

**M. en C. Ileri
Alejandra Carbajal
Valenzuela**

**Efecto de la aplicación de eADN propio como DAMP de
Solanum lycopersicum en interacción con *Fusarium
oxysporum* f. sp. *lycopersici***

2024



**Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad de Ingeniería**

**Efecto de la aplicación de eADN propio como DAMP
de *Solanum lycopersicum* en interacción con *Fusarium
oxysporum* f. sp. *lycopersici***

Tesis

**Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas**

Presenta

M. en C. Ileri Alejandra Carbajal Valenzuela

Dirige:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

El Marqués, Qro. A XX de Noviembre de 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Efecto de la aplicación de eADN propio como DAMP de
Solanum lycopersicum en interacción con *Fusarium*
oxysporum f. sp. *lycopersici*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ingeniería de Biosistemas

Presenta

M en C. Ileri Alejandra Carbajal Valenzuela

Dirige:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Dr. Mario Martín González Chavira

Secretario

Dr. Irineo Torres Pacheco

Vocal

Dra. Ana Angélica Peregrino Pérez

Suplente

Dr. Enrique Rico García

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario

Dedicatoria

Le dedico esta tesis a la Ileri del pasado que nunca dudó en elegir su camino libremente ni de su capacidad para conseguir lo que quería siempre teniendo en alto sus convicciones y prioridades.

Agradecimientos

Al CONAHCYT por otorgarme la oportunidad de seguir estudiando en mi contexto socioeconómico.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por recibirme de regreso y ser mi casa de estudios por segunda ocasión.

A mi comité tutorial por cada examen en que guiaron mi camino académico

Al doctor Ramón Guevara por estar disponible siempre, por enseñarme tantas cosas y por ser el investigador que es, logró motivarme gran parte del camino y lo seguirá haciendo.

A mis padres por forjar el camino en el cual llegaría a ser quien soy ahora, por reforzar la importancia de ser independiente, y guiarme con libertad y amor.

A mis hermanas por escucharme y acompañarme y ser el mejor modelo a seguir para siempre.

Al chen por ser mi fiel compañero en una tesis más.

A Adrian por venir y completar mi mejor versión.

Índice general

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iii
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	vii
Resumen	ix
Abstract	x
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Sistema inmune innato vegetal	3
2.2 Redes de señalización mediadas por ácido salicílico	5
2.3 Redes de señalización mediadas por ácido jasmónico	6
2.4 Uso de PAMPs y DAMPs en el manejo integrado de enfermedades ...	7
2.5 ADN exógeno propio como DAMP	9
III. Planteamiento del problema	10
IV. Justificación	11
V. Hipótesis	14
VI. Objetivos	14
6.1 Objetivo general	14
6.2 Objetivos específicos	14
VII. Materiales y métodos	15
7.1 Material biológico	15
7.2 Extracción de ADN	15
7.3 Cinética de efecto de ADN propio en marcadores inmunes de la planta	16
Establecimiento del cultivo y diseño experimental.....	16
Variables de activación de sistema inmune vegetal	19
Análisis de datos y estadísticos.....	21
7.4 Efecto de ADN propio en cultivo de jitomate inoculado con <i>Fusarium oxysporum</i>	22
Establecimiento del cultivo y diseño experimental.....	22

Evaluación de severidad de la infección.....	24
Evaluación de variables morfológicas	24
Evaluación de variables enzimáticas.....	25
Evaluación de expresión génica	25
Análisis estadístico	26
7.5 Efecto de ADN propio en variables productivas del cultivo de jitomate	27
Establecimiento del cultivo y diseño experimental.....	27
Evaluación de variables morfológicas	29
Evaluación de variables enzimáticas.....	29
Evaluación de rendimiento	29
Análisis estadísticos	30
VIII. Resultados	31
8.1 Extracción de ADN	31
8.2 Cinética de efecto de ADN propio en marcadores inmunes de la planta	32
Variables de activación del sistema inmune vegetal	32
8.3 Efecto de ADN propio en cultivo de jitomate inoculado con <i>Fusarium oxysporum</i>	36
Variables morfológicas	36
Activación de marcadores de inmunidad.....	40
Evaluación de la expresión genética	42
8.4 Efecto de ADN propio en variables productivas del cultivo de jitomate	43
Variables morfológicas y biomasa	44
Variables de rendimiento.....	44
Variables de calidad del fruto	44
IX. Discusión	49
X. Conclusiones	52
XI. Bibliografía	52

