



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Caracterización de microesclerocios en *Metarhizium* spp.:
genes responsables de la diferenciación celular y de la
patogenicidad frente a larvas del mosquito *Aedes aegypti*,
vector del virus del Dengue***

Tesista: Lic. MSc. Santos da Paixão, Flávia Regina

Director: Dr. Pedrini, Nicolás

Co-director: Dr. Fernandes, Éverton Kort Kamp

Año 2022

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Nicolas Pedrini y la co-dirección del Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes del Instituto Parasitología Tropical y Salud Pública de la Universidad Federal de Goiás, Brasil.

Mi reconocimiento

A las autoridades del INIBIOLP, por haberme aceptado en el Instituto.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca de doctorado para estudiantes latinoamericanos, y por el apoyo que otorgaron a nuestro grupo de investigación.

Al Programa ESCALA de Estudiantes de Posgrado de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), por otorgarme una beca de pasantía en Brasil para estudiantes de Doctorado, que me permitió realizar parte de los experimentos que componen esta tesis.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Médicas que me permitieron inscribirme y realizar mi trabajo para optar por el título de Doctor.

Mi agradecimiento

A mi director de tesis, el Dr. Nicolas Pedrini, por haberme aceptado en su grupo de investigación, por toda la predisposición al trabajo, y su constante guía fundamental para el desarrollo de publicaciones científicas y este trabajo de tesis.

A mi co-director de tesis, el Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes, por su orientación a nivel profesional y personal durante todos estos años, y su predisposición al trabajo.

A la Lic. Marianela Santana y a la Dra. Carla Huarte-Bonnet por ayudarme siempre a seguir adelante y solucionar las cosas pronto.

A mis compañeras y amigas del laboratorio 12, Dra. Costanza Mannino, Lic. Belén Davyt, Dra. Debora Moriconi y a la Dra. Andrea Dulbecco quienes crearon en el laboratorio un ambiente de amistad y cambios de tips a nivel maternal.

A todo el personal del INBIOLP por una buena convivencia.

Al Dr. Juan José García; Dra Claudia C. López Lastra y la Dra. Marianel Falvo, por hacer posible la realización de parte de mi trabajo experimental por la provisión de larvas de mosquitos y aislamientos de hongos entomopatógenos regionales.

A mi familia por siempre alentarme a perseguir mis sueños y apoyarme en cada paso, desde cerca o a la distancia. En especial a Ignacio G. Capra y Sophia Éloa Capra Paixao, por su contención y compañía invaluable.

A todos mis amigos, a los maestros y los profesores presentes en mi trayectoria estudiantil.

A la sincronía del destino, por un sueño y un objetivo de vida cumplido. Un ciclo termina para otro empezar.

Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis:

1. **Paixão F.R.S.**, Huarte-Bonnet C, Ribeiro-Silva C.dS, Mascarin G.M., Fernandes É.K.K., , 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* 2:654737. doi: 10.3389/ffunb.2021.654737

Trabajos publicados durante la realización de este trabajo de tesis:

2. Rodrigues, J., Catão, A. M. L., Dos Santos, A. S., **Paixão, F. R. S.**, Santos, T. R., Martinez, J. M., Marreto. R.N., Mascarin. G.M., Fernandes. E.K.K., Humber. R.A., & Luz, C. (2021 b). Relative humidity impacts development and activity against *Aedes aegypti* adults by granular formulations of *Metarhizium humberi* microsclerotia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(7), 2725-2736.
3. Santos, T. R., **Paixão, F. R. S.**, Catão, A. M. L., Muniz, E. R., Ribeiro-Silva, C. S., Taveira, S. F., Luz, C., Mascarin, G. M., Fernandes, E. K. K., Marreto, R. N. (2021). Inorganic pellets containing microsclerotia of *Metarhizium anisopliae*: a new technological platform for the biological control of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12.
4. Huarte-Bonnet, C., Pereira-Junior, R. A., **Paixao, F. R.**, Braga, G. U., Roberts, D. W., Luz, C., Pedrini, N., Fernandes, E. K. (2020). *Metarhizium robertsii* and *M. acridum* conidia produced on riboflavin-supplemented medium have increased UV-A tolerance and upregulated photoprotection and photoreactivation genes. *BioControl*, 65(2), 211-222. doi.org/10.1007/s10526-019-09990-w
5. **Paixão F.R.S.**, Fernandes É.K.K., Pedrini N. (2019) Thermotolerance of Fungal Conidia. In: Khan M., Ahmad W. (eds) *Microbes for Sustainable Insect Pest Management. Sustainability in Plant and Crop Protection*. Springer, Cham.
6. Mannino, M. C., **Paixão, F. R.**, & Pedrini, N. (2019). The limpet transcription factors of *Triatoma infestans* regulate the response to fungal infection and modulate the expression pattern of defensin genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 53-60. doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.03.010
7. Huarte-Bonnet, C., **Paixão, F. R.**, Mascarin, G. M., Santana, M., Fernandes, É. K., & Pedrini, N. (2019). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces microsclerotial-like pellets mediated by oxidative stress and peroxisome biogenesis. *Environmental Microbiology Reports*, 11(4), 518-524. doi.org/10.1111/1758-2229.12742
8. Pereira-Junior, R. A., Huarte-Bonnet, C., **Paixão, F. R.**, Roberts, D. W., Luz, C., Pedrini, N., & Fernandes, É. K. (2018). Riboflavin induces *Metarhizium* spp. to produce conidia with elevated tolerance to UV-B, and upregulates photolyases, laccases and polyketide synthases genes. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 159-171. doi.org/10.1111/jam.13743

- Huarte-Bonnet, C., **Paixão, F. R.**, Ponce, J. C., Santana, M., Prieto, E. D., Pedrini, N. (2018). Alkane-grown *Beauveria bassiana* produce mycelial pellets displaying peroxisome proliferation, oxidative stress, and cell surface alterations. *Fungal Biology*, 122(6), 457-464. doi.org/10.1016/j.funbio.2017.09.003

Reuniones científicas, simposios y congresos:

- Paixão, FRS**; Pedrini, N. “Patogenicidad y virulencia de microesclerocios del hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* frente a larvas del mosquito *Aedes aegypti*, vector del virus del dengue” **2019**. Jornadas de Investigación 2019 de la Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de La Plata.
- Huarte-Bonnet, C; **Paixão, FRS**; Pedrini, N; Fernandes, EKK. “*Beauveria bassiana* produces microsclerotia-like propagules with active peroxisome biogenesis” In: 50th Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology, 2017, San Diego. 50th Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology., **2017**. p.68 - 68
- Pereira-Junior, R A; Huarte-Bonnet, C; **Paixão, FRS**; LUZ, C; Rangel, DEN.; Roberts, DW; Pedrini, N; Fernandes, ÉKK. Over-expression of genes may reveal increased tolerance against UV-B radiation in *Metarhizium* spp. conidia produced on culture medium supplemented with riboflavin (vitamin B2) In: 50th Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology, 2017, San Diego. 50th Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology., **2017**. p.32 - 33
- Paixão, FRS**; Huarte-Bonnet, C; Santana, M; Pedrini, N. “Oxidative stress and peroxisomal biogenesis in microsclerotia produced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii*” In: Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, 2017, Buenos Aires. Medicina. Buenos Aires: Grafica Taddeo, **2017**. v.77. p.302 –
- Paixão, FRS**; Huarte-Bonnet, C; Fernandes, É. K; & Pedrini, N. “Gene expression analysis during microsclerotial development of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575” International symposium on fungal stress – ISFUS **2017** Goiânia -Brasil.
- Huarte-Bonnet, C; **Paixão, FRS**; Ponce, JC; Santana, M; Pedrini, N. “Production of mycelial pellets by alkane-grown *Beauveria bassiana* display oxidative stress and cell surface alterations” International symposium on fungal stress – ISFUS **2017** Goiânia - Brasil.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
Control microbiano.....	2
Hongos entomopatógenos	2
Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	4
Microesclerocios de <i>Metarhizium</i> spp.....	6
Diferenciación y desarrollo	7
Estrés oxidativo; biogénesis de peroxisomas y síntesis de pigmentos	8
Factores abióticos en el control microbiano	11
El mosquito <i>Aedes aegypti</i>	12
Ciclo de vida.....	13
Importancia en la salud pública	15
Control de <i>A. aegypti</i> con hongos entomopatógenos	15
Sistema de defensa de los insectos	16
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Hongos entomopatógenos	21
Producción de microesclerocios y pellets de <i>Metarhizium</i> spp.....	22
Caracterización de microesclerocios y pellets de <i>M. robertsii</i>	23
Microscopía Transmisión Electrónica (TEM) de <i>M. robertsii</i>	24
Tolerancia a radiación ultravioleta B (UV-B) de microesclerocios y pellets de <i>M. robertsii</i>	25
Tolerancia al calor de microesclerocios y pellets de <i>M. robertsii</i>	26
Evaluación de la producción y viabilidad de conidios luego la exposición de microesclerocios y pellets de <i>M. robertsii</i> a la radiación UV-B o al calor.....	27
Producción de conidios por microesclerocios o pellets de <i>M. anisopliae</i> s.l y <i>M. robertsii</i> sumergidos en agua.....	28

Origen y cría del mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae).....	29
Bioensayos de patogenicidad y virulencia de microesclerocios o pellets de <i>Metarhizium</i> spp. frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i>	30
Diseño de los primers	32
Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	34
Análisis estadístico	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
Sección I: Tolerancia a los factores abióticos de microesclerocios y pellets de <i>Metarhizium robertsii</i>, cambios moleculares y ultraestructurales durante la diferenciación de microesclerocios	42
Caracterización de microesclerocios y pellets de <i>M. robertsii</i> ARSEF 2575.	42
Tolerancia a la radiación UV-B y al calor de microesclerocios y pellets de <i>M. robertsii</i> ARSEF 2575.....	44
Análisis ultraestructurales durante la diferenciación de microesclerocios.....	45
Análisis de expresión génica durante la diferenciación de microesclerocios.....	47
Discusión	49
Sección II: Producción de microesclerocios y pellets a partir de diferentes aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp., patogenicidad y virulencia frente a larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i>. Análisis de genes codificantes de péptidos antimicrobianos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> durante la interacción con microesclerocios de <i>M. robertsii</i>	59
Producción de microesclerocios y pellets.....	59
Bioensayos de supervivencia de larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i> tratadas con microesclerocios o pellets de <i>Metarhizium</i> spp.....	63
Análisis de la expresión génica de larvas de <i>A. aegypti</i> durante la interacción con microesclerocios de <i>M. robertsii</i>	66
Discusión	68
CONSIDERACIONES FINALES.....	76
REFERENCIAS.....	79

INTRODUCCIÓN

Control microbiano

El control microbiano es una rama del control biológico de plagas y se puede definir como el uso de microorganismos entomopatógenos (hongos, virus, bacterias, protistas o nematodos) para reducir una población de insectos plaga o de vectores de enfermedades, así como otros artrópodos, a un nivel que no genere impacto económico o daño para la salud (Shapiro-Ilan et al. 2012). La investigación de diferentes agentes de control microbiano se ha desarrollado en forma continua desde el siglo XIX. El control microbiano ha recibido gran interés fundamentalmente desde la aparición de fenómenos de resistencia a los insecticidas sintéticos comúnmente utilizados para el control de diversas plagas (Davidson y Sweeney, 1983) y por ser una forma más amigable con el medio ambiente ya que poseen baja o casi nula toxicidad hacia otros organismos, en comparación con los insecticidas de síntesis química (Shapiro-Ilan et al. 2012). Además, al tener mayor especificidad, mejoran la biodiversidad en los ecosistemas (Islam et al. 2021).

Hongos entomopatógenos

El empleo de hongos como agentes de control microbiano se ha reportado desde 1835, cuando Agostino Bassi reconoció y asoció la enfermedad del gusano de seda (*Bombyx mori*) con un hongo patógeno, más tarde llamado *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912 en su honor. La capacidad de cultivo de un hongo entomopatógeno fue desarrollada por Elie Metchnikoff en 1879 cuando aisló *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883, desde el coleóptero plaga de cereales *Anisoplia austriaca* y lo cultivó en un medio artificial (Tanada, 1959; Lacey, 2017). Desde entonces, diversos hongos entomopatógenos que tienen la capacidad de infectar y matar artrópodos se han

identificado y clasificado en los órdenes Hypocreales y Entomophthorales. El orden Hypocreales incluye los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* spp., *Isaria fumosorosea* Wize 1904 y *Lecanicillium* spp., los cuáles pueden ser producidos en una variedad de cultivos en condiciones de laboratorio o a mayor escala para uso comercial (Lacey, 2017).

Los hongos entomopatógenos son capaces de provocar infecciones letales y así regular poblaciones en la naturaleza mediante epizootias. La ocurrencia de epizootias ocasionadas por hongos es de gran interés en las investigaciones de patología de insectos por su importancia para el control de plagas o vectores (Faria y Wraight, 2007; Shapiro-Ilan et al. 2012; Kidanu y Hagos 2020; Islam et al 2021). Como ya se describió para el control microbiano en general, el uso de hongos entomopatógenos es viable debido a su especificidad para algunas especies de insectos, bajo impacto ambiental, bajo riesgo para los mamíferos y su capacidad patogénica para todos los estadios de desarrollo y del ciclo de vida de insectos tanto holometábolos como hemimetábolos (Zimmermann, 2007; Luz et al. 2007; Leles et al. 2010; Brunner-Mendoza et al. 2019; Islam et al 2021). El género *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) presenta distribución mundial, actúa como regulador de poblaciones de insectos en la naturaleza siendo bastante estudiado en los aspectos teórico-prácticos, a nivel molecular y bioquímico (Lacey et al. 2001; Kepler et al. 2014; Wang et al. 2016; Sant et al. 2019). *Metarhizium* spp. ha sido asociado a un estilo de vida dual, como patógeno de insectos y simbionte de plantas (Wyrebek y Bidochka, 2013). Son reconocidos y aplicados como agente de control biológico de insectos plagas o control de insectos y arácnidos vectores de enfermedades humanas (Zimmermann 1993); Rodrigues et al. 2015). *Metarhizium* y *Beauveria* son dos de los géneros de hongos entomopatógenos mejor caracterizados y empleados en el control microbiano, por su capacidad de patogenicidad y virulencia, por

tener una distribución mundial desde el ártico hasta los trópicos, colonizando una variedad de ecosistemas (Zimmermann, 2007; Lobo et al. 2015; Forlani et al. 2015; Mannino et al. 2018; Pedrini 2018; Cabral et al. 2020; Kinadu y Hagos, 2020). Las investigaciones con hongos entomopatógenos se centran en la biología, fisiología, ecología, influencia de factores bióticos y abióticos, formulaciones y su potencial para regular poblaciones de artrópodos plagas o vectores (Roy et al. 2006), búsqueda de asociaciones entre hongos y artrópodos en diferentes condiciones naturales, así como la preservación de hongos patógenos de insectos para futuros estudios microbianos (Gutierrez et al. 2017). En Argentina se describió la presencia de hongos entomopatógenos en ambientes agrícolas y naturales en 15 provincias (Sosa-Gómez et al. 2010).

Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos

El mecanismo tradicional de infección por hongos entomopatógenos del orden Hypocreales comienza por la adhesión de un propágulo de dispersión, denominado conidio, a la cutícula del artrópodo susceptible, lo que desencadena una serie de cambios morfológicos, físicos y químicos que garantizan el inicio de la infección fúngica (Figura 1). El proceso de adhesión en el hospedador combina fuerzas hidrofóbicas pasivas, fuerzas electrostáticas e interacciones varias entre los conidios y la epicutícula. Las adhesinas (Mad1 y Mad2) son fundamentales en la adhesión de los hongos (Wyrebek y Bidochka, 2013; Greenfield et al. 2014). Luego de la adhesión empieza la germinación con la posterior formación del apresorio, estructura que permite la penetración de la cutícula del hospedador. El mecanismo de penetración de la cutícula del insecto es el resultado de la combinación de una presión mecánica y de varias

enzimas (proteasas, quitinasas, citocromo P450s, lipasas, esterases) en el tubo germinativo (Pedrini, 2018). Una vez en la hemolinfa los hongos producen cuerpos hifales que se diseminan a través del hemocele, liberando una serie de toxinas y metabolitos secundarios que generan reacciones en el sistema de defensa inmunológica del hospedador (Pedrini, 2022). Para el género *Metarhizium* se han descrito seis tipos de destruxinas y citocalasinas (C y D) como metabolitos secundarios (Pedras et al. 2002; Donzelli et al. 2012; Arroyo-Manzanares et al. 2017). Finalmente, el hongo es capaz de producir micelios que invaden todos los tejidos, lo que lleva a la muerte del hospedador. Sobre el cadáver se vuelven a formar conidios que son esporas asexuales infecciosas y de fácil dispersión (Zimmermann, 2007). Se ha descrito la expresión de una gran variedad de genes durante el proceso de infección y la patogénesis (Barranco-Florido et al. 2013; Pedrini, 2018; Shin et al. 2020). Sin embargo, el proceso de infección de *Metarhizium* spp. en larvas de insectos acuáticos presenta algunas diferencias cuando se lo compara con un hospedador terrestre (Butt et al. 2013; Aw et al. 2017), como se detallará más adelante.

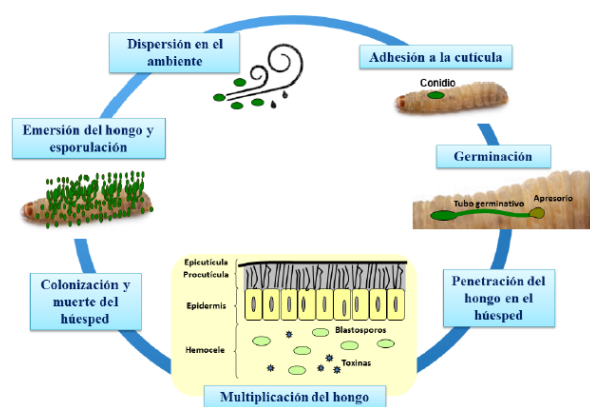


Figura 1: Representación del ciclo de infección de los hongos entomopatógenos del orden Hypocreales sobre los artrópodos huéspedes. Fuente: López Lastra y Lecuona, 2019.

Microesclerocios de *Metarhizium* spp.

Los microesclerocios de hongos entomopatógenos son propágulos de resistencia formados por un agregado compacto de hifas pigmentadas, que se forman a partir de los conidios cultivados en un medio líquido específico (Osherov y May, 2001; Jackson y Jaronski, 2009, Song et al. 2014; Mascarin et al., 2014). Estas estructuras se describieron por primera vez para el género *Metarhizium* en el año 2009, bajo un cultivo líquido específico que permite el desarrollo dimórfico del hongo (Jackson y Jaronski, 2009). Este dimorfismo en *Metarhizium* radica en la transición de conidios a crecimiento miceliogénico seguido por el desarrollo de hilos de hifas densos y compactos que forman los microesclerocios, que son gránulos fúngicos de 50 - 600 μm de diámetro. Este tipo de propágulo es notablemente tolerante a la desecación y capaz de producir conidios infecciosos sin una fuente de carbono exógena debido a sus reservas endógenas (Jaronski y Jackson, 2008; Jackson y Jaronski, 2009; Behle et al., 2013; Mascarin et al., 2014; Goble et al., 2016; Song et al., 2017). Los hongos filamentosos también pueden crecer como gránulos por formación de micelios en cultivos sumergidos (pellets) que pueden ser ligeramente distintos en morfología y probablemente menos tolerantes al estrés ambiental en relación con los microesclerocios (Nair et al., 2016; Zhang y Zhang, 2016; Veiter et al., 2018). Los microesclerocios son propágulos con potencial aplicación como agentes de control microbiano y su capacidad micoinsecticidas ha sido abordada para el control de diversos insectos y ácaros (Jaronski y Jackson, 2008; Jackson y Jaronski, 2009; Behle et al., 2013; Mascarin et al., 2014; Goble et al., 2016; Song et al., 2017; Rodrigues et al. 2021; Marciano et al. 2021; Santos et al. 2021).

Diferenciación y desarrollo de pellets y microesclerocios

La forma y tamaño de los diferentes propágulos fúngicos basados en agregados miceliales están directamente asociados con la disponibilidad de nutrientes y la optimización del medio de cultivo (Fargues et al. 2002). Los procesos de diferenciación y adaptación bioquímica de los hongos tienen un efecto significativo sobre el potencial de crecimiento, incluyendo la diferenciación celular, regulación temporal y espacial de la expresión génica, comunicación celular y respuesta a factores ambientales (Nielsen, 1992; Feofilova, 2003; Park y Yu, 2012). El crecimiento microbiano en medios líquidos (cultivos sumergidos) para obtención de microesclerocios involucra la actividad simultánea de muchos genes relacionados a mecanismos fisiológicos durante el proceso de morfogénesis (Song et al. 2013; Huarte-Bonnet et al. 2019; Paixao et al. 2021). Esta forma de desarrollo se asocia con condiciones específicas como concentración de carbono, niveles de nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono disuelto, pH y temperatura. Además, dependen de factores físicos como la morfología y geometría del fermentador, los sistemas de agitación, la reología y los modos de cultivo (Papagianni, 2004; Song et al. 2017; Walker y White, 2017). La diferenciación de los microesclerocios incluye cambios morfológicos y fisiológicos durante las etapas de desarrollo como la formación y agregación de hifas; posteriormente, los agregados crecen en tamaño y sintetizan el/los pigmento/s característicos. La diferenciación de los propágulos de resistencia son desencadenados por mecanismos de estrés oxidativo que incluyen la biogénesis activa de peroxisomas y el desarrollo de pigmentación (Georgiou et al. 2006; Song et al 2013, Huarte-Bonnet et al. 2019; Paixao et al. 2021).

Estrés oxidativo, biogénesis de peroxisomas y síntesis de pigmentos relacionados a la formación de microesclerocios

El desarrollo celular en levaduras y hongos filamentosos muestra una correlación entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la regulación positiva de enzimas antioxidantes específicas, como superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT), CAT-peroxidasas, glutatión peroxidasas (GPxs) y peroxiredoxinas (Aguirre et al. 2005, 2006). Un desequilibrio entre las ROS y la respuesta de las enzimas antioxidantes puede causar efectos perjudiciales en la morfología celular, la tasa de crecimiento, el metabolismo y la secreción de proteínas, entre otros (Aguirre et al. 2006). Por otro lado, la generación de ROS y el estrés oxidativo están asociados con la maduración de los esclerocios en los hongos filamentosos *Sclerotium rolfii* Sacc. 1911 (Georgiou et al. 2006) y *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn 1858 (Liu et al. 2018) y con el desarrollo de los microesclerocios y propágulos similares en las especies de hongos entomopatógenos *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* (Farl.) Kepler, Rehner y Humber (2014) (Song et al. 2013, 2017; Liu et al. 2014) y *B. bassiana* (Huarte-Bonnet et al. 2019). Se ha observado biogénesis activa de peroxisomas en *B. bassiana* durante la formación de pellets miceliales cuando el hongo se cultiva en medio líquido suplementado con hidrocarburos (Huarte-Bonnet et al. 2018) y durante el desarrollo de estructuras similares a los microesclerocios (Huarte-Bonnet et al. 2019). *B. bassiana* acompaña la inducción de genes marcadores de estrés oxidativo con la expresión de genes *pex* que codifican peroxinas, proteínas implicadas en el transporte de proteínas desde el citosol al lumen del peroxisoma. Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas antioxidantes importantes para los sistemas de defensa contra las ROS descomponiendo el anión superóxido y el oxígeno singlete en oxígeno y H₂O₂. Las

SOD comprenden tres tipos de isoformas, dependientes de Cu^{2+} / Zn^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} como cofactores para su actividad (Cullota et al. 2006). Las isoformas SOD1 (Cu / ZnSOD) y SOD2 (MnSOD) están localizadas en el citosol o las mitocondrias y están implicadas en la diferenciación celular y en las respuestas de estrés múltiple (Aguirre et al. 2005; Li et al. 2017). Para *M. robertsii* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner y Humber (2014), la familia SOD es sintetizada por genes que comprenden seis miembros funcionales: Cu / ZnSOD (*sod1* / 5/ 6), MnSOD (*sod2* / 3) y FeSOD (*sod4*) (Zhu et al. 2018). En *M. rileyi* se identificaron los genes *sod1* y *sod2* regulados positivamente durante la formación de microesclerocios (Song et al. 2017; Wang, 2019). La catalasa es una enzima de la familia de las oxido-reductasas que tiene como función metabolizar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. En base a sus propiedades físicas y bioquímicas, las catalasas se dividen en dos grupos: catalasas monofuncionales (catA, catB y catC) y catalasas-peroxidasas bifuncionales (catP y catD) (Wang et al. 2013). En los hongos filamentosos las catalasas actúan durante la germinación y el crecimiento en respuesta al estrés oxidativo (Michán et al. 2002; Pedrini et al. 2006; Wang et al. 2013; Song et al. 2018; Huarte-Bonnet et al. 2019). Las lacasas son enzimas multicobre oxidasas que catalizan la formación de compuestos aromáticos y no aromáticos con reducción de oxígeno molecular a agua. Se conocen numerosas isoformas debido a la diversidad de funciones fisiológicas que realizan durante el ciclo de vida de los hongos (Rivera-Hoyos et al. 2013). En hongos filamentosos como *M. anisopliae*, el gen codificante para una lacasa (*Malac1*) se expresa durante el crecimiento isotrópico, la tolerancia al estrés abiótico y durante la pigmentación de conidios (Fang et al. 2010). También se ha observado que para *M. robertsii* y *M. acridum* ((Driver y Milner) J.F. Bischoff., S.A. Rehner y Humber 2009) las isoformas *lac1*, *lac2* y *lac3* se expresan positivamente cuando los hongos se exponen a condiciones estresantes de radiación

UV-B (Pereira-Junior et al. 2018). Las glutatión peroxidases (GPx) son enzimas antioxidantes dependientes de selenio (Se). Se reconocen al menos 3 isoformas de GPx, una intracelular (GPx-c), una extracelular (GPx-p) y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPx-PH) (Bai et al. 2003). En microorganismos, las GPx participan en el sistema de defensa celular por el estrés oxidativo, reduce tanto el H₂O₂ como el lipoperóxido (L-OOH), siempre utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH) o isoenzimas GSH S-transferasa (Bai et al. 2003). Las hidrofobinas son proteínas tensioactivas producidas por hongos filamentosos involucradas en el crecimiento (Wösten, 2001), siendo importantes para la esporulación, pigmentación, hidrofobicidad y virulencia de *M. brunneum* (Sevim et al. 2012); y en el desarrollo del apresorio en *M. anisopliae* (Leger et al. 1992). Los peroxisomas participan en los hongos filamentosos durante el mecanismo de biosíntesis, patogenicidad y desarrollo (Pieuchot y Jedd, 2012). Como se menciona antes, los genes implicados en la biogénesis de los peroxisomas se denominan genes *pex* y las proteínas codificadas por éstos se denominan peroxinas (PEX). La mayoría de las PEX intervienen en el transporte de proteínas de la matriz desde el citosol hasta la luz del peroxisoma. Este transporte de proteínas de la matriz depende de señales específicas de direccionamiento peroxisómico (PTS), se han identificado dos proteínas receptoras PTS1 y PTS2 (Kiel et al. 2006; Opaliński et al. 2010; Pieuchot y Jedd, 2012). Las policétido sintasas (PKS) son enzimas involucradas en varias actividades biológicas, como la biosíntesis de policétidos, biosíntesis de pigmentos y de micotoxinas. Hay reconocidas tres clases de PKS (Molnár et al. 2010). Sin embargo, se ha reportado la expresión de los genes *pks1* y *pks2* para especies de *Metarhizium*, siendo que *pks1* se involucra en la pigmentación de conidios y tolerancia al estrés ambiental y *pks2* se expresa durante la patogenicidad (Pereira-Junior et al. 2018; Zeng et al. 2018).

