



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Caracterización fenotípica a través de técnicas de microscopía electrónica de una mutante del hongo *Fusarium sp.* de implicación patogénica aislado de *Xylosandrus morigerus*.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

Alan Josué Pérez Lira

Tutoras

Dra. Diana Sánchez Rangel

Dra. Mónica Ramírez Vázquez

Coordinador de Especialidad

Dr. Luis Felipe Jiménez García

CD.MX. 2021.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Financiamiento

El presente trabajo fue financiado por el Fondo Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación (FORDECyT) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto número 292399 “*Generación de estrategias científico–tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México*”.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microscopía Electrónica del edificio Tlahuizcalpan, en la Facultad de Ciencias y el laboratorio de Microscopía Electrónica en el departamento de Biología Celular y Tisular en la Facultad de Medicina de la UNAM, Ciudad de México, y en la Unidad de Microscopía Avanzada en el Instituto de Ecología A.C. (INECOL) en la Red de Estudios Moleculares Avanzados en la Ciudad de Xalapa, Veracruz.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca concedida al alumno Alan Josué Pérez Lira a través del Fondo Regional para el Desarrollo Científico y tecnológico (proyecto FORDECYT 292399), de agosto de 2019 a junio de 2021.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Especialidad en Microscopía Electrónica y Facultad de Ciencias por haberme brindado la oportunidad de engrandecer mi conocimiento en el campo de la Microscopía Electrónica.

Al Instituto de Ecología A.C. (INECOL), por todas las facilidades brindadas para el uso de las instalaciones, en especial al laboratorio de Biología Molecular y Unidad de Microscopía Avanzada.

Agradezco infinitamente el apoyo y la excepcional catedra en la Microscopía Electrónica de Transmisión durante la especialidad a la M. en C. Silvia Juárez Chavero, y a la Especialista en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas, Rosario Pintor Elizalde, y a la Bióloga Lorena María Luisa López Sánchez.

Se agradece la magnífica calidad de enseñanza y el apoyo en el Microscopio Electrónico de Barrido al Biólogo Armando Zepeda Rodríguez, a la Bióloga Greta Hanako Rosas Saito, y al Biólogo Francisco Pasos Nájera.

Un especial agradecimiento a la Dra. Reyna Lara Martínez y a todos los catedráticos de la Especialidad en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas.

Se agradece al M. en C. Emanuel Villafán de la Torre por el apoyo de la edición del documento y sus enormes enseñanzas, a la Dra. Nohemi Carreras Villaseñor, al Dr. Eric Edmundo Hernández Domínguez, por sus amables aportaciones al trabajo realizado.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Hongos	1
1.2	Género <i>Fusarium</i>	3
1.3	Complejos ambrosiales	6
1.4	Marchitez regresiva por <i>Fusarium</i>	8
1.5	Vector de la marchitez regresiva por <i>Fusarium</i>	10
1.5.1	KSHB: Kuroshio shot hole-borer	10
1.6	Hongos asociados a escarabajos nativos de México: el caso de <i>Xylosandrus morigenus</i> como modelo de estudio.....	13
1.7	Mutante en una serina proteasa	14
1.8	Serinas proteasas	15
1.9	Técnicas de microscopía para el estudio de hongos.....	17
2	JUSTIFICACIÓN.....	24
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo general	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	METODOLOGÍA	25
4.1	Obtención del material Biológico	25
4.2	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	25
4.3	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	26
4.3.1	Ultramicrotomía	26
4.3.2	Contraste.....	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Análisis de la cepa mutante (Δsp) y cepa silvestre <i>Fusarium</i> sp. (INECOL-BM-06) por Microscopía Electrónica de Barrido.....	28
5.2	Análisis de la cepa silvestre <i>Fusarium</i> sp (INECOL-BM-06) por Microscopía Electrónica de Transmisión.....	31
6	DISCUSIÓN	33
7	CONCLUSIONES	36
8	BIBLIOGRAFÍA.....	37

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Hongos

Los hongos son un extenso grupo de organismos que pertenecen al reino *Fungi*, con un aproximado de 70,000 especies que habitan en una extensa variedad de ecosistemas. Al poseer un núcleo se consideran organismos eucariontes y estos pueden ser unicelulares o multicelulares, su reproducción es sexual y asexual por medio de esporas, son heterótrofos y la estructura de su pared celular está compuesta principalmente por quitina, glucanos y glicoproteínas (Arenas., 2003; Webster *et al.*, 2007; Pontón., 2008).

Los hongos son organismos cosmopolitas y su distribución se debe a su efectiva capacidad de desarrollarse en una extensa variedad de materia orgánica, debido a que poseen la cualidad, entre otros mecanismos, de modificar el pH de su entorno para su óptimo crecimiento (Muszewska *et al* 2017; Sánchez-Rangel *et al.*, 2018). Suelen tener una próspera proliferación en espacios con poca luz, altos niveles de humedad, e intervalos de temperatura entre los 20-30 °C (García *et al.*, 2002; Agrios., 2005).

Al carecer de clorofila estos organismos son incapaces de elaborar su propio alimento, por lo que sus nutrientes los adquieren de manera heterótrofa, es decir, se nutren mediante la segregación de enzimas degradadoras sobre una gran variedad de sustratos orgánicos (generalmente en materia vegetal o animal) de los que extraen los nutrientes necesarios para su desarrollo y proliferación (Marzluf., 1981; Muszewska. *et al* 2017).

Los hongos al poseer la capacidad de degradar la materia orgánica son de gran beneficio para los ecosistemas funcionando como recicladores. Así mismo, algunos hongos son de gran utilidad para crear antibióticos y fabricación de determinados productos para el consumo humano; sin embargo, para ciertos géneros de hongos, estas capacidades de descomposición son perjudiciales ya que pueden ocasionar enfermedades tanto en los seres humanos, animales, pero principalmente en especies vegetales (Arenas., 2003).

Los hongos se encuentran clasificados como los principales causantes de enfermedades en especies vegetales (Marin-Felix *et al.*, 2017) y aproximadamente 8,000 especies de hongos pueden ocasionar daño, teniendo como consecuencia enormes pérdidas de especies

biológicas y agroalimentarias de impacto económico (Guzmán., 2001). A este tipo de hongos se les conoce como fitopatógenos los cuales emplean distintas estrategias de vida para proliferar, colonizar y como consecuencia causar enfermedad: *i*) necrótofos, *ii*) biotrófos, *iii*) hemibiotrófos. Los hongos necrótofos matan las células vegetales secretando enzimas y/o toxinas en las primeras etapas de la infección aniquilando el tejido vegetal, permitiendo la adquisición de nutrientes necesarios. Los hongos biotrófos colonizan en tejido vegetal vivo, utilizan moléculas efectoras suprimiendo la muerte de las células evitando el reconocimiento de defensa del hospedero, dirigiendo el metabolismo a su favor para obtener sus nutrientes. Los hongos hemibiotróficos ejercen ambas estrategias, en la fase inicial se comportan como biotrófos, seguido de una fase necrotrófa en la cual secreta toxinas para provocar la muerte celular de su hospedero a través de procesos de necrosis (Koeck *et al.*, 2011; Zeilinger *et al.*, 2016; Doehlemann *et al.*, 2017).

Los géneros de hongos fitopatógenos más estudiados en México por su patogenicidad en especies vegetales son *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phymatotdchum* y *Fusarium* (Guzmán., 2001). Los hongos pertenecientes a estos géneros pueden provocar necrosis, pudrición de raíz, marchitez y clorosis, esto debido a que poseen un arsenal de metabolitos tóxicos y tienen la capacidad de secretar enzimas y fitotoxinas que aumentan su virulencia resultando altamente tóxicas para su huésped (Guzmán., 2001; Villa-Martínez *et al.*, 2015). El género *Fusarium* se encuentra distribuido en una extensa variedad de suelos en una diversidad de ecosistemas que infectan y generan ciertas patologías en una variedad de especies agroforestales. Este género causa estragos en diferentes partes de la planta como, en raíz, fruto, semillas, tallo, siendo una enorme problemática agrícola, ya que reduce considerablemente el rendimiento y la calidad de cosechas en cultivos como trigo, maíz, cebada, frijol, caña de azúcar, tomate, papa, entre otras (Fig. 1). Se ha reportado que en México las principales especies de *Fusarium* causantes de enfermedades asociadas a síntomas de pudrición de raíz y tizón de la espiga por mencionar algunos son *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*; en el caso de la caña de azúcar son *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. solani* y *F. oxysporum*; mientras que en el caso de los cultivos de frijol se reconocen a *F. solani*, *F. verticillioides* y *F. oxysporum*, aunque existe una extensa lista de especies relacionados con otros cultivos (González *et al.*, 2005; Leslie *et al.*, 2008; Martínez-Fernández *et al.*, 2015; Leyva-Mir *et al.*, 2017).

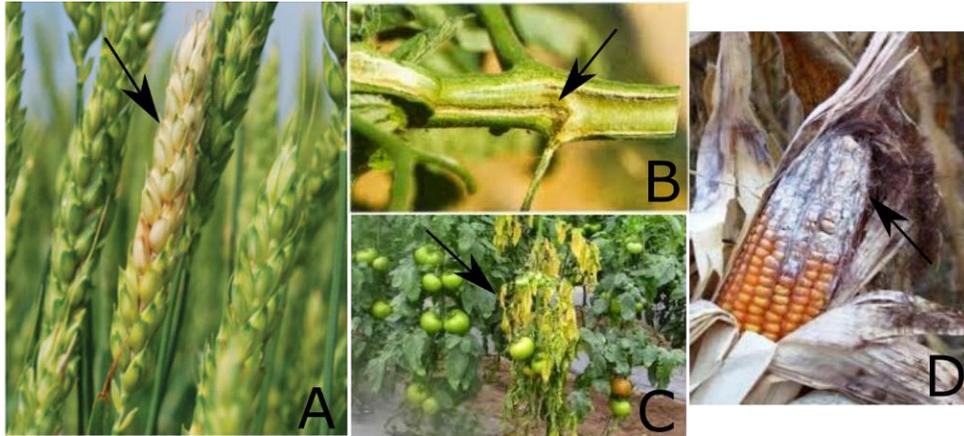


Figura 1. Daños provocados por el género *Fusarium*. **A)** Espiguilla de trigo infectada con *F. graminearum*, produciendo blanqueamiento de algunas espiguillas y enfermedad de tizón de la cabeza por *Fusarium* (Kiersten., *et al.*, 2015). **B)** Tallo de cultivo de tomate, corte transversal con necrosis vascular tono café causado por *F. oxysporum*. **C)** Hojas marchitas con evidente clorosis en cultivo de tomate infectadas por *F. oxysporum*. [Imagen]. (s. f.). Marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*). Recuperado de <https://enfermedadesdel tomate1.blogspot.com/2015/01/marchitez-por-fusarium-fusarium.html>. **D)** Mazorca de maíz infectado con *F. verticillioides*, con síntomas de podredumbre (Reid., 1966).

1.2 Género *Fusarium*

El género *Fusarium* (Link ex Grey, 1821) habita principalmente en suelos y son los protagonistas en cuanto a pérdidas de cultivos en México y el mundo reconocidos como hongos fitopatógenos necrótrofos a los cuales se les conoce coloquialmente como “hongos de campo” (Arenas, 2003; Leslie *et al.*, 2008; Villa-Martínez *et al.*, 2015). Se ha reportado que mantienen un patrón de infección, invadiendo y fragmentando la barrera física de su huésped, por medio de celulasas, pectinasas, proteasas y quitinasas, comenzando generalmente por la raíz para posteriormente colonizar el tallo y el sistema vascular de su hospedero.

La morfología del género *Fusarium* está constituida por una masa micelial bien desarrollada, septada, que está conformada por múltiples hifas continuas alargadas, ramificadas y de forma cilíndrica que se prolongan hacia la extensión apical con diversas

formas según la especie. Las hifas vegetativas se encuentran tanto en la superficie o en el interior del material orgánico que ocupan como sustrato, mientras que las hifas aéreas están proyectadas hacia la superficie y dan lugar a las estructuras reproductoras como los conidióforos (esporas reproductoras asexuales), macroconidios, microconidios y clamidiosporas. Las macroconidias son estructuras pluricelulares y tienen una forma de media luna, o una forma peculiar hialina generalmente septada; la célula apical es alargada y la basal en forma de pie (Fig. 2A-L). Las microconidias son unicelulares, de menor tamaño y con diversas formas las cuales pueden ser ovoides, elipsoidales o sub-globosas; raramente presentan septo y su base puede llegar a ser redondeada, apiculada o corta (Fig. 2M-T). Las clamidiosporas se caracterizan por poseer doble pared gruesa, lisa o rugosa; y se les logra observar de manera aisladas, dobles o en grupo. (Monzón *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 2008; Villa-Martínez *et al.*, 2015). Los hongos de este género al ser organismos eucariotas poseen núcleo, mitocondrias, vacuolas, cuerpos lipídicos, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, y también se pueden observar hacia el ápice o a lo largo de la hifa un grupo de micro y macro vesículas conocidas como Spitzenpoker (Spk), (Arenas., 2003; Estrada *et al.*, 2019).

