



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Caracterización molecular de genes del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* involucrados en la captación y degradación de hidrocarburos de insecto***

---

**Tesista: Lic. HUARTE BONNET, Carla**

**Director: PEDRINI, Nicolás**

**Año: 2017**

**El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas 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. Nicolás Pedrini.**

### **Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis:**

- Huarte-Bonnet C, Juárez MP, Pedrini N, 2015. Oxidative stress in entomopathogenic fungi grown on insect-like hydrocarbons. *Current Genetics* **61**: 289–297.
- Huarte-Bonnet C, Kumar S, Saparrat M, Girotti JG, Santana M, Hallsworth JE, Pedrini N, 2017. Insights into hydrocarbon assimilation in eurotial and hypocrealean fungi: roles for CYP52 and CYP53 clans of cytochrome P450 genes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2608-z>
- Huarte-Bonnet C, Paixao FRS, Ponce JC, Santana M, Prieto ED, Pedrini N, 2017. Alkane-grown *Beauveria bassiana* produce mycelial pellets displaying peroxisome proliferation, oxidative stress and cell surface alterations. *Fungal Biology* <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.09.003>

### **Trabajos publicados durante la realización de este trabajo de tesis:**

- Pedrini N, Ortiz-Urquiza A, Huarte-Bonnet C, Zhang S, Keyhani NO, 2013. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology* **4**: 1–18.
- Pedrini N, Ortiz-Urquiza A, Huarte-Bonnet C, Fan Y, Juárez MP, Keyhani NO, 2015. Tenebrionid secretions and a fungal benzoquinone oxidoreductase form competing components of an arms race between a host and pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: E3651–E3660.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Control Microbiano de Plagas</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Los hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano</b> .....	<b>4</b>
2.1. <i>Beauveria bassiana</i> .....	5
<b>3. Propágulos fúngicos</b> .....	<b>5</b>
3.1. Conidios .....	6
3.2. Blastosporos.....	6
3.3. Pellets miceliales .....	7
3.4. Microesclerocios .....	7
<b>4. Estrés fúngico</b> .....	<b>8</b>
4.1. Defensa antioxidante en <i>B. bassiana</i> .....	9
4.2. Peroxidación lipídica por estrés oxidativo .....	11
<b>5. Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos</b> .....	<b>11</b>
<b>6. Interacción entre los hongos entomopatógenos y la cutícula de insectos</b> .....	<b>15</b>
6.1. Captación de hidrocarburos cuticulares por los hongos entomopatógenos.....	16
6.1.1. Biosurfactantes .....	16
6.2. Degradación de hidrocarburos epicuticulares.....	17
6.2.1. Biogénesis de peroxisomas.....	18
6.2.2. Citocromo P450 monooxigenasas .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>1. Crecimiento y mantenimiento de <i>Beauveria bassiana</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2. Crecimiento en medio sólido</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Crecimiento en medio líquido</b> .....	<b>25</b>
3.1. Crecimiento en medio completo .....	25
3.2. Crecimiento en medios mínimos con hidrocarburos .....	26
<b>4. Viabilidad de los propágulos</b> .....	<b>26</b>
4.1. Producción de conidios/ viabilidad de conidios producidos .....	27
4.2. Termotolerancia.....	27
<b>5. Ensayo de hidrofobicidad</b> .....	<b>28</b>
<b>6. Microscopías</b> .....	<b>28</b>
6.1. Microscopía óptica .....	28
6.2. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).....	29
6.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	29
<b>7. Bioensayos de mortalidad</b> .....	<b>30</b>
<b>8. Actividad enzimática y peroxidación lipídica</b> .....	<b>31</b>
8.1. Obtención de homogenatos fúngicos .....	31
8.2. Cuantificación de proteínas totales.....	31
8.3. Actividades enzimáticas.....	32
<b>9. Análisis de expresión diferencial de genes mediante qPCR.</b> .....	<b>33</b>
9.1. Extracción de ARN.....	33
9.4. Diseño de los primers utilizados.....	36
<b>10. Aislamiento y caracterización de biosurfactantes</b> .....	<b>39</b>
10.1. Aislamiento .....	39
10.2. Métodos colorimétricos.....	39

10.3. Metanólisis ácida.....	40
10.4. Cromatografía en capa fina (TLC).....	40
10.5. Cromatografía gaseosa capilar (CGC) acoplada a espectrometría de masa (MS). .....	41
10.6. Cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico utilizando un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) .....	42
<b>11. Análisis estadístico.....</b>	<b>42</b>
<b>SECCIÓN I .....</b>	<b>43</b>
<i>Resultados</i> .....	<b>44</b>
<b>Crecimiento de <i>B. bassiana</i> en medios sólidos suplementados con hidrocarburos .....</b>	<b>45</b>
<b>Crecimiento de <i>B. bassiana</i> en medios líquidos suplementados con hidrocarburos ...</b>	<b>46</b>
<b>Expresión diferencial de genes en <i>B. bassiana</i> crecido en hidrocarburos .....</b>	<b>49</b>
<b>Actividad enzimática de células crecidas en hidrocarburos.....</b>	<b>51</b>
<b>Aislamiento y caracterización de glicolípidos (biosurfactantes) .....</b>	<b>52</b>
Caracterización de la fracción hidrófila de la metanólisis .....	54
Caracterización de la fracción hidrofóbica de la metanólisis.....	55
Expresión diferencial de genes potencialmente involucrados en la biosíntesis de glicolípidos .....	57
<i>Discusión</i> .....	<b>59</b>
<b>SECCIÓN II.....</b>	<b>67</b>
<i>Resultados</i> .....	<b>68</b>
<b>Aislamiento de pellets miceliales .....</b>	<b>69</b>
<b>Observaciones por microscopía.....</b>	<b>70</b>
<b>Expresión diferencial de genes en pellets miceliales: marcadores de estrés oxidativo, biosíntesis de peroxisomas e hidrofobinas.....</b>	<b>73</b>
<b>Caracterización de pellets como potenciales propágulos de biocontrol .....</b>	<b>76</b>
Esporulación.....	76
Termotolerancia .....	76
Bioensayos de patogenicidad.....	77
<i>Discusión</i> .....	<b>78</b>
<b>Sección III.....</b>	<b>83</b>
<i>Resultados</i> .....	<b>84</b>
<b>Microesclerocios .....</b>	<b>85</b>
<b>Caracterización celular y molecular de microesclerocios.....</b>	<b>87</b>
<b>Caracterización de microesclerocios como propágulos para biocontrol.....</b>	<b>91</b>
<i>Discusión</i> .....	<b>92</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVOS Y BUFFERS .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>100</b>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>AFM</b> microscopía de fuerza atómica	<b>MC</b> medio completo
<b>Bb</b> <i>Beauveria bassiana</i>	<b>ME</b> microesclerocio
<b>BC</b> biomasa de MC	<b>MIP</b> manejo integrado de plagas
<b>BM</b> biomasa de MM-C16	<b>MM</b> medio mínimo
<b>CAT</b> catalasa	<b>MM-C16</b> MM suplementado con hexadecano
<b>CGC</b> cromatografía gaseosa capilar	<b>MM-C28</b> MM suplementado con octacosano
<b>CYP</b> citocromo P450	<b>MS</b> espectrometría de masa
<b>DAB</b> 3-3´diaminobencidina	<b>PAD</b> detector de pulso amperométrico
<b>ER</b> expresión relativa	<b>PDA</b> agar papa-dextrosa
<b>GPx</b> glutatión peroxidasa	<b>PM</b> pellets miceliales
<b>GSH</b> glutatión	<b>qPCR</b> PCR cuantitativa a tiempo real
<b>GST</b> glutatión-S-transferasa	<b>ROS</b> especies reactivas de oxígeno
<b>HC</b> hidrocarburos alifáticos	<b>SOD</b> superóxido dismutasa
<b>HPAEC</b> cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico	<b>TEM</b> microscopía de transmisión electrónica
<b>Hyd</b> hidrofobina	<b>TLC</b> cromatografía en capa fina
<b>IH</b> índice de hidrofobicidad	<b>U</b> unidad de actividad enzimática
<b>LPO</b> peroxidación lipídica	<b>UFC</b> unidades formadoras de colonias

# **INTRODUCCIÓN**

### 1. Control Microbiano de Plagas

Se proyecta que la población mundial ascenderá a 9.700 millones de habitantes en el año 2050. En este escenario, el desarrollo de estrategias para asegurar la provisión de alimentos de manera económica y sustentable se ha convertido en una prioridad global (Godfray et al., 2010). Los artrópodos plaga son los principales responsables en la limitación de la producción de alimentos. Se estima que las pérdidas económicas debido al daño a cultivos causadas por estas plagas ascienden a varios billones de dólares por año, correspondiendo a aproximadamente el 15% de la producción global (Hussain et al., 2014). El control de artrópodos plaga con pesticidas químicos ha sido la estrategia más ampliamente utilizada a lo largo de los años. Sin embargo, su uso ha traído como consecuencia varios problemas como la prevalencia de poblaciones resistentes a insecticidas, brotes de plagas secundarias normalmente controladas por enemigos naturales, riesgos de seguridad para humanos y animales domésticos, contaminación de aguas subterráneas, disminución de la biodiversidad y otras preocupaciones ambientales. Estos problemas han estimulado un mayor interés en el manejo integrado de plagas (MIP), que propone la utilización de productos químicos más selectivos, menos tóxicos, aplicándolos en dosis mínimas y complementándolos con otras estrategias de control ecológicamente aceptables. Entre sus tácticas se destaca el control biológico, basado en el empleo de bioplaguicidas: productos derivados de animales, plantas y microorganismos (entomopatógenos) para prevenir, repeler, eliminar o reducir los daños causados por las plagas (Lecuona, 1996; Lacey et al., 2001; Kumar y Kalita, 2017). En este sentido, distintos microorganismos se emplean como agentes de control microbiano (una rama del control biológico) de insectos en cultivos al aire libre e invernaderos, huertos, plantas ornamentales, pastos y césped, productos almacenados y silvicultura; así como para el control de insectos vectores de enfermedades de importancia

médica y veterinaria. Los organismos entomopatógenos utilizados para el control microbiano incluyen bacterias, virus, hongos, protozoos y nematodos (Lacey et al., 2015). Sumado a su eficacia, las ventajas para su uso son numerosas, e incluyen seguridad para los seres humanos y otros organismos no blanco, reducción de los residuos de plaguicidas en los alimentos, rápida biodegradación, preservación de otros enemigos naturales y aumento de la biodiversidad en los ecosistemas. Sin embargo, en la actualidad los bioplaguicidas sólo conforman un 5% del mercado para la protección de cultivos (Lacey et al., 2001; Lacey et al., 2015; Deshayes et al., 2017). Los motivos están relacionados con la velocidad de muerte de sus hospedadores, persistencia, especificidad (rango de acción demasiado amplio o demasiado estrecho) y costos de producción y almacenamiento comparados con los insecticidas químicos convencionales. Su mayor utilización requerirá mejoras en diversos aspectos, como en la velocidad de muerte, en el rendimiento en condiciones ambientales específicas, en la eficiencia en su producción y formulación que permitan una fácil aplicación, mayor persistencia ambiental y mayor vida útil. Por otra parte, se requiere una mayor comprensión de cómo articularán en los sistemas integrados de manejo mediante su interacción con el medio ambiente y con otros componentes del MIP, y una mayor apreciación de sus ventajas ambientales para la aceptación de los productores y el público en general (Lacey et al., 2001, Deshayes et al., 2017).

### 2. Los hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano

En la actualidad, los hongos entomopatógenos son utilizados para el control biológico de un gran número de especies plaga de sistemas agrícolas, incluyendo áfidos, escarabajos, saltamontes, polillas, mariposas, termitas, gorgojos, moscas blancas (Lacey et al., 2015; Deshayes et al., 2017), así como de artrópodos de importancia médica y veterinaria, como mosquitos, vinchucas, chinches de cama, garrapatas y moscas *tse tse* (Blanford et al., 2005; Scholte et al., 2006; Pedrini et al., 2009; Fang y St. Leger, 2012; Fernandes et al., 2012; Maniania et al., 2013; Zhao et al., 2016, Barbarin et al., 2017).

Los hongos entomopatógenos no afectan negativamente a organismos no-blanco, son de producción fácil y económica, muestran una alta especificidad y son seguros para el operador que los aplica. Además, pueden iniciar epizootias donde el hongo es transmitido eficientemente de forma horizontal y pueden replicarse dentro de sus hospedadores, produciendo esporas virulentas. Asimismo, también pueden ser endófitos de plantas, antagonistas de fitopatógenos, colonizadores de la rizósfera y promotores del crecimiento de las plantas. Estos atributos recientemente reportados ofrecen la posibilidad de utilizar hongos en múltiples roles (Moonjeli et al., 2016). Además del control de plagas de artrópodos, algunas especies de hongos podrían simultáneamente suprimir patógenos de plantas y nematodos parásitos de plantas, así como promover el crecimiento de las mismas (Lacey et al., 2001; Hussain et al., 2014).

Se ha recopilado una lista de 171 micoinsecticidas y micoacaricidas en el mundo (de Faria and Wright, 2007). De ellos, solo nueve especies fúngicas están disponibles en el mercado como agentes microbianos de control biológico: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Hirsutella thompsonii*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium (Verticillium) spp.*,

*Metarhizium spp*, *Sporothrix insectorum*, *Conidiobolus thromboides* y *Lagenidium giganteum* (Deshayes et al., 2017).

### 2.1. *Beauveria bassiana*

*Beauveria bassiana* es un hongo cosmopolita de aspecto hialino, de conidios esféricos, típicamente entre 1,5 y 5,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, y paredes lisas. Ha sido aislado del suelo, artrópodos, tejidos vegetales vivos y aire (Feng et al., 1994; Zimmerman, 2007; Rehner et al., 2011). *Beauveria bassiana* es una de las especies de hongos entomopatógenos más estudiada, con un amplio rango de hospedadores que superan las 200 especies de insectos dentro de nueve órdenes, entre los que se destacan Leditróptera y Coleóptera, y se extiende también a garrapatas y ácaros (Feng et al., 1994; Mascarin y Jaronski, 2016). Asimismo, tiene la capacidad de formar interacciones simbióticas con plantas (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2016), evidenciando un rol protector contra patógenos de plantas (Ownley et al., 2008).

### 3. Propágulos fúngicos

Para la utilización de hongos como bioplaguicidas, es necesario producir la máxima cantidad de propágulos fúngicos vivos, estables e infectivos para el insecto blanco a controlar. Es crucial entonces que los hongos puedan ser producidos masivamente de manera económica y almacenarse correctamente manteniendo su capacidad infectiva en el ambiente donde fueran a utilizarse. Para ello, se emplean sistemas de producción líquidos y sólidos, siendo los primeros de preferencia por su sencillo control de variables en el proceso, como pH, agitación, aireación y temperatura, entre otras variables (Deshpande, 1999; Jackson et al., 2010).

Los propágulos más estudiados y utilizados en productos comerciales son los conidios; sin embargo, en los últimos años se han desarrollado formulaciones basadas en blastosporos y algunas más novedosas basadas en cúmulos hifales (Jackson et al., 2010, Lacey et al., 2015).

### 3.1. Conidios

Los conidios pueden ser aéreos o sumergidos. Los aéreos se obtienen en cultivos de soporte sólido y representan los propágulos más utilizados en formulaciones por su resistencia a factores abióticos (de Faria y Wraight, 2007). En *B. bassiana*, los conidios aéreos son muy hidrofóbicos, presumiblemente por la presencia de hidrofobinas en su superficie, con la capacidad de adherirse a superficies altamente hidrofóbicas, como la cutícula de insectos (Holder y Keyhani, 2005; Holder et al., 2007). En cambio, los conidios sumergidos son producidos en medios líquidos ricos, son células relativamente hidrofóbicas, pudiendo adherirse a todo tipo de superficies (Holder y Keyhani, 2005; Holder 2007).

### 3.2. Blastosporos

Los blastosporos son producidos artificialmente en medios líquidos. Son células similares a levaduras de rápido crecimiento, que al igual que los cuerpos hifales producidos *in vivo*, tienen la capacidad de evadir el sistema inmune del hospedador (Holder et al., 2007; Jackson et al., 2010). Los blastosporos de *I. fumosorosea* y *B. bassiana* son estables, tolerantes a la desecación, tienen bajos costos de producción en medios apropiados, son viables luego de su almacenamiento por tiempos prolongados, así como patógenos de ninfas de mosca blanca en condiciones de laboratorio (Mascarin et al., 2015).

### 3.3. Pellets miceliales

En cultivos líquidos, la morfología de crecimiento en hongos filamentosos varía desde micelios libremente dispersos a pellets densos. Los pellets miceliales son agregados esféricos de una red ramificada y parcialmente entrelazada de hifas. Han sido ampliamente estudiados para la producción de metabolitos en cultivos industriales como ácido cítrico, glucosa oxidasa y glucoamilasa, entre otros, ya que puede evitarse el aumento en la viscosidad del cultivo, y para estos casos, la transferencia de oxígeno y nutrientes es considerablemente mejor que en cultivos de micelio convencionales. Sin embargo, la utilización de pellets también trae aparejados inconvenientes por la formación de un gradiente de nutrientes hacia el centro de la estructura, por lo que su implementación en los cultivos depende de la naturaleza del producto de interés (Wucherpennig et al., 2010). No se ha reportado la formación de pellets miceliales en *B. bassiana*.

### 3.4. Microesclerocios

Los esclerocios son agregados hifales compactos que frecuentemente se presentan como estructuras de resistencia que se melanizan durante su desarrollo. Estas estructuras fúngicas han sido ampliamente reportadas en hongos fitopatógenos, y en menor medida, en hongos entomopatógenos. Asimismo, se halló que los cuerpos esclerotiales encontrados en cadáveres de insectos podían producir conidios infectivos (Speare, 1920; Sprengel et al., 1977). El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* produce grandes cantidades de esclerocios pequeños, bajo condiciones nutricionales específicas en fermentaciones líquidas, denominados microesclerocios (ME) (Jackson et al., 2010). Los ME son estructuras de 500-600  $\mu\text{m}$  que típicamente se presentan de forma melanizada, toleran la desecación y son capaces de utilizar reservas endógenas para la producción de conidios (Jackson y Payne, 2016). Se ha comprobado su eficiencia en ensayos de laboratorio contra distintas especies de

insectos como *Tetanops myopaeformis*, *Frankliniella occidentalis*, *Alphitobius diaperinus*, *Etiella zinckenella*, *Ixodes scapularis*, *Popillia japonica*, *Phyllophaga spp.*, *Cyclocephala spp* y *Anoplophora glabripennis* (Jaronski y Jackson, 2008; Jackson y Jaronski, 2009; Wang et al., 2012; Behle et al., 2013; Behle y Jackson, 2014; Song et al., 2014; Behle y Goett, 2016; Globe et al., 2016). También se evaluó la persistencia y viabilidad de microesclerocios de *M. brunneum* en suelos, así como su efectividad para controlar *Popillia japonica* en ensayos a campo (Behle et al., 2015; Behle y Goett, 2016). Se ha sugerido que la diferenciación de conidios a ME es desencadenada por un escenario de estrés oxidativo (Papapostolou y Georgiou, 2010a, 2010b; Song et al., 2013; Jiang et al., 2014; Liu et al., 2014; Zhou et al., 2015).

#### 4. Estrés fúngico

Existen diferentes situaciones de estrés que los hongos entomopatógenos deben atravesar y mitigar durante su desarrollo, entre los que se destacan estrés térmico, estrés a la radiación solar, estrés osmótico y estrés oxidativo (Lovett y St. Leger, 2015). Durante el proceso de infección, los hongos entomopatógenos conviven en distintos ambientes, incluyendo la epicutícula de naturaleza hidrofóbica, la procutícula compuesta de quitina, y la hemolinfa hipertónica. Por lo tanto, durante el ciclo de infección, cada proceso particular presenta un desafío diferente que el hongo debe atravesar para culminar un ciclo infectivo exitoso (Pedrini, 2017). Se ha demostrado que cada uno de estos procesos involucra la expresión de cientos de genes relacionados con transducción de señales, degradación de cutícula, evasión del sistema inmune y reorganización de la pared celular (Lovett y St. Leger, 2015). Asimismo, se ha descrito que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están

involucradas en la metamorfosis a ME (Papapostolou y Georgiou, 2010a, 2010b; Song et al., 2013; Jiang et al., 2014; Liu et al., 2014; Zhou et al., 2015).

La baja supervivencia luego de su aplicación a campo se debe en mayor medida a la exposición a factores abióticos como la radiación solar y diferentes temperaturas que limitan su eficiencia (Fernandes et al., 2015; Lovett y St. Leger, 2015; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2015). La radiación ultravioleta provoca la formación de radicales superóxido, la formación de dímeros de pirimidina y/o 6-4 fotoproductos en el ADN, que pueden causar distorsión en la hélice de ADN y errores en la replicación (Fernandes et al., 2007). Las fluctuaciones de temperatura pueden provocar un desbalance osmótico, así como la generación de radicales libres. Para mitigar estos efectos, se ha hallado que el hongo es capaz de producir carbohidratos solubles como trehalosa y manitol (Lovett y St. Leger, 2015; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2015).

Las ROS pueden aparecer por efectos ambientales o debido a procesos metabólicos internos. Dada su naturaleza, pueden provocar daño en componentes celulares como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. Sin embargo, algunas ROS como el óxido nítrico también pueden funcionar como moléculas de señalización. Asimismo, las ROS pueden provenir de las defensas del hospedador o bien pueden producirse en el hongo para atacar las estructuras y defensas del insecto. Más allá de la fuente, la habilidad de responder frente a estas especies es crítica, y para ello los hongos utilizan un sistema de defensa antioxidante parcialmente solapado (Huarte-Bonnet et al., 2015; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2015).

### **4.1. Defensa antioxidante en *B. bassiana***

Las especies reactivas de oxígeno incluyen peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radicales libres como radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) e iones superóxido ( $\text{O}_2 \bullet^-$ ), que pueden ser

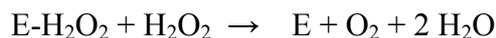
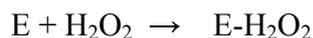
degradadas a través de varios mecanismos específicos e inespecíficos (Luschak, 2011). Las enzimas más importantes en la detoxificación de estos compuestos son:

### *Superóxido dismutasas (SOD)*

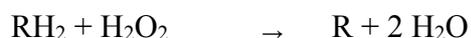
Las SOD son metaloproteínas que detoxifican los radicales superóxido convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno y agua (Fridovich, 1995). *B. bassiana* presenta 3 isoformas: una SOD dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) localizada en el citosol y codificada por el gen *Bbsod1* y dos SOD dependientes de manganeso (Mn-SOD) localizadas en el citosol y en la mitocondria y codificadas por los genes *Bbsod2* y *Bbsod3*, respectivamente (Xie et al., 2010, 2012).

### *Catalasas (CAT)*

Las CAT son enzimas que catalizan la degradación del peróxido de hidrógeno. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede actuar como sustrato y dador de hidrógeno simultáneamente (función catalasa) produciendo H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>:



O bien, ser utilizado para oxidar diversos compuestos (alcoholes, aldehídos) mediante una peroxidación (función peroxidasa):



De acuerdo a estos mecanismos, existen dos tipos de catalasas: las catalasa-peroxidasas (bifuncionales) y las catalasas verdaderas (monofuncionales). La familia de la catalasas de *B. bassiana* se compone de cinco isoformas: *CATA* (específica de esporas), *CATB* (secretada), *CATP* (peroxisómica), *CATC* (citoplásmica) y *CATD* (catalasa/peroxidasa secretada) (Wang et al., 2013).

### *Glutación peroxidadas (GPx)*

Las GPx son enzimas dependientes de selenio que reducen el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos, tales como hidroperóxidos de ácidos grasos, oxidando moléculas de glutación (GSH) (Michiels et al., 1994).

### *Glutación-S-transferasas (GST)*

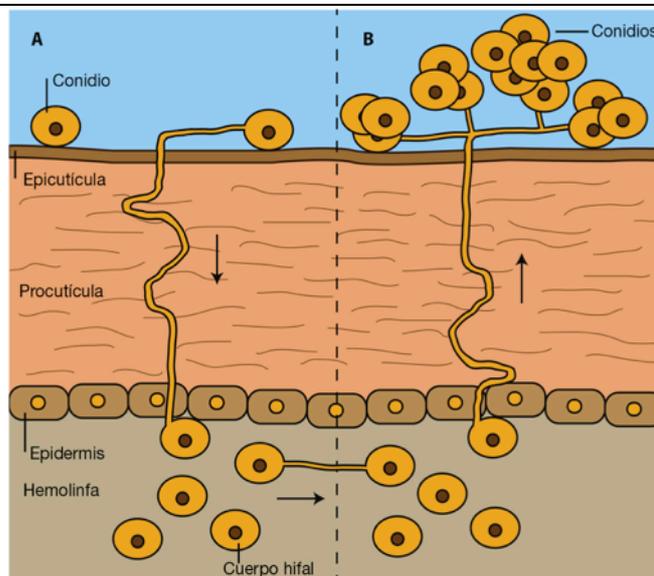
Las GST son enzimas de detoxificación de fase II que presentan la capacidad de conjugar una amplia gama de xenobióticos potencialmente dañinos con el GSH (Ketterer et al., 1983).

## **4.2. Peroxidación lipídica por estrés oxidativo**

Las membranas celulares son especialmente vulnerables a la oxidación por ROS debido a su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (Esterbauer, 1996). La peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LPO) provoca daños estructurales en las membranas y genera productos secundarios altamente tóxicos. El grado de peroxidación lipídica es uno de los parámetros más utilizados para cuantificar el daño inducido por radicales libres a nivel celular (Esterbauer, 1996; Pamplona et al 2002; Catalá, 2006).

## **5. Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos**

A diferencia de otros patógenos de insectos, los hongos entomopatógenos no necesitan ser ingeridos para comenzar el ciclo infeccioso, ya que en general invaden al hospedador mediante la penetración de su cutícula (Pedrini et al., 2007). El ciclo infeccioso se esquematiza en la figura 1.