Factores abióticos en el control microbiano

Los factores abióticos consisten en elementos ambientales como temperatura, humedad, y radiación ultravioleta (UV) que determinan el desarrollo inicial y la supervivencia de los propágulos de hongos entomopatógenos (Ment et al. 2017). La temperatura y la radiación UV son más pronunciadas en las regiones tropicales y subtropicales. El tiempo de exposición a estos factores ambientales pueden alterar las estructuras moleculares y desencadenar la producción de ROS provocando daño, reduciendo la viabilidad de los hongos e incluso provocando la muerte celular (Braga et al. 2001; Nascimento et al. 2010; Zhang et al. 2017). El espectro UV se divide en tres intervalos de longitud de onda: UV-A (315 - 400 nm), UV-B (280 - 315 nm) y UVC (100 - 280 nm). La radiación UV-B contiene un espectro de longitudes de onda que induce efectos específicos, pero no necesariamente dañinos a los organismos vivos (Wellmann, 1983). La tolerancia a los rayos UV-B han sido reportados en propágulos como conidios, micelio o blastosporos de hongos entomopatógenos (Fernandes et al. 2007, 2015; Braga et al. 2015; Rangel et al. 2015; Brancini et al. 2018; Zhao et al. 2019; Bernardo et al. 2020; Corval et al, 2021). La temperatura es un factor limitante durante la morfogénesis, la germinación y los procesos metabólicos (Abrashev et al. 2008; Zhang et al. 2017). Los hongos entomopatógenos son mesófilos ya que crecen a temperaturas entre 10 y 40 °C, siendo una temperatura óptima para la germinación y crecimiento entre 25 y 30 °C (Roberts y Campbell, 1976). En este sentido, el estrés por calor puede retrasar y reducir la efectividad de la germinación de conidios, esporulación y crecimiento de hongos entomopatógenos termosensibles (Fernandes et al. 2008, 2010; Paixão et al. 2019). Para los microesclerocios de *Metarhizium* el estrés térmico se reduce por la morfología del

propágulo, la tolerancia a la desecación, capacidad de germinación y esporulación en condiciones favorables de temperatura y humedad es posible debido que el propágulo posee reservas energéticas (Jackson y Jaronski, 2009). No hay estudios hasta la fecha acerca de la aplicación de microesclerocios de hongos entomopatógenos en medios acuosos.

El mosquito *Aedes aegypti*

Los mosquitos son una gran amenaza para la salud humana en todo el mundo, transmiten varios parásitos y patógenos de importancia médica y veterinaria que causan morbilidad y mortalidad significativas (Foster y Walker, 2019, Gao et al. 2020). El mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) se encuentra en regiones con clima tropical y subtropical (Figura 2) (Ding et al. 2018) y es un importante vector de enfermedades infecciosas por ser un artrópodo hematófago (Santiago et al. 2017). Las hembras adultas de mosquito se alimentan de sangre humana para desencadenar la síntesis metabólica de reserva energética para la producción de huevos y perpetuación de la especie (Harrington et al. 2001; Santiago et al. 2017). El comportamiento de muchas especies de mosquitos, incluido *Ae. aegypti*, se ha modificado por la alteración humana al espacio ambiental, efectos de la globalización o cambios climáticos (Foster y Walker, 2019; Fischer et al. 2019), lo que ha contribuido a la expansión geográfica de la especie. La presencia del vector *Ae. aegypti* se ha confirmado en provincias argentinas como Tucumán, Salta, Formosa, Chaco, Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires (Bonica et al. 2019). Se han desarrollado investigaciones que buscan comprender mejor los factores y características que influyen la presencia, expansión, competencia y capacidad vectorial de *Ae. aegypti* en Argentina (Ciota et al. 2018; Garzón et al. 2021).

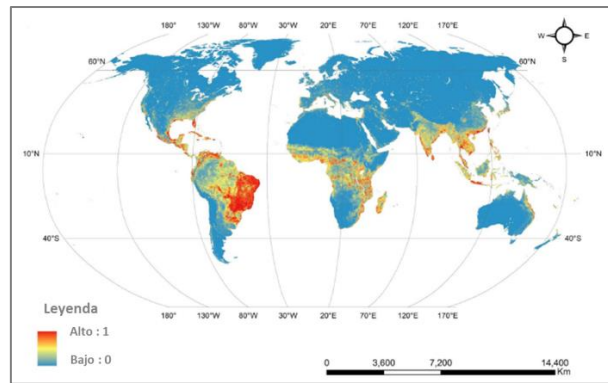


Figura 2: adaptada Ding et al 2018, Mapeo de la distribución espacial del mosquito *Ae. aegypti*,

Ciclo de vida

Los mosquitos son insectos holometábolos que se caracterizan por necesitar dos tipos de ambientes, uno acuático y el otro terrestre, para completar las fases de desarrollo huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3). La oviposición por hembras de *Ae. aegypti* ocurre sobre o en el agua, o sobre sustratos sólidos que posteriormente se inundarán. La eclosión de las larvas ocurre cuando las condiciones ambientales son favorables (por ejemplo, temperaturas de 26-28 °C), para iniciar la fase acuática con el desarrollo de los estadios larvales subsecuentes (L1, L2, L3 y L4), que puede durar 5 o 6 días. Luego, las larvas pasan a pupa y los adultos emergen de ese estadio alrededor de 2 o 3 días después. Los adultos inician el ciclo terrestre, son móviles, se dispersan y ocupan hábitats favorables para el descanso, alimentación e hibernación. Muchos de estos hábitats están en zonas urbanas y periurbanas (Scolari et al. 2019; Foster y Walker, 2019). Las larvas de mosquitos se encuentran en varios hábitats acuáticos (naturales o artificiales) como estanques, zanjas, pozos ciegos, áreas inundadas, charcos de lluvia, huecos de árboles o plantas, pequeños contenedores, neumáticos desechados u otros recipientes con capacidad de acumular agua (Skiff y Yee, 2014; Foster y Walker, 2019). Las larvas de mosquitos están anatómicamente divididas en tres partes distintas (Figura 4): 1) cabeza

(boca, ojos y antenas), 2) tórax más ancho y 3) abdomen que se compone de 7 segmentos casi idénticos y 3 segmentos posteriores modificados, además del sifón respiratorio (Snodgrass, 1959; Becker et al. 2020). En la superficie del agua, los 4 o 5 lóbulos espiraculares en forma de aleta son empujados a su posición extendida por las fuerzas de tensión superficial. Al abandonar la superficie del agua los lóbulos se cierran sellando el espiráculo.

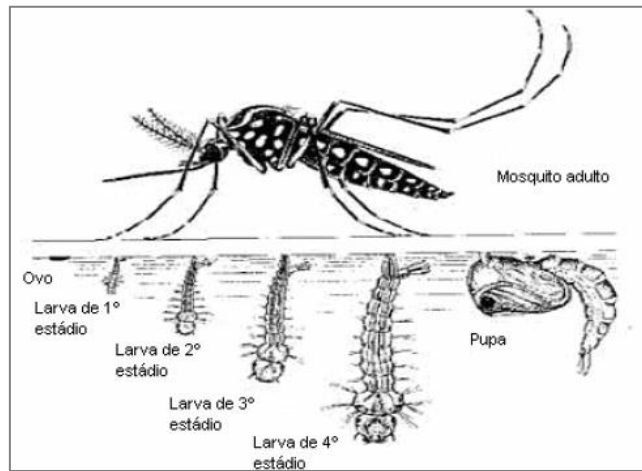


Figura 3: Ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti*. Fuente: Google imagen

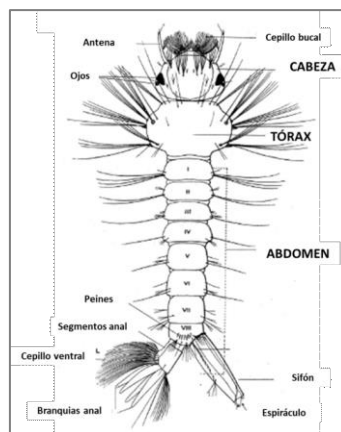


Figura 4: Anatomía externa de una larva de *Ae. aegypti*. Adaptada Folker y Walter 2019

En las larvas el sistema respiratorio se protege del agua por poseer una glándula adyacente a los lóbulos espiraculares que libera sustancias hidrófobas. El

comportamiento alimentario de las larvas se puede clasificar en alimentadores de filtro o suspensión, exploradores o depredadores. Básicamente la fuente de alimentos se compone de microorganismos, algas, protozoos, invertebrados y detritos (Becker et al. 2020).

Importancia en la salud pública

El mosquito *Ae. aegypti* se muestra epidemiológicamente importante para los seres humanos, debido a su comportamiento sinantrópico y capacidad vectorial (Harrington et al. 2001; Zhu et al. 2019). Además, su importancia para la salud pública se vincula con la alergia de las picaduras, irritación localizada, hipersensibilidad y consecuentemente se puede llevar a infecciones secundarias por la transmisión de microorganismos de importancia médica y veterinaria (Foster y Walker, 2019). Las hembras de *Ae. aegypti* transmiten arbovirosis por lo que son importantes vectores del virus del dengue, chikungunya y zika (Rubio et al. 2011; Powell y Tabachnick 2013; Scolari et al 2019; Foster y Walker, 2019; Bonica et al. 2019). La urbanización del vector es un factor importante para la transmisión de estos virus y consecuentes enfermedades vectoriales (Rubio et al. 2011).

Control de *Ae. aegypti* con hongos entomopatógenos

Los métodos tradicionales de control de mosquitos se basan en la utilización de insecticidas sintéticos que pueden desarrollar diversas formas de resistencia y generar residuos perjudiciales para el medio ambiente (Corbel et al. 2016; Dusfour et al. 2019). La patogenicidad de hongos entomopatógenos considerados “terrestres” (por ejemplo los generos *Beauveria* y *Metarhizium*) frente a mosquitos ha sido demostrada (Shen et

al. 2020; Bitencourt et al. 2020). Los mosquitos adultos están expuestos a los hongos durante el descanso en interiores y al aire libre, el apareamiento y la oviposición. Los propágulos comúnmente estudiados son conidios (López Lastra, 1999; Scholte et al. 2007; Leles et al. 2010; Lobo et al. 2016; Falvo et al. 2020) aunque se ha descrito la patogenicidad de sus microesclerocios frente a huevos y adultos (Flor-Weiler et al. 2018; Rodrigues et al. 2021). En ambientes acuáticos, los hongos pueden ingresar al cuerpo de la larva de forma pasiva a través de diversos comportamientos de alimentación incluido en la recolección y el filtrado, así como el pastoreo y la trituración de materia orgánica, o por penetración directa de la cutícula. Hay reportes que proponen que la infección ocurre cuando las esporas presentes en la superficie del agua ingresan por aberturas naturales, principalmente en el sifón respiratorio (Crisan, 1971; Mannino et al. 2019; Tawidian et al. 2019).

Sistema de defensa de los insectos

Los insectos poseen un sistema defensivo activo que los protege contra los agentes infecciosos. El primer mecanismo de defensa son las barreras físicas como el exoesqueleto rígido (cutícula) y barreras intestinales que separan el alimento del epitelio intestinal. Una vez en la hemolinfa, se desencadenan mecanismos de inmunidad innata, que se compone de mecanismos celulares y humorales para evitar el proceso de infección microbiana e involucra una serie de interacciones moleculares, complejas e intrincadas, que son producto de la coevolución entre los insectos y sus patógenos (Pedrini, 2018; Qu y Wang, 2018; Tawidian et al. 2019; Bitencourt et al. 2020). Las respuestas inmunitarias celulares de los insectos dependen de los hemocitos circulantes, que se dividen en diferentes tipos según las características morfológicas y funcionales

(Qu y Wang, 2018, Dunn, 1986; Dubovskiy et al. 2013; Milutinović et al. 2016). Las respuestas humorales incluyen una arquitectura básica para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) conservados evolutivamente (Milutinović et al. 2016), induciendo la producción de péptidos antimicrobianos en varios tejidos como el cuerpo graso, los hemocitos y la capa epitelial del intestino. Los péptidos antimicrobianos sintetizados por insectos son componentes multifuncionales de los sistemas de defensa inmunitaria innato y en general se dividen en tres grupos: (1) Cecropinas: son péptidos básicos lineales con alfa hélices que carecen de residuos de cisteína, se sintetizan generalmente como respuesta a una infección bacteriana (Steiner et al. 1988); (2) Defensinas: son péptidos con 6-8 residuos de cisteína conservados, estabilizados mediante 3 o 4 puentes disulfuro, con 3 dominios que consisten en un bucle amino terminal flexible; (3) péptidos ricos en residuos de prolina y/o glicina (Lowenberger, 2001; Wu et al. 2018). En *Ae. aegypti*, se describieron seis grupos de péptidos antimicrobianos: Defensinas, Dipterocinas, Gambicinas, Attacinas, Holotricinas y Cecropinas (Wu et al. 2020).

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El control del mosquito *Aedes aegypti* ha tomado especial importancia en los últimos años debido a que es vector de varios arbovirus causantes de enfermedades. El control masivo con insecticidas químicos ha provocado focos de resistencia en diferentes partes del mundo, por lo que las herramientas alternativas de control, como los hongos entomopatógenos, ha tomado gran impulso en los últimos años para afrontar este problema. Hay evidencias del potencial de los hongos entomopatógenos para el control biológico en medios acuosos, sin embargo, no hay estudios del potencial biocida (patogenicidad y virulencia) de microesclerocios de *Metarhizium* spp. frente a insectos acuáticos o que desarrollan parte de su ciclo de vida en el agua, como las larvas del mosquito *Ae. aegypti*. Tampoco hay información de expresión génica en *Metarhizium* spp. durante la diferenciación de hifas a microesclerocios ni de la expresión de genes del mosquito relacionados con la respuesta inmune innata durante el proceso de infección a partir de los microesclerocios. Por todo lo expuesto, el presente trabajo aporta información valiosa tanto desde caracterización morfológica, biológica, bioquímica y molecular acerca del potencial de microesclerocios de *M. robertsii* para el control de larvas de *Ae. aegypti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hongos entomopatógenos

En este trabajo se utilizaron tres aislamientos de *Metarhizium* spp., dos de los cuales corresponden a *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l) que se encuentran depositados en la colección micológica del CEPAVE - Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) (La Plata, Buenos Aires, Argentina) bajo los códigos CEP 087 y CEP 423. El tercero de los aislamientos utilizados corresponde a *Metarhizium robertsii* y se encuentra depositado en la colección ARSEF Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (Ithaca, Nueva York, Estados Unidos) bajo el código ARSEF 2575. La descripción de cada uno se detalla en la Tabla 1. Para la producción de conidios, los hongos se cultivaron en placas de Petri (80 × 10 mm) conteniendo medio de agar papa dextrosado (Merck, Darmstadt, Alemania), adicionado con extracto de levadura 1 g L⁻¹ (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) (PDAL).

Tabla 1: Descripción de los aislamientos de *Metarhizium* estudiados.

Aislado*	Especie	Origen	Sustrato/ hospedador	Año
CEP 087	<i>M. anisopliae</i> s.l.	La Plata, Bs. As., Argentina	Hemiptera: Cercopidae no identificada	2004
CEP 423	<i>M. anisopliae</i> s.l.	La Plata, Bs. As., Argentina	<i>Tenebrio molitor</i> [Coleoptera: Tenebrionidae]	2013
ARSEF 2575	<i>M. robertsii</i>	Carolina del Sur, EEUU	<i>Curculio caryae</i> [Coleoptera: Curculionidae]	1988

(*) CEP: CEPAVE- Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores; ARSEF: ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures.

Las placas se incubaron durante 10 días a 27 ± 1 °C en la oscuridad. Los conidios se rasparon de la superficie del cultivo con una espátula y se prepararon suspensiones en 10 ml de solución de Tween 80[®] 0,05% (v/v) (Sigma-Aldrich, USA) para lo cual se utilizaron tubos tipo Falcon (17 x 120 mm). Las suspensiones se agitaron y se llevaron a una concentración de 5×10^7 conidios mL⁻¹ con ayuda de un hemocitómetro en un microscopio óptico (Primo Star, Zeiss[®]) (aumento 40×), para posteriormente ser utilizadas como inóculos de los cultivos para la obtención de microesclerocios y pellets.

Producción de microesclerocios y pellets de *Metarhizium* spp.

Para iniciar el cultivo de microesclerocios y pellets, se inocularon 10 mL de cada suspensión de conidios en 90 mL de medio líquido basal (Tabla 2), previamente descritos para la producción de microesclerocios (Mascarin et al. 2014). La producción de pellets se realizó adaptando el medio de cultivo líquido utilizado por Mapari y colaboradores (2008) para el cultivo de hongos filamentosos.

Tabla 2: Composición del medio basal para la obtención de microesclerocios y pellets

Fórmula molecular	Componentes	Concentración (g/L)	
		Microesclerocios	Pellets
C ₆ H ₁₂ O ₆	Dextrosa anhidra	200	20
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico	4	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de calcio	0,8	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnesio	0,6	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato ferroso	0,1	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	Sulfato de manganeso II	0,016	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de zinc	0,014	-
-	Extracto de levadura	15	-
-	Extracto de malta	-	20
-	Caseína (ácido hidrolizado)	-	1

Los cultivos se prepararon en frascos Erlenmeyers de 250 mL conteniendo 100 mL volumen final. Estos se incubaron en un agitador orbital (Certomat BS-1, Sartorius, Alemania) a 250 rpm, a 26 ± 1 °C durante 4 días. Los Erlenmeyers se examinaron diariamente y en ese momento se agitaron manualmente por 1 minuto para minimizar el crecimiento de micelio en las paredes del mismo.

Caracterización de microsclerocios y pellets de *M. robertsii*

Cuatro días después de la inoculación, se recogieron muestras para medir la acumulación de biomasa, la concentración y el tamaño de los propágulos de microsclerocios o pellets (Figura 5). Además, se cuantificó el pH del medio de cultivo remanente con un pHmetro (Altronix Mod. EZDO-PC[®]). Para la acumulación de biomasa, 1 mL del cultivo líquido se depositó en discos de papel filtro (80gr/m²) (AC[®]) previamente pesado. Las muestras se secaron a 32 °C por dos días, para luego determinar la biomasa como peso seco (Jackson y Jaronski, 2009). Para la determinación de la concentración de los propágulos, 1 mL de cultivo líquido se adicionó a 9 mL de solución de Tween 80[®] 0,05% (v/v). Se colocaron 100 µL de cada suspensión de propágulos homogenizados (vortex) entre portaobjetos (76,2 × 25,4mm) y cubreobjetos (24 × 24 mm) y se contaron mediante microscopio óptico aumento 40× todos los propágulos presentes (Jackson y Jaronski, 2009). El diámetro de los propágulos se midió con una cámara Leica ICC50 HD, con resolución de 1280 × 720 p (HD ready) y el software Leica 201 LAZ EZ versión 3.0.0. acoplado a un microscopio óptico (Leica[®]). Para cada uno de los experimentos mencionados se realizaron al menos tres réplicas en diferentes días.

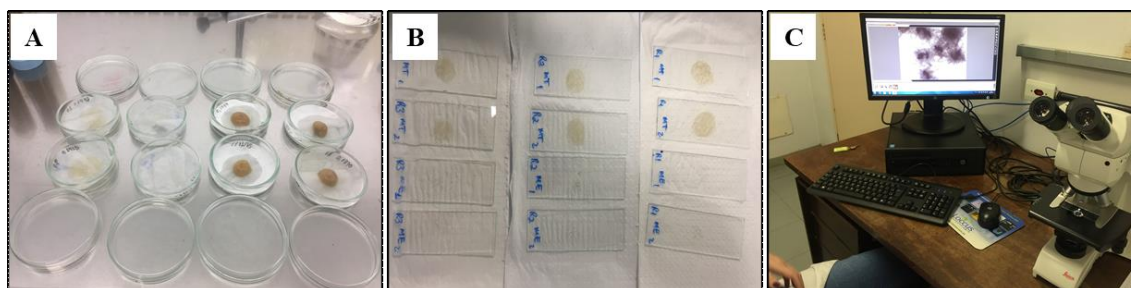


Figura 5: (A) Determinación de biomasa fúngica. (B) Determinación de la concentración de microsclerocios y pellets de *M. robertsii*. (C) Determinación del tamaño de microsclerocios y pellets de *M. robertsii*.

Para la caracterización por microscopía óptica, se tomaron muestras de propágulos de microsclerocios o pellets a las 24, 48, 72 y 96 hs posteriores a la inoculación del medio de cultivo. Las muestras se centrifugaron para recuperar los propágulos, se lavaron dos veces con agua estéril y se observaron con un microscopio óptico Nikon eclipse e200 (Nikon, Japón) con aumento 10×.

Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) en *M. robertsii*

Para caracterizar ultraestructuralmente los microsclerocios y comenzar a estudiar el escenario de estrés oxidativo reportado en la formación de esclerocios de otras especies fúngicas, se analizaron microsclerocios de 2 y 4 días mediante microscopía electrónica de transmisión y se los comparó con la ultraestructura de los conidios que le dieron origen, siguiendo el protocolo descrito por Huarte-Bonnet et al. (2018). Brevemente, los conidios y microsclerocios se lavaron y se fijaron inicialmente con glutaraldehído al 2% en buffer fosfato (pH 7,2) durante 2 hs en vacío, luego se lavaron 3 veces en buffer fosfato. Posteriormente, las muestras se tiñeron durante toda la noche con 3,3-diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich, EEUU) y se lavaron nuevamente con el mismo buffer. La DAB se utiliza para determinar la actividad de la enzima peroxidasa y constituye el principio activo de una técnica usada generalmente como marcador de

peroxisomas en imágenes de microscopia (Fahimi, 2017). La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1% durante 1 h a 4°C en vacío. Posteriormente, las muestras se deshidrataron con una serie creciente de alcoholes en cámara de vacío y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (70 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Japón) y se fotografiaron con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., EEUU) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Tolerancia a radiación ultravioleta B (UV-B) de los microesclerocios y pellets de *M. robertsii*

Para cuantificar la tolerancia a UV-B se obtuvieron y lavaron propágulos de microesclerocios y pellets al cuarto día de cultivo (96 hs) y se suspendieron en agua estéril. Se inocularon alícuotas de cada suspensión (conteniendo 100 propágulos) en medio agar-agua 2 % (peso /volumen) en placas de Petri (80 × 10 mm) y se expusieron a radiación UV-B como se describe en Fernandes et al. (2007) y Pereira-Junior et al. (2018) (Figura 6). Las placas se expusieron abiertas a 1.283,38 mW m⁻² de irradiancia ponderada por Quaitte (Quaitte et al. 1992) en una cámara conteniendo cuatro lámparas UV (UV-B-313 EL/40 W; Q-Lab Corporation, Westlake, EEUU) durante 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 horas, que correspondieron a dosis de 2.31, 4.62, 9.24, 13.86, 18.48 y 23.10 kJ m⁻², respectivamente. Durante el periodo de irradiación, las placas fueron cubiertas con film de diacetato de celulosa de 0.13 mm de espesor (JCS Industries, Le Mirada, EEUU). El diacetato de celulosa bloquea la radiación UV-C (longitudes de onda inferiores a 280 nm) y longitudes de onda corta de UV-B (280–290 nm), pero permite el paso de

radiación UV-B (290-320 nm) y una emisión mínima de UV-A (320–400 nm). La irradiancia espectral se midió con un espectro radiómetro USB 2000+ Rad (Ocean Optics, Dunedin, EEUU). Las placas utilizadas como controles del ensayo se cubrieron con papel de aluminio para bloquear toda la radiación UV (Pereira-Junior et al. 2018). Luego de la exposición, las placas se incubaron durante 10 días a 27 ± 1 °C en la oscuridad para evaluar el rendimiento y viabilidad de los conidios producidos a partir de cada tipo de propágulo. Se realizaron tres réplicas biológicas (dos replicas técnicas de cada una) en diferentes días.