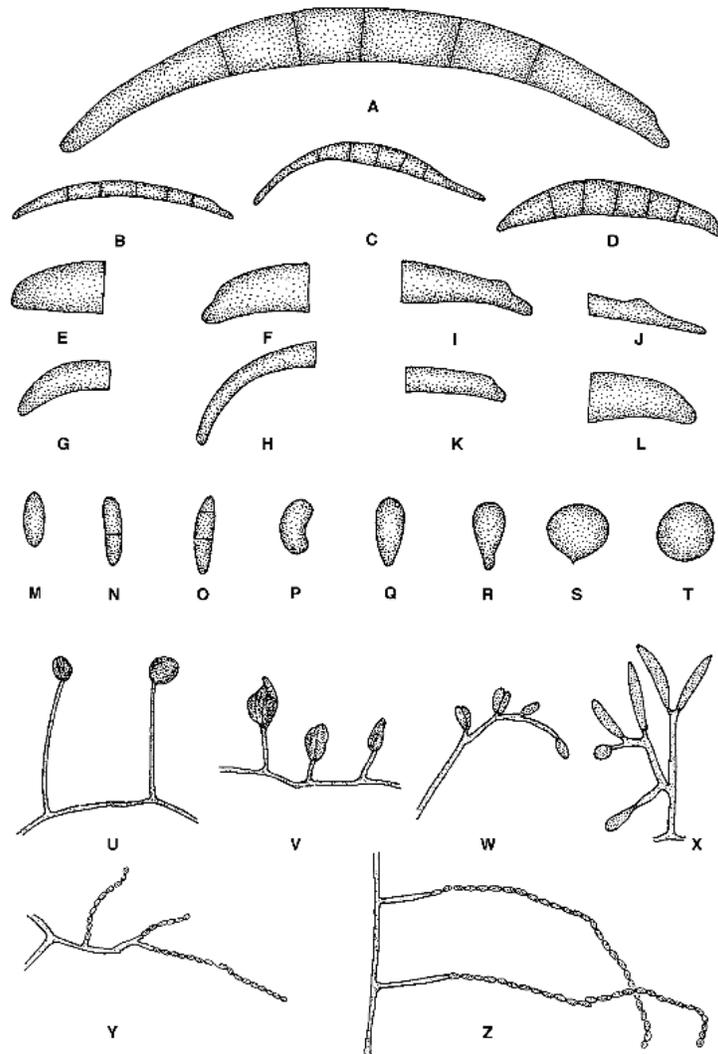


Figura 2. Caracteres morfológicos usados en la identificación de especies de *Fusarium*. **A-D)** Formas de macroconidias. **A)** Típica macroconidia de *Fusarium*. Célula apical a la izquierda, célula basal a la derecha. **B)** Macroconidia delgada, derecha, casi parecida a una aguja, ej., *F. avenaceum*. **C)** Macroconidia con curvatura dorsiventral, ej., *F. equiseti*. **D)** Macroconidia con el lado dorsal más curvado que el ventral, ej., *F. crookwellense*. **E-H)** Formas de las células apicales de las macroconidias. **E)** roma, ej., *F. culmorum*. **F)** Papilada, ej., *F. sambucinum*. **G)** Enganchada, ej., *F. lateritium*. **H)** ahusada, ej., *F. equiseti*. **I-L)** Forma de las células basales de la macroconidia. **I)** Forma de pie, ej., *F. crookwellense*. **J)** Forma de pie elongado, *F. longipes*. **K)** Muesca diferenciada, ej., *F. avenaceum*. **M-T)** Forma de las microconidias. **M)** Oval. **N)** Oval bicelular. **O)** Oval con tres células. **P)** Reniforme. **Q)** Forma ovoide con una base truncada. **R)** Piriforme. **S)** Napiforme. **T)** Globosa. **U-X)** Morfología de las fiálides. **U)** Monofialides largas, ej., *F. solani*. **V)** Monofialides cortas, ej., *F. oxysporum*. **W)** Polifialides, ej., *F. polyphialidicum*. **X)** Polifialides, ej., *F. semitectum*. **Y-Z)** Microconidias catenuladas. **Y)** Cadenas cortas, ej., *F. nygamai*. **Z)** Cadenas largas, ej., *F. verticillioides*. (Leslie et al., 2008).

Debido a su incapacidad de trasladarse por sus propios medios, las condiciones ambientales juegan un rol importante para la propagación de las esporas, las cuales pueden ser dispersadas a través de agua, viento, o insectos (Herrera *et al.*, 2013). Estos últimos resultan ser muy interesante, debido a que algunos insectos como los escolítidos (un grupo extenso de diminutos escarabajos) presentan una relación simbiótica obligada con hongos, los cuales utilizan como fuente de alimento (García-Guevara *et al.*, 2018).

1.3 Complejos ambrosiales

Los escolítidos son diminutos escarabajos de una singular forma cilíndrica o semiesférica pertenecientes a uno de los grupos de coleópteros xilófagos (García-Guevara *et al.*, 2018), también conocidos como ambrosiales, y que se caracterizan por su simbiosis obligada con una diversidad de géneros de hongos como fuente de alimento. En esta simbiosis ambas especies son beneficiadas; el escarabajo se alimenta del hongo adquiriendo nutrientes y el hongo se beneficia al ser propagado en nuevos hospederos de forma directa. Las hembras de los escarabajos son quienes transportan las esporas del hongo de su huésped nativo en sus estructuras especializadas llamadas micangios (Fig. 3), (Skelton *et al.*, 2019).

Estos escarabajos son considerados plagas secundarias y se reconoce que atacan las ramas y tallos de árboles secos, arbustos y árboles en estado de senescencia o debilitados (Soto *et al.*, 2002; De la Cruz-Martínez *et al.*, 2020). Cabe resaltar que las colonias de estos escarabajos fluctúan de estación a estación, es decir, las colonias de los escarabajos no son constantes a lo largo del año; sin embargo, los cambios climáticos que provocan estrés abiótico en los hospederos sanos (como la escasez de agua) ocasionan su debilitamiento, dando como resultado un escenario perfecto para la invasión de estos escarabajos ambrosiales y lo cual se torna en un peligro para las especies vegetales aledañas (Soto *et al.*, 2002; De la Cruz-Martínez *et al.*, 2020;). Así mismo, estas especies al ser introducidas en nuevos ecosistemas por el comercio internacional representan una terrible amenaza ya que pueden atacar una gran variedad de especies vegetales de importancia agroforestal. Un claro ejemplo de esto es el complejo integrado por el escarabajo ambrosial *Euwallaceae kuroshio* (KSHB: *Kuroshio shot hole-borer*, *Euwallacea kuroshio*) y su hongo simbionte *Fusarium kuroshium*,

los cuales son transmisores y causantes respectivamente de la marchitez regresiva por *Fusarium* (Eskalen *et al.*, 2012).

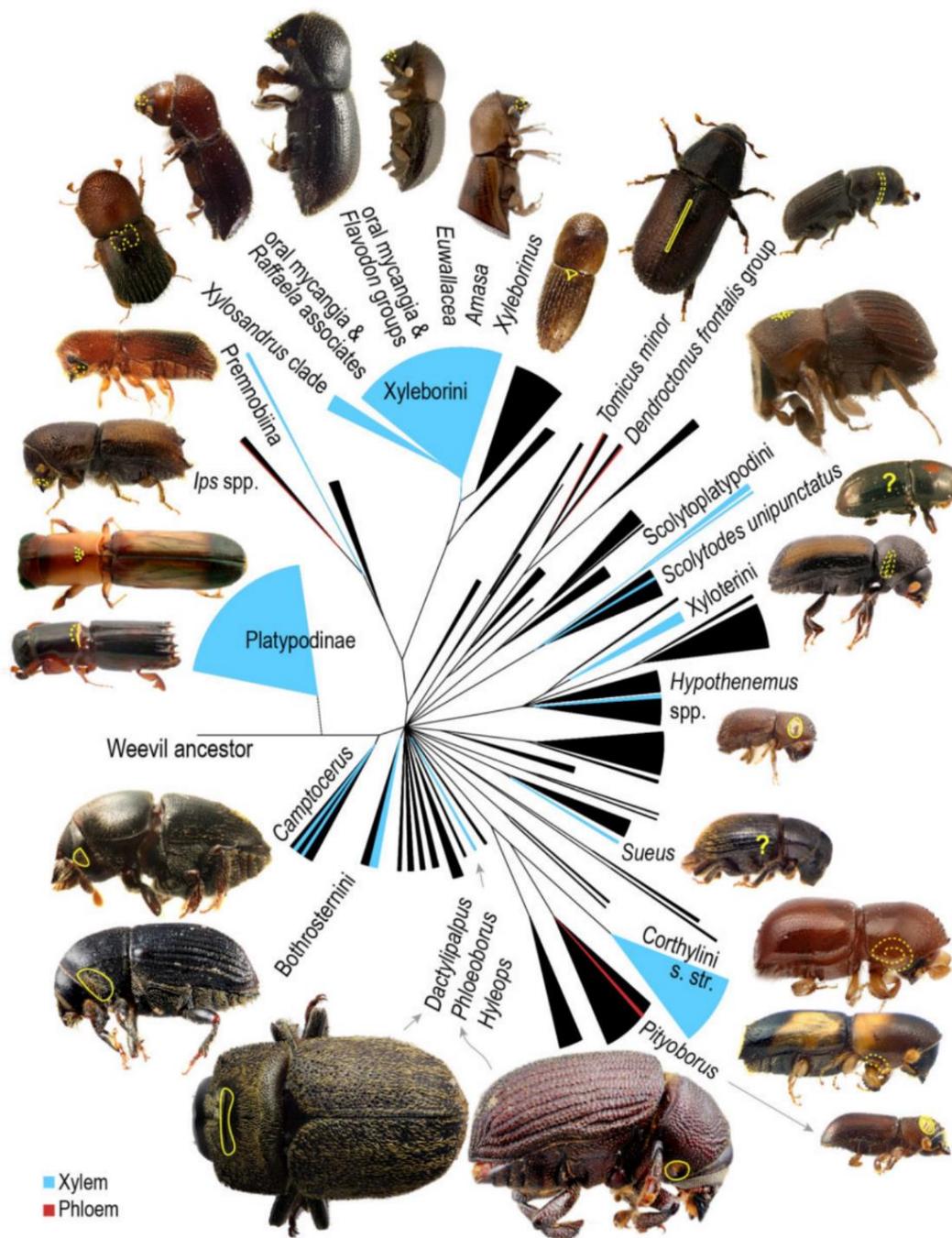


Figura 3. Diversidad de escarabajos ambrosiales. La zona amarilla indica la posición del micangio. (Imagen. 2017). *Ambrosia beetle diversity*. Recuperado de <https://www.ambrosiasymbiosis.org/ambrosia-beetles/classification/>.

1.4 Marchitez regresiva por *Fusarium*

La marchitez regresiva por *Fusarium* es una enfermedad que afecta numerosas especies vegetales causadas por los hongos fitopatógenos del género *Fusarium* por su vector KSHB *Kuroshio shot hole-borer, Euwallacea kuroshio*. Se ha informado que el KSHB ataca arboles vivos sanos; los árboles atacados e infestados presentan visibles signos externos de perforaciones circulares (agujeros) en la corteza del hospedero, el daño causado al xilema se asocia a un excesivo exudado seco o/y húmedo de color blanco nombrado “volcanes de azúcar” acompañado de excretas del escarabajo y trazas de aserrín (Eskalen *et al.*, 2012; Dodge *et al* 2017; Na *et al.*, 2018; Carrillo *et al* 2020). La marchitez regresiva por *Fusarium* ocurre una vez que el hongo se extiende por las galerías e infecta el tejido vascular del huésped, el cual como mecanismo de respuesta realiza una sobre producción de tilosa lo que conlleva a un taponamiento vascular, provocando de esta manera un marchitamiento que inicia en hojas y que se extiende posteriormente a las ramas y finalmente conduce a la muerte del árbol (Eskalen *et al*, 2012; Eskalen *et al.*, 2014). Durante el proceso de infección, el hongo fitopatógeno extrae nutrientes de las células de su hospedero al mismo tiempo que libera diversas enzimas y toxinas que rompen el equilibrio celular de su hospedero, favoreciendo así la progresión de la infección (Fig. 4).

Es de destacar que Instituciones, como el Instituto de Ecología A.C. (INECOL) en colaboración con el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) del Centro Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), llevaron a cabo uno de los primeros esfuerzos para entender mediante técnicas moleculares el proceso de infección del hongo *Fusarium kuroshium*. Dicho estudio consistió en la generación del transcriptoma del hongo con la finalidad de evaluar el crecimiento del hongo bajo diferentes condiciones de pH, y caracterizar en estas sus patrones de expresión génica (Sánchez-Rangel *et al.*, 2018).

De este trabajo se identificaron con base en su perfil de expresión, genes relacionados potencialmente a la patogenicidad del hongo y con un papel relevante como posibles factores de virulencia, como por ejemplo una serina proteasa (SP), un factor de transcripción APSES (FT) y un remodelador de cromatina (kdm4).