Índice de tablas

Tabla 1. Estudios de elicitores del sistema inmune vegetal.....	8
Tabla 2. Diseño de tratamientos en cinética de respuesta inmune.	18
Tabla 3. Tratamientos aplicados a plantas de jitomate.....	24
Tabla 4. valores de calidad de ADN extraído	31
Tabla 5. Valores de marcadores de inmunidad en plantas de jitomate	33

Índice de figuras

Figura 1. Cultivo de cinética de efecto de eADN propio	17
Figura 2. Esquema temporal de la cinética de efecto ADN en plantas de jitomate.	19
Figura 3. Cultivo de jitomate en invernadero establecido para evaluación de severidad en un diseño de bloques al azar.....	23
Figura 4. Ensayo de cultivo de jitomate y evaluación de variables productivas cultivo de jitomate	28
Figura 5. Medición de texturometría en jitomates cosechados del experimento	30
Figura 6. Medición de texturometría en jitomates cosechados del experimento con diferentes metodologías.....	31
Figura 7. Modelo del comportamiento de variables de activación del sistema inmune vegetal.....	35
Figura 8. Valores obtenidos en las variables morfológicas (a, b y c) y de severidad (d) de las plantas evaluadas	38
Figura 9. Fotografías representativas del estado de las plantas en cada grupo evaluado	39
Figura 10. Valores obtenidos en las actividades enzimáticas y bioquímicas de las plantas evaluadas	41
Figura 11. Expresión diferencial de los genes	43
Figura 12. Resultados de variables morfológicas y desarrollo de biomasa en plantas evaluadas.	46
Figura 13. Variables de rendimiento del cultivo	47
Figura 14. Variables de calidad del fruto	48

Abreviaturas y siglas

CAT: catalasa

COI1: coronatine insensitive 1

DAMPS: damage associated molecular pattern

DDA: días después de la aplicación

DDSA: días después de la segunda aplicación

eADN: AND extracelular

EE: extracto enzimático

EROs: especies reactivas de oxígeno

ET: etileno

F. oxysporum: *Fusarium oxysporum*

f. sp.: forma specialis

FEN: fenoles

FLAV: flavonoides

Fol: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

HDA: horas después de la aplicación

HDSA: horas después de la segunda aplicación

JA: ácido jasmónico

JA-Ile: isoleucine conjugada a ácido jasmónico

JAZ: jasmonate zim protein

MeJA: metil jasmonato

MAPK: mitogen activated protein kinase

NPR1: natriuretic peptide receptor

PAL: fenilalanino amonio liasa

PAMPs: pathogen associated molecular pattern

PTI: PAMPs triggered immunity

PR: proteínas relacionadas con la patogenicidad

SA: ácido salicílico

SAR: Systemic, acquired resistance

SOD: superóxido dismutasa

Resumen

Con el fin de manejar importantes enfermedades vegetales como la marchitez de *Solanum lycopersicum* por *Fusarium oxysporum*, mientras se reduce la aplicación de productos agroquímicos cuyos efectos adversos al ambiente y salud humana son cada vez más conocidos se ha explorado la aplicación de moléculas biológicas cuya presencia alerta a las plantas de un peligro potencial cercano. En este contexto se ha identificado la capacidad de las plantas para sensar la presencia de moléculas de ADN propio fragmentado en el ambiente, una vez sentido, el ADN desencadena una serie de señales que terminan por activar diferentes mecanismos de inmunidad tales como una explosión oxidativa, reprogramación de expresión génica y la producción de metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides. En este trabajo se propone dar un paso adelante en la propuesta de utilizar al ADN propio como un tratamiento agrícola efectivo para elicitar el sistema inmune vegetal, con este fin, se desarrolló una técnica de baja especialización para extraer y fragmentar grandes cantidades de ADN fragmentado a partir de tejido de poda vegetal y se evaluó la cinética de respuesta al ADN propio de marcadores inmunes bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y moleculares. Asimismo, se evaluó la efectividad del tratamiento frente a una infección de *Fusarium oxysporum* monitoreando variables de severidad y fisiológicas de la planta. Por último, se evaluaron variables agrícolas importantes como respuesta al tratamiento. Se confirmó a la aplicación de ADN propio como un tratamiento elicitor del sistema inmune del cultivo de jitomate que no afecta a las variables agronómicas con bajo costo ambiental y de salud humana y un efectivo tratamiento protector frente a infecciones de *Fusarium oxysporum*.