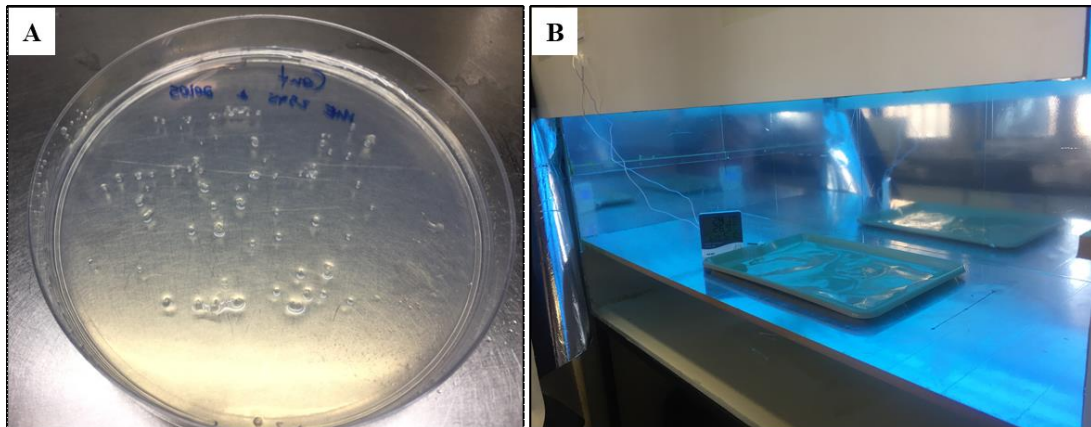


Figura 6: Propágulos de microesclerocios de *M. robertsii* (A) expuestos a radiación UV-B (B).

Tolerancia al calor de los microesclerocios y pellets de *M. robertsii*

Para cuantificar la tolerancia al calor de cada tipo de propágulo se prepararon alícuotas de 1 mL conteniendo 100 propágulos de microesclerocios o pellets. Las muestras se colocaron en tubos de ensayo de vidrio con tapones de goma (16 x 100 mm) y se expusieron a temperatura de 45 °C en un baño termostático digital (Newlab[®]) durante 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 horas (Figura 7). Los tubos de las muestras controles se mantuvieron a 27 °C. Después de cada exposición, las muestras se centrifugaron y luego se eliminaron

500 μ L del sobrenadante. El volumen restante se inoculó en agar-agua 2 % (peso/volumen) en placas de Petri (80 \times 10 mm) e incubaron durante 10 días a 27 ± 1 °C en la oscuridad para evaluar la producción de conidios desde los propágulos y determinar la viabilidad de conidios esporulados. Se realizaron tres réplicas biológicas (dos replicas técnicas de cada una) en diferentes días.

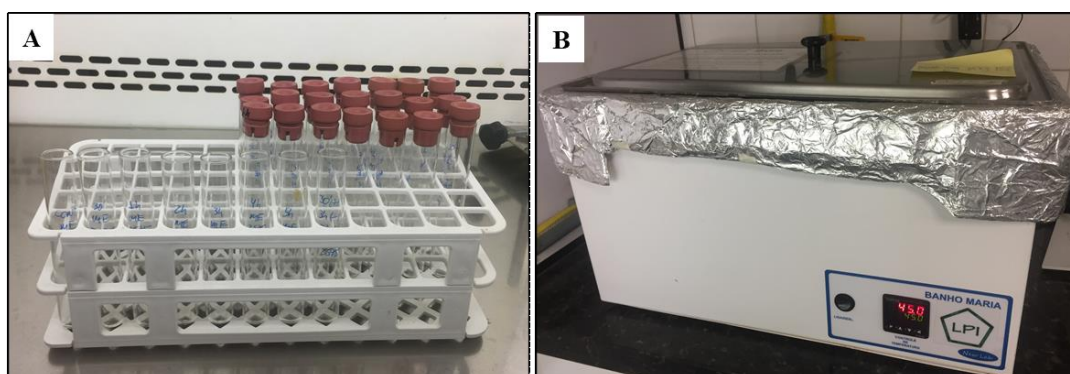


Figura 7: Suspensiones de microesclerocios y pellets de *M. robertsii* (A) expuestos a temperatura de 45 °C (B).

Evaluación de la producción y viabilidad de conidios luego la exposición de los microesclerocios y pellets de *M. robertsii* a la radiación UV-B o al calor

Para cuantificar la producción y viabilidad de conidios a partir de propágulos expuestos tanto a radiación UV-B como a 45 °C se evaluó la capacidad de conidiogénesis de microesclerocios o pellets (Figura 8). Los conidios producidos 10 días después de la inoculación de cada propágulo en placas de agar-agua se recolectaron y se resuspendieron en 10 mL Tween 80[®] 0,05%. Las muestras se homogeneizaron y cuantificaron con ayuda de hemocitómetro en microscopio óptico (40 \times). La viabilidad de los conidios se evaluó a partir de suspensiones de 1×10^6 conidios mL⁻¹ una alícuota de 20 μ L se inoculó en el centro de una placa de Petri conteniendo medio agar papa dextrosado con el agregado de Benomil 0,002% (50% del ingrediente activo; Benlate R,

DuPont, São Paulo, Brasil) (Braga et al. 2001) y de Cloranfenicol 0,05 % (INLab Confiança, São Paulo, Brasil). Las placas se incubaron durante 48 h a 27 ± 1 °C en la oscuridad. Para determinar la viabilidad de los conidios, se aplicaron 20 μ L de azul de algodón sobre el cultivo de 48 h en cada placa y se evaluó inmediatamente la germinación en microscópico óptico (40 \times). Se evaluó un mínimo de 300 conidios por placa, a los que se clasificó como germinados o no germinados, y se calculó el porcentaje relativo de viabilidad de los conidios según Braga et al. (2001) (Figura 8).

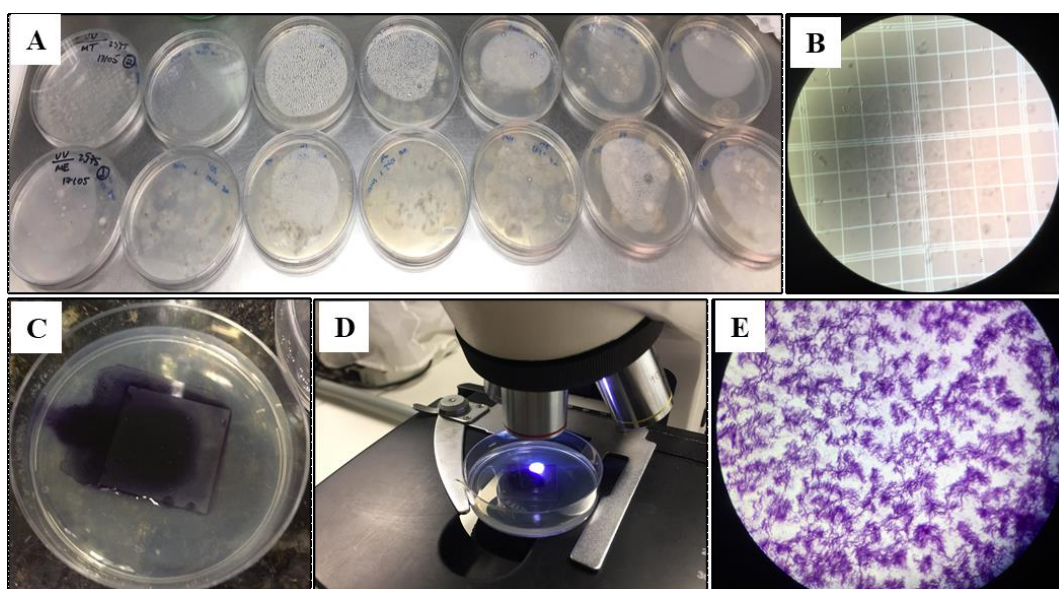


Figura 8: Producción (A y B) y viabilidad de conidios (C, D y E) a partir de propágulos de *M. robertsii* expuestos a radiación UV-B o el calor de 45 °C.

Producción de conidios por microesclerocios o pellets de *M. anisopliae* s.l y *M. robertsii* sumergidos en agua

Para estudiar la producción de conidios a partir de microesclerocios o pellets de los aislamientos *M. anisopliae* s.l. CEP 087; *M. anisopliae* s.l CEP 423 y *M. robertsii* ARSEF 2575 se utilizaron recipientes de plástico (placas de cultivo con doce pocillos) con diámetro de 22,1 mm, profundidad de 17,5 mm, capacidad de 6,55 mL y área de 3,8

cm². Para esto, se adicionaron alícuotas de 100 µL de cada cultivo de microesclerocios o pellets en 5 mL de agua estéril, y se incubaron a 26 ± 1 °C con humedad relativa (RH) ≥ 80% durante diferentes periodos de tiempo (1, 5, 10 y 15 días) (Figura 9). En cada uno de estos días se recolectó el volumen total y se transfirió a tubos tipo Falcon (17x120 mm). Las muestras se homogeneizaron (vortex) y se cuantificaron con ayuda de hemocitómetro en un microscopio óptico (40× de aumento). La viabilidad de los conidios se evaluó a partir de suspensiones de 1 × 10⁶ conidios mL⁻¹ como se describió antes. Se realizaron tres pruebas (dos repeticiones cada una) en diferentes días.

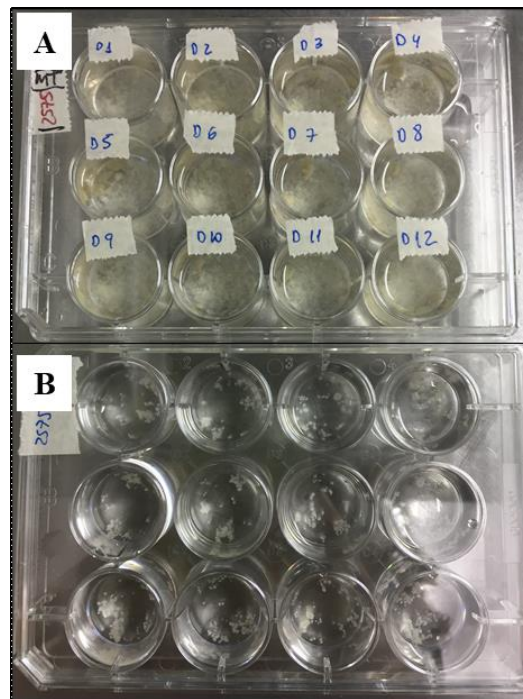


Figura 9: Placas de cultivo con microesclerocio (A) y pellets (B) de *M. robertsii*

Origen y cría del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Las larvas de *Ae. aegypti* se criaron en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, CONICET-UNLP) según Gerberg et al. (1994). La colonia de *Ae. aegypti* se estableció en condiciones de laboratorio (temperatura constante de 27 ± 1 °C,

humedad relativa de 75% y fotoperiodo de 12 h) a partir de mosquitos adultos que fueron recolectados en la ciudad de La Plata, Argentina, en el año 1996. Las hembras adultas se utilizaron a los 5-7 días post eclosión, en el estado previtelogénico, y se alimentaron dos veces por semana con sangre de pollo, mientras que machos y hembras se alimentaron con pasas de uva. Las larvas se mantuvieron con alimento para conejos (La Tahona, Cerealera Azul, Argentina) previamente triturado y molido (Gerberg et al. 1994; Muniz et al. 2018).

Bioensayos de patogenicidad y virulencia de microesclerocios o pellets de *Metarhizium* spp. frente a larvas de *Aedes aegypti*

Para todos los bioensayos de supervivencia se utilizaron larvas de segundo (L2) o tercer estadio (L3) de *Ae. aegypti*, que se sumergieron en placas de cultivo con seis pocillos. Cada pocillo (diámetro de 34,6 mm, profundidad de 17,5 mm, capacidad de 16 mL y área de 9,4 cm²) contenía 15 mL de agua estéril. Se realizaron 3 tipos de bioensayos de patogenicidad y virulencia con larvas de *Ae. aegypti*, como control de los bioensayos se colocaron las larvas en placas similares a las mencionadas anteriormente, sin propágulo fúngico. En cada pocillo se colocaron 10 larvas de *Ae. aegypti*. Para todos los bioensayos se obtuvieron 3 réplicas biológicas, cada una conteniendo 2 réplica técnica.

1) Para estudiar la importancia de la esporulación (conidiogénesis) desde los microesclerocios previo al contacto con los insectos, se realizaron bioensayos iniciales de patogenicidad utilizando microesclerocios con o sin conidiogénesis previa. Para esto, se inocularon 100 µL del cultivo de *M. robertsii* ARSEF 2575 durante 5 días a 26 ± 1 °C para permitir la esporulación de los conidios desde los propágulos. Pasado este período se incorporaron a los pocillos las larvas L2 o L3. Por otro lado, otro lote de

larvas fue incorporado a pocillos conteniendo microesclerocios sin incubarlos previamente durante 5 días a 26 ± 1 °C. En ambos casos, la mortalidad se registró diariamente durante dos semanas.

2) Para el estudio inicial de la patogenicidad de microesclerocios o pellets de diferentes aislamientos de *Metarhizium* spp. frente a larvas de *A. aegypti*, se inocularon 100 μ L del medio de cultivo (conteniendo el caldo y los propágulos) de los aislamientos *M. anisopliae* s.l. CEP 087; *M. anisopliae* s.l CEP 423 y *M. robertsii* ARSEF 2575. En base a los resultados obtenidos en el punto 1), las placas se incubaron durante 5 días a 26 ± 1 °C para permitir la producción de conidios a partir de los propágulos (Figura 10). Pasado este período se incorporaron a los pocillos las larvas L2 o L3 utilizando pipetas Pasteur. La mortalidad se registró diariamente durante dos semanas.

3) Para estudiar el efecto de la concentración de microesclerocios en la patogenicidad y virulencia frente a larvas de *A. aegypti*, se inocularon 500 y 1000 propágulos de los aislamientos *M. robertsii* ARSEF 2575 y *M. anisopliae* s.l CEP 423. Para el lavado de los microesclerocios, alícuotas de cultivo (50 mL) se recogieron en tubos tipo Falcon y se centrifugaron durante 3 min a 7500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento de centrifugación con agua estéril. El sobrenadante se descartó nuevamente y el proceso se repitió tres veces. Luego, se resuspendió con agua esteril. Una alícuota de 1 mL fue suspendida en 9 mL de agua destilada y entonces se determinó la cantidad de propágulos en 100 μ L. La concentración de propágulos se determinó con ayuda de, porta, cubre y un microscopio óptico (Primo Star, Zeiss®) (aumento 10 \times) (Jackson y Jaronski, 2009). Las placas se incubaron durante 5 días a 26 ± 1 °C para permitir la esporulación de conidios desde los propágulos. Pasado este período se incorporaron a los pocillos las larvas L2 o L3 y la mortalidad se registró diariamente durante dos semanas.

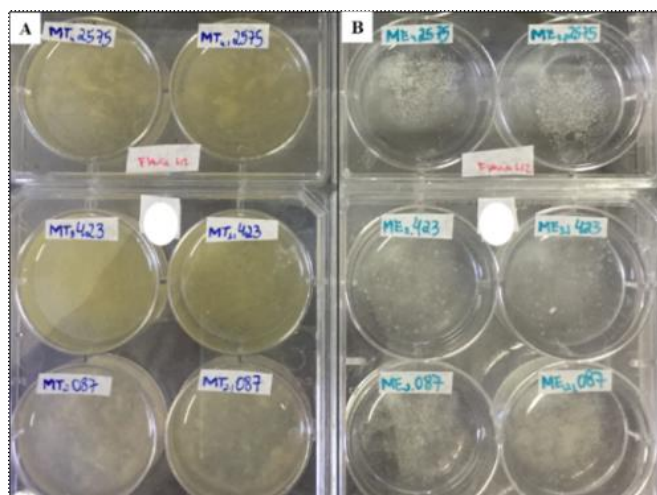


Figura 10: Placas conteniendo cultivos líquidos de microesclerocios (A) y pellets (B) de *Metarhizium spp.*

Diseño de los primers

Para el diseño de los primers específicos se utilizó el programa Gene Runner, a partir de las secuencias de ADN complementario (ADNc) obtenidas en la base de secuencias obtenidas del NCBI. La especificidad y concentración óptima de primers fue evaluada por qPCR mediante curvas de calibración. Para la curva de calibración se utilizó un pool de ADNc formado por alícuotas de cada muestra (microesclerocios de 24, 48, 72 y 96 h de cultivo para el experimento A y larvas infectadas a los días 3, 6 y 9 para el experimento B, ver detalle más abajo). Para cada caso se realizaron diluciones seriadas 1/5 del pool de muestras, utilizando como molde de PCR las diluciones 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 y 1/3.125.

Tabla 3: Oligonucleótidos usados para amplificar genes de *Metarhizium robertsii* (potencialmente implicados en procesos de estrés oxidativo, biogénesis de peroxisomas, hidrofobicidad y biosíntesis de pigmentos). * Gen de referencia (Housekeeping)

Gene (nombre usado)	Secuencia /Forward (5'-3')	Secuencia/ Reverse (5'-3')
---------------------	----------------------------	----------------------------

Peroxina 5 (<i>Mrpex5</i>)	TTTGTCCGGGCTCGCTACAATC	ATTTTCGTGCGCCTTGCTTCG
Peroxina 7 (<i>Mrpex7</i>)	CCTGGCTTGGTCGGAAATCAAC	TGTTTCGCGCTTGTGTTCGTG
Peroxina 14/17 (<i>Mrpex14/17</i>)	AGGTCCAAAGGCATCAGCGAAGT	GAGCGTTGCCGAGTTGTGC
Peroxina 19 (<i>Mrpex19</i>)	ATGCCGCTCCCAAGGAATCC	TCAAAGTCTGCTGCATTTCCG
Glutación peroxidasa (<i>Mrpox</i>)	GGGCAAAGTCGTCTCATCGTC	TGGCCGCCAAACTGGTTACAG
Hidrofobina (<i>MrqSSqa</i>)	GTGTATTGCTGCAACAAAG	AGACCATTTTGCTGGACATTG
Superoxido dismutasa 1 (<i>Mrsod1</i>)	CCAATGGCTGCACTTCTGCTGG	TGTGAGGGCCGATGAGCTTGAC
Superoxido dismutasa 2 (<i>Mrsod2</i>)	CCAGCATCTCGGCGCAAATC	CCAGCATCTCGGCGCAAATC
Catalasa A (<i>MrcatA</i>)	GTCGGCGCACAACAACCTTCTG	CCAGTCGAACTTGACGACGTGC
Catalasa B (<i>MrcatB</i>)	ACAGGATCAGCCACGACATCGC	TCCTTGAGAGCGTTTCGCCTGAG
Catalasa P (<i>MrcatP</i>)	TGCCCAATGGAGCCACAACCTTC	GCAAAGGCATCGGCGAACTG
Policétido sintasa 1 (<i>Mrpks1</i>)	CATTCCGCCTCTCTCATTGCC	TGTGCGGCGCATGATATGG
Policétido sintasa 2 (<i>Mrpks2</i>)	CATCAGCGCCATCGGTTTAGAC	CGGGATAGGGATTGGTTTGTGG
Lacasa 1 (<i>Mrlac1</i>)	AGGGAGACCGCACAGGATTGTG	ACTGGCTCCAATCCGACACGAC
Lacasa 2 (<i>Mrlac2</i>)	TCCCTGGGTCAACGAAAGCC	CGCCGCGATAAAGTTCATGC
Lacasa 3 (<i>Mrlac3</i>)	TCGGCTCAAGTGTCGTGTCCAC	CCGATCCTGTTGCCCAAACG
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>Mrgapdh</i>)*	GACTGCCCGCATTGAGAAG	AGATGGAGGAGTTGGTGTG

Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas como molde, para evaluar la potencial formación de dímeros de primers. Se evaluaron los parámetros de linealidad de las rectas obtenidas para cada gen y a partir de éstas se obtuvo la eficiencia de PCR para cada par de primer de los genes estudiados (Tablas 3-4). En todos los casos las eficiencias de PCR resultaron en el rango aceptable por bibliografía para la cuantificación de la expresión génica (Pfaffl, 2001).

Tabla 4: Oligonucleótidos usados para amplificar genes de *Aedes aegypti* infectados con *Metarhizium robertsii*

Gene (nombre usado)	Secuencia / Forward (3'-5')	Secuencia / Reverse (5'-3')
Defensina A (<i>AeDa1</i>)	TCGGCGTTGGTGATAGTCTTG	TTGTTCAATTCGGGCAGACGC

Defensina B (<i>AeDb1</i>)	CGATGAACTGCCGGAGGAAACC	CCACGGGCAATGCAATGAGC
Defensina C (<i>AeDc2</i>)	CCCTCATCGTCGTTTGCTTCG	AGTTGGCGTAAGGGCGAACATC
Cecropina N (<i>AeCecn</i>)	TGCGCTCCGTCGATCAAGTTC	TTCTTGCCGAATTTCCACCTGG
Actina (<i>AeAct</i>)*	ACCTTCAACTCGCCAGCCATG	AGATTGGGACGGTGTGGGAGAC

*Gene de referencia (housekeeping)

Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Se analizó la expresión relativa de genes en dos experimentos diferentes:

A) Microsclerocios de *M. robertsii*

B) Larvas de *A. aegypti* expuestas a microsclerocios de *M. robertsii*

A) Microsclerocios de *M. robertsii*: Se analizó el patrón de expresión de genes potencialmente relacionados con el estrés oxidativo, la biogénesis de peroxisomas, la hidrofobicidad y la biosíntesis de pigmentos, durante la formación de microsclerocios a partir de conidios. Para esto, se tomaron muestras de cultivo de microsclerocios a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la inoculación del medio de cultivo con conidios. Cada una de estas alícuotas se utilizó para la extracción de ARN, la síntesis de ADNc y el análisis mediante RT-qPCR, como se describe en detalle a continuación. Cada alícuota de cultivo (10 mL) se recogió en tubos tipo Falcon (17 x 120 mm) y se centrifugó durante 3 min a 7500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento de centrifugación con agua estéril. El sobrenadante se descartó nuevamente y el proceso se repitió tres veces. Luego, los hongos se transfirieron a sobres de papel aluminio de 5 cm² y se congeló con nitrógeno líquido y se dejó guardada en ultrafreezer (-70°C) hasta su utilización. Este procedimiento se realizó cada 24 horas desde el día 1 hasta el día 4. A todas las muestras se le extrajo el ARN total homogenizando las células con mortero/pilón y nitrógeno líquido. Se transfirieron inmediatamente 100 mg

de cada muestra homogeneizada a tubos de microcentrífuga de 2 mL que contenían 1 mL de Trizol (Invitrogen™, EEUU) para la posterior extracción de ARN.

B) Larvas de *A. aegypti* expuestas a microesclerocios de *M. robertsii*: Para analizar la expresión génica de genes de *A. aegypti* potencialmente involucrados en la respuesta inmune ante la infección fúngica (Tabla 8), se tomaron larvas vivas del bioensayo de patogenicidad y virulencia descritos con anterioridad a los 3, 6 y 9 días para la extracción del ARN total (larva + hongo). Para esto, se recogieron 15 larvas para cada uno de los días fijados (3, 6 y 9), se lavaron 3 veces con solución de Tween 80® 0,05% estéril, se secaron en papel absorbente y se transfirieron inmediatamente a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL que contenían 1 mL Trizol (Invitrogen™, EEUU). Para el grupo control se aplicaron las mismas condiciones en ausencia de hongo (larvas no infectadas).

Para ambos experimentos (A y B), las muestras se homogeneizaron durante 10 segundos con un homogeneizador de alta velocidad (Homogenizer, High speed 4000 rpm, Variable Speed-Reversible – Glas-Col®) mediante la técnica de Trizol. El reactivo Trizol® es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes, que se usa para aislar ARN total de alta calidad (así como ADN y proteínas). Este reactivo mantiene la integridad del ARN debido a la inhibición altamente efectiva de la actividad de la ARNasa, este disuelve los componentes celulares durante la homogeneización de la muestra. Luego, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (Biofuge 15R Heraeus®). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga 1,5 mL y permaneció durante 5 minutos a 25 °C o temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Luego se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitaron las muestras en vortex (TKS3 TechnoKartell®) por 15 segundos y se dejaron

por 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Esta centrifugación permite que la mezcla se separe en una fase inferior (fase fenol-cloroformo), una interfase y una fase incolora en la porción superior del tubo (fase acuosa). El volumen de la fase acuosa es cerca del 70 % del volumen Trizol utilizado en la homogenización. Para la precipitación del ARN se transfirieron 300 µL de la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga 1,5 mL, se agregaron 300 µL de isopropanol que se mezcló con la muestra con el auxilio de pipeteo para permitir la precipitación del ARN de la fase acuosa. Luego se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y pasado el tiempo se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El ARN total precipita en forma de pellet blanco y los sobrenadantes se descartan. Para el lavado del ARN se agregó 1mL de etanol 70 % frío, se agitaron las muestras por 10 segundos en vortex y luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Este paso de lavado se repitió una vez más. El sobrenadante se descartó y los pellets de ARN se secaron por 5-10 minutos a 37 °C. Para la resuspensión del ARN se adicionaron 20-50 µL de agua RNase-free y se homogenizó por pipeteo. El ARN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop* 2000c (Thermo, EEUU). Se registraron además los valores de los cocientes 260/280 y 230/260 para evaluar la presencia de contaminantes (proteínas y solventes, respectivamente). Se consideraron como adecuados los cocientes: $260/280 > 1,8$ y $260/230 > 2,0$. Para determinar la integridad del ARN y la presencia o no de contaminación con ácido desoxirribonucleico genómico (ADNg), se corrió 1 µg de cada muestra en un gel de agarosa 1% (p/v) en buffer TBE (Tris 0,05 M; Ácido Bórico 0,05 M; EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM), durante 20 minutos a 100 Voltios en una cuba electroforética horizontal especialmente reservada para trabajar con ARN. El buffer TBE utilizado tanto para preparar el gel como para usar de soporte del mismo

dentro de la cuba electroforética fue preparado con agua MiliQ estéril. Para la visualización de las bandas, el gel se expuso bajo luz UV con el agregado del agente intercalante bromuro de etidio y se observó en un transiluminador Hoefer Macrovue UV- 20. Se tomaron fotos con una cámara Kodak DC 210 Zoom Digital Camera y el software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, EEUU). Se evaluó la presencia de las típicas bandas 28S y 18S, y sólo se trabajó con las muestras cuya corrida electroforética resultó satisfactoria en este sentido. Se descartó cualquier muestra conteniendo ADN_g como contaminante. Para la obtención de ADN_c se utilizó el kit comercial iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 5). La retrotranscripción del ARN se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Thermo), con un ciclo consistente en las siguientes tres etapas: 5 minutos a 25 °C (unión de *random primers* al ARN), 20 minutos a 46 °C (síntesis de ADN_c) y 1 minuto a 95 °C (inactivación de la retrotranscriptasa).