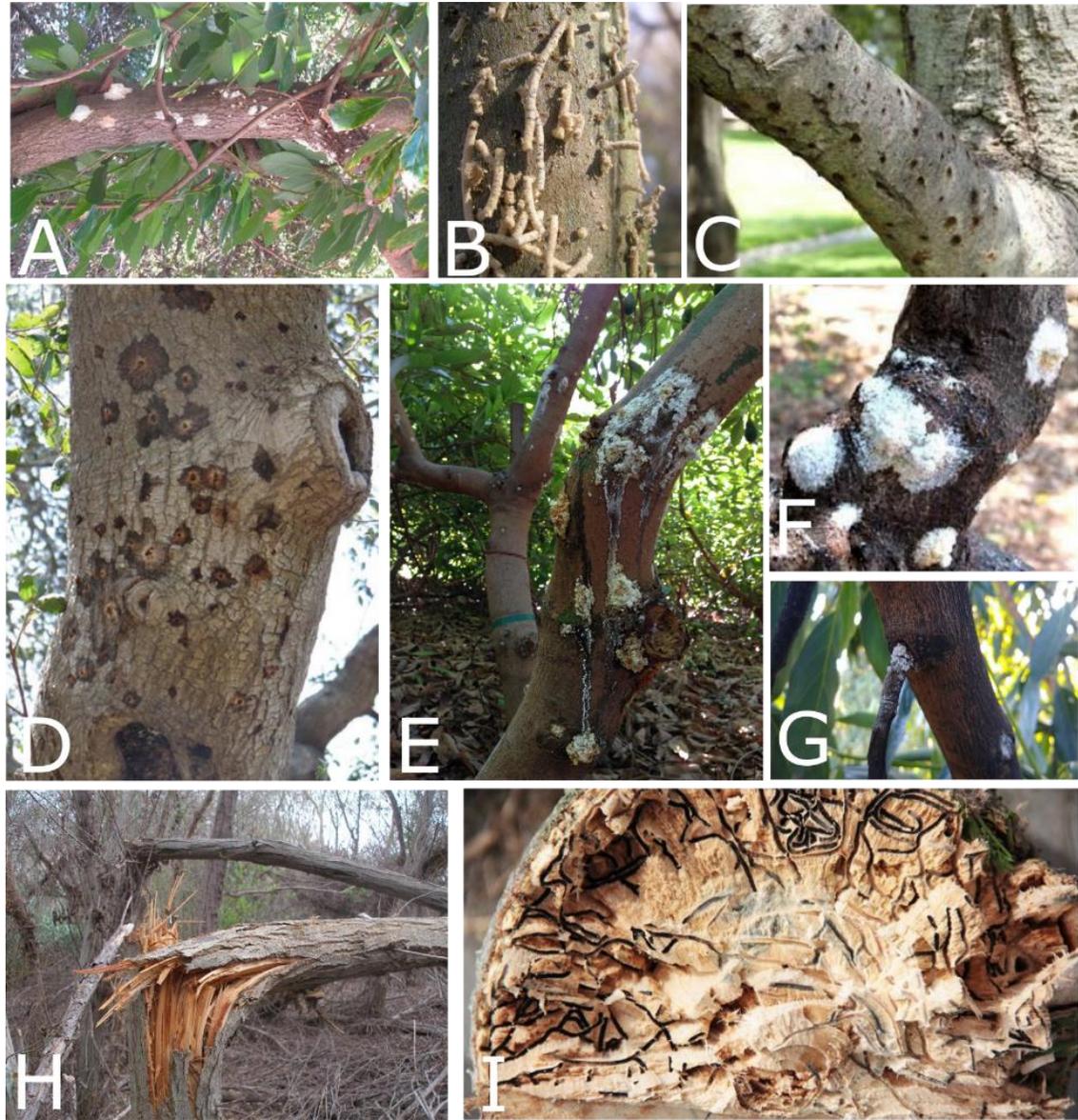


Figura 4. Síntomas de la marchitez regresiva por *Fusarium*. **A)** Árbol de aguacate (*Persea americana*) muestra señales de ataque por escarabajos en ramas y tronco (Rios., 2015). *Polyphagous Shot Hole Borer*: San Diego Population Now Known as Kuroshio Shot Hole Borer [Imagen]. Recuperado de <https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=18867&email=yes>. **B)** Excretas de aserrín, indican excavación activa dentro de un sauce de arroyo por el escarabajo KSHB, (Boland., 2016) **C-D)** Síntomas externos de infestación por escarabajos en *Quercus agrifolia*, (Eskalen., 2015; Umeda *et al.*, 2016). **E- F, G)** Exudado seco/húmedo (volcanes de azúcar) en *Persea americana* (aguacate), (Coleman *et al.*, 2013; Manga *et al.*, 2020). **H)** Troncos de sauces de arroyo infestados de escarabajos quebrados por el viento, (Boland., 2016). **I)** Tronco de árbol muestra huella de las galerías causadas por el ataque del complejo PHSB/KSHB (Dimson., 2018). *Invasive Polyphagous Shot Hole Borer Beetle* [Imagen]. Recuperado de <https://planning.lacounty.gov/site/sea/2018/05/03/invasive-polyphagous-shot-hole-borer-beetle/>.

1.5 Vector de la marchitez regresiva por *Fusarium*

1.5.1 KSHB: Kuroshio shot hole-borer

El escarabajo barrenador *Kuroshio* (KSHB: *Kuroshio shot hole-borer*, *Euwallacea kuroshio* [Gomez & Hulcr, 2018]) es un escarabajo ambrosial de la familia de los escolítinos, de la tribu Xyleborini, proveniente de Taiwán, Vietnam y China (Na *et al.*, 2018). Se cree que esta especie fue introducida al continente Americano por algún puerto de comercio marítimo de la costa Oeste de los Estados Unidos a través de artículos de madera infestados procedentes del sudeste Asiático (Eskalen *et al.*, 2014).

Los primeros reportes de la presencia de KSHB en América son del año 2003; sin embargo, no fue hasta el 2012 cuando se presentaron las primeras evidencias de pérdidas agroforestales al sur de California, Estados Unidos, en arboles vivos de parques urbanos y especies de importancia comercial causadas por la infección asociada a sus hongos simbioses, los cuales provocan en su hospedero la marchitez regresiva por *Fusarium* (Eskalen *et al.*, 2012; Boland *et al.*, 2019).

Aunque el KSHB forma estrechas relaciones simbióticas con una gran variedad de especies de hongos (Eskalen *et al.*, 2014), estudios recientes han revelado que es vector de tres hongos principalmente: *Graphium sp.*, *Acremonium sp.* y *Fusarium kuroshium*, (Fig. 5B) (Na *et al.*, 2018) siendo este último el principal agente causal de la marchitez regresiva por *Fusarium* (Lynch *et al.*, 2016; Na *et al.*, 2018).

El ciclo de vida del KSHB inicia cuando las hembras adultas colonizan un hospedero el cual barrenan para crear galerías en forma de ramal divergente hasta llegar al xilema. Es en estas galerías donde el escarabajo inocula las esporas de los hongos que transporta en estructuras especializadas ubicadas en la parte posterior de la mandíbula y denominadas micangios. La relación simbiótica entre el hongo y el escarabajo se establece cuando el hongo que crece sobre las paredes de las galerías sirve de alimento tanto a las larvas del escarabajo como a los individuos adultos, mientras que el hongo se beneficia al ser dispersado y propagado por el escarabajo (García-Guevara *et al.*, 2018).

Una sola hembra de KSHB (Fig. 5A), puede generar una colonia, pues al ser una especie haplo-diploide, los huevos no fecundados pueden generar individuos machos

(Eatough *et al.*, 2017) con quienes la hembra colonizadora se puede reproducir para posteriormente ovopositar huevos fecundados que den lugar a individuos hembras (Kabashima *et al.*, 2014). Estas pueden permanecer en la colonia para reproducirse con sus hermanos o bien colonizar un nuevo hospedero, ya que son las únicas que poseen alas para poder desplazarse a un nuevo árbol y continuar con el ciclo de vida.

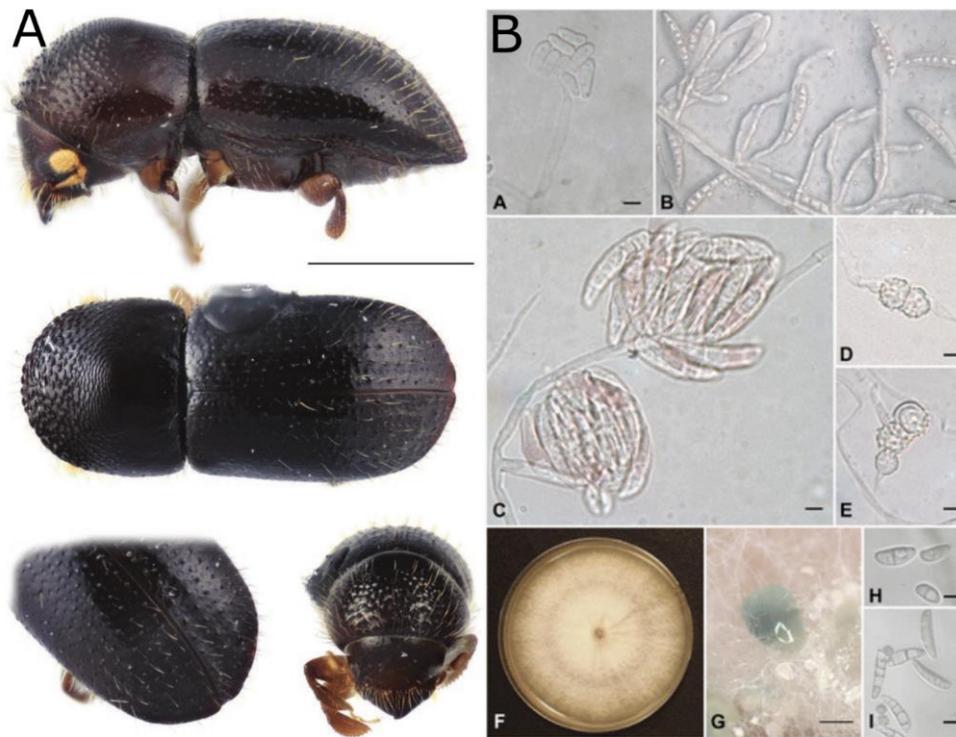


Figura 5. Morfología de *Euwallacea kuroshio* sp. nov. y *Fusarium kuroshium*. **A)** Hembra de *Euwallacea kuroshio* sp. nov. holotipo, vista lateral, vista dorsal, vista oblicua posterior, vista frontal. La escala de la barra corresponde a 1,0 mm, (Gomez *et al.*, 2018). **B)** Morfología de *Fusarium kuroshium* **A, B, D, I**), en medio de cultivo agar bajo en nutrientes Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) a 14 días. Morfología de *Fusarium kuroshium* **C, E, H, F, G**), en agar papa dextrosa (PDA). **A)** Microconidio aseptado. **B)** Fialides conidiógenas esporodoquiales que forman macroconidios fusiformes-claviformes. **C)** Conidióforos esporodoquiales que presentan pigmentación rojiza. **D)** Clamidosporas dobles con paredes rugosas. **E)** Clamidosporas terminales con paredes rugosas. **F)** Morfología de la cepa en medio PDA a las 2 semanas de incubación. **G)** Masas de conidias azul verdosas posterior a 30 días de incubación en cultivo en PDA. **H)** Microconidios septados 0-1. **I)** Macroconidios multiseptados con formación de clamidosporas de paredes rugosas Escala de la barra **A-E, H, I** 5 µm; **G)** 1 mm, (Na *et al.*, 2018).

El primer reporte en México de *Euwallacea kuroshio* fue en el año 2015 (García-Ávila *et al.*, 2016). El ejemplar capturado en una trampa colocada en Tijuana, Baja California, a escasos metros de la frontera con Estados Unidos, se identificó morfológicamente en el “Laboratorio de Entomología y Acarología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria” (CNRF) utilizando las claves taxonómicas como *Euwallacea nr. fornicatus* (García-Ávila, *et al.*, 2016). Una muestra adicional fue enviada para su identificación mediante técnicas moleculares al laboratorio de Entomología de Frutas Tropicales del Instituto de Ciencias Agrícolas y Alimentarias de la Universidad de Florida donde fue caracterizado como *Euwallacea kuroshio*, especie conocida como barrenador kuroshio (KSHB) y que hasta ese momento se encontraba en San Diego, California (García-Ávila *et al.*, 2016). Actualmente, los casos positivos de *Euwallacea sp.* se han detectado en zonas urbanas del municipio de Tijuana, Tecate, Rosarito y Ensenada, Baja California, por lo que de acuerdo con lo establecido en la NIMF No. 8, el estatus de *Euwallacea sp.* es **Transitoria: accionable, en curso de erradicación**. En adición, por lo establecido en la NIMF No. 5, Glosario de términos fitosanitarios, **cumple con la definición de plaga cuarentenaria**, ya que se encuentra presente restringida solo en algunas áreas del estado de Baja California y puede potencialmente causar pérdidas económicas en cultivos hospedantes (SENASICA., 2019).

La presencia de escarabajo *Euwallacea kuroshio* en México, encendió las alarmas fitosanitarias, pues su establecimiento y dispersión representa una gran problemática agroforestal debido al amplio rango de hospederos vegetales que puede llegar a afectar, entre las que se destaca *Persea americana* (aguacate), especie en la que incluso puede completar su ciclo reproductivo (García-Ávila *et al.*, 2016).

Debido al estatus cuarentenario que guarda el hongo *Fusarium kuroshium*, el INECOL, seleccionó como modelo alternativo de estudio al escarabajo escolitino *Xylosandrus morigerus* asociado al hongo *Fusarium sp* (cepa INECOL-BM-06). Dicho modelo se seleccionó por *i*) pertenecer a la tribu Xyleborini y estar filogenéticamente emparentado al KSHB (Fig. 3); *ii*) ambos escarabajos comparten características como la haplodiploidia, endogamia y simbiosis obligada con hongos como fuente de alimento; *iii*) la presencia de *Xylosandrus morigerus* en varios estados de la república mexicana (Klepzig *et al.*, 2004). Por lo tanto, la cepa de *Fusarium sp.* procedente del escarabajo *Xylosandrus morigerus* ayudará

a comprender y analizar fenómenos biológicos asociados al sistema *Euwallacea kuroshio-Fusarium Kurohium*, sin poner en riesgo la sanidad vegetal de la región.

1.6 Hongos asociados a escarabajos nativos de México: el caso de *Xylosandrus morigerus* como modelo de estudio

Xylosandrus morigerus (Blandford, 1894) pertenece a la tribu Xyleborini, se cree que es una especie originaria de la India, Sri Lanka y Papua Nueva Guinea, sin embargo, ante el intercambio comercial por los mercados internacionales esta especie se ha distribuido en todos los continentes como ocurrió con otras especies de la tribu Xyleborini (CABI., 2019).

El escarabajo *Xylosandrus morigerus* (Fig. 6), se ha reportado en México en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca, (Barrera., 2002; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2009). *Xylosandrus morigerus* forma estrechas relaciones simbióticas con una variedad de especies de hongos, se ha informado que es vector de las especies de hongos *Ambrosiella* y *Fusarium* (Andersen *et al.*, 2012; Giraldo *et al.*, 2015; CABI., 2019), siendo este último el principal agente causal de patologías en especies vegetales, ya que se sabe que el género *Fusarium* son principales patógenos de especies vegetales. El escarabajo *Xylosandrus morigerus* transporta las esporas del hongo en el micangio y una vez instalado y barrenado en su hospedero, el hongo comienza a crecer en las paredes de la galería sirviendo de alimento como fuente nutricional de las larvas y los escarabajos adultos (Andersen *et al.*, 2012; CABI., 2019; Giraldo *et al.*, 2015).