**Figura 1:** Esquema del ciclo infeccioso de hongos entomopatógenos, adaptado de Valero-Jiménez et al. (2016). **(A)** Un conidio se adhiere a la cutícula del insecto (paso 1). El conidio germina y se produce el tubo germinal (paso 2). La presión mecánica, la secreción de enzimas y la degradación de componentes cuticulares se emplean para romper la cutícula (paso 3). El hongo cambia al crecimiento de cuerpos hifales (semejantes a blastosporos) para colonizar el hemocele del hospedador (paso 4), donde secreta toxinas y se alimenta de azúcares en la hemolinfa. Los blastosporos evaden o superan las respuestas inmunes del hospedador (paso 5). **(B)** Después de que el huésped ha muerto (paso 6), el hongo rompe la cutícula nuevamente desde el interior y esporula en el cadáver (paso 7). Las flechas indican la dirección del crecimiento de las células fúngicas.

Las etapas mediante las cuales se produce la infección fúngica se detallan a continuación:

#### *Adherencia de los hongos a la superficie cuticular*

El primer paso en el proceso de infección es la adhesión de conidios en la superficie del hospedador. Como la mortalidad es dependiente de la dosis, es crucial que la mayor cantidad de conidios puedan adherirse a la cutícula (Butt et al., 2016). La fijación de los conidios a la superficie depende de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas inespecíficas entre la superficie de los conidios y la cutícula del insecto (Butt et al., 2016; Valero-Jiménez et al., 2016). En *B. bassiana* la superficie de los conidios aéreos contiene una capa compuesta de hidrofobinas que facilitan la fijación de los mismos en la superficie de la cutícula. Las hidrofobinas son proteínas fúngicas anfipáticas que facilitan la interacción entre interfases hidrofílicas-hidrofóbicas (Holder y Keyhani, 2005; Vigueras et al., 2014). En *B. bassiana* se

han descrito dos genes codificantes para hidrofobinas, *Bbhyd1* y *Bbhyd2*, cruciales para la adhesión de la superficie celular de conidios a matrices hidrofóbicas (Zhang et al., 2011). Existen otras proteínas de la pared celular, como las adhesinas, importantes en el proceso de adhesión (Wang y Wang, 2017).

### *Germinación del hongo y crecimiento en la superficie cuticular del insecto*

Cuando las condiciones del microambiente son favorables (como la temperatura, humedad y fuentes carbono exógenas), los conidios aumentan su tamaño y forman una o varias evaginaciones que se prolongan hasta generar tubos germinales. A partir de estas estructuras hifales, pueden originarse hifas laterales cortas y especializadas como órganos de fijación que se denominan apresorios. Estas estructuras proporcionan al hongo una sujeción mecánica para permitir la perforación de la cutícula (Valero-Jiménez et al., 2016). En algunos casos, los apresorios pueden originarse a partir de conidios o de hifas. En otros casos, el proceso de penetración puede desencadenarse sin la formación de apresorios (Butt et al., 2016).

### *Degradación enzimática de los componentes cuticulares*

Dado que las células infectivas están expuestas altas temperaturas y radiación UV, la ruptura acelerada de la cutícula disminuiría su exposición aumentando la virulencia (Valero-Jiménez et al., 2016). Para penetrar la cutícula del insecto el hongo utiliza una serie de mecanismos mecánicos y enzimáticos (Pedrini, 2017). Se han descrito distintas enzimas responsables de la degradación de componentes cuticulares como citocromo P450 (CYP), lipasas, proteasas, peptidasas y quitinasas (Pedrini et al., 2013; Valero-Jiménez, 2016; Wang y Wang, 2017). Las células fúngicas enfrentan diferentes pH dependiendo del entorno, que varía según la especie de insecto, el tejido y la edad del hospedador. Como las enzimas tienen pH óptimo para su actividad, su expresión puede ser regulada en respuesta al pH del microambiente, o

bien pueden secretarse compuestos para acidificar o alcalinizar el medio circundante (Valero-Jiménez et al., 2016).

### *Crecimiento en el hemocele*

En el interior del insecto se desarrollan cuerpos hifales de tipo levaduriforme, similares a blastosporos producidos en medio líquidos, que se multiplican por gemación. Éstas células activan osmosensores que permiten la adaptación en el entorno hipertónico de la hemolinfa (Butt et al., 2016). Asimismo, son capaces de liberar metabolitos secundarios de bajo peso molecular tóxicos para el hospedador (Valero-Jiménez et al., 2016; Pedrini, 2017).

### *Interacciones con el sistema inmune del hospedador*

La infección activa la respuesta inmune del insecto. Para colonizar el hospedador, el hongo debe evadir o superar el sistema inmune del insecto. La respuesta celular está gobernada por diferentes tipos de hemocitos que pueden encapsular, fagocitar o matar células invasoras. Los cuerpos hifales evaden el reconocimiento celular por la ausencia de moléculas antigénicas en su superficie (Butt et al., 2016; Valero-Jiménez et al., 2016; Wang y Wang, 2017). La respuesta humoral incluye la liberación de péptidos antimicrobianos en la hemolinfa, ROS y una cascada enzimática compleja que regula la coagulación y melanización. Para mitigar este efecto, los cuerpos hifales deben colonizar rápidamente la cavidad (Valero-Jiménez et al., 2016; Pedrini, 2017).

### *Colonización y muerte del hospedador*

Los cuerpos hifales se multiplican rápidamente, y utilizan la hemolinfa como fuente de nutrientes y “vehículo” para su diseminación y colonización (Valero-Jiménez et al., 2016). El principal órgano blanco dentro del hospedador es el intestino, que es invadido por el hongo

desde el hemocele. Esto produce una parálisis con interrupción de la alimentación y la consecuente muerte y momificación del insecto (Ferron, 1985).

### *Extrusión de las hifas y diseminación de conidios*

Cuando los nutrientes están agotados y el hospedador ha muerto, el hongo debe crecer por fuera del insecto para producir y dispersar conidios. Los blastosporos en circulación deben revertir su crecimiento a hifas para atravesar la cutícula nuevamente, en sentido opuesto. Las hifas que logran escapar del cuerpo del hospedador son capaces de producir conidios, que se diseminan por acción del aire a otros insectos, iniciando nuevamente el ciclo infeccioso (Valero-Jiménez et al., 2016).

## **6. Interacción entre los hongos entomopatógenos y la cutícula de insectos**

La cutícula juega un papel protector fundamental en el proceso de infección. La capa más externa, la epicutícula, es una capa fina compuesta por una mezcla compleja de lípidos no polares. Predominan hidrocarburos alifáticos (HC) lineales y ramificados de muy largas cadenas (entre 20 y 40 átomos de carbono), alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos libres de variadas estructuras (Pedrini et al., 2007). Su principal función es restringir la pérdida de agua, controlar la absorción de sustancias químicas, la actividad de microorganismos y actuar en procesos de comunicación química. La composición lipídica epicuticular de los insectos difiere entre especies y entre estadios de la misma especie, pudiendo influenciar el proceso de infección ya que distintos hidrocarburos pueden inhibir o estimular la adhesión de conidios, germinación y crecimiento (Valero-Jiménez et al., 2016; Pedrini, 2017).

### 6.1. Captación de hidrocarburos cuticulares por los hongos entomopatógenos

Para penetrar la cutícula hacia el interior del insecto, el hongo debe degradar sus componentes. Para poder metabolizar los hidrocarburos epicuticulares, el hongo debe captarlos e internalizarlos, proceso poco estudiado en hongos entomopatógenos. Experimentos realizados en diferentes levaduras indican que la captación de alcanos involucra al menos dos pasos, una adsorción pasiva de los hidrocarburos en la superficie celular, donde pueden visualizarse estructuras filamentosas similares a pelos unidas a éstos, y un segundo paso de transporte activo del alcano hacia los microsomas donde son oxidados (Kappeli 1984; Lindley y Heydeman, 1986). En células de *B. bassiana* cultivadas en hidrocarburos como única fuente de carbono se han observado por microscopía electrónica estas proyecciones en la superficie celular, ausentes en células crecidas en glucosa (Crespo et al., 2000).

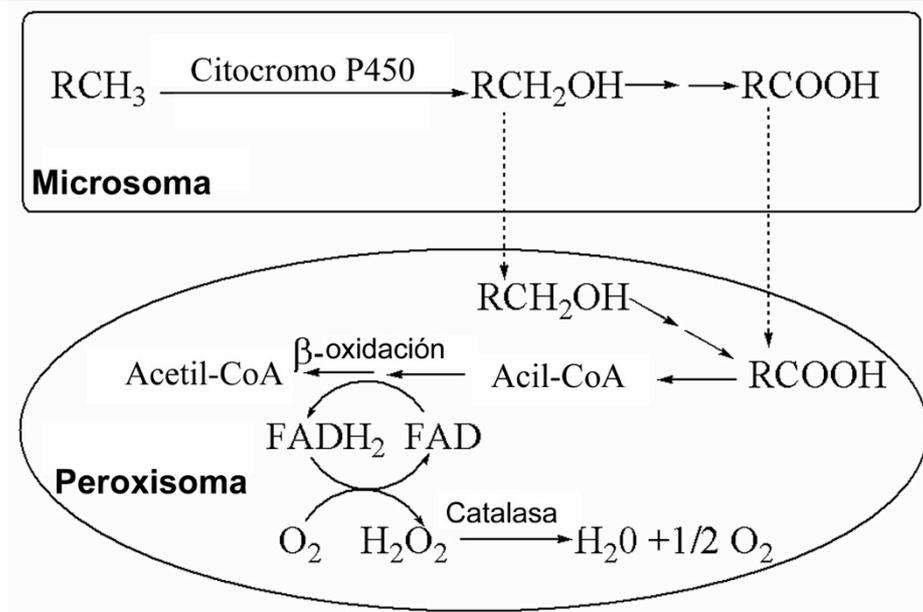
#### 6.1.1. Biosurfactantes

En microorganismos degradadores de hidrocarburos se ha reportado la síntesis de biosurfactantes para captar y emulsificar estas moléculas hidrofóbicas. Los biosurfactantes son compuestos anfipáticos capaces de reducir la tensión interfacial y superficial, lo que le permite al microorganismo que lo sintetiza solubilizar moléculas no polares para su posterior catabolismo. Los biosurfactantes extracelulares provocan la emulsificación de los hidrocarburos, y los asociados a pared facilitan la penetración de los mismos al espacio intracelular. Son ampliamente estudiados como alternativa a surfactantes sintéticos por su baja toxicidad, alta biodegradabilidad, buena compatibilidad con el ambiente, gran selectividad y actividad específica a temperaturas, pH y salinidad extremas. Muchos de ellos han sido estudiados y utilizados para bioremediación y aplicaciones terapéuticas. Existen distintos tipos de biosurfactantes conocidos en la actualidad, clasificados en glicolípidos,

lipopéptidos, lipoproteínas, ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos, surfactantes poliméricos y particulados, siendo los glicolípidos los más intensamente estudiados. Estos últimos se clasifican en ramnolípidos, soforolípidos, lípidos de trealosa y lípidos de manosileritritol. (Hommel 1990; Karant et al., 1999; Kitamoto et al., 2002). Si bien son muy estudiados en bacterias y levaduras degradadoras de hidrocarburos, hasta la fecha no hay reportes de producción de biosurfactantes en hongos filamentosos.

### 6.2. Degradación de hidrocarburos epicuticulares

El primer evento requerido para la penetración fúngica es la degradación de la epicutícula. Los hongos entomopatógenos son capaces de asimilar hidrocarburos (cuticulares y análogos sintéticos) y metabolizarlos para su incorporación en componentes celulares y producción de energía. Asimismo, se ha demostrado que *B. bassiana* es capaz de crecer en medios sintéticos suplementados con hidrocarburos como única fuente de carbono (Napolitano y Juárez, 1997; Crespo et al., 2000; Pedrini et al., 2010). La degradación de hidrocarburos comienza con la hidroxilación terminal de *n*-alcanos por un sistema de citocromo P450s de localización microsómica. El alcohol resultante se convierte, luego de sucesivas transformaciones, en un ácido graso que inicia el proceso de  $\beta$ -oxidación. En hongos filamentosos, la  $\beta$ -oxidación ocurre exclusivamente en los peroxisomas (Tanaka y Fukui, 1989; Kunau et al., 1996). Eventualmente, el ácido graso se puede generar directamente en los microsomas y luego de atravesar la membrana perixosómica para alimentar la vía oxidativa antes mencionada (Pedrini et al., 2007; 2013). Un esquema de esta vía metabólica se muestra en la figura 2.



**Figura 2:** Esquema de ruta metabólica de la degradación de hidrocarburos por *Beauveria bassiana*.

### 6.2.1. Biogénesis de peroxisomas

Los peroxisomas son organelas de 0,1 a 1  $\mu m$  de diámetro, englobados por membranas simples. Juegan un rol importante en el metabolismo lipídico y la producción de especies reactivas de oxígeno (Goodman, 2008). Se conoce que en *B. bassiana* el crecimiento en HC induce la proliferación y actividad catalasa perioxosómica (Crespo et al., 2000; Pedrini et al., 2006). Su biogénesis es llevada a cabo por peroxinas, proteínas codificadas por genes *pex*. Se han descrito más de 30 peroxinas involucradas en la diferentes pasos en la biogénesis de estas organelas, como división perioxosómica, biogénesis “de novo” y transporte de proteínas de la matriz y de membrana (Smith y Aitchison, 2013; Li et al., 2016). Las proteínas de la matriz son importadas post traduccionalmente mediante péptidos señal (*peroxisomal targeting signal*, PTS1 y PTS2), que son reconocidos por los receptores de importación citoplasmáticos PEX5 y PEX7. El proceso de importación involucra hasta 13 peroxinas asociadas a membrana, que reconocen la molécula cargo en el citosol y permiten el anclaje del complejo receptor-cargo a la membrana, la liberación de la molécula cargo en la matriz y translocación del receptor hacia el citosol (Smith y Aitchonson, 2013). En hongos filamentosos el complejo de anclaje parece estar formado por PEX13 y PEX14/17 (Li et al.,

2016). Por otro lado, las proteínas de la membrana perioxisómica contienen el péptido señal PTS<sub>m</sub>, que permiten su asociación con la proteína citosólica PEX19 y el cargo es reconocido por otro complejo de anclaje en el que interviene PEX3. Alternativamente, algunas proteínas de membrana pueden ser importadas vía transporte vesicular desde el retículo endoplasmático (Smith y Aitchison, 2013).

### 6.2.2. Citocromo P450 monooxigenasas

Las enzimas citocromo P450 monooxigenasas (CYP) son hemo-tiolato proteínas que catalizan reacciones de monooxigenación estereoselectivas en un amplio rango de sustratos lipofílicos, originando derivados más hidrofílicos por la adición de un átomo de oxígeno a partir de oxígeno molecular. Éstas constituyen un sistema microsómico de dos componentes formado por la NADPH citocromo P450 reductasa (flavoproteína que contiene FAD y FMN) y la hemoproteína P450 monooxigenasa. Los sistemas de citocromo P450 fúngicos están involucrados en la biosíntesis de componentes de la pared celular, biosíntesis de micotoxinas, patogénesis, resistencia a antifúngicos, desnitrificación, biotransformación de compuestos químicos y biodegradación, así como en la síntesis de biosurfactantes (van der Brink et al, 1998; Hewald et al., 2005).

Dentro de la superfamilia CYP, los genes son clasificados en familias y subfamilias por identidad de secuencia de aminoácidos. Los genes se asignan a familias cuando comparten una identidad mayor al 40%, y subfamilias cuando comparten una identidad mayor al 55% (Nelson et al., 1996). Se ha propuesto un orden de agrupamiento mayor para los genes P450 denominado clan, para clasificar P450 de distintos reinos (Nelson, 1999). La introducción de clanes permite agrupar genes en base a relaciones filogenéticas robustas. Genes dentro de un mismo clan probablemente divergen de un ancestro común y pueden compartir funciones (Nelson, 1998, 1999).

La exploración del genoma de *B. bassiana* permitió determinar la presencia de dos clanes que representan el 45,5% del total de los genes P450: CYP52 y CYP53. Dentro del clan CYP52 se encuentra la familia CYP52, originalmente identificada como la responsable en la hidroxilación de *n*-alcanos y ácidos grasos (Tanaka et al., 1982; Pedrini et al., 2013). En *B. bassiana*, esta familia está formada por 6 genes: *Bbcyp52x1*, *Bbcyp52g11*, *Bbcyp52ta*, *Bbcyp52tb*, *Bbcyp52tc* y *Bbcyp52td*. La enzima BbCYP52X1 fue caracterizada por Zhang et al. (2012), mostrando actividad de hidroxilación terminal en ciertos ácidos grasos (C12:0, C14:0, C16:0, C18:1, C18:2), pero baja o nula actividad en C9:0 y C18:0, sugiriendo que más de una enzima es requerida para la asimilación de hidrocarburos de cutícula. El mutante  $\Delta Bbcyp52x1$  mostró reducción en virulencia por topicaciones fúngicas en larvas de *Galleria mellonella*, pero no así en ensayos con inyecciones en la hemolinfa, indicando que esta enzima juega un rol crucial durante la penetración cuticular pero no es necesaria una vez que la cutícula es superada. Si bien se ha encontrado que otros genes CYP (pertenecientes tanto a otros clanes como a otras familias dentro del clan CYP52) se indujeron en presencia de *n*-alcanos de distintas longitudes de cadena, sus mutantes no mostraron diferencias fenotípicas en términos de virulencia o asimilación de hidrocarburos, sugiriendo que existe un solapamiento de actividades (Pedrini et al., 2013).

# **OBJETIVOS**

### Objetivos generales

Avanzar en el conocimiento de la bioquímica y biología molecular de la interacción entre los hongos entomopatógenos y la cutícula del insecto hospedador, mediante la caracterización de los genes y las enzimas participantes en dos de los eventos fundamentales en la etapa inicial de la infección fúngica: la captación y solubilización de hidrocarburos cuticulares por los hongos, y la posterior degradación oxidativa de los mismos para obtener energía e intermediarios del metabolismo. A largo plazo se espera contribuir a la optimización de las etapas iniciales de la infección, así como producir y caracterizar propágulos novedosos para lograr un mejoramiento de micoinsecticidas.

### Objetivos específicos

- Estudiar la expresión diferencial de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos, estrés oxidativo, hidrofobicidad de la superficie celular y síntesis de biosurfactantes (glicolípidos) en diversas células de *Beauveria bassiana* adaptadas a crecer en hidrocarburos como única fuente de carbono.
- Identificar los potenciales biosurfactantes fúngicos que actúan durante el proceso de captación de hidrocarburos.
- Caracterizar molecular y fisiológicamente nuevos propágulos con capacidad infectiva en *B. bassiana* cultivados en medios con hidrocarburo como única fuente de carbono.

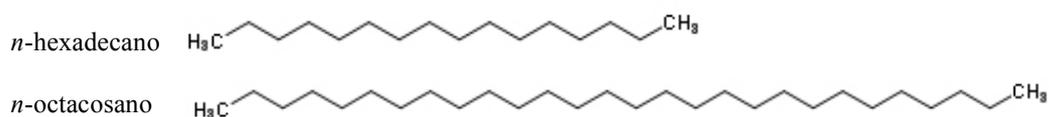
# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Crecimiento y mantenimiento de *Beauveria bassiana*

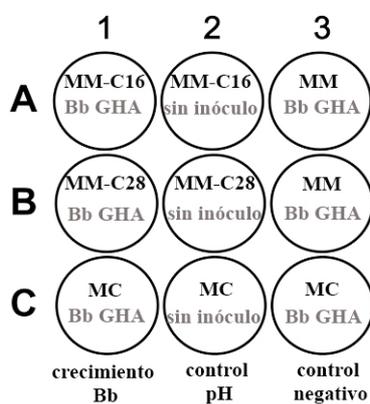
*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (cepa GHA) fue obtenida de una formulación comercial en polvo de Laverlam International, Butte, EEUU. El hongo se mantuvo rutinariamente en medio agar papa-dextrosa (PDA) a 26°C por 14 días. Para cada ensayo, se cosecharon conidios frescos de estas placas y se ajustó su concentración con una cámara de Neubauer en una solución de Tween 80 (polisorbato de sodio) al 0.01% en agua miliQ estéril.

## 2. Crecimiento en medio sólido

Para ensayar el crecimiento de *B. bassiana* en medios conteniendo distintos hidrocarburos como fuente de carbono, se cosecharon conidios repicados en placas PDA y se realizaron suspensiones de  $10^7$  conidios/ml. Se plaqueó 1 ml de medio mínimo (MM)-agar o medio completo(MC)-ágar, en ambos casos conteniendo el colorante púrpura de bromocresol al 0,05% p/v (Biopack, Argentina) en placas estériles de 24 pocillos. El medio completo es un medio rico que contiene sales, glucosa y extracto de levadura. El medio mínimo contiene las mismas sales que MC, pero no contiene glucosa y extracto de levadura; por lo tanto, es un medio basal que carece de fuentes de carbono. La composición de ambos medios se detalla en el Anexo 1. El púrpura de bromocresol es un indicador ácido-base que presenta color amarillo en  $\text{pH} < 5,2$  y color púrpura en  $\text{pH} > 6,8$ , rango de pH que permite monitorear la acidificación del medio durante el crecimiento. Para suplementar el medio mínimo se utilizaron dos hidrocarburos como única fuente de carbono: *n*-hexadecano (16 carbonos, Carlo Erba, Italia) y *n*-octacosano (28 carbonos, Carlo Erba, Italia).



Un mililitro de solución stock de cada hidrocarburo (10% p/v en hexano, Carlo Erba, Italia) se plaqueó en la superficie de cada pocillo conteniendo MM-ágar y se dejó evaporar el solvente bajo campana de flujo laminar. Luego se inocularon los pocillos con 20 µl de la suspensión de conidios. Como controles, se inocularon pocillos conteniendo MC-ágar (control positivo), así como también pocillos de MM-ágar sin agregado de hidrocarburos (control negativo). Además, se dejaron pocillos suplementados con hidrocarburo sin inóculo (control de acidificación espontánea). El diseño de las placas se muestra a continuación:



Las placas se incubaron a 26°C en estufa por 7 días. Se monitorearon y fotografiaron diariamente. El experimento se repitió tres veces.

### 3. Crecimiento en medio líquido

#### 3.1. Crecimiento en medio completo

Erlenmeyers conteniendo 500 ml de MC líquido con 500 µl de ampicilina (50mg/ml) se inocularon con suspensiones de  $10^7$  conidios/ml e incubados por 3-4 días a 26°C con agitación orbital. Para probar distintas relaciones C:N en los medios de cultivo se mantuvieron constantes las concentraciones g/L de sales y extracto de levadura, y se varió la concentración final de glucosa hasta obtener medios de cultivo de composición 5:1; 12,5:1;

30:1; 40:1 (C:N). Las células se separaron luego por centrifugación a  $5.800\times g$  por 20 minutos y se lavaron con agua estéril. Dependiendo de la velocidad de agitación y la relación C:N se aislaron dos tipos celulares:

- i. Micelio y conidios
- ii. Microesclerocios (ME)

### 3.2 Crecimiento en medios mínimos con hidrocarburos

Se determinó el peso húmedo de las células obtenidas en 3.1.i y se utilizaron como inóculo inicial para erlenmeyers de 200 ml de MM líquido suplementado con 1 ml de *n*-hexadecano (0.5% v/v, MM-C16) o con 1 g de *n*-octacosano (0,5% p/v, MM-C28), y erlenmeyers de 200 ml de MC líquido (control). Dependiendo del ensayo a realizar, se cultivaron durante 2, 3, 5 y/o 7 días. Luego, las células se separaron por centrifugación a  $5.800 \times g$  por 20 minutos y se lavaron con agua miliQ estéril.

En cada caso, se calculó la variación en el peso húmedo (calculada como masa húmeda final/ masa húmeda del inóculo inicial) y se midió el pH del medio líquido remanente. De estos cultivos se aislaron 3 poblaciones celulares:

- iii. Biomasa de MC (BC), compuesta por micelio y conidios
- iv. Biomasa de MM (BM), compuesta por micelio y conidios
- v. Pellets miceliales (PM)

### 4. Viabilidad de los propágulos

Se evaluó la viabilidad de los pellets miceliares y los microesclerocios. Los pellets miceliales observados en MM-C16 se aislaron del medio de cultivo de 7 días por filtración, se lavaron y se colocaron en placas de Petri con cristales de sílica gel a  $4^{\circ}C$  para su secado por 5 días. Los microesclerocios se cosecharon a los 4 días y se secaron de la misma manera.

Luego, se pesaron y se colocaron en placas de Petri conteniendo medio sólido agar-agar con ampicilina a 26°C. Se monitoreó el crecimiento regularmente con una lupa y se cosecharon los conidios luego de 14 días, se suspendieron en una solución de Tween 80 (0.01%v/v) y se cuantificaron utilizando una cámara de Neubauer. Para los pellets miceliares se determinó su concentración como número de conidios totales/masa inicial seca de pellets.

### **4.1. Producción de conidios/ viabilidad de conidios producidos**

Para determinar la viabilidad de los conidios producidos en el agar-agar, se utilizaron las suspensiones preparadas en el ítem 4 para inocular placas de MC sólido. Se cuantificó la germinación luego de 24 h de crecimiento. Para cada una de las 5 réplicas estudiadas, se observaron menos 300 conidios y el porcentaje de germinación (%) se calculó como  $100 \times (\text{conidios germinados})/(\text{conidios totales})$ .

### **4.2. Termotolerancia**

Se utilizaron pellets miceliares de 7 días para estudiar la tolerancia a distintas temperaturas: -20°C, 4°C, 26°C (control), 37°C y 45°C. Para ello, 0,1g (peso húmedo) de muestra se incubaron a las distintas temperaturas por dos horas. Luego, se sembraron en placas de Petri de 90mm conteniendo PDA con ampicilina (concentración final 50 µg/ml) y se analizó la tolerancia a la temperatura determinando la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo inicial de pellet luego de 3 días de crecimiento a 26°C. Asimismo, se cuantificó la producción de conidios por gramo de pellet luego de 14 días de crecimiento a 26°C como se explicó anteriormente.