Tabla 5: Reacción típica de 20µl de retrotranscripción

Volumen	Reactivo o muestra
4 µl	buffer de reacción 5X
1 µl	retrotranscriptasa
1 µg	ARN
	H ₂ O nucleasa free

Este ADN_c se utilizó como molde de la qPCR que se realizó en un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems, EEUU). Se utilizó el kit comercial iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, EEUU) que contiene todos los reactivos necesarios (dNTPs, una ADN

polimerasa hot start, buffer de reacción apropiado y el fluoróforo SYBR Green como agente intercalante) (Tabla 6).

Tabla 6: Protocolo para una reacción típica de qPCR (10 μ l volumen total)

Volumen	Reactivo o muestra
5 μ l	qPCR Supermix 2X
0,5 μ l	Forward Primers 10 μ M
0,5 μ l	Reverse Primers 10 μ M
4 μ l	ADNc diluído 1/5

El cDNA obtenido se diluyó 5 veces antes de ser utilizado como molde de la reacción para ser amplificado por los *primers* Forward y Reverse en concentración final 300 mM (Tabla 6). El protocolo de ciclado y de lectura de fluorescencia se divide en tres segmentos: 1°: se produce la activación de la ADN polimerasa hot start y la desnaturalización del molde. 2°: constituye la reacción de amplificación. 3°: corresponde a la curva de disociación de los productos formados. La calidad de las curvas de disociación obtenidas fue evaluada después de cada corrida y, en caso de no haber sido satisfactorias (presencia de más de un pico de disociación, dímeros de primers, etc.), esos resultados no se consideraron. Luego del ciclado, el equipo devuelve el valor del Ct para cada muestra. Este valor corresponde al ciclo en el cual la fluorescencia de un pocillo dado se despega de la línea de base (ruido de fondo), iniciando la fase exponencial de la curva de reacción de PCR, es decir, el valor de Ct es el ciclo en el cual la fluorescencia cruza la línea umbral establecida. Para determinar la expresión relativa de los genes de interés se utilizó el método de cuantificación relativa, utilizando un gen de referencia o housekeeping (Huarte-Bonnet et al. 2018; Pereira-

Junior et al. 2018). Para realizar los cálculos se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$, con la siguiente ecuación:

$$ER = \frac{E_T^{\Delta C_t T(\text{control-tratado})}}{E_R^{\Delta C_t R(\text{control-tratado})}}$$

donde ER es la expresión relativa, E es la eficiencia de los la PCR (como se detalla más abajo), ΔC_t es la diferencia de Ct entre el control y el tratamiento, T es el gen de interés, R es el gen de referencia. Para el caso (A) la muestra control consistió en microesclerocios a las 24 hs de cultivo y las muestras correspondientes al tratamiento fueron microesclerocios de 48, 72 y 96 horas. Para el caso (B) la muestra control consistió en larvas sin exposición al hongo del día 3, 6 y 9; ya que las muestras correspondientes al tratamiento fueron expuestas a microesclerocios por el período de 3, 6 y 9 días, respectivamente. Para cada caso se realizaron tres réplicas biológicas con dos repeticiones técnicas para cada una.

Análisis estadístico

Para los análisis realizados en la sección 1 se utilizó el software estadístico R v.3.6.1 (R Core Team, 2018). Los datos del nivel de expresión génica se ajustaron a un modelo lineal mixto con distribución normal y efectos fijos atribuidos a la clase de genes, el tiempo de evaluación y su término de interacción, y el efecto aleatorio se atribuyó a la replicación para tener en cuenta las medidas repetidas a lo largo del tiempo. Como la interacción fue significativa, se compararon las medias de los niveles de expresión génica para cada intervalo de tiempo y también entre los intervalos de tiempo para cada clase de genes. Los datos de recuento sobre los rendimientos de propágulos (microesclerocios y pellets) se ajustaron a un modelo lineal generalizado (GLM) con

distribución binomial negativa con función de enlace logarítmico, mientras que los datos de producción de biomasa se ajustaron a un modelo lineal (LM) con distribución normal, ambos modelos incluyen un efecto fijo para el "tipo de propágulo" en el predictor lineal. De manera similar, LM con distribución normal se ajustó al tamaño del propágulo. Con respecto al ensayo de tolerancia a UV-B, los datos de producción de conidios transformados con \log_{10} se ajustaron a un LM con distribución normal. Para la tolerancia al calor, la producción de conidios se ajustó a un GLM con distribución quasi-Poisson y función de enlace logarítmico. Los efectos fijos en ambos modelos se atribuyeron al "tipo de propágulo", al "tiempo de exposición" y su término de interacción en el predictor lineal. Además, se realizaron análisis de varianza (pruebas de tipo II) y análisis de desviación (pruebas de tipo II) para evaluar la importancia de los factores fijos en estos modelos, respectivamente. Las comparaciones de medias por pares de dos muestras (microesclerocios frente a pellets) se realizaron mediante estimaciones de contraste con la prueba de *t*-Student, mientras que las comparaciones de medias por pares múltiples se realizaron con la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, todas con una significancia del 5%. En estos análisis se emplearon paquetes "emmeans" (Lenth, 2020), "mass" (Venables y Ripley, 2002) y "ggplot2" (Wickham, 2016). Para la sección 2 se utilizó el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., EEUU) y Statistica Release 7 (StatSoft, US). La significancia en las diferencias entre medias se evaluó mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el post-test Student Newman Keuls (SNK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sección I: Tolerancia a los factores abióticos de microesclerocios y pellets de *Metarhizium robertsii*, cambios moleculares y ultraestructurales durante la diferenciación de microesclerocios

Caracterización de microesclerocios y pellets de *M. robertsii* ARSEF 2575.

En el aislamiento de *M. robertsii* (ARSEF 2575) utilizado como modelo se observó la producción de microesclerocios o pellets en medios de cultivos líquidos y el desarrollo progresivo de ambos propágulos en las observaciones realizadas desde las 24 hs hasta las 96 hs (Figura 11).

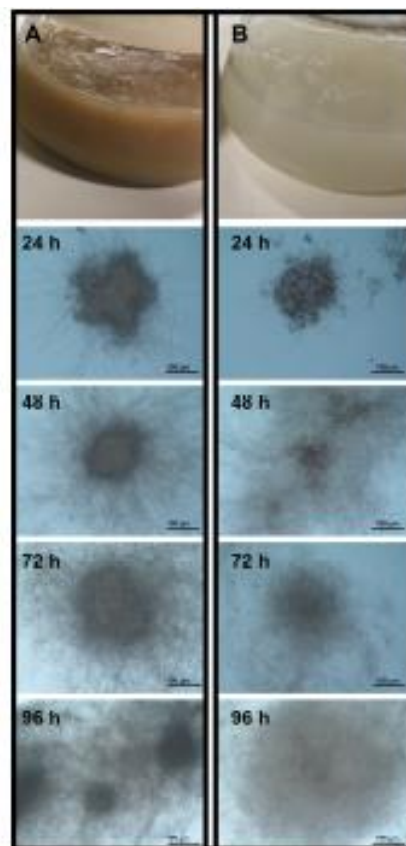


Figura 11: Formación de propágulos de microesclerocios (A) y pellets (B) de *M. robertsii* (ARSEF 2575) durante fermentación líquida. Las fotos fueron tomadas a las 24 hs, 48 hs, 72 hs y 96 hs de cultivo con un aumento de 100x.

El valor de pH inicial en ambos medio de cultivo fue de 5,0 y varió entre 4,0 y 4,5 durante el periodo de fermentación. Luego de 96 hs de cultivo, ambos propágulos mostraron rendimientos significativamente diferentes (microesclerocios = 700 propágulos mL⁻¹, pellets = 90 propágulos mL⁻¹) [$\chi^2 = 83,64$; grados de libertad (df) = 1, 14; $p < 0.05$], así como también de producción de biomasa (microesclerocios = 0.053 g mL⁻¹, $p = 0.015$ g mL⁻¹) ($F = 362.2$; df = 1, 14; $p < 0.05$) (Figura 12).

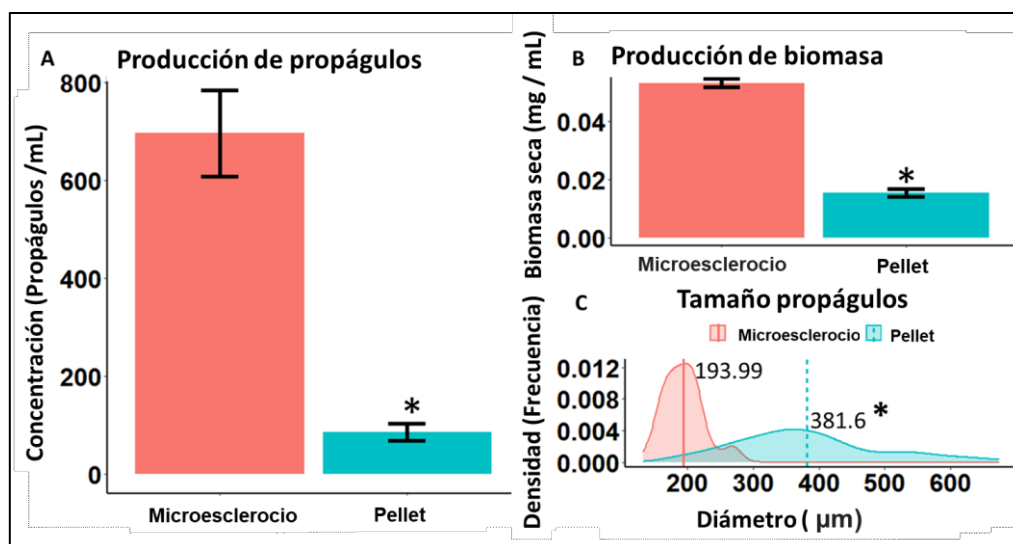


Figura 12: Rendimiento (A), biomasa (B) y tamaño de los propágulos (C) de microesclerocios y pellets obtenidos de cultivos líquidos de *M. robertsii* (ARSEF 2575) luego 96 hs de cultivo. * $p < 0,05$.

A diferencia de los pellets, los microesclerocios se mostraron como agregados de hifas más compactas con formación de una médula central de hifas de paredes delgadas. Los conidios germinados se diferenciaron en microesclerocios entre 6 y 18 hs después de la inoculación, formando agregados hifales visibles a las 24 hs y microesclerocios compactos y maduros a las 96 hs, con una pigmentación más oscura típica de éstos gránulos miceliales (Figura 11). Las imágenes de 96 hs de crecimiento mostraron que los pellets son de mayor tamaño (263 - 485 µm) que los microesclerocios (174 - 226

μm); sin embargo, estos últimos mostraron una densidad más alta con una curva de tamaño de distribución diferente ($F = 164,9$; $df = 1, 118$; $p < 0,0001$) (Figura 12).

Tolerancia a la radiación UV-B y al calor de microesclerocios y pellets de *M. robertsii* ARSEF 2575

Los propágulos expuestos a la radiación UV-B ($1.283,38 \text{ mW m}^{-2}$) mostraron una disminución en la producción de conidios de una manera dependiente del tiempo; sin embargo, tanto los microesclerocios como los pellets resultaron más tolerantes a la exposición al calor ($45 \text{ }^\circ\text{C}$). Comparando ambos tipos de propágulos, se observó que la producción de conidios a partir de microesclerocios fue mayor que a partir de pellets, incluso sin tratamiento con radiación UV-B o calor en todos los tiempos de exposición ensayados, excepto a las 5 hs de exposición ($F = 12,4$; $df = 6, 70$; $p < 0,0001$; y $F = 3,2$; $df = 6, 70$; $p = 0,007$, respectivamente) (Figura 13). El efecto de la radiación UV-B y el calor sobre la conidiogénesis a partir de los microesclerocios fue evidente y se observó en una reducción significativa de la producción de conidios después de exposiciones de 2 y 4 hs, respectivamente, en relación con su producción inicial a partir de microesclerocios no expuestos (Figura 13). Respecto a los controles, la susceptibilidad de los pellets se fue más alta que la de los microesclerocios después de la exposición a radiación UV-B ($F = 52,8$; $df = 1, 70$; $p < 0,0001$) y estrés por calor ($F = 74,7$; $df = 1, 70$; $p < 0,0001$). La viabilidad media de los conidios producidos a partir de microesclerocios o pellets sometidos a estrés por radiación UV-B o calor se mostró superior al 97% en cada prueba, independientemente del tiempo de exposición.

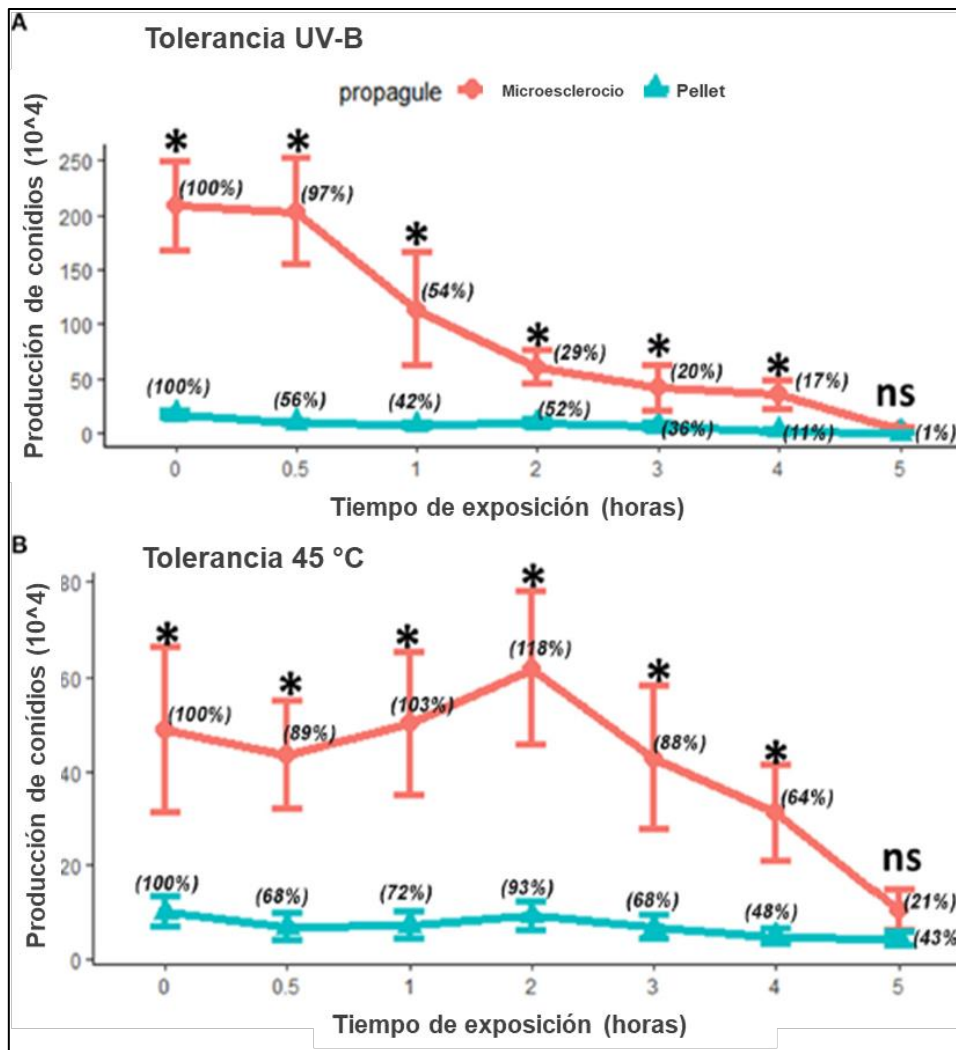


Figura 13: (A) Tolerancia de microsclerocios y pellets de *M. robertsii* (ARSEF 2575) a la radiación UV-B artificial [1.283,38 mW m⁻² de irradiancia ponderada en Quaité (Quaité et al., 1992) para 0 (control), 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 hs, que correspondieron a las dosis de 0 (control), 2,31, 4,62, 9,24, 13,86, 18,48 y 23,10 kJ m⁻², respectivamente]. (B) Tolerancia de microsclerocios y pellets de *M. robertsii* (ARSEF 2575) al calor (45 °C). Los valores indican la media y el error estándar. Los valores porcentuales relativos para cada tipo de propágulo se muestran entre paréntesis. En cada tiempo de exposición, las diferencias significativas entre propágulos se muestran con un asterisco ($p < 0.05$). ns = no significativo.

Análisis ultraestructurales durante la diferenciación de los microsclerocios

En las imágenes de TEM durante la diferenciación celular se revelaron diferencias en la pared celular entre los conidios y los microsclerocios (Figura 14).

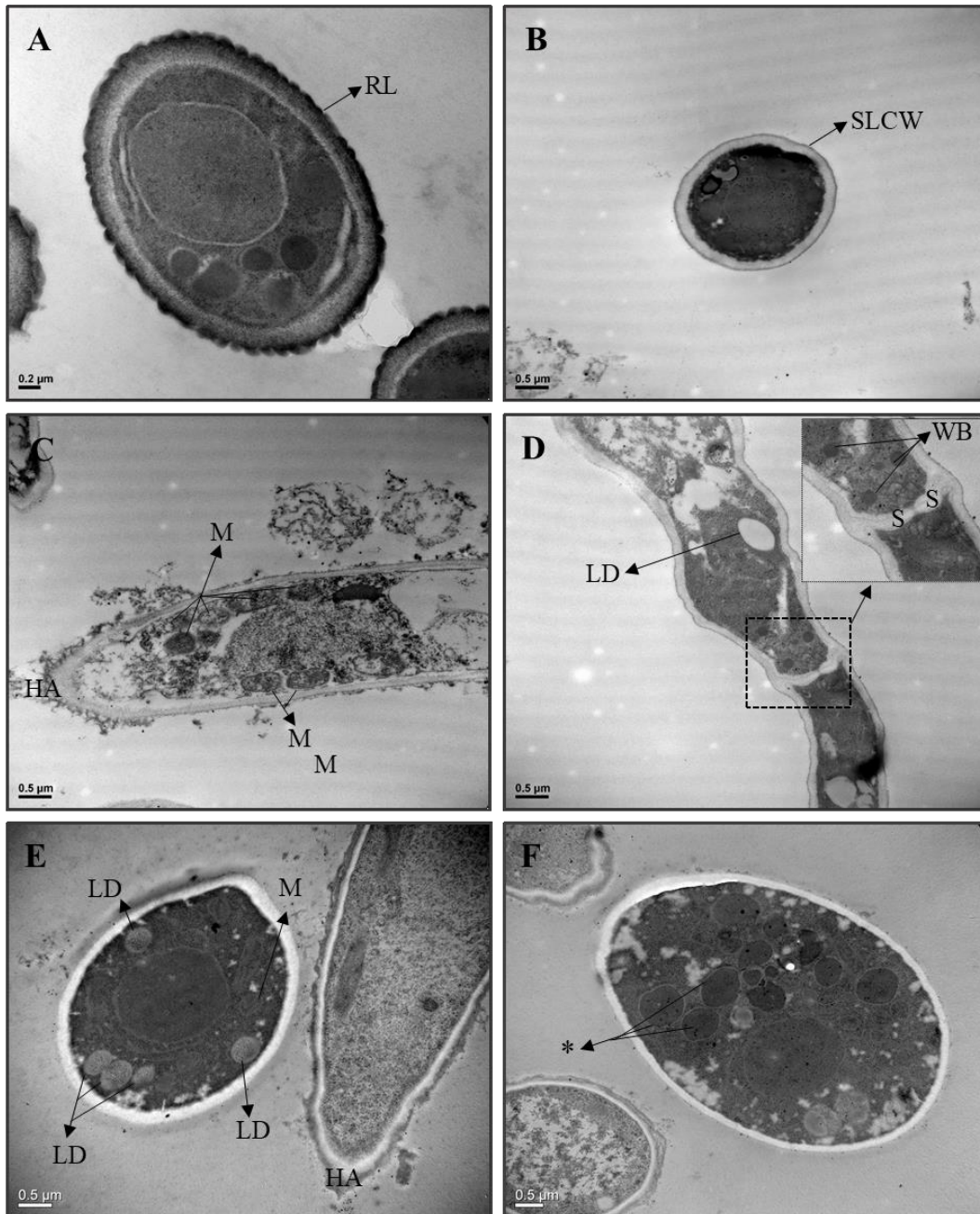


Figura 14: Imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de conidios (A) y de microesclerocios de 48 horas (B – D) y de 96 horas (E – F) de *M. robertsii* (ARSEF 2575) teñidos con DAB y visualizados a 30.000×. La sección transversal de ambos propágulos mostró diferencias en la morfología de la pared celular y la ultraestructura. Debido a la reacción DAB, los microesclerocios exhibieron tanto puntos como áreas negras dentro de las células, en el ápice de las hifas y en las interconexiones celulares. Varias mitocondrias, peroxisomas y cuerpos de Woronin fueron visibles y se tiñeron fuertemente en los microesclerocios pero no en conidios. RL capa de varillas; SLCW pared celular de una sola capa; HA ápice de la hifa; M mitocondria; LD gotas de lípidos; WB cuerpo de Woronin; S, septos; * vesículas no identificadas.

Las organelas y estructuras observadas en microesclerocios consisten en mitocondrias, gotas de lípidos y grupos de peroxisomas ubicados junto a los septos de hifas, lo que sugiere su clasificación específica como cuerpos de Woronin, un micro cuerpo de núcleo denso derivado de peroxisomas con una unidad de membrana, que se encuentra cerca de los septos que dividen los compartimentos de hifas en ascomiceto filamentosos. Se detectó actividad peroxidasa (visualizada por reacción de DAB con H_2O_2 dentro de las células y también en el ápice de las hifas) en microesclerocios luego 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, pero no en los conidios (Figura 15).

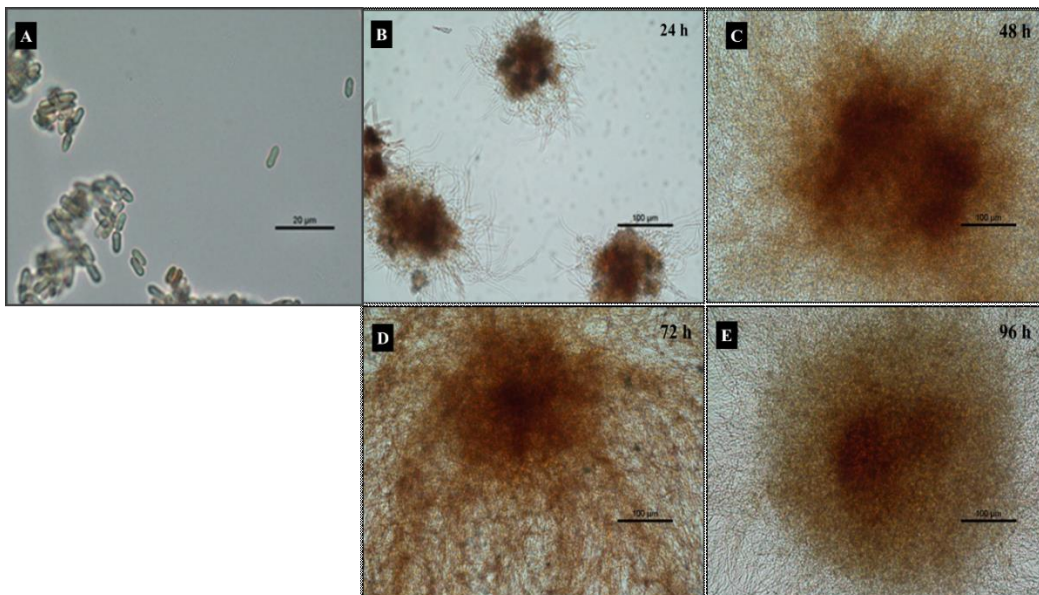


Figura 15: Conidios (A) y microesclerocios de *M. robertsii* (ARSEF 2575) a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo (B; C; D; E, respectivamente) formados a partir de los conidios mostrados en (A). Las muestras se tiñeron con DAB y se observaron mediante microscopio óptico con un aumento de 20× (microesclerocios) y 100× (conidios).

Análisis de expresión génica durante la diferenciación de los microesclerocios

Se analizó la expresión de 16 genes potencialmente implicados en la formación de microesclerocios (Figura 16). Basado en estudios previos (Huarte-Bonnet et al. 2018,

2019, 2020; Pereira-Junior et al. 2018), los genes seleccionados fueron los asociados con el estrés oxidativo (*MrcatA*, *MrcatB*, *MrcatP*, *Mrsod1*, *Mrsod2*, *Mrgpx*), biogénesis de peroxisomas (*Mrpex5*, *Mrpex7*, *Mrpex14 / 17*, *Mrpex19*), pigmentación (*Mrpks1*, *Mrpks2*, *Mrlac1*, *Mrlac2*, *Mrlac3*) y formación de capa externa de varillas de hidrofobinas (*MrssgA*). Para cada gen, la expresión se midió a las 48, 72 y 96 hs posteriores al inicio de la fermentación y se normalizó con valores medidos a las 24 hs (control).