Según el Centro de Biociencia Agrícola Internacional (CABI) el escarabajo *Xylosandrus morigerus* debe ser considerada una plaga cuarentenaria potencial, ya que los individuos de *Xylosandrus morigerus*, pueden reproducirse en un considerable número de especies vegetales y provocar potenciales daños tanto en especies forestales como agrícolas de importancia económica (CABI., 2019). La literatura reporta que su principal hospedero es el café robusta *Coffea canephora*, pero también tiene una preferencia menor hacia café arábigo *Coffea arabica*; sin embargo, se ha reportado que también tiene algunos hospederos secundarios como *Bixa orellana* (achiote), *Camellia sinensis* (té), *Cedrela odorata* (cedro americano), y *Persea amaricana* (aguate) entre otras (Giraldo *et al.*, 2015; CABI., 2019),

siendo este el último de gran impacto a nivel económico para México ya que es uno de los principales productores y exportadores de aguacate a nivel mundial, al reportarse en el primer trimestre del 2020 en México una superficie sembrada de 241 mil 140 hectáreas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera., 2020).



Figura 6. Micrografía de *Xylosandrus morigerus*, [Imagen]. (s. f.). *Escarabajo de la Corteza* (*Xylosandrus morigerus*). Recuperado de <https://www.naturalista.mx/taxa/269721-Xylosandrus-morigerus>.

1.7 Mutante en una serina proteasa

En el laboratorio de Biología Molecular de la Red de Estudios Moleculares Avanzados (REMAv) del INECOL, se analizó la expresión de genes candidatos previamente seleccionados, y se observó que los genes que codifican para la serina proteasa (SP) presentaron un perfil de expresión interesante, situándolo como un candidato para generar una mutante a través de técnicas moleculares mediante reemplazo génico.

A través de la caracterización de la mutante de la serina proteasa (Δsp) de la cepa *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06), fue posible distinguir a nivel macroscópico un crecimiento radial menor en medio YPDA (Extracto de Levadura Peptona Dextrosa Agar) en comparación con la cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) (Fig. 7). Además, la mutante (Δsp) provocó una sintomatología de infección menor en el tejido vegetal en un patosistema *in vitro*, mostrando así un menor daño de la cepa mutante serina proteasa (Δsp), en comparación con la sintomatología desarrollada por la cepa silvestre (WT) *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) (Carreras-Villaseñor *et al.*, en preparación).

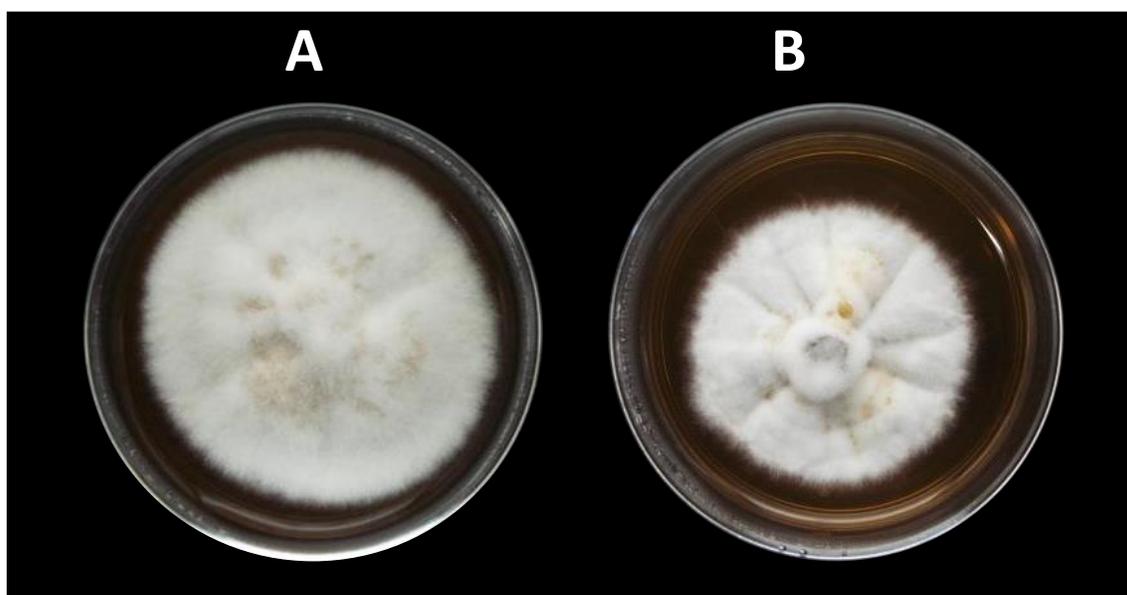


Figura 7. **A)** Cepa silvestre *Fusarium sp.* INECOL-BM-06, **B)** Cepa mutante SP (Δsp). (mutante obtenida por Carreras-Villaseñor., N, 2019).

1.8 Serinas proteasas

Las serinas proteasas (SP) son una familia génica que se encuentran estrechamente vinculadas a la función como catalizadores biológicos, se encuentran distribuidas ampliamente en animales, plantas, bacterias y hongos, son las encargadas de realizar gran número de funciones biológicas, tales como: maduración de proteínas, la escisión de péptidos de señal, la transducción de señales, el recambio de proteínas intracelulares, la respuesta

inmune, la apoptosis (muerte celular programada), la reproducción, además del procesamiento de citocromos en las mitocondrias, la degradación de nutrientes y la adquisición y asimilación de estos mismos (Muszewska *et al.*, 2017; da Silva., 2018).

Las SP hidrolizan los enlaces peptídicos, fragmentando la proteína. En los hongos, las SP se encuentran implicadas en los procesos de patogénesis ya que se ha reportado que estas juegan un rol importante en procesos de desestructuración tisular y de proteólisis de la maquinaria de la defensa del huésped (Muszewska *et al.*, 2017; da Silva., 2018;). De igual manera, en los hongos se sabe que estas enzimas tienen relevancia en el recambio de proteínas, maduración de proteínas, transducción de señales, la escisión de los péptidos de señal y la degradación extracelular (Muszewska *et al.*, 2017; Sánchez-Rangel *et al.*, 2018). Esta última función resulta importante considerando que los hongos son organismos cuya función esencial para su supervivencia es la asimilación y descomposición de nutrientes. Por lo anterior se espera que la mutante Δsp generada a partir de *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06), aislada del escarabajo *Xylosandrus morigerus* presente diferencias en la morfología del hongo en comparación con la cepa silvestre.

Con la finalidad de evaluar dichos efectos, en el presente trabajo se realizará un análisis morfológico-comparativo de la mutante (Δsp) con la cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) empleando Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), con el objetivo de obtener una descripción detallada del aspecto general (topografías de alta resolución) de las estructuras vegetativas y reproductivas del hongo.

Además, debido a la complejidad estructural de la pared fúngica de estos hongos, es un reto evaluar y conservar la ultraestructura de los organelos luego de la exposición de las muestras a tratamientos químicos por fijación, postfijación, deshidratación e inclusión, por lo que este trabajo puso a punto un protocolo para Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), que permita realizar en un futuro estudios ultraestructurales encaminados a describir los posibles los efectos y/o cambios causados por la mutación de la serin proteasa SP, de la cepa silvestre de *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06).

1.9 Técnicas de microscopía para el estudio de hongos

Los microscopios electrónicos de Barrido y Transmisión son utilizados para la investigación, la medicina y la industria, ya que permiten observar diversos materiales a pequeña escala y producir una imagen con una resolución superior a la de un microscopio fotónico (Bozzola., 1999; Nin., 2000; Williams *et al.*, 2009).

La Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión aplicada a la investigación en las ciencias biológicas ha demostrado ser una herramienta indispensable, ya que con ellas se han podido profundizar aspectos estructurales y ultraestructurales de los organismos vivos, así como caracterizar sus efectos a microescalas (Bozzola., 1999). Sin embargo, debido a que los microscopios electrónicos trabajan con un haz de electrones y en condiciones de alto vacío, para hacer uso de ellos es necesario procesar el material biológico por medio de técnicas particulares (Echlin., 2011), dado que el material biológico se encuentra conformado principalmente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N) (Contreras *et al.*, 2015), elementos que al poseer un bajo nivel atómico resultan ser un reto para su observación con dichos equipos. Por esta razón, las muestras biológicas requieren una preparación previa a través de la cual se les dota con agentes contrastantes (átomos endógenos) y conductivos, haciéndolas aptas para su observación a través del Microscopio Electrónico de Barrido y del Microscopio Electrónico de Transmisión (Bozzola., 1999; Nin., 2000; Frankl *et al.*, 2015).

Es claro que el Microscopio Electrónico de Barrido como el Microscopio Electrónico de Transmisión han evolucionado conforme va avanzado la tecnología, construyendo modelos más potentes con gran versatilidad que los modelos originales, sin embargo, el principio de estos microscopios se basa en el fundamento teórico de los haces de electrones (Nin., 2000).

El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM: por sus siglas en inglés "*Scanning Electron Microscopy*") posee un poder de resolución de 3 - 5 nm (30 - 50 Å). El SEM es de gran ayuda para el análisis morfológico, caracterización topográfica, así como para realizar comparativos entre especies silvestres e individuos genéticamente manipulados. El haz de electrones del microscopio al ir barriendo la muestra, interacciona generando señales (electrones secundarios), los cuales son colectados por medio de un detector que traduce la

información recabada a una imagen (Fig. 8). De igual manera, el SEM es capaz de generar distintas señales, las cuales pueden ser captadas por distintos tipos de detectores acoplados al microscopio, como el detector de electrones retrodispersos (composición química cualitativa) o el detector RX (composición química cuantitativa) (Bozzola., 1999; Echlin., 2011).

El Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés “*Transmission Electron Microscopy*”, cuenta con un poder de resolución de hasta 0,2 nm (2 Å). El TEM es de gran utilidad para obtener información ultraestructural del interior del material biológico, ya que este emite electrones irradiando las secciones ultrafinas de una muestra previamente tratada, las cuales deben poseer un espesor entre los 60 - 150 nm (Nin., 2000). Los haces de electrones que inciden sobre las muestras producen una dispersión diferencial, ya que al interactuar con las secciones son transmitidos o dispersados para formar la imagen (Fig. 8) (Bozzola., 1999; Williams *et al.*, 2009).

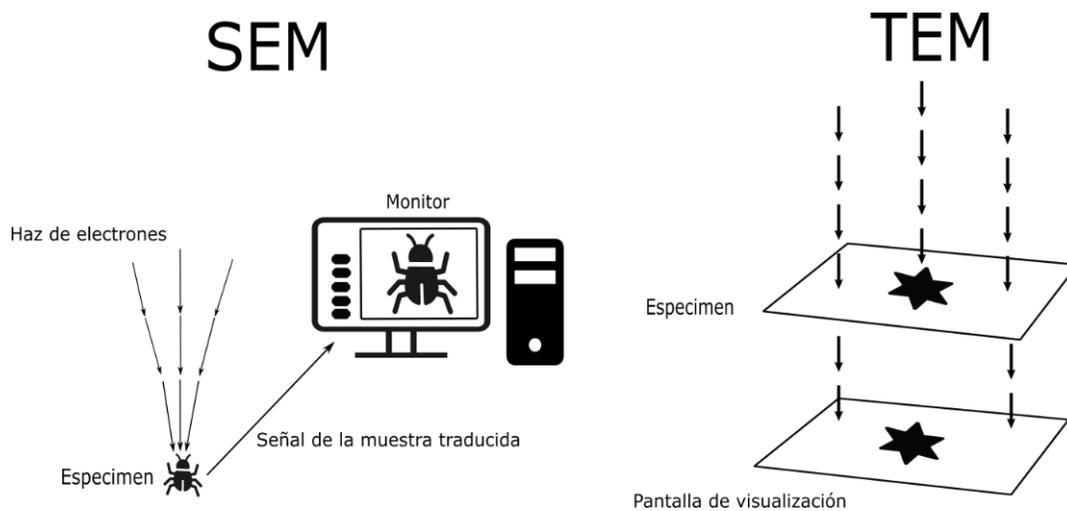


Figura 8. Diferencias básicas entre los microscopios de electrones de transmisión (TEM) y electrones de barrido (SEM). Modificado de (Bozzola., 1999).

Debido a la rigurosa y escrupulosa preparación que requieren las muestras biológicas para SEM y TEM, a lo largo de la historia se han desarrollado un gran número de protocolos dependiendo del tipo de material biológico y lo que se desee observar en él, por lo que existe una amplia gama de protocolos que a su vez permiten modificar ciertos parámetros para que

el investigador y/o microscopista puedan adecuar la preparación en función de la pregunta de investigación que se desee abordar.

Los hongos, al igual que el resto de los materiales biológicos, requieren de preparación para su observación por técnicas de microscopía electrónica; sin embargo, debido a su naturaleza dicha preparación conlleva ciertos retos. Para SEM es fundamental conservar la estructura superficial evitando la destrucción, colapso o fractura celular por los tratamientos a los que se somete la muestra (Torres., 1989). Un proceso típico para SEM conlleva una serie de etapas como la fijación, la deshidratación, el secado y el recubrimiento con un metal conductor. En cada una de dichas etapas es indispensable conservar la integridad del material biológico.

Por ejemplo, Guerra *et al.*, (2012) llevaron a cabo un trabajo para evaluar la efectividad de cuatro protocolos de preparación de diferentes materiales biológicos para SEM (incluyendo hongos), enfatizando las diferencias entre la fijación física y la fijación química. El primer método consistió en una fijación física con calor a 70°C, mientras que el segundo método involucro una fijación física con frío mediante liofilización a -62° C a 1.2 Pa. Un tercer método consistió en fijación química con glutaraldehído 3%, y el cuarto tratamiento con una fijación química con glutaraldehído 3% seguido de una fijación secundaria con Tetraóxido de osmio (OsO₄). Las últimas dos metodologías deshidrataron con una serie de alcoholes, secado por liofilización (-62° C a 1.2 Pa) y recubrimiento con oro los cuatro tratamientos. Los resultados reportados por Guerra *et al.*, (2012) indicaron que, para el caso de los hongos, las muestras sujetas a los primeros dos tratamientos (fijación física) no sufrieron daños severos; sin embargo, en los tratamientos por fijación química solamente el último preservó la integridad de las muestras. Es importante destacar que si no se cuenta con un protocolo bien establecido para el secado de las muestras mediante liofilización (Freeze Dryer), es posible generar daños por sublimación al material como consecuencia de los cambios térmicos y la tensión superficial, lo cual se hace evidente al momento de su observación en SEM (Echlin., P. 2011).

