Ciclopeptido
1	598.3484 ^{LI}	[M+H]	Destruxin Ed ₂	C ₂₈ H ₄₈ O ₉ N ₅	NA	NA	NA	NA	Ciclopeptido
1	610.3487	[M+H]	Destruxin D ₂	C ₂₉ H ₄₇ N ₅ O ₉	5.678	64.377	10.523	69.77	Ciclopeptido
1	582.3537	[M+H]	Desmethyldestruxin E	C ₂₈ H ₄₇ N ₅ O ₈	5.935	75,813	0.001	66,47	Ciclopeptido
1	580.3748 ^{LI}	[M+H]	Desmethyldestruxin B	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₇	NA	NA	NA	NA	Ciclopeptido
1	580.338	[M+H]	Destruxin E ₂	C ₂₈ H ₄₅ N ₅ O ₈	NA	NA	NA	NA	Ciclopeptido
1	616.3146	[M+H]	Destruxin E ₂ chlorohydrin	C ₂₈ H ₄₆ N ₅ O ₈ Cl	2.926	59.486	99.996	67.93	Ciclopeptido
1	596.3695 ^m	[M+H]	Destruxin C ₂	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₈	N.A	N.A	N.A	N.A	Ciclopeptido
2	678.4826	[M+H]	2-{2-[(2-aminopyridin-4-yl)methyl]-8-carboxy-9,11a-dihydroxy-7-[4-(6-hydroxy-4-pentylcyclohex-2-en-1-yl)butyl]-dodecahydro-1H-cyclopenta[10]annulen-4-yl]-4-ethyl-3H-pyrrol-3-ide	C ₄₁ H ₆₃ N ₃ O ₅	8.29	73.079	100	28.06	Aminoácidos y derivados
3	608.4059	[M+H]	Destruxin B ₄	C ₃₁ H ₅₄ N ₅ O ₇	1.580	55.082	4.426	74.10	Ciclopeptido
Selfloops	566.3589	[M+H]	cyclo[N(Me)Ala-bAla-DL-OAbu-Pro-Ile-N(Me)Val]	C ₂₈ H ₇ N ₅ O ₇	1.405	79.188	0.000	67.27	Oligopéptido
Selfloops	624.4003	[M+H]	Hydroxyhomodestruxin B*	C ₃₁ H ₅₃ N ₅ O ₈	3.748	67.445	0.0002	65.92	Ciclopeptido
Selfloops	608.3326	[M+H]	N-(14-[[4-(4a-hydroxy-decahydroisoquinolin-2-yl)-4-oxobutyl]amino]-3,4,5-trimethoxy-13-oxotricyclo[9.5.0.0 ² ,7]hexadec	C ₃₄ H ₄₅ N ₃ O ₇	3.850	68.140	100	38.15	α-aminoácido y derivados

Red	m/z obtenido	Aducto	Compuesto ^A	Fórmula molecular	Error medio	Sirius (% Total Explained Intensity)	Sirius score (%)	CSI: FINGER (%Similitud)	CANOPUS
			a-1(16),2(7),3,5,11,14-hexaen-10-yl)acetamide						
Selfloops	638.3794	[M+H]	Destruxin D ₁	C ₃₁ H ₅₁ N ₅ O ₉	1.606	68.282	99.510	72.38	Ciclopeptido
Selfloops	660.3608	[M+H]	(2S,3R)-2-(((S)-7-acetamido-1,2,3-trimethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-10-yl)amino)-N-(1-(4-methoxyphenyl)-2-methylpropyl)-3-methylpentanamide	C ₃₁ H ₅₁ N ₅ O ₉	1.742	75.911	100	35.58	α-aminoácido y derivados
Selfloops	481.307	[M+H]	(5R,7R,8R,10R,11R,12S,15R,16S,25S)-11-ethyl-10-methyl-21,26-diazapentacyclo[23.2.1.05,16.07,15.08,12]octacos-13,18-diene-2,20,27,28-tetrone	C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₄	-2,068	68.026	100	43.63	α-aminoácido y derivados
Selfloops	608.3693	[M+H]	Destruxin E ₁	C ₃₀ H ₄₉ N ₅ O ₈	-2.495	85.175	99.188	68.68	Ciclopeptido
Selfloops	610.3847	[M+H]	Hydroxydestruxin B	C ₃₀ H ₅₁ N ₅ O ₇	4.007	79.575	99.966	69.53	Ciclopeptido
Selfloops	646.3454	[M+H]	Benzyl 2-[[2-[[3-benzyloxy-2-(tert-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]-3-phenylpropanoyl]amino]-4-methylpentanoate	C ₃₇ H ₄₇ N ₃ O ₇	1.213	23.058	100	45.51	α-aminoácido y derivados
Selfloops	471.3155 ^{SA}	[M+H]		C ₂₃ H ₄₂ N ₄ O ₆	0.174	66.456	1.426	0.00	Péptido
Selfloops	592.338	[M+H]	5-{2-[(2-aminopyridin-4-yl)[5-(8-cyclohexyl-4-hydroxy-3,5-dioxooctyl)-2-hydroxy-3-methoxyphenyl]methyl]-3-hydroxypropyl}-3H-pyrrol-3-ide	C ₃₄ H ₄₅ N ₃ O ₆	3.400	59.938	99.984	26.80	α-aminoácido y derivados
Selfloops	564.3438	[M+H]	Desmethyldestruxin A	C ₂₈ H ₄₅ N ₅ O ₇	1.929	77.509	0.027	59.23	Ciclopeptido
Selfloops	481.3066	[M+H]	(5R,7R,8R,10R,11R,12S,15R,16S,25S)-11-ethyl-10-methyl-21,26-diazapentacyclo[23.2.1.05,16.	C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₄	-4.014	61.153	100.0	30.42	α-aminoácido y derivados

Red	m/z obtenido	Aducto	Compuesto ^A	Fórmula molecular	Error medio	Sirius (% Total Explained Intensity)	Sirius score (%)	CSI: FINGER (%Similitud)	CANOPUS
			07,15.08,12]octacos-13,18-diene-2,20,27,28-tetrone						
Selfloops	565.3464	[M+H]	3-(5-hydroxy-2,3-dimethyl-8-[5-methyl-2-(propan-2-ylidene)hexyl]-8-(3-methylbut-2-en-1-yl)-4,7-dioxo-3,4,4a,7,8,8a-hexahydro-2H-1-benzopyran-6-yl)-3-phenylpropanoic acid	C ₃₅ H ₄₈ O ₆	-2.262	51.248	100.00	50.00	Triacilglicerol
Selfloops	586.325	[M+H]	N-{1-[16-methoxy-10-(2-methylpropyl)-8,11-dioxo-2-oxa-6,9,12-triazatricyclo[13.3.1.0 ^{3,7}]nona deca-1(18),13,15(19),16-tetraen-6-yl]-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-2-(N-methylformamido)propanamida	C ₃₀ H ₄₃ N ₅ O ₇	3.055	37.190	0.012	55.27	Péptido
Selfloops	596.3696 ^m	[M+H]	Desmethyldestruxin C	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₈	4.170	73.523	100.0	57.76	Ciclodepsipéptido
Selfloops	614.3561	[M+H]	N-[(2R,3R)-5-[(2S)-1-hydroxypropan-2-yl]-3-methyl-2-[[methyl-[(4-phenoxyphenyl)methyl]amino]methyl]-6-oxo-2,3,4,7-tetrahydro-1,5-benzoxazin-9-yl]cyclohexanecarboxamide	C ₃₇ H ₄₇ N ₃ O ₅	0.953	37.044	99.418	46.24	α-aminoácido y derivados
Selfloops	610.348	[M+H]	Destruxin D ₂	C ₂₉ H ₄₇ N ₅ O ₉	0.360	70.750	7.664	69.97	Ciclodepsipéptido

^A Los nombres de los compuestos se mantienen en inglés con el fin de facilitar la búsqueda del lector. Los números (1), (2), (3) indican las posibles opciones de estructura según el programa CSI:Finger en orden de similitud. ^{LI}: asignación tentativa con ayuda de la comparación con datos de literatura (Taibon et al., 2014 y Arroyo-Manzanares et al. 2017). ^{SA}: Compuesto que no pudo ser anotado. ^M: Derreplicación manual utilizando los espectros de MS/MS obtenidos. * Esta destruxina fue derreplicada ampliando su búsqueda en la base de datos PubMed.

Un segundo análisis de redes moleculares en el GNPS fue hecho con los datos de MS/MS del análisis por LC-MS de los metabolitos producidos por la cepa *M. robertsii* Mt008 en el medio de cultivo G₂₀P₂₀ (fracción control) junto con los datos de MS/MS para los metabolitos producidos por la cepa *M. robertsii* Mt004 en el medio de cultivo D, es decir los datos antes presentados (Figura 4-17). Para los primeros los *features* se representaron con discos morados, y para los segundos se usaron discos de color rosado. A pesar de las diferencias metodológicas en cuanto a extracción y separación para estos dos tratamientos, esta comparación fue hecha para evaluar las similitudes y diferencias en la expresión de metabolitos que pudieran jugar un papel importante en la actividad insecticida de las dos cepas de *Metarhizium* evaluadas.

En el análisis de redes se identificaron nueve redes (Figura 4-16), donde 5 de ellas pertenecen a compuestos producidos exclusivamente por *M. robertsii* Mt008 y corresponden a la red 1 de α -aminoácidos y derivados con 18 *features*; la red 3 que está constituida por una familia de los péptidos que comprende 8 *features*; la red 5 con 2 *features* correspondientes a la familia de los alcaloides harmala; la red 4 (7 *features*) y la red 9 (3 *features*) no pudieron ser clasificados en ninguna familia molecular. Se observó una red de 16 *features* (red 2) correspondiente a la familia de los ciclodepsipéptidos (destruxinas) y contiene compuestos producidos por las dos cepas de *Metarhizium* estudiadas en este trabajo. Por último, la red 7 resultó ser exclusiva para *M. robertsii* Mt004 y es la misma antes denominada como red 2 en el análisis anterior (Figura 4-16) y según la derreplicación realizada por SIRIUS, son péptidos que no comparten similitud estructural con las destruxinas.

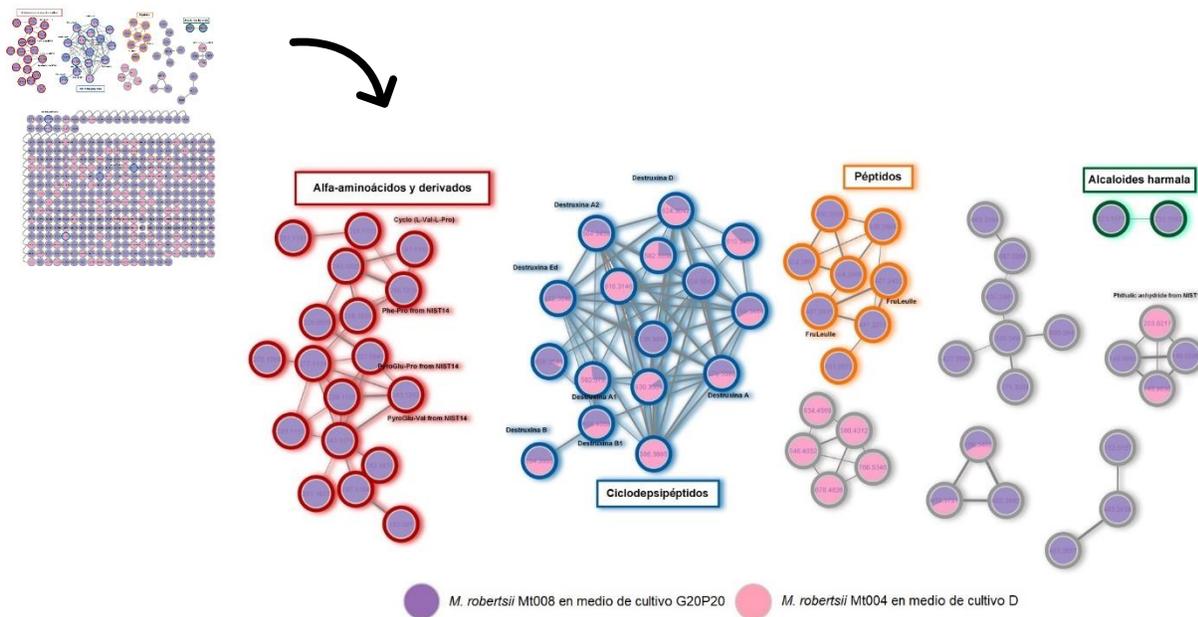
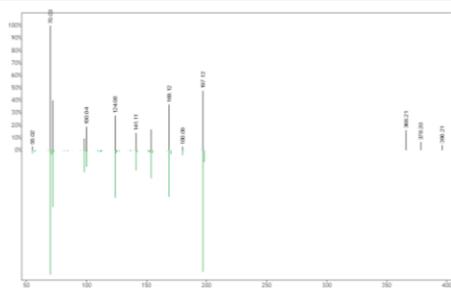
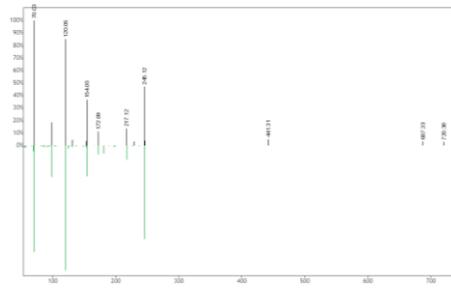
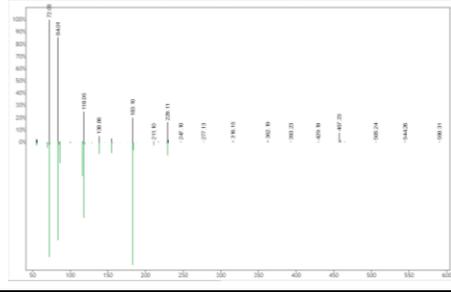


Figura 4-17. Redes moleculares para *M. robertsii* Mt008 (fracción control) (Disco morado) y la fracción orgánica del caldo de cultivo de *M. robertsii* Mt004 en medio D (Disco rosado). En la red se evidencia la familia de los α -aminoácidos y derivados (red 1), ciclodepsipéptidos (red 2), péptidos (3), alcaloides harmala (red 5) y sin coincidencia (red 4,6,7,8,9). El análisis realizado en la plataforma GNPS se puede visualizar en el link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=22ff0070da914aa2b4bca8d090835158>.

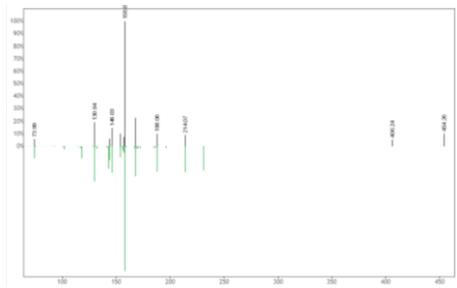
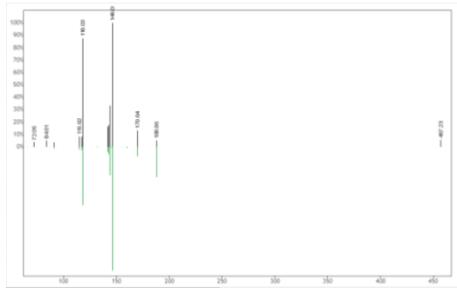
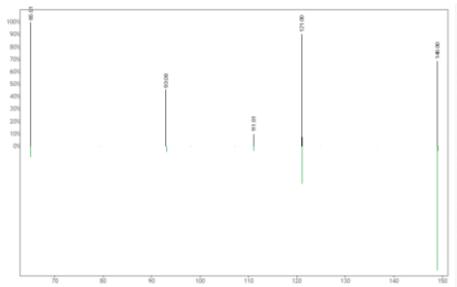
Si se comparan las dos cepas, se puede evidenciar una alta diversidad de metabolitos exclusivos del hongo *M. robertsii* Mt008 en comparación con *M. robertsii* Mt004. La abundancia de los metabolitos de *M. robertsii* Mt008 podría ser explicado por varias razones, i) el método de extracción utilizado (diálisis, cromatografía en fase normal y reversa) que permitió una mayor recuperación de metabolitos de diferente naturaleza, como los péptidos y alcaloides harmala, entre otros, ii) el medio de cultivo empleado para cada uno de los hongos, donde el medio G₂₀P₂₀ proveía condiciones de crecimiento normal y el medio de cultivo D proveía condiciones de estrés nutricional y oxidativo, pues el objetivo era la producción de ME, no forzar una mayor riqueza metabólica; y iii) las características intrínsecas de los hongos y su relación con el hospedero. Todo este conjunto de variables pudo influir en la mayor abundancia de metabolitos obtenida con *M. robertsii* Mt008.