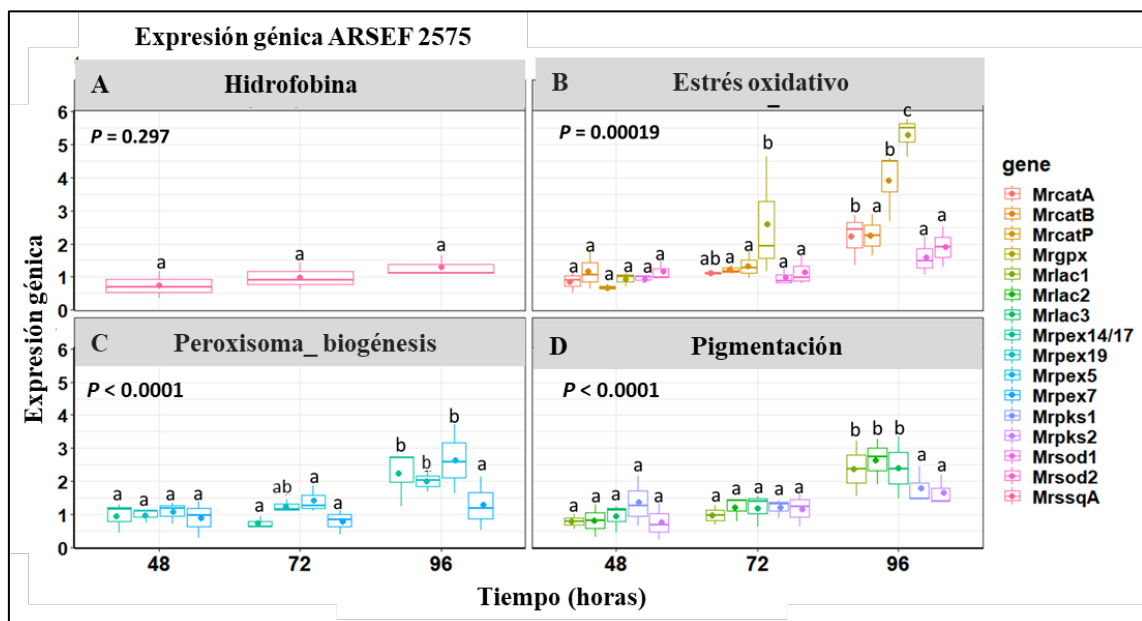


Figura 16: Expresión relativa de genes implicados: hidrofobina (A), estrés oxidativo (B), biogénesis de peroxisomas (C), pigmentación (D) durante el desarrollo de microesclerocios *M. robertsii* (ARSEF 2575). Las cajas contienen entre el 25% y el 75% de los valores; la línea dentro de las cajas representa la mediana (50%) de la distribución de todos los valores, y las barras verticales representan el rango. Los valores medios se indican mediante puntos dentro de cada diagrama de caja. Se hicieron comparaciones de medias entre intervalos de tiempo dentro de cada clase de genes, y letras diferentes resaltan diferencias significativas en los niveles de expresión entre genes. Nivel de significancia utilizado: $\alpha = 0,05$ según la prueba de Tukey HSD.

Para la familia de las catalasas (CAT), la expresión de *MrcatA* y *MrcatP* a las 96 hs después de la inoculación fué significativamente mayor (aumento de su expresión en 2,2 y 3,9 veces, respectivamente) que las encontradas a las 48 y 72 hs. El gen más

expresado a las 96 h fue *Mrgpx* (mostrando una inducción de 5,3 veces), significativamente más alto ($p < 0,01$) que el punto anterior a las 72 hs (inducción de 2,6 veces) (Figura 16). No se observó inducción a lo largo del tiempo para la familia de las superóxido dismutasas (SOD). Dentro de la familia de las peroxinas, se observaron inducidos los genes *Mrpex14 / 17* (1,5 veces) y *Mrpex5* (2,6 veces) a las 96 hs, lo mismo que para los genes asociados a la pigmentación *Mrlac1* (inducción de 2,4 veces), *Mrlac2* (2,6 veces inducción) y *Mrlac3* (inducción de 2,4 veces) ($p < 0,001$).

Discusión

Las condiciones nutricionales presentes en la fermentación de hongos filamentosos influyen fuertemente en el crecimiento y la morfología de los propágulos en crecimiento (Cox y Thomas, 1992), así como el pH y la tasa de aireación (Nair et al. 2016; Veiter et al. 2018). Las condiciones de fermentación que se utilizaron en este estudio fueron favorables para la producción de microesclerocios y pellets de *M. robertsii* ARSEF 2575. El desarrollo de microesclerocios se inició con la agregación de hifas a las 18 horas de la inoculación, mostrando estructuras compactas a las 24 horas, y propágulos de microesclerocios pigmentados y maduros a las 96 horas. Este proceso concuerda con la definición de microesclerocios de hongos entomopatógenos, que consiste en la formación de hifas compactas y pigmentadas oscuras (Jaronski y Jackson, 2008; Jackson y Jaronski, 2009; Behle et al. 2013; Mascarín et al. 2014; Goble et al. 2016; Song et al. 2016a, b; Xin et al. 2020). La formación de pellets se logró en un medio de cultivo líquido considerado pobre por su composición, desprovisto de sales, pero constituido por tres elementos que proporcionaron la fuente de carbono y nitrógeno requerida para su desarrollo (Mapari et al. 2008).

Algunos parámetros, como el pH, nivel de oxígeno, temperatura y velocidad de agitación, son muy importantes para el crecimiento y maduración de pellets (Zhang y Zhang, 2016). Se conoce que el pH del medio de cultivo utilizado durante la producción de microesclerocios en especies de *Metarhizium* inicialmente es ácido (pH 5,5) (Jackson y Jaronski, 2009; Behle et al. 2013; Song et al. 2015, 2017). En este trabajo se evidencia que el pH descendió a 4.0 durante el desarrollo de la microesclerocios (al igual que durante la formación de pellets) lo que concuerda con los resultados de *Metarhizium* (anteriormente *Nomuraea*) *rileyi* (Song et al. 2015). El pH es también el factor impulsor de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la morfología de agregación y formación de pellets (Zhang y Zhang, 2016; Veiter et al. 2018). La composición del medio se mostró determinante para la formación de pellets con mayor diámetro que los microesclerocios; sin embargo, incluso a la misma velocidad de agitación y condiciones de temperatura, se encontró una mayor acumulación de biomasa y concentración de propágulos para los microesclerocios que para los pellets. Este resultado concuerda con los estudios previos en *M. anisopliae*, donde los cultivos líquidos utilizando medios ricos en carbono acumulan mayor cantidad de biomasa y producen un mayor número de microesclerocios (Jackson y Jaronski, 2009), mientras que los medios de fermentación con concentraciones de nitrógeno más altas también resultan en una mayor acumulación de biomasa y mayores rendimientos de microesclerocios que los cultivados en medios deficientes en nitrógeno (Behle y Jackson, 2014). Las condiciones de crecimiento nutricionales y ambientales juegan un papel esencial en el desarrollo de los hongos al proporcionar una fuente de energía y cofactores para las reacciones bioquímicas, y estos factores también ejercen un impacto notable en la formación y los atributos de calidad de una variedad de propágulos empleados para diferentes propósitos en el control de plagas (Jaronski y Mascarín, 2016). En este trabajo se observó que el

medio de cultivo remanente luego de la producción de pellets era menos viscoso que el correspondiente a la producción de microesclerocios. Para aislamientos de *Metarhizium spp.*, se observó una reducción de la viscosidad del cultivo durante la formación de microesclerocios debido al rápido agotamiento de los nutrientes (Mascarin et al. 2014). La menor viscosidad también se asocia con un mayor suministro de oxígeno en cultivos líquidos sumergidos de hongos, lo que puede mejorar el crecimiento de hongos y los rendimientos de propágulos específicos, como se describió anteriormente (Mascarin et al. 2015).

En estudios previos utilizando otros propágulos de hongos como blastosporos o conidios aéreos, se han abordado los efectos de los factores abióticos para evaluar la tolerancia y supervivencia de algunos hongos comúnmente utilizados en el control biológico (Braga et al. 2001, 2015; Paixão et al. 2017; Pereira-Junior et al. 2018; Bernardo et al. 2020). Los conidios de especies de *Metarhizium* expuestas a radiación UV-B (irradiancias entre 920 y 1200 mWm⁻²) resultaron tener afectada la germinación y supervivencia de una manera dependiente de la dosis y el tiempo (Braga et al. 2001). Los conidios del mismo aislado que se utilizó en este estudio (ARSEF 2575) expuestas a 866,7 mW m⁻² de irradiancia ponderada de Quaité mostraron un cierto grado de tolerancia a los rayos UV-B en relación con la dosis utilizada (3,9-6,2 kJ m⁻²) (Pereira-Junior et al. 2018). Tanto los conidios como los blastosporos de *M. robertsii* IP 146 fueron igualmente tolerantes a la radiación UV-B (irradiancia 743,7 mW m⁻²); sin embargo, la viabilidad relativa fue menor que en los conidios aéreos cuando se exponen a 45 °C (Bernardo et al. 2020). Recientemente, se reportó que la viabilidad de microesclerocios expuestos a la radiación UV-B (4.0 kJ m⁻²) varió mucho entre aislamientos de *Metarhizium spp.*, algunos aislamientos fueron susceptibles y otros bastante tolerantes (Corval et al. 2021). En este trabajo de tesis, se muestra por primera

vez la tolerancia comparativa entre microesclerocios y pellets de *M. robertsii* ARSEF 2575 a la radiación UV-B (1.283,38 mW m⁻²). Aunque los efectos de UV-B o la exposición al calor no inhibieron la producción de conidios (conidiogénesis) por microesclerocios o pellets después de la inoculación en medio de agar agua, los microesclerocios poseen la capacidad de resistir mejor ambas condiciones estresantes como lo demuestra su mayor producción de conidios comparado con los pellets. La producción de conidios se evaluó después de 10 días de incubación, dicho período de tiempo es necesario para promover la esporulación completa de microesclerocios y pellets bajo un microambiente altamente húmedo generado por el medio de agar agua utilizado como sustrato artificial.

Con respecto a los cambios ultraestructurales durante la diferenciación celular, mediante microscopía TEM se revelaron diferencias entre conidios y microesclerocios; específicamente, en la pared celular y en algunas estructuras intracelulares. En microesclerocios se visualizaron un mayor número de mitocondrias, gotas lipídicas, peroxisomas y cuerpo de Woronin, así como la actividad peroxidasa, comparado con los conidios. Los cuerpos de Woronin son organelas que se encuentran exclusivamente en el micelio de los hongos filamentosos, su función es sellar el poro septal en respuesta a una lesión, permitiendo que el resto del micelio continúe creciendo y conferir resistencia al estrés, entre otras funciones propuestas (Liu et al. 2008). Esta organela es, de hecho, un tipo especial de peroxisoma que se encuentra en la periferia celular o en asociación con el tabique (Jedd y Chua, 2000; Liu et al. 2011). Por lo tanto, se pueden encontrar dos tipos de peroxisomas en los hongos filamentosos; un tipo es inmóvil y participa en el sellado de los poros entre las células de las hifas, y el otro es móvil y se forma activamente en las hifas en crecimiento (Knoblach y Rachubinski, 2016). Ambos tipos están asociados con vías anabólicas y catabólicas, como el metabolismo de

peróxidos, la oxidación de ácidos grasos y la biosíntesis de fosfolípidos (Jedd y Chua, 2000). Recientemente, la proteína que forma cristales hexagonales dentro de los cuerpos de Woronin (HEX1) se caracterizó funcionalmente en el micelio de *M. robertsii*; *MrHex1* fue responsable de la formación de cuerpos de Woronin y participó en el sellado de los poros septales, pero inesperadamente, no parece tener ninguna función con respecto a la tolerancia al estrés y la virulencia (Tang et al. 2020). Este trabajo de tesis demuestra la presencia de peroxisomas en microesclerocios de *M. robertsii* (ARSEF 2575), así como una alta actividad peroxidasa dentro de las células y en las interconexiones celulares durante la formación de microesclerocios. La mayoría de los peroxisomas se encontraron cerca de los septos de las hifas, lo que sugiere que podrían ser cuerpos de Woronin, en concordancia con los estudios en pellets miceliales y pellets similares a microesclerocios del hongo *B. bassiana*, donde también se encontró aumentada la biogénesis de peroxisomas y la actividad de la peroxidasa durante su diferenciación a partir de conidios (Huarte-Bonnet et al. 2018, 2019).

Con respecto a la expresión de genes potencialmente implicados en la diferenciación de conidios a microesclerocios, en este estudio se reporta que *M. robertsii* induce genes *pex* (que codifican proteínas denominadas peroxinas, PEX) durante el proceso de diferenciación celular. En general, las PEX están asociadas con la biogénesis de peroxisomas, y la mayoría de ellas están implicados en el transporte de proteínas de la matriz desde el citosol al lumen del peroxisoma (Kiel et al. 2006; Opalinski et al. 2010; Pieuchot y Jedd, 2012). La caracterización de genes *pex* se realizó en otros hongos filamentosos como *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch 2002 (*MoPex7*, involucrado en numerosos procesos del hongo como la conidiogénesis, el metabolismo de ácidos grasos de cadena corta y la patogenicidad) (Goh et al. 2011) y *Fusarium graminearum* Schwabe 1839 (*FgPex4*, involucrado en la regulación del crecimiento de hifas,

reproducción sexual y asexual, virulencia, integridad de la pared celular y eliminación de especies reactivas de oxígeno (Zhang et al. 2019). La familia de genes *Pex14 / 17* (también conocida como *Pex33*) se ha identificado como un gen específico de hongos que codifica la peroxina asociada con la conidiogénesis y la biogénesis de peroxisomas y que codifica una proteína ubicada en la membrana peroxisomal (Managadze et al. 2010; Opalinski et al. 2010). Algunos ortólogos de *Pex14 / 17* también se han caracterizado en *M. oryzae*, asociados con la germinación de los conidios, el alargamiento del tubo germinal y la aparición inicial de apresorios y como proteína de membrana peroxisomal del receptor de acoplamiento (Li et al. 2017). En *B. bassiana*, se ha demostrado que *Bbpex14 / 17*, *Bbpex5*, *Bbpex7* y *Bbpex19* se inducen durante la formación de pellets similares a microesclerocios (Huarte-Bonnet et al. 2019). En este trabajo de tesis, los genes *Mrpex5* y *Mrpex14 / 17* fueron los únicos regulados positivamente a las 96 h post inoculación en medio líquido. En células eucariotas se ha informado que tanto *Pex5* como *Pex7* son receptores citosólicos cíclicos que reconocen las señales de dirección peroxisomal PTS1 y PTS2, respectivamente (Pieuchot y Jedd, 2012); en *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge 1927, el complejo de acoplamiento de la importación de proteínas de la matriz peroxisomal está compuesto por *PEX14 / 17* (*PEX33*) que interactúa consigo mismo y con el receptor PTS1-PEX5 (Managadze et al. 2010). Este resultado sugiere que ambos genes podrían expresarse y actuar juntos en esta función durante el desarrollo y envejecimiento de microesclerocios de *M. robertsii*. Este estudio también muestra un escenario de estrés oxidativo durante la diferenciación celular que ocurre en el proceso de formación de microesclerocios. Se ha informado la producción de especies reactivas de oxígeno durante la diferenciación celular en hongos y específicamente para la diferenciación de esclerocios (Georgiou et al. 2006). Los estudios sobre los procesos de agregación de hifas indican que están mediados por una

entrada reducida de oxígeno dentro de la célula debido a una relación superficie/volumen disminuida y, por lo tanto, podría ser un mecanismo de adaptación micelial de los hongos a un incremento de especies reactivas de oxígeno en el microambiente (Gessler et al. 2007). Las enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx actúan como la primera línea de defensa celular contra especies reactivas de oxígeno (Aguirre et al., 2005; Song et al. 2013; Liu et al. 2018; Huarte-Bonnet et al. 2019). En estructura y filogenia, los genes *sod* de *M. robertsii* son homólogos a los de *B. bassiana* y otros hongos filamentosos, pero algunos de ellos son funcionalmente distintos (Zhu et al. 2018). La expresión del gen *sod* se informó durante la diferenciación de pellets similares a microesclerocios de *B. bassiana* (Huarte-Bonnet et al. 2019) y el desarrollo de microsclerocios de *M. rileyi* (Song et al. 2013). Sin embargo, en el presente estudio se encontró que tanto *Mrsod1* (Cu^{2+} / Zn^{2+} SOD) como *Mrsod2* (Mn^{2+} SOD) no se inducen durante la formación de microesclerocios. Las CATs fúngicas se expresan durante la germinación y el crecimiento en respuesta al estrés oxidativo (Michán et al. 2002; Pedrini et al. 2006; Wang et al. 2013; Song et al. 2018; Huarte-Bonnet et al. 2019). En este estudio, se evaluó la expresión de dos genes codificantes para CAT citosólicas (*MrcatA* y *MrcatB*) y una CAT peroxisomal (*MrcatP*) (Wang et al. 2013). En microesclerocios maduros se indujeron los genes *MrcatA* y *MrcatP*, en concordancia con el resultado anterior reportado sobre pellets miceliales y pellets similares a microesclerocios de *B. bassiana* (Huarte-Bonnet et al. 2018, 2019) y con los resultados de TEM encontrados en este trabajo de tesis. Un gen codificante para catalasa peroxisomal también fue expresado durante el crecimiento vegetativo y las etapas de desarrollo esclerotial del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Yarden et al. 2014). De los genes evaluados en este estudio que se relacionan con la respuesta al estrés oxidativo, el más expresado fue *Mrgpx* que se indujo en microesclerocios a las 72 y 96 horas. Las

enzimas glutatión peroxidadas (GPx) reducen el H₂O₂ o los hidroperóxidos orgánicos a agua o sus correspondientes alcoholes utilizando glutatión reducido (Margis et al. 2008; Huarte-Bonnet et al. 2015). Como GPxs y CAT utilizan H₂O₂ como sustrato, podría ocurrir que este sustrato pueda reducirse por inducción de sólo uno de los dos sistemas; ya que en los pellets miceliales y pellets similares a microesclerocios de *B. bassiana* se indujeron los genes codificantes para CAT (*BbcatA-C* y *BbcatP*), pero no *Bbgpx* (Huarte Bonnet et al. 2018, 2019), al contrario de lo que se encontró en este estudio para microesclerocios de *M. robertsii*. En resumen, los valores obtenidos para la expresión de *Mrgpx*, *MrcatP* y *Mrsod1* a las 96 horas coinciden con lo reportado en el estudio de Michiels et al. (1994), donde se informa Gpx tiene un alto comportamiento protector, CAT tiene un comportamiento intermedio y Cu / Zn-SOD tiene un efecto protector muy pequeño para proteger las células contra los radicales libres.

Las hidrofobinas son proteínas tensioactivas producidas por hongos filamentosos, involucradas en el crecimiento fúngico y procesos morfológicos como la formación y maduración de los conidios (Wösten, 2001). En *M. anisopliae* s.l., el gen *ssgA* codifica una hidrofobina que se vincula con el desarrollo del apresorio (Leger et al. 1992). Aunque los estudios anteriores se informa que los genes de hidrofobina juegan un papel importante en el desarrollo de microesclerocios de *Verticillium dahliae* Kleb. 1913 (Klimes y Dobinson, 2006) y la formación de pellets a través de interacciones hidrofóbicas en hongos filamentosos (Zhang y Zhang, 2016), en este trabajo de tesis no se observó inducción del gen *MrssgA* en ninguno de los puntos de tiempo de fermentación durante el desarrollo de microesclerocios. Con respecto a la identificación de posibles mecanismos de pigmentación, las lacasas (LAC) y las policétido sintasas (PKS) se han relacionado con la pigmentación fúngica. Las LAC son oxidasas que catalizan la transformación de compuestos aromáticos y no aromáticos con la reducción

del oxígeno molecular a agua. Existen diversas isoformas debido a las diversas funciones fisiológicas durante el ciclo de vida de los hongos (Rivera-Hoyos et al. 2013). En *M. anisopliae*, *Malac1* se expresa durante el crecimiento isotrópico y se ha propuesto que proporciona tolerancia al estrés abiótico durante la pigmentación de los conidios (Fang et al. 2010). Los genes codificantes para LAC en *M. robertsii* y *M. acridum* (*lac1*, *lac2* y *lac3*) se mostraron altamente expresados cuando sus conidios se expusieron a la irradiación UV-B (Pereira-Junior et al. 2018). En este estudio, los tres genes *Mrlac1*, *Mrlac2* y *Mrlac3* también se mostraron inducidos en microesclerocios maduros. Las PKS son una familia de enzimas implicadas en la biosíntesis de policétidos con diversas actividades biológicas, entre las que se encuentran la pigmentación y la biosíntesis de micotoxinas. En *Metarhizium* spp., el gen *pks1* estaría involucrado en la pigmentación de conidios y la tolerancia al estrés ambiental y *pks2* estaría relacionado con la patogenicidad (Pereira-Junior et al. 2018; Zeng et al. 2018). En *M. rileyi*, el patrón de expresión de *pks* se ha incrementado entre la etapa inicial y madura de microesclerocios (Song et al. 2013); sin embargo, en este estudio, ninguno de los genes estudiados (*Mrpks1* y *Mrpks2*) fueron inducidos durante la formación de microesclerocios. Dado que el proceso de agregación de hifas se acompaña de la biosíntesis de pigmentos en el micelio (Gessler et al. 2007) y que en este trabajo todos los genes *lac* pero ninguno de los *pks* se encontraron inducidos a las 96 horas, los primeros serían importantes en el proceso de pigmentación asociado a la formación de microesclerocios, probablemente con la función de participar en la limitación del escenario de estrés oxidativo que se observa a tiempos menores de cultivo (72 horas). Sin embargo, se necesitan estudios funcionales adicionales para confirmar esta hipótesis. En resumen, el patrón de expresión tanto de los genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo, como de la biogénesis de los peroxisomas y la

pigmentación se encontró inducido mayoritariamente a las 96 horas, es decir, en microesclerocios maduros.

Como conclusión general de esta primera parte de la tesis, se puede afirmar que *M. robertsii* es capaz de producir diferentes propágulos bajo diferentes condiciones de fermentación, es decir, favoreciendo el desarrollo de microesclerocios o pellets. A pesar de su tamaño dos veces más pequeño, los microesclerocios exhibieron una mayor biomasa (peso seco) y un mayor rendimiento de agregados de hifas que los pellets. El proceso de diferenciación de microesclerocios se acompaña con diversos mecanismos de protección frente al estrés oxidativo como la expresión aumentada de genes codificantes de enzimas citosólicas y peroxisomales implicadas en el metabolismo de especies reactivas del oxígeno, actividad peroxidasa alta y biogénesis activa de los peroxisomas, que por su ubicación ultraestructural serían cuerpos de Woronin. Se propone que debido a su tolerancia a la desecación, calor y UV-B, que los microesclerocios de *M. robertsii* (ARSEF 2575) podrían ser excelentes candidatos para ser utilizados en el control biológico de plagas en condiciones ambientales tropicales y subtropicales.

Sección II: Producción de microesclerocios y pellets a partir de diferentes aislamientos de *Metarhizium* spp., patogenicidad y virulencia frente a larvas del mosquito *Aedes aegypti*. Análisis de genes codificantes de péptidos antimicrobianos en larvas de *Ae. aegypti* durante la interacción con microesclerocios de *M. robertsii*

Producción de microesclerocios y pellets

En todos los aislamientos ensayados en este trabajo (*M. anisopliae* s.l. CEP 087, *M. anisopliae* s.l. CEP 423 y *M. robertsii* ARSEF 2575) se observó la producción de microesclerocios y pellets luego de 96 hs de cultivo en los medios líquidos específicos (Figura 17).

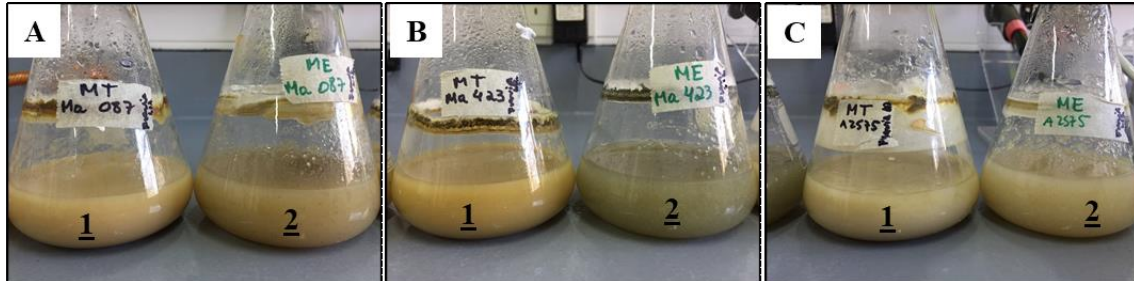


Figura 17: Producción de microesclerocios (1) o pellets (2) de *M. anisopliae* s.l. CEP 087 (A); *M. anisopliae* s.l. CEP 423 (B) o *M. robertsii* ARSEF 2575 (C) luego 96 horas de cultivo.

Al igual que lo descrito en la sección anterior para *M. robertsii*, el desarrollo de ambos propágulos en los aislamientos locales de *M. anisopliae* s.l. se inició a las 24 hs con la formación y agregación de hifas y a las 96 hs se obtuvieron los propágulos maduros (Figura 18). El valor de pH inicial de ambos medio de cultivo se fijó en 5,0 y fue variando entre 4,0 y 4,5 durante el periodo de fermentación de ambos cultivos.