## **5. Ensayo de hidrofobicidad**

La hidrofobicidad de la superficie celular de conidios se determinó a través del ensayo de *microbial adhesion to hydrocarbons* (MATH assay) como se describe en Holder et al. (2007). Los conidios obtenidos luego de 3, 5 y 7 días de cultivo en MC y MM se lavaron con buffer PUM. Las suspensiones se ajustaron a un OD<sub>470</sub> 0.4 y 3 ml de las mismas se colocaron en tubos de ensayo previamente lavados con una solución de HNO<sub>3</sub> 10% v/v; luego se adicionaron 300 µl de *n*-hexadecano y los tubos se mezclaron con vórtex 3 veces de 30 segundos cada una. Las muestras se dejaron reposar por 15 min y luego se retiró cuidadosamente el *n*-hexadecano. Para quitar todo el excedente, los tubos se llevaron a 4°C por 10 minutos y la fase sólida se retiró con una espátula estéril. La A<sub>470</sub> de las muestras se midió nuevamente, y el índice de hidrofobicidad se calculó con la siguiente ecuación:  $(A_{470, \text{control}} - A_{470, \text{tratado con hexadecano}}) / (A_{470, \text{control}})$ . Las muestras se analizaron por quintuplicado y el experimento se repitió cuatro veces.

## **6. Microscopías**

### **6.1. Microscopía óptica**

Las diferentes muestras de propágulos fúngicos se observaron en un microscopio Nikon eclipse e200 microscope (Nikon Corporation, Japón). Adicionalmente, éstos se tiñeron con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich, EEUU) durante toda la noche, se lavaron con buffer fosfato (pH 7,2) y se observaron nuevamente luego del tratamiento. La DAB es una sustancia química que reacciona con el peróxido de hidrógeno, se utiliza para determinar la actividad peroxidasa/catalasa en células y es frecuentemente empleado como marcador de peroxisomas (Fukui y Tanaka, 1979).

### 6.2. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Las muestras se fijaron inicialmente con glutaraldehído al 2% en buffer fosfato (pH 7,2) durante 2 horas y luego con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora (fijación secundaria), en ambos casos 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. A las muestras tratadas con DAB se les adicionó un paso de tinción con esta sustancia durante toda la noche luego de la fijación con glutaraldehído.

### 6.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Los propágulos obtenidos luego del cultivo en medio mínimo suplementado con hexadecano (BM) y medio completo (BC) se filtraron en gasa estéril para obtener los respectivos conidios que se analizaron por microscopía de fuerza atómica en el servicio a terceros del Laboratorio de Nanoscopías-INIFTA. Para esto, las muestras se inmovilizaron en un filtro estéril Millipore de 0,22 µm de tamaño de poro y se secaron a 4°C en una cámara conteniendo sílica gel activada. Todas las imágenes se obtuvieron en condiciones ambientales utilizando microscopio de fuerzas atómica Multimode con controlador nanoscope V (Veeco, EEUU) en modo contacto intermitente (*tapping*). La sonda utilizada fue Nano Word dopada con Nitruro de Silicio, con las siguientes características: frecuencia de resonancia del cantilever 258 kHz, constante de fuerza 42 N/m, radio nominal de la punta 5-10 nm, velocidad de barrido de 1 Hz.

## **7. Bioensayos de mortalidad**

Se evaluó la patogenicidad de los pellets miceliales y microesclerocios. Para pellets miceliales se llevaron a cabo bioensayos de mortalidad contra larvas de *Tribolium castaneum* y *Tenebrio molitor*. Para esto, se obtuvieron 3 réplicas biológicas de pellets frescos de 7 días de cultivo, se filtraron y lavaron utilizando papel de filtro estéril y se colocaron 0,325 g (peso húmedo) en placas de Petri estériles descartables de 6 cm de diámetro. Como vehículo se utilizaron 1,75 g de vermiculita en cada placa previamente esterilizada y humedecida con 1,5 ml de agua miliQ estéril. En cada placa se colocaron larvas de insecto (10 larvas de *T. castaneum* por placa o 5 larvas de *T. molitor* por placa) y se mantuvieron en una cámara de cría a 26°C, de manera que las larvas permanecieron en contacto constante con el inóculo fúngico. Como control de los experimentos se colocaron las larvas en placas similares a las mencionadas anteriormente, sin inóculo fúngico. Para microesclerocios el diseño del bioensayo de mortalidad se realizó con larvas de *T. castaneum* de manera similar al descrito anteriormente. En este caso, en cada placa de Petri se colocaron 30 propágulos.

En todos los casos la mortalidad de las larvas se monitoreó cada 3 días durante 10 días. Los cadáveres fueron retirados, lavados con etanol 70% por 30 s, enjuagados con agua destilada estéril por dos min y secados. Luego se colocaron individualmente en placas de agar-agar y se incubaron por 3 días a 26°C para permitir el crecimiento del hongo en el exterior del cadáver y así diferenciar las muertes causadas por *B. bassiana* de otras causas. Para el cálculo de la mortalidad acumulativa se utilizó la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

Las larvas de los insectos plaga de granos almacenados *T. castaneum* y *T. molitor* utilizados fueron provenientes de la Cátedra de Terapéutica Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Los insectos fueron criados en frascos de vidrio de 250 ml cubiertos con una fina red metálica y mantenidos en una cámara de cría a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $70 \pm 5\%$  de humedad relativa, con un fotoperíodo de 12 hs/12 hs luz:oscuridad. Se alimentaron con

dietas consistentes en una mezcla de levadura de cerveza, leche descremada, germen y harina de trigo para el caso de *T. castaneum* y salvado de trigo para *T. molitor*. En ambos casos, las larvas utilizadas correspondían a últimos estadios larvales.

### **8. Actividad enzimática y peroxidación lipídica**

#### **8.1. Obtención de homogenatos fúngicos**

Se utilizaron cultivos líquidos de 2 días de *B. bassiana* crecidos en MC, MM-C16 o MM-C28. Los hongos se aislaron por centrifugación, se procesaron en buffer fosfato (pH 7) con un homogeneizador Mini-Bead Beater (BioSpec, EEUU) operado a 50.000 rpm, utilizando perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. La homogeneización se realizó en 6 ciclos de 30 segundos cada uno, manteniendo las muestras en hielo entre cada ciclo para evitar el sobrecalentamiento producido por la agitación. Luego se centrifugó a 2.000×g durante 15 minutos para obtener los sobrenadantes (homogenatos) donde se ensayaron las actividades enzimáticas.

#### **8.2. Cuantificación de proteínas totales**

Para la detección de proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) basado en el cambio de color del colorante Comassie Brilliant Blue G-250 en presencia de distintas concentraciones de proteínas. La interacción del colorante con aminoácidos básicos y aromáticos provoca un cambio en su máximo de absorción, de 465 a 595 nm (rojo y azul, respectivamente). Para determinar la concentración de proteínas de una determinada muestra, se midieron las muestras sin diluir y diluciones 1/5, 1/10 o 1/50 y, en paralelo, una curva de calibración con albúmina 1mg/ml. Asimismo, para descartar la posible interacción del pH ácido de las muestras con el método, se realizaron las mismas diluciones de albúmina a pH 2. Luego de agregar el reactivo de Bradford a la muestra, se incubó 5 minutos a temperatura

ambiente y luego se leyó su absorbancia en las dos longitudes de onda en un lector de placas DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, EEUU). Luego se restó Abs 595nm-Abs 465nm y con ese valor se construyó la curva de calibración y se determinó la concentración de proteínas de las muestras. Sólo se utilizaron los valores de las muestras problema cuyo valor estuviera dentro de los límites de la curva de calibración.

### **8.3. Actividades enzimáticas**

Las medidas de las actividades enzimáticas se realizaron en un espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro (Biochrom Ltd., Reino Unido) utilizando cubetas de cuarzo o de plástico dependiendo de la longitud de onda utilizada. En todos los casos se utilizaron cubetas de 10 mm de paso de luz.

#### **8.3.a. Actividad específica superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad SOD se cuantificó mediante el método de Marklund (Marklund y Marklund, 1974). Se utilizó pirogalol, un compuesto que se autooxida de manera espontánea en medio básico (pH 8,2 y 28°C), mediante una reacción de velocidad constante visible a 420 nm que da como producto pirogalina (amarillo). La presencia de un secuestrador del radical anión superóxido (SOD) inhibe la reacción de autooxidación del pirogalol, permitiendo calcular el porcentaje de inhibición de la autooxidación a 420 nm. Se definió una unidad de actividad enzimática (U) SOD como la cantidad de enzima para lograr una inhibición de 50%. La actividad específica SOD se definió como (U)/mg de proteína.

#### **8.3.b. Actividad específica de catalasa (CAT)**

El consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM en buffer fosfato 50 mM, pH 7) se midió espectrofotométricamente por el decaimiento de la absorbancia a 240 nm (Beers y Sizer, 1952). Una unidad CAT se definió como la cantidad de enzima requerida para descomponer

1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 1 minuto de reacción a pH 7 y  $25^\circ\text{C}$ . La actividad específica CAT se definió como (U)/mg de proteína.

### 8.3.c. Actividad específica glutatión-s-transferasa (GST)

La determinación de la actividad específica GST se realizó por el método de Habig (Habig et al., 1984), El reactivo 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), reacciona en presencia de glutatión formando GS-dinitro benzenu (GS-DNB), que absorbe a 340 nm. Una unidad de GST se definió como la cantidad de enzima requerida para catalizar la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB por minuto a  $25^\circ\text{C}$ . La actividad específica GST se definió como (U)/mg de proteína.

### 8.4. Cuantificación de la peroxidación lipídica (LPO)

La LPO se estimó mediante el método de TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico) (Esterbauer, 1996). Esta técnica consiste en cuantificar la cantidad de malondialdehído, cuya formación se considera como un indicador de lipoperoxidación. El malondialdehído, al ser mezclado con el ácido tiobarbitúrico, reacciona formando un pigmento rosa que puede ser detectado a una longitud de onda de 530 nm. Los resultados se expresaron como nanomoles de sustancias reactivas a TBARS por mg de proteína y se calcularon en base al coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de malondialdehido de  $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

## 9. Análisis de expresión diferencial de genes mediante qPCR.

### 9.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total, las muestras se homogeneizaron con Nitrógeno líquido en morteros estériles, obteniendo una masa aproximada de 100 mg de polvo por muestra. Se utilizó el kit *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen, Alemania), que incluyó un paso

adicional de digestión de ADN con *RNase-Free DNase Set* (Qiagen). 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 obtenido y la presencia o no de contaminación con ADN, se corrió 1  $\mu\text{g}$  de cada muestra en un gel con 1% de agarosa p/v en TBE, por 20 minutos a 100 V en una cuba electroforética horizontal especialmente reservada para trabajo con ARN. Tanto el buffer TBE para preparar el gel como el utilizado durante la corrida fueron preparados con agua MiliQ estéril. Para la visualización de las bandas, el gel se tiñó con 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 haya sido satisfactoria.

### 9.2. Obtención de ADN complementario (ADNc).

Para la obtención de ADNc se utilizó el kit comercial *iScript cDNA Synthesis Kit* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante, usando 1  $\mu\text{g}$  de ARN. La reacción típica de 20 $\mu\text{l}$  de retrotranscripción consiste en:

- 4  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción 5X
- 1  $\mu\text{l}$  de retrotranscriptasa
- H<sub>2</sub>O nucleasa free
- 1  $\mu\text{g}$  de ARN

La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Thermo) y el ciclado consiste típicamente en tres etapas: 5 minutos a 25 °C (unión de random primers al ARN), 20 minutos a 46 °C (síntesis de ADNc) y 1 minuto a 95 °C (inactivación de la retrotranscriptasa).

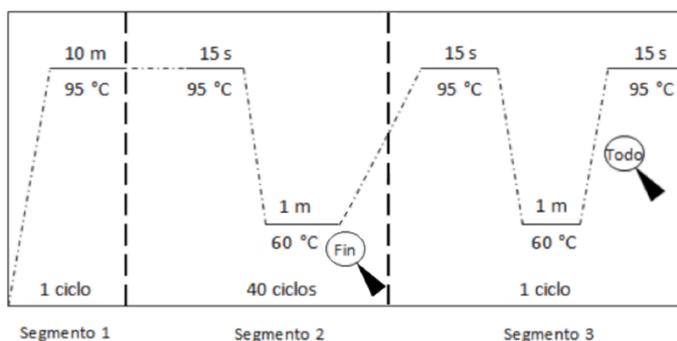
### 9.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

Para la determinación de la cantidad relativa de ARNm de los genes de interés en distintas condiciones de cultivo se utilizó el método de cuantificación relativa por PCR cuantitativa a tiempo real a partir de ADNc. Esta técnica se basa en la detección específica del número de copias de un transcripto determinado haciendo uso de sondas específicas o fluoróforos no específicos. En este caso, se utilizó la supermix comercial iQ SYBR Green Supermix (BioRad) que contiene todos los reactivos necesarios (dNTPs, una ADN polimerasa hot start, buffer de reacción apropiado y el fluoróforo SYBR Green como agente intercalante) todo a doble concentración (2X). El molde para esta reacción es el ADNc, diluido 5 o 10 veces. El protocolo para una reacción típica de qPCR fue el siguiente:

- 5 µl qPCR Supermix 2X
- 0,5 µl Forward + 0,5 µl Reverse Primers 10 µM cada uno (conc. final: 300 mM)
- 4 µl de ADNc diluido 1/5 o 1/10

Total: 10 µl

Para el ciclado y la lectura de la fluorescencia se usó un equipo StepOne Plus (Thermo). En



general, el protocolo de ciclado y de lectura de fluorescencia fue el siguiente:

En el segmento 1 se produce la activación de la ADN polimerasa hot

start y la desnaturalización del molde, el segmento 2 constituye la reacción de PCR

propiamente dicha y el segmento 3 corresponde a la curva de disociación de los productos formados. Las lupas indican cuándo se lee la fluorescencia: luego del apareamiento de los primers con el molde y durante toda la disociación de los productos de PCR formados. Debido a que la temperatura de disociación de un dímero de ácido nucleico depende de su secuencia, el análisis de las curvas de disociación permite determinar la cantidad de productos de PCR formados durante el ciclado, como también la presencia de sub-productos indeseados o dímeros de primers. Luego de cada corrida se corroboró la calidad de las curvas de disociación obtenidas 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 dado pocillo se despegaba 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 genes housekeeping (*Bbact*). Para realizar los cálculos se utilizó el método de  $\Delta\Delta Ct$ , con la siguiente ecuación:

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

donde ER es la expresión relativa, E es la eficiencia de los la PCR (como se detalla más abajo),  $\Delta Ct$  es la diferencia de Ct entre el control (MC) y el tratamiento (crecimiento en hidrocarburos), T es el gen de interés, R es el gen de referencia.

#### 9.4. Diseño de los primers utilizados

Para el diseño de los primers específicos se utilizó el programa Gene Runner, a partir de las secuencias de ADNc obtenidas en la base de secuencias de NCBI. En el caso de los

genes CYP52, dado que las secuencias presentan alta similitud de secuencia, se realizaron alineamientos de las secuencias con el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) para verificar que los primers diseñados sean específicos de cada gen.

La especificidad y concentración de primers fue evaluada por qPCR mediante curvas de calibración. Para esto, se tomaron alícuotas de cada muestra a estudiar para formar un pool que sea representativo de todas las condiciones de crecimiento de *B. bassiana*. Se obtuvieron distintas concentraciones del pool inicial mediante diluciones seriadas 1/5 y se utilizaron como molde las diluciones 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 y 1/3125. Se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas para evaluar la potencial formación de dímeros de primers. Se evaluaron los parámetros de linealidad de las rectas obtenidas para cada gen y se obtuvo la eficiencia de PCR para cada primer (Tabla 1).

## Materiales y métodos

Nombre	Primer forward (5'- 3')	Primer reverse (5'- 3')	Eficiencia	R <sup>2</sup>
<i>Bbact</i>	ATGGAGGAAGAAGTTGCTGC	ACACGGAGCTCGTTGTAGAA	112,7	0,992
<i>Bbsod1</i>	ACAACACCAACGGCTGCACC	ACGGCCAACAACGCTGTGAG	116	0,997
<i>Bbsod2</i>	CCAGTGTTTGGCATTGACATG	TCAGCCGTCTTCCAGTTGATG	105,6	0,996
<i>Bbsod3</i>	ACATCAATCACACTCTCTTCTG	GCGTTGGTCTGCTTCTTG	103,1	0,992
<i>Bbgpx</i>	CAAGGTCGTCCTCGTCGTC AAC	CTTGTCGCCATTGACCTCCACC	122,5	0,994
<i>Bbgst</i>	TCTTGTAGCCAGCCCTCCATCG	AGAGATGTGGTCGCGGAACGA	115,5	0,969
<i>Bbcata</i>	GAAAGCCGCGCAAGTGAAAG	TCTCTGGCAAAGACATCCAG	107,2	0,993
<i>Bbcatb</i>	GAAGACGCCCATGTTTGTTCG	AAAGTTGCCCTCATCGGTATAGC	117,3	0,987
<i>Bbcatc</i>	TGCTGGACGATGTGTCTGAC	CACGCACCGTATCGCTAGAG	108,6	0,991
<i>Bbcatd</i>	GCGCTCGCAGTGA CTGTAC	CTAGCACGGCCCTGTATAATGG	113,3	0,998
<i>Bbcatp</i>	TGTA CTGGGGCTCCGAACC	ATGAGACCTGTGTAGCGTTAGC	105,7	0,967
<i>Bbpex5</i>	AATGCCGGGCCGAATATGC	CAGGCTGGCTGTTGAAATCGTG	130,2	0,991
<i>Bbpex7</i>	TCGCTTCGGCTGCCAATTTTC	TGCGACAATGAGCTGGTTCTCG	111,1	0,993
<i>Bbpex14/17</i>	TCGCCAACCTCGTCAGACACTG	CCTCGACGCCCTTTGACTTGAG	114,3	0,991
<i>Bbpex19</i>	AAGTTCCTGTCTGGCTGTCGG	CCGGCAAAGGCTTCTTGTGC	114,3	0,993
<i>Bbhyd1</i>	CACCATGGTGGA AAGGATCTGCAC	CCGAGAAGGTGGGAAAGAAGACCA	108,5	0,996
<i>Bbhyd2</i>	TGTCAAGACTGGCGACATTTGCG	TCGATGGGGACAAGCTGGTTGA	117,7	0,985
<i>Bbcyp52x1</i>	TCGGTTCACGTTATGCACCACC	TTCTCCAGGGCAGTTGGTCAGG	113,4	0,989
<i>Bbcyp52g11</i>	CGCTCACTGCTATCCTCATCGG	TTCTTAGGGCGCATGGTGGTGAC	108,9	0,988
<i>Bbcyp52ta</i>	TTATTCGGTCGATTCCACCACG	TCCATGAGCATGCCCTTGAAAC	116,8	0,978
<i>Bbcyp52tb</i>	TGCCAACTTTGCTCGCGTACTG	GCTTGGTGAAAGGTGGACAGGC	135,8	0,984
<i>Bbcyp52tc</i>	CACCAGCGACGGTAAAGAGTGG	GCTGTCCAAGAGCCTGCATGAG	104,9	0,994
<i>Bbcyp52td</i>	ATTTATTGCAGCGACGCTGGTG	CCTGTGCGTCACGATTTGCC	100,4	0,985
<i>Bbudp-t</i>	ACGATGTGACGTT CCTCGCAAG	CGGCATTCATACGTTACCTGG	119,3	0,996
<i>Bbtransp</i>	TCGACTGGGCAACAAGA ACTCG	CTAATGGCCGCAATCACCACAG	103,1	0,988
<i>Bbacylt</i>	TGCCACGGAAAGAAACCAAGC	ATTGCAGCCGTAGTCGACGTTG	104,9	0,990

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las eficiencias de cada primer y su  $R^2$  fueron calculados utilizando el software del equipo StepOne Plus. *Bbact* fue utilizado como gen de referencia.

### 10. Aislamiento y caracterización de biosurfactantes

#### 10.1. Aislamiento

Para el aislamiento de potenciales biosurfactantes, se ajustaron los protocolos descritos por Satpute et al. (2010) y Smyth et al. (2010). Brevemente, se filtraron cultivos de dos días de cultivo, el medio remanente (libre de células) se llevo a pH 2 con HCl 0,1 M y se almacenó a 4°C por 12 horas. Posteriormente se centrifugó a 20.000×g para precipitar potenciales componentes lipídicos y proteicos del medio de cultivo. Cada precipitado se lavó dos veces con agua miliQ y se resuspendió en 1,5 ml de agua miliQ.

#### 10.2. Métodos colorimétricos

Para caracterizar la composición de los precipitados obtenidos para MM-C16, MM-C28 o MC se utilizaron dos métodos colorimétricos para la detección de azúcares:

1) Método colorimétrico de Orcinol: este es un método que se utiliza rutinariamente para evidenciar la presencia de restos glicosídicos en una muestra en medio ácido y altas temperaturas. Utiliza el reactivo orcinol (1,3-dihidroxi-5-metilbenceno, Sigma-Aldrich), dando coloración en solución por reacción de este compuesto con el furfural producto de la deshidratación de los azúcares en medio ácido. El ácido sulfúrico provoca la hidrólisis de los azúcares en sus monómeros y su deshidratación. Dependiendo de la naturaleza de los monómeros, la coloración obtenida puede ser azulada (pentosas) o rojiza (hexosas). Para el ensayo se tomaron 100 µl de la resuspensión de cada precipitado, se colocaron en tubos de vidrio y se le adicionaron 900 µl de la mezcla del reactivo de orcinol (0,002 g/ml, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 67% en agua bidestilada). Como control positivo se utilizaron soluciones de ramnosa (10 mg/L y 1mg/L) y como control negativo se utilizó agua miliQ. Los tubos se incubaron por 30

min a 80 °C en un baño húmedo y fotografiados una vez transcurrido este tiempo de incubación.

2) Método colorimétrico de Antrona: este es un método ampliamente utilizado para la detección de restos glicosídicos, utilizando como reactivo antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno, Sigma-Aldrich) dando una coloración azul-verdosa, por reacción con el furfural producto de la acción del ácido sulfúrico. Se tomaron 200 µl de la resuspensión de cada precipitado y se le adicionó 1 ml de la mezcla antrona (antrona 0,2 % p/v, etanol absoluto 5 % v/v, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 75% v/v en agua bidestilada). Se utilizaron los mismos controles que en el ensayo de orcinol. Los tubos se incubaron por 10 min a 100°C en un baño húmedo y luego se fotografiaron.

### 10.3. Metanólisis ácida

Los precipitados resuspendidos se trataron con HCl 5% en metanol (Carlo Erba, Italia) por 8 hs a 80°C para la ruptura del enlace éster del glicolípido, obteniendo un residuo glicosídico y un residuo lipídico metilesterificado. Luego, los productos resultantes de la metanólisis se extrajeron por separación en fases con hexano (Carlo Erba). Se utilizó 1 ml de cada muestra e iguales cantidades de hexano. Se agitó vigorosamente y se dejó en reposo el sistema por 1 h. Posteriormente, se separaron las fases acuosas y orgánicas, colectadas en frascos de vidrio limpios y se concentraron por evaporación de solventes con flujo de aire. En la fase acuosa se espera aislar el residuo glicosídico, y en la fase orgánica, el residuo lipídico.

### 10.4. Cromatografía en capa fina (TLC)

Las fracciones orgánicas y acuosas de la metanólisis se analizaron en placas de sílica gel Polygram Sil G/UV<sub>254</sub> de 4 × 8 cm y 20 x 20 cm (Macherey-Nagel, Alemania), Para la fracción orgánica se utilizaron dos sistemas de desarrollo: primero *n*-hexano (100%) y luego

*n*-hexano:eter etílico:ácido acético (80:20:1 v/v). Para la fracción acuosa se utilizó una mezcla acetonitrilo: agua (85 : 15 v/v). Los lípidos y azúcares se identificaron por comparación con estándares sembrados en forma simultánea en la misma placa. Todos los solventes orgánicos utilizados fueron de grado pro-análisis (Carlo Erba).

El revelado de las muestras se realizó mediante los siguientes métodos:

- 1) Con vapores de yodo ( $I_2$ ). Se colocó la placa desarrollada y seca en una cuba conteniendo yodo bisublimado (Carlo Erba) durante 10 minutos. Es un método cualitativo que permite visualizar las zonas con lípidos ya que el yodo (colorante inespecífico) los tiñe de un color parduzco. La intensidad de la mancha se correlaciona con la cantidad de insaturaciones.
- 2) Por calcinación. Se realizó la inmersión de la placa cromatográfica en una solución de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) en etanol (5%) y posteriormente se colocó en estufa a 180°C durante 15 min. Es un método destructivo, inespecífico, con una alta sensibilidad, que produce la carbonización de los compuestos que se observan como manchas negras.

### **10.5. Cromatografía gaseosa capilar (CGC) acoplada a espectrometría de masa (MS).**

Para la fracción lipídica se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 equipado con una columna capilar Zebron-5HT *inferno* (30m x 0.25 mm I.D., F.T. 0.25  $\mu$ m, Phenomenex, EEUU). Como gas transportador se utilizó He a 11.36 psi con una velocidad lineal de 39 cm/s. El inyector se operó en modo splitless a 300°C, y el horno se programó con una temperatura inicial de 50°C por 1 min, y luego con rampas de temperatura de 50°C/min hasta 200°C y 3°C/min hasta 330°C permaneciendo finalmente a esa temperatura por 10 min. Se acopló a este equipo un detector selectivo de masa (MSD) Agilent 5975C VL. El MSD fue operado en el modo SCAN con un rango de masas de 35 a 800 u.m.a.; en modo impacto electrónico a 70 eV; línea de transferencia a 320°C; temperatura de cámara de

ionización a 230°C y cuadrupolo a 150°C. Los compuestos se identificaron por interpretación de sus espectros de fragmentación (Juárez et al., 2001).

### **10.6. Cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico utilizando un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)**

La fracción polar de la metanólisis se analizó por cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico en un equipo Dionex BioLC-3000 con detector de pulso amperométrico en el servicio a terceros del Departamento de Química Orgánica Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. El método de HPAEC-PAD permite identificar carbohidratos por comparación con estándares, utilizando las propiedades levemente ácidas de estos compuestos por separación selectiva a pH altos utilizando un intercambiador aniónico. En esta determinación se utilizaron L-fucosa, D-galactosamina, D-glucosamina, D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-ribosa y 2-desoxiribosa como azúcares estándar.