Abstract

Aiming to reduce the application of agrochemical products with negative health and environmental claims on vegetal cultures such as pesticides and fungicides, researchers explore the application of biological molecules whose presence would alert de vegetal cells about a close potential danger. In this context, the hability of plants to sense and discern their self DNA has been addressed. Once the plant had sensed the DNA, multiple signals are displayed inside the cell until defense mechanisms are being activated such as the oxidative burst, genetic expression reprogramming and secondary metabolites synthesis. In this work, we propose to go one step further into applying self DNA as an effective, sustainable and viable agriculture treatment. To this end, using *Solanum lycopersicum* as the study model, a low specialization technique had been developed to obtain large quantities of fragmented DNA from pruned vegetable tissues, the immune responses kinetics have been elucidated in order to determine a suitable time of application and the effectivity of the treatment have been evaluated in terms of severity of a *Fusarium oxysporum* infection and the most important agronomical variables. All these were monitored through molecular, biochemical, physiological and morphological variables. The treatment had been confirmed as an efficient immune elicitor to tomato plants, an efficient protector treatment in front of *Fusarium oxysporum* infection and without affecting agronomical variables in the plants.

I. Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea y perenne perteneciente a la familia *Solanaceae*, tiene origen en América del sur y como centro de domesticación a México, debido a la gran diversidad de variedades comerciales presentes (Saavedra et al., 2017; SINAVIMO, 2010). Su fruto es altamente consumido por su versatilidad de uso y aportes nutrimentales, ya que es rico en minerales, vitaminas, aminoácidos esenciales y contiene grandes cantidades de licopeno: un antioxidante con grandes beneficios a la salud (Naika et al., 2005).

Un patógeno importante del jitomate es *Fusarium oxysporum*, una especie de hongos filamentosos y ascomicetos, cosmopolita y ubicuo del suelo. Incluye mayoritariamente hongos fitopatógenos productores de toxinas de importancia agrícola (Ma et al., 2013). Estos hongos desarrollan estrechas relaciones con su hospedero y generalmente cada cepa de *F. oxysporum* presenta un elevado grado de especificidad a un corto rango de hospederos. Los aislados que son patogénicos al mismo hospedero son agrupados en la misma *forma specialis* (f. sp.) (Ma et al., 2013; Gordon, 2017).

Una de las *formae speciales* mayor estudiada ha sido *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*). Esta cepa cuenta con la presencia de genes específicos que le confieren la especificidad de virulencia sobre el jitomate (Ma et al., 2010). Se ha descrito como la principal razón de especialización de esta cepa a la alta presión de selección ejercida en los cultivos de jitomate (Srinivas et al., 2019). A su vez, *Fol* desencadena mecanismos de defensa en la planta del jitomate mediante el reconocimiento de elicitores.

Los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) son moléculas endógenas derivadas de la planta hospedera resultantes de la acción de un patógeno que las

células vegetales reconocen como señales de daño (Henry et al., 2012). La percepción de estas señales desencadena una serie de reacciones que culminan en la activación de la resistencia basal de las plantas o PTI y más adelante en resistencia sistémica adquirida (SAR) que confiere a la planta resistencia potenciada contra un amplio espectro de patógenos (Durrant & Dong, 2004).

El ADN es una macromolécula biológica que contiene y transmite la información necesaria para la producción de todas las proteínas en una célula en unidades de información llamadas genes. El término ADN extracelular (eADN) es empleado colectivamente para las moléculas de ADN extracelular (Duran-Flores & Heil, 2018), es decir, se refiere a la molécula cuando se encuentra fuera de la célula. El eADN ha presentado función de DAMP ya que la manera más común en que se produce el eADN es mediante daño a los tejidos de la planta, de esta forma, la presencia de eADN es una señal directa de daño. Se llama eADN propio a las moléculas del eADN percibidas por el organismo de donde se originaron. Las plantas han desarrollado complejos mecanismos para identificar moléculas propias, entre ellas el eADN, pues estas son un indicador de daño en sus propios tejidos (Heil, 2009).