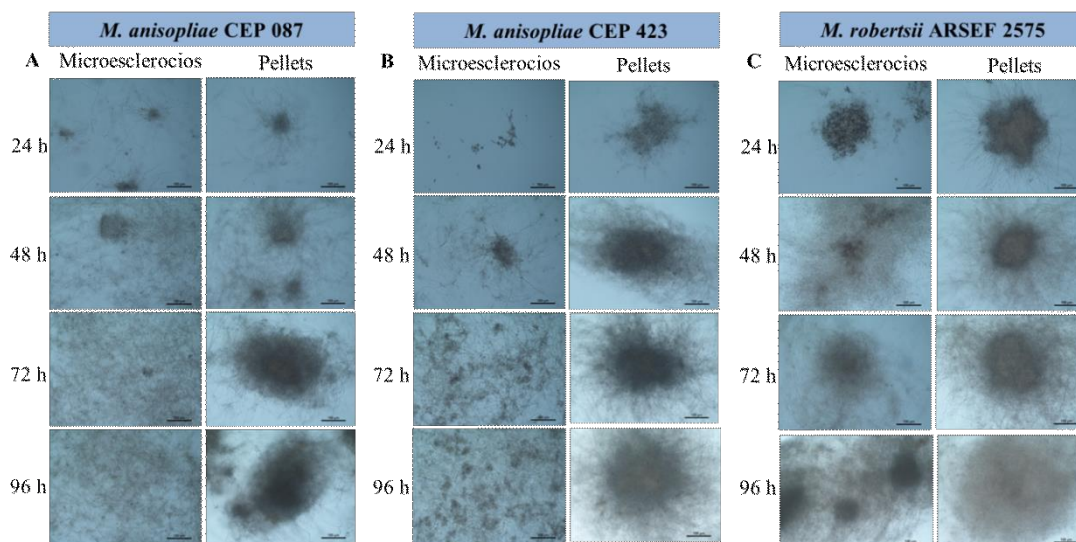


Figura 18: Microesclerocios o pellets de *M. anisopliae* s.l. CEP 087 (A); *M. anisopliae* s.l. CEP 423 (B) y *M. robertsii* ARSEF 2575 (C) a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo. Barra = 100 μ m. Aumento 20x.

Los 3 aislamientos de *Metarhizium* spp. cultivados en medio líquido tuvieron un peso seco (biomasa total) similar entre sí, tanto para la obtención de microesclerocios ($F = 1,3$; $df = 6$; $p = 0.331$) como de pellets ($F = 1,3$; $df = 6$; $p = 0.345$). Sin embargo, la acumulación de biomasa varió significativamente cuando se comparó los dos medios para cada uno de los aislamientos, siendo mayor para los microesclerocios ($F = 17,2$; $df = 6$; $p = 0.000$) (Figura 19).

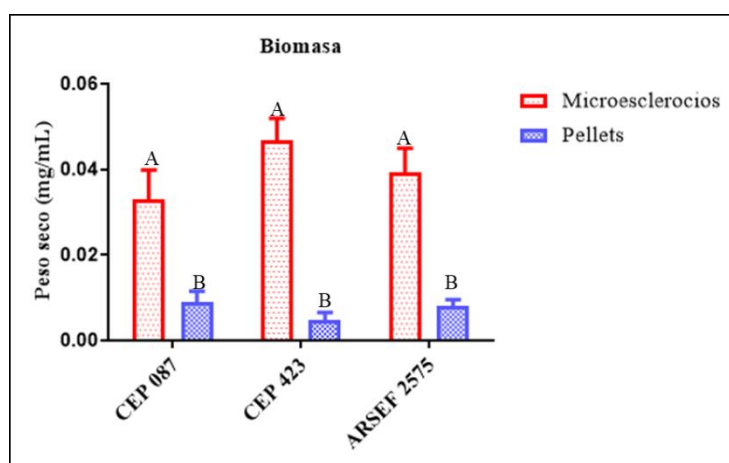


Figura 19: Biomasa de *M. anisopliae* s.l. CEP 087; *M. anisopliae* s.l. CEP 423 o *M. robertsii* ARSEF 2575 producidos en medio líquido. Las barras representan las medias \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Tanto el tamaño de los microesclerocios (Fig. 18) como la producción de estos (Figura 20) fue significativamente diferente entre los aislamientos ($F = 15,3$; $df = 6$; $p = 0.004$), mientras que no lo fue para la producción de pellets ($F = 1,6$; $df = 6$; $p = 0.275$) (Figura 20). En el caso de los microesclerocios, el mayor rendimiento se observó en el aislado ARSEF 2575, seguido por los aislamientos locales CEP 423y CEP 087 (Figura 20).

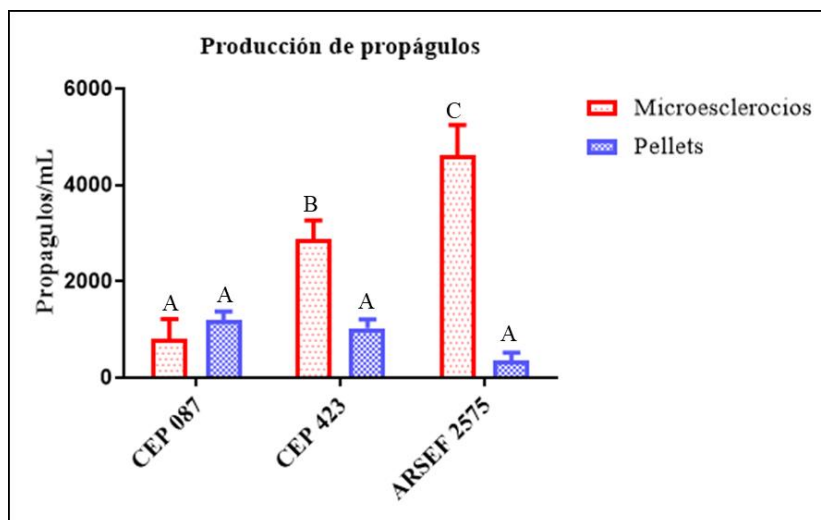


Figura 20: Producción de propágulos por mililitro de medio de cultivo para *M. anisopliae* s.l. CEP 087; *M. anisopliae* s.l. CEP 423 o *M. robertsii* ARSEF 2575. Los valores representan medias \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La producción de conidios a partir de los propágulos se mostró influenciada por el tipo de medio de cultivo en todos los tiempos ensayados ($F = 13,5$; $df = 18$; $p = 0.000$) (Figura 21). Específicamente, la producción de conidios en *Metarhizium* spp. Incubados en agua a 26 ± 1 °C durante diferentes períodos de tiempo fue significativamente diferente a partir de los microesclerocios pero no a partir de pellets (Figura 21). A los 5 días, estos valores fueron mas altos para los aislamientos locales CEP 087 (5×10^5 conidios/ mL) y CEP 423 ($3,5 \times 10^5$ conidios/mL), seguidos por ARSEF 2575 ($0,2 \times 10^5$ conidios/mL) ($F = 10,2$; $df = 9$; $p = 0.004$). Para los conidios

esporulados a partir de pellets en el mismo tiempo los valores fueron los siguientes: $0,1 \times 10^5$ (CEP 87); $0,1 \times 10^5$ (CEP 423) y $0,2 \times 10^5$ (ARSEF 2575) ($F = 1,0$; $df = 8$; $p = 0.397$).

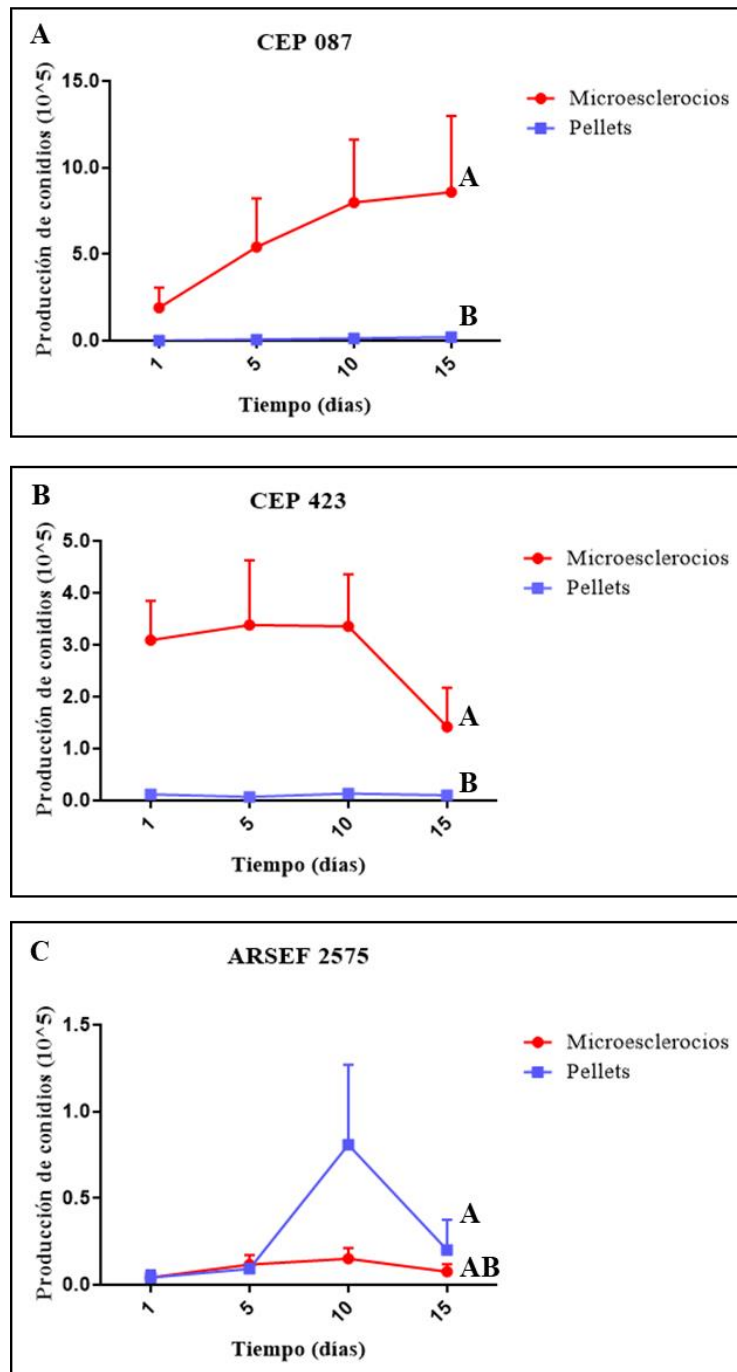


Figura 21: Producción de conidios ($\times 10^5$) en *M. anisopliae* s.l. CEP 087 (A), *M. anisopliae* s.l. CEP 423 (B) o *M. robertsii* ARSEF 2575 (C) producidos por mL de medio líquido específicos para la obtención de microesclerocios o pellets. Los puntos representan medias \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Bioensayos de supervivencia de larvas del mosquito *Aedes aegypti* tratadas con microesclerocios o pellets de *Metarhizium* spp.

Se realizaron tres bioensayos para establecer y optimizar las condiciones ideales para el tratamiento de larvas de *Ae. aegypti* con los microesclerocios de *Metarhizium* spp.:

1) En primer término se compararon los microesclerocios de ARSEF 2575 con o sin conidiogénesis previa en agua antes del agregado de las larvas. Se encontró que aunque los dos tratamientos evaluados difieren del grupo control al final del ensayo ($F = 36,296$; $p = 0.000$) (Figura 22).

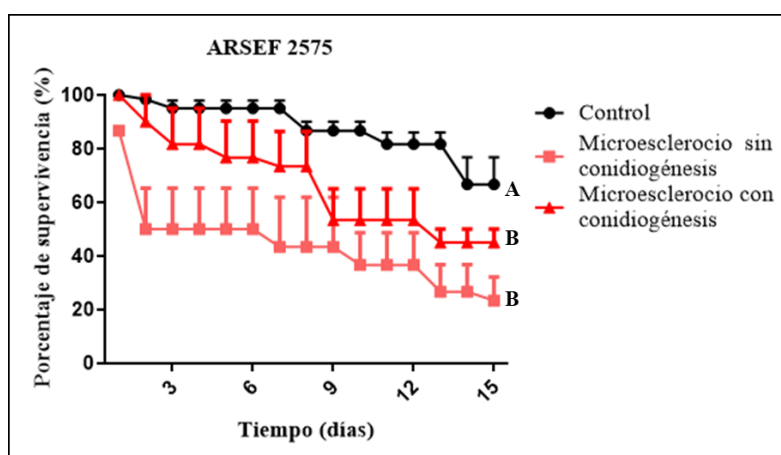


Figura 22: Porcentaje de supervivencia de larvas de *Ae. aegypti* expuesta en agua con microesclerocios de *M. robertsii* ARSEF 2575 sin conidiogénesis previa o con conidiogénesis de 5 días. Control (línea negra) ausencia de propágulos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

2) Se realizaron bioensayos de supervivencia exponiendo las larvas de *Ae. aegypti* a propágulos de microesclerocios o pellets contenidos en 100 μ l de cultivo, en ambos casos luego de 5 días en agua para favorecer la conidiogénesis. Para todos los tiempos ensayados se observó que los tres aislamientos resultaron patogénicos (CEP 087: $F = 16,2$; $p = 0,000$, CEP 423: $F = 6,6$; $p = 0.003$, ARSEF 2575: $F = 6,7$; $p = 0,003$) y ocasionaron la reducción de la supervivencia de las larvas a partir del tercer día comparado a la supervivencia del grupo control, mostrando así diferente grado de

virulencia (Figura 23). La esporulación de los conidios se detectó sólo sobre larvas muertas del grupo tratado (Figura 24).

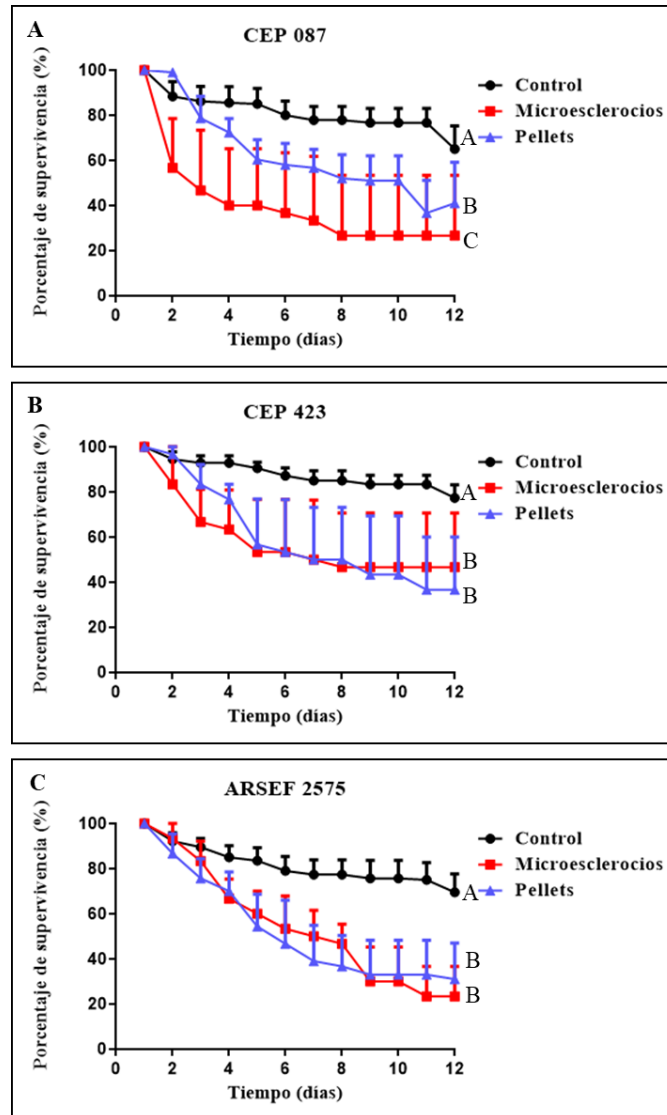


Figura 23: Porcentaje de supervivencia de larvas de *Ae. aegypti* expuesta en agua con microesclerocios o pellets de *M. anisopliae* s.l. CEP 087 (A); *M. anisopliae* s.l. CEP 423 (B) o *M. robertsii* ARSEF 2575 (C) contenidos en 100 μ l de cultivo. El grupo control (línea negra) indica supervivencia en ausencia de propágulos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

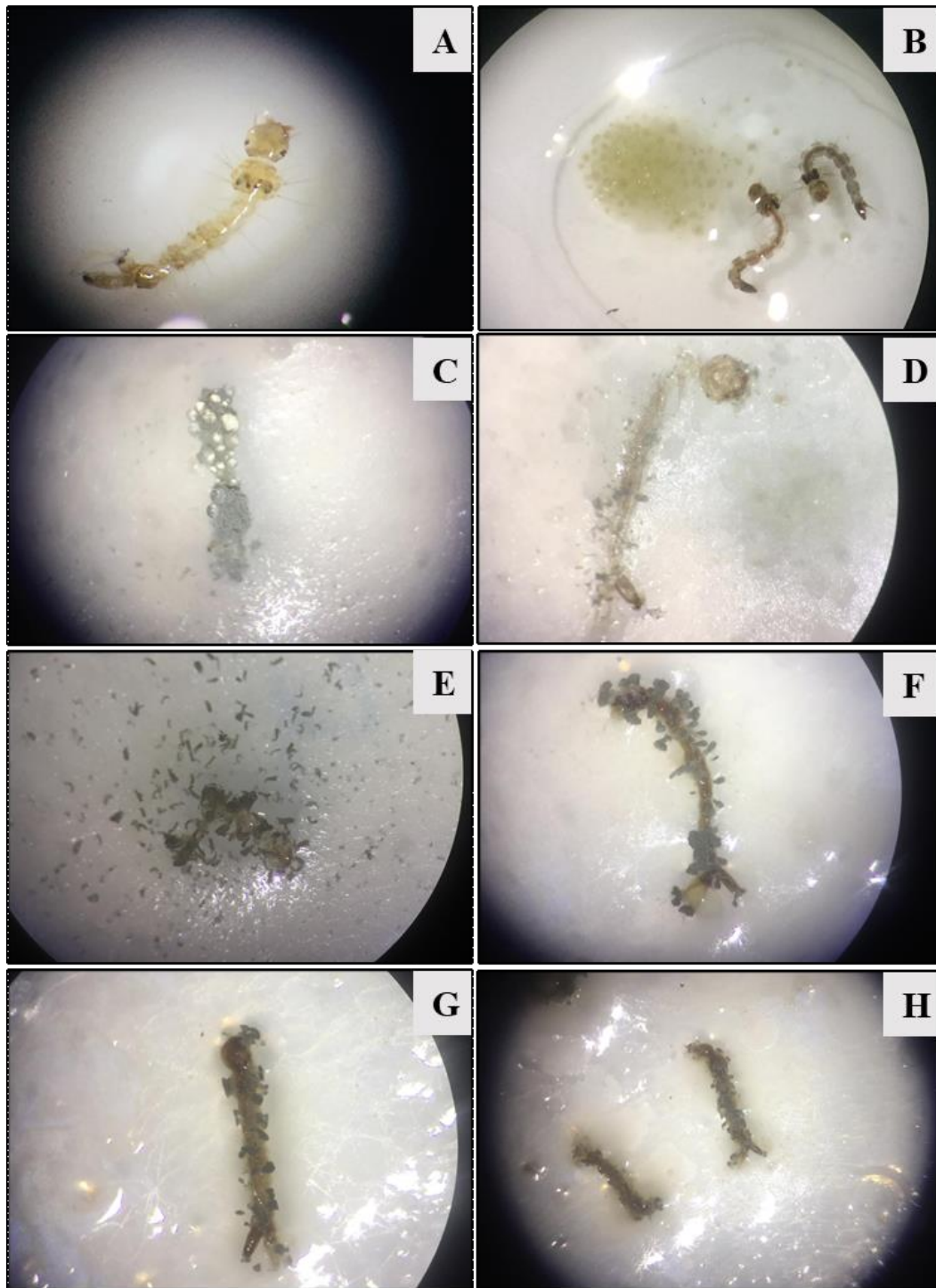


Figura 24: Larvas de *Ae. aegypti*: Control (A); Larvas en contacto con microesclerocios (B); Conidiogénesis sobre de larvas tratadas con microesclerocios de *M. anisopliae* s.l. CEP 087 (C -D); *M. anisopliae* s.l. CEP 423 (E - F) o *M. robertsii* ARSEF 2575 (G – H).

3) En el último bioensayo diseñado, se establecieron dos cantidades de microesclerocios (500 y 1000 propágulos totales en cada recipiente) para los aislamientos ARSEF 2575 y CEP 423, observándose en ambos casos una reducción significativa de la supervivencia de larvas de *Ae. aegypti* en el el grupo tratado con 1000 propágulos en comparación al grupo control ($F = 12,0$; $P = 0.000$) (Figura 25).

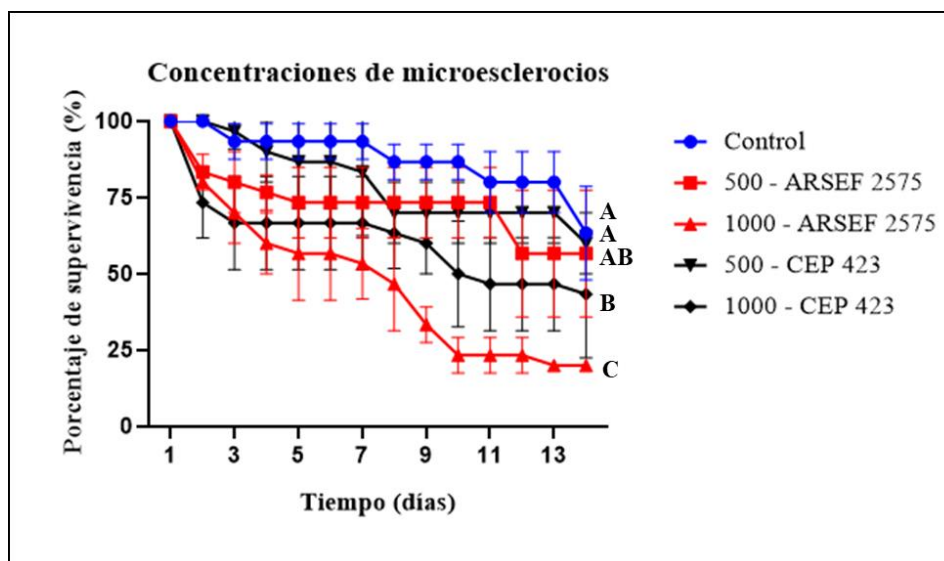


Figura 25: Porcentaje de supervivencia de larvas de *Ae. aegypti* expuesta en agua con 500 y 1000 microesclerocios de *M. robertsii* ARSEF 2575 y *M. anisopliae* s.l. CEP 423. El grupo control (línea azul) indica la supervivencia en ausencia de propágulos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Análisis de la expresión génica de larvas de *Ae. aegypti* durante la interacción con microesclerocios de *M. robertsii*

Se analizó la expresión de 4 genes potencialmente implicados en el sistema de defensa de inmunidad humoral de insectos. Los genes seleccionados fueron los codificantes para defensina A (*AeDa1*), defensina B (*AeDb1*), defensina C (*AeDc2*) y cecropina N (*AeCecn*). Se utilizó actina (*AeAct*) como gen de referencia.

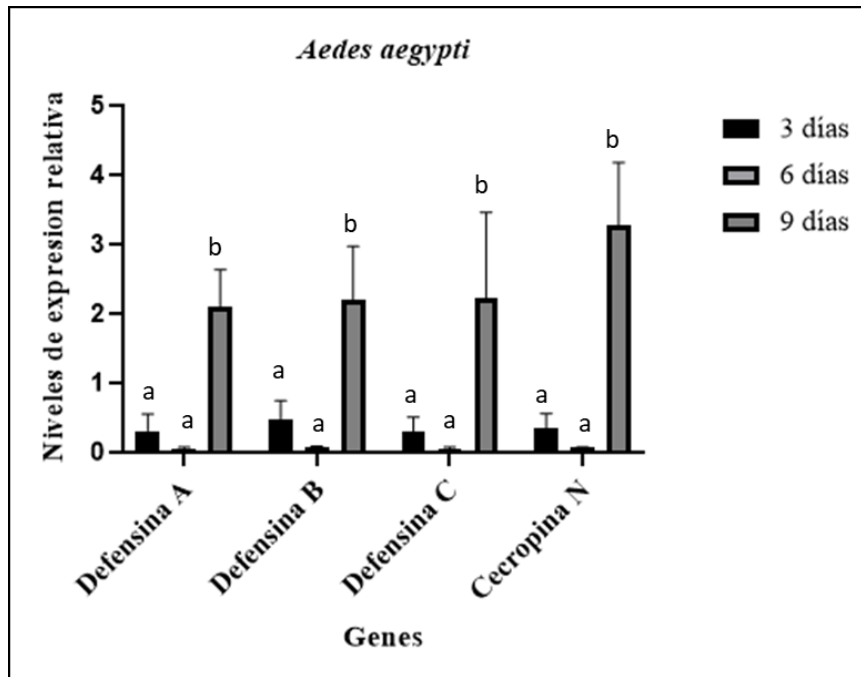


Figura 26: Expresión de Defensina A (*AeDal*), Defensina B (*AeDb1*), Defensina C (*AeDc2*) y Cecropina N (*AeCecn*) en larvas de *Ae. aegypti* durante la interacción con microesclerocios y conidios de *M. robertsii* ARSEF 2575. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Para cada gen, la expresión se midió al día 3, 6 y 9 posteriores a que las larvas fueron adicionadas en el agua conteniendo microesclerocios de *M. robertsii* ARSEF 2575 y la misma se normalizó con valores medidos del día 3, 6 y 9 para larvas no infectadas (control). Para las tres defensinas la expresión al día 9 fue significativamente mayor que las encontradas a los días 3 y 6; específicamente, *AeDal* ($F = 15,7$; $P = 0,006$), *AeDb1* ($F = 9,0$; $P = 0,022$), *AeDc2* ($F = 10,4$; $P = 0,016$). La misma tendencia fue observada para el gen codificante para Cecropina N (*AeCecn*) que presentó inducción al día 9 ($F = 8,8$; $P = 0,022$). No se observó inducción en la expresión de ninguno de los cuatro genes a los días 3 y 6 post tratamiento (Figura 26).