### **11. Análisis estadístico**

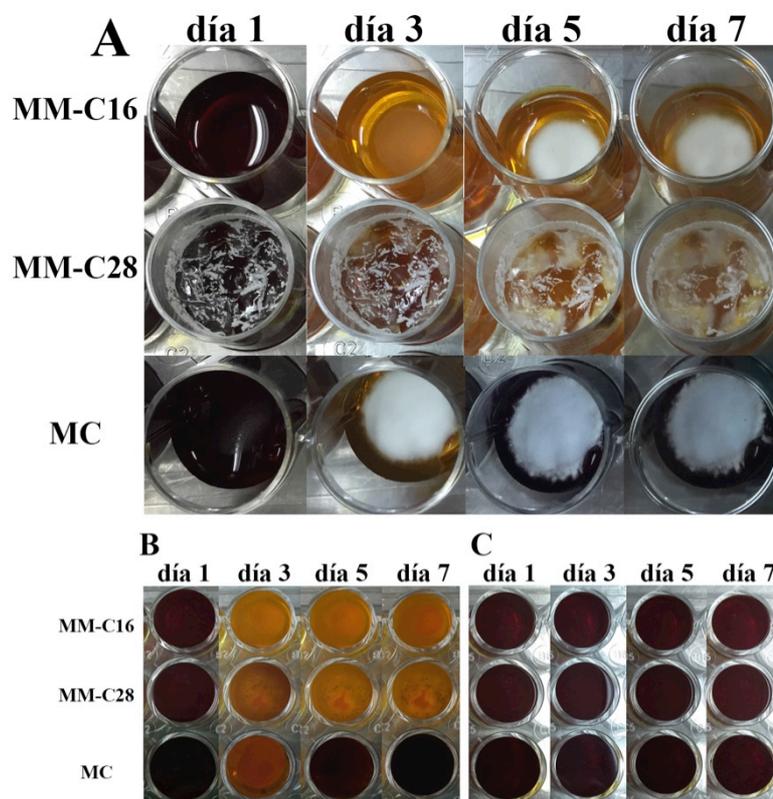
Las diferencias entre medias se determinaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el post-test de Tukey, en el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., EEUU). Para el análisis estadístico de los datos de qPCR entre tratamientos y controles se utilizó el software REST 2009 (Qiagen, Alemania).

# SECCIÓN I

## *Resultados*

### Crecimiento de *B. bassiana* en medios sólidos suplementados con hidrocarburos

Con el objetivo de ensayar el desarrollo de *B. bassiana* en medios conteniendo distintos hidrocarburos, se monitoreó el crecimiento y pH del medio en pocillos conteniendo medios sólidos inoculados con suspensiones de conidios (Figs. 3A y 3B), así como en pocillos sin inóculo fúngico (controles, fig. 3C).



**Figura 3.** Crecimiento en medio sólido registrado para los días 1, 3, 5 y 7 de crecimiento en MM con hidrocarburos y MC. **A)** Desarrollo micelial de *B. bassiana*. **B)** Parte trasera de pocillos de *B. bassiana* donde se observa el viraje del indicador de pH. **C)** Parte trasera de pocillos control (no inoculado con suspensión fúngica).

En coincidencia con reportes anteriores, *B. bassiana* es capaz de crecer en medios suplementados con alcanos. El crecimiento comenzó a ser visible en MM-agar con hexadecano desde el día 3, y en MM-agar con octacosano desde el día 5. Sin embargo, para MC-agar el crecimiento se visualizó desde el día 1, y se observó desarrollo micelial más abundante comparado con los pocillos suplementados con alcanos en todos los tiempos ensayados. Al día 3, los pocillos inoculados con suspensiones fúngicas conteniendo MM-agar con *n*-hexadecano y *n*-octacosano como única fuente de carbono cambiaron su coloración, evidenciando una disminución en el pH ( $\text{pH} < 4,4$ ), que se mantuvo a lo largo de todos los días del ensayo. El MC-agar también mostró una disminución de pH al día 3, luego aumentado a partir del día 5. No se observó crecimiento ni viraje de indicador de pH en los controles sin inóculo.

### **Crecimiento de *B. bassiana* en medios líquidos suplementados con hidrocarburos**

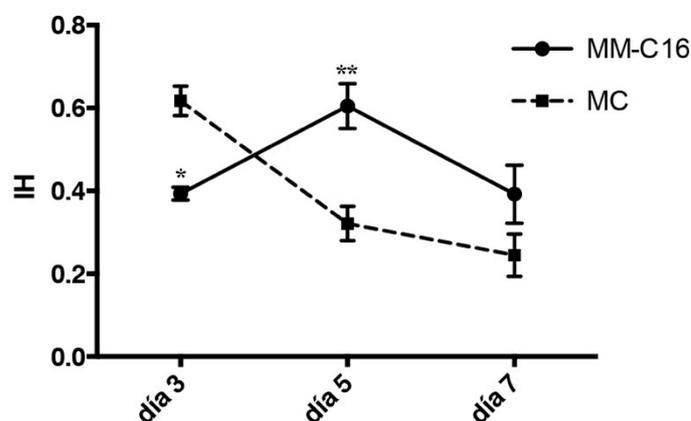
Luego de 3, 5 y 7 días de cultivo en medios líquidos, se registró el pH del medio y la variación de masa húmeda de hongos crecidos en MC y MM-C16. Para esto, el inóculo inicial y las células obtenidas para cada condición se pesaron luego de ser cosechadas. Asimismo, se midió el pH del medio de cultivo remanente (Tabla 2). Puede observarse que el peso húmedo aumenta al menos 5 veces en el MC, pero para MM-C16 no se registran variaciones, difiriendo significativamente con los valores para MC ( $p < 0.05$ ). El medio líquido obtenido luego del cultivo en MC mostró una disminución inicial del pH a los 3 días de crecimiento (el pH de MC fue 6), con un aumento progresivo y significativo ( $p < 0.01$ ) del pH durante los 7 días. Este comportamiento fue similar al encontrado para el crecimiento en medio sólido (Fig. 3B). En contraposición, en el MM-C16 se observó una tendencia (aunque no significativa) de disminución de pH en el medio de cultivo a lo largo de los días.

Día	Variación de biomasa		pH	
	MM-C16	MC	MM-C16	MC
3	1.2 ± 0.2aA	6.1 ± 0.8aB	6.1 ± 0.4aA	3.6 ± 0.1aB
5	1.2 ± 0.2aA	7.4 ± 1.4aB	5.4 ± 0.7aA	6.5 ± 0.1bA
7	1.1 ± 0.3aA	5.4 ± 1.9aB	4.9 ± 0.5aA	7.1 ± 0.1cB

**Tabla 2.** Variación de biomasa húmeda y pH del medio remanente para los días 1, 3 y 5 de crecimiento en MM-C16 y MC. Para cada determinación, valores en cada columna con diferentes letras minúsculas y valores en cada fila con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### Hidrofobicidad y topografía de la superficie celular

Para caracterizar la superficie de células crecidas en medio suplementado con hidrocarburos se utilizó el método MATH, basado en la interacción hidrofóbica de la superficie celular de conidios con la superficie de contacto, en este caso con hidrocarburos. Para esto, se ponen en contacto las células a estudiar con *n*-hexadecano y se cuantifica por espectrofotometría la migración de células hacia la fase orgánica. Para este ensayo se aislaron conidios de 3, 5 y 7 días de las biomásas de MM-C16 y MC y se determinó el índice de

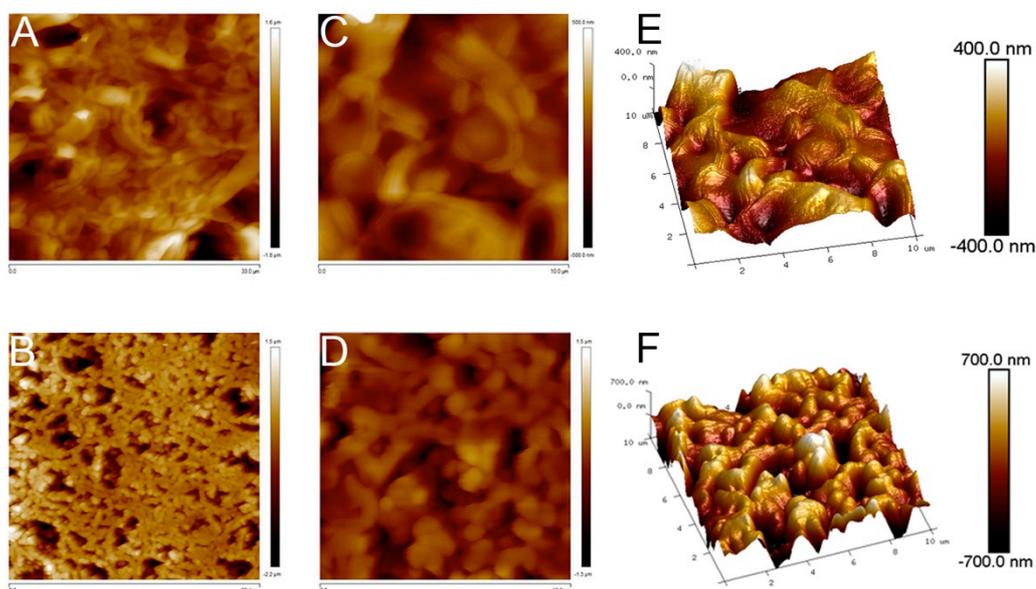


**Figura 4.** Hidrofobicidad de la superficie celular de conidios crecidos en MC y MM-C16 luego de 3, 5 y 7 días de crecimiento. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

hidrofobicidad (IH) para cada muestra. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 4.

Se observa que el IH de los conidios de MC disminuyó significativamente ( $p < 0,001$ ) entre el día 3 ( $0,62 \pm 0,04$ ) y el día 7 ( $0,25 \pm 0,05$ ). Para MM-C16, el IH fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el día 5 ( $0,61 \pm 0,05$ ) en comparación con los días 3 ( $0,39 \pm 0,02$ ) y 7 ( $0,39 \pm 0,06$ ). En este sentido, mientras en el día 3 el IH de MC fue mayor ( $p < 0,05$ ) que en conidios de MM-C16, en el día 5 el IH de MM-C16 fue mayor ( $p < 0,01$ ) que conidios de MC.

En base a estos resultados, se aislaron conidios de 5 días provenientes de cultivos de MM-C16 y MC para continuar con el análisis de la superficie celular. Éstos se fijaron en membranas y se analizaron por AFM utilizando el modo *tapping*. Se encontró que los conidios de MC son heterogéneos e irregulares, con diámetros variables entre 1,5 y 5,4  $\mu\text{m}$  (Figs. 5A, 5C). Sin embargo, los conidios de MM-C16 tienen formas más esféricas, uniformes, siendo más pequeños (con diámetros más entre 0,9 y 2,5  $\mu\text{m}$ ) (Figs. 5B, 5D). Las características topográficas también fueron distintivas, los conidios crecidos en MC tienen bordes profundos y rugosos, mientras que los conidios crecidos en MM-C16 resultaron tener estructuras más lisas y de bordes uniformes (Figs. 5E, 5F).

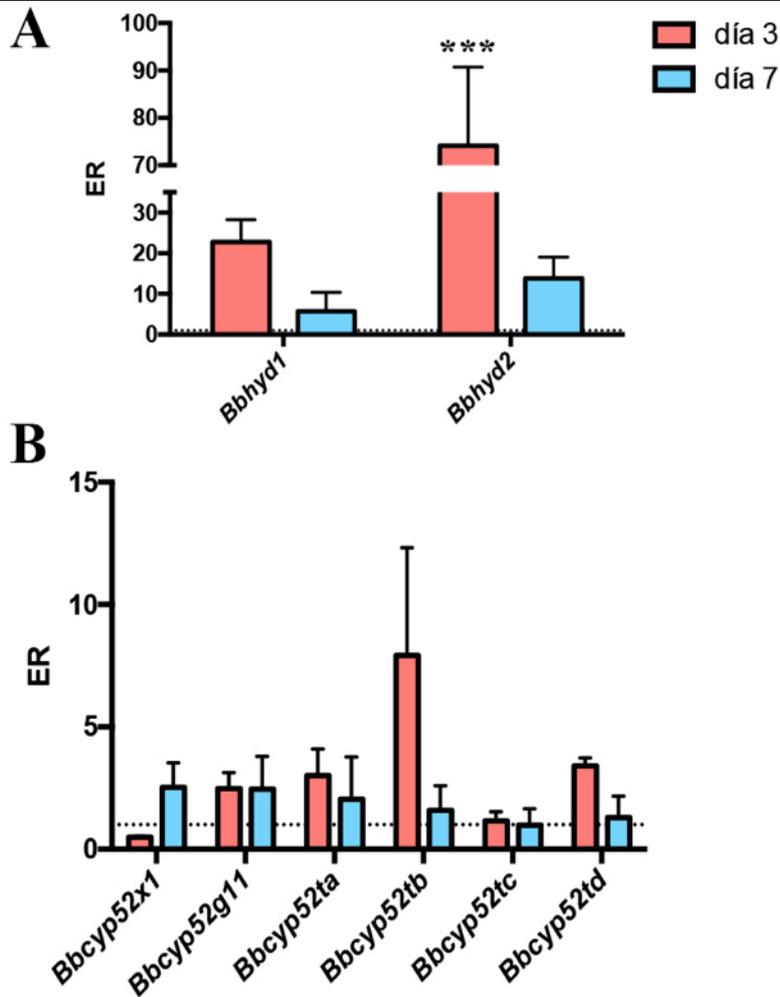


**Figura 5.** Imágenes obtenidas por AFM de conidios de 5 días crecidos en MC (B, D, F) y MM-C16 (A, C, E) en modo *tapping*. Las imágenes tienen una resolución de  $512 \times 512$  píxeles. La altura se expresa en escala de colores (barra en el lado derecho).

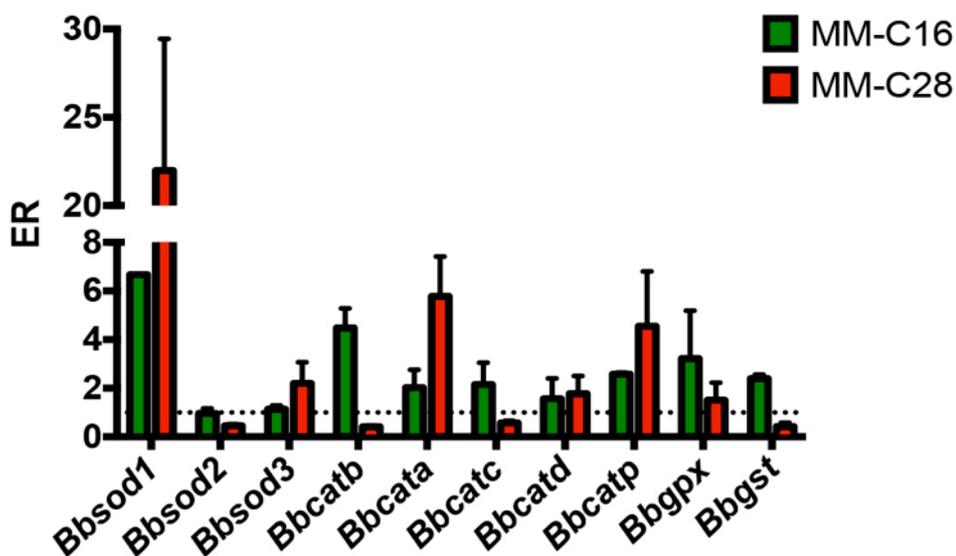
### Expresión diferencial de genes en *B. bassiana* crecido en hidrocarburos

Para estudiar una de las familias de genes potencialmente involucrados en la hidrofobicidad de la superficie celular, se midió la expresión génica de hidrofobinas en la biomasa de MM-C16 y biomasa de MC como control (Fig. 6A). Ambos genes fueron altamente inducidos en la biomasa de MM-C16. El nivel de expresión de *Bbhyd1* fue  $22,8 \pm 5,5$  veces más alto que los controles al día 3, mientras que el día 7 no se indujo significativamente ( $5,8 \pm 4,6$  veces). Para *Bbhyd2*, el nivel de expresión para el día 3 fue de  $74,1 \pm 16,6$  (día 3) y  $13,9 \pm 5,2$  (día 7) veces mayor que en MC. Asimismo, la expresión génica de *Bbhyd2* al día 3 fue significativamente más alta ( $p < 0,001$ ) que al día 7.

Por otro lado, se analizó la expresión relativa de todos los genes pertenecientes a la familia CYP52, genes que codifican para citocromo P450 monooxigenasas involucrados en la degradación de hidrocarburos mediante una reacción inicial de hidroxilación (Fig. 6B). Para las mismas condiciones de crecimiento descritas para las hidrofobinas, se halló que *Bbcyp52g11* no se vió inducido significativamente en el día 3 ( $2,5 \pm 0,6$ ) ni en el día 7 ( $2,4 \pm 1,3$ ), así como tampoco *Bbcyp52x1*, con niveles de expresión relativa de *Bbcyp52x1* de  $0,5 \pm 0,1$  y  $2,5 \pm 0,9$  para los días 3 y 7, respectivamente. Para las cuatro versiones del gen *Bbcyp52t*, *Bbcyp52ta* ( $3,9 \pm 1,1$  veces), *Bbcyp52tb* ( $7,9 \pm 4,4$  veces) y *Bbcyp52td* ( $3,4 \pm 0,3$  veces) se indujeron significativamente respecto de los controles al día 3, y no así al día 7, con niveles de expresión diferencial de  $2,1 \pm 1,7$  (*Bbcyp52ta*),  $1,6 \pm 1,0$  (*Bbcyp52tb*), y  $1,3 \pm 0,9$  veces (*Bbcyp52td*). Por el contrario, *Bbcyp52tc* no se indujo en las condiciones analizadas ( $1,2 \pm 0,4$  para el día 3 y  $1 \pm 0,7$  para el día 7).



**Figura 6.** Análisis de la expresión génica mediante qPCR en en MM-C16 de *B. bassiana* luego de 3 y 7 días de crecimiento comparado con el control (MC) de **A)** genes codificantes para hidrofobinas y **B)** genes CYP52 de *B. bassiana* mediante qPCR. Se utilizó el método de  $\Delta\Delta C_t$  con *Bbact* como gen de referencia. Las barras representan el error estándar de 4 ensayos independientes. La línea punteada indica la expresión relativa = 1. Los asteriscos marcan diferencias significativas en los valores entre 3 y 7 días, \*\*\* ( $p < 0,001$ ).



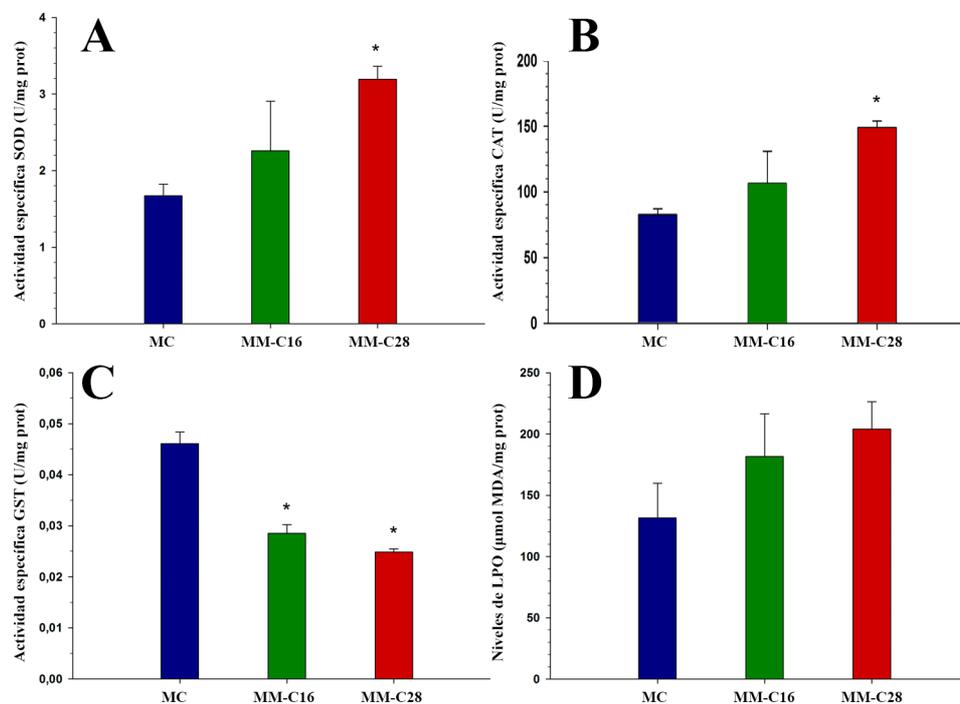
**Figura 7.** Análisis de la expresión génica mediante qPCR en en MM-C16 de *B. bassiana* luego de 2 días de crecimiento comparado con el control (MC) de marcadores de estrés oxidativo de *B. bassiana* mediante qPCR. Se utilizó el método de  $\Delta\Delta C_t$  con *Bbact* como gen de referencia. Las barras representan el error estándar de 4 ensayos independientes. La línea punteada indica la expresión relativa = 1.

Se midieron también los patrones de expresión de los genes marcadores de estrés oxidativo luego del cultivo con hidrocarburos (figura 7). Dentro de la familia de genes *sod*, *Bbsod1* resultó altamente inducido en presencia de *n*-octacosano ( $22,0 \pm 7,4$  veces) y *n*-hexadecano ( $6,7 \pm 0,01$  veces) respecto a los controles. En cambio, *Bbsod2* ( $< 1,0$ ) y *Bbsod3* ( $< 2,5$  veces) no se indujeron significativamente en presencia de hidrocarburos. Varios genes pertenecientes a la familia de las catalasas se indujeron en presencia de hidrocarburos: *Bbcatp* (peroxisómica) mostró niveles de expresión de  $4,5 \pm 2,2$  (MM-C28) y  $2,5 \pm 0,1$  (MM-C16); *Bbcatc* (citoplasmática) tuvo niveles de inducción similares que *Bbcatp* en MM-C16, aunque no presentó inducción en MM-C28; para *Bbcata* (espora específica) los niveles de expresión fueron de  $5,8 \pm 1,6$  veces más altos que controles en *n*-octacosano, mientras que la expresión de *Bbcatb* (secretada) se indujo con *n*-hexadecano ( $4,5 \pm 0,8$  veces). Por el contrario, *Bbcatd* (peroxidasa/catalasa secretada) no presentó niveles significativos de inducción con ninguno de los alcanos estudiados ( $< 1,8$  veces). Dentro del sistema GSH, *Bbgpx* no se indujo significativamente en presencia de hidrocarburos, con valores de  $3,2 \pm 1,9$  (MM-C16) y  $1,5 \pm 0,7$  (MM-C28) veces. Por otro lado, la expresión del gen codificante para la Glutación-S-transferasa no fue alterado significativamente por el crecimiento en hidrocarburos.

### Actividad enzimática de células crecidas en hidrocarburos

Dado que varios genes marcadores de estrés oxidativos se indujeron luego del crecimiento en hidrocarburos, se obtuvieron homogenatos de células aisladas de cultivos con *n*-hexadecano, *n*-octacosano, y MC (control) para realizar medidas de actividad de las enzimas codificadas por estos genes. Tanto la actividad catalasa como la actividad superóxido dismutasa aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en presencia de *n*-octacosano (Figs. 8A y 8B). Por el contrario, la actividad específica de glutación-S-transferasa disminuyó

significativamente en presencia de hexano y de octacosano (Fig. 8C). También se realizaron medidas para estudiar el proceso de peroxidación lipídica ya que los lípidos son una de las especies orgánicas más afectadas por las ROS (Fig. 8D). En este caso, no hubo diferencias significativas en presencia de hidrocarburos respecto de células crecidas en glucosa. Sin embargo, se observa una tendencia de aumento.

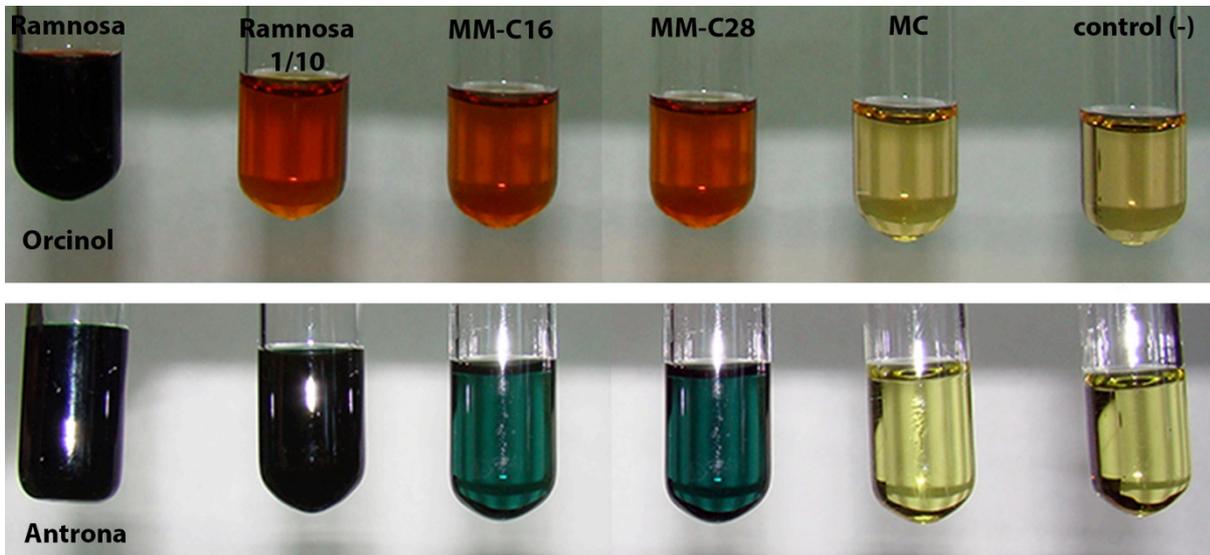


**Figura 8.** Sistema antioxidante de *B. bassiana* crecida en medio con hidrocarburos y MC (control). **A)** Actividad superóxido dismutasa (SOD). **B)** Actividad catalasa (CAT). **C)** Actividad glutatión-S-transferasa (GST). **D)** Peroxidación lipídica (LPO). En azul se muestran los valores para células crecidas en MC, en verde MM-C16, en rojo MM-C28. Los asteriscos indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre MC y medios con hidrocarburos.