En otro trabajo realizado por Borah *et al.*, (2016), se realizó un estudio del potencial de los ramnolípidos (RL) como una táctica para el biocontrol del hongo filamentoso *Fusarium verticillioides*. Para ello se analizó a través de SEM el efecto de los RL sobre la morfología

del hongo, siguiendo el protocolo de Yan *et al.*, (2015). Dicho protocolo se basa principalmente en una fijación química con glutaraldehído 2.5%, seguida de una deshidratación con alcoholes escalonados y un secado mediante punto crítico. El análisis de las micrografías de *F. verticilloides* permitió observar una morfología irregular en el micelio tratado con ramnolípidos (RL), mientras que el micelio sin tratamiento presento morfología normal. De lo anterior se asume que la metodología realizada por Borah, *et al.*, (2016) no muestra alteraciones en *F. verticilloides*. debido a que los tratamientos químicos ejercidos en las muestras procesadas no afectaron la morfología del tratamiento y el control.

Baffoni *et al.*, (2015) evaluaron en un sistema *in vitro* el efecto antagónico de dos cepas de *Lactobacillus plantarum* (SLG17 y FLN13) contra *Fusarium spp.* Parte de la evaluación del antagonismo de este trabajo se analizó mediante SEM, para lo cual se tomaron del cultivo *in vitro* cuadros de agar papa dextrosa PDA de 1x1 cm² adyacentes al micelio, realizando una fijación con solución química de glutaraldehído al 2.5%, una deshidratación gradual con alcoholes, un secado por punto crítico y un recubrimiento de oro-paladio. El análisis por SEM revelo alteraciones en la superficie de las hifas y conidios de *Fusarium spp.*, en comparación al control. También del estudio se concluye que debido a que las micrografías de *Fusarium spp.* bajo condiciones control no presentan daño morfológico, dicha metodología es idónea para el procesamiento de ese tipo de material biológico.

De forma similar, Pariona *et al.*, (2019) realizaron un estudio para evaluar la actividad antifúngica de nanopartículas de cobre a distintas concentraciones para su aplicación como potencial fungicida contra tres cepas de hongos filamentosos: *Fusarium solani*, *Neofusicoccum sp.* y *Fusarium oxysporum*. La actividad antifúngica fue evaluada en parte a través de SEM siguiendo la metodología por Bozzola., (1992), la cual consistió en cortar discos de 10 x 10 mm² de la periferia del micelio en cultivo *in vitro*, los cuales se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2.5%, deshidratados con alcoholes graduales, secados en un secador de punto crítico y cubiertas con oro. En las micrografías obtenidas de las estructuras vegetativas (micelio) y reproductivas (conidios) se puede observar una deformación dependiendo de la concentración de las nanopartículas aplicadas en las tres cepas, cambios que no fueron observados en las muestras control a las que no se aplicaron nanopartículas. Dichos resultados indican por lo tanto que los cambios estructurales se

debieron al efecto de las nanopartículas de cobre sobre las muestras y no por el procesamiento del material.

En el caso de la Microscopía Electrónica de Transmisión, la preparación de muestras provenientes de levaduras y hongos presenta un elevado grado de dificultad ya que estos organismos al poseer una pared celular rígida compuesta de quitina y glucanos, lo cual complica la infiltración química de los compuestos utilizados durante la preparación de muestras, por lo que en muchos casos se requieren estandarizar protocolos específicos para la fijación, deshidratación, inclusión, y contraste de las muestras, de forma que se logren obtener imágenes de alta calidad y adecuadas para realizar un análisis ultraestructural (Pontón., 2008; Frankl *et al.*, 2015;).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo modelo utilizado de forma recurrente en la investigación de este grupo de organismos (y en general en los eucariotas) debido a su fácil manipulación y su elevada tasa de crecimiento. Debido a esto, existe gran cantidad de información referente a su genética y procesos bioquímicos, lo cual ha permitido desarrollar enfoques que echen mano de la Microscopía Electrónica de Transmisión para describir los efectos ultraestructurales que conlleva su manipulación genética (Bauer *et al.*, 2001; Gammie., 2008; Frankl *et al.*, 2015).

Debido a su similitud estructural, algunas metodologías utilizadas para el estudio por TEM de *Saccharomyces cerevisiae* han resultado útiles también para el estudio de otras especies de levaduras y hongos filamentosos (Frankl *et al.*, 2015). Wright., (2000) propuso un protocolo de gran efectividad para la preparación de levaduras para TEM. Este protocolo se basa en una fijación química con aldehídos (generalmente glutaraldehído/paraformaldehído), seguida de una postfijación con permanganato de potasio (KMnO₄) o Tetraóxido de osmio (OsO₄). Sin embargo, el uso de KMnO₄ debe ser utilizado con cautela, pues se sabe que puede llegar a extraer organelos no membranosos y alterar la morfología a grandes magnificaciones (Bozzola.,1999), aunque se sabe también que conserva bien las capas lipídicas (Bowes *et al.*, 1966; Frankl *et al.*, 2015). Por otro lado, el Tetraóxido de osmio tiene la cualidad de ser más efectivo que el KMnO₄ al lograr estabilizar los componentes celulares membranosos y las capas lipídicas, además mantiene componentes como los microtúbulos y microfilamentos con tiempos adecuados, aunque tiene la desventaja de tener

una menor velocidad de penetración en hongos y levaduras en comparación con el KMnO₄ (Bozzola.,1999).

Además de la fijación, otra etapa crítica es la inclusión ya que esta requiere hacer uso de resinas con capacidad de reticulación para abarcar toda la estructura celular sin perder la plasticidad necesaria para realizar los cortes ultrafinos. Wright (2000) sugiere el uso de la resina Spurr (o dióxido de vinilciclohexeno) debido a su baja viscosidad, pues favorece la infiltración en el caso levaduras, siendo una de las utilizadas para el estudio de su ultraestructura. Sin embargo, también existen otras resinas epoxicas como Epon que se siguen utilizando de forma rutinaria para la inclusión de levaduras (Frankl *et al.*, 2015).

Al igual que con SEM, existen ya algunas metodologías para la preparación de muestras de TEM que han resultado de utilidad. Por ejemplo, Zhang *et al.*, (2013) estudiaron el potencial efecto antifúngico de la bacilomicina L (producida de manera natural por *Bacillus amyloliquefaciens*), pues esta molécula sugiere aumentar la permeabilidad de la membrana en hongos filamentosos como *Rhizoctonia solani*. Parte de la evaluación de la actividad antifúngica de la bacilomicina L se realizó mediante TEM, la metodología consistió en fijar las hifas en glutaraldehído al 2.5%, seguido de una fijación secundaria con Tetraóxido de osmio OsO₄ al 1%, una deshidratación con alcoholes ascendentes desde el 10% hasta el 100%, la infiltración del material con solución de acetona y una inclusión en resina epóxica epon-araldita contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los resultados permitieron analizar la ultraestructura de las hifas de *R. solani* sometidas al tratamiento con (bacilomicina L) y en las que fue evidente la presencia de una membrana nuclear discontinua, además de la estructura de los nucleolos menos definidos y mitocondrias desorganizadas en comparación al control. En otro trabajo realizado por Han *et al.*, (2019) se probó el péptido P852 como potencial antifúngico contra la *F. oxysporum.*, evidenciando mediante TEM que el antimicótico P852 produce daño en la membrana y en el contenido celular de las hifas. La metodología realizada para TEM en este estudio también se basó el trabajo de Zhang., *et al.*, (2013).

Otro ejemplo es el trabajo de Folch-Mallol *et al.*, (2004), en el que evaluaron la regulación de estrés del crecimiento exponencial de dos mutantes ($\Delta cdc25-21$ y $\Delta cdc25-22$) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En este estudio analizaron por TEM la

ultraestructura celular ante el estrés térmico, en la fase de crecimiento exponencial de la levadura. Su metodología consistió en una fijación en glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4%, seguido de una fijación secundaria con permanganato de potasio KMnO_4 e inclusión en resina Spurr. Sus resultados permitieron concluir que distinguir fenotípicamente entre las cepas mutantes (que presentaron paredes celulares gruesas, bien definidas y con alta acumulación de glucógeno) y la cepa silvestre.

Los trabajos antes mencionados constituyen distintos métodos empleados para analizar cambios morfológicos y ultraestructurales en hongos y levaduras utilizando los microscopios electrónicos SEM y TEM. A partir de ellos es posible sentar una base a partir de la cual se pueden desarrollar flujos de trabajos específicos para la preparación de material biológico de los hongos filamentosos de la cepa mutante (Δsp) y la cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06).

2 JUSTIFICACIÓN

Este trabajo se desarrolla en el marco del proyecto 292399 “*Generación de estrategias científico–tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México*” financiado por CONACyT a través del Fondo Regional para el Desarrollo Científico y tecnológico (FORDECYT). Los resultados contribuirán en generar conocimiento sobre los cambios morfológicos y estructurales de la cepa mutante Δsp seleccionada por su probable participación en procesos de infección del hongo *Fusarium sp.* asociado al escarabajo ambrosial *Xylosandrus morigerus*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar la cepa mutante (Δsp) del hongo fitopatógeno ambrosial *Fusarium sp.* asociado al escarabajo *Xylosandrus morigerus* a través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Estandarizar un protocolo para estudiar a nivel ultraestructural el hongo ambrosial *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) asociado al escarabajo *Xylosandrus morigerus* a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

3.2 Objetivos específicos

- Obtener muestras de la cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) y de la cepa mutante $\Delta sp.$, crecidas en medio agar papa dextrosa (PDA).
- Procesar muestras para su análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Analizar las muestras a través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Establecer un protocolo para el análisis ultraestructural del hongo ambrosial *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) a través de Microscopía Electrónica de Transmisión TEM.

4 METODOLOGÍA

4.1 Obtención del Material Biológico

Para la obtención de material biológico para Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía Electrónica de Transmisión se propagaron las cepas preservadas por medio de cubos de micelio de 5mm de diámetro de la cepa *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) y la cepa mutante Δsp , en cajas Petri en medio Agar Papa Dextrosa (PDA, 39g / L Sigma-Aldrich) a una temperatura de 28 ± 1 ° C en oscuridad por un periodo de 5 días.

4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Se recolectaron muestras de cultivos de 5 días crecidas en medio Agar Papa Dextrosa (PDA, 39 g / L Sigma-Aldrich) de la cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) y de la cepa mutante (Δsp), se seccionaron fragmentos en cubos de 5mm de la zona periférica micelial del hongo, las muestras biológicas se fijaron en solución fijadora de glutaraldehído al 2.5% durante 24 hrs a 4°C, posteriormente las muestras se lavaron con tampón de fosfatos Sörensen 0.1M, pH 7.2, (fosfato monosódico Sigma-Aldrich, fosfato disódico Sigma-Aldrich) por triplicado por un lapso de 5 min cada cambio (Sjöstrand., 1967; Nin., 2000; Echlin., 2011). La deshidratación se realizó con soluciones de alcoholes ascendentes a 4°C a de forma gradual iniciando con alcohol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 96% durante 60 min entre cada cambio. El último paso se realizó en etanol al 100% por triplicado por un lapso de 30 min cada cambio. Las muestras deshidratadas se colocaron en un secador de punto crítico Polaron-E500 con CO₂ (Watford, Hertfordshire, UK). El material secado se colocó con delicadeza en un porta-muestras de aluminio previamente cubierto con cinta adhesiva doble de carbón y se cubrieron con una capa de oro en un ionizador Polaron 11-HD (Watford, Hertfordshire, UK). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) FEI Quanta 250 FEG (Czech Republic); operado a una aceleración de voltaje de 5 kV y se tomaron micrografías con magnificaciones de 5,000× y 10,000× (Bozzola., 1999).

4.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Se recolectaron muestras de la cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) y de la cepa mutante (Δsp) crecidas durante 5 días en medio Agar Papa Dextrosa (PDA, 39g/L Sigma-Aldrich). Para ello se seccionaron fragmentos en forma de cubo de 0.5 mm, los cuales fueron recolectados de la zona periférica del hongo. Las muestras recolectadas se colocaron en la solución fijadora de glutaraldehído al 2.5%, paraformaldehído al 4% en un tampón de fosfatos Sörensen 0.1M, pH 7.2 (fosfato monosódico Sigma-Aldrich, fosfato disódico Sigma-Aldrich), durante 24 h. Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces cada 10 min en buffer fosfatos de Sörensen pH 7.2, las muestras lavadas fueron postfijadas con Tetraóxido de osmio OsO₄ al 1% (Sigma-Aldrich), por un lapso de 1 hr. Transcurrido el tiempo las muestras fueron lavadas nuevamente por triplicado en tampón de fosfatos Sörensen pH 7.2, (Sjöstrand., 1967; Nin., 2000; Echlin., 2011). La deshidratación se realizó empleando soluciones graduales de alcohol a 4°C iniciando con 30, 50, 70, 80, 96 y 100%, 10 min entre cada cambio de alcohol, este último alcohol absoluto (100%) se realizó por triplicado por un lapso de 10 min entre cada cambio. Posteriormente se inició con el agente intermediario Acetonitrilo Reagent, (Electron Microscopy Sciences) realizando tres cambios cada 10 min. La preinclusión con una mezcla de Acetonitrilo-Spurr- 1:1 (Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit EMS) durante 24 hrs. y posteriormente se realizó un segundo cambio de Acetonitrilo-Spurr 1:2 durante 12 hrs. Transcurrido el tiempo se procedió a evaporar el acetonitrilo por 12 hrs. en campana de extracción, posterior a la evaporación del acetonitrilo se realizó un nuevo cambio con resina pura Spurr durante 12 hrs., trascurrido este tiempo se comenzó con la inclusión en moldes de silicón con nueva resina Spurr (Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit EMS) una vez situadas las muestras en los moldes de silicón se procedió a la polimerización en horno secado convexion BINDER durante 48 hrs. a 60°C (Bozzola., 1999; Wright., 2000).