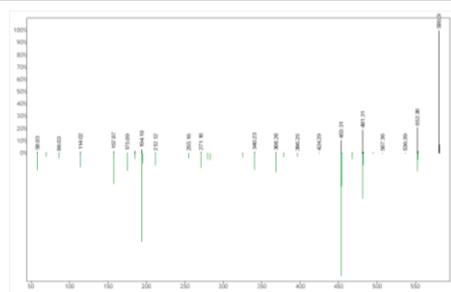
A continuación, se describen los compuestos derreplicados en la red compartida por ambas cepas por la plataforma de GNPS. Cabe resaltar que, las destruxinas que previamente fueron derreplicadas y que se encuentran en la tabla 4-7 fueron evidenciadas en esta red, por lo que no fueron incluidas en la tabla 4-9. Aparte de las destruxinas, se derreplicaron algunos péptidos, aminoácidos y alcaloides harmala por la plataforma de GNPS.

Tabla 4-9. Identificaciones putativas obtenidas a partir de la plataforma de GNPS para la fracción control obtenida después de la fermentación de *M. robertsii* Mt008 en el medio G₂₀P₂₀.

Red	Compuesto	[M+H] ⁺	Coseno	Error (ppm)	Espectro Espejo	Código QR
α-aminoácidos y derivados (Red 1)	Ciclo(L-Val-L-Pro)	197.1153	0.86	69		
α-aminoácidos y derivados (Red 1)	Phe-Pro de NIST14	245.1208	0.87	33		
α-aminoácidos y derivados (Red 1)	PyroGlu-Val de NIST14	229.1105	0.84	7		

Red	Compuesto	[M+H] ⁺	Coseno	Error (ppm)	Espectro Espejo	Código QR
α-aminoácidos y derivados (Red 1)	PyroGlu-Pro de NIST14	227.0941	0.71	34		
Péptido (Red 3)	Fru-Leu-Ile	407.2431	0.75	10		
Péptido (Red 3)	Fru-Leu-Ile	407.2432	0.74	10		

Red	Compuesto	[M+H] ⁺	Coseno	Error (ppm)	Espectro Espejo	Código QR
Alcaloides harmala (Red 5)	Ácido Tetrahydroharman-3-carboxílico	231.1052	0.82	33		
Selfloops	Abrina	188.0557	0.91	76		
Selfloops	Ácido ftálico*	148.9996	0.91	156		

Red	Compuesto	[M+H] ⁺	Coseno	Error (ppm)	Espectro Espejo	Código QR
Selfloops	Desmetildestroxina B*	580.3747	0.80	9		

*Estos compuestos se comparten con el hongo *M. robertsii* Mt004.

Al igual que con la red anterior, algunos *features* no pudieron ser derreplicados por la plataforma de GNPS, por lo que se utilizó la base de datos SIRIUS:CSI Finger. Los compuestos identificados putativamente se enlistan en la tabla 4-10.

Tabla 4-10. Identificaciones putativas obtenidas a partir de la búsqueda de la masa exacta en el SIRIUS: CSI Finger con un margen de error de 10 ppm para el sobrenadante crudo del medio de cultivo G₂₀P₂₀ producido por *M. robertsii* Mt008

Red	Origen (<i>Metarhizium</i>)	m/z obtenido	Aducto	Compuesto	Fórmula molecular	Error medio (ppm)	Sirius (% Total Explained Intensity)	Sirius score (%)	CSI: FINGER (%Similitud)	CANOPUS
2	Mt008	596.3695	[M+H]	Destruxin F	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₈	3.916	74.196	100.00	79.60	Ciclopepsipéptido
2	Mt008, Mt004	582.3538	[M+H]	Desmethyldestruxin E	C ₂₈ H ₄₇ N ₅ O ₈	5.935	75,813	0.001	66,47	Ciclopepsipéptido
2	Mt008, Mt004	610.3487	[M+H]	Destruxin D ₂	C ₂₉ H ₄₇ N ₅ O ₉	3.810	65.504	71.984	59.83	Ciclopepsipéptido
2	Mt008, Mt004	608.3694	[M+H]	Destruxin E ₁	C ₃₀ H ₄₉ N ₅ O ₈	4.624	79.827	0.909	67.41	Ciclopepsipéptido
2	Mt008, Mt004	630.3304	[M+H]	Chlorodestruxin	C ₂₉ H ₄₈ ClN ₅ O ₈	3.333	65.176	100.00	84.88	Ciclopepsipéptido
2	Mt008, Mt004	598.3484 ^{Ll}	[M+H]	Destruxin Ed ₂	C ₂₈ H ₄₈ O ₉ N ₅	NA	NA	N.A	NA	Ciclopepsipéptido
2	Mt008, Mt004	624.3643	[M+H]	Destruxin D	C ₃₀ H ₄₉ O ₉ N ₅	3-597	66.392	100.00	78.61	Ciclopepsipéptido
1	Mt008	261.1191	[M+H]	Asn-Gln	C ₉ H ₁₆ O ₅ N ₄	6.203	40.003	100.00	28.51	Dipéptido
1	Mt008	245.1225	[M+H]	Amidinoproclavamate	C ₉ H ₁₆ O ₄ N ₄	-1.308	27.845	100.00	37.21	α-aminoácidos y derivados
1	Mt008	277.1139	[M+H]	5-amino-6-(D-ribitylamino)uracil	C ₉ H ₁₆ O ₆ N ₄	-3.965	13.253	50.000	37.78	α-aminoácidos y derivados
1	Mt008	293.1118	[M+H]	Canavaninosuccinate	C ₉ H ₁₆ O ₇ N ₄	1.677	58.276	100.00	37.24	Dipéptidos
3	Mt008	490.2808	[M+H]	1-Guanidino-4-(N-nitro-benzoylamino-L-leucyl-L-prolylamino)butane	C ₂₇ H ₃₉ O ₇ N	1.464	76.77	100.00		N.A
3	Mt008	538.2805	[M+H]	N-[(2R,3S)-5-[(2S)-1-hydroxypropan-2-yl]-2-[[[4-methoxyphenyl)methyl-	C ₂₇ H ₃₅ O ₅ N ₇	1.873	86.763	4.857	43.42	Péptido

Red	Origen (<i>Metarhizium</i>)	m/z obtenido	Aducto	Compuesto	Fórmula molecular	Error medio (ppm)	Sirius (% Total Explained Intensity)	Sirius score (%)	CSI: FINGER (%Similitud)	CANOPUS
				methylamino]methyl]-3- methyl-6-oxo-3,4- dihydro-2H-1,5- benzoxazocin-8-yl]-2- (1-tetrazolyl)acetamide						
4	Mt008	427.2598	[M+H]	N-[3- (diethylamino)propyl]-4- [(2-methyl- [1,2,4]triazolo[1,5- c]quinazolin-5- yl)hydrazo]-4- oxobutanamide	C ₂₁ H ₃₀ O ₂ N ₈	2.585	60.895	100.00	N.A	Dipéptido
4	Mt008	637.3481	[M-H ₂ O+H]	H-Phe-Arg-Tyr-Leu- Gly-OH	C ₃₂ H ₄₆ O ₇ N ₈	2.092	81.216		46.24	Oligopéptido
8	Mt008, Mt004	600.3408	[M+H]	5-[2-(2-aminopyridin-4- yl)-4-{5-[1,13- dihydroxy-8-(2- hydroxyethyl)-6,7- didehydro- 1H,2H,3H,5aH,8H,9H,1 0H,11H,12H,13H,13aH - cyclohepta[10]annulen- 3-yl]-2- hydroxyphenoxy}butyl]- 3H-pyrrol-3-ide	C ₃₆ H ₄₅ N ₃ O ₅	0.762- 0.363	34.922	100.00	30.64	α -aminoácidos y derivados
8	Mt008	602.3562	[M+H]	2-(2-([6-amino-4-(2- phenylethyl)pyridin-3- yl]methyl)-4-hydroxy-5- methoxyphenyl)-1- hydroxy-12-methyl-13- (methylamino)tridec-2- ene-4,6-dione	C ₃₆ H ₄₇ N ₃ O ₅	-0.676	20.831	100.00	30.85	Dipéptido
8	Mt008, Mt004	616.3721	[M+H]	N-[(3S,9S,10R)-9- [[benzyl(methyl)amino] methyl]-12-[(2R)-1- hydroxypropan-2-yl]-	C ₃₇ H ₄₉ N ₃ O ₅	-0.042	29.699	100.00	40.97	Dipéptido

Red	Origen (<i>Metarhizium</i>)	m/z obtenido	Aducto	Compuesto	Fórmula molecular	Error medio (ppm)	Sirius (% Total Explained Intensity)	Sirius score (%)	CSI: FINGER (%Similitud)	CANOPUS
				3,10-dimethyl-13-oxo- 2,8-dioxa-12- azabicyclo[12.4.0]octad eca-1(14),15,17-trien- 16-yl]-2- phenylacetamide						

^{L1}: asignación tentativa con ayuda de la comparación con datos de literatura (Taibon et al., 2014 y Arroyo-Manzanares et al. 2017).

Todos los *features* agrupados en la red 2 pudieron ser derreplicados por la base de datos SIRIUS: CSI Finger y pertenecen a la familia de las destruxinas. En esta red 2 se observa que la mayoría de los compuestos son compartidos por ambas cepas de *Metarhizium*, salvo los *features* con m/z 616.3146 y m/z 596.3695 que corresponden a la destruxina E₂ chlorohidrina y destruxina C₂ y que son exclusivas para *M. robertsii* Mt004 cultivado en medio D. Así mismo, el *feature* con m/z 596.3695 que corresponde a la destruxina F resultó ser exclusiva para *M. robertsii* Mt008 cultivado en medio G₂₀P₂₀. Es interesante notar que ambos hongos producen un *feature* con m/z 596.3695, que indica que corresponde a un par de isómeros, pero que corresponde a compuestos diferentes porque los tiempos de retención son de 42,87 y 42,94 minutos para *M. robertsii* Mt004 y Mt008 respectivamente. Se realizó la derreplicación manual para evidenciar las diferencias entre estos dos compuestos, encontrando que, la producida por *M. robertsii* Mt004 corresponde a la destruxina C₂ mientras que para *M. robertsii* Mt008 corresponde a la destruxina F, que difieren entre sí por los iones b₄, a₄ y b₃ y el fragmento D⁺ (Arroyo-Manzanares et al., 2017).

Por otro lado, si se observa en la figura 4-16, específicamente en la red 2 perteneciente a las destruxinas, aparecen dos *features* con m/z idéntica: 624,36 con diferentes tiempos de retención (43.51 y 43.88 min) donde uno de ellos es compartido entre las dos cepas de *Metarhizium* y el otro *feature* es único para el hongo *M. robertsii* Mt008 crecido en el medio G₂₀P₂₀. Cuando se hizo la derreplicación por la plataforma de GNPS, el análisis arrojó que el *feature* compartido entre las dos cepas pertenecía a la destruxina D, que coincide con lo reportado por otros autores (Taibon et al. 2014, Arroyo-Manzanares et al., 2017), mientras que el otro *feature* no fue derreplicado. Sin embargo, cuando se realizó la derreplicación de este *feature* de *M. robertsii* Mt008 con el programa SIRIUS: Finger, éste arrojó que era el mismo *hit* (compuesto). Lo anterior no explicaba porque la plataforma GNPS los identificaba como dos *features* diferentes. Una hipótesis que se sugirió para explicar dicho fenómeno fue que posiblemente el rango de tolerancia del tiempo de retención era muy exigente (0,2 min), por lo que se aumentó su tolerancia a 0,5 y 1 minuto en el programa *MZmine* con el fin de observar si estos *features* se unían o no como uno solo. A los 0,5 minutos no se observaron grandes cambios, manteniendo la misma red con ambos *features* separados (Anexo B). Al modificar la tolerancia a un minuto (Anexo B) se observaron cambios considerables en las redes, manteniéndose los dos *features* con m/z de 624,36 separados, es decir no los unió en uno solo, lo que puede ser explicado porque los espectros MS/MS de ambos son lo suficientemente distintos para que la plataforma de

GNPS los considere como *features* (compuestos) diferentes. Con lo anterior uno de ellos (43.88 min) parece corresponder a la destruxina D, y el otro (43.51 min) no pudo ser identificado, pero fue clasificado como ciclodepsipéptido.

Es importante mencionar que, se realizó la búsqueda y derreplicación de los *selfloops* pertenecientes a las destruxinas que fueron encontrados en la red anterior. Se evidenció que la mayoría fueron compartidos entre las dos cepas: la hidroxihomodestruxina B, destruxina D₁, destruxina E₁, destruxina Ed₁, desmetildestruxina A, destruxina D₂, a excepción de la desmetildestruxina C (*m/z* 596.3696) que fue exclusiva para *M. robertsii* Mt004. En este análisis también se identificaron putativamente mediante el programa SIRIUS: CSI Finger compuestos producidos principalmente por *M. robertsii* Mt008 en el medio de cultivo G₂₀P₂₀ que fueron clasificados en diferentes redes, entre ellos se encuentran algunos dipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos excretados al medio de cultivo, que podrían ser resultados de productos de algunas vías metabólicas asociadas al metabolismo de compuestos nitrogenados o fragmentos de algunos péptidos.

4.4 Discusión

Los microesclerocios son considerados una alternativa promisoría para remplazar el uso de conidios como ingredientes activos de bioinsecticidas. Esto debido a que pueden ser producidos de manera más eficiente y controlada en fermentación líquida, a sus características de resistencia a las condiciones ambientales, y a la capacidad de producción de conidios secundarios infectivos (bajo las condiciones adecuadas). Sin embargo, el caldo de cultivo residual después de la cosecha de los ME también tiene un alto potencial, ya algunos de los metabolitos producidos durante la formación de estas estructuras podrían tener actividad insecticida. Los cuales podrían ser utilizados como aditivos para potenciar al hongo o como moléculas activas para el desarrollo de nuevos insecticidas.

En este trabajo se exploró el potencial insecticida de los metabolitos producidos durante la formación de ME por parte de la cepa Mt004 de *M. robertsii*. Durante la investigación se pudo establecer que los metabolitos producidos corresponden principalmente a destruxinas como se evidenció en los análisis por LC-MS/MS. Dado que, tanto el uso de

los microesclerocios como de los metabolitos producidos durante su formación causaron mortalidad de las larvas *D. saccharalis*, se podría sugerir el uso de ambos recursos en el desarrollo de un bioinsecticida que podría presentar mayor eficacia y persistencia, así como un menor tiempo letal en comparación con el desempeño de un producto tradicional a base conidios (Kim et al. 2013). Sin embargo, es necesario profundizar los estudios de la mezcla de los ME y el caldo de fermentación agotado con el fin de evidenciar efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos antes de su formulación, así como también, si es necesario realizar el proceso de extracción de la fracción orgánica o si se puede utilizar todo el caldo de fermentación para su formulación junto con los ME.

En el mercado actual de los bioplaguicidas fúngicos, los hongos *Metarhizium* spp y *Beauveria bassiana* son los más utilizados y los conidios son los propágulos fúngicos principalmente empleados como ingrediente activo. En Colombia se encuentran registrados los productos Metabiol® WP, Destruxin® WP, DeepGreen® SC, Metatropico® W, Inprometarhizium® WP, Bio-Ma® WG, Biometar® a base de conidios de cepas de *Metarhizium* sp. (ICA, 2021). Sin embargo, dentro de las especificaciones de los productos no se menciona si contienen destruxinas u otros metabolitos fúngicos con actividad insecticida.