### Aislamiento y caracterización de glicolípidos (biosurfactantes)

En microorganismos degradadores de hidrocarburos se ha reportado la síntesis de biosurfactantes necesarios para captar y emulsificar moléculas hidrofóbicas. Como se encontró que *B. bassiana* acidifica el medio al crecer en medios con hidrocarburos, se siguieron protocolos descritos en bacterias y levaduras degradadoras de hidrocarburos para

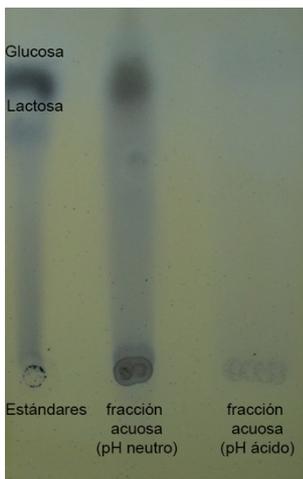
intentar aislar glicolípidos de naturaleza ácida luego de 2 días de crecimiento en medios con alcanos y medio completo como control. Los glicolípidos buscados estarían compuestos por residuos glicosídicos (hidrofilicos) unidos por uniones ésteres a residuos lipídicos (hidrofóbicos). Se aislaron precipitados en MM-C16, MM-C28 y MC y se estudió su naturaleza empleando distintos métodos colorimétricos y cromatográficos. Se encontró que los medios con alcanos dieron reacciones positivas por el método de orcinol y de antrona, mientras que el medio completo dio negativo para ambas reacciones (Fig. 9). Por la coloración marrón visualizada luego de la reacción con orcinol puede deducirse que los residuos glicosídicos serían mayoritariamente hexosas. Se realizó una reacción de metanólisis en medio ácido de las muestras originalmente obtenidas en medios MM-C16 y MM-C28 para la hidrólisis de glicolípidos. Luego de la reacción que provocaría la ruptura de los glicolípidos en restos glicosídicos hidrofilicos y restos lipídicos hidrofóbicos, se realizó una extracción por separación de fases con *n*-hexano. Por la diferencia en polaridad de cada solvente, se esperaba que los residuos glicosídicos se encontraran en la fase acuosa, y los residuos lipídicos en la fase de hexano. Para comprobar esto, se concentraron las fracciones con flujo constante de aire y se analizó cada una de las fracciones por separado.



**Figura 9.** Ensayos colorimétricos para la detección de azúcares de orcinol (arriba) y antrona (abajo). Como controles positivos se utilizaron dos soluciones de ramnosa, y como control negativo se utilizó agua miliQ.

### Caracterización de la fracción hidrófila de la metanólisis

Las fracciones acuosas se sembraron en placas de TLC junto con estándares de monosacáridos (glucosa) y disacáridos (lactosa). Como las fracciones provienen de la metanólisis en medio ácido, se neutralizaron las muestras y también se sembraron. Luego del revelado, se halló una mancha entre ambos estándares en la muestra neutralizada, por lo que no puede concluirse si los residuos glicosídicos aislados fueron monosacáridos, disacáridos o mezcla de ambos (Fig. 10).



**Figura 10.** TLC de los la fracción polar de la metanólisis. Se utilizaron glucosa y lactosa como estándares. La muestra fue sembrada en las condiciones de la reacción anterior (pH ácido), y luego de neutralizar el pH de la solución.

Para la identificación de la fracción polar de la metanólisis se realizó un análisis por HPAEC-PAD. Se encontraron tres picos que se identificaron como fucosa, glucosamina y manosa (Fig. 11). Estos azúcares son constitutivos de pared celular fúngica y no se encuentran como constituyentes de glicolípidos reportados en otros microorganismos.

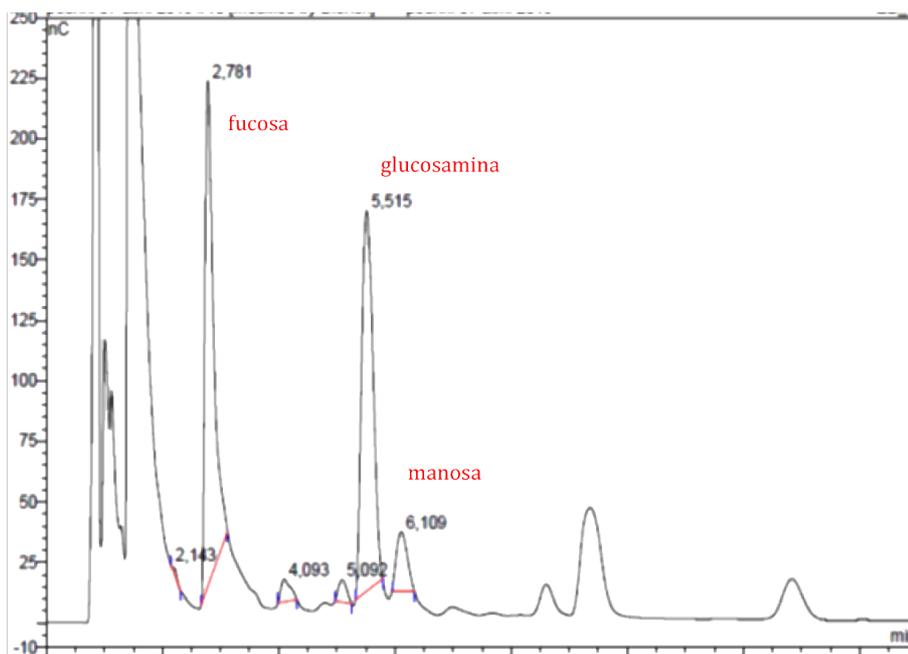
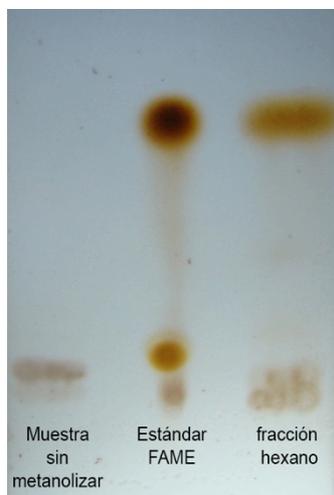


Figura 11. Perfil cromatográfico de la fracción polar de la metanólisis analizado por HPAEC-PAD.

### Caracterización de la fracción hidrofóbica de la metanólisis

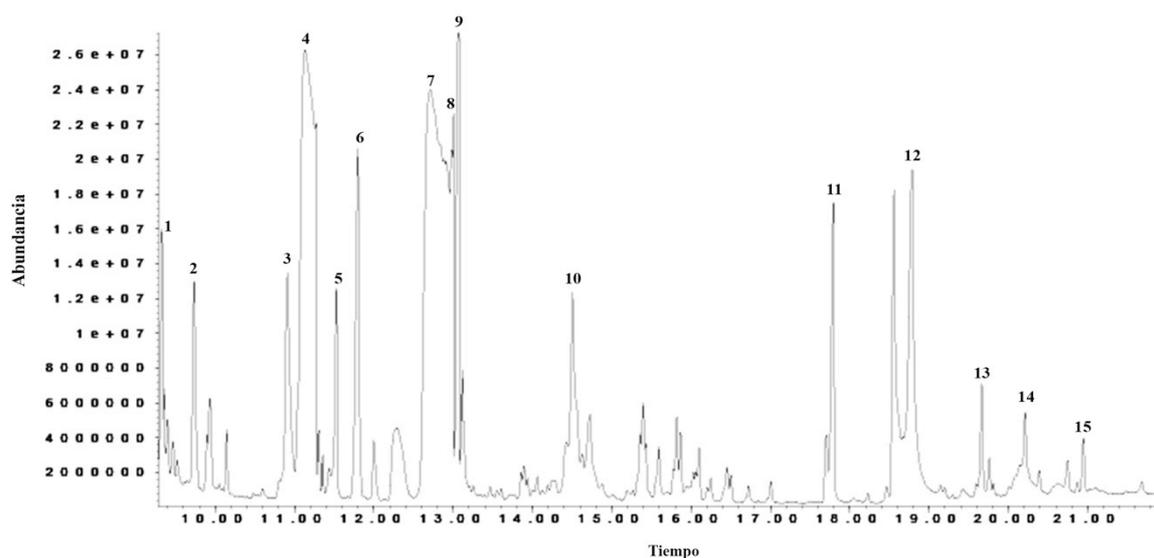
La fracciones hexano se corrieron en placas de TLC junto con estándares de ácidos grasos metil-esterificados y muestras sin metanolizar. Luego del revelado de la placa, para la



fracción hexano se visualizó una mancha coincidente con el estándar de ácido graso metil-esterificado. También puede verse que la muestra sin metanolizar permaneció en el punto de siembra, por lo que puede deducirse que la muestra inicialmente puede contener moléculas más complejas (fosfolípidos, glicolípidos u otras moléculas anfipáticas) con las que interacciona e impide que desarrollen en la placa (Fig. 12).

Figura 12. TLC de la fracción no polar de la metanólisis. Se utilizó un estándar de ácido graso metil esterificado. Como testigo de la metanólisis se sembró el precipitado no hidrolizado.

Las fracciones de hexano de las muestras originalmente precipitadas de MM-C16 y MM-C28 y luego hidrolizadas se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso capilar acoplado a un espectrómetro de masas.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico de la fracción no polar de la metanólisis de la muestra originaria de MM-C16 analizado por CGC-MS. Los picos señalados corresponden a: 1- ác. tetradecanoico; 3- ác. 9-hexadecenoico; 4- ác. hexadecanoico; 6-*n*-hexadecano; 7- ác. 9,12-octadienoico; 8- ác. 9-octadecenoico; 9- ác. octadecanoico; 10-ác. 2-hidroxiheneicosanoico; 11- ác. tetracosanoico; 12- ác 2-hidroxitricosanoico; 13, 14, 15- derivados de ergosterol; 2,5- no identificados.

En el perfil de lípidos metilesterificados provenientes de crecimiento en hexadecano (Figura 13) se identificaron diferentes derivados de ácidos grasos típicos de membrana celular, principalmente ácidos 16:1, 16:0, 18:2, 18:1 18:0 (picos 3, 4, 7, 8, 9, respectivamente). También se encontraron picos correspondientes a derivados de ergosterol (componentes de membrana fúngica; picos 13, 14, 15) y un pico correspondiente al *n*-hexadecano (pico 6), hidrocarburo utilizado como fuente de carbono en el medio de cultivo de la muestra inyectada en este caso. También se identificó el pico 11 como ácido tetracosanoico, un ácido graso de cadena larga de abundancia considerable, que podría estar formando parte de los glicolípidos ya que no es abundante en membranas (Juárez et al., 2000). Por otro lado, los picos 10 y 12, serían ácidos grasos hidroxilados de 21 y 23 carbonos,

respectivamente. Sin embargo, la superposición de varios compuestos en el mismo pico (eluyen en el mismo tiempo de retención) no permite confirmar su identidad. Estas hidroxilaciones son similares a las encontradas en ácidos grasos pertenecientes a glicolípidos reportados en otros organismos. Para las muestras procesadas luego del crecimiento en octacosano se obtuvieron perfiles similares.

Tanto el perfil de azúcares como el de lípidos estarían reflejando que los precipitados obtenidos en medios suplementados con hidrocarburos contendrían restos celulares.

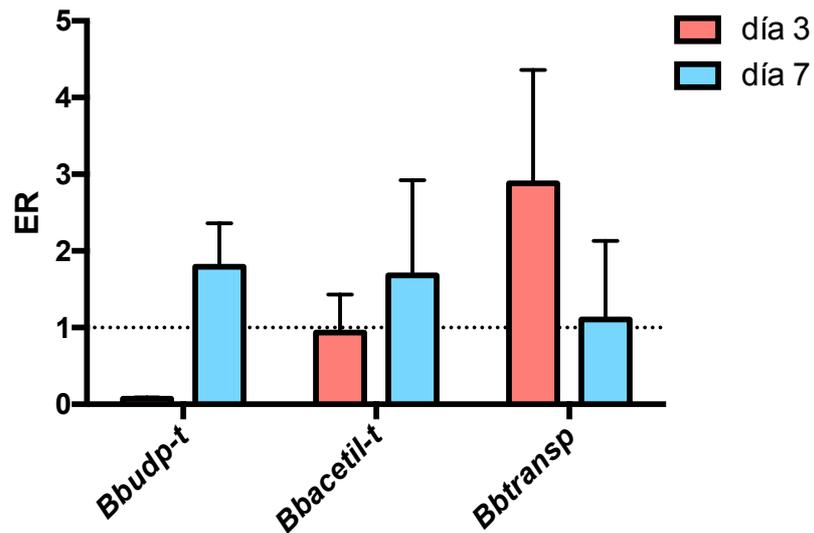
### **Expresión diferencial de genes potencialmente involucrados en la biosíntesis de glicolípidos**

Luego de una búsqueda bibliográfica para seleccionar posibles genes candidatos en la vía de síntesis de glicolípidos, se hallaron en *B. bassiana* secuencias ortólogas de genes de *Candida bombicola* localizados en un cluster responsable por la síntesis de glicolípidos, conformado por una glicosiltransferasa dependiente de UDP, que se encarga de transferir el resto glicosídico al resto lipídico, una acetiltransferasa que acetila el glicolípido, un transportador que permite el pasaje del glicolípido al espacio periplásmico, y una CYP52 encargada de hidroxilar el ácido graso (Van Bogaert et al., 2013). Luego de obtener las secuencias de *B. bassiana*, se diseñaron los primers y se utilizaron para analizar los patrones de expresión de estos genes en células de MM-C16 y MC (control) (Fig. 14).

Se halló que *Bbudp-t* redujo sus valores de expresión en MM-C16 significativamente para el día 3 ( $0,07 \pm 0,01$  veces), y se expresó de manera similar al control para el día 7 ( $1,8 \pm 0,5$  veces). *Bbacetil-t* no se indujo significativamente respecto al control, con niveles de expresión de  $0,9 \pm 0,5$  veces (día 3) y  $1,7 \pm 1,2$  veces (día 3). *Bbtransp* se expresó de manera similar al control ( $2,9 \pm 1,5$  veces y  $1,1 \pm 1$  veces para los días 3 y 7, respectivamente).

El gen codificante para la CYP52 ortólogo en *B. bassiana* fue *Bbcyp52g11*. Como se

describió anteriormente (Fig. 6B), este gen no indujo significativamente para el día 3 ( $2,5 \pm 0,6$ ) ni para el día 7 ( $2,4 \pm 1,3$ ).



**Figura 14.** Análisis de la expresión génica mediante qPCR en MM-C16 de *B. bassiana* luego de 3 y 7 días de crecimiento comparado con el control (MC) de genes potencialmente involucrados en la síntesis de glicolípidos de *B. bassiana* mediante qPCR. Se utilizó el método de  $\Delta\Delta C_t$  con *Bbact* como gen de referencia. Las barras representan el error estándar de 4 ensayos independientes. La línea punteada indica la expresión relativa = 1.

## *Discusión*

Se conoce que *Beauveria bassiana* es capaz de crecer en medios sólidos suplementados con hidrocarburos alifáticos (Napolitano y Juárez, 1997; Crespo et al., 2000, Juárez et al., 2000; Pedrini et al., 2007) y se confirma en este trabajo de tesis. Sin embargo, el crecimiento en estos medios se ve levemente retardado respecto de medios ricos. De los hidrocarburos alifáticos ensayados, el crecimiento de *B. bassiana* fue visible antes y de manera más abundante con *n*-hexadecano. Estos resultados son coincidentes con los encontrados en Pedrini et al. (2010), donde se reportó que *n*-hexadecano fue el hidrocarburo de preferencia en un análisis comparativo de crecimiento con una serie de alcanos conteniendo entre 9 y 33 carbonos. En el cultivo con MM líquidos suplementados con *n*-hexadecano no se observó un aumento significativo de la biomasa durante los períodos de incubación estudiados, en contraste con medios ricos en glucosa, donde se registraron aumentos de más de 5 veces en la biomasa respecto del inóculo inicial.

Tanto en medios sólidos como líquidos se observaron patrones diferenciales de pH en los medios remanentes, con un aumento de pH en MC y un descenso en MM-C16 y MM-C28. Estos comportamientos pueden deberse a la secreción de distintos compuestos de naturaleza ácida que cambien el pH del entorno. Se conoce que *B. bassiana* puede liberar ácido oxálico como un factor de virulencia, y que su secreción es dependiente del medio de cultivo utilizado (Kirkland et al., 2005). También, como se ha mencionado, los microorganismos degradadores de alcanos liberan biosurfactantes, algunos con restos ácidos como soforolípidos, ácidos grasos libres, entre otros, en el proceso de captación de compuestos hidrofóbicos (Kitamoto et al., 2002). Por último, no puede descartarse el consumo de otros compuestos de naturaleza básica que provoquen indirectamente la acidificación del medio.

Se evidenciaron diferencias en los índices de hidrofobicidad en conidios aislados de las biomasas de MM-C16 y MC, así como topografías diferentes visualizadas por AFM. Se

ha descrito que en *B. bassiana* los conidios aéreos son los propágulos más hidrofóbicos, los blastosporos son hidrofílicos, y los conidios sumergidos presentan índices de hidrofobicidad intermedios (Holder et al., 2007). Los valores de hidrofobicidad para conidios sumergidos hallados en las condiciones estudiadas son similares a los hallados por Holder et al. (2007), y además, se observa que la presencia de *n*-hexadecano provoca un aumento en estos índices luego de 5 días de cultivo para conidios de MM-C16. Las hidrofobinas son proteínas anfipáticas que en hongos entomopatógenos permiten la adhesión de los conidios en superficies hidrofóbicas como la epicutícula del insecto (Vigueras et al., 2014). En la biomasa de MM-C16 se halló que los patrones de expresión de hidrofobinas eran significativamente mayores que en MC. Asimismo, se conoce que los mutantes  $\Delta Bbhyd1$  y  $\Delta Bbhyd2$ , y el doble mutante  $\Delta Bbhyd1Bbhyd2$  muestran IH significativamente menores que en conidios *wild type* (Zhang et al., 2011). Si bien no se realizaron *western blots* para identificar la presencia y expresión aumentada de las proteínas codificadas, puede suponerse que uno de los causantes de los cambios de hidrofobicidad y topografía de la superficie celular de conidios crecidos en MM-C16 es la expresión diferencial de hidrofobinas. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder afirmar esta hipótesis.

Como se ha mencionado anteriormente, los hongos entomopatógenos, y en particular *B. bassiana* tienen la habilidad de crecer en medios con hidrocarburos como única fuente de carbono (Napolitano y Juárez, 1997). Se evidenció un escenario de estrés oxidativo en células crecidas en medios líquidos suplementados con hidrocarburos en los primeros días de cultivo. Particularmente, se halló que la actividad SOD aumentó en MM-C28, mientras que la expresión relativa del gen codificante para la Cu-SOD citosólica, *Bbsod1*, se indujo en MM-C16 y MM-C28. Sin embargo, los genes *Bbsod2* y *Bbsod3* codificantes para Mn-SODs citosólica y mitocondrial, respectivamente, no se indujeron en estos cultivos. Sin embargo, ambos genes se indujeron más que *Bbsod1* en *B. bassiana* expuestos al insecticida piretroide

deltametrina (Forlani et al. 2014), sugiriendo que existe complementariedad de funciones para mitigar el efecto de los iones superóxido generados por diferentes fuentes de estrés. Si bien no hay información disponible de actividad enzimática de fracciones subcelulares, los resultados de expresión génica sugieren que *Bbsod1* sería el principal responsable de la actividad enzimática aumentada en homogenatos crudos de *B. bassiana* crecida en hidrocarburos.

Al igual que lo observado para las SOD, la actividad CAT aumentó significativamente en MM-C28, en coincidencia con lo reportado en Pedrini et al. (2006). Los genes más inducidos en estas condiciones fueron *Bbcata* (MM-C28), *Bbcatb* (MM-C16) y *Bbcatp*. La inducción diferencial de estos genes estarían reflejando indirectamente distintas fuentes de especies reactivas de oxígeno. *Bbcata* y *Bbcatb* estarían siendo inducidas por la presencia de ROS citoplasmáticas y de pared, mientras que *Bbcatp* estaría siendo inducida debido a la degradación de hidrocarburos vía  $\beta$  oxidación peroxisómica, según se sugiere en Pedrini et al. (2006). Las funciones de estos genes han sido estudiadas mediante disrupción génica (Wang et al., 2013). *Bbcatp* y *Bbcatb* parecen ser los contribuyentes mayoritarios en la actividad CAT, con pérdidas de 56 and 89% para  $\Delta Bbcatp$  and  $\Delta Bbcatb$ , respectivamente. *Bbcata* y *Bbcatd* parecen ser más importantes en otras situaciones de estrés, como altas temperaturas y radiación UV-B. La delección de *Bbcatp* resultó en una sensibilidad aumentada al estrés oxidativo durante la germinación de los conidios y el crecimiento vegetativo. También se evidenció una disminución del 50% en la virulencia de la cepa mutante, reflejando la importancia de esta enzima en el proceso de infección. Sin embargo, los mutantes no fueron afectados por los cambios térmicos o UV. Si bien no hay información de la asimilación de alcanos en estos mutantes, los resultados obtenidos sugieren que la catalasa peroxisómica sería un factor crucial en la adaptación al estrés oxidativo generado por el crecimiento en hidrocarburos.

Dentro del sistema GSH, el gen *Bbgpx* no se indujo durante el crecimiento en alcanos. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede ser eliminado tanto por la enzima glutatión peroxidasa como por las catalasas. En este sentido, se conoce que existe cooperatividad entre ambas actividades (Michiels et al., 1994); CAT es usualmente vulnerable a valores altos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la expresión de *gpx* está regulada para mantener la actividad catalasa (Baud et al., 2004). Es por este motivo que la actividad CAT y los niveles de inducción altos de los genes codificantes para esta familia podrían explicar la baja inducción de *Bbgpx*. Por otro lado, la expresión del gen codificante para la glutatión-S-transferasa no fue alterado significativamente por el crecimiento en hidrocarburos, así como tampoco con deltametrina (Forlani et al., 2014). Esto es esperable dado que esta enzima forma parte del sistema de detoxificación clase II, y los hidrocarburos serían detoxificados por el sistema de las citocromo P450 perteneciente al sistema de clase I (Pedrini, 2006).

El sistema citocromo P450 monooxigenasa cataliza la primera reacción del proceso de degradación de hidrocarburos (Pedrini et al., 2010). Luego de la publicación del genoma de *B. bassiana* (Xiao et al., 2012), se hallaron 83 genes codificantes para CYP, con 6 secuencias génicas clasificadas dentro de la familia CYP52. Esta familia es la responsable de la degradación de alcanos en levaduras, BbCYP52X1 ha sido identificada como responsable en la hidroxilación de alcanos y ácidos grasos para su degradación (Zhang et al., 2012). Si bien se estudiaron otros mutantes dentro de esta y otras familias, no se hallaron fenotipos distintivos, posiblemente por el solapamiento de funciones o redundancia en la especificidad de sustrato entre miembros CYP (Pedrini et al., 2013). En las condiciones de crecimiento aquí estudiadas, se halló que algunos genes se inducen luego de 3 días, algunos luego de 7 días, y otros no muestran niveles de transcripción mayores a los encontrados en medios ricos. Particularmente, *Bbcyp52x1* mostró niveles de expresión similares a los encontrados en Zhang et al. (2012) para *n*-hexadecano a los 7 días de crecimiento, pero no diferentes

significativamente a los controles. Sin embargo, para alcanos de cadena más larga este gen se indujo significativamente (Zhang et al., 2012). Los resultados de inducción diferentes al día 3 y 7 podrían explicarse nuevamente por el posible solapamiento de funciones. Asimismo, en este trabajo se encontró que los genes *Bbcyp52ta*, *Bbcyp52tb* y *Bbcyp52td* se indujeron durante el crecimiento con *n*-hexadecano, pero no se han caracterizado estos genes o sus productos proteicos, por lo que no puede más que especularse sobre su potencial función en la degradación de hidrocarburos. También, si bien se le atribuye la función de degradación de alcanos a la familia CYP52, no puede descartarse que otras CYP estén involucradas en el proceso. En este sentido, Pedrini et al. (2010) hallaron altos niveles de inducción en genes pertenecientes a otras familias CYP en células crecidas en hidrocarburos de cadena corta, mediana y larga; algunos de ellos fueron clasificados en el clan CYP52 (CYP655C1 y CYP539B5) junto con la familia CYP52 y otros clasificados fuera de este clan. Sin embargo, ninguno de los mutantes obtenidos para estos genes mostró fenotipos distintivos. Como se propone en Pedrini et al. (2013), la amplia variedad de hidrocarburos hallados no sólo en distintos insectos hospedadores, sino en distintas etapas de crecimiento en un mismo insecto, explicaría la inespecificidad parcial de sustratos y solapamiento de funciones entre las citocromo P450 de *B. bassiana*.

Si bien el proceso de degradación de hidrocarburos cuticulares ha sido ampliamente estudiado, no existe evidencia de los procesos involucrados en la captación e internalización de estos hidrocarburos en hongos entomopatógenos. Se conocen mecanismos de captación en levaduras degradadoras de alcanos, en los que intervienen biosurfactantes (Kappeli et al., 1984; Lindley y Heydeman, 1986; Goma et al., 1973; Meisel et al., 1973; Cooney et al., 1980; Reddy et al., 1982; Cameotra et al., 1983). Luego de dos días de crecimiento en hidrocarburos, se separaron y caracterizaron precipitados hallados en MM-C16 y MM-C28 con protocolos de aislamiento de biosurfactantes en bacterias y levaduras. Estos precipitados

contienen residuos glicosídicos, visualizados por métodos colorimétricos, y ácidos grasos, visualizados luego de la reacción de metanólisis por TLC. Se comprobó por CGC-MS que en estos precipitados existen ácidos grasos de cadena larga. Previamente se ha estudiado en el laboratorio la composición lipídica total de *B. bassiana* crecida en medio completo y medios suplementado con hidrocarburos (Juárez et al., 2000). En ese trabajo se vieron diferencias entre los perfiles lipídicos, encontrando ácidos grasos de cadenas más largas en células crecidas con hidrocarburo, y no así en medio completo. Si bien en el presente trabajo no se estudiaron los perfiles lipídicos de MC, la evidencia preliminar permitiría descartar la presencia de ácidos grasos de cadena larga en células crecidas en MC y fortalecer la hipótesis de que existen ácidos grasos no constitutivos de membrana celular que están siendo sintetizados en respuesta al crecimiento en hidrocarburos. Asimismo, Juárez et al. (2000) tampoco hallaron ácidos grasos hidroxilados en los perfiles totales de células crecidas en MC, en contraposición con lo que se observó en los perfiles obtenidos en este trabajo para los precipitados en medios con hidrocarburos. Se conoce que los glicolípidos están formados por ácidos grasos hidroxilados unidos por enlaces éster a residuos glicosídicos (Smyth et al., 2010). Es posible que los ácidos grasos hidroxilados encontrados en perfiles de MM-C16 y MM-C28 formen parte de glicolípidos para solubilizar e internalizar los hidrocarburos del medio. En este sentido, en levaduras se ha reportado la presencia de biosurfactantes anclados a la superficie celular, que intervienen en la captación e internalización de sustancias hidrofóbicas mediante vesículas a través de mecanismos complejos de endocitosis (Meisel et al., 1973; Cooney et al., 1980; Lindley y Heydeman, 1986). Si estos mecanismos ocurrieran en células de *B. bassiana*, puede hipotetizarse que debido a la agitación, las vesículas en formación conteniendo biosurfactantes se liberarían al medio de cultivo y es por este motivo que en los perfiles se encuentran compuestos constitutivos de membrana y pared. Es importante destacar que si así fuera, estos mecanismos no estarían siendo activamente

utilizados en células crecidas en MC, ya que el precipitado obtenido para esas muestras no dieron reacciones positivas para azúcares por los métodos colorimétricos estudiados. Alternativamente, células intactas pueden migrar a la interfase agua/hidrocarburo y así no puedan ser aisladas por centrifugación a  $5.800\times g$ , luego precipitando a  $20.000\times g$ .