4.3.1 Ultramicrotomía

Con el propósito de obtener los cortes para la observación por microscopía óptica y electrónico de transmisión se llevó a cabo la preparación de bloques polimerizados. A partir de dichos bloques se formó una pirámide en uno de los extremos, en el soporte del

ultramicrotomo (LEICA EMUC7 Germany); los cortes para generar la pirámide se realizaron manualmente con ayuda de navajas tipo Gillet® de doble filo y dejando en la parte superior una base en forma de trapecio justo por encima del material biológico. Una vez obtenida la pirámide se realizaron cortes semifinos y ultrafinos utilizando el ultramicrotomo (LEICA EMUC7 Germany) con cuchillas de vidrio. Se realizaron cortes semifinos de 200-250 nm de grosor los cuales fueron teñidos con Azul de Toludina con el fin de realizar una exploración del material y determinar la zona de interés para realizar cortes ultrafinos. Los cortes ultrafinos se realizaron de aproximadamente 60 nm de espesor y fueron colectados en rejillas de cobre cubiertas con membrana colodión (Bozzola., 1999; Nin., 2000).

4.3.2 Contraste

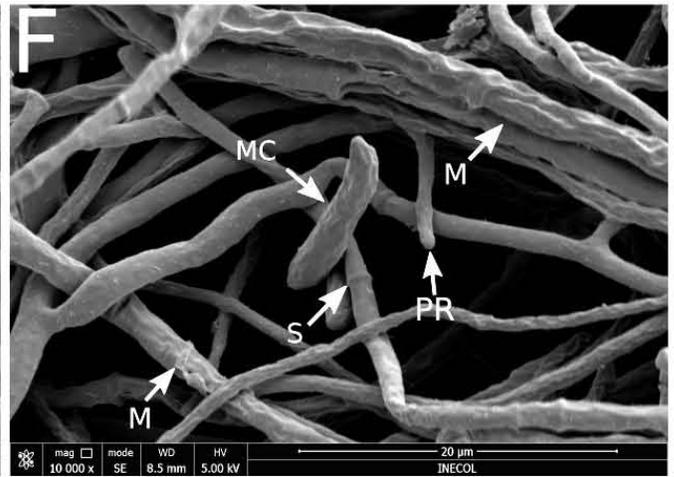
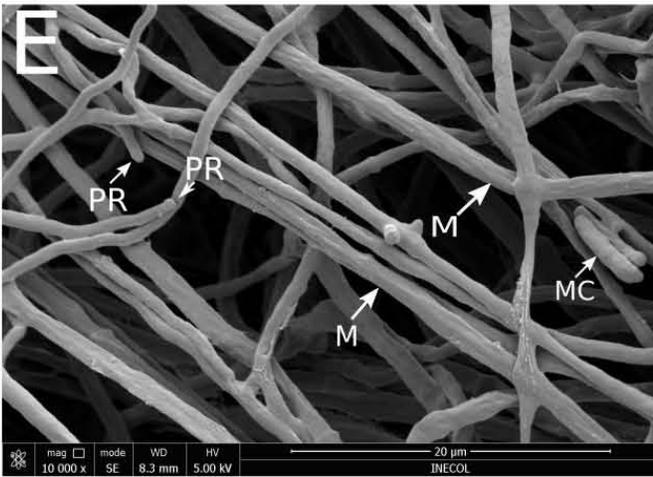
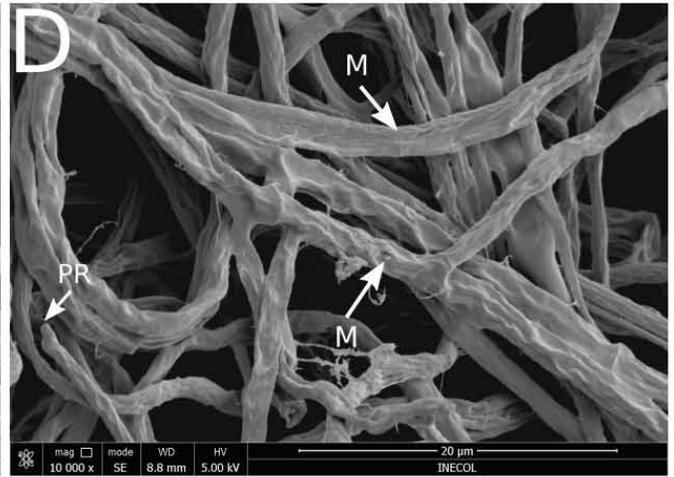
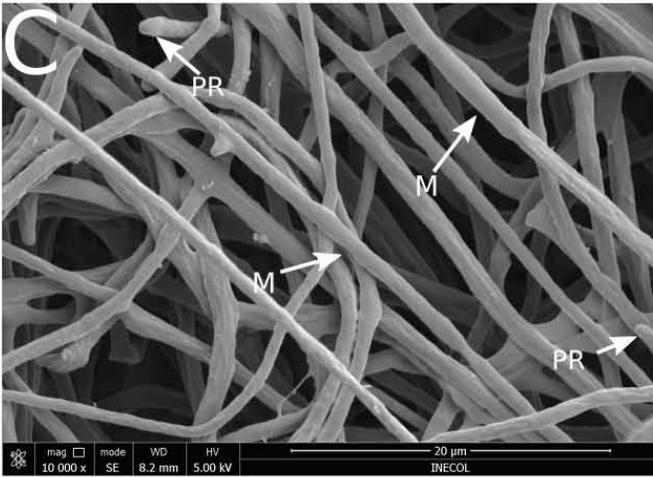
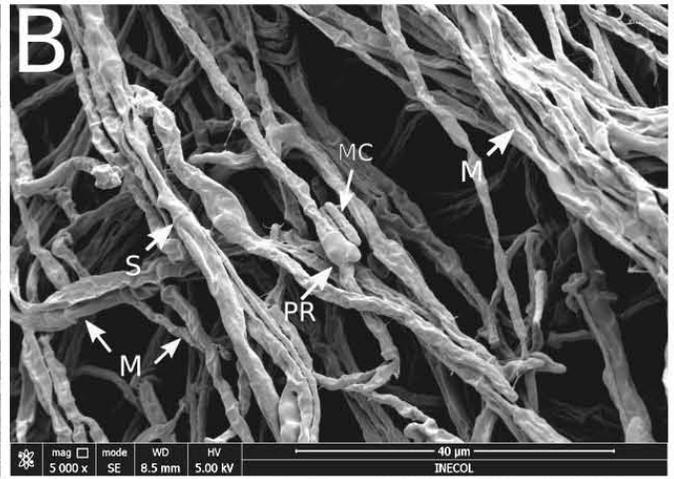
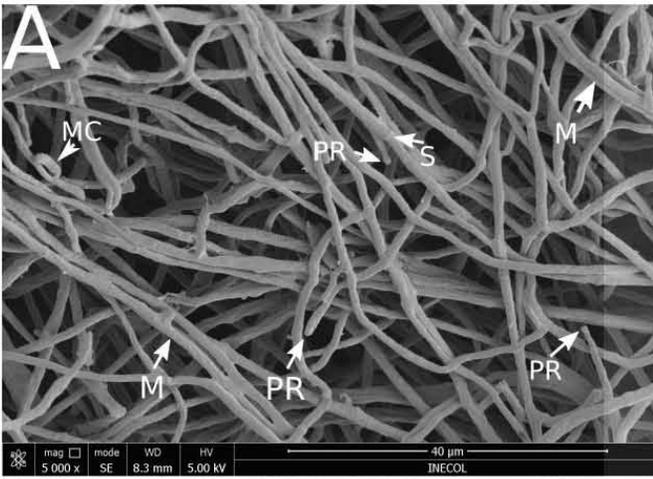
Los cortes ubicados en las rejillas de cobre se contrastaron con Acetato de Uranilo 2% durante 20 min y con citrato de plomo de Reynold al 0.2% durante 10 min. Las rejillas con los cortes contrastados se observaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEM-1010 (JEOL Japan) operado a 80 kVs.

5 RESULTADOS

5.1 Análisis de la cepa mutante (Δsp) y cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) por Microscopía Electrónica de Barrido.

La morfología de ambas cepas se analizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido. En la cepa silvestre *Fusarium sp.* (WT), Fig. 9A-I se observaron hifas desorganizadas conformadas por un micelio septado de forma cilíndrica, de textura lisa y con células apicales bien definidas y de punta redonda. En las imágenes de mayor magnificación Fig. 9C, E, G, I, se puede observar un micelio cilíndrico, turgente, liso y con células apicales redondeadas, sobre el cual es posible observar microconidios aseptados, levemente redondeados y que se afinan hacia la base.

En contraste, en la cepa mutante Δsp Fig. 9B-J, se observan hifas desorganizadas conformado por un micelio septado, colapsado, con textura rugosa y de superficie amorfa; además se pueden observar algunos microconidios aseptados, alargados, levemente redondeados y de textura también rugosa. En las imágenes de mayor magnificación (Fig. 9D, 9F, 9H y 9J), se puede se puede observar con mayor definición la textura rugosa tanto del micelio septado como de los microconidios aseptados, con textura rugosa y de superficie amorfa.



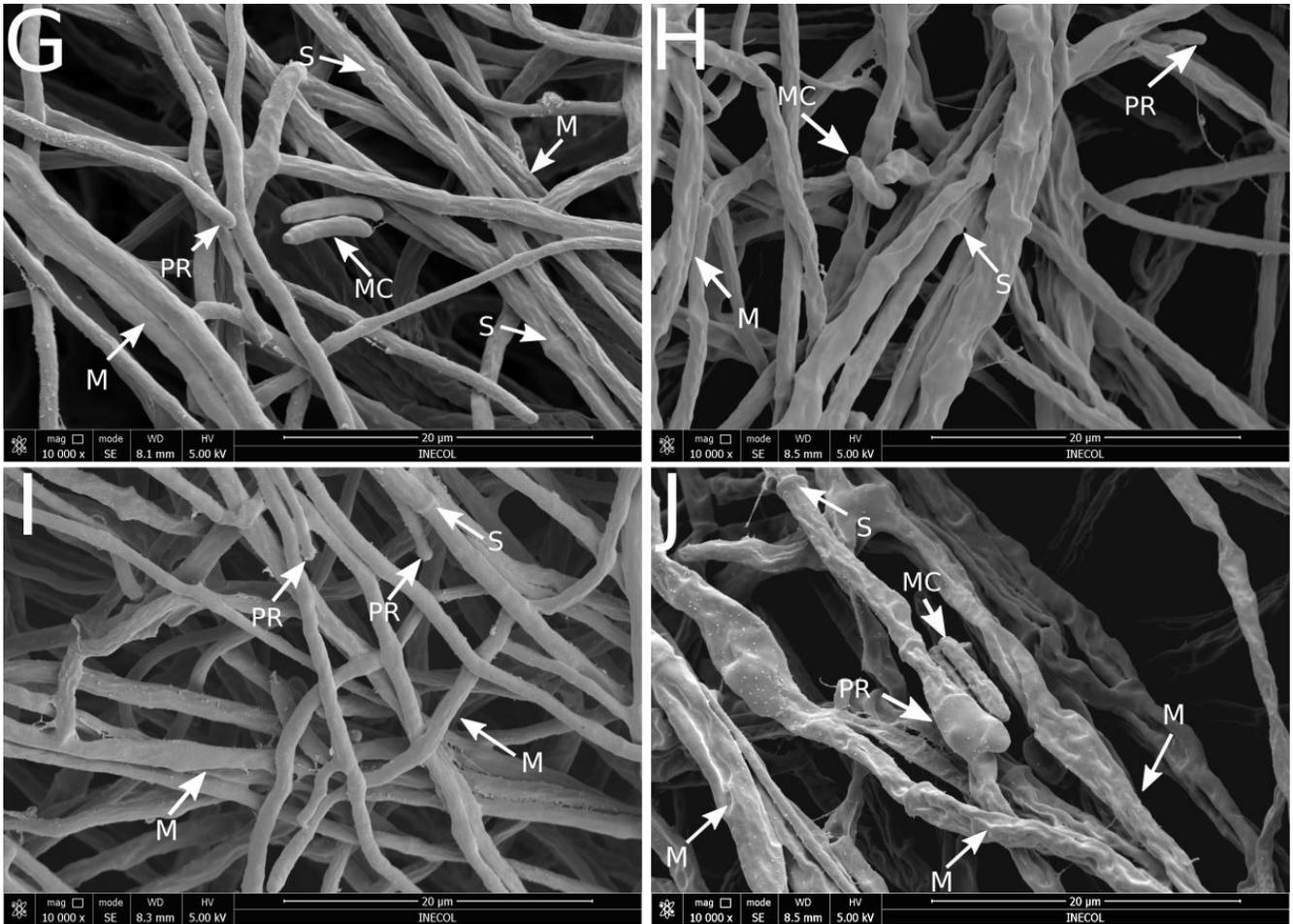


Figura 9. Micrografías adquiridas por Microscopía Electrónica de Barrido de las estructuras vegetativas y reproductivas de la cepa silvestre *Fusarium sp* (WT) y la cepa mutante (Δsp) tomadas a aumentos de 5,000× (A-B) y de 10,000× (C-J). M: Micelio, S: Septo, PR: Célula apical punta redondeada, MC: Microconidios.