Las destruxinas son metabolitos producidos por algunos hongos, entre los que se encuentra *Metarhizium*; y han sido usados en aplicaciones como insecticidas, citotóxicos, antivirales, inmunosupresores y fitotóxicos. Es más, las destruxinas son consideradas como determinantes de la patogenicidad de algunos hongos entomopatógenos usados como agentes biocontroladores para combatir plagas, y son una alternativa frente plaguicidas químicos (Arroyo-Manzanares, 2017).

Conforme con lo descrito por Ríos-Moreno et al. (2016), hay un gran número de estudios sobre la producción de destruxinas y no hay uniformidad en la información que permita hacer comparaciones entre sí, sin embargo, se ha evidenciado que la producción de destruxinas es completamente dependiente de la cepa en estudio, sus características genéticas y fisiológicas, así como también del medio de cultivo, y las condiciones de fermentación.

En el presente trabajo se utilizó un medio de cultivo que indujo la formación de microesclerocios por estrés oxidativo y nutricional (relación carbono: nitrógeno 55:1) y se

estableció que dichas condiciones también favorecieron que el hongo produjera destruxinas. Se detectó la presencia de al menos 24 destruxinas en el caldo de cultivo después de 20 días de fermentación, lo que sugiere que este medio líquido podría tener potencial para ser utilizado como un aditivo potenciador del hongo o como fuente de moléculas con actividad insecticida.

Con el objetivo de producir destruxinas, Wang et al (2004), evaluaron la influencia de diferentes relaciones de C:N con las cepas de *M. anisopliae* V245 y V275. Con todos los medios de cultivo se evidenció la presencia de las destruxinas A, B y E. Sin embargo, los autores notaron que a medida que aumentaba la concentración de peptona en el medio, se incrementaba la concentración de las destruxinas, por lo que sugirieron que la formación de destruxinas está altamente influenciada por la fuente de nitrógeno. Esto fue observado por Wang et al. (2016) al evaluar los efectos del agotamiento de la fuente de carbono y de nitrógeno sobre la producción de destruxinas. Estos autores evidenciaron que el agotamiento de la fuente de carbono incrementó la producción de destruxinas con la cepa BIPESCO 5 de *M. anisopliae*, mientras que el agotamiento de la fuente de nitrógeno afectó significativamente su producción, concluyendo que la disponibilidad de la fuente de nitrógeno juega un papel importante en la producción de destruxinas. En contraste, en el trabajo presentado por Liu et al (2000), se optimizó un medio de cultivo para la producción de destruxinas con una cepa de *M. anisopliae*. En dicho trabajo se demostró que la adición de maltosa en el medio de cultivo favoreció la producción de las destruxinas A y B, mientras que la fuente de nitrógeno no influyó significativamente.

Por otro lado, Ríos-Moreno (2016) evaluaron la producción de destruxinas bajo diferentes condiciones de estrés con algunas cepas de *Metarhizium* spp. Utilizaron cuatro medios de cultivo que proveían diferentes condiciones de estrés: CM (medio completo semisintético-condición normal), MM (medio mínimo de sales- estrés nutricional), OSM (medio de estrés osmótico) y CN2 (medio de estrés por carbono). Dentro de los resultados más relevantes encontraron que la concentración de destruxinas varió considerablemente con la cepa fúngica y el medio de cultivo. Con la cepa ARSEF 23 de *M. robertsii* se observó que el medio de cultivo OSM indujo una mayor producción de las destruxinas A y B en comparación con los demás medios de cultivo, y con este mismo medio se logró la mayor detección de las destruxinas producidas.

Taibon et al. (2014) también cuantificaron la producción de las destruxinas A y B por parte de tres cepas de *M. brunneum* en dos medios de cultivo, Czapek-Dox y Sabouraud Dextrosa, los cuales proveían una condición normal y una condición de estrés por carbono, respectivamente. Independientemente del medio de cultivo, la cepa BIPESCO 5 produjo una mayor concentración de destruxinas, mientras que con la cepa ART2825 estuvieron por debajo del límite de cuantificación (LOQ Dtx A y B: 1.2 µg/mL, Dtx E 4.3 µg/mL)

Estos estudios confirman que la diversidad, producción y concentración de las destruxinas en los diferentes medios de cultivo son dependientes de la composición y condiciones de fermentación, así como de las características genéticas propias de la cepa de *Metarhizium* utilizada. En un trabajo realizado por Xu et al. (2016) compararon los *clusters* genéticos involucrados en el metabolismo secundario de diferentes especies de *Metarhizium* spp., *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. majus*, *M. guizhouense*, *M. brunneum*, *M. album*, y *M. acridum*, encontrando que, a excepción de las dos últimas especies, todas conservaban los *clusters* que dirigen la producción de destruxinas. En ese mismo estudio, el análisis metabolómico mediante LC-MS de las diferentes especies de *Metarhizium* spp. resultó en la identificación de alrededor de 102 compuestos con estructuras conocidas según las diferentes bases de datos. Estos incluyen las destruxinas, hirsutellones alcaloides, macrociclo torrubielutinas, naftoquinonas naftogeranina y tricotecanas espirotenuipesinas, entre otras. Este estudio concluyó que, la diversidad genética y química entre las diferentes especies de *Metarhizium* sp. está íntimamente relacionado con la adaptación fúngica a diversos hospederos.

En esta tesis de maestría, se encontró que el sobrenadante crudo y la fracción orgánica del cultivo de la cepa *M. robertsii* Mt004 en el medio de cultivo D causaron una mortalidad promedio del 48% después de 15 días de evaluación con una dosis de 500 ppm sobre larvas de *D. saccharalis*. Dado que, el objetivo principal de este trabajo fue la producción de microesclerocios y no de las destruxinas, este resultado contrasta con algunos estudios dirigidos exclusivamente a la producción de destruxinas, por ejemplo el de Hu et al. (2006), quienes evaluaron la actividad insecticida de las destruxinas purificadas provenientes de una cepa de *M. anisopliae* contra larvas de *Spodoptera litura*, encontrando que la administración de éstas en una concentración de 200 ppm causó una mortalidad del 21,6% después de 13 días. Sree et al. (2008) evidenciaron que, cuando administraron a una concentración de 500 ppm del extracto crudo que contenía destruxinas producidas las cepas M-10 y M-19 de *M. anisopliae* en larvas de *S. litura*, obtuvieron una mortalidad del

100% después de 12 días. En otro estudio, Lozano-Tovar et al. (2015) evaluaron la actividad insecticida de un extracto crudo obtenido a partir de una cepa de *M. brunneum* Petch EAMb 09/01-Su sobre *Ceratitis capitata*, tanto el extracto crudo como la fracción EtOAc:2-propanol (400 ppm) causaron mortalidades entre 90 y 100% después de 48 horas. El análisis de MS/MS de este extracto detectó 13 compuestos, entre los que se encuentran la destruxina A, A₂, B, B₂ y desmetildestruxina B. Las subfracciones correspondientes a la destruxina A y A₂ fueron las que retuvieron mayor actividad insecticida, entre un 40-75% y 75-100% de mortalidad.

Aunque en el presente estudio no se realizaron estudios de la actividad *antifeeding*, las observaciones indicaron una disminución en la ingesta de la dieta y un menor tamaño de las larvas (en comparación con el testigo) provocada posiblemente por la administración de dichos tratamientos. Varios autores han mencionado que la actividad insecticida de las destruxinas es debido a la combinación de una actividad fagodepresiva cuando se ingieren las destruxinas, y sus efectos tóxicos en la permeabilidad e integridad de la membrana celular, la fosforilación de algunas proteínas, actividad enzimática de la fenoloxidasas, entre otros (Strasser et al. 2000; Hu et al. 2006). Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que las larvas murieran por inanición y los efectos de las destruxinas sobre la membrana celular, sin embargo, esta hipótesis debe ser confirmada en estudios futuros.

El análisis de redes moleculares confirmó la presencia de 24 destruxinas en el sobrenadante de cultivo de *M. robertsii* Mt004 en el medio D, entre las cuales se encuentran las mismas que se producen por cultivo de *M. robertsii* Mt008 en el medio de cultivo G₂₀P₂₀. En ambas cepas se identificaron las destruxinas B₁, A₂, A, A₁, E_d, D, B, para las cuales se ha reportado actividad insecticida (Hu et al. 2006, Sree et al. 2008, Lozano-Tovar et al. 2015). En este sentido, es posible sugerir que dichas destruxinas fueran las causantes de la mortalidad en larvas de *D. saccharalis* (Strasser et al. 2010, Liu y Tzeng 2012). Estas toxinas han sido ampliamente reconocidas por causar debilidad en el sistema inmunológico, parálisis tetánica inicial, daños en el sistema muscular y túbulos de Malpighi, afectan la excreción y dificultan la alimentación y movilidad del insecto (Strasser et al. 2000; Liu y Tzeng 2012). Bioquímicamente, las destruxinas causan cambios en la transducción de señales por fosforilación de ciertas proteínas en lepidópteros y debido a sus propiedades ionofóras, son capaces de formar complejos con cationes modificando la polaridad de la membrana celular (Strasser et al. 2000; Liu et al. 2004; Liu y Tzeng 2012).

De las destruxinas identificadas en las dos cepas, solo tres de estas se detectaron en *M. robertsii* Mt004 y no en *M. robertsii* Mt008, ellas son: la destruxina C₂ (m/z 596.3695 $rt=$ 42,87), desmetildestruxina C (m/z 596.3695) y la destruxina E₂ clorohidrina (m/z 616.3146). Como se ha mencionado a lo largo de este capítulo, es posible que las variables como el medio de cultivo y el método de extracción pudieran influir en la detección y/o producción de dichas destruxinas por parte de *M. robertsii* Mt004. Dicho esto, la diversidad química depende en gran medida de las diferentes condiciones que se establezcan (Barelli, 2020).

Las destruxinas que son diferentes para las dos cepas de *Metarhizium* estudiadas no han sido tan estudiadas como las destruxinas A, B y E. La desmetildestruxina C fue descrita por primera vez por Wahlman y Davidson en el año 1993, y fue aislada a partir de una cepa de *M. anisopliae*. Su estructura es similar a la destruxina C, se conforma de la secuencia de aminoácidos común para todas las destruxinas difiriendo en el radical del α -hidroxiácido ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{CH}_2\text{OH}$) y la demetilación del aminoácido MeVal en la posición AA4 (Taibon et al., 2014, Arroyo-Manzanares et al., 2017, Wahlman y Davidson, 1993). Su actividad biológica no ha sido bien estudiada, sólo se ha reportado que pueden llegar a ser tóxicas para la termita *Coptotermes formosanu* (Wahlman y Davidson 1993). La destruxina C₂ fue descrita por primera vez por País et al (1981) a partir de un aislamiento de *M. anisopliae*, esta destruxina sólo difiere de la destruxina C por el reemplazo del aminoácido valina en vez de la isoleucina en la posición AA3, su actividad biológica específica no se ha evaluado, pero su uso combinado con otras destruxinas ha demostrado una actividad antibacteriana frente a *Clostridium perfringens* (Maresca et al. 2020).

Por otro lado, la destruxina E₂ clorohidrina fue identificada por primera vez en 1996 por Yeh et al. (1996) a partir de una cepa de *M. anisopliae*. Esta destruxina tiene la misma secuencia de aminoácidos que la destruxina E difiriendo del radical del hidroxiácido, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Cl}$ y la presencia de un residuo de valina en vez de isoleucina en el aminoácido AA3. La formación de los metabolitos que puedan ser considerados como derivados de la destruxina E ha sido objeto de discusión por parte de varios autores debido a la inestabilidad intrínseca de la destruxina E, pues contiene un epóxido terminal en la cadena lateral del α -hidroxiácido, proponiendo que los derivados son en realidad un producto de su transformación y no “nuevas toxinas” producidas por *M. anisopliae* (Dudley et al. 2004) como lo proponen otros autores (Yeh, et al. 1996). Las observaciones realizadas por Dudley et al. (2004) demostraron que la conversión de la destruxina E a la destruxina E diol es un proceso no enzimático que puede ocurrir durante el proceso de

almacenamiento, y, de manera similar ocurre con la destruxina Ed₂ que podría ser el resultado de la transformación de la destruxina E₂ (Arroyo-Manzanares et al. 2017).

En el caso de la destruxina E₂ clorhidrina, en este trabajo se propone como un artefacto producto de transformación de la destruxina E en presencia de iones cloruro presentes en el medio de cultivo. Estos nucleófilos atacarían al epóxido de la dtx E por una S_N2 formando la clorhidrina. Si bien, esta hipótesis podría explicar su formación, se desconoce si la reacción de transformación de la destruxina E con los iones de cloro son los responsables de la presencia de este compuesto en extractos fúngicos (Dudley et al. 2004). Yeh et al. (1996) identificó este metabolito y evaluó su actividad biológica sobre células del hepatoma humano, demostrando que la destruxina E₂ clorhidrina fue capaz de suprimir la secreción de HBsAg en células Hep3B de hepatoma humano; sin embargo, no se ha reportado como metabolito con actividad insecticida.

Para el caso del sobrenadante de *M. robertsii* Mt008 producido en el medio de cultivo G₂₀P₂₀, se identificó sólo una destruxina diferenciadora, la destruxina F aislada por primera vez de *M. anisopliae* por Wahlman y Davidson (1993), respectivamente. Esta destruxina se conforma de la misma secuencia de aminoácidos: DHA-Pro-Ile-MeVal-MeAla-βala, difiriendo únicamente del radical del hidroxiaácido, el radical 2,4-dihidroxipentanoico. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los estudios han sido dirigidos hacia la biosíntesis y producción de las destruxinas A, B y E, eclipsando estudios con las demás destruxinas, se conoce que esta destruxina podría estar involucradas en la actividad insecticida de algunos insectos (Wahlman y Davidson, 1993), y recientemente la producción de dicha destruxina junto con otras destruxinas podrían dictar la interacción con plantas hospederas para el control de fitopatógenos (Barelli 2020).

Por otro lado, dentro los compuestos derreplicados por el GNPS para el sobrenadante de *M. robertsii* Mt008, llama la atención el ácido tetrahydroharman-3 carboxílico perteneciente al grupo de los alcaloides harmala. Si bien poco se conoce acerca de este compuesto, y no ha sido relacionado con cepas de *Metarhizium* sp, se ha evidenciado que interviene en reacciones entre aminoácidos y ácidos orgánicos, como es el caso del triptófano y ácido pirúvico (Chu y Clydesdale 1976). Por otro lado, el compuesto abrina producido principalmente por la planta *Abrus precatorius* ha sido estudiado por su potencial fitotóxico (Johnson et al. 2009). Si bien, no ha sido detectado previamente en cepas de *Metarhizium*

sp., se ha evidenciado la producción de compuestos como 4-dimetil-alil-l-abrina en el hongo *Aspergillus fumigatus*, este compuesto parece estar involucrado metabólicamente en la formación de alcaloides de ergot (Gerhards et al. 2014).

En ambas cepas se detectaron péptidos, aminoácidos y oligopéptidos que pueden ser de gran interés biotecnológico. Se conoce que la mayoría de los hongos ascomicetos producen un gran número de metabolitos secundarios que podrían ser parte de la “carrera armamentista” evolutiva entre hongos e insectos y su diversidad se debe a varios fenómenos genéticos como duplicación de genes y transferencia horizontal de genes. Se han descrito múltiples vías metabólicas mediante estudios de secuencia del genoma, siendo estos compuestos posiblemente parte de la formación de otros compuestos conocidos o parte de vías metabólicas que son tan únicas que aún no se han logrado predecir (Wang et al. 2019).

De acuerdo con Donzelli y Krasnoff (2016), la relación entre el metabolismo secundario fúngico y la patogenicidad está muy lejos de comprenderse, y para la gran mayoría de los casos, el papel de estas moléculas pequeñas en estos procesos complejos sigue siendo muy esquivos. Durante el desarrollo esclerotial, la producción de metabolitos secundarios ha sido relacionados a numerosas funciones biológicas, como mensajeros químicos entre microorganismos, defensa química frente a depredadores y competencia con otros microorganismos (Calvo y Cary, 2005).