Discusión

Las condiciones de fermentación utilizadas se mostraron favorables para la producción de microesclerocios o pellets de *M. anisopliae* s.l. CEP 087, *M. anisopliae* s.l. CEP 423 y *M. robertsii* ARSEF 2575. Al igual que para *M. robertsii* (Sección I), los dos aislamientos locales de *M. anisopliae* s.l. cultivados en los dos medios de cultivo seleccionados para la obtención de microesclerocios o pellets mostraron una agregación de hifas desde las 24 horas de inoculación, con estructuras más compactas a las 96 horas. La biomasa de los aislamientos de *Metarhizium* CEP 087, CEP 423 o ARSEF 2575 producidas a partir del medio para la obtención de microesclerocios fue mayor que para los pellets. La acumulación de biomasa es importante durante el crecimiento de hongos filamentosos en medio líquido porque responde a cuáles fueron las características del cultivo, como la velocidad de agitación y su influencia sobre el crecimiento, transporte o difusión de nutrientes como oxígeno y calor (Nielsen, 1992). La integración de los nutrientes del medio a los componentes celulares, seguido del aumento de la biomasa y la eventual septación es extremadamente importante (Willets, 1971 y 1972). La densidad de hifas dentro de los pellets está influenciada por la difusión de nutrientes y oxígeno a la biomasa micelial, cuando la viscosidad del medio aumenta se reduce el transporte de nutrientes al interior del pellet (Papagianni, 2004). El aislamiento *M. robertsii* (ARSEF 2575) tuvo un mayor rendimiento de microesclerocios frente a los aislamientos de *M. anisopliae* locales, aunque estos últimos mostraron mayores rendimientos de conidios a partir de los microesclerocios, en las mismas condiciones de desarrollo. La conidiogénesis de microesclerocios sumergido en agua se describió para aislamientos de *M. anisopliae* por primera vez en el presente estudio. El agua se muestra esencial para el metabolismo de los hongos, sin embargo, el exceso o la

falta de disponibilidad afecta negativamente a la fisiología celular. El potencial hídrico se refiere a la energía potencial del agua y se relaciona estrechamente con la presión osmótica de los medios de crecimiento de hongos (Walker y White, 2017). La pared de la célula fúngica es una estructura dinámica que protege a la célula de los cambios resultantes de la presión osmótica y otras tensiones ambientales, al mismo tiempo permite que la célula fúngica interactúe con su entorno, garantizando la plasticidad adecuada para permitir el crecimiento celular, la división celular y la formación de una gran variedad de tipos de células (Bowman y Free, 2006). Los hongos pueden sobrevivir a estos cambios de corto plazo alterando su potencial osmótico interno (por ejemplo, reduciendo los niveles intracelulares de K^+ o glicerol). El glicerol es un ejemplo de un soluto compatible que se sintetiza para mantener baja la actividad citosólica del agua cuando la concentración del soluto externo es alta. El glicerol puede reemplazar eficazmente el agua celular, restaurar el volumen celular y permitir que continúe el metabolismo de los hongos. La trehalosa, el arabitol y el manitol pueden proteger de manera similar contra el estrés osmótico (Walker y White, 2017). La evidencia que los microesclerocios de *Metarhizium* spp. esporulen sumergidos en agua sugiere que estos propágulos compatibilizan eficientemente sus actividades metabólicas durante la conidiogénesis en esas condiciones. Durante el ciclo de vida del hongo la dinámica de la pared celular, las actividades enzimáticas, la elasticidad adecuada son esenciales para permitir un nuevo crecimiento, brotación o ramificación, además de la fuerza para protegerse contra la lisis celular (Bowman y Free, 2006). Esta compatibilidad es esencial a la hora de proponer el uso de estos propágulos como biolarvicidas, como se discute a continuación, y los mayores valores en la conidiogénesis registrados para los aislamientos locales sugieren un empleo promisorio en este sentido.

Actualmente la erradicación de los mosquitos vectores de enfermedades humanas es un gran desafío debido a la expansión del área de cobertura y prevalencia del mosquito en zonas donde antes eran inexistentes, relacionadas a la globalización y los cambios climáticos a nivel mundial (Ryan et al. 2019; Messina et al. 2019; Liu-Helmersson et al. 2019). Mantener baja la población de mosquitos ya no es una preocupación solamente para los países de clima tropical, sino también de los de clima subtropical (Shaw y Catteruccia, 2019; Muniz. 2019; Huang et al. 2019; Suesdek, 2019). El control de poblaciones de mosquitos vectores con insecticidas químicos sintéticos ha desarrollado altos índices de resistencia y cambios en el comportamiento, además de que no son efectivos para la etapa larvaria que se desarrolla en medios acuáticos (Hemingway y Ranson, 2000; Vontas et al. 2012; Foster y Walker, 2019; Chen et al. 2021). El uso de hongos entomopatógenos como parte de un manejo integrado de plagas y vectores de enfermedades constituye una alternativa interesante para interrumpir el ciclo de vida y reducir la densidad poblacional de los mosquitos presentes en las áreas urbanas y periurbanas (Butt et al. 2013, Lacey et al. 2015; Qu y Wang, 2018). Los patógenos fúngicos comúnmente estudiados para el control de mosquitos incluyen los géneros *Coelomomyces*, *Lagenidium*, *Culicinomyces*, *Tolypocladium* y *Metarhizium* (Rodrigues et al. 2018; Foster y Walker, 2019; Shen et al. 2020; Rodrigues et al. 2021a). El género *Metarhizium* es considerado terrestre y su potencialidad para control de mosquitos adultos se ha evidenciado en diversos estudios con base en formulaciones de conidios (Leles et al. 2012; Falvo et al. 2018, Rodrigues et al. 2019). El uso de microesclerocios de *Metarhizium* spp. para el control de mosquitos se ha reportado para adultos y huevos (Flor-Weiler et al. 2019; Rodrigues et al. 2021b). El presente estudio reporta por primera vez el empleo de microesclerocios crudos en ambientes acuáticos y presenta resultados de patogenicidad satisfactorios contra larvas de *Ae. aegypti*, aún sin el

empleo de una formulación específica conteniendo adjuvantes u otros compuestos diferentes al entomopatógeno que favorezca su actividad biolarvicida.

La supervivencia de larvas de *Ae. aegypti* en contacto con microesclerocios o pellets de *Metarhizium* spp. (CEP 087, CEP 423 o ARSEF 2575) se redujo en relación al periodo de tiempo. Los conidios están descritos como las unidades infectantes de artrópodos terrestres por vía de adhesión a la cutícula. La adhesión de conidios a la cutícula de hospedadores terrestres implica inicialmente fuerzas hidrofóbicas seguidas de una consolidación facilitada por acción de enzimas extracelulares y la secreción de mucílago (Osharov y May, 2001). Los blastosporos de hongos entomopatógenos también producen mucílago para facilitar su adhesión a la cutícula del insecto; estos mucilagos parecen proporcionar también bajo el agua una condición relativamente estable para la germinación de esporas (Qu y Wang, 2018). Sin embargo, se ha reportado que las fuerzas de adhesión de los conidios de *M. anisopliae* a larvas de *Ae. aegypti* son débiles y no forman un vínculo firme, evitando así la ruta normal de invasión y patogénesis (Butt et al. 2013; Greenfield et al. 2014). El ingreso de conidios por vía de aberturas naturales es una probable ruta de infección para las larvas, el sifón respiratorio y el aparato bucal pueden favorecer esta vía natural de entrada de agentes patógenos (Miranpuri, y Khachatourians, 1991; Butt et al. 2013; Greenfield et al. 2014; Mannino et al. 2019). El ingreso de conidios por el aparato respiratorio es facilitado por el comportamiento de las larvas cuando se ubican en la superficie de agua para respirar abriendo sus válvulas peri espiraculares, mientras obtienen oxígeno directamente del aire. A través de este comportamiento larval, los conidios hidrofóbicos que se ubican en la interfase agua-aire flotan sobre el agua y se adhieren a la punta de sifón, para luego desencadenar el proceso de entrada a la larva que la lleva a la muerte por asfixia (Butt et al. 2013). Por otro lado, las larvas de *Aedes* son muy voraces (Becker et al. 2020) y en

este trabajo se ha observado que se alimentan de los microesclerocios, por lo que otra vía natural de ingreso de los conidios sería por el tracto digestivo. Sin embargo, se ha reportado que una vez ingeridos los conidios no son digeridos y que la acumulación en el intestino de la larva impide un correcto acceso a los nutrientes lo que también las llevaría a la muerte (Crisan, 1971; Butt et al. 2013; Mannino et al. 2019).

El modo básico de acción de los hongos cuando son aplicados para el control de insectos se logra cuando hay suficientes propágulos infecciosos (generalmente conidios) que entran en contacto con un huésped susceptible y cuando además las condiciones ambientales son adecuadas para el desarrollo de la enfermedad (Kidanu y Hagos, 2020).

En este trabajo se evidenció que la mayor concentración de microesclerocios de *M. robertsii* ensayada (1000 propágulos totales) fue más eficiente comparado con la menor concentración (500 propágulos totales), obteniendo una relación dosis-respuesta positiva que permite pensar en diseñar estrategias de aplicación en condiciones de mayor escala, como ensayos de semicampo y campo programados en un futuro.

El género *Metarhizium* es considerado un hongo terrestre que presenta baja respuesta de adhesión a larvas de mosquitos en el ambiente acuático, lo que se ha sido descrito como una desventaja frente al uso de patógenos acuáticos que permanecen más tiempo en el agua y que presentan mejor capacidad de adhesión al hospedador (Butt et al. 2013). Sin embargo, el uso de microesclerocios de *Metarhizium* spp. en el ambiente acuático es muy promisorio debido a su capacidad de producir de conidios continuamente, al menos a lo largo de diez días sumergidos en el agua, como se evidenció para los aislamientos de *Metarhizium* CEP 87, CEP 423 y ARSEF 2575.

Los insectos pueden protegerse de la invasión de patógenos mediante barreras físicas y la activación de su sistema inmunológico celular y humoral; la activación de éste último desencadena la producción de péptidos antimicrobianos (Lowenberger, 2001;

Bitencourt et al 2020). Los mosquitos han desarrollado evolutivamente mecanismos inmunológicos debido a su estrecha relación con microorganismos que causan enfermedades (Dunn, 1986; Tawidian et al. 2019). Los péptidos antimicrobianos de insectos se clasifican de acuerdo a su función, secuencia y composición de aminoácidos, y son activados durante un proceso de infección (Wu et al. 2018). En el presente estudio se observó la activación de los mecanismos inmunológicos en larvas del mosquito *Ae. aegypti* durante la presencia del hongo entomopatógeno *M. robertsii* ARSEF 2575 a través de la expresión génica de Defensina A, Defensina B, Defensina C y Cecropina N. Estos péptidos antimicrobianos se expresaron en las larvas que permanecieron vivas durante la interacción con microsclerocios como productores de conidios en el ambiente acuático, lograron activar su sistema de defensa y aumentar los niveles de defensinas y cecropinas recién al día 9 de comenzado el ensayo comparado con el control sin la presencia de hongo. Las defensinas y cecropinas de *Ae. aegypti* están más asociadas a su función como péptidos antibacterianos (Lowenberger, 2001), sin embargo se han reportado que las defensinas pueden ser también antifúngicas para los hongos *Dipodascopsis*, *Geotrichum*, *Metarhizium*, *B. bassiana*, *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc. 1892, *F. oxysporum* Schltdl. 1824, *Neurospora crassa*, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 y *Cryptococcus* spp. (Lowenberger et al. 1999; Ekengren y Hultmark, 1999; Mannino et al. 2019; Wu et al. 2020). Las cecropinas de *Hyalophora cecropia*, *Drosophila melanogaster*, *Ae. aegypti* y *Anopheles gambiae* también presentan respuestas antifúngicas contra los hongos *Fusarium* y *Aspergillus* (Bulet et al. 2003). Es interesante notar que hay poca información de defensinas antifúngicas para *Ae. aegypti*, a pesar de que estos péptidos están presente en muchas especies de insectos, mejillones, escorpiones, garrapatas y nematodos (Bulet et al. 2003). Las defensinas antifúngicas inhiben la germinación de las esporas o la perforación de hifas

en los insectos (Bulet y Stocklin, 2005) se ha reportado su permanencia en el insecto por un periodo de 21 días luego que el patógeno desafía el sistema inmune (Lowenberger et al., 1999; Lowenberger, 2001). El presente estudio evidenció que las larvas de *Ae. aegypti* en presencia de propágulos fúngicos exhibieron una expresión aumentada de Defensina A y Defensina B, mientras que la Defensina C y la Cecropina N mostraron valores de expresión génica alrededor de 3 veces mayor que los controles no infectados. Se ha reportado que las isoformas A y B de las defensinas de *Ae. Aegypti* están en general más expresadas que la isoforma C, que se muestra en niveles más bajos (Lowenberger, 2001). Estas diferencias se deben a su forma de activación por remoción del péptido señal y de su ubicación (las isoformas A y B que se encuentra en el cuerpo graso y la isoforma C se encuentran en el intestino medio) (Lowenberger, 2001). La presencia de cecropina se ha descrito en el cuerpo graso, hemocitos y hemolinfa en diferentes estadios de desarrollo de *Ae. aegypti* (Liu et al. 2017, Wu et al 2020) y se expresa diferencialmente durante infecciones locales o infecciones sistémicas (Brady et al 2019). Todos estos péptidos antimicrobianos inducen una lisis rápida de las células bacterianas actuando directamente sobre sus membranas (Steiner et al. 1988; Wu et al. 2018), mientras que en hongos reprimen el crecimiento de las hifas (Ekengren y Hultmark, 1999). Para *Ae. aegypti* han sido reportadas las cecropinas AeaCec 1, AeaCec 2–4 y AeaCec 5, siendo AeaCec 1 la que presenta actividad antifúngica (Wei et al. 2018; Brady et al 2019). En este trabajo de tesis la Cecropina N presentó inducción génica solamente al día 9. En concordancia con este resultado, se ha reportado una alta inducción de cecropina en *Drosophila* al día 9 post inyección con conidios de *Metarhizium* (Ekengren y Hultmark, 1999). La detección de cecropina está asociada para la etapa tardía de larvas, pupas blancas y etapa temprana de pupas negras, pero no en huevos y etapas tempranas de las larvas cuando son inducidas por bacterias

(Wu et al., 2020). Las cecropinas aumentan gradualmente su expresión y han sido detectadas después de 10 días de un desafío inmunológico (Lowenberger et al. 1999; Lowenberger, 2001). A pesar de que los insectos presentaron varios mecanismos de defensas para protegerse de agentes patogénicos, los hongos entomopatógenos también han evolucionado para eludir estas defensas inmunitarias a través de múltiples estrategias para lograr evadir las barreras física, humoral y celular de los insectos, incluyendo por ejemplo el enmascaramiento de los carbohidratos inmunogénicos de la superficie de las células fúngicas para evitar la estimulación inmunológica y la secreción de moduladores inmunitarios para interrumpir la respuesta inmunitaria del huésped y reprimir las proteasas que activan la cascada de fenoloxidasa (Ekengren y Hultmark, 1999; Qu y Wang, 2018, Wang et al. 2019). Cuando el hongo logra imponer estos mecanismos en general se muestra patogénico y virulento, activando múltiples estrategias que culminan con un proceso infeccioso exitoso (Pedrini, 2018). Los resultados de este trabajo muestran que si bien las larvas están activando el sistema inmune mediante la expresión de péptidos antimicrobianos luego de la exposición a los microesclerocios, lo hacen tardíamente (día 9 post tratamiento) por lo que el proceso infeccioso ya está disparado y culmina con la mortalidad de las larvas.

CONSIDERACIONES FINALES

En el presente estudio reporta que *M. robertsii* (ARSEF 2575) exhibe cambios moleculares y ultraestructurales durante la formación de microesclerocios y ante el estímulo de factores abióticos como la temperatura y la radiación UV, a los que se muestran relativamente tolerantes. También reporta que aislamientos de *Metarhizium* de origen platense (CEP 83 y CEP 423) exhibe producción de microesclerocios y mayor producción de conidios infectivos comparado con los pellets, otro propágulo granular producidos por los mismos aislamientos. El aislamiento modelo (ARSEF 2575) exhibió una mayor producción de microesclerocios y de mayor tamaño que los los aislamientos locales CEP 83 y CEP 423, aunque estos últimos mostraron mayor capacidad de conidiogénesis a partir de microesclerocios maduros. Los 3 aislamientos redujeron la sobrevivencia de *Ae. aegypti* expuestas a sus microesclerocios. La interacción hongo-larva generó una respuesta en el hospedador que se evidenció con la expresión de genes de su sistema inmune humoral, aunque lo hizo tardíamente (9 días post infección) cuando la infección fúngica se consolidaba como un proceso exitoso que culminó con la mortalidad de las larvas tratadas. Los microesclerocios de *Metarhizium* spp. son prometedores para el control microbiano ya que producen conidios continuamente en las condiciones adecuadas. Es especialmente interesante para el control de larvas de mosquitos, ya que al introducir los microesclerocios en el agua, éstos se ubican en el fondo del recipiente, desde donde pueden ser ingeridos por las larvas. Sin embargo, los conidios producidos por estos microesclerocios van hacia la superficie debido a su hidrofobicidad, donde actúan como agentes infecciosos de las larvas que se encuentran en la superficie para respirar. Son pocos los reportes de la utilización de microesclerocios para el control de vectores de enfermedades humanas. El presente estudio abre el camino para explorar el uso de estos propágulos de resistencia fúngico como larvicidas. Futuros estudios de nuestro grupo de investigación estarán

relacionados con ensayos de semi-campo y campo para comprobar su eficiencia. En un contexto más general, este estudio también permite abrir nuevos horizontes para investigar y fortalecer el conocimiento teórico-práctico de la aplicación de hongos entomopatógenos para el control de artrópodos vectores.

REFERENCIAS

- Abrashev, R. I., Pashova, S. B., Stefanova, L. N., Vassilev, S. V., Dolashka-Angelova, P. A., & Angelova, M. B. (2008). Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(12), 977-983.
- Aguirre, J., Hansberg, W., & Navarro, R. (2006). Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology*, 44(Supplement_1), S101-S107.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13(3), 111-118.
- Arroyo-Manzanares, N., Di Mavungu, J. D., 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.
- Aw, K. M. S., & Hue, S. M. (2017). Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. *Journal of Fungi*, 3(2), 30.
- Bai, Z., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2003). Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(4), 267-302.
- Barranco-Florido, E., García-Hernández, L. A., Rodríguez-Navarro, S., Flores-Macías, A., & Ramos-López, M. A. (2013). Regulation of gene expression in entomopathogenic fungi in three different environmental conditions: A review. *African Journal of Biotechnology*, 12(10).
- Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M. B., Dahl, C., & Kaiser, A. (2020). *Mosquitoes: Identification, Ecology and Control*. Springer International Publishing.
- Behle, R. W., & Jackson, M. A. (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.
- Behle, R. W., Jackson, M. A., & Flor-Weiler, L. B. (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.

- Bernardo, C.C., Pereira-Junior, R. A., Luz, C., Mascarin, G. M., & Fernandes, É. K. K. (2020). Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. *Fungal Biology*, 124(8), 714-722.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530.
- Bitencourt, R. D. O. B., Salcedo-Porras, N., Umaña-Díaz, C., da Costa Angelo, I., & Lowenberger, C. (2020). Antifungal immune responses in mosquitoes (Diptera: Culicidae): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107505.
- Bonica, M. B., Goenaga, S., Martín, M. L., Feroci, M., Luppo, V., Muttis, E., Fabbri, C., Morales, M. A., Enria, D., Micieli, M. V., & Levis, S. (2019). Vector competence of *Aedes aegypti* for different strains of Zika virus in Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007433.
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.
- Brady, D., Grapputo, A., Romoli, O., & Sandrelli, F. (2019). Insect cecropins, antimicrobial peptides with potential therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5862.
- Braga, G. U., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2001). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 N to 54 S. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), 98-108.
- Braga, G. U., Rangel, D. E., Fernandes, E. K., Flint, S. D., & Roberts, D. W. (2015). Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics*, 61(3), 405-425.
- Brancini, G. T., Bachmann, L., Ferreira, M. E. D. S., Rangel, D. E., & Braga, G. Ú. (2018). Exposing *Metarhizium acridum* mycelium to visible light up-regulates a photolyase gene and increases photoreactivating ability. *Journal of Invertebrate Pathology*, 152, 35-37.
- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. D. R., Moonjely, S., Bidochka, M. J., & Toriello, C. (2019). A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 29(1), 83-102.

- Bulet, P., & Stocklin, R. (2005). Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters*, 12(1), 3-11.
- Bulet, P., Charlet, M., & Hetru, C. (2003). Antimicrobial peptides in insect immunity. In *Innate immunity* (pp. 89-107). *Humana Press*, Totowa, NJ.
- Butt, T. M., Greenfield, B. P., Greig, C., Maffei, T. G., Taylor, J. W., Piasecka, J., Dudley, E., Abdulla, A., Dubovskiy, I. M., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, Q., Penny, M. W. & Eastwood, D. C. (2013). *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death. *PloS One*, 8(12), e81686.
- Cabral, S., De Paula, A., Samuels, R., Da Fonseca, R., Gomes, S., Silva, J. R., & Mury, F. (2020). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) immune responses with different feeding regimes following infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Insects*, 11(2), 95.
- Chen, T. Y., Smartt, C. T., & Shin, D. (2021). Permethrin resistance in *Aedes aegypti* affects aspects of vectorial capacity. *Insects*, 12(1), 71.
- Ciota, A. T., Chin, P. A., Ehrbar, D. J., Micieli, M. V., Fonseca, D. M., & Kramer, L. D. (2018). Differential effects of temperature and mosquito genetics determine transmissibility of arboviruses by *Aedes aegypti* in Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(2), 417.
- Corbel, V., Achee, N. L., Chandre, F., Coulibaly, M. B., Dusfour, I., Fonseca, D. M., ... & David, J. P. (2016). Tracking insecticide resistance in mosquito vectors of arboviruses: the Worldwide Insecticide resistance Network (WIN). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(12), e0005054.
- Corval, A. R., Mesquita, E., Corrêa, T. A., Silva, C. D. S., Bitencourt, R. D. O., Fernandes, É. K. K., Bittencourt, V. R. E. P., Roberts, D. W., & Gôlo, P. S. (2021). UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology*, 61(1), 15-26.
- Couch, B. C., & Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94(4), 683-693.

- Cox, P. W., & Thomas, C. R. (1992). Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(9), 945-952.
- Crisan, E. V. (1971). Mechanism responsible for release of toxin by *Metarhizium* spores in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17(2), 260-264.
- Culotta, V. C., Yang, M., & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 747-758.
- Davidson, E. W., & Sweeney, A. W. (1983). Microbial control of vectors: A decade of progress. *Journal of Medical Entomology*, 20(3), 235-247.
- Ding, F., Fu, J., Jiang, D., Hao, M., & Lin, G. (2018). Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Tropica*, 178, 155-162.
- Donzelli, B. G. G., Krasnoff, S. B., Sun-Moon, Y., Churchill, A. C., & Gibson, D. M. (2012). Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. *Current Genetics*, 58(2), 105-116.
- Dubovskiy, I. M., Whitten, M. M., Yaroslavtseva, O. N., Greig, C., Kryukov, V. Y., Grizanov, E. V., Mukherjee, K., Vilcinskas, A., Glupov, V. V., & Butt, T. M. (2013). Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi?. *PloS One*, 8(4), e60248.
- Dunn, P. E. (1986). Biochemical aspects of insect immunology. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 321-339.
- Dusfour, I., Vontas, J., David, J. P., Weetman, D., Fonseca, D. M., Corbel, V., Raghavendra, K., Coulibaly, M. B., Martins, A. J., Kasai, S., & Chandre, F. (2019). Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(10), e0007615.
- Ekengren, S., & Hultmark, D. (1999). Drosophila cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(11), 965-972.
- Fahimi, H. D. (2017). Cytochemical detection of peroxisomes in light and electron microscopy with 3, 3'-diaminobenzidine. In Peroxisomes (pp. 93-100). *Humana Press*, New York, NY.
- Falvo, M. L., Albornoz Medina, P., Rodrigues, J., López Lastra, C. C., García, J. J., Fernandes, É. K., & Luz, C. (2018). Effect of UV-B irradiation on water-

- suspended *Metarhizium anisopliae* sl (Hypocreales: Clavicipitaceae) conidia and their larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 55(5), 1330-1333.
- Falvo, M. L., Musso, A., Ordoqui, E., López Lastra, C. C., Luz, C., & García, J. J. (2020). Adulticidal Activity of *Metarhizium anisopliae* sl (Hypocreales: Clavicipitaceae) Native Strains From Argentina Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 57(2), 636-640.
- Fang, W., Fernandes, É. K., Roberts, D. W., Bidochka, M. J., & Leger, R. J. S. (2010). A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fungal Genetics and Biology*, 47(7), 602-607.
- Fargues, J., Smits, N., Vidal, C., Vey, A., Vega, F., Mercadier, G., & Quimby, P. (2002). Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*, 154(3), 127-138.
- Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256.
- Feofilova, E. P. (2003). Deceleration of vital activity as a universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39(1), 1-18.
- Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Chong, J. P., Rangel, D. E., Miller, M. P., & Roberts, D. W. (2010). Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 115-128.
- Fernandes, É. K., Rangel, D. E., Braga, G. U., & Roberts, D. W. (2015). Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*, 61(3), 427-440.
- Fernandes, E. K., Rangel, D. E., Moraes, A. M., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. W. (2008). Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(1), 69-78.