5.2 Análisis de la cepa silvestre *Fusarium sp* (INECOL-BM-06) por Microscopía Electrónica de Transmisión.

En la Fig. 10A, se muestra la ultraestructura celular de una hifa dispuesta en un corte longitudinal, en donde es posible identificar la pared celular intacta electrodensa, así como la membrana celular claramente definida y gotas lipídicas en el centro de la célula. En la Fig. 10B, se muestra una estructura vegetativa del hongo en el cual es posible apreciar un septo bien definido en la parte superior; en la zona apical de la célula se observan numerosas vesículas electrodensas asociadas a Spitzenkörper; de igual manera es posible distinguir el contorno celular definido tanto por la pared celular como por su membrana plasmática. La Fig. 10C, muestra la ultraestructura de las estructuras vegetativas; en la parte superior de la imagen se aprecian dos hifas las cuales contienen numerosos cuerpos residuales y gotas lipídicas, y en las que es posible distinguir claramente el contorno de la pared celular y de la membrana plasmática. En la parte inferior de la misma imagen se observa una estructura vegetativa en la que también es posible distinguir gotas lipídicas, así como la pared celular y la membrana celular claramente conservada y definida. Finalmente, en la Fig. 10D, se observa la ultraestructura de una hifa dispuesta de manera transversal en la cual se distingue en la zona apical una pared celular de tipo granular y una membrana celular claramente delineadas; de igual manera se distinguen en su interior algunas gotas lipídicas y vesículas electrodensas asociadas a Spitzenkörper, además de observarse una vacuola.

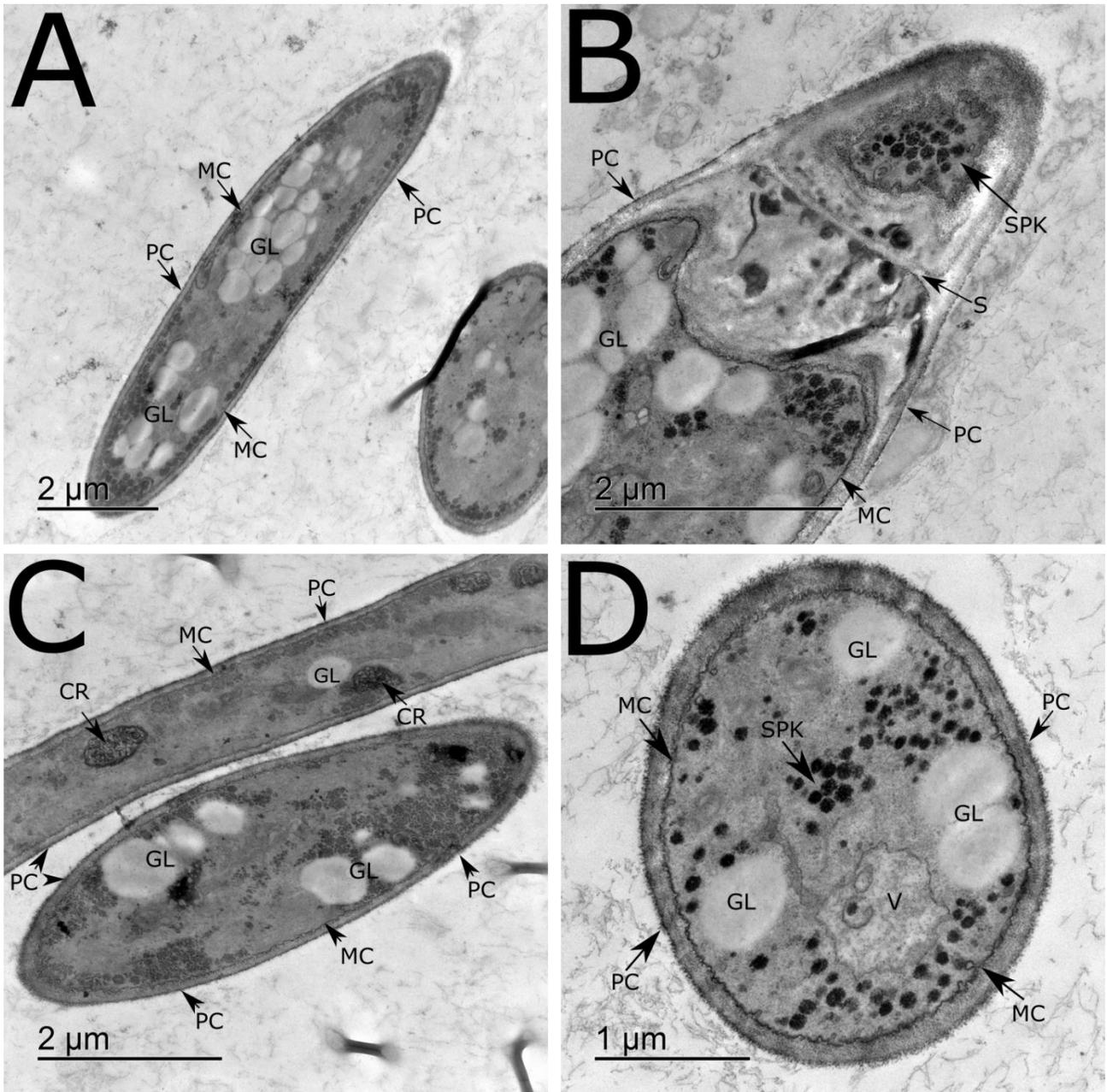


Figura 10. Electromicrografía de Microscopía Electrónica de Transmisión en secciones de cepa silvestre *Fusarium sp.* (WT) **A)** Ultraestructura de estructura vegetativa, **B)** Ultraestructura de estructura vegetativa, **C)** Ultraestructura vegetativa, **D)** Ultraestructura Vegetativa. **MC:** Membrana celular, **PC:** Pared celular, **S:** Septo, **GL:** Gotas de lípidicas **V:** Vacuola, **SPK:** Vesículas de Spitzenkörper.

6 DISCUSIÓN

A través de la metodología utilizada para este trabajo se logró obtener micrografías de barrido tanto de la cepa mutante Δsp como de la cepa WT *Fusarium sp* (INECOL-BM-06). Trabajos previos han reportado diversas metodologías para la preparación de material biológico para Microscopía Electrónica de Barrido SEM y en particular para el procesamiento de hongos filamentosos (Baffoni *et al.*, 2015; Guerra *et al.*, 2016; Borah *et al.*, 2016; Pariona *et al.*, 2019); sin embargo, las metodologías empleadas consideran diferentes especies de hongos así como diferentes tratamientos, por lo que cada trabajo presenta variaciones mínimas de acuerdo a la pregunta que cada autor abordara. Por esta razón fue necesario establecer un flujo de trabajo específico para el presente proyecto y en que se tomaran en cuenta todos los posibles factores de variación para cada etapa del procesamiento como fijación, deshidratación, secado por punto crítico y recubrimiento. Lo anterior con la intención de obtener muestras biológicas bajo los más altos estándares de calidad y con la integridad necesaria para evaluar en SEM de la cepa mutante Δsp , y la cepa WT *Fusarium sp* INECOL-BM-06. Se generaron micrografías mediante SEM con excelente calidad, por lo que se concluye que la metodología ejecutada en este trabajo es eficiente para hongos filamentosos provenientes de un complejo ambrosial.

Por otro lado, este trabajo se concentró en describir la morfología comparativa de la cepa mutante Δsp por medio de SEM como respuesta a la mutación de SP, empleando como control la cepa silvestre *Fusarium sp* (INECOL-BM-06). Las micrografías obtenidas en SEM revelaron y confirmaron cambios significativos en la arquitectura morfológica de la cepa mutante Δsp , entre las que destacan una masa micelial colapsada y conformada por hifas amorfas de textura corrugada; esta textura también pudo observarse en las estructuras reproductivas (microconidios) (Fig. 9B, D, F, H, J). En contraste, en la cepa silvestre de *Fusarium sp*. INECOL-BM-06 se observó una masa micelial conformada por hifas de estructura cilíndrica, lisa y septada, y con microconidios de forma ovalada, aseptados y sin presentar daños evidentes en la arquitectura de su superficie (Fig.9A, C, E, G, I). Dichos resultados sugieren cautelosamente que la mutación de la familia génica de las SP afecta el desarrollo estructural de la cepa mutante Δsp , causando profundas consecuencias en la pared celular tanto de estructuras vegetativas (hifas) como de estructuras reproductivas

(microconidios). Se sabe que la familia de las SP juega un papel fundamental en la fisiología fúngica, en particular para llevar a cabo actividades metabólicas asociadas al desarrollo y proliferación (crecimiento vegetativo y conidiación) (Kalisz., 1988; Monod *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004; Yike., 2011; Muszewska *et al.*, 2017; da Silva., 2018; Sánchez-Rangel *et al.*, 2018;). Además, las SP extracelulares se encuentran fuertemente involucradas en actividades proteolíticas asociadas a la degradación, como en el caso de la S1 (quimotripsina), S8 (subtilisina), S9 (prolil oligopeptidasa) y S10 (carboxipeptidasa Y), de las cuales S1 y S8 son parte fundamental para el desarrollo de la patogenicidad (Monod *et al.*, 2002; Muszewska *et al.*, 2017). Por lo tanto, es de esperarse que la mutación de las SP pueda provocar directamente el cambio en la arquitectura de la pared celular como en su crecimiento. Es importante resaltar que no fue posible identificar macroconidios ni clamidosporas en nuestros análisis, por lo que sugerimos que en estudios futuros se empleen distintos medios de cultivo y prolongar el tiempo de incubación, con el propósito de lograr observar las estructuras mencionadas.

De igual forma se realizó el establecimiento de un protocolo para análisis de la ultraestructura de un hongo filamentoso proveniente de un complejo ambrosial mediante Microscopía Electrónica de Transmisión TEM. La composición natural de la pared celular (quitina y glucanos) este tipo de material biológico requiere etapas específicas que facilite por un lado la penetración de los agentes químicos y por otro el conservar la ultraestructura de la célula. Trabajos similares han desarrollado técnicas para el procesamiento de hongos, como Wright (2000) en el cual sugiere metodologías para el procesamiento de levaduras; por su parte Frankl *et al.* (2015) llevaron a cabo una revisión de diversas técnicas para TEM aplicadas a levaduras y en la cual sugirieron algunas adecuaciones para su uso en hongos filamentosos. De igual forma, otros trabajos han demostrado que las metodologías para TEM han resultado ser exitosas para el procesamiento químico y la conservación de la ultraestructura en hongos filamentosos (Sjöstrand., 1967; Bozzola., 1999; Folch-Mallol *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2019). Estos trabajos se emplearon como base para determinar cuál es el procesamiento más eficiente y eficaz para las muestras del presente estudio, cuya estandarización arrojó buenos resultados, logrando electromicrografías de ultraestructura fúngica sin alteraciones evidentes por el procesamiento químico de la cepa *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) (Fig. 10A-D). En los análisis de la ultraestructura se observa

una pared celular electrodensa, así como una membrana celular bien definida, por lo que podemos deducir que la fijación con aldehídos seguido de OsO₄ como postfijador, contribuyo favorablemente a la estabilización las bicapas lipídicas. La infiltración con la resina Spurr arrojó también buenos resultados al permitir una reticulación estable, dotando a la preparación de la muestra de una firmeza adecuada para ultramicrotoma y su posterior análisis en el microscopio. Así mismo, a través de las electromicrografías evaluadas fue posible determinar la conservación de ciertos componentes celulares como la vacuola, cuerpos residuales y vesículas asociadas al SPK, aunque se sugiere seguir explorando el bloque con el objetivo de localizar otros componentes celulares importantes como núcleo, nucleolo, mitocondrias, aparato de Golgi y Retículo endoplásmico. Así mismo, también se sugiere la exploración del material procesado de la cepa mutante Δsp , con el objetivo de realizar el análisis ultraestructural de dicha mutante y evaluar los posibles cambios ultraestructurales derivados de la mutación de las SP.

Finalmente, los datos reportados constituyen una base fundamentada en lo teórico-práctico que facilitara el estudio de la ultraestructura en futuros trabajos en hongos filamentosos provenientes de un complejo ambrosial. Cabe mencionar que este es el primer acercamiento morfológico y ultraestructural mediante Microscopía Electrónica de un hongo asociado a un complejo ambrosial en México (*Fusarium sp* - *Xylosandrus morigerus*). Además, es importante resaltar que este trabajo proporcionara valiosa información complementaria a la caracterización de la cepa mutante Δsp asociado a un hongo ambrosial.

7 CONCLUSIONES

-Se lograron obtener y procesar las muestras tanto la cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) como de la cepa mutante Δsp para su observación y análisis en el Microscopio Electrónico de Barrido. Las micrografías obtenidas reflejan el adecuado manejo en el proceso del material biológico (fijación, deshidratación, desecación y montaje).

-El análisis comparativo por medio de Microscopía Electrónica de Barrido de la cepa mutante (Δsp) y de la cepa silvestre *Fusarium sp.* (INECOL-BM-06) confirman cambios a nivel estructural en la pared celular de la masa micelial (hifas) y en las estructuras reproductivas (microconidios) de la cepa mutante (Δsp).