4.5 Conclusiones y recomendaciones

La fermentación de *M. robertsii* Mt004 en el medio de cultivo D permitió la formación de microesclerocios, el sobrenadante fue extraído con solvente orgánico y este extracto mostró una actividad insecticida del 48% sobre larvas de *D. saccharalis* a 500 ppm. Los metabolitos presentes en el extracto fueron caracterizados mediante el estudio de sus espectros de MS/MS como las destruxinas A, A₂ y B, que fue confirmado por sus tiempos de retención en HPLC usando un extracto rico en destruxinas como patrón, que había sido previamente caracterizado. Posteriormente, este extracto fue estudiado mediante redes moleculares lo que permitió evidenciar la presencia de 7 *features* dereplicados como las destruxinas A, A₁, A₂, B, B₁, D, E_d; el uso de la base de datos SIRIUS:CSI Finger, permitió sugerir la presencia adicional de 17 destruxinas. En total fueron identificadas

putativamente 24 destruxinas producidas por *M. robertsii* Mt004 cultivado en el medio de cultivo D.

Se encontraron tres destruxinas que produce *M. robertsii* Mt004 cultivado en medio D, y que no fueron detectas el extracto control de *M. robertsii* Mt008 cultivado en medio de cultivo G₂₀P₂₀, la destruxina C₂, desmetildestruxina C y destruxina E₂ clorhidrina. Lo anterior, está de acuerdo con la observación que los metabolitos producidos son dependientes de la composición del medio, las condiciones de fermentación, el hongo evaluado y su relación con el hospedero.

A la luz de estos resultados, el caldo de fermentación usado para la producción de ME también podría ser aprovechado en cuanto a su contenido de metabolitos. Pudiendo ser formulado, junto con los microesclerocios producidos por la cepa de *M. robertsii* Mt004 para el desarrollo de un bioplaguicida fúngico. Sin embargo, es recomendable evaluar el efecto de los metabolitos en mezcla con los ME, con el fin de evidenciar un potencial efecto aditivo o sinérgico que sustente su uso combinado para la producción de un bioplaguicida más eficiente. También es recomendable evaluar si es necesario realizar el proceso de extracción para la obtención de la fracción orgánica, o, si se puede utilizar todo el caldo de fermentación agotado. En este punto es importante mencionar que el caldo de fermentación agotado debería ser estudiado en cuanto a otros metabolitos diferentes a las destruxinas acá ya estudiadas.

Por otro lado, el proceso de extracción mediante fraccionamiento por solventes puede ser considerado como una alternativa para la obtención de las destruxinas, lo que permitiría disminuir los costos, tiempos y utilización de solventes. Sin embargo, se deben realizar estudios más precisos de rentabilidad y rendimientos en comparación con las técnicas tradicionales empleadas en la extracción y separación de dichos compuestos.

4.6 Bibliografía

Aaron A., Gentry E., McPhail K, et al (2020). Reproducible Molecular Networking Of Untargeted Mass Spectrometry Data Using GNPS. Nat Methods; 17(9): 905–908.

Afoullouss S, Balsam A, Allcock AL, Thomas OP (2022) Optimization of LC-MS 2 Data Acquisition Parameters for Molecular Networking Applied to Marine Natural Products.

- Metabolites 12 (3): 245. <https://doi.org/10.3390/metabo12030245>
- Angel E., Rodriguez V., Mendez G., Lozano-Tovar (2021) *Metarhizium robertsii* y sus metabolitos para el control de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en Colombia. Memorias Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. 48 Congreso SOCOLEN. Sociedad Colombiana de Entomología. p 103. 1, 2 y 3 de septiembre de 2021, Ibagué, Tolima, Colombia
- Arroyo-Manzanares N, Diana Di Mavungu J, Garrido-Jurado I, Arce L, Vanhaecke L, Quesada-Moraga E, De Saeger S (2017) Analytical strategy for determination of known and unknown destruxins using hybrid quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (13):3347-3357. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0276-z>
- Calvo AM, Cary JW (2015) Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Frontiers in Microbiology* 6(2):1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00062>
- Calvo AM, Wilson RA, Bok J, Keller NP (2002) Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3):447-459. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447>
- Carollo CA, Calil ALA, Schiave LA, Guaratini T, Roberts DW, Lopes NP, Braga GUL (2010) Fungal tyrosine betaine, a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp. fungi. *Fungal Biology* 114(5-6):473-480. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.03.009>
- Chu N.T and Clydesdale F.M (1976). Reactions between amino acids and organic acids: reaction of tryptophan and pyruvic acid. *Journal of food science*, 41:891:894.
- Donzelli BGG, Krasnoff SB (2016) *Molecular Genetics of Secondary Chemistry in Metarhizium Fungi*. Elsevier Ltd
- Donzelli BGG, Krasnoff SB, Sun-Moon Y, Churchill ACL, Gibson DM (2012) Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. *Current Genetics* 58(2):105-116. <https://doi.org/10.1007/s00294-012-0368-4>
- Dudley E, Wang C, Skrobek A, Newton RP, Butt TM (2004) Mass spectrometric studies on the intrinsic stability of destruxin E from *Metarhizium anisopliae*. *Rapid*

Communications in Mass Spectrometry 18(21):2577-2586.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1659>

Dührkop K, Fleischauer M, Ludwig M, Aksenov AA, Melnik A V., Meusel M, Dorrestein PC, Rousu J, Böcker S (2019) SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods* 16(4):299-302.
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>

He P, Wang K, Cai Y, Hu X, Zheng Y, Zhang J, Liu W (2018) Involvement of autophagy and apoptosis and lipid accumulation in sclerotial morphogenesis of *Morchella importuna*. *Micron* 109(March):34-40. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.03.005>

Hu QB, Ren SX, Wu JH, Chang JM, Musa PD (2006) Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon* 48(5):491-498.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.06.018>

ICA, 2021. Productos bioinsumos registrados - Enero 2021. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/areas/agricola/servicios/agricultura-ecologica-1/documentos/productos-bioinsumos-marzo-14-2018.aspx>. Consultado el 14 de abril de 2022.

Jackson MA, Jaronski ST (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research* 113(8):842-850.
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>

Johnson R., Zhou Y., Jain R., Lemire S., Fox S., Sabourin P., Barr J (2019). Quantification of L-Abrine in Human and Rat Urine: A Biomarker for the Toxin Abrin. *Journal of Analytical Toxicology*, 33: 77-84.

Lacatena F., Marra R., Mazzei P., Piccolo A., Digilio M., Giorgini M., Woo S., Cavallo P., Lorito M., Vinale F. (2019) Chlamyphilone, a Novel *Pochonia chlamydosporia* Metabolite with Insecticidal Activity. *Molecules* 24: 1-11.

Liu BL, Tzeng YM (2012) Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances* 30(6):1242-1254.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.006>

Liu CM, Huang SS, Tzeng YM (2004) Purification and Quantitative Analysis of Destruxins from *Metarhizium anisopliae* by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 27(6):1013-1025. <https://doi.org/10.1081/JLC-120030175>

Lodesani M, Costa C, Franceschetti S, Bergomi P, Galaverna G, Dall'Asta C (2017) Toxicidad de destruxinas contra el ácaro parásito *Varroa destructor* y su hospedador *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 56(3):278-287. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1304611>

Lozano-Tovar MD, Garrido-Jurado I, Lafont F, Quesada-Moraga E (2015) Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 108(2):462-472. <https://doi.org/10.1093/jee/tov041>

Lozano Tovar MD, Ballestas K., Mendez G. Hongos entomopatogenos y sus compuestos bioactivos para el control dual de adultos y pre-imaginales de las moscas de las frutas (2021). *Memorias Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. 48 Congreso SOCOLEN. Sociedad Colombiana de Entomología. p 100. 1, 2 y 3 de septiembre de 2021, Ibagué, Tolima, Colombia. 256 p.*

Mascarin GM, Kobori NN, de Jesus Vital RC, Jackson MA, Quintela ED (2014) Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(5):1583-1590. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1581-0>

Mohimani H, Gurevich A, Shlemov A, Mikheenko A, Korobeynikov A, Cao L, Shcherbin E, Nothias LF, Dorrestein PC, Pevzner PA (2018) Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nature Communications* 9(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>

Nothias LF, Petras D, Schmid R, Dührkop K, et al. (2020) Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods* 17(9):905-908. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>

Oide S, Turgeon BG (2020) Natural roles of nonribosomal peptide metabolites in fungi.

Mycoscience 61(3):101-110. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2020.03.001>

Pais M., Das B.C., Ferron P. 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* 20 (4):715-723.

Patel TK (2020) Chapter 29: *Metarhizium*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. 593-610. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00029-0>

Payne GA, Brown MP (1998) Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Review of Phytopathology* 36(October):329-362. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.329>

Ravindran K, Akutse KS, Sivaramakrishnan S, Wang L (2016) Determination and characterization of destruxin production in *Metarhizium anisopliae* Tk6 and formulations for *Aedes aegypti* mosquitoes control at the field level. *Toxicon* 120:89-96. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.016>

Ríos-Moreno A, Carpio A, Garrido-Jurado I, Arroyo-Manzanares N, Lozano-Tovar MD, Arce L, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Quesada-Moraga E (2016) Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS. *Biocontrol Science and Technology* 26(9):1298-1311. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1195336>

Rivas-Franco F, Hampton JG, Altier NA, Swaminathan J, Rostás M, Wessman P, Saville DJ, Jackson TA, Jackson MA, Glare TR (2020) Production of Microsclerotia From Entomopathogenic Fungi and Use in Maize Seed Coating as Delivery for Biocontrol Against *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4(December):1-13. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.606828>

Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56(7):1267-1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>

Sobolev VS, Cole RJ, Dorner JW, Horn BW, Harrigan GG, Gloer JB (1997) Isolation and structure elucidation of a new metabolite produced by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Natural Products* 60(8):847-850. <https://doi.org/10.1021/np970131m>

Song Z (2018) Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing

- factors, and molecular mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(23):9873-9880. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9400-z>
- Sree KS, Padmaja V, Murthy YL (2008) Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest management science* 64:119-125. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Strasser H, Vey A, Butt TM (2000) Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?. *Biocontrol Science and Technology* 10(6):717-735. <https://doi.org/10.1080/09583150020011690>
- Taibon J, Sturm S, Seger C, Parth M, Strasser H, Stuppner H (2014) Development of a fast and selective UHPLC-DAD-QTOF-MS/MS method for the qualitative and quantitative assessment of destruxin profiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(29):7623-7632. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8203-z>
- Villamizar LF, Nelson TL, Jones SA, Jackson TA, Hurst MRH, Marshall SDG (2018) Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. *Biocontrol Science and Technology* 28(12):1097-1113. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1514584>
- Wahlman M, Davidson B (1993) New destruxins from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Natural Products* 56(4):643-647. <https://doi.org/10.1021/np9601216>
- Wang J, Lovett B, St. Leger RJ (2019) The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi. *Fungal Ecology* 38:7-11. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.04.001>
- Wang M, Carver JJ, Phelan V V., Sanchez LM, et al. (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* 34(8):828-837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Xu YJ, Luo F, Li B, Shang Y, Wang C (2016) Metabolic conservation and diversification of *Metarhizium* species correlate with fungal host-specificity. *Frontiers in Microbiology*

7(DEC):1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02020>

Yadav R, Rashid M, Zaidi N, Kumar R, Singh H (2019) Secondary Metabolites of *Metarhizium* spp. and *Verticillium* spp. and Their Agricultural Applications

Yeh SF, Pan W, Ong GT, Chiou AJ, Chuang CC, Chiou SH, Wu SH (1996) Study of structure-activity correlation in destruxins, a class of cyclodepsipeptides possessing suppressive effect on the generation of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229(1):65-72. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1758>

Yu JH, Keller N (2005) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* 43(114):437-458. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>.

5. Conclusiones y recomendaciones generales

La cepa Mt004 identificada como *Metarhizium robertsii* fue capaz de producir ME con todos los medios de cultivos evaluados, destacándose los medios de cultivo que contenían extracto de levadura como fuente de nitrógeno (A y D), con los cuales se alcanzaron rendimientos finales de $1,64 \times 10^3$ y $1,43 \times 10^3$ ME/mL. A los 8 días de fermentación, los ME presentaron poca pigmentación, por lo que se decidió extender el proceso hasta los 20 días para permitir la maduración de las estructuras. El medio de cultivo D que contenía la mayor relación de C:N (55:1) y extracto de levadura como fuente de nitrógeno fue seleccionado por producir el mayor rendimiento de estructuras ($2,04 \times 10^3$ ME/mL), que al esporular produjeron alrededor de $6,02 \times 10^5$ conidios por ME. Estos resultados permitieron concluir que el tiempo de fermentación y la fuente de nitrógeno son condiciones críticas que determinan la formación, compactación y pigmentación de los ME. De esta forma, los parámetros establecidos en este trabajo son la línea base para una futura optimización del proceso, que permita aumentar los rendimientos por mililitro.

La caracterización ultraestructural de los ME, permitió describir los cambios que presentan estos propágulos en su interior durante su proceso de maduración. Se pudo concluir que los ME inician su formación como agregados de hifas que con el tiempo se empiezan a compactar. A medida que maduran, la lisis de las células en el interior genera la formación de una matriz extracelular que va migrando hacia la superficie hasta recubrir completamente la estructura. Los ME maduros de 20 días edad presentaron dos zonas, la interna caracterizada por una baja densidad de células sueltas y viables embebidas en la matriz extracelular y una zona externa con mayor densidad de células e hifas entrelazadas. El análisis composicional no detectó la presencia de trehalosa, pero sí de manitol y otros carbohidratos que podrían ser parte de la composición de la matriz extracelular. Sin embargo, se recomienda utilizar técnicas más sensibles para la caracterización e identificación de los carbohidratos presentes en el contenido intracelular de los ME.

En este trabajo se confirmó que los ME son propágulos fúngicos más tolerantes a condiciones de estrés como la temperatura y la radiación ultravioleta, en comparación con los conidios producidos en fermentación sólida. En cuanto a la estabilidad en almacenamiento, los ME fueron estables durante 6 meses a 8°C manteniendo una germinación superior al 80%, pero redujeron su viabilidad cuando se almacenaron a mayores temperaturas (18 y 28°C). Dado que, la humedad es uno de los principales factores que afecta los propágulos fúngicos cuando son almacenados durante largos periodos de tiempo, se recomienda para posteriores trabajos, reducir el contenido de humedad de los ME cosechados y/o formulados a valores alrededor del 2,5% antes de su empaque y almacenamiento. También se recomienda utilizar sistemas de empaque con atmósfera modificada que reduzca la presencia de oxígeno, con miras a disminuir al máximo el metabolismo fúngico y lograr una mayor supervivencia de los propágulos en el tiempo.

Se demostró que los conidios producidos por los ME germinados fueron patogénicos para las larvas de *D. saccharalis* alcanzando un 78% de eficacia en un bioensayo bajo condiciones de laboratorio, resultado similar al obtenido con conidios producidos por el método tradicional de fermentación sólida (84,23).

M. robertsii Mt004 produjo metabolitos extracelulares con actividad insecticida (50% de eficacia sobre larvas de *D. saccharalis*) durante la formación de ME en fermentación líquida. Dentro de dichos metabolitos se identificaron las destruxinas A, A₂ y B, compuestos previamente reportados por su efecto tóxico y letal para varios insectos plaga. Es importante mencionar que, el proceso de extracción de los metabolitos utilizado en este trabajo puede ser considerado como una alternativa para la obtención de las destruxinas, lo que permitiría disminuir los costos, tiempos y utilización de solventes.

Los datos de MS/MS obtenidos para la fracción activa (FO), fueron usados en la construcción de redes moleculares utilizando la plataforma GNPS (*Global Natural Product Molecular Networking Social*). El análisis indicó que la FO se componía principalmente de compuestos de la familia de los ciclodepsipéptidos sugiriendo la presencia de 24 destruxinas, entre las cuales se encuentran las destruxina C₂, desmetil destruxina C y la

destruxina E₂ clorhidrina que se produjeron únicamente en el medio de cultivo D inoculado con el hongo *M. robertsii* Mt004.