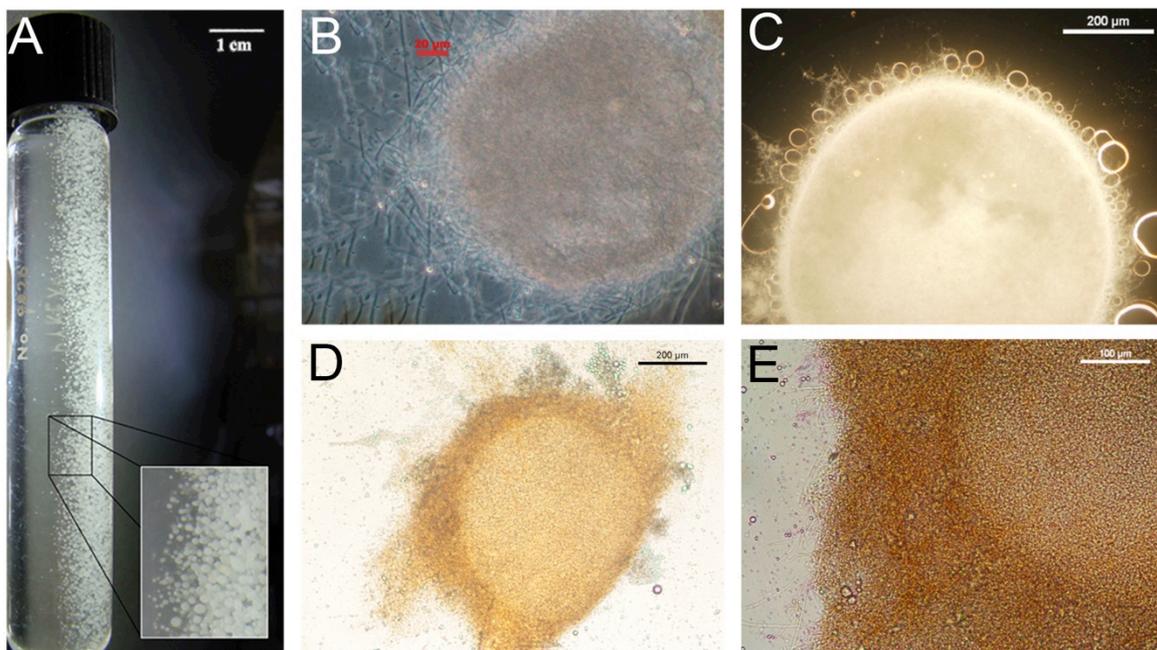
Se estudió la expresión relativa de genes de *B. bassiana* ortólogos a los involucrados en la síntesis de soforolípidos en *S. bombycolina* (Van Bogaert et al., 2013). Sin embargo, se hallaron niveles de inducción moderados y/o bajos para los genes estudiados. Dado que estos genes ortólogos constituyen un cluster específico en levaduras, los bajos niveles de inducción estarían indicando, o bien que el glicolípido buscado no sería un soforolípido, o bien que estos genes en *B. bassiana* no necesariamente están involucrados en la síntesis de el/los glicolípidos en esta especie, independientemente de la naturaleza del mismo. Es necesario continuar con el estudio de genes potencialmente involucrados en la síntesis de éstos u otros biosurfactantes, y complementando los resultados con knock out de los genes candidatos para evaluar si se modifica el crecimiento en hidrocarburos y/o la virulencia de las cepas mutantes.

## **SECCIÓN II**

## *Resultados*

### Aislamiento de pellets miceliales

Para continuar con el aislamiento de glicolípidos fúngicos se decidió prolongar los tiempos de cultivo en medios suplementados con *n*-hexadecano. Luego de 3 días de cultivo se encontraron agregados esféricos macroscópicos, no uniformes, en el medio mínimo suplementado con *n*-hexadecano en contacto directo con la fase orgánica luego de la separación de la biomasa celular por centrifugación (Fig. 15A). Estas estructuras también se hallaron luego de 5 y 7 días de cultivo y se hallaron en medio completo en las mismas condiciones de cultivo. Luego de varias repeticiones se observó que la cantidad de agregados así como sus tamaños no seguían un patrón definido, inclusive en distintos erlenmeyers en un mismo ensayo inoculado con la misma biomasa inicial de MC. Estos agregados se separaron por filtración para su estudio.



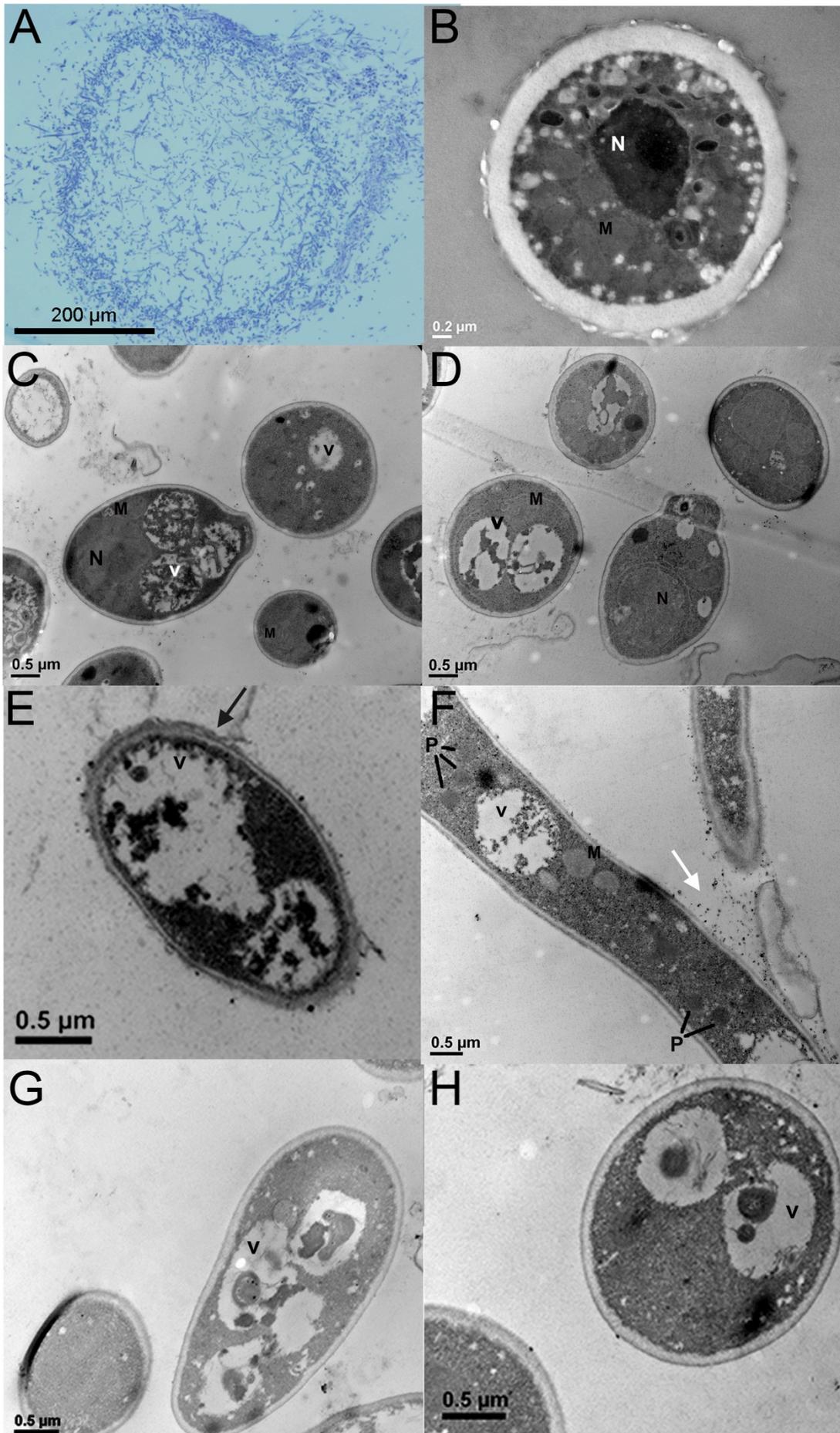
**Figura 15.** A) Pellets miceliales suspendidos en agua dentro de un tubo de ensayo. B) Microscopía de contraste de fases de un pellet aislado formado por cúmulo de hifas (40×). C) Gotas de hexadecano rodeando la estructura del pellet (10×). D) Pellet teñido con DAB (10×). E) Pellet teñido con DAB (20×).

### Observaciones por microscopía

Se evidenció por microscopía óptica que los agregados hallados en MM-C16 de 7 días están formados por cúmulos de hifas (Fig. 15B), rodeados de gotas de hexadecano (Fig. 15C). Estas estructuras, denominadas pellets miceliales, son similares a las descritas en otros hongos crecidos en medios ricos en glucosa y fuentes de nitrógeno. Sin embargo, no existen reportes de pellets miceliales de *B. bassiana* en medios ricos o medios suplementados con hidrocarburos. Por su novedad, se prosiguió a estudiarlos y caracterizarlos.

Dado que se conoce que los conidios de *B. bassiana* cultivados en hidrocarburos presentan alta actividad peroxidasa/catalasa (Crespo et al., 2000), los pellets también se tiñeron con DAB. Se observó una tinción intensa en toda la estructura del pellet y una menor tinción en las hifas cerca de los bordes de la estructura, indicando una alta actividad peroxidasa en las células que conforman los pellets (Fig. 15D y 15E).

Para el procesamiento de muestras para TEM se aislaron pellets miceliales de 7 días y biomásas de MC y MM-C16 de 7 días para su visualización. Se obtuvieron cortes semifinos que se observaron por microscopía óptica para seleccionar las zonas de cortes ultrafinos para su observación por TEM. La observación de uno de los cortes preliminares semifinos de pellets miceliales se muestra en la figura 16A. Es visible que los agregados son estructuras poco compactas, de hifas entrelazadas, poco densas y con bordes bastante definidos.



**Figura 16.** **A)** Observación de un corte semifino de pellet miceliales por microscopía óptica donde se observa la estructura del cúmulo (40×). **B)** Ultraestructura de pellet miceliales (50.000×). **C)** Ultraestructura de la biomasa de MM-C16 (30.000×). **D)** Ultraestructura de la biomasa de MC (30.000×). **E), F)** Ultraestructura de pellets miceliales (30,000×) teñidos con DAB. La reacción aparece como puntos blancos pequeños dentro de las células y en las interconexiones (flecha blanca). Varios peroxisomas son visibles por la tinción. Estructuras similares a pelos se visualizan en la superficie celular (flecha negra). **G), H)** Ultraestructura de biomasa de MC a 30,000× teñida con DAB. La reacción es positiva mayoritariamente en vacuolas y no se visualizan peroxisomas. V: vacuola. N: núcleo. M: mitocondria. P: peroxisoma.

La visualización por TEM de los cortes ultrafinos de pellets miceliales (Fig. 16B) evidenciaron una superficie celular irregular en la cara citoplasmática, vesículas pequeñas de contraste similar y un grosor aparente mayor comparado con la superficie de células de MC (Fig. 16C) y MM-C16 (Fig. 16D). Para comparar el grosor de la superficie de pellets, MC y MM-C16, se midió el espesor de la superficie celular de alrededor de 10 células de cada muestra. Se encontró que el espesor promedio en los pellets ( $0,36 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ) es significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) que los encontrados en MC ( $0,11 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ) y MM-C16 ( $0,15 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ).

Las muestras de pellets y biomasa de MC de 7 días se tiñeron con DAB y se procesaron para TEM como se indica en Materiales y Métodos. Las imágenes de cortes de pellets teñidos con DAB revelaron altos niveles de actividad peroxidasa/catalasa, visualizados como puntos negros pequeños dentro de las células (Fig. 16E) y en las conexiones entre células (Fig. 16F). También se diferenciaron varios peroxisomas y estructuras similares a pelos en la superficie celular. Por el contrario, en células de MC se observó que la reacción con DAB fue menor, principalmente encontrada dentro de vacuolas, pocos o ningún peroxisoma y superficies celulares lisas (Figs. 16G y 16H).

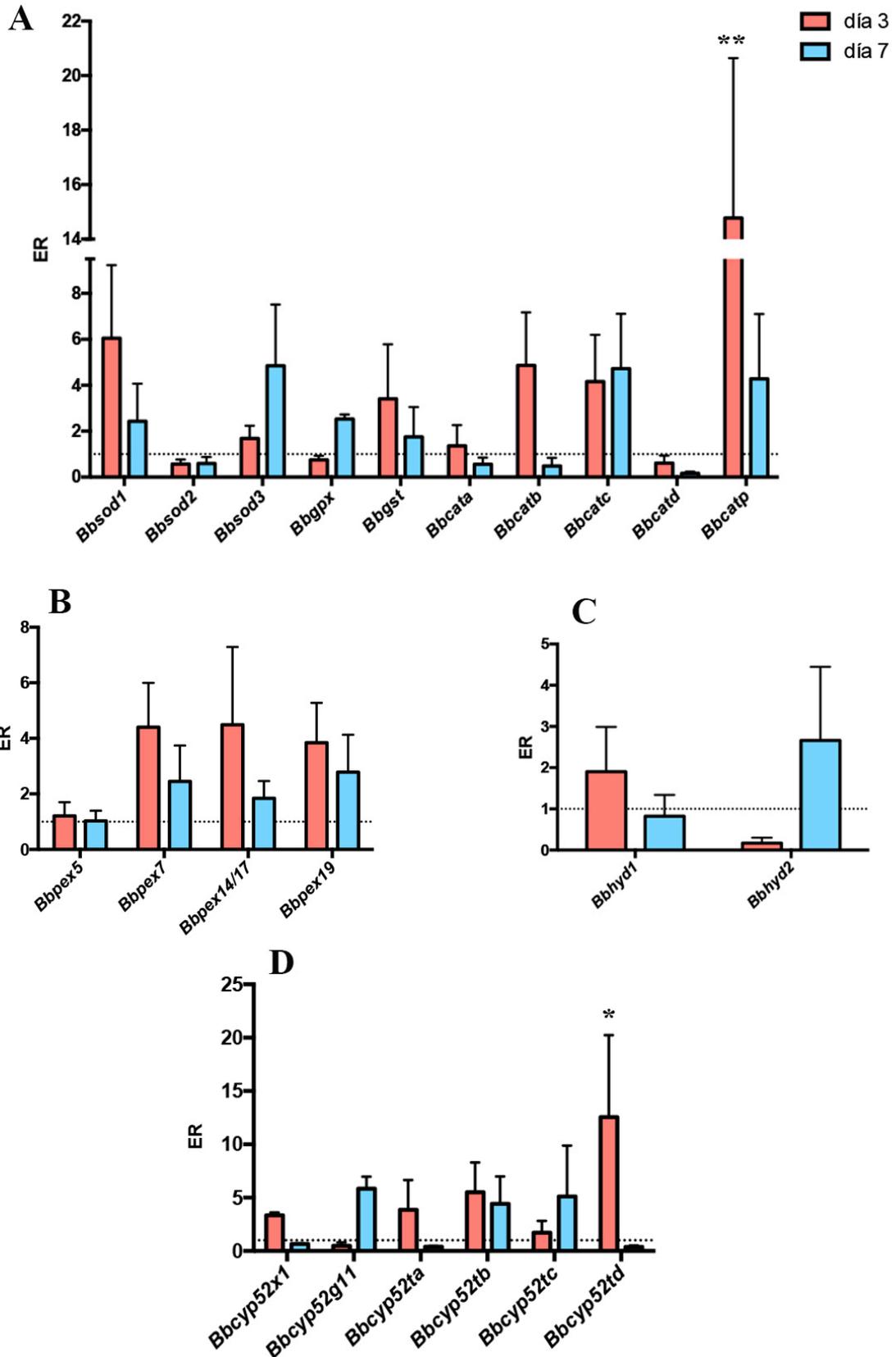
### Expresión diferencial de genes en pellets miceliales: marcadores de estrés oxidativo, biosíntesis de peroxisomas e hidrofobinas

Dado que se evidenció que los pellets miceliales teñidos con DAB tienen una actividad peroxidasa alta, se midieron por qPCR genes algunos genes marcadores de stress oxidativo en pellets miceliales a los 3 y 7 días de cultivo comparados con MC (control) (Fig. 17A). Se encontró que dentro la familia superóxido dismutasa, el gen *Bbsod1* se indujo al día 3 ( $6,1 \pm 3,1$  veces), pero no así al día 7. En cambio, *Bbsod3* se indujo al día 7 ( $4,9 \pm 2,7$  veces), y no al día 3. Por el contrario, *Bbsod2* no se indujo en las condiciones estudiadas. Para el sistema GSH, *Bbgst* no se indujo respecto de los controles ( $3,4 \pm 2,4$  y  $1,8 \pm 1,3$  veces al día 3 y 7, respectivamente), mientras que la expresión de *Bbgpx* fue similar a los controles al día 3 ( $0,7 \pm 0,2$  veces) y aumento al día 7 ( $2,5 \pm 0,2$  veces). Dentro de la familia catalasa, los genes *Bbcatb*, *Bbcate* y *Bbcatep* se indujeron significativamente en hongos crecidos en alcanos, con valores de expresión relativa de  $4,9 \pm 2,3$  veces al día 3 (*Bbcatb*),  $4,2 \pm 2,0$  y  $4,7 \pm 2,3$  veces al día 3 y 7, respectivamente (*Bbcate*),  $14,8 \pm 5,8$  y  $4,3 \pm 2,8$  veces al día 3 y al día 7, respectivamente (*Bbcatep*).

Dada la alta expresión relativa de la catalasa peroxisómica y de la visualización de numerosos peroxisomas en las imágenes de TEM, se decidió estudiar el patrón de expresión de genes *pex*, involucrados en la biosíntesis de peroxisomas (Fig. 17B). *Bbpex7* se indujo significativamente durante el cultivo en alcanos luego de 3 días respecto de los controles ( $4,4 \pm 1,6$  veces), mientras que *Bbpex5* ( $1,0 \pm 0,3$  y  $1,2 \pm 0,4$  veces al día 3 y 7, respectivamente), *Bbpex14/17* ( $1,8 \pm 0,6$  y  $4,5 \pm 2,8$  veces al día 3 y 7, respectivamente) y *Bbpex19* ( $2,8 \pm 1,3$  y  $3,9 \pm 1,4$  veces al día 3 y 7, respectivamente) no se expresaron significativamente más que los controles.

Dado que la hidrofobicidad de la superficie celular es más alta en conidios crecidos en hidrocarburos, y que se inducen los genes codificantes para hidrofobinas, se midió la expresión génica de hidrofobinas en pellets miceliales, comparado con MC como control (Fig. 17C). Se halló que *Bbhyd1* y *Bbhyd2* no se indujeron en pellets para ninguno de los dos días de cultivo estudiados.

Debido al rol de la familia CYP52 en la degradación de hidrocarburos, se analizó su expresión relativa (Fig. 17D). Algunos genes de esta familia se indujeron significativamente al día 3, con valores  $3,3 \pm 0,3$  veces mayores que el control para *Bbcyp52x1*,  $5,5 \pm 2,7$  veces para *Bbcyp52tb* y  $12,6 \pm 7,6$  veces para *Bbcyp52td*, aunque sus valores de expresión relativa disminuyeron significativamente al día 7, con valores de  $0,7 \pm 0,1$  (*Bbcyp52x1*), y  $0,3 \pm 0,1$  (*Bbcyp52td*), o bien similares a los controles, con valores de expresión relativa de  $4,4 \pm 2,6$  (*Bbcyp52tb*). Por el contrario, la expresión de *Bbcyp52g11* fue similar a los controles al día 3 ( $0,5 \pm 0,3$ ) pero aumentó significativamente al día 7 ( $5,9 \pm 1,1$ ). *Bbcyp52ta* y *Bbcyp52tc* no se indujeron para los días ensayados, mostrando valores de expresión relativa de  $3,8 \pm 2,8$  y  $0,4 \pm 0,1$  para los días 3 y 7, respectivamente (*Bbcyp52ta*), y  $5,1 \pm 4,8$  y  $1,7 \pm 1,1$  para los días 3 y 7, respectivamente (*Bbcyp52tc*).



**Figura 17.** Análisis de la expresión génica mediante qPCR en pellets miceliales de *B. bassiana* luego de 3 y 7 días de crecimiento comparado con el control (MC) de **A)** genes marcadores de estrés oxidativo **B)** peroxinas **C)** hidrofobinas **D)** genes CYP52. Se utilizó el método de  $\Delta\Delta C_t$  con *Bbact* como gen de referencia. Las barras representan el error estándar de 4 ensayos independientes. La línea punteada indica la expresión relativa = 1. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los 3 y 7 días, \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

### Caracterización de pellets como potenciales propágulos de biocontrol

#### Esporulación

El desecado de propágulos es un paso crucial para la formulación y almacenamiento como partículas secas para uso en prácticas de control microbiano. Para comprobar si los pellets de *B. bassiana* obtenidos en medios con *n*-hexadecano toleran el desecado, y son capaces de germinar y producir conidios viables, se los desecó por 5 días, se los repicó en placas de ágar-ágar con antibiótico y se los observó regularmente con lupa. Luego de dos días se observó desarrollo hifal, seguido por producción de conidios desde el día 6. A los 14 días, los conidios se cosecharon y cuantificaron. Se encontró que la producción de conidios fue de  $3,3 \pm 0,9 \times 10^9$  conidios por gramo de pellet seco. También se evaluó la viabilidad de esos conidios, obteniendo un porcentaje de germinación promedio de 99.7%.

#### Termotolerancia

La tolerancia a distintas temperaturas también es un parámetro crítico, tanto para el almacenamiento de propágulos como para su viabilidad en días cálidos en campo, sea cual fuere el modo de aplicación elegido. Como prueba inicial de la tolerancia de estos pellets en distintas condiciones similares a las ambientales y/o de almacenamiento, se evaluó su viabilidad luego de ser incubados por 2 h a distintas temperaturas. Los resultados de la producción de conidios por gramo de pellet y las unidades formadoras de colonias por gramo de pellet se muestran en la Tabla 3. Para los tiempos de incubación estudiados, los pellets miceliales toleran altas y bajas temperaturas.

Temperatura (°C)	Producción de conidios/g pellets miceliales	UFC/g pellets miceliales
-20	$4,3 \pm 0,3 \times 10^9$	$1,2 \pm 0,007 \times 10^3$
5	$4,2 \pm 0,07 \times 10^9$	$1,9 \pm 0,1 \times 10^3$
26	$4,2 \pm 0,3 \times 10^9$	$1,7 \pm 0,0 \times 10^3$
37	$4,9 \pm 1 \times 10^9$	$1,9 \pm 0,02 \times 10^3$
45	$2,9 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,1 \pm 0,5 \times 10^3$

**Tabla 3.** Ensayo de termotolerancia.

### Bioensayos de patogenicidad

Se utilizaron pellets de 7 días frescos para evaluar su patogenicidad contra larvas de *Tribolium castaneum* y *Tenebrio molitor*. Los resultados del bioensayo se muestran en la Tabla 4. Los pellets provocan la muerte de 70% de las larvas de *T. castaneum*, y más del 90% de las larvas de *T. molitor* luego de una semana, mostrando ser aptas como propágulo para control biológico.

Día	Mortalidad (%)	
	<i>Tribolium castaneum</i>	<i>Tenebrio molitor</i>
0	$0 \pm 0a$	$0 \pm 0a$
2	$0 \pm 0a$	$0 \pm 0a$
5	$70.2 \pm 11.9b$	$53.3 \pm 10.7b$
8	$67.3 \pm 13.1b$	$96.7 \pm 1.9c$

**Tabla 4.** Bioensayo de patogenicidad. Porcentaje acumulativo de mortalidad de larvas de *T. castaneum* y *T. molitor* tratadas con pellets miceliales (PM) y no tratadas (control). Los valores de mortalidad fueron corregidos respecto del control con la fórmula de Abbott. Para ambos insectos, diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## *Discusión*

Estos resultados describen un nuevo tipo de crecimiento en *B. bassiana* cultivado en medio mínimo suplementado con *n*-hexadecano, formado por agregados de hifas similares a pellet miceliales encontrados en otros hongos filamentosos (Metz y Kossen, 1977; Grimm et al., 2005a). Sin embargo, a diferencia de otros pellets descritos en la bibliografía, *B. bassiana* los produce durante el crecimiento en hidrocarburos pero no en cultivos ricos en glucosa.