-Se estableció un protocolo para el análisis ultraestructural del hongo *Fusarium sp.* (INECOL-BM-6) a través de Microscopía Electrónica de Transmisión. Los resultados de las electromicrografías reflejan una buena preservación de la ultraestructura celular y de algunos componentes subcelulares. Los cortes analizados mediante TEM indican que el material biológico se manipuló de manera adecuada ya que las electromicrografías no muestran alteraciones ocasionadas por los procesos de fijación, deshidratación e inclusión; tampoco se encontraron precipitados generados por el uso de contrastantes, ni son evidentes mellas y vibraciones.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology 5th Edition: Elsevier Academic Press. *Burlington, Ma. USA*, 79-103.
- Andersen, H. F., Jordal, B. H., Kambestad, M., & Kirkendall, L. R. (2012). Improbable but true: the invasive inbreeding ambrosia beetle *Xylosandrus morigerus* has generalist genotypes. *Ecology and Evolution*, 2(1), 247-257.
- Arenas Guzman, R. (2003). *Micología: médica ilustrada*. 30-50 p.
- Baffoni, L., Gaggia, F., Dalanaj, N., Prodi, A., Nipoti, P., Pisi, A., ... & Di Gioia, D. (2015). Microbial inoculants for the biocontrol of *Fusarium* spp. in durum wheat. *BMC microbiology*, 15(1), 242.
- Bauer, C., Herzog, V., & Bauer, M. F. (2001). Improved technique for electron microscope visualization of yeast membrane structure. *Microscopy and Microanalysis*, 7(6), 530-534.
- Barrera, J. F. (2002). El Taladrador de las Ramas del café Robusta: La otra Broca del café. *El Colegio de la Frontera Sur (Ed.), Tres plagas del café en Chiapas*, 81-84.
- Boland, J. M., & Woodward, D. L. (2019). Impacts of the invasive shot hole borer (*Euwallacea kuroshio*) are linked to sewage pollution in southern California: the Enriched Tree Hypothesis. *PeerJ*, 7, e6812 <https://doi.org/10.7717/peerj.6812>.
- Boland, J. M. (2016). The impact of an invasive ambrosia beetle on the riparian habitats of the Tijuana River Valley, California. *PeerJ*, 4, e2141.
- Borah, S. N., Goswami, D., Sarma, H. K., Cameotra, S. S., & Deka, S. (2016). Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize. *Frontiers in microbiology*, 7, 1505.
- Bowes, J. H., & Cater, C. W. (1966). The reaction of glutaraldehyde with proteins and other biological materials. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 85(2), 193-200.
- Bozzola, J. J., & Russell, L. D. (1999). *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Learning.
- CABI. (2019). Invasive Species Compendium. Technical Factsheet: *Xylosandrus morigerus* (brown twig beetle). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/57238>

- Carrillo, J. D., Mayorquin, J. S., Stajich, J. E., & Eskalen, A. (2020). Probe-Based Multiplex Real-Time PCR as a Diagnostic Tool to Distinguish Distinct Fungal Symbionts Associated With *Euwallacea kuroshio* and *Euwallacea whitfordiodendrus* in California. *Plant Disease*, *104*(1), 227-238, <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0201-RE>.
- Contreras, E. V., González, M. V. V., & México, D. F. (2015). Modelación Molecular en Sistemas Biológicos.
- da Silva, R. R. (2018). Commentary: Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Frontiers in microbiology*, *9*, 467.
- De la Cruz-Martínez, F., Nápoles, J. R., Martínez, A. E., Buenfil, J. A. L., & Huerta, B. T. (2020). Micangio Mesonotal del escarabajo ambrosial *xylosandrus curtulus* (eichhoff, 1869) (curculionidae: scolytinae) en Ziracuaretiro, Michoacán, México. *folia entomológica mexicana (nueva serie)*, *6*(2), 19-26.
- Dodge, C., Coolidge, J., Cooperband, M., Cossé, A., Carrillo, D., & Stouthamer, R. (2017). Quercivorol as a lure for the polyphagous and Kuroshio shot hole borers, *Euwallacea spp. nr. fornicatus* (Coleoptera: Scolytinae), vectors of *Fusarium dieback*. *PeerJ*, *5*, e3656.
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant pathogenic fungi. *The fungal kingdom*, 701-726.
- Eatough Jones, M., Kabashima, J., Eskalen, A., Dimson, M., Mayorquin, J. S., Carrillo, J. D., ... & Paine, T. D. (2017). Evaluations of insecticides and fungicides for reducing attack rates of a new invasive ambrosia beetle (*Euwallacea sp.*, Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in infested landscape trees in California. *Journal of economic entomology*, *110*(4), 1611-1618, <https://doi.org/10.1093/jee/tox163>
- Echlin, P. (2011). *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer Science & Business Media, 152-159p.
- Eskalen, A., Gonzalez, A., Wang, D. H., Twizeyimana, M., Mayorquin, J. S., & Lynch, S. C. (2012). First report of a *Fusarium sp.* and its vector tea shot hole borer (*Euwallacea fornicatus*) causing *Fusarium dieback* on avocado in California. *Plant Disease*, *96*(7), 1070-1070.

- Eskalen, A., Kabashima, J., & Dimson, M. (2014). Polyphagous Shot Hole Borer+ Fusarium Dieback Field Identification Guide. *University of California. Agricultura and Natural Resources, California, United Estates.*
- Eskalen, A., & Stouthamer, R. (2012). Fungus disease complex threatens avocado production. *From the Grove, 2*, 8-10.
- Eskalen, A., Stouthamer, R., Lynch, S. C., Rugman-Jones, P. F., Twizeyimana, M., Gonzalez, A., & Thibault, T. (2013). Host range of *Fusarium* dieback and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytinae) vector in southern California. *Plant Disease, 97*(7), 938-951.
- Estrada Salazar, G. I., & Ramírez Galeano, M. C. (2019). *Micología general.*
- Folch-Mallol, J. L., Martínez, L. M., Casas, S. J., Yang, R., Martínez-Anaya, C., Lopez, L., ... & Nieto-Sotelo, J. (2004). New roles for CDC25 in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology, 150*(9), 2865-2879.
- Frankl, A., Mari, M., & Reggiori, F. (2015). Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell, 2*(11), 412.
- Gammie, A. E. (2008). Ultrastructural Analysis of Cell Fusion in Yeast. In *Cell Fusion* (pp. 197-211). Humana Press.
- García-Avila, C. D. J., Trujillo-Arriaga, F. J., López-Buenfil, J. A., González-Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L. F., ... & Acevedo-Reyes, N. (2016). First report of *Euwallacea* nr. *forficatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist, 99*(3), 555-556.
- García, A. V., Martínez, G. S., & Torres, A. E. (2002). Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica, 73*(1), 1-15.
- García-Guevara, J. F., de Jesús García-Ávila, C., Acevedo-Reyes, N., & Vergara-Pineda, S. (2018). Escarabajos (Curculionidae: Scolytinae) asociados a trampas en huertos de *Persea americana* Miller, 1768 en cuatro municipios de Michoacán. *Entomología Agrícola, 5*, 408-414.

- Giraldo, M., Benavides, P., & Constantino, L. (2015). *Conozca al pasador de las ramas del café: Un insecto plaga ocasional en Colombia*. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- González, L. M., Flores, F. G., García, B. M. S., Rivera, S. G., Vázquez, F. P. G., Gallegos, J. A. A., ... & Elos, M. M. (2005). Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 1-7.
- Gomez, D. F., Skelton, J., Steininger, M. S., Stouthamer, R., Rugman-Jones, P., Sittichaya, W., ... & Hulcr, J. (2018). Species delineation within the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae) complex revealed by morphometric and phylogenetic analyses. *Insect Systematics and Diversity*, 2(6), 2.
- Guerra, S., & Debut, A. (2012). Comparación entre cuatro protocolos para la preparación de muestras de referencia usando el Microscopio Electrónico de Barrido. *Ciencia y Tecnología*, ISSN, 1390-4663.
- Guzmán, M. D. P. R. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, (Es1), 53-78.
- Han, Y., Zhao, J., Zhang, B., Shen, Q., Shang, Q., & Li, P. (2019). Effect of a novel antifungal peptide P852 on cell morphology and membrane permeability of *Fusarium oxysporum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1861(2), 532-539.
- Herrera, T., & Ulloa, M. (2013). *Micología Básica y Aplicada*. T. Herrera, & M. Ulloa, *Reino de los Hongos. SL Fondo De La Cultura Económica De España*.
- Hu, G., & Leger, R. S. (2004). A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *Journal of evolutionary biology*, 17(6), 1204-1214.
- Kabashima, J., and Dimson, M. (2014). The Polyphagous Shot Hole Borer: A New Tree Pest in Southern California. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. UCNFA News.
- Kalisz, H. M. (1988). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. ed. Fiechter A, Springer, Berlin, 1-65.
- Klepzig, K. D., & Six, D. L. (2004). Bark beetle-fungal symbiosis: context dependency in complex associations. *Symbiosis*.

- Koeck, M., Hardham, A. R., & Dodds, P. N. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular microbiology*, 13(12), 1849-1857.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons. 113-150 p.
- Leyva-Mir, S. G., Vega-Portillo, H. E., Villaseñor-Mir, H. E., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., & Tovar-Pedraza, J. M. (2017). caracterización de especies de *Fusarium* Causantes de pudrición de raíz del trigo en el bajío, México. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 33(2), 142-151.
- Lynch, S. C., Twizeyimana, M., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Na, F., Kayim, M., ... & Hulcr, J. (2016). Identification, pathogenicity and abundance of *Paracremonium pembeum* sp. nov. and *Graphium euwallaceae* sp. nov.—two newly discovered mycangial associates of the polyphagous shot hole borer (*Euwallacea* sp.) in California. *Mycologia*, 108(2), 313-329.
- Martínez-Fernández, E., Martínez-Jaimes, P., Guillén Sánchez, D., Peña-Chora, G., & Hernández-Hernández, V. M. (2015). Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista mexicana de micología*, 42, 33-43.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J. Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S., Barnes, I., ... & De Beer, Z. W. (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in mycology*, 86, 99-216.
- Marzluf, G. A. (1981). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiological Reviews*, 45(3), 437.
- Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., & Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(5-6), 405-419.
- Monzón, A., & Rodríguez, J. L. (2000). Infecciones causadas por el género *Fusarium*. *Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda*.

- Muszewska, A., Stepniewska-Dziubinska, M. M., Steczkiewicz, K., Pawlowska, J., Dziedzic, A., & Ginalski, K. (2017). Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Na, F., Carrillo, J. D., Mayorquin, J. S., Ndinga-Muniania, C., Stajich, J. E., Stouthamer, R., ... & Eskalen, A. (2018). Two novel fungal symbionts *Fusarium kuroshium* sp. nov. and *Graphium kuroshium* sp. nov. of *Kuroshio* shot hole borer (*Euwallacea* sp. nr. *forficatus*) cause *Fusarium* dieback on woody host species in California. *Plant disease*, 102(6), 1154-1164.
- Nin, G. V. (2000). *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. UNAM.
- Pariona, N., Mtz-Enriquez, A. I., Sánchez-Rangel, D., Carrión, G., Paraguay-Delgado, F., & Rosas-Saito, G. (2019). Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant pathogens. *RSC advances*, 9(33), 18835-18843.
- Perez-De La Cruz, M., Equihua-Martinez, A., Romero-Napoles, J., Sanchez-Soto, S., & Garcia-Lopez, E. (2009). Diversity, dynamic population and host plants of bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Curculionidae) associated to the cocoa agroecosystem in Tabasco, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80(3), 779-791.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82.
- Reid, L. M., Hamilton, R. I., & Mather, D. E. (1996). *Screening maize for resistance to Gibberella ear rot*. Agriculture & Agri-Food Canada, Research Branch, Eastern Cereal & Oilseed Research Centre.
- Sánchez-Rangel, D., Hernández-Domínguez, E. E., Pérez-Torres, C. A., Ortiz-Castro, R., Villafán, E., Rodríguez-Haas, B., ... & Ibarra-Laclette, E. (2018). Environmental pH modulates transcriptomic responses in the fungus *Fusarium* sp. associated with KSHB *Euwallacea* sp. near *forficatus*. *BMC genomics*, 19(1), 721. 19, 721. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5083-1>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2020, febrero). *Boletín mensual de avance de la producción de aguacate*. Recuperado de

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/539271/Avance_producci3n_de_Aguacate_Enero_2020.pdf.

- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria –SENASICA 2019. *Ficha t3cnica No. 62*. Complejo Escarabajo barrenador Pol3fago (*Euwallacea* sp.-*Fusarium euwallaceae*) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Aviso p3blico del riesgo y situaci3n actual.
- Sjöstrand, F. S. (1967). *Electron Microscopy of Cells and Tissues: Instrumentation and Techniques* (Vol. 1). Academic Press. 151-155p.
- Skelton, J., Johnson, A. J., Jusino, M. A., Bateman, C. C., Li, Y., & Hulcr, J. (2019). A selective fungal transport organ (mycangium) maintains coarse phylogenetic congruence between fungus-farming ambrosia beetles and their symbionts. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1894), 20182127.
- Soto, A., Orengo, L., & Estrela, A. (2002). Estudio de poblaciones de insectos escol3tidos (Coleoptera: Scolytidae) en las masas de *Pinus halepensis* Miller del Parque Natural del Montgó (Alicante). *Bolet3n de sanidad vegetal. Plagas*, 28, 445-456.
- Torres, K. C. (1989). Specimen preparation for scanning electron microscopy. In *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops* (pp. 225-233). Springer, Boston, MA.
- Umeda, C., Eskalen, A., & Paine, T. D. (2016). Polyphagous shot hole borer and *Fusarium* dieback in California. In *Insects and diseases of Mediterranean forest systems* (pp. 757-767). Springer, Cham.
- Villa-Mart3nez, A., P3rez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Mart3nez-Escudero, E. (2015). Current situation of *Fusarium* spp in the control and evaluation of the antifungal activity on vegetables extracts. *Acta Agron3mica*, 64(2), 194-205.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.
- Williams, D. B., Carter, C. B., & Microscopy, C. T. E. (2009). A textbook for Materials Science. Transmission Electron Microscope.
- Wright, R. (2000). Transmission electron microscopy of yeast. *Microscopy research and technique*, 51(6), 496-510.

- Yan, F., Xu, S., Guo, J., Chen, Q., Meng, Q., & Zheng, X. (2015). Biocontrol of post-harvest *Alternaria alternata* decay of cherry tomatoes with rhamnolipids and possible mechanisms of action. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1469-1474.
- Yike, I. (2011). Fungal proteases and their pathophysiological effects. *Mycopathologia*, 171(5), 299-323.
- Zhang, B., Dong, C., Shang, Q., Han, Y., & Li, P. (2013). New insights into membrane-active action in plasma membrane of fungal hyphae by the lipopeptide antibiotic bacillomycin L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(9), 2230-2237.
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., ... & Nayak S, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS microbiology reviews*, 40(2), 182-207.