Tanto los microesclerocios, como los metabolitos liberados durante su formación, causaron mortalidad sobre el insecto modelo, lo que nos permite concluir que los dos recursos pueden ser usados como ingredientes activos para el desarrollo de bioplaguicidas. Además, considerando que los mecanismos de acción son diferentes para los propágulos fúngicos y para los metabolitos, se recomienda evaluar el efecto de los metabolitos en mezcla con los ME, con el fin de evidenciar efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos sobre la actividad insecticida frente a diferentes insectos blanco

A. Anexo: Análisis estadísticos

Capítulo 2.

Medio de cultivo A

```
One-Way AOV for: d4 d6 d8

Source   DF      SS      MS      F      P
Between  2   7.44872   3.72436   433   0.0000
Within   14   0.12032   0.00859
Total    16   7.56904

Grand Mean 2.7073   CV 3.42

Bartlett's Test of Equal Variances   Chi-Sq  DF      P
Cochran's Q                           5.04    2    0.0804
Largest Var / Smallest Var           9.5056

Component of variance for between groups  0.65800
Effective cell size                       5.6

Variable N    Mean    SE
d4       5    1.6868  0.0415
d6       6    3.0550  0.0378
d8       6    3.2100  0.0378
```

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

```
Variable   Mean  Homogeneous Groups
d8         3.2100  A
d6         3.0550  B
d4         1.6868  C

Alpha                0.05
Critical Q Value     3.703
All 3 means are significantly different from one another.
```

Medio de cultivo B

```
One-Way AOV for: d6 d8

Source   DF      SS      MS      F      P
Between  1   0.79734   0.79734   22.3   0.0022
Within   7   0.25082   0.03583
Total    8   1.04816

Grand Mean 1.9478   CV 9.72

Bartlett's Test of Equal Variances   Chi-Sq  DF      P
Cochran's Q                           0.43    1    0.5140
Largest Var / Smallest Var           2.1172

Component of variance for between groups  0.17134
Effective cell size                       4.4

Variable N    Mean    SE
d6       4    1.6150  0.0946
d8       5    2.2140  0.0847
```

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

```
Variable   Mean  Homogeneous Groups
d8         2.2140  A
d6         1.6150  B

Alpha                0.05
Critical Q Value     3.345
All 2 means are significantly different from one another.
```

Medio de cultivo C

One-Way AOV for: d6 d8 d4

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	1.15772	0.57886	20.1	0.0005
Within	9	0.25905	0.02878		
Total	11	1.41677			

Grand Mean 1.7117 CV 9.91

Chi-Sq	DF	P	
Bartlett's Test of Equal Variances	5.70	2	0.0578
Cochran's Q	0.8523		
Largest Var / Smallest Var	33.422		

Component of variance for between groups 0.14045
Effective cell size 3.9

Variable	N	Mean	SE
d6	3	1.5467	0.0980
d8	5	2.0720	0.0759
d4	4	1.3850	0.0848

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
d8	3.1260	A
d6	3.0040	A
d4	1.0840	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1479
Critical Q Value 3.783 Critical Value for Comparison 0.3958
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Medio de cultivo D

One-Way AOV for: d6 d8 d4

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	13.1184	6.55921	120	0.0000
Within	12	0.6566	0.05471		
Total	14	13.7750			

Grand Mean 2.4047 CV 9.73

Chi-Sq	DF	P	
Bartlett's Test of Equal Variances	3.14	2	0.2083
Cochran's Q	0.6755		
Largest Var / Smallest Var	6.4918		

Component of variance for between groups 1.30090
Effective cell size 5.0

Variable	Mean
d6	3.0040
d8	3.1260
d4	1.0840

Observations per Mean 5
Standard Error of a Mean 0.1046
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1479

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
d8	2.0720	A
d6	1.5467	B
d4	1.3850	B

Alpha 0.05
Critical Q Value 3.948
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Variable: Blastosporas

One-Way AOV for: MA8 MB8 MC8 MD8 MA4 MB4 MC4 MD4

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	7	1.071E+14	1.530E+13	8.22	0.0000
Within	92	1.713E+14	1.862E+12		
Total	99	2.784E+14			

Grand Mean 2.26E+06 CV 60.43

Chi-Sq	DF	P	
Bartlett's Test of Equal Variances	71.1	7	0.0000
Cochran's Q	0.3493		
Largest Var / Smallest Var	87.352		

Component of variance for between groups 1.082E+12
Effective cell size 12.4

Variable	N	Mean	SE
MA8	15	3.66E+06	352300
MB8	13	2.08E+06	378431
MC8	9	618667	454818
MD8	12	3.46E+06	393884
MA4	18	2.50E+06	321605
MB4	11	1.69E+06	411398
MC4	10	492800	431478
MD4	12	2.36E+06	393884

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
MA8	3.66E+06	A
MD8	3.46E+06	AB
MA4	2.50E+06	ABC
MD4	2.36E+06	ABC
MB8	2.08E+06	BCD
MB4	1.69E+06	CD
MC4	492800	D
MC8	419455	D

Alpha 0.05
Critical Q Value 4.383
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Variable: Conidios

One-Way AOV for: MA8 MB8 MC8 MD8 MA4 MB4 MC4 MD4

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	7	3.810E+13	5.443E+12	18.3	0.0000
Within	92	2.733E+13	2.971E+11		
Total	99	6.543E+13			

Grand Mean 780622 CV 69.82

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	101	7	0.0000
Cochran's Q	0.4237		
Largest Var / Smallest Var	258.87		

Component of variance for between groups 4.146E+11
Effective cell size 12.4

Variable	N	Mean	SE
MA8	16	243000	136261
MB8	9	558222	181681
MC8	9	307012	181681
MD8	9	545778	181681
MA4	14	725714	145669
MB4	15	1.72E+06	140730
MC4	14	137651	145669
MD4	14	1.69E+06	145669

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
MB4	1.72E+06	A
MD4	1.69E+06	A
MA4	725714	B
MB8	558222	B
MD8	545778	B
MC8	307012	B
MA8	243000	B
MC4	137651	B

Alpha 0.05
Critical Q Value 4.386
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Variable: Biomasa

One-Way AOV for: MA8 MB8 MC8 MD8 MA4 MB4 MC4 MD4

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	7	3106.79	443.827	37.2	0.0000
Within	104	1239.39	11.917		
Total	111	4346.18			

Grand Mean 17.264 CV 20.00

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	8.42	7	0.2966
Cochran's Q	0.1721		
Largest Var / Smallest Var	2.9957		

Component of variance for between groups 30.8788
Effective cell size 14.0

Variable	N	Mean	SE
MA8	14	21.865	0.9226
MB8	15	19.429	0.8913
MC8	13	8.283	0.9574
MD8	12	17.745	0.9965
MA4	15	23.331	0.8913
MB4	15	20.874	0.8913
MC4	15	9.399	0.8913
MD4	13	16.252	0.9574

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
MA4	23.331	A
MA8	21.865	AB
MB4	20.874	AB
MB8	19.429	BC
MD8	17.745	BC
MD4	16.252	C
MC4	9.3993	D
MC8	8.2831	D

Alpha 0.05
Critical Q Value 4.374
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Variables: ME

Statistix 8.0 21/10/202

One-Way AOV for: T0 T2 T4 T6 T8

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	6.9022	1.72554	30.8	0.0000
Within	60	3.3626	0.05604		
Total	64	10.2648			

Grand Mean 4.2049 CV 5.63

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	9.60	4	0.0478
Cochran's Q	0.3251		
Largest Var / Smallest Var	6.3720		

Component of variance for between groups 0.13422
Effective cell size 12.4

Variable	N	Mean	SE
T0	3	4.0777	0.1367
T2	17	3.7247	0.0574
T4	15	4.1707	0.0611
T6	18	4.5703	0.0558
T8	12	4.4117	0.0683

Viabilidad de ME

One-Way AOV for: A B C D

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	2.414E+10	8.046E+09	20.9	0.0004
Within	8	3.087E+09	3.859E+08		
Total	11	2.722E+10			

Grand Mean 107576 CV 18.26

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.55	3	0.9088
Cochran's Q	0.4296		
Largest Var / Smallest Var	2.9799		

Component of variance for between groups 2.553E+09
Effective cell size 3.0

Variable	Mean
A	105167
B	37896
C	126500
D	160739

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 11341
Std Error (Diff of 2 Means) 16039

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
D	160739	A
C	126500	AB
A	105167	B
B	37896	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 16039
Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 51343
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Biomasa del medio de cultivo D

One-Way AOV for: T12 T16 T2 T20 T4 T6 T8

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	351.167	58.5279	9.29	0.0003
Within	14	88.230	6.3022		
Total	20	439.398			

Grand Mean 13.343 CV 18.81

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	9.31	6	0.1568
Cochran's Q	0.3768		
Largest Var / Smallest Var	172.40		

Component of variance for between groups 17.4086
Effective cell size 3.0

Variable	Mean
T12	13.171
T16	6.436
T2	17.404
T20	8.221
T4	17.386
T6	16.415
T8	14.406

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 1.4494
Std Error (Diff of 2 Means) 2.0497

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
T2	17.404	A
T4	17.346	A
T6	16.415	A
T8	14.406	AB
T12	13.171	ABC
T20	8.2215	BC
T16	6.4360	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.0497
Critical Q Value 4.832 Critical Value for Comparison 7.0029
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Capítulo 3.**Tolerancia a radiación ultravioleta**

- **Producción conidios**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004 V005						Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test			
Source	DF	SS	MS	F	P	Variable	Mean	Homogeneous Groups	
Between	4	1.984E+11	4.961E+10	24.9	0.0000	V001	290240	A	
Within	25	4.976E+10	1.990E+09			V002	222848	A	
Total	29	2.482E+11				V003	124638	B	
						V004	109807	B	
						V005	68121	B	
Grand Mean 163131 CV 27.35						Alpha	0.05	Standard Error for Comparison 25757	
Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 14.0 DF 4 P 0.0073						Critical Q Value	4.154	Critical Value for Comparison 75648	
Cochran's Q 0.7170						There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.			
Largest Var / Smallest Var 13.307									
Component of variance for between groups 7.937E+09									
Effective cell size 6.0									
Variable	Mean								
V001	290240								
V002	222848								
V003	124638								
V004	109807								
V005	68121								
Observations per Mean	6								
Standard Error of a Mean	18213								
Std Error (Diff of 2 Means)	25757								

- **Germinación miceliogénica**

Statistix 8.0	8/10/2021, 12:39:26 p. m.
Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test	
Variable	Mean Homogeneous Groups
V001	25.000 A
V002	23.917 A
V004	11.583 AB
V003	11.000 AB
V005	6.0000 B
Alpha	0.05
Critical Z Value	2.807 Critical Value for Comparison 14.267
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.	

Tolerancia a temperatura

- **30°C**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004 V005 V006 V007 V008

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	7	983.88	140.555	20.0	0.0000
Within	40	280.45	7.011		
Total	47	1264.33			

Grand Mean 96.527 CV 2.74

At least one group variance is near zero,
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 22.2572
Effective cell size 6.0

Variable	Mean
V001	100.00
V002	100.00
V003	100.00
V004	100.00
V005	100.00
V006	89.93
V007	92.19
V008	90.10

Observations per Mean 6
Standard Error of a Mean 1.0810
Std Error (Diff of 2 Means) 1.5287

Statistix 8.0 Temperatura 30°C CON..., 9/05/2022, .

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V001	100.00	A
V002	100.00	A
V003	100.00	A
V004	100.00	A
V005	100.00	A
V007	92.188	B
V008	90.097	B
V006	89.932	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.5287
Critical Q Value 4.520 Critical Value for Comparison 4.8863
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

- **40°C**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004 V005 V006

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	549.30	109.859	2.10	0.0934
Within	30	1571.84	52.395		
Total	35	2121.13			

Grand Mean 89.724 CV 8.07

Bartlett's Test of Equal Variances 13.7 5 0.0174
Cochran's Q 0.4805
Largest Var / Smallest Var 34.330

Component of variance for between groups 9.57748
Effective cell size 6.0

Variable	Mean
V001	97.000
V002	88.667
V003	91.667
V004	87.670
V005	88.997
V006	84.342

Observations per Mean 6
Standard Error of a Mean 2.9551
Std Error (Diff of 2 Means) 4.1791

- **50°C**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004 V005 V006						
Source	DF	SS	MS	F	P	
Between	5	4524.36	904.872	14.0	0.0000	
Within	30	1942.27	64.742			
Total	35	6466.63				
Grand Mean		76.380	CV	10.53		
				Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances				10.0	5	0.0749
Cochran's Q				0.3887		
Largest Var / Smallest Var				13.980		
Component of variance for between groups				140.022		
Effective cell size				6.0		
Variable	Mean					
V001	90.667					
V002	85.000					
V003	83.000					
V004	74.833					
V005	66.748					
V006	58.032					
Observations per Mean		6				
Standard Error of a Mean		3.2849				
Std Error (Diff of 2 Means)		4.6455				

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V001	90.667	A
V002	85.000	AB
V003	83.000	AB
V004	74.833	BC
V005	66.748	CD
V006	58.032	D

Alpha	Standard Error for Comparison	Critical Q Value	Critical Value for Comparison
0.05	4.6455	4.301	14.130

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

- **Producción de conidios**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004 V005 V006 V007 V008 V009 V010						
Source	DF	SS	MS	F	P	
Between	9	1.432E+11	1.591E+10	12.7	0.0000	
Within	50	6.290E+10	1.258E+09			
Total	59	2.061E+11				
Grand Mean		184971	CV	19.17		
				Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances				5.52	9	0.7865
Cochran's Q				0.2213		
Largest Var / Smallest Var				5.9802		
Component of variance for between groups				2.443E+09		
Effective cell size				6.0		
Variable	Mean					
V001	200640					
V002	176320					
V003	283200					
V004	178133					
V005	217872					
V006	174319					
V007	202302					
V008	194963					
V009	136569					
V010	85388					
Observations per Mean		6				
Standard Error of a Mean		14479				
Std Error (Diff of 2 Means)		20477				

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V003	283200	A
V005	217872	AB
V007	202302	BC
V001	200640	BC
V008	194963	BC
V004	178133	BC
V002	176320	BC
V006	174319	BC
V009	136569	CD
V010	85388	D

Alpha	Standard Error for Comparison	Critical Q Value	Critical Value for Comparison
0.05	20477	4.681	67775

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Estabilidad de almacenamiento

- **Producción de conidios 8°C**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004						
Source	DF	SS	MS	F	P	
Between	3	6.943E+11	2.314E+11	52.1	0.0000	
Within	8	3.553E+10	4.441E+09			
Total	11	7.298E+11				
Grand Mean		385668	CV	17.28		
				Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances				10.4	3	0.0152
Cochran's Q				0.9367		
Largest Var / Smallest Var				62.409		
Component of variance for between groups				7.566E+10		
Effective cell size				3.0		
Variable	Mean					
V001	217600					
V002	246957					
V003	277447					
V004	800667					
Observations per Mean		3				
Standard Error of a Mean		38477				
Std Error (Diff of 2 Means)		54414				

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V004	800667	A
V003	277447	B
V002	246957	B
V001	217600	B

Alpha	Standard Error for Comparison	Critical Q Value	Critical Value for Comparison
0.05	54414	4.527	174192

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

- Producción de conidios 18°C

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	2.474E+10	8.247E+09	27.5	0.0001
Within	8	2.402E+09	3.003E+08		
Total	11	2.714E+10			

Grand Mean 156781 CV 11.05

Statistic	Value	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.91	3	0.4051
Cochran's Q	0.5345		
Largest Var / Smallest Var	20.529		

Component of variance for between groups 2.649E+09
Effective cell size 3.0

Variable	Mean
V001	217600
V002	168688
V003	150095
V004	90741

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 10005
Std Error (Diff of 2 Means) 14149

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V001	217600	A
V002	168688	B
V003	150095	B
V004	90741	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 14149
Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 45293
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.**- Producción de conidios 28°C**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	5.591E+10	1.864E+10	24.0	0.0002
Within	8	6.204E+09	7.755E+08		
Total	11	6.212E+10			

Grand Mean 100287 CV 27.77

Statistic	Value	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.04	3	0.1096
Cochran's Q	0.7852		
Largest Var / Smallest Var	60.461		

Component of variance for between groups 5.954E+09
Effective cell size 3.0

Variable	Mean
V001	217600
V002	51131
V003	74444
V004	57971

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 16078
Std Error (Diff of 2 Means) 22738

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V001	217600	A
V003	74444	B
V004	57971	B
V002	51131	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 22738
Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 72788
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.**- Germinación miceliológica 8°C**

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
V001	10.0	3
V002	4.0	3
V003	6.8	3
V004	5.2	3
Total	6.5	12

Kruskal-Wallis Statistic 5.1756
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.1594

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	61.167	20.3889	2.37	0.1465
Within	8	68.833	8.6042		
Total	11	130.000			

Total number of values that were tied 12
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 12 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean Rank	Homogeneous Groups
V001	10.000	A
V003	6.8333	A
V004	5.1667	A
V002	4.0000	A

Alpha 0.05
Critical Z Value 2.638 Critical Value for Comparison 7.7668
There are no significant pairwise differences among the means.