- Fernandes, E. K., Rangel, D. E., Moraes, Á. M., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. W. (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(3), 237-243.
- Fischer, S., De Majo, M. S., Di Battista, C. M., Montini, P., Loetti, V., & Campos, R. E. (2019). Adaptation to temperate climates: evidence of photoperiod-induced embryonic dormancy in *Aedes aegypti* in South America. *Journal of Insect Physiology*, 117, 103887.
- Flor-Weiler, L. B., Behle, R. W., Johnson, E. T., Strickman, D. A., & Rooney, A. P. (2019). Evaluation of a granular formulation containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) microsclerotia in controlling eggs of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Science and Technology*, 29(1), 68-82.
- Forlani, L., Pedrini, N., Girotti, J. R., Mijailovsky, S. J., Cardozo, R. M., Gentile, A. G., Hernández-Suárez, C. M., Rabinovich, J. E., & Juárez, M. P. (2015). Biological control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* combined with an aggregation cue: field, laboratory and mathematical modeling assessment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), e0003778.
- Foster, W. A., & Walker, E. D. (2019). mosquitoes (Culicidae). In *Medical and veterinary entomology* (pp. 261-325). Academic press.
- Franklinos, L. H., Jones, K. E., Redding, D. W., & Abubakar, I. (2019). The effect of global change on mosquito-borne disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(9), e302-e312. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2036.
- Gao, H., Cui, C., Wang, L., Jacobs-Lorena, M., & Wang, S. (2020). Mosquito microbiota and implications for disease control. *Trends in Parasitology*, 36(2), 98-111.
- Garzón, M. J., Maffey, L., Lizuain, A., Soto, D., Diaz, P. C., Leporace, M., ... & Schweigmann, N. J. (2021). Temperature and photoperiod effects on dormancy status and life cycle parameters in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from subtropical Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, 35(1), 97-105.
- Georgiou, C. D., 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.

- Gerberg, E. J., Barnard, D. R., & Ward, R. A. (1994). Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *American Mosquito Control Association, Inc.*
- Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., & Belozerskaya, T. A. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1091-1109.
- Goble, T. A., Gardescu, S., Fisher, J. J., Jackson, M. A., & Hajek, A. E. (2016). Conidial production, persistence and pathogenicity of hydromulch formulations of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia under forest conditions. *Biological Control*, 95, 83-93.
- Goh, J., Jeon, J., Kim, K. S., Park, J., Park, S. Y., & Lee, Y. H. (2011). The PEX7-mediated peroxisomal import system is required for fungal development and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS One*, 6(12), e28220.
- Greenfield, B. P., Lord, A. M., Dudley, E., & Butt, T. M. (2014). Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. *Royal Society Open Science*, 1(2), 140193.
- Gutierrez, A. C., Tornesello-Galván, J., Manfrino, R. G., Hipperdinger, M., Falvo, M., D'Alessandro, C., & Lastra, C. C. L. (2017). Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 183-188.
- Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Journal of Medical Entomology*, 38(3), 411-422.
- Hemingway, J., & Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 371-391.
- Huang, Y. J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2019). Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Current Opinion in Virology*, 34, 104-109.
- Huarte-Bonnet, C., Juárez, M. P., & Pedrini, N. (2015). Oxidative stress in entomopathogenic fungi grown on insect-like hydrocarbons. *Current Genetics*, 61(3), 289-297.
- Huarte-Bonnet, C., Paixão, F. R., Mascarin, G. M., Santana, M., Fernandes, É. K., & Pedrini, N. (2019). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces

- microsclerotia-like pellets mediated by oxidative stress and peroxisome biogenesis. *Environmental Microbiology Reports*, 11(4), 518-524.
- Huarte-Bonnet, C., Paixao, F. R., Ponce, J. C., Santana, M., Prieto, E. D., & Pedrini, N. (2018). Alkane-grown *Beauveria bassiana* produce mycelial pellets displaying peroxisome proliferation, oxidative stress, and cell surface alterations. *Fungal Biology*, 122(6), 457-464.
- Huarte-Bonnet, C., Pereira-Junior, R. A., Paixao, F. R., Braga, G. U., Roberts, D. W., Luz, C., Pedrini, N., & Fernandes, E. K. (2020). *Metarhizium robertsii* and *M. acridum* conidia produced on riboflavin-supplemented medium have increased UV-A tolerance and upregulated photoprotection and photoreactivation genes. *BioControl*, 65(2), 211-222.
- Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y. S., Qasim, M., Tayyab, M., Noman, A., Nisar, M. S., AliKhan, K., & Ali, H. (2021). Insect-fungal interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. *Microbial Pathogenesis*, 105-122.
- Jackson, M. A. & Jaronski, S. T. (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.
- Jaronski, S. T. & Jackson, M. A. (2008). Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology* 18, 849-863.
- Jaronski, S. T., & Mascarin, G. M. (2017). Mass production of fungal entomopathogens. *Microbial control of insect and mite pests*, 141-155.
- Jedd, G., & Chua, N. H. (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature Cell Biology*, 2(4), 226-231.
- Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F., & Rehner, S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4), 811-829.
- Kidanu, S., & Hagos, L. (2020). Research and Application of Entomopathogenic Fungi as Pest Management Option: A Review. *Journal of Environment and Earth Science*, 10(3), 31-39.
- Kiel, J. A., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2006). PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic*, 7(10), 1291-1303.

- Klimes, A., & Dobinson, K. F. (2006). A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(4), 283-294.
- Knoblach, B., & Rachubinski, R. A. (2016). How peroxisomes partition between cells. A story of yeast, mammals and filamentous fungi. *Current Opinion in Cell Biology*, 41, 73-80.
- Lacey, L. A. (2017). Entomopathogens used as microbial control agents. In *Microbial Control of Insect And Mite Pests* (pp. 3-12). Academic Press.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biological Control*, 21(3), 230-248.
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41.
- Leger, R. J. S., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1992). Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 120(1), 119-124.
- Leles, R. N., D'Alessandro, W. B., & Luz, C. (2012). Effects of *Metarhizium anisopliae* conidia mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*, 110(4), 1579-1582.
- Leles, R. N., Sousa, N. A., Rocha, L. F. N., Santos, A. H., Silva, H. H. G., & Luz, C. (2010). Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 107(5), 1271-1274.
- Lenth, R. (2020). Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means (Version 1.5. 2-1) [R package].
- Li, L., Wang, J., Chen, H., Chai, R., Zhang, Z., Mao, X., Qiu, H., Jiang, H., Wang, Y., & Sun, G. (2017). Pex14/17, a filamentous fungus-specific peroxin, is required for the import of peroxisomal matrix proteins and full virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant pathology*, 18(9), 1238-1252.
- Liu, B., Wang, H., Ma, Z., Gai, X., Sun, Y., He, S., Liu, X., Wang, Y., Xuan, Y., & Gao, Z. (2018). Transcriptomic evidence for involvement of reactive oxygen species in *Rhizoctonia solani* AG1 IA sclerotia maturation. *PeerJ*, 6, e5103.

- Liu, F., Lu, Y., Pieuchot, L., Dhavale, T., & Jedd, G. (2011). Import oligomers induce positive feedback to promote peroxisome differentiation and control organelle abundance. *Developmental Cell*, 21(3), 457-468.
- Liu, F., Ng, S. K., Lu, Y., Low, W., Lai, J., & Jedd, G. (2008). Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. *The Journal of Cell Biology*, 180(2), 325-339.
- Liu, J., Yin, Y., Song, Z. et al. (2014). NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase and ROS regulate microsclerotium development in *Nomuraea rileyi*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 1927–1935.
- Liu, W. T., Tu, W. C., Lin, C. H., Yang, U. C., & Chen, C. C. (2017). Involvement of cecropin B in the formation of the *Aedes aegypti* mosquito cuticle. *Scientific Reports*, 7(1), 1-17.
- Liu-Helmersson, J., Brännström, Å., Sewe, M. O., Semenza, J. C., & Rocklöv, J. (2019). Estimating past, present, and future trends in the global distribution and abundance of the arbovirus vector *Aedes aegypti* under climate change scenarios. *Frontiers in Public Health*, 7, 148.
- Lobo, L. S., Luz, C., Fernandes, E. K., Juárez, M. P., & Pedrini, N. (2015). Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 128, 14-21.
- Lobo, L. S., Rodrigues, J., & Luz, C. (2016). Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations against dengue vectors under laboratory and field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 26(3), 386-401.
- López Lastra, C. C. (1999). Entomopathogenic fungi as biological control agents of sanitary important insects. State of knowledge. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 58(1-2).
- López Lastra, C. C., & Lecuona, R. E. (2019). *Micopatología de artrópodos: hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas* (No. 632.96). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina).
- Lowenberger, C. (2001). Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(3), 219-229.

- Lowenberger, C., Charlet, M., Vizioli, J., Kamal, S., Richman, A., Christensen, B. M., & Bulet, P. (1999). Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20092-20097.
- Luz, C., Tai, M. H. H., Santos, A. H., Rocha, L. F. N., Albernaz, D. A. S., & Silva, H. H. G. (2007). Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44(5), 799-804.
- Managadze, D., Würtz, C., Wiese, S., Schneider, M., Girzalsky, W., Meyer, H. E. Ralf., Warscheid, B., & Rottensteiner, H. (2010). Identification of PEX33, a novel component of the peroxisomal docking complex in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *European journal of cell biology*, 89(12), 955-964.
- Mannino, M. C., Juárez, M. P., & Pedrini, N. (2018). Tracing the coevolution between *Triatoma infestans* and its fungal pathogen *Beauveria bassiana*. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 319-324.
- Mannino, M. C., Paixão, F. R., & Pedrini, N. (2019). The limpet transcription factors of *Triatoma infestans* regulate the response to fungal infection and modulate the expression pattern of defensin genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 53-60.
- Mapari, S. A., Meyer, A. S., and Thrane, U. (2008). Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. *Biotechnology Letters* 30, 2183–2190.
- Marciano, A. F., Mascarin, G. M., Franco, R. F. F., Golo, P. S., Jaronski, S. T., Fernandes, É. K. K., & Bittencourt, V. R. E. P. (2021). Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. *Scientific Reports*, 11(1), 1-11.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS Journal*, 275(15), 3959-3970.
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W., Dunlap, C. A., & Delalibera Júnior, Í. (2015). Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and

- bioefficacy of blastospores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), 6653-6665.
- Mascarin, G. M., Kobori, N. N., de Jesus Vital, R. C., Jackson, M. A., & Quintela, E. D. (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.
- Ment, D., Shikano, I., & Glazer, I. (2017). Abiotic factors. *Ecology of Invertebrate Diseases*, 143-186.
- Messina, J. P., Brady, O. J., Golding, N., Kraemer, M. U., Wint, G. W., Ray, S. E., Pigott, D. M., Shearer, F. M., Johnson, K., Earl, L., Marczack, L. B., Shirude, S., Weaver, N. D., Gilbert, M., Velayudhan, R., Jones, P., Jaenisch, T., Scott, T. W., Reiner Jr, R. C., & Hay, S. I. (2019). The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature Microbiology*, 4(9), 1508-1515.
- Michán, S., Lledías, F., Baldwin, J. D., Natvig, D. O., & Hansberg, W. (2002). Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 521-532.
- Michiels, C., Raes, V., Toussaint, O., & Remacle, J. (1994). Importance of Cu/Zn-SOD for Se-glutathione cell survival peroxidase, catalase, and against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17, 235-248.
- Milutinović, B., Peuß, R., Ferro, K., & Kurtz, J. (2016). Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *Zoology*, 119(4), 254-261.
- Miranpuri, G. S., & Khachatourians, G. G. (1991). Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 59(1), 19-27.
- Molnár, I., Gibson, D. M., & Krasnoff, S. B. (2010). Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural product reports*, 27(9), 1241-1275.
- Muniz, E. R., Catão, A. M., Rueda-Páramo, M. E., Rodrigues, J., Lastra, C. C. L., García, J. J., Fernandes, E.K.K., & Luz, C. (2018). Impact of short-term temperature challenges on the larvicidal activities of the entomopathogenic water mold *Leptolegnia chapmanii* against *Aedes aegypti*, and development on infected dead larvae. *Fungal Biology*, 122(6), 430-435.

- Nair, R. B., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2016). Mycelial pellet formation by edible ascomycete filamentous fungi, *Neurospora intermedia*. *Amb Express*, 6(1), 1-10.
- Nascimento, E., Da Silva, S. H., dos Reis Marques, E., Roberts, D. W., & Braga, G. U. (2010). Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*. *Photochemistry and Photobiology*, 86(6), 1259-1266.
- Nielsen, J. (1992). Modelling the growth of filamentous fungi. *Modern Biochemical Engineering*, 187-223.
- Opaliński, Ł., Kiel, J. A., Homan, T. G., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2010). *Penicillium chrysogenum* Pex14/17p—a novel component of the peroxisomal membrane that is important for penicillin production. *The FEBS Journal*, 277(15), 3203-3218.
- Osharov, N., & May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS microbiology Letters*, 199(2), 153-160
- Paixão, F. R. S., Muniz, E. R., Barreto, L. P., Bernardo, C. C., Mascarin, G. M., Luz, C., & Fernandes, É. K. (2017). Increased heat tolerance afforded by oil-based conidial formulations of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium robertsii*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(3), 324-337.
- Paixão, F. R., Fernandes, É. K., & Pedrini, N. (2019). Thermotolerance of fungal conidia. In *Microbes for Sustainable Insect Pest Management* (pp. 185-196). Springer, Cham.
- Paixão, F. R., Huarte-Bonnet, C., Ribeiro-Silva, C. D. S., Mascarin, G. M., Fernandes, É. K., & 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, 654737.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189-259.
- Park, H. S., & Yu, J. H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current opinion in Microbiology*, 15(6), 669-677.

- Pedras, M. S. C., Zaharia, L. I., & Ward, D. E. (2002). The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, *59*(6), 579-596.
- Pedrini, N. (2018). Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. *Fungal Biology*, *122*(6), 538-545.
- Pedrini, N. (2022). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* shows its toxic side within insects: secondary metabolites gene expression during pathogenesis. *Journal of Fungi*, *8*, 488.
- Pedrini, N., Juárez, M. P., Crespo, R., & de Alaniz, M. J. (2006). Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. *Mycologia*, *98*(4), 528-534.
- Pereira-Junior, R. A., Huarte-Bonnet, C., Paixão, F. R., Roberts, D. W., Luz, C., Pedrini, N., & Fernandes, É. K. (2018). Riboflavin induces *Metarhizium* spp. to produce conidia with elevated tolerance to UV-B, and upregulates photolyases, laccases and polyketide synthases genes. *Journal of Applied Microbiology*, *125*(1), 159-171.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*, e45.
- Pieuchot, L. & Jedd, G. (2012). Peroxisome assembly and functional diversity in eukaryotic microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, *66*, 237-63.
- Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *108*, 11-17.
- Qu, S. & Wang, S. (2018). Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, *83*, 96-103.
- Quate, F. E., Sutherland, B. M., & Sutherland, J. C. (1992). Action spectrum for DMA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature*, *358*(6387), 576-578.
- R Core Team (2018). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available online at: <https://www.r-project.org> (accessed April 16, 2021).

- Rangel, D. E., Braga, G. U., Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Hallsworth, J. E., & Roberts, D. W. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current Genetics*, 61(3), 383-404.
- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3-4), 67-82.
- Roberts, D. W. & Campbell, A. S. (1976). Stability of entomopathogenic fungi. *Misc. Publ. Entomological Society of America.*, 10(3), 19.
- Rodrigues, J., Bergamini, C., Montalva, C., Humber, R. A., & Luz, C. (2021 a). Simple method to detect and to isolate entomopathogenic fungi (Hypocreales) from mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 182, 107581.
- Rodrigues, J., Borges, P. R., Fernandes, É. K. K., & Luz, C. (2019). Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* sl IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on post mortem conidiogenesis. *Acta Tropica*, 193, 192-198.
- Rodrigues, J., Campos, V. C., Humber, R. A., & Luz, C. (2018). Efficacy of *Culicinomyces* spp. against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults. *Journal of Invertebrate Pathology*, 157, 104-111.
- Rodrigues, J., Catão, A. M. L., Dos Santos, A. S., Paixão, F. R. S., Santos, T. R., Martinez, J. M., Marreto. R.N., Mascarín. G.M., Fernandes. E.K.K., Humber. R.A., & Luz, C. (2021 b). Relative humidity impacts development and activity against *Aedes aegypti* adults by granular formulations of *Metarhizium humeri* microsclerotia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(7), 2725-2736.
- Rodrigues, J., Lobo, L. S., Fernandes, É. K., & Luz, C. (2015). Effect of formulated *Metarhizium anisopliae* on eggs and eclosing nymphs of *Triatoma infestans*. *Journal of Applied Entomology*, 139(1-2), 146-153.
- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Pell, J. K. (2006). Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*, 51, 331-357.
- Rubio, A., Cardo, M. V., & Vezzani, D. (2011). Tire-breeding mosquitoes of public health importance along an urbanisation gradient in Buenos Aires, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 678-684.

- Ryan, S. J., Carlson, C. J., Mordecai, E. A., & Johnson, L. R. (2019). Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(3), e0007213.
- Sant, N., Iwanicki, A., Pereira, A. A., Botelho, A. B. R. Z., Rezende, J. M., Andrade Moral, R., Zucchi, M.I., & Júnior, I. D. (2019). Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-12.
- Santiago, P. B., de Araújo, C. N., Motta, F. N., Praça, Y. R., Charneau, S., Bastos, I. M. D., & Santana, J. M. (2017). Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity-a review. *Parasites & Vectors*, *10*(1), 1-20.
- Santos, T. R., Paixão, F. R. S., Catão, A. M. L., Muniz, E. R., Ribeiro-Silva, C. S., Taveira, S. F., Luz, C., Mascarin, G. M., Fernandes, E. K.K., & Marreto, R. N. (2021). Inorganic pellets containing microsclerotia of *Metarhizium anisopliae*: a new technological platform for the biological control of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12.
- Scholte, E. J., Takken, W., & Knols, B. G. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta tropica*, *102*(3), 151-158.
- Scolari, F., Casiraghi, M., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes* spp. and their microbiota: a review. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2036.
- Sevim, A., Donzelli, B. G., Wu, D., Demirbag, Z., Gibson, D. M., & Turgeon, B. G. (2012). Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Current Genetics*, *58*(2), 79-92.
- Shapiro-Ilan, D. I., Bruck, D. J., & Lacey, L. A. (2012). Principles of epizootiology and microbial control. *Insect Pathology*, *2*, 29-72.
- Shaw, W. R., & Catteruccia, F. (2019). Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature Microbiology*, *4*(1), 20-34.
- Shen, D., Nyawira, K. T., & Xia, A. (2020). New discoveries and applications of mosquito fungal pathogens. *Current Opinion in Insect Science*.

- Shin, T. Y., Lee, M. R., Park, S. E., Lee, S. J., Kim, W. J., & Kim, J. S. (2020). Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 105(4), e21747.
- Skiff, J. J., & Yee, D. A. (2014). Behavioral differences among four co-occurring species of container mosquito larvae: effects of depth and resource environments. *Journal of Medical Entomology*, 51(2), 375-381.
- Snodgrass, R. E. (1959). The anatomical life of the mosquito. *Smithsonian Miscellaneous Collections*.
- 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.
- Song, Z., Shen, L., Yin, Y., Tan, W., Shao, C., Xu, J., & Wang, Z. (2015). Role of two *Nomuraea rileyi* transmembrane sensors Sho1p and Sln1p in adaptation to stress due to changing culture conditions during microsclerotia development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 477-485.
- Song, Z., Shen, L., Zhong, Q., Yin, Y., & Wang, Z. (2016 a). Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematology*, 18(6), 719-726.
- 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.
- 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), 1-9.
- Song, Z., Yin, Y., Lin, Y., Du, F., Ren, G., & Wang, Z. (2018). The bZip transcriptional factor activator protein-1 regulates *Metarhizium rileyi* morphology and mediates microsclerotia formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(10), 4577-4588.
- Song, Z., Zhong, Q., Yin, Y., Shen, L., Li, Y., & Wang, Z. (2016 b). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate morphology, microsclerotia development, and virulence in *Metarhizium rileyi*. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.

- Sosa-Gómez, D. R., Lastra, C. C. L., & Humber, R. A. (2010). An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. *Mycopathologia*, *170*(1), 61-76.
- Steiner, H., Andreu, D., & Merrifield, R. B. (1988). Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *939*(2), 260-266.
- Suesdek, L. (2019). Microevolution of medically important mosquitoes—A review. *Acta Tropica*, *191*, 162-171.
- Tanada, Y. (1959). Microbial control of insect pests. *Annual Review of Entomology*, *4*(1), 277-302.
- Tang, G., Shang, Y., Li, S., & Wang, C. (2020). MrHex1 is required for Woronin body formation, fungal development and virulence in *Metarhizium robertsii*. *Journal of Fungi*, *6*(3), 172.
- Tawidian, P., Rhodes, V. L., & Michel, K. (2019). Mosquito-fungus interactions and antifungal immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *111*, 103182.
- Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet relationship between morphology and productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(7), 2997-3006.
- Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet relationship between morphology and productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(7), 2997-3006.
- Venables, W. N., & Ripley, B. D. (2002). Linear statistical models. In *Modern applied statistics with S* (pp. 139-181). Springer, New York, NY.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., & Ranson, H. (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *104*(2), 126-131.
- Walker, G. M., & White, N. A. (2017). Introduction to fungal physiology. *Fungi: Biology and Applications*, 1-35.
- Wang, J. B., Leger, R. S., & Wang, C. (2016). Advances in genomics of entomopathogenic fungi. *Advances in Genetics*, *94*, 67-105.
- Wang, J., Lovett, B., & Leger, R. J. S. (2019). The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi. *Fungal Ecology*, *38*, 7-11.

- Wang, Z. L., Zhang, L. B., Ying, S. H., & Feng, M. G. (2013). Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environmental Microbiology*, 15(2), 409-418.
- Wei, L., Yang, Y., Zhou, Y., Li, M., Yang, H., Mu, L., Qian, Q., Wu, J., & Xu, W. (2018). Anti-inflammatory activities of *Aedes aegypti* cecropins and their protection against murine endotoxin shock. *Parasites & Vectors*, 11(1), 1-13.
- Wellmann, E. (1983). UV radiation in photomorphogenesis. In *Photomorphogenesis* (pp. 745-756). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, NY: Springer.
- Willettts, H. J. (1971). The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. *Biological Reviews*, 46(3), 387-407.
- Willettts, H. J. (1972). The morphogenesis and possible evolutionary origins of fungal sclerotia. *Biological Reviews*, 47(4), 515-536.
- Wösten, H. A. (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*, 55, 625-646.
- Wu, Q., Patočka, J., & Kuča, K. (2018). Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins*, 10(11), 461.
- Wu, R. C. C., Chang-Chien, Y. C., Wang, W. J., & Cho, W. L. (2020). Studies of Gene Regulation and Functions of An Antimicrobial Peptide *Aedes aegypti* Cecropin N (AaCECN) with Bactericidal Activity against a Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Adaptive Medicine*, 12(2), 30-41.
- Wyrebek, M., & Bidochka, M. J. (2013). Variability in the insect and plant adhesins, Mad1 and Mad2, within the fungal genus *Metarhizium* suggest plant adaptation as an evolutionary force. *PLoS One*, 8(3), e59357.
- Xin, C., Xing, X., Wang, F., Liu, J., Ran, Z., Chen, W. Wang, G. & Song, Z. (2020). MrMid2, encoding a cell wall stress sensor protein, is required for conidium production, stress tolerance, microsclerotium formation and virulence in the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi*. *Fungal Genetics and Biology*, 134, 103278.
- Yarden, O., Veluchamy, S., Dickman, M. B., & Kabbage, M. (2014). *Sclerotinia sclerotiorum* catalase SCAT1 affects oxidative stress tolerance, regulates

- ergosterol levels and controls pathogenic development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 85, 34-41.
- Zeng, G., Zhang, P., Zhang, Q., Zhao, H., Li, Z., Zhang, C.W., Yin, W.B., & Fang, W. (2018). Duplication of a Pks gene cluster and subsequent functional diversification facilitate environmental adaptation in *Metarhizium* species. *PLoS Genetics*, 14(6), e1007472.
- Zhang, J., & Zhang, J. (2016). The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1066-1077.
- Zhang, L., Wang, L., Liang, Y., & Yu, J. (2019). FgPEX4 is involved in development, pathogenicity, and cell wall integrity in *Fusarium graminearum*. *Current Genetics*, 65(3), 747-758.
- Zhang, X., St. Leger, R. J., & Fang, W. (2017). Pyruvate accumulation is the first line of cell defense against heat stress in a fungus. *MBio*, 8(5), e01284-17.
- Zhao, T., Tian, H., Xia, Y., & Jin, K. (2019). MaPmt4, a protein O-mannosyltransferase, contributes to cell wall integrity, stress tolerance and virulence in *Metarhizium acridum*. *Current Genetics*, 65(4), 1025-1040.
- Zhu, G., Liu, T., Xiao, J., Zhang, B., Song, T., Zhang, Y., Lin, L., Peng, Z., Deng, A. Ma.W., & Hao, Y. (2019). Effects of human mobility, temperature and mosquito control on the spatiotemporal transmission of dengue. *Science of the Total Environment*, 651, 969-978.
- Zhu, X. G., Tong, S. M., Ying, S. H., & Feng, M. G. (2018). Antioxidant activities of four superoxide dismutases in *Metarhizium robertsii* and their contributions to pest control potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9221-9230.
- Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375-379.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879-920.