Se han registrado algunas respuestas biológicas en plantas hacia la presencia de eADN propio que sugieren su actividad como DAMP (Duran-Flores & Heil, 2018; Vega-Muñoz et al., 2018). Estas respuestas biológicas podrían ser de utilidad en actividades agrícolas, de igual forma que tendría grandes beneficios al cultivo, ya que han presentado alta especificidad, alta eficiencia y sugieren bajos costos económicos, ecológicos y ambientales.

En este trabajo se explora la viabilidad del uso de eADN propio como DAMP en el cultivo de jitomate con el fin de reducir la severidad de marchitez vascular causado por *Fol*.

II. Antecedentes

2.1 Sistema inmune innato vegetal

El éxito de todo organismo vivo, sin importar el grupo taxonómico al que pertenece, reside en gran medida en su capacidad de sensar y analizar información acerca del ambiente que los rodea. Uno de los principales mecanismos biológicos que todo organismo debe llevar a cabo es el de defensa y todas las reacciones derivadas de ello (Matzinger, 2002; Duran-Flores y Heil, 2018).

Las plantas no cuentan con células de defensa móviles o con sistema inmune adaptativo, por lo que dependen del sistema inmune innato de cada célula y de señales sistémicas generadas en sitios de infección (Jones & Dangl, 2006).

Como es descrito en la revisión de Choi y Klessig (2016), el desarrollo de la inmunidad innata requirió de la evolución de receptores que detectaran estímulos externos relacionados con peligro para la planta y a su vez activaran sistemas de respuesta. Aunque estos estímulos pueden ser identificados como estrés en las plantas, existe otra clasificación descrita a continuación: si las respuestas al estímulo por parte de la planta son positivas (mayor crecimiento vegetal, rendimiento o biosíntesis de metabolitos) este efecto se denomina eustrés y los factores que lo generan eustresores, siendo estos de gran interés agrícola, por otro lado, cuando las respuestas son negativas (fitotoxicidad, menor crecimiento e incluso muerte vegetal), este puede considerarse distrés y los factores que lo generan distresores (Vázquez-Hernández et al., 2019). Comúnmente, el mismo factor puede comportarse como eustresor o distresor dependiendo solamente de la dosis con la que las plantas lo perciben, debido a un fenómeno de respuesta bifásica llamado hormesis (Godínez-mendoza et al., 2023).

Recientemente, se han denominado a los eustresores biológicos, como elicitores. Los elicitores pueden ser clasificados en elicitores generales, los cuales activan respuestas basales conservadas en la mayoría de especies vegetales por lo que están relacionadas con la resistencia general; y los elicitores específicos que provienen de cepas de patógenos especializados y funcionan solo en plantas que contienen genes de resistencia correspondientes y generan respuestas de mayor intensidad en las células (Montesano et al., 2003).

Por otro lado, los elicitores pueden ser clasificados como: PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) siendo moléculas altamente conservadas en los organismos de agentes infecciosos, por ejemplo: la flagelina, lipoproteínas, peptidoglicanos y polisacáridos bacterianos y quitina fúngica, entre otros descritos en diferentes revisiones (Henry et al., 2012; Choi & Klessig, 2016) o DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) siendo moléculas provenientes del mismo organismo que las detecta en una distribución o forma no fisiológica, lo cual señala su liberado al ambiente por causa de la acción de algún agente infeccioso (Henry et al., 2012). Algunos ejemplos de DAMPs que ya han sido identificados experimentalmente son: polipéptidos vegetales (Huffaker et al., 2006), sistemina (Narváez-Vásquez & Ryan, 2004), ATP extracelular (Choi y Klessig, 2016) y más recientemente reconocido, el ADN exógeno propio (Vega-Muñoz et al., 2018).

La presencia de elicitores es detectada por receptores reconocedores de patrones (PRRs) (Jones & Dangl, 2006). Una vez percibidos los elicitores activan diversas cascadas de señalización y juntas activan la llamada inmunidad activada por PAMPs (PTI). En general, la defensa PTI es considerada la menos eficiente en la defensa contra enfermedades vegetales, aun así, se ha observado que juega un papel significativo en la restricción de los patógenos y la resistencia a las enfermedades. La inducción de la inmunidad innata es ahora considerada un componente clave en el manejo integrado de enfermedades (Henry et al., 2012).