Se han descrito dos mecanismos para la formación de pellets miceliales: mecanismos del tipo coaglativo donde los pellets se forman a partir del agregado de esporas e hifas durante etapas tempranas de cultivo; y mecanismos de tipo no coaglativo donde una espora aislada crece para formar un pellet (Serrano-Carreón et al., 2015). Asimismo, se conoce que la formación de pellets miceliales en otros hongos filamentosos está fuertemente regulada por el pH del medio y las interacciones hidrofóbicas, entre otros factores (Glazebrook et al., 1992; Ryoo y Choi, 1999; Dynesen y Nielsen, 2003; Grimm et al., 2005b;). En particular, la formación de pellets miceliales en *Aspergillus niger* ha sido ampliamente estudiada, se ha determinado cómo las fuerzas hidrofóbicas de la superficie celular y el pH del medio son cruciales en la dinámica de formación de pellets (Grimm et al., 2005b). Entonces, puede sugerirse que los comportamientos diferenciales hallados de pH, hidrofobicidad e inducción de genes de hidrofobinas en la biomasa de MM-C16 (sección I) podrían ser los desencadenantes de la formación de pellets en estos medios de cultivo. Siendo que existe evidencia de activo crecimiento de *B. bassiana* en medios con *n*-hexadecano (Sección I; Pedrini et al., 2010), es posible que las células en MM-C16 estarían en activa división y crecimiento, pero migrarían para formar parte de los pellets miceliales encontrados en la interfase con el alcano, en contacto con el sustrato a metabolizar. Podría suponerse también que los pellets miceliales permiten optimizar el proceso de captación e internalización del

alcano. Asimismo, es posible que la estructura relativamente poco densa observada por micrografía óptica contenga otros compuestos englobados entre las interconexiones hifales, como el *n*-hexadecano a metabolizar o sustancias secretadas para favorecer tal fin.

Se observó que las células que forman los pellets presentan pequeñas estructuras, posiblemente vesículas, dentro del citoplasma, así como también gran cantidad de peroxisomas, ausentes en células de la biomasa. Asimismo, se evidenció un engrosamiento de la membrana celular y estructuras similares a peines en la superficie celular externa. Estas proyecciones en el exterior de la célula fueron observadas también en células de *B. bassiana* crecidas en medio sólido conteniendo hidrocarburos (Crespo et al., 2000), así como en levaduras degradadoras de alcanos (Kappeli et al., 1984; Lindley y Heydeman, 1986). Se cree que estas estructuras en la superficie facilitan la captación e internalización de hidrocarburos mediante la adhesión, e invaginación de los mismos hacia el citosol, y las vesículas conteniendo hidrocarburos evitarían la acumulación de los mismos en el citosol (Lindley y Heydeman, 1986).

La tinción con DAB también permitió observar una alta actividad peroxidasa/catalasa, tanto en el interior de la célula como en las interconexiones celulares. Asimismo, se halló que se inducen numerosos genes marcadores de estrés oxidativo; entre ellos, el más inducido fue el gen codificante para la catalasa peroxisómica, *Bbcatp*. Sin embargo, no es posible establecer si la inducción de estos procesos encontrados en los pellets miceliales es en respuesta al crecimiento en alcanos, como se describe en la sección I, o bien si la diferenciación a pellets miceliales genera un estrés adicional.

Como se mencionó antes, la fase final de la degradación fúngica de alcanos ocurre vía  $\beta$ -oxidación peroxisómica (Fukui and Tanaka 1979; Tanaka et al 1982; Crespo et al., 2000; Pedrini et al., 2007). La biogénesis de peroxisomas involucra la acción de varias proteínas denominadas peroxinas, codificadas por los genes *pex* (Li et al., 2016; Smith y Aitchison,

2013). Se observó que en pellets miceliales *Bbpex7* se indujo luego de 3 días de crecimiento. Estos resultados junto con los de TEM, indicarían que la vía de biogénesis de peroxisomas estaría activada en estas condiciones, como fue reportado en levaduras crecidas en alcanos (Fukui and Tanaka, 1979; Monosov et al., 1996; Smith y Aitchison, 2013; Tanaka y Ueda, 1993).

Resulta interesante comparar los comportamientos diferenciales entre células que forman los pellets y las células que forman la biomasa de MM-C16. Por un lado, por TEM se evidencian diferencias en la forma y el grosor de la superficie celular de las dos células. Por otro lado, se vio un aumento en la hidrofobicidad de la superficie celular y una alta inducción de genes codificantes para hidrofobinas en la biomasa de MM-C16, mientras que no se evidenció inducción de hidrofobinas en los pellets. Asimismo, se halló cierta similitud de comportamiento en los genes *Bbcyp52t*, con *Bbcyp52tb*, y *Bbcyp52td* inducidos al día 3, y no así al día 7, y *Bbcyp52c* no inducido para los días ensayados. Sin embargo, mientras *Bbcyp52ta* mostró niveles de transcripción mayores en biomasa de MM-C16 al día 3, no se indujo en pellets miceliales. Por último, mientras *Bbcyp52x1* y *Bbcyp52g11* se indujeron en pellets al día 3 y día 7, respectivamente, estos genes no se indujeron en la biomasa de MM-C16. Estas diferencias morfológicas y moleculares estarían reflejando que en el medio mínimo suplementado con *n*-hexadecano se encuentran dos poblaciones celulares diferentes entre sí en posible respuesta a la adaptación al crecimiento en hidrocarburos. Si bien se necesita complementar estos resultados con estudios proteicos para comprender mejor el rol fisiológico de cada miembro de la familia CYP52 en ambas poblaciones celulares, es posible que las células de los pellets miceliales en contacto constante con el hidrocarburo sean más propensas a asimilar y degradar el *n*-hexadecano, y por lo tanto sus niveles de inducción son mayores y por tiempos más prolongados que en la biomasa crecida en hidrocarburos.

Estas estructuras complejas resultaron ser tolerantes a la desecación y temperatura, capaces de germinar en medios sin fuente de carbono, utilizando reservas endógenas para proliferar. Asimismo, se aislaron de cultivos cuya única fuente de carbono son hidrocarburos. Estudios previos han demostrado que el cultivo de *B. bassiana* en medios con hidrocarburos aumenta la virulencia, tanto por un aumento en la mortalidad de insectos como por una disminución en el tiempo letal medio frente a diferentes huéspedes (Crespo et al. 2002; Pedrini et al. 2009). Estos pellets miceliales son capaces de matar larvas de *T. molitor* y *T. castaneum*. Estos resultados muestran que estos pellets miceliales tendrían un gran potencial para su formulación, almacenamiento y utilización en programas de biocontrol. Es necesario continuar con la caracterización microbiológica de estos propágulos para determinar parámetros de mortalidad con insectos plaga de interés, vehículos para su formulación y tolerancia a las condiciones ambientales críticas para su utilización en programas de biocontrol.

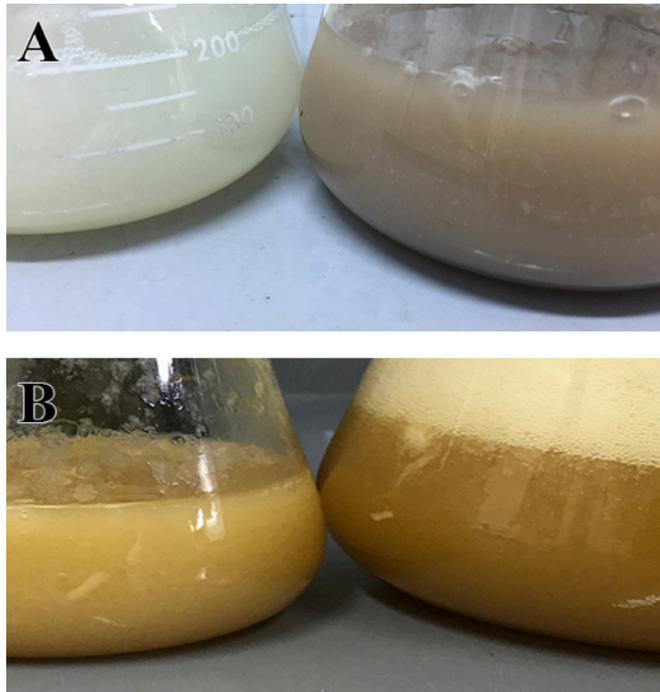
## **Sección III**

## *Resultados*

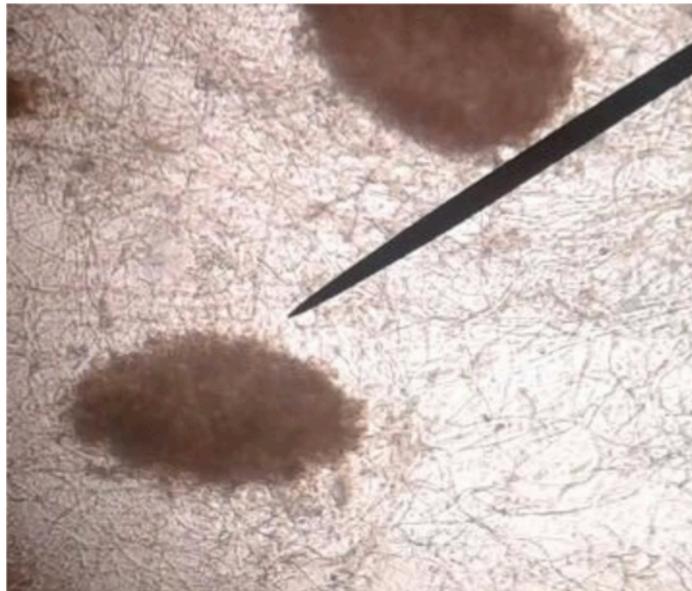
#### Microesclerocios

Luego de 4 días de cultivo en MC con agitación vigorosa (250 rpm) se observó una coloración más oscura a la coloración usual de medios de cultivo de *B. bassiana* en igual medio con agitación más leve (180 rpm), siendo que los conidios y micelio de este hongo son hialinos (Fig. 18). Durante la precipitación de las células se observaron cúmulos de hifas acompañando la biomasa característica de crecimiento en medio líquido. Estos cúmulos se aislaron para su análisis y caracterización.

Se observó por microscopía óptica que los cúmulos aislados están conformados por un agregado de hifas melanizado (Fig. 19). Esta observación sugirió que se podría tratar de microesclerocios. Como en las condiciones ensayadas se obtuvo una mezcla de estructuras celulares compuesta de hifas dispersas y microesclerocios, se comenzaron pruebas de optimización descriptas para la producción de microesclerocios modificando la concentración de C y N de los medios. Se probaron relaciones C:N inferiores (5:1) y superiores (30:1, 40:1) a las que contiene el MC (12,5:1), manteniendo constantes la concentración de sales y de extracto de levadura y sólo modificando la concentración de glucosa. Se halló que el medio correspondiente a una relación 30:1 aumentó la cantidad de propágulos por ml respecto de MC. Para las otras relaciones, la producción de propágulos fue similar a la de MC.



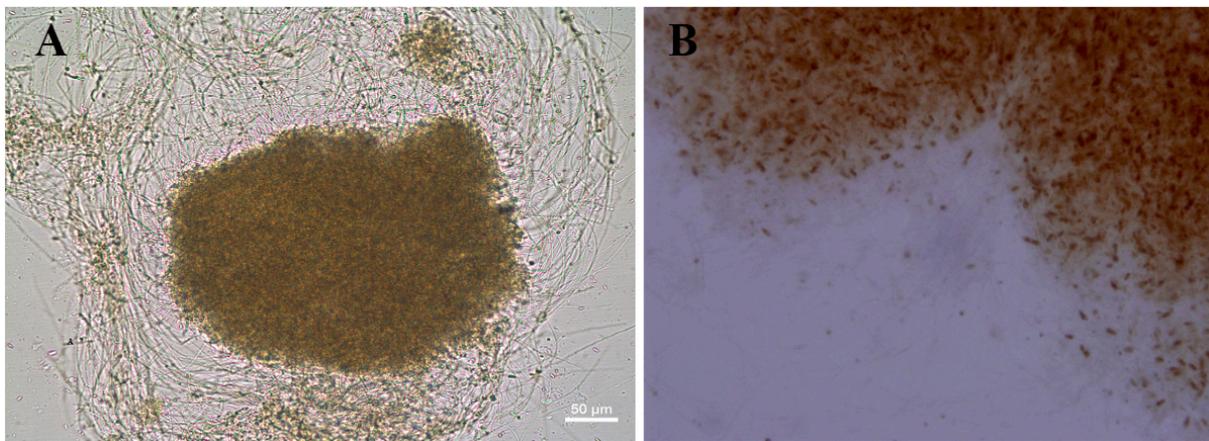
**Figura 18.** Medios de cultivo de *B. bassiana* A la derecha, cultivo de microesclerocios, mostrando típica melanización de células, otorgándole un color marrón intenso al medio de cultivo. A la izquierda, cultivo de micelio en MM-C16 (A) y cultivo de micelio en MC (B)



**Figura 19.** Microesclerocios de *B. bassiana* visualizados por microscopía óptica.

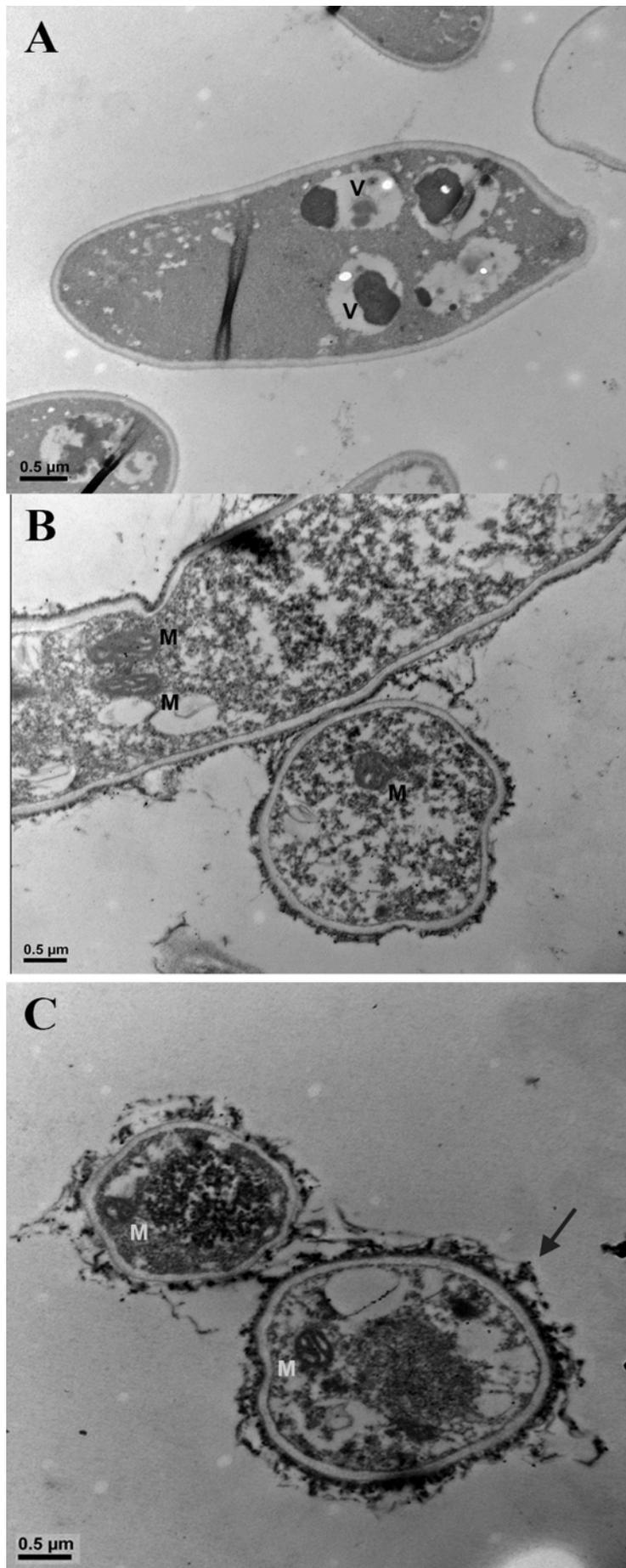
### Caracterización celular y molecular de microesclerocios

Dado que se ha estudiado el estrés oxidativo en la formación de microesclerocios de otras especies de entomopatógenos (Papapostolou y Georgiou, 2010; Song et al., 2013; Zhou et al., 2015) los propágulos frescos de *B. bassiana* se tiñeron con DAB, dando una coloración intensa dentro de la estructura, y más tenue en las hifas que la rodean (Figs. 20A y 20B) señalando una alta actividad peroxidasa/catalasa en estos microesclerocios.



**Figura 20.** Microesclerocios de *B. bassiana* teñidos con DAB visualizados por microscopía óptica a 20× (A) y 100× (B).

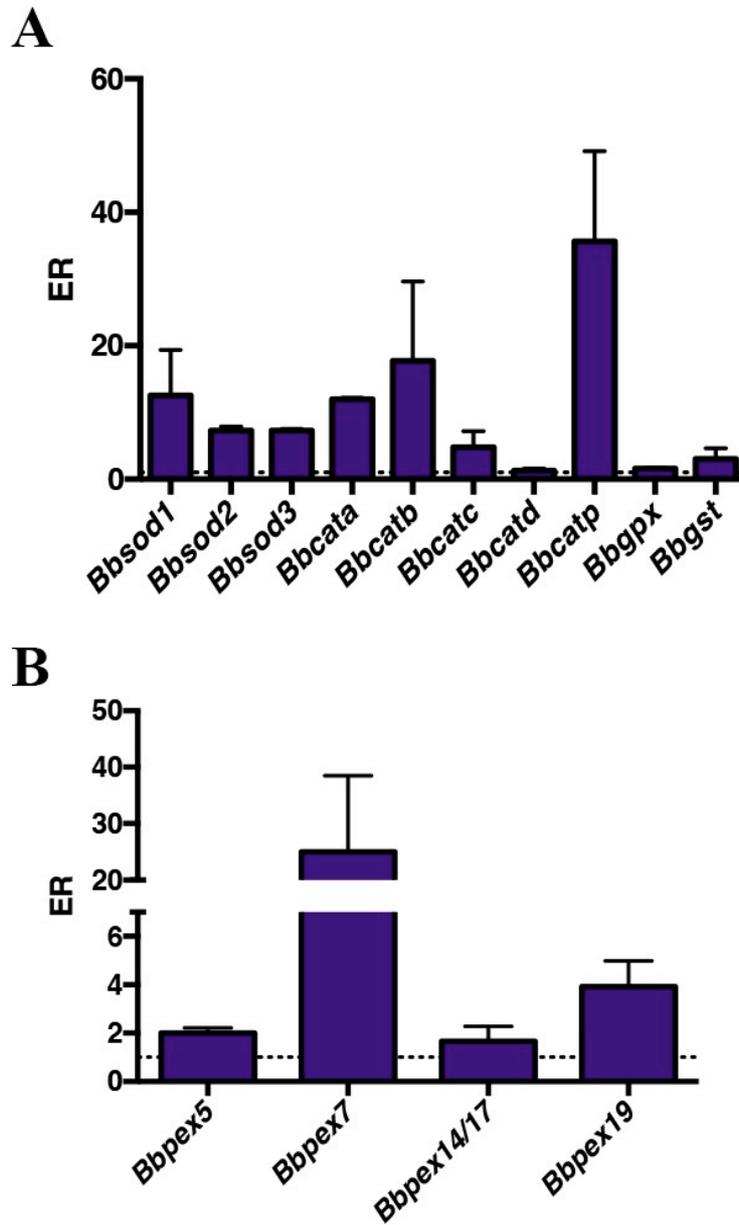
Asimismo, los microesclerocios y la biomasa de MC (control) de 4 días se tiñeron con DAB y se procesaron para ser visualizados por TEM. En la figura 19 se muestra una de las imágenes obtenidas para MC (Fig. 21A) y microesclerocios (Figs. 21B y 21C) de 4 días. Puede observarse que la reacción con DAB es mucho más intensa en las células que forman el microesclerocio, visualizada como puntos negros dentro de toda la célula, así como también rodeando la superficie celular y en las conexiones entre células. Asimismo, se distinguen mitocondrias también teñidas, indicando una posible actividad catalasa/peroxidasa mitocondrial aumentada. También es posible identificar de manera indirecta la presencia de melaninas en la superficie de estas células, visualizadas como cúmulos oscuros alrededor de la pared celular. En el caso de las células de MC se visualizan escasos puntos oscuros correspondientes a la reacción de DAB sólo dentro de las vacuolas.



**Figura 21.** Microscopía de transmisión electrónica de muestras teñidas previamente con DAB. **A)** micelios de MC (control). **B)** y **C)** microesclerocios. La flecha negra indica la melanización alrededor de la superficie celular. V: vacuola. M: mitocondria.

Para complementar los resultados de microscopía, se decidió medir el patrón de expresión de genes marcadores de estrés oxidativo y genes involucrados en la biogénesis de peroxisomas. Para esto, se midieron los genes candidatos por qPCR de muestras de microesclerocios y micelio (control) de 4 días. El análisis de los resultados se muestran en las figuras 22A y 22B.

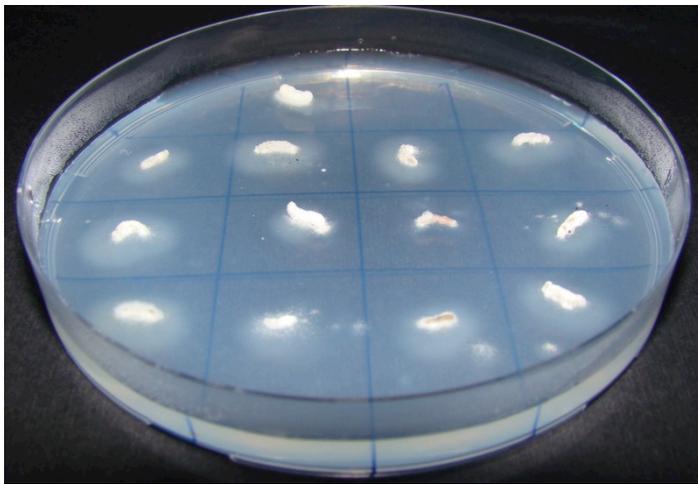
Se encontró que en la familia de las superóxido dismutasas, todos los genes se indujeron en cultivos de microesclerocios, con valores de inducción respecto del control de  $12,5 \pm 6,4$  para *Bbsod1*,  $7,3 \pm 0,6$  para *Bbsod2* y  $7,3 \pm 0,2$  para *Bbsod3*. Dentro de la familia de las catalasas, los genes *Bbcata* ( $12,0 \pm 0,2$ ), *Bbcatb* ( $17,7 \pm 11,9$ ) y *Bbcatp* ( $35,6 \pm 13,6$ ) se indujeron en microesclerocios, mientras que *Bbcatc* ( $4,8 \pm 2,4$ ) se indujo moderadamente, y *Bbcatd* ( $1,3 \pm 0,3$ ) no se indujo. Para el sistema glutatión, los genes *Bbgpx* y *Bbgst* no se indujeron significativamente, con valores de  $1,6 \pm 0,1$  y  $3,0 \pm 1,6$  veces mayor al control, respectivamente. Dentro de las peroxinas (Fig. 22B), *Bbpex7* se indujo en cultivos de microesclerocios ( $25,0 \pm 13,4$  veces mayor que los controles), con valores mayores a otras peroxinas, mientras que *Bbpex5* y *Bbpex19* se indujeron moderadamente ( $2,0 \pm 0,2$  veces y  $3,9 \pm 1,1$  mayor que los controles, respectivamente), y que *Bbpex14/17* no mostró niveles de expresión mayores a los cultivos control ( $1,7 \pm 0,6$  veces mayor que los controles).



**Figura 22.** Análisis de la expresión génica mediante qPCR en pellets miceliales de *B. bassiana* luego de 3 y 7 días de crecimiento comparado con el control (MC) de **A**) genes marcadores de estrés oxidativo **B**) peroxinas de *B. bassiana* mediante qPCR. Se utilizó el método  $\Delta\Delta C_t$  con *Bbact* como gen de referencia. Las barras representan el error estándar de 4 ensayos independientes. La línea punteada indica la expresión relativa = 1

#### Caracterización de microesclerocios como propágulos para biocontrol

Para evaluar la tolerancia a desecación, se tomaron propágulos de 4 días y se los secaron a 4°C como se indica en Materiales y Métodos. Luego de 7 días, se repicaron en medio sólido ágar-ágar y se estudió la producción y viabilidad de conidios. Se halló que estos microesclerocios son capaces de germinar y producir conidios viables en ausencia de fuentes exógenas de carbono. Asimismo, un ensayo preliminar de mortalidad con una réplica biológica mostró que los microesclerocios de *B. bassiana* matan a las larvas de *T. castaneum*,



con porcentajes de mortalidad corregidos por Abbott de 69,7%. En la figura 23 se observan cadáveres de *T. castaneum* mostrando la cubierta blanca característica de *B. bassiana*.

**Figura 23.** Larvas de *Tribolium castaneum* colonizadas por *Beauveria bassiana* luego de 5 días de inoculación con microesclerocios.

## *Discusión*

Los microesclerocios son producidos por una amplia variedad de hongos filamentosos. Dentro de los hongos entomopatógenos, solo fue reportada la formación de estos tipos de propágulos infectivos en *Metarhizium spp.* (Jackson y Jaronski, 2012). Estas estructuras suelen ser formas de resistencia a condiciones adversas de temperatura y radiación solar, por lo que estas formas infectivas son buenas candidatas para su utilización en programas de control biológico. Se ha propuesto que la producción de microesclerocios y su optimización está determinada por factores nutricionales compartidos por varias especies, como *Metarhizium spp.*, *Colletotrichum truncatum*, *Mycocleptodiscus terrestris* y *Trichoderma spp.* Se ha establecido crucial la alta concentración de glucosa así como una óptima relación C:N en la composición del medio de cultivo para su producción. Asimismo, la optimización en la formación de microesclerocios en fermentaciones líquidas es clave para mejorar la producción en términos de tiempos y costos (Behle y Jackson., 2014; Jackson y Payne, 2016). En el caso de *B. bassiana*, no existen reportes en la bibliografía de la diferenciación de conidios a microesclerocios. En este sentido, la composición del medio utilizado en este trabajo para *B. bassiana* difiere a la de los medios utilizados para la producción de microesclerocios en otras especies, incluyendo diferentes concentraciones y sales. En la Tabla 5 se compara la composición del medio de cultivo usado para *B. bassiana* en este trabajo (MC) con medios de cultivos optimizados para la producción de microesclerocios en otros hongos filamentosos. Por lo tanto, *B. bassiana* muestra necesidades nutricionales diferentes a otros hongos para la producción de microesclerocios y éstas aún deben ser optimizadas para aumentar el rendimiento en la producción de propágulos.