- **Germinación miceliogénica 18°C**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	9059.67	3019.89	102	0.0000
Within	8	237.33	29.67		
Total	11	9297.00			

Grand Mean 67.500 CV 8.07

At least one group variance is near zero, variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 996.741
Effective cell size 3.0

Variable	Mean
V001	100.00
V002	75.33
V003	70.67
V004	24.00

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 3.1447
Std Error (Diff of 2 Means) 4.4472

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V001	100.00	A
V002	75.333	B
V003	70.667	B
V004	24.000	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.4472
Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 14.236
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

- **Germinación miceliogénica 28°C**

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	14560.0	4853.33	217	0.0000
Within	8	178.7	22.33		
Total	11	14738.7			

Grand Mean 41.333 CV 11.43

At least one group variance is near zero, variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 1610.33
Effective cell size 3.0

Variable	Mean
V001	100.00
V002	32.00
V003	24.00
V004	9.33

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 2.7285
Std Error (Diff of 2 Means) 3.8586

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V001	100.00	A
V002	32.000	B
V003	24.000	B
V004	9.3333	C

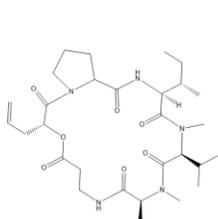
Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.8586
Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 12.352
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

B. Anexo: Análisis de espectrometría de masas y construcción de redes moleculares

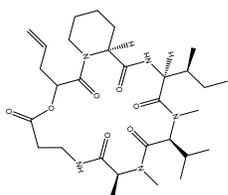
- Acceso electrónico a datos brutos de espectrometría de masas/masas obtenido a partir de los tratamientos evaluados

<https://drive.google.com/drive/folders/1jT2kvAVc2cKi4oMJxGc2Y91XZlRhCUEq?usp=sharing>

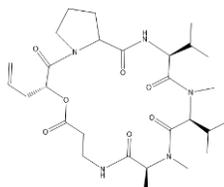
- Estructuras de las destruxinas identificadas putativamente por el programa SIRIUS: CSI Finger y la plataforma GNPS producidas por el hongo *M. robertsii* en el medio de cultivo D



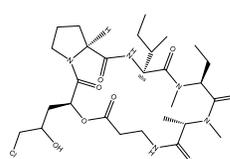
Destruxina A



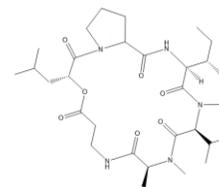
Destruxina A1



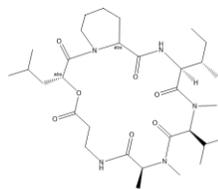
Destruxina A2



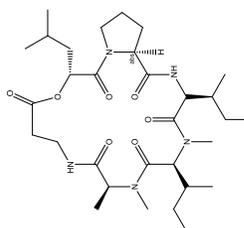
Clorodestruxina



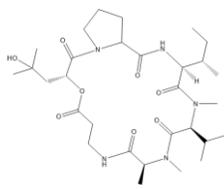
Destruxina B



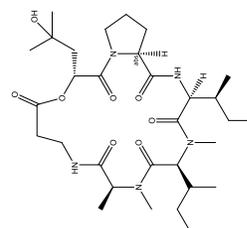
Destruxina B1



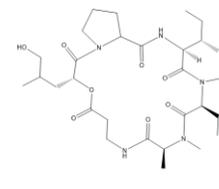
Destruxina B4



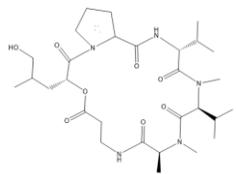
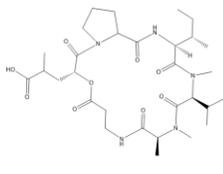
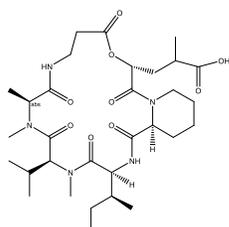
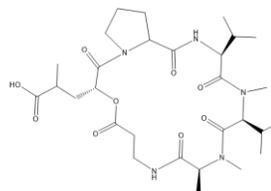
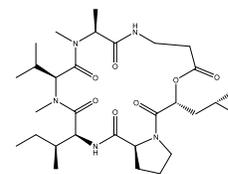
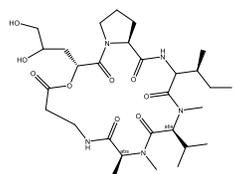
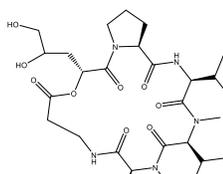
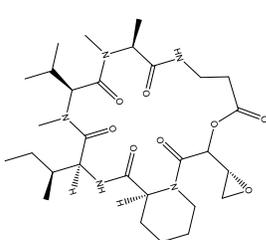
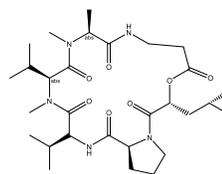
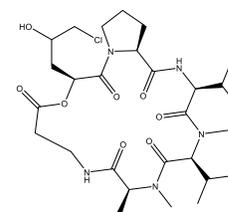
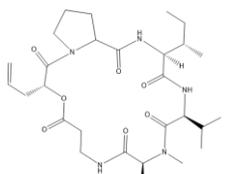
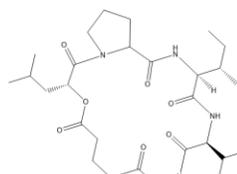
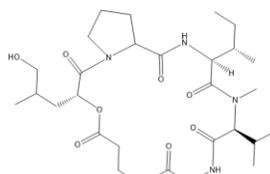
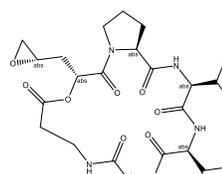
Hidroxidestruxina B



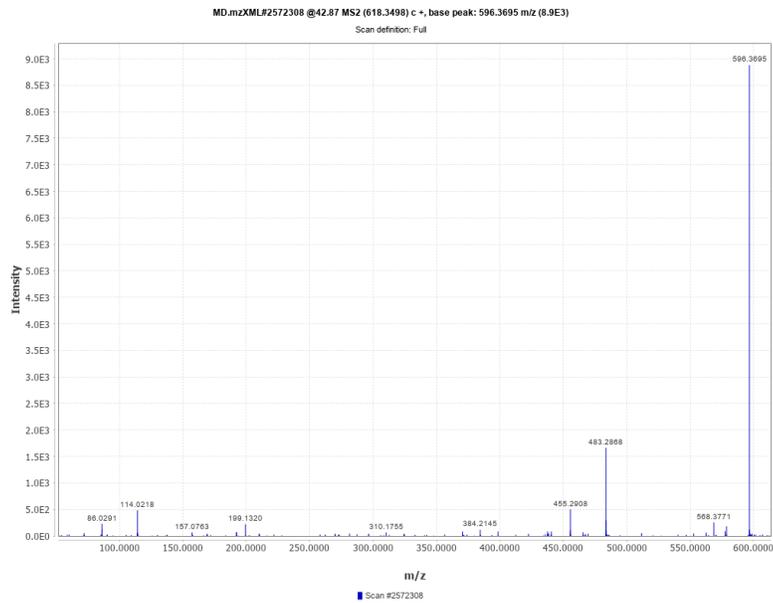
Hidroxihomodestruxina B



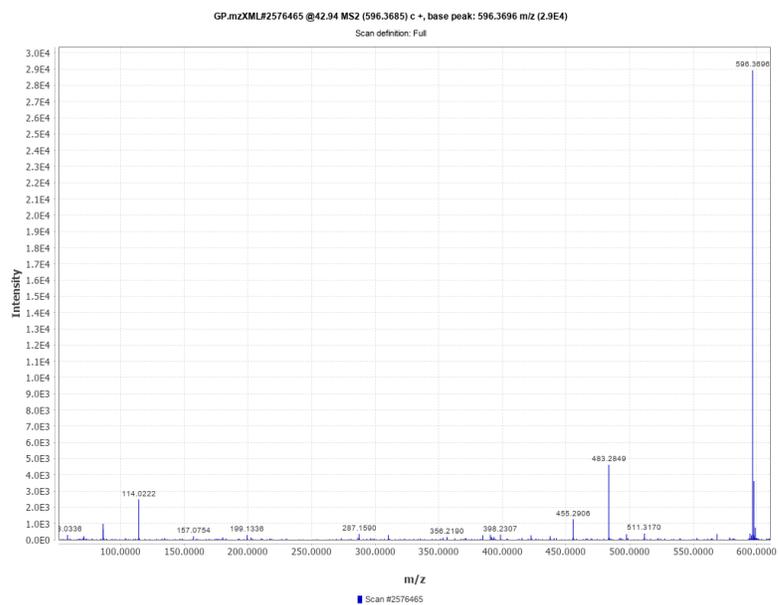
Destruxina C

**Destruxina C₂****Destruxina D****Destruxina D₁****Destruxina D₂****Destruxina E****Destruxina E_d****Destruxina E_{d2}****Destruxina E₁****Destruxina E₂****Destruxina E₂
Clorhidrina****Desmetildestruxina
A****Desmetildestruxina B****Desmetildestruxina C****Desmetildestruxina E**

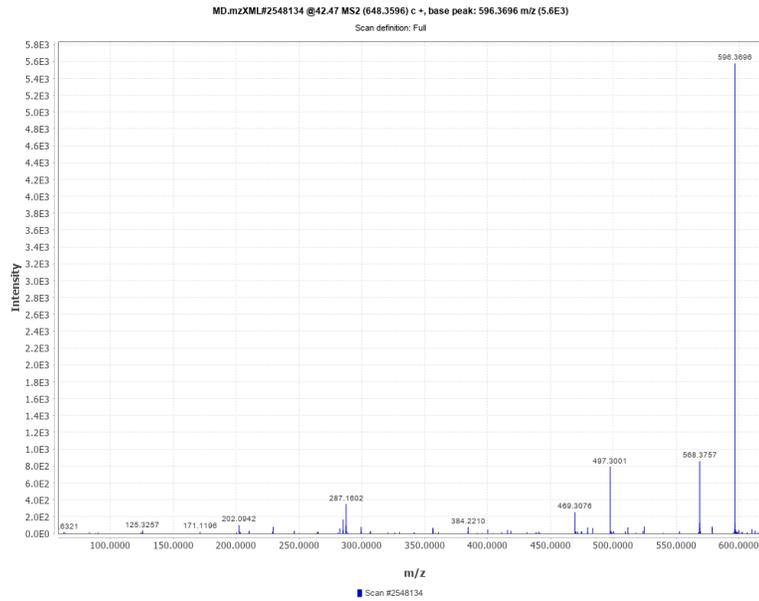
- **Espectro Full MS/MS de la destruxina C₂ (*m/z* 596.3695)**



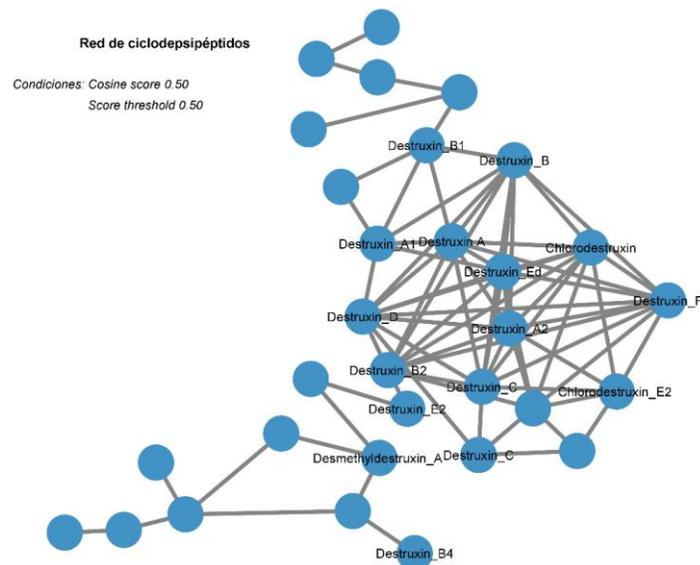
- **Espectro Full MS/MS de la destruxina F (*m/z* 596.3696)**



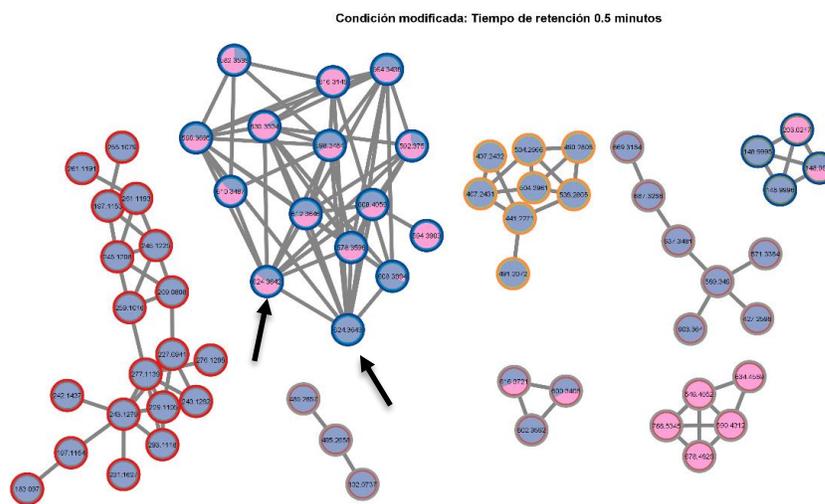
- **Espectro Full MS/MS de la Desmetildestroxina C (m/z 596.3696)**



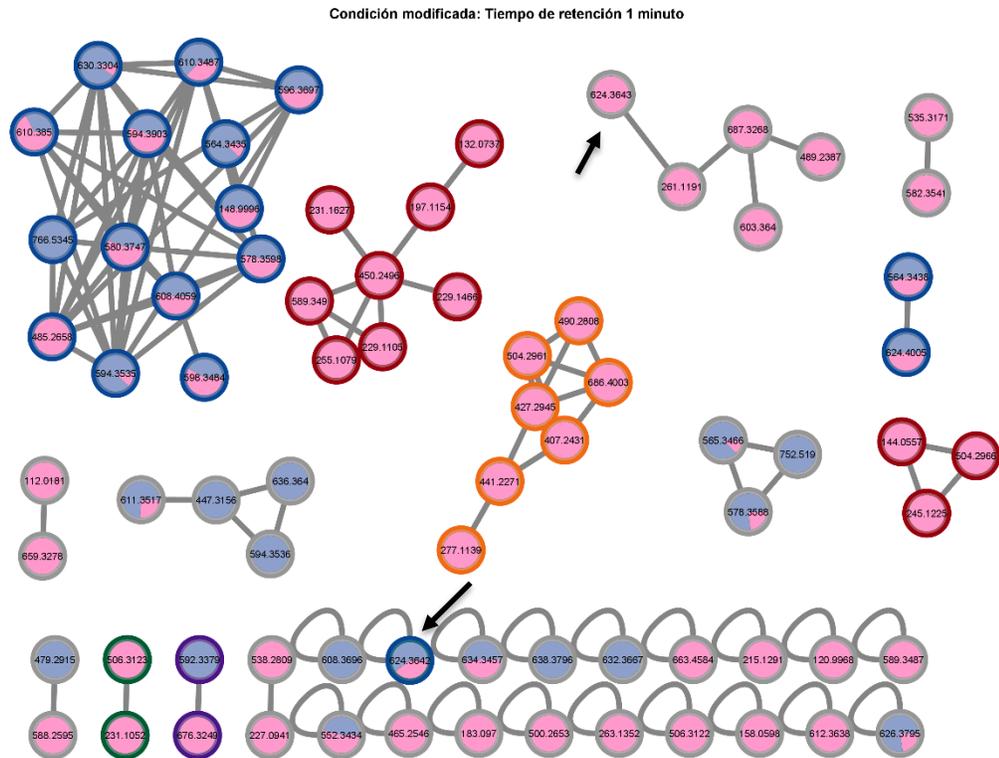
- **Visualización de la red de los ciclodepsipéptidos de la fracción orgánica del cultivo de *M. robertsii* Mt004 inoculado en el medio D modificada bajo las siguientes condiciones: *Cosine score*: 0.5 y *Score Threshold*: 0.5. Link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=96868f50bc084d47b3fcf477d22bcc30>**



- Visualización de redes moleculares para *M. robertsii* Mt008 (fracción control) (Disco morado) y la fracción orgánica del cultivo de *M. robertsii* Mt004 inoculado en el medio D (Disco rosado) modificando la tolerancia del tiempo de retención a 0.5 minutos. Link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=e830f72233524403b69ea20838994afd>



- Visualización de redes moleculares para *M. robertsii* Mt008 (fracción control) (Disco morado) y la fracción orgánica del cultivo de *M. robertsii* Mt004 inoculado en el medio D (Disco rosado) modificando la tolerancia del tiempo de retención a 1 minuto. Link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=638d04ff514f440298da9b7e8fe67ab2>



C. Anexo: Producción académica



Modalidad: Presentación oral

30 julio 2022- 4 agosto 2022

Insecticidal metabolites produced by *M. robertsii* during microsclerotia formation

Lorena Garcia Riaño¹, Gloria Patricia Barrera¹, Leonardo Castellanos Hernandez², Laura Fernanda Villamizar³

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá, 250047, Mosquera, Cundinamarca, Colombia

² Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Carrera 30 # 45, Bogotá, D.C., 111321, Colombia.

³ Microbial Solutions, AgResearch Ltd. Lincoln Research Centre. Christchurch 8140, New Zealand

Corresponding author: jgarcia@agrosavia.co

Microsclerotia (MS) are considered the most promising fungal propagules to be included as active ingredient in mycoinsecticide due to their potential to produce infective conidia under suitable growth conditions and tolerate biotic and abiotic stress. However, the role of metabolites produced during MS formation has not been studied. In this work, we evaluated the insecticidal activity of extracts from the culture broth where microsclerotia of *M. robertsii* Mt004 were produced. The MS production was carried out in a culture medium with C:N ratio of 55:1. The yield reached 2.04×10^3 MS/mL after 20 days of fermentation and MS-derived conidia caused 77.9% mortality of *Diatraea saccharalis* larvae. The fungus-free supernatant was extracted with organic solvents (EtOAc:DCM 1:1) and different fractions were evaluated in a bioassay against *D. saccharalis* larvae. Then, the fungus-free supernatant and its fractions with activity were analysed by HPLC-MS/MS. Both the cell-free supernatant and the organic fraction caused larvae mortality (48%). The data obtained from the mass spectrometry analysis of the organic fraction were used to build molecular networks using the GNPS platform. Majority of compounds in the organic fraction were from the cyclodepsipeptide family, suggesting the presence of 24 destruxins, including destruxin A, A₂ and B, all recognized for their insecticidal activity. Therefore, the MS and the metabolites released during their formation caused insect mortality, suggesting that both resources can be exploited to develop new microbial products for pest control.



**New Zealand
Plant Protection Society**

Protecting Plants with Science

Modalidad: Póster

9 agosto 2022 - 11 agosto 2022

**Microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium robertsii*:
Formation, virulence and tolerance to abiotic factors**

Lorena Garcia Riaño¹, Gloria Patricia Barrera¹, Leonardo Castellanos Hernandez², Laura Fernanda Villamizar³

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá, 250047, Mosquera, Cundinamarca, Colombia

² Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Carrera 30 # 45, Bogotá, D.C., 111321, Colombia.

³ Microbial Solutions, AgResearch Ltd. Lincoln Research Centre. Christchurch 8140, New Zealand

Corresponding author: laura.villamizar@agresearch.co.nz

Metarhizium is a genus of entomopathogenic fungi, which conidia are commonly used as the active ingredient for biopesticides. Conidia performance in the field is drastically affected by abiotic factors, which added to its laborious production using solid fermentation (SSF) have motivated the search for novel fungal propagules. Several *Metarhizium* species have been forced to produce resistant structures named microsclerotia (MS) using liquid fermentation. MS are compact and pigmented aggregates of mycelium, highly tolerant to desiccation, and able to produce infective conidia. In this study, we investigated the differentiation process of MS by *Metarhizium robertsii* strain Mt004, the tolerance of MS to ultraviolet radiation (UV-A) and heat, and the insecticidal activity of MS-derived conidia. *M. robertsii* started to form hyphal aggregates after 2 days, structures looked more compact after 8 days, and MS were mature and pigmented at 20 days. The yield was $2,04 \times 10^3$ MS/mL and MS size varied between 352 y 1752 μm . Conidia produced by SSF completely died after 1 hour of UV-A irradiation, while 84.7% of MS remained viable after 4 hours. MS were 2.47 times more tolerant to heat than conidia when exposed for 3 hours at 50°C. MS-derived conidia were as virulent as conidia produced on rice. Ultrastructure analysis revealed that mature MS contained few alive cells embedded in an extracellular matrix, but MS were more tolerant to heat, and UV-A than conidia, allowing to conclude that MS could be an excellent candidate to develop biopesticides for climates where heat and UV radiation are detrimental to fungi survival and persistence.



Modalidad Poster

Production, tolerance to abiotic factors and insecticidal potential of microsclerotia produced by *Metarhizium robertsii*

Lorena Garcia Riaño¹, Gloria Patricia Barrera¹, Leonardo Castellanos Hernandez², Laura Fernanda Villamizar³

¹ **Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia**. Centro de Investigación Tibaitatá, 250047, Mosquera, Cundinamarca, Colombia. ² Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Carrera 30 # 45, Bogotá, D.C., 111321, Colombia. ³ Microbial Solutions, AgResearch Ltd. Lincoln Research Centre. Christchurch 8140, New Zealand

Corresponding author: jgarciar@agrosavia.co

Microsclerotia (MS) is considered the most interesting fungal propagules due to their high resistance to stress conditions and capacity to germinate under adequate conditions, producing infective conidia. In this work, we studied four culture media (A, B, C and D) for MS production in liquid fermentation and assessed the MS tolerance to heat and ultraviolet radiation (UV-B) and the insecticide activity of MS-derived conidia against *Diatraea saccharalis* larvae in comparison with conidia produced by solid fermentation (SSF) on rice. After to 8 days of fermentation, propagules similar to microsclerotia were formed in all culture media. The media A and D reached the highest yields with $1,64 \times 10^3$ y $1,43 \times 10^3$ MS/mL and 21,88 and 17,74 g of biomass per litre, respectively. Due to low pigmentation on MS, the fermentation time was extended to 20 days to allow MS maturation using the selected medium “D” (C:N 55:1). Final yield was $2,04 \times 10^3$ MS/mL and conidiogenic germination resulted in $6,02 \times 10^5$ conidia/MS. The glucose consumption was 98%, final pH was 5.14 and final protein content in the broth was 181,11 $\mu\text{g/mL}$. Similar to conidia produced by SSF, MS-derived conidia caused 77,9% mortality of *D. saccharalis* larvae. However, MS were more tolerant to heat and UV-B radiation than conidia produced on rice, suggesting that MS from *M. robertsii* could be used to develop new and efficient biopesticides with better persistence in the field.

Bibliografía

Abo Ellil AHA (1999) Sclerotial development, melanin production and lipid peroxidation by *Sclerotium rolfsii*. *Folia Microbiologica* 44(2):181-186

Aldridge DC, Turner WB (1969) Structures of cytochalasins C and D. *Journal of the Chemical Society C: Organic* (6):923-928. <https://doi.org/10.1039/j39690000923>

Al-Hamdani AM, Cooke RC (1987) Effects of water potential on accumulation and exudation of carbohydrates and glycerol during sclerotium formation and myceliogenic germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Transactions of the British Mycological Society* 89(1):51-60. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(87\)80057-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(87)80057-8)

Afoullouss S, Balsam A, Allcock AL, Thomas OP (2022) Optimization of LC-MS 2 Data Acquisition Parameters for Molecular Networking Applied to Marine Natural Products. *Metabolites* 12 (3): 245. <https://doi.org/10.3390/metabo12030245>

Amsellem Z, Zidack NK, Quimby PC, Gressel J (1999) Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms. *Crop Protection* 18(10):643-649. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00070-8)

Ansari MA, Butt TM (2013) Influence of the application methods and doses on the susceptibility of black vine weevil larvae *Otiorhynchus sulcatus* to *Metarhizium anisopliae* in field-grown strawberries. *BioControl* 58(2):257-267. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9491-x>

Argüelles J-C, Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R (2017) Trehalose: A Crucial Molecule in the Physiology of Fungi. *Reference Module in Life Sciences* :1-9. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.12084-9>

Arroyo-Manzanares N, Diana Di Mavungu J, Garrido-Jurado I, Arce L, Vanhaecke L, Quesada-Moraga E, De Saeger S (2017) Analytical strategy for determination of known

and unknown destruxins using hybrid quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409(13):3347-3357. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0276-z>

Baard SW, Van Wyk PWJ, Pauer GDC (1981) Structure and lysis of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 77(2):251-260. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(81\)80027-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(81)80027-7)

Behle RW, Jackson MA (2014) Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *Journal of Economic Entomology* 107(2):582-590. <https://doi.org/10.1603/EC13426>

Behle RW, Jackson MA, Flor-Weiler LB (2013) Efficacy of a Granular Formulation Containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) Microsclerotia Against Nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology* 106(1):57-63. <https://doi.org/10.1603/ec12226>

Belozerskaya TA, Gessler NN, Aver'yanov AA (2017) Melanin Pigments of Fungi. *Fungal Metabolites* (July):263-291. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_29

Bennett JW, Horowitz PC, Lee LS (1979) Production of Sclerotia by Aflatoxigenic and Nonaflatoxigenic Strains of *Aspergillus Flavus* and *A. Parasiticus*. *Mycologia* 71(2):415-422. <https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021019>

Bernardo CC, Barreto LP, e Silva C de SR, Luz C, Arruda W, Fernandes ÉKK (2018) Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* sl: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 9(5):1334-1342. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.001>

Beys-da-Silva WO, Rosa RL, Berger M, Coutinho-Rodrigues CJB, Vainstein MH, Schrank A, Bittencourt VREP, Santi L (2020) Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 208(October 2019):107812. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>

Braga GUL, Rangel DEN, Fernandes ÉKK, Flint SD, Roberts DW (2015) Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics* 61(3):405-425. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0483-0>

Braga GUL, Rangel DEN, Flint SD, Anderson AJ, Roberts DW (2006) Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology* 82(2):418. <https://doi.org/10.1562/2005-05-08-ra-52>

Bullock S, Ashford AE, Willetts HJ (1980) The structure and histochemistry of sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger - II. Histochemistry of extracellular substances and cytoplasmic reserves. *Protoplasma* 104(3-4):333-351. <https://doi.org/10.1007/BF01279777>

Butler MJ, Day AW (1998) Fungal melanins: A review. *Canadian Journal of Microbiology* 44(12):1115-1136. <https://doi.org/10.1139/w98-119>

Calvo AM, Cary JW (2015) Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Frontiers in Microbiology* 6(FEB):1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00062>

Calvo AM, Wilson RA, Bok J, Keller NP (2002) Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3):447-459. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447>

Carollo CA, Calil ALA, Schiave LA, Guaratini T, Roberts DW, Lopes NP, Braga GUL (2010) Fungal tyrosine betaine, a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp. fungi. *Fungal Biology* 114(5-6):473-480. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.03.009>

Cheng XH, Guo SX, Wang CL (2006) Factors influencing formation of Sclerotia in *Grifola umbellata* (Pers.) Pilát under artificial conditions. *Journal of Integrative Plant Biology* 48(11):1312-1317. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00349.x>

Clifton EH, Gardescu S, Behle RW, Hajek AE (2019) Asian longhorned beetle bioassays to evaluate formulation and dose-response effects of *Metarhizium* microsclerotia. *Journal of Invertebrate Pathology* 163:64-66. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.03.005>

Choi K-D, Kwon J-K, Shim JO, Lee S-S, Lee T-S, Lee MW (2002) Sclerotial Development of *Grifola umbellata*. *Mycobiology* 30(2):65. <https://doi.org/10.4489/myco.2002.30.2.065>

Colotelo N, Sumner JL, Voegelin WS (1971) Chemical studies on the exudate and developing sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DeBary. *Canadian journal of microbiology* 17(9):1189-1194. <https://doi.org/10.1139/m71-190>

Cordero RJB, Casadevall A (2017) Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews* 31(2):99-112. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.003>

Corval ARC, Mesquita E, Corrêa TA, Silva C de SR, Bitencourt R de OB, Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP, Roberts DW, Gôlo PS (2021) UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology* 61(1):15-26. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000515>

Cotes A. M. (Ed.). (2018). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros (Vol. 1 y Vol 2). Primera, ed. Agrosavia editorial, Mosquera, Cundinamarca, Colombia, pp. 928-930.

Donzelli BGG, Krasnoff SB (2016) *Molecular Genetics of Secondary Chemistry in Metarhizium Fungi*. Elsevier Ltd

Donzelli BGG, Krasnoff SB, Sun-Moon Y, Churchill ACL, Gibson DM (2012) Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. *Current Genetics* 58(2):105-116. <https://doi.org/10.1007/s00294-012-0368-4>

Dudley E, Wang C, Skrobek A, Newton RP, Butt TM (2004) Mass spectrometric studies on the intrinsic stability of destruxin E from *Metarhizium anisopliae*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18(21):2577-2586. <https://doi.org/10.1002/rcm.1659>

Dührkop K, Fleischauer M, Ludwig M, Aksenov AA, Melnik A V., Meusel M, Dorrestein PC, Rousu J, Böcker S (2019) SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods* 16(4):299-302. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>

Dunlap CA, Jackson MA, Saha BC (2011) Compatible solutes of sclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris* under different culture and drying conditions. *Biocontrol Science and Technology* 21(2):113-123. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.534551>

Erental A, Dickman MB, Yarden O (2008) Sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*: awakening molecular analysis of a «Dormant» structure. *Fungal Biology Reviews* 22(1):6-16. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.10.001>

Fan R, Klosterman SJ, Wang C, Subbarao K V., Xu X, Shang W, Hu X (2017) Vayg1 is required for microsclerotium formation and melanin production in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* 98:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.11.003>

Faria M, Lopes RB, Souza DA, Wraight SP (2015) Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 125:68-72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>

Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Braga GUL, Roberts DW (2015) Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>

Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Moraes ÁML, Bittencourt VREP, Roberts DW (2007) Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology* 96(3):237-243. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.05.007>

Fronza E, Specht A, Heinzen H, de Barros NM (2017) *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* as biological control agent. *Biocontrol Science and Technology* 27(11):1243-1264. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1391175>

Georgiou CD, Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G (2006) Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 46(6):691-712. <https://doi.org/10.1093/icb/icj034>

Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA (2014) Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 50(2):105-113. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020094>

Goble TA, Gardescu S, Fisher JJ, Jackson MA, Hajek AE (2016) Conidial production, persistence and pathogenicity of hydromulch formulations of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia under forest conditions. *Biological Control* 95:83-93. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.003>

Gomez-Miranda B, Leal JA (1979) Chemical composition of *Botrytis cinerea* sclerotia. Transactions of the British Mycological Society 73(1):161-164. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(79\)80089-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(79)80089-3)

Griffin (1981) Fungal physiology. A while-inter-science publication., USA. New York. pp 102-227,260-279.