	MC	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,4g	4g		4g	4g	2g	4g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1,4g						
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,6g	0,6g	0,12g	0,6g	0,6g	0,3g	0,6g
<b>MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>				0,016g		0,016g	0,016g
<b>MnCl<sub>2</sub></b>		0,016g	0,002g				
<b>FeCl<sub>3</sub></b>			0,002g				
<b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>		0,1g		0,1g	0,1g	0,05g	0,1-0,4g
<b>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>		0,037g				0,037g	0,037g
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>			0,001g				
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>		0,014g		0,014g		0,014g	0,014g
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>		0,8g		0,8g	0,8g	0,4g	0,8g
<b>KCl</b>	1g						
<b>NaCl</b>			0,12g				
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,7g	3,1g					
<b>Citrato de amonio</b>					2,5g		
<b>Extracto de levadura</b>	5g		1g	3,64g			5g
<b>ácido casamino/ hidrolizado caseína</b>		2-45g				15g	
<b>Peptona</b>							2,5g
<b>Glucosa</b>	10g	10-81g	18g	36g	40g	75g	40g
<b>Vitamina B1</b>		0,5g	0,3mg			0,5g	
<b>Vitamina B2</b>		0,5g				0,5g	
<b>Vitamina B3</b>		0,5g				0,5g	
<b>Vitamina B5</b>		0,5g				0,5g	
<b>Vitamina B6</b>		0,5g				0,5g	
<b>Vitamina B12</b>		0,05g				0,05g	
<b>Biotina</b>		0,05g				0,05g	
<b>Ácido fólico</b>		0,05g				0,05g	
<b>Ácido lipoico</b>		0,5g				0,5g	

**Tabla 5.** Composición de medios de cultivo para la producción de microesclerocios utilizados en este trabajo (MC), (1) Jackson y Jaronski, 2009, (2) Papapostolou y Giourgiou, 2010, (3) Mascarin et al., 2014, (4) Song et al., 2014, (5) Jackson y Payne, 2016, (6) Wang et al., 2016.

Se conoce que en las especies fúngicas fitopatógenas *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*, algunos marcadores de estrés oxidativo como el peróxido de hidrógeno y radicales superóxido intracelulares están involucrados en la diferenciación a microesclerocio (Papapostolou y Georgiou, 2010a,b). Los resultados de tinciones con DAB junto con los patrones de expresión génica de marcadores de estrés oxidativo reportados en este trabajo permiten afirmar que existe un escenario de estrés oxidativo en células de microesclerocios de *B. bassiana*. Los altos niveles de inducción de *Bbcatp* y *Bbpex7* sugieren que los peroxisomas podrían jugar un rol clave en la metamorfosis a microesclerocios. Asimismo, los hongos filamentosos presentan un tipo especial de peroxisomas llamados cuerpos de *Woronin*, que intervienen en el sellado de los poros en

respuesta a una lesión celular (Liu et al., 2008). Se cree que los cuerpos de *Woronin* son requeridos cuando se forman redes hifales y pequeños poros conectan las células para el intercambio de nutrientes y organelas (Tenney et al., 2000). En *Neurospora crassa* estas organelas muestran gran actividad catalasa (Schiebs et al., 2006). Es posible que en las células de *B. bassiana* que componen los microesclerocios estas estructuras también estén presentes y tengan un rol crucial para regular el intercambio de macromoléculas. Además, se conoce que la proteína HEX-1 está involucrada en la diferenciación a cuerpos de *Woronin* (Tenney et al., 2000). En este sentido, los próximos pasos serán caracterizar los cuerpos de *Woronin* en microesclerocios, así como caracterizar funcionalmente el gen ortólogo *Bbhex1* y su rol en la metamorfosis de conidios a microesclerocios en *B. bassiana*.

Estos propágulos de *B. bassiana* comparten con microesclerocios de otras especies características distintivas como la melanización de sus estructuras, la tolerancia a la desecación (crucial para el formulado de gránulos secos), germinación y producción de conidios patógenos sin fuentes externas de carbono. Debido a que los conidios, propágulos más ampliamente estudiados para programas de control biológico, deben germinar e infectar al huésped del insecto, mantener su viabilidad es una preocupación principal durante todo el proceso de producción y aplicación de bioplaguicidas. En lugar de conidios, los microesclerocios pueden ser más adecuados para su uso ya que estos agregados compactos sirven como la estructura natural de hibernación para hongos. Cuando las condiciones son favorables, los microesclerocios se rehidratan, germinan y esporulan, produciendo conidios capaces de infectar insectos blanco, que no fueron afectados por las potenciales condiciones adversas que pudieran sufrir los propágulos anteriores a su utilización. También, sus formulaciones granulares crean numerosos focos infectivos que contienen una gran cantidad de conidios, promoviendo un control biológico más exitoso (Jackson y Jaronski, 2009; Behle

y Jackson, 2014; Behle y Goett, 2016). Estas características hacen de las cepas productoras de microesclerocios interesantes para su utilización en programas de control biológico.

En la mayoría de los casos, los propágulos deben formularse con aditivos para mejorar la vida útil frente a condiciones ambientales adversas, así como diluyentes inertes, esparcidores, adhesivos y emulsionantes. Los próximos pasos para continuar con este trabajo serán la optimización de la composición de los medios de cultivo en la producción de microesclerocios de *B. bassiana*; pruebas con distintos vehículos para la formulación de estos propágulos para el control de *T. castaneum*, un coleóptero que provoca enormes pérdidas en depósitos de trigo y sus productos derivados; y el desarrollo de un prototipo de trampas de atracción-infección que incluirán microesclerocios para su implementación en programas de control de insectos de granos almacenados.

# **CONCLUSIONES**

Las conclusiones de este trabajo son:

- Se evidenció un escenario de estrés oxidativo en células de *Beauveria bassiana* crecidas en medios con hidrocarburos como única fuente de carbono. Asimismo, se observaron diferencias en patrones de pH del medio de cultivo, variación en biomasa e hidrofobicidad de la superficie celular de células crecidas en hidrocarburos respecto de células crecidas en medios ricos.
- Durante la búsqueda de biosurfactantes, se hallaron compuestos conteniendo ácidos grasos constituyentes de cadena larga e hidroxilados, ausentes en perfiles lipídicos de células crecidas en medios ricos. Asimismo, luego de 3 días de crecimiento en medios con *n*-hexadecano aparecieron cúmulos de hifas hialinos caracterizados como pellets miceliales, ausentes en medios ricos.
- Se encontró que estos pellets miceliales son capaces de germinar sin una fuente externa de carbono, producir conidios viables, tolerar cambios de temperatura y ser patógenos frente a larvas de *Tribolium castaneum* y *Tenebrio molitor*. Se evidenció que las células que lo conforman presentan una alta actividad peroxidasa, gran cantidad de peroxisomas, inducción de genes marcadores de estrés oxidativo y activa biogénesis de peroxisomas.
- Se encontró por primera vez que *Beauveria bassiana* es capaz de producir estructuras microesclerociales, capaces de germinar, producir conidios viables y ser patógenos frente a larvas de *Tribolium castaneum*. Este hallazgo es de gran originalidad ya que desde hace algunos años diversos investigadores han intentado sin éxito producir microesclerocios en *B. bassiana*. Asimismo, las células que forman estas estructuras tienen una actividad peroxidasa alta e inducción de genes marcadores de estrés oxidativo y de peroxinas asociadas a la biogénesis de peroxisomas.

**ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVOS Y BUFFERS**

**Medio papa-dextrosa-agar (PDA):** 39g de polvo comercial (Merck), 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada. El polvo comercial contiene 15 g de ágar, 20 g de glucosa y 4 g de infusión de papa.

**Medio completo:** 0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,6 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,0 g KCl, 0,7 g NH<sub>4</sub>N<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 g dextrosa, 5 g extracto de levadura, 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**Medio mínimo:** 0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,6 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,0 g KCl, 0,7 g NH<sub>4</sub>N<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**Medio agar-agar (Agar-agua):** 15 g de ágar, 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada

**Buffer PUM:** 22,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,26 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8 g urea, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada, pH 7,1.

**Buffer TBE:** Tris 0,05 M; Ácido Bórico 0,05 M; EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 mM.

**Buffers fosfato:** se preparan dos soluciones madre, y se mezclan en distintas proporciones para la obtención de buffers fosfato a distintos pH.

Solución A (A): 27,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada

Solución B (B): 53,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada

-buffer fosfato pH 7 0,1 M: 195 ml A, 305 ml B, 500 ml H<sub>2</sub>O destilada

- buffer fosfato pH 7 50 mM: 195 ml A, 305 ml B, 1500 ml H<sub>2</sub>O destilada

- buffer fosfato pH 7,2 0,1 M: 140 ml A, 360 ml B, 500 ml H<sub>2</sub>O destilada

# REFERENCIAS

- Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economical Entomology* **18**: 265-267
- Barbarin AM, Bellicanta GS, Osborne JA, Schal C, Jenkins NE, 2017. Susceptibility of insecticide-resistant bed bugs (*Cimex lectularius*) to infection by fungal biopesticide. *Pest Management Science* **73**: 1568–1573.
- Baud, O. Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ RP, 2004. Glutathione Peroxidase-Catalase Cooperativity Is Required for Resistance to Hydrogen Peroxide by Mature Rat Oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience* **24**: 1531–1540.
- Beers RF, Sizer IW, 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*. **195**:133-140.
- Behle RW, Goett EJ, 2016. Dosage response mortality of Japanese beetle, masked chafer, and June beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) adults when exposed to experimental and commercially available granules containing *Metarhizium brunneum*. *Journal of Economic Entomology* **109**: 1109–1115.
- Behle RW, Jackson MA, 2014. Effect of Fermentation Media on the Production, Efficacy, and Storage Stability of *Metarhizium brunneum* Microsclerotia Formulated as a Prototype Granule. *Journal of Economic Entomology* **107**: 582–590.
- Behle RW, Jackson MA, Flor-Weiler LB, 2013. Efficacy of a Granular Formulation Containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) Microsclerotia Against Nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixoididae). *Journal of Economic Entomology* **106**: 57–63.
- Behle RW, Richmond DS, Jackson MA, Dunlap CA, 2015. Evaluation of *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for Control of Japanese Beetle Larvae in Turfgrass. *Journal of Economic Entomology* **108**: 1587–1595.
- Blanford S, 2005. Fungal Pathogen Reduces Potential for Malaria Transmission. *Science* **308**: 1638–1641.

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**:248-54.
- Butt TM, Coates CJ, Dubovskiy IM, Ratcliffe NA, 2016. *Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions*. Elsevier Ltd.
- Cameotra SS, Singh HD, Hazarika AK, Baruah JN, 1983. Mode of uptake of insoluble solid substrates by microorganisms 2. Uptake of solid normal-alkanes by yeast and bacterial species. *Biotechnology and Bioengineering*. **25**: 2945–2956
- Catalá A, 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **38**: 1482–1495.
- Cooney JJ, Siporin C, Smucker RA, 1980. Physiological and cytological responses to hydrocarbons by the hydrocarbon-using fungus *Cladosporium resinae*. *Botanica Marina* **23**: 227–232.
- Crespo R, Juárez MP, Cafferata LFR, 2000. Biochemical interaction between entomopathogenous fungi and their host-like hydrocarbons. *Mycologia* **92**: 528–536
- de Faria MR, Wraight SP, 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* **43**: 237–256.
- Deshayes C, Siegwart M, Pauron D, Froger J-A, Lapied B, Apaire-Marchais V, 2017. Microbial Pest Control Agents: Are they a specific and safe tool for insect pest management? *Current Medicinal Chemistry* **24**: 1–15.
- Deshpande M V, 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Critical reviews in microbiology* **25**: 229–243.
- Dynesén J, Nielsen J, 2003. Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. *Biotechnology Progress* **19**: 1049–1052.

- Esterbauer H, 1996. Estimation of peroxidative damage. A critical review *Pathologie Biologie*. 25-28.
- Fang W, St. Leger RJ, 2012. Enhanced UV resistance and improved killing of malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi. *PLoS ONE* 7: 2–8.
- Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG, 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology* 4: 3–34.
- Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP, Roberts DW, 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology* 130: 300–305.
- Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Braga GUL, Roberts DW, 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics* 61: 427–440.
- Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Moraes ÁML, Bittencourt VREP, Roberts DW, 2007. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria spp.* isolates. *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 237–243.
- Ferron, P., 1985. Fungal control. En: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., editors. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, *Academic Press*. 313-346.
- Forlani L, Juárez MP, Lavarías S, Pedrini N, 2014. Toxicological and biochemical response of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* after exposure to deltamethrin. *Pest Management Science*. 70:751–756
- Fridovich I, 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 64:97–112
- Glazebrook MA, Vining LC, White RL, 1992. Growth morphology of *Streptomyces akiyoshiensis* in submerged culture: influence of pH, inoculum, and nutrients. *Canadian*.

*Journal of Microbiology*. **38**: 98–103.

-Goble TA, Gardescu S, Jackson MA, Hajek AE, 2016. Evaluating different carriers of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia for control of adult Asian longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Biocontrol Science and Technology* **26**: 1212–1229.

-Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C, 2010. The Challenge of Food Security. *Science* **327**: 812–818.

-Goma G, Pareilleux A, Durand G, 1973. Cinetique de degradation des hydrocarbures par *Candida lipolytica*. *Archive fur Mikrobiologie*. **88**: 97–109.

-Goodman SR (Ed.), 2008. Chapter 4 - Organelle Structure and Function. In: Medical Cell Biology (Third Edition). Academic Press, San Diego, pp. 101–148.

-Grimm LH, Kelly S, Krull R, Hempel DC, 2005a. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 375–384.

-Grimm LH, Kelly S, Völkerding II, Krull R, Hempel DC, 2005b. Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnology and Bioengineering* **92**: 879–888

-Habig W, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathione-S-Transferases. *Biological Chemistry*. **249**:7130-7139.

-Hewald, S., Josephs, K., Bolker, M. 2005. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Applied Environmental Microbiology*. **71**:3033-3040.

-Holder DJ, Keyhani NO, 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5260–5266.

- Holder DJ, Kirkland BH, Lewis MW, Keyhani NO, 2007. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology* **153**: 3448–3457.
- Hommel RK, 1990. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms - Biosurfactants in hydrocarbon utilization. *Biodegradation* **1**: 107–119.
- Huarte-Bonnet C, Juárez MP, Pedrini N, 2015. Oxidative stress in entomopathogenic fungi grown on insect-like hydrocarbons. *Current Genetics* **61**: 289–297.
- Hussain A, Rizwan-ul-Haq M, Al-Ayedh H, Al-Jabr A, 2014. Mycoinsecticides: Potential and Future Perspective. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* **6**: 45–53.
- Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST, 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *The Ecology of Fungal Entomopathogens*: 129–145.
- Jackson MA, Jaronski ST, 2009. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research* **113**: 842–850.
- Jackson MA, Jaronski ST, 2012. Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology* **22**: 915–930.
- Jackson MA, Payne AR, 2016. Microbial-Based Biopesticides. **1477**: 71–83.
- Jaronski ST, Jackson MA, 2008. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology* **18**: 849–863.
- Jiang S Sha, Yin Y Ping, Song Z Yong, Zhou G Lin, Wang Z Kang, 2014. RacA and Cdc42 regulate polarized growth and microsclerotium formation in the dimorphic fungus *Nomuraea rileyi*. *Research in Microbiology* **165**: 233–242.

- Juárez MP, Crespo R, Fernández GC, Lecuona R, Cafferata LF, 2000. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *Journal of invertebrate pathology* **76**: 198–207.
- Juárez, M.P., Blomquist, G.J., Schofield, C.J. 2001. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **129B**:733-746.
- Kappeli O, Walther P, Mueller M, and Fiechter A, 1984. Structure of the cell-surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydro- carbon transport. *Archives of Microbiology*. **138**: 279–282.
- Karant NGK, Deo PG, Veenanadig NK, 1999. Microbial production of biosurfactant and their importance. *Current Science* **77**: 116–126.
- Ketterer B, Coles B, Meyer DJ, 1983. The role of glutathione in detoxification. *Environmental Health Perspectives* **49**:59–69
- Kirkland BH, Eisa A, Keyhani NO, 2005. Oxalic acid as a fungal acaracidal virulence factor. *Journal of medical entomology* **42**: 346–51.
- Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T, 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants--from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of bioscience and bioengineering* **94**: 187–201.
- Kumar D, Kalita P, 2017. Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. *Foods* **6**: 1-8.
- Kunau, W-H., Dommès, V., Schulz, H. 1996.  $\beta$ -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipids Res.* 34:267-342
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P, 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* **248**: 230–248.
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS, 2015.

Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* **132**: 1–41.

-Lecuona, R.E. 1996. Control Microbiano, utopía o realidad. En: Lecuona, R.E., editor. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires: M. Mas. p 13-15.

-Li L, Wang J, Chen H, Gu Z, Wang Y, Sun G, 2016. Pex14/17, a filamentous fungi specific peroxin, is required for import of peroxisomal matrix proteins and full virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant pathology*: 1–15.

-Lindley ND, Heydemann MT, 1986. The uptake of normal alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon-utilizing fungus *Cladosporium resinae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **23**: 384–388

-Liu J, Yin Y, Song Z, Li Y, Jiang S, Shao C, Wang Z, 2014. NADH: Flavin oxidoreductase/NADH oxidase and ROS regulate microsclerotium development in *Nomuraea rileyi*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**: 1927–1935.

-Lovett B, St. Leger RJ, 2015. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. *Current Genetics* **61**: 253–261.

-Lushchak VI, 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **153**: 175–190.

-Maniania NK, Ekesi S, 2013. The use of entomopathogenic fungi in the control of tsetse flies. *Journal of Invertebrate Pathology* **112**: S83–S88.

-Marklund SL, Marklund G, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. **47**:469–474

-Mascarin GM, Jaronski ST, 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a

microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32**.

-Mascarin GM, Kobori NN, de Jesus Vital RC, Jackson MA, Quintela ED, 2014. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium spp.* using submerged liquid culture fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**:

-Meisel, MN, Medvedeva GA, Kozlova TM, Domoshnikova NA, Zaikina AI, Fedoseeva GE, 1973. Regularities of penetration into yeast cells of higher fatty acids and hydrocarbons, their intracellular migration and concentration. Proceedings of the 3rd International Specilized Symposium on Yeast, eds H. Suomalainen and C. Waller (Helsinki: Otaniemi), 149–168.

-Metz B, Kossen NWF, 1977. The growth of molds in the form of pellets—a literature review. *Biotechnology and Bioengineering* **19**: 781–799.

-Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J, 1994. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **17**: 235–248.

-Monosov EZ, Wenzel TJ, Luers GH, Heyman JA, Subramani S, 1996. Labeling of Peroxisomes with Green Fluorescent Protein in Living *P. pastoris* Cells. *J. Histochem. Cytochem.* **44**: 189–581.

-Moonjely S, Barelli L, Bidochka MJ, 2016. Insect Pathogenic Fungi as Endophytes. *Advances in Genetics* **94**: 107–135.

-Napolitano, R., Juárez, M.P. 1997. Entomopatogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 344:208-214.

-Nelson DR, 1998. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **121**: 15–22.

Nelson, D.R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **369**:1-10.

-Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki,T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J. Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W.

1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42.

-Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO, 2015. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. *Current Genetics* **61**: 239–249.

-Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO, 2016. Chapter Six - Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. In: Lovett B, St. Leger RJBTA in G, eds. *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. Academic Press, pp. 165–249.

-Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO, 2016. *Molecular Genetics of Beauveria bassiana Infection of Insects*. Elsevier Ltd.

-Pamplona R, Barja G, Portero-Otin M, 2002. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Annals of the New York Academy of Sciences* **959**: 475–490.

-Papapostolou I, Georgiou CD, 2010a. Hydrogen peroxide is involved in the sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* **109**: 1929–1936.

-Papapostolou I, Georgiou CD, 2010b. Superoxide radical is involved in the sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi: identification of a fungal xanthine oxidase. *Fungal Biology* **114**: 387–395.

-Pedrini N, 2006. Enzimas fúngicas involucradas en el catabolismo de hidrocarburos. Su aplicación a la optimización de bioinsecticidas. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

-Pedrini N, 2017. 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*: 1–10.

-Pedrini N, Crespo R, Juárez MP, 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by

entomopathogenic fungi. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* **146**: 124–37.

-Pedrini N, Juárez MP, Crespo R, de Alaniz MJT, 2006. Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. *Mycologia* **98**: 528–34.

-Pedrini N, Mijailovsky SJ, Girotti JR, Stariolo R, Cardozo RM, Gentile A, Juárez MP, 2009. Control of pyrethroid-resistant chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**.

-Pedrini N, Ortiz-Urquiza A, Huarte-Bonnet C, Zhang S, Keyhani NO, 2013. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology* **4**: 1–18.

-Pedrini N, Zhang S, Juárez MP, Keyhani NO, 2010. Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect hydrocarbon degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* **156**: 2549–2557

-Reddy P, Singh H, Roy P, Baruah J, 1982. Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. *Biotechnology and Bioengineering*. **24**: 1241–1269.

-Rehner SA, Minnis AM, Sung G-H, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA, 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* **103**: 1055–1073.

-Ryoo D, Choi CS, 1999. Surface thermodynamics of pellet formation in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* **21**: 97–100.

-Satpute SK, Banpurkar AG, Dhakephalkar PK, Banat IM, Chopade B a, 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology* **30**: 127–144.

- Schliebs W, Würtz C, Kunau WH, Veenhuis M, Rottensteiner H, 2006. A eukaryote without catalase-containing microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. *Eukaryotic Cell* **5**: 1490–1502.
- Scholte E-J, Knols BGJ, Takken W, 2006. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology* **91**: 43–49.
- Serrano-Carreón L, Galindo E, Rocha-Valadéz JA, Holguín-Salas A, Corkidi G, 2015. Hydrodynamics, Fungal Physiology, and Morphology. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **149**: 55—90.
- Smith JJ, Aitchison JD, 2013. Peroxisomes take shape. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**: 803–817.
- Smyth TJP, Perfumo A, McClean S, Marchant R, Banat IM, 2010. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* **1**: 1–6.
- 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**: 411.
- Song Z, Yin Y, Jiang S, Liu J, Wang Z, 2014. Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. *BioControl* **59**: 597–605.
- Speare AT, 1920. On certain entomogenous fungi. *Mycologia*. **12**:62–76
- Sprenkel RK, Brooks WM, 1977. Winter survival of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in North Carolina. *Journal of Invertebrate Pathology* **29**:262–266.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.

- Tanaka A, Fukui S, 1989. Metabolism of n-alkanes. In A. Tanaka & S. Fukui (Eds.), *The yeast*, 2nd edition (Vol. 3, pp. 261–287). New York: *Academic Press*
- Tanaka A, Osumi M, Fukui S, 1982. Peroxisomes of alkane-grown yeast: fundamental and practical aspects. *Annals of the New York Academy of Science* **386**:183–199
- Tanaka A, Ueda M, 1993. Assimilation of alkanes by yeasts: functions and biogenesis of peroxisomes. *Mycological Research*. **97**: 1025–1044
- Tenney K, Hunt I, Sweigard J, Pounder JI, McClain C, Bowman EJ, Bowman BJ, 2000. hex-1, a Gene Unique to Filamentous Fungi, Encodes the Major Protein of the Woronin Body and Functions as a Plug for Septal Pores. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 205–217.
- Valero-Jiménez CA, Wieggers H, Zwaan BJ, Koenraadt CJM, van Kan JAL, 2016. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* **133**: 41–49.
- Van Bogaert INA, Holvoet K, Roelants SLKW, Li B, Lin YC, Van de Peer Y, Soetaert W, 2013. The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: A biotechnological interesting biosurfactant produced by *Starmerella bombicola*. *Molecular Microbiology* **88**: 501–509.
- van den Brink HJM, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ, 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. **23**:1-17
- Vigueras G, Shirai K, Hernández-Guerrero M, Morales M, Revah S, 2014. Growth of the fungus *Paecilomyces lilacinus* with n-hexadecane in submerged and solid-state cultures and recovery of hydrophobin proteins. *Process Biochemistry* **49**: 1606–1611.
- Wang C, Wang S, 2017. Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. *Annual Review of Entomology* **62**: 73–90.
- Wang H, Lei Z, Reitz S, Li Y, Xu X, 2012. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Cordycipitaceae) as a biological control

agent against soil-dwelling stages of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Biocontrol Science and Technology* **23**: 234–238.

-Wang Z, Zhong Q, Yin Y, Song Z, Shen L, 2016. Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematology* **18**: 719–726.

-Wang ZL, Zhang L Bin, Ying SH, Feng MG, 2013. Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environmental Microbiology* **15**: 409–418.

-Wucherpfennig T, Kiep KA, Driouch H, Wittmann C, Krull R, 2010. Chapter 4 - Morphology and Rheology in Filamentous Cultivations. In: Allen I. Laskin SS and GMGBT-A in AM, ed. Academic Press, pp. 89–136.

-Xiao G, Ying S-H, Zheng P, Wang Z-L, Zhang S, Xie X-Q, Shang Y, St. Leger RJ, Zhao G-P, Wang C, Feng M-G, 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports* **2**: 483.

-Xie XQ, Li F, Ying SH, Feng MG, 2012. Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE* **7**.

-Xie XQ, Ying SH, Feng MG, 2010. Characterization of a new Cu/Zn-superoxide dismutase from *Beauveria bassiana* and two site-directed mutations crucial to its antioxidation activity without chaperon. *Enzyme and Microbial Technology* **46**: 217–222.

-Zhang S, Widemann E, Bernard G, Lesot A, Pinot F, Pedrini N, Keyhani NO, 2012. CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *The Journal of biological chemistry* **287**: 13477–86.

-Zhang S, Xia YX, Kim B, Keyhani NO, 2011. Two hydrophobins are involved in fungal

spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology* **80**: 811–826.

-Zhao H, Lovett B, Fang W, 2016. Chapter Five - Genetically Engineering Entomopathogenic Fungi. In: Lovett B., St. Leger RJBT-A in G, eds. *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. Academic Press, pp. 137–163.

-Zhou G, Song Z, Yin Y, Jiang W, Wang Z, 2015. Involvement of an alternative oxidase in the regulation of hyphal growth and microsclerotial formation in *Nomuraea rileyi* CQNr01. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **31**: 1343–1352.

-Zimmermann G, 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* **17**: 553–596.