Griffiths DA (1970) The fine structure of developing microsclerotia of *Verticillium dahliae* Kleb. Archiv für Mikrobiologie 74(3):207-212. <https://doi.org/10.1007/BF00408881>

Hallsworth JE, Magan N (1995) Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. Microbiology 141(5):1109-1115. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-5-1109>

Hallsworth JE, Magan N (1996) Culture Age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Applied and Environmental Microbiology 62(7):2435-2442. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2435-2442.1996>

He P, Wang K, Cai Y, Hu X, Zheng Y, Zhang J, Liu W (2018) Involvement of autophagy and apoptosis and lipid accumulation in sclerotial morphogenesis of *Morchella importuna*. Micron 109(March):34-40. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.03.005>

Hong TD, Jenkins NE, Ellis RH (2000) The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. Mycological Research 104(6):662-665. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001872>

Hu QB, Ren SX, Wu JH, Chang JM, Musa PD (2006) Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. Toxicon 48(5):491-498. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.06.018>

Ignoffo CM, Garcia C (1992) Influence of Conidial Color on Inactivation of Several Entomogenous Fungi (Hyphomycetes) by Simulated Sunlight. Environmental Entomology 21(4):913-917. <https://doi.org/10.1093/ee/21.4.913>

Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Fargues J, Durand A (2005) Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. Process Biochemistry 40(3-4):1425-1431. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.029>

Iwanicki NSA, Ferreira B de O, Mascarin GM, Júnior ÍD (2018) Modified Adamek's medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae. *Fungal Biology* 122(9):883-890. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.05.004>

Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* 55(1):129-145. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y>

Jackson MA, Jaronski ST (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research* 113(8):842-850. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>

Jackson MA, Jaronski ST (2012) Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology* 22(8):915-930. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.696578>

Jackson MA, Payne AR (2016) Liquid Culture Production of Fungal Microsclerotia. En: Glare TR, Moran-Diez (eds) *Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, New York, pp 71-83

Jackson MA, Schisler DA (1992) The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied and Environmental Microbiology* 58(7):2260-2265

Jackson MA, Schisler DA (1995) Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. *Mycological Research* 99(7):879-884. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80745-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80745-4)

Jaronski ST, Jackson MA (2008) Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology* 18(8):849-863. <https://doi.org/10.1080/09583150802381144>

Jennings DH (1985) Polyol Metabolism in Fungi. *Advances in Microbial Physiology* 25(C):149-193. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60292-1)

Kleespies RG, Zimmermann G (1992) Production of Blastospores by Three Strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in Submerged Culture. *Biocontrol Science and Technology* 2(2):127-135. <https://doi.org/10.1080/09583159209355226>

Kobori NN, Mascarin GM, Jackson MA, Schisler DA (2015) Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* 119(4):179-190. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>

Krasnoff SB, Keresztes I, Gillilan RE, Szebenyi DME, Donzelli BGG, Churchill ACL, Gibson DM (2007) Serinocyclins A and B, cyclic heptapeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Natural Products* 70(12):1919-1924. <https://doi.org/10.1021/np070407i>

Lastra B, Gómez L a. (2006) La cría de *Diatraea saccharalis* (F.) para la producción masiva de sus enemigos naturales. *Serie Técnica Ceñicaña* 36(3):30

Le Tourneau D (2016) Mycological Society of America Trehalose and Acyclic Polyols in Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* Mycological Society of America *Stable* 58(6):934-942 <http://www.jstor.org/stable/3757064>.

Li D., Holdom D. (1995) Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 65:235-260

Li J, Feng MG (2009) Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological Research* 113(1):93-99. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.08.006>

Lira AC de, Mascarin GM, Delalibera Júnior Í (2020) Microsclerotia production of *Metarhizium* spp. for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda* through corn seed coating. *Fungal Biology* 124(8):689-699. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.011>

Liu BL, Tzeng YM (2012) Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances* 30(6):1242-1254. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.006>

Liu CM, Huang SS, Tzeng YM (2004) Purification and Quantitative Analysis of Destruxins from *Metarhizium anisopliae* by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 27(6):1013-1025. <https://doi.org/10.1081/JLC-120030175>

Liu Q, Ying SH, Feng MG, Jiang XH (2009) Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 95(1):65-75. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9288-1>

Li Y qian, Song K, Li Y chai, Chen J (2016) Statistical culture-based strategies to enhance chlamyospore production by *Trichoderma harzianum* SH2303 in liquid fermentation. *Journal of Zhejiang University: Science B* 17(8):619-627. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500226>

Lodesani M, Costa C, Franceschetti S, Bergomi P, Galaverna G, Dall'Asta C (2017) Toxicidad de destruxinas contra el ácaro parásito *Varroa destructor* y su hospedador *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 56(3):278-287. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1304611>

Lomer CJ, Bateman R, Godonou I, Kpindou D, Shah P., Paraiso A, Prior C (1993) Field Infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology* 3(3):337-346

Lozano-Tovar MD, Garrido-Jurado I, Lafont F, Quesada-Moraga E (2015) Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 108(2):462-472. <https://doi.org/10.1093/jee/tov041>

Mascarin GM, Jaronski ST (2016) The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(11):1-26. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>

Mascarin GM, Kobori NN, de Jesus Vital RC, Jackson MA, Quintela ED (2014) Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(5):1583-1590. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1581-0>

Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Í, Fernandes ÉKK, Luz C, Faria M (2018) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* (August 2017):0-1. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>

Mejía C, Espinel C, Forero M, Ramos FA, Pedro FB, Villamizar L, Mejía C, Espinel C, Forero M, Ramos FA, Pedro FB, Mejía C, Brandão FB, Ramos FA (2020) Improving ecological fitness of *Beauveria bassiana* conidia to control the sugar cane borer *Diatraea saccharalis*. *Biocontrol Science and Technology* 0(0):1-18. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1738343>

Ment D, Gindin G, Glazer I, Perl S, Elad D, Samish M (2010) The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biology* 114(1):49-56. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.005>

Merck (2000) Merck Microbiology Manual. Disponible en: http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/MERCK_Manual_de_microbiologia_12a_edicion.pdf.

Mohimani H, Gurevich A, Shlemov A, Mikheenko A, Korobeynikov A, Cao L, Shcherbin E, Nothias LF, Dorrestein PC, Pevzner PA (2018) Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nature Communications* 9(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>

Moore D, Douro-Kpindou OK, Jenkins NE, Lomer CJ (1996) Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* Conidia. *Biocontrol Science and Technology* 6(1):51-62. <https://doi.org/10.1080/09583159650039520>

Mukherjee K, Vilcinskis A (2018) The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection. *Virulence* 9(1):402-413. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1405190>

Nicolaus RA, Piattelli M, Fattorusso E (1964) The structure of melanins and melanogenesis-IV. On some natural melanins. *Tetrahedron* 20(5):1163-1172. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)98983-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)98983-5)

Nothias LF, Petras D, Schmid R, et al. (2020) Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods* 17(9):905-908. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>

Oide S, Turgeon BG (2020) Natural roles of nonribosomal peptide metabolites in fungi. *Mycoscience* 61(3):101-110. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2020.03.001>

Pal AK, Gajjar DU, Vasavada AR (2014) DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical Mycology* 52(1):10-18. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.826879>

Paixão FRS, Huarte-Bonnet C, Ribeiro-Silva C de S, Mascarin GM, Fernandes ÉKK, Pedrini N (2021) Tolerance to Abiotic Factors of Microsclerotia and Mycelial Pellets From *Metarhizium robertsii*, and Molecular and Ultrastructural Changes During Microsclerotial Differentiation. *Frontiers in Fungal Biology* 2(April):1-12. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.654737>.

Patel TK (2020) Chapter 29: *Metarhizium*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. 593-610. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00029-0>.

Payne GA, Brown MP (1998) Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Review of Phytopathology* 36(October):329-362. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.329>

Pedras MSC, Irina Zaharia LI, Ward DE (2002) The destruxins: Synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* 59:579-596

Peng G, Wang Z, Yin Y, Zeng D, Xia Y (2008) Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop Protection* 27(9):1244-1250. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.03.007>

Pilz C, Enkerli J, Wegensteiner R, Keller S (2011) Establishment and persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in maize fields. *Journal of Applied Entomology* 135(6):393-403. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01566.x>

Puttikamonkul S, Willger SD, Grahl N, Perfect JR, Movahed N, Bothner B, Park S, Paderu P, Perlin DS, Cramer RA (2010) Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology* 77(4):891-911. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07254.x>

Raman T, Muthukathan G (2015) Field suppression of *Fusarium* wilt disease in banana by the combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates possessing multiple functions. *Phytopathologia Mediterranea* 54(2):241-252. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>

Rangel D, Butler M, Torabinejad J, Anderson A, Braga G, Day A, Roberts D (2006) Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 170–182.

Ravindran K, Akutse KS, Sivaramakrishnan S, Wang L (2016) Determination and characterization of destruxin production in *Metarhizium anisopliae* Tk6 and formulations for *Aedes aegypti* mosquitoes control at the field level. *Toxicon* 120:89-96. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.016>

Ríos-Moreno A, Carpio A, Garrido-Jurado I, Arroyo-Manzanares N, Lozano-Tovar MD, Arce L, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Quesada-Moraga E (2016) Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS. *Biocontrol Science and Technology* 26(9):1298-1311. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1195336>

Rivas-Franco F, Hampton JG, Altier NA, Swaminathan J, Rostás M, Wessman P, Saville DJ, Jackson TA, Jackson MA, Glare TR (2020) Production of Microsclerotia From Entomopathogenic Fungi and Use in Maize Seed Coating as Delivery for Biocontrol Against *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4(December):1-13. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.606828>

Roberts DW. (1981) Toxins of Entomopathogenic Fungi. In *Microbial Control of Pests* (Ed. Burges H. D.), pp. 441-464. Academic, London

Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56 (7):1267-1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>

Schümann J, Hertweck C (2007) Molecular basis of cytochalasan biosynthesis in fungi: Gene cluster analysis and evidence for the involvement of a PKS-NRPS hybrid synthase by RNA silencing. *Journal of the American Chemical Society* 129(31):9564-9565. <https://doi.org/10.1021/ja072884t>

Selvakumar P, Rajasekar S, Periasamy K, Raaman N (2008) Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (Telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(10):2125-2131. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9718-2>

Shearer JF, Jackson MA (2006) Liquid culturing of microsclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla. *Biological Control* 38(3):298-306. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.04.012>

Smith ME, Henkel TW, Rollins JA (2015) How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecology* 13(December 2018):211-220. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.010>

Sobolev VS, Cole RJ, Dorner JW, Horn BW, Harrigan GG, Gloer JB (1997) Isolation and structure elucidation of a new metabolite produced by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Natural Products* 60(8):847-850. <https://doi.org/10.1021/np970131m>

Solomon PS, Waters ODC, Oliver RP (2007) Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in Microbiology* 15(6):257-262. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.002>

Song Z (2018) Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors, and molecular mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(23):9873-9880. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9400-z>

Song Z, Lin Y, Du F, Yin Y, Wang Z (2017) Statistical optimisation of process variables and large-scale production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycetes: Hypocreales) microsclerotia in

submerged fermentation. Mycology 8(1):39-47.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1279688>

Song Z, Shen L, Zhong Q, Yin Y, Wang Z (2016) Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. Nematology 18(6):719-726.
<https://doi.org/10.1163/15685411-00002987>

Song Z, Yin Y, Jiang S, Liu J, Chen H, Wang Z (2013) Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. BMC Genomics 14(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-411>

Song Z, Yin Y, Jiang S, Liu J, Wang Z (2014) Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. BioControl 59(5):597-605. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9589-4>

Sree KS, Padmaja V, Murthy YL (2008) Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. Pest management science 64:119-125. <https://doi.org/10.1002/ps>

Strasser H, Vey A, Butt TM (2000) Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?. Biocontrol Science and Technology 10(6):717-735. <https://doi.org/10.1080/09583150020011690>

Taibon J, Sturm S, Seger C, Parth M, Strasser H, Stuppner H (2014) Development of a fast and selective UHPLC-DAD-QTOF-MS/MS method for the qualitative and quantitative assessment of destruxin profiles. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406(29):7623-7632. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8203-z>

Teertstra WR, Tegelaar M, Dijksterhuis J, Golovina EA, Ohm RA, Wösten HAB (2017) Maturation of conidia on conidiophores of *Aspergillus niger*. Fungal Genetics and Biology 98:61-70. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.12.005>

Toledo AV, Franco MEE, Yanil Lopez SM, Troncozo MI, Saparrat MCN, Balatti PA (2017) Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. Physiological and Molecular Plant Pathology 99:2-6. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.04.004>

Torres-Torres L, Espinel-Correal C, Santos-Díaz AM (2020) Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoinsecticidas. 46(2)

Tseng MN, Chung PC, Tzean SS (2011) Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology* 77(13):4508-4519. <https://doi.org/10.1128/AEM.02033-10>

Villamizar LF, Barrera G, Marshall SDG, Richena M, Harland D, Jackson TA (2020) Three-dimensional cellular aggregates formed by *Beauveria pseudobassiana* in liquid culture with potential for use as a biocontrol agent of the African black beetle (*Heteronychus arator*). *Mycology* 00(00):1-14. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1754953>

Villamizar R LF, Cotes AM (2003) Efecto de las condiciones de cultivo sobre parámetros del modo de acción de *Metarhizium anisopliae*. *Revista Colombiana de Entomología* 29(2):121-126

Villamizar LF, Nelson TL, Jones SA, Jackson TA, Hurst MRH, Marshall SDG (2018) Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. *Biocontrol Science and Technology* 28(12):1097-1113. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1514584>

Wahlman M, Davidson B (1993) New destruxins from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Natural Products* 56(4):643-647. <https://doi.org/10.1021/np9601216>

Wang C, Pi L, Jiang S, Yang M, Shu C, Zhou E (2018) ROS and trehalose regulate sclerotial development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Fungal Biology* 122(5):322-332. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.02.003>

Wang SYC, le Tourneau D (1971) Carbon sources, growth, sclerotium formation and carbohydrate composition of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Archiv für Mikrobiologie* 80(3):219-233. <https://doi.org/10.1007/BF00410123>

Willettts HJ, Bullock S (1992) Developmental biology of sclerotia. *Mycological Research* 96(10):801-816. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81027-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81027-7)

Xing XK, Guo SX (2008) The structure and histochemistry of sclerotia of *Ophiocordyceps sinensis*. *Mycologia* 100(4):616-625. <https://doi.org/10.3852/07-007R2>

Xu YJ, Luo F, Li B, Shang Y, Wang C (2016) Metabolic conservation and diversification of *Metarhizium* species correlate with fungal host-specificity. *Frontiers in Microbiology* 7(DEC):1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02020>

Yadav R, Rashid M, Zaidi N, Kumar R, Singh H (2019) Secondary Metabolites of *Metarhizium* spp. and *Verticillium* spp. and Their Agricultural Applications

Yeh SF, Pan W, Ong GT, Chiou AJ, Chuang CC, Chiou SH, Wu SH (1996) Study of structure-activity correlation in destruxins, a class of cyclodepsipeptides possessing suppressive effect on the generation of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229(1):65-72. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1758>

You-ping YIN, Shan H, Zhang-yong S, Zhong-kang W (2012) Microsclerotia Artificial Inductions of *Nomuraea rileyi* CQNr01. *Scientia Agricultura Sinica* 45(23):4801-4807. <https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2012.23.006>.

Yu JH, Keller N (2005) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* 43(114):437-458. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>.