El efecto de PAMPs y DAMPs en el sistema inmune innato de las plantas comparten mecanismos moleculares, e incluso algunos inducen las mismas respuestas de

defensa como flujo de iones Ca^{2+} hacia el citosol, deposición de calosa, activación de cinasas de tipo MAPK y producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Choi y Klessig, 2016). Las respuestas de defensa son el resultado de la activación de ciertas rutas de señalización detalladas a continuación.

2.2 Redes de señalización mediadas por ácido salicílico

El ácido salicílico (SA) es una molécula pequeña fenólica y juega un importante rol en la defensa de las plantas. Uno de los mensajeros más importantes en la vía de acción de SA es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se ha propuesto que mediante el aumento de H_2O_2 y otros EROs, SA activa la expresión de proteínas relacionadas con patogenicidad (PR) (Klessig et al., 2000). Por otro lado, se ha observado que SA además de activar la síntesis de EROs, tiene la capacidad de unirse a varias catalasas y peroxidasas producidas por patógenos, de esta forma inhibe su actividad antioxidante, la cual, atenúa la respuesta de defensa vegetal por EROs. Otra forma en la que SA actúa en defensa de la planta es generando radicales libres mediante la pérdida de electrones, los radicales libres inician la peroxidación de lípidos, que a su vez induce expresión de proteínas PR (Klessig et al., 2000).

La acumulación de SA o su aplicación exógena en tejidos vegetales estimula la translocación de NPR1 hacia dentro del núcleo celular. NPR1 es una proteína de 65-kDa clave para la señalización río abajo de SA. Esta proteína contiene repeticiones de ankirina en su estructura, las cuales le permiten interactuar con otras proteínas identificadas como factores de transcripción de la familia TGA/OBF (Henry et al., 2012). Por lo anterior, se sugiere que estos factores de transcripción transducen las señales desde NPR1 hasta la activación de genes inducibles por SA, principalmente proteínas PR (Klessig et al., 2000; Henry et al., 2012).

Adicionalmente, se ha reportado un aumento del contenido de SA en zonas distales al inicio de la infección, lo que sugiere el inicio de la resistencia sistémica adquirida

(SAR) (Durrant & Dong, 2004). ISR provee a la planta protección de largo término contra diferentes tipos de patógenos.

En general, el rol de SA en la defensa de las plantas ha sido relacionado con respuestas de defensa contra patógenos biotróficos o hemi-biotróficos (Bari & Jones, 2009).

2.3 Redes de señalización mediadas por ácido jasmónico

El ácido jasmónico (JA) es un regulador de crecimiento endógeno encontrado en plantas superiores, este y metil ester (MeJA), así como su conjugado con isoleucina (JA-Ile) son derivados de una clase de ácidos grasos y son llamados colectivamente jasmonatos (JAs) (Ruan et al., 2019). La transmisión de corta y larga distancia de señales de JA en las plantas, ha sido relacionada con respuestas de defensa local, con resistencia adquirida sistémica, e incluso con respuestas inducidas sistémicas.

Se ha identificado un mecanismo de iniciación de la señalización de ácido jasmónico mediante la percepción de señales de estrés biótico o abiótico. Ejemplos anteriormente estudiados son la sistemina, una molécula liberada del tejido de jitomate por daño mecánico (Narváez-Vásquez & Ryan, 2004) y el polipéptido AtPEP1 (Huffaker et al., 2006; Yamaguchi et al., 2010). El proceso de unión al receptor en membrana es complejo, pero se sabe que un proceso importante es la activación de fosfolipasas en la membrana plasmática, de esta forma, las fosfolipasas actúan en la membrana para liberar ácido linoléico (un precursor de JA) a partir de los fosfolípidos (Ruan et al., 2019). Una vez liberado el ácido linoléico y hexadecano, estos son convertidos en ácido 12-oxo-fitodienólico o ácido vegetal diénico deoximetilado en el cloroplasto, después a JA en el peroxisoma y, por último, JA es metabolizado en sus diferentes estructuras finales en el citoplasma (Ruan et al., 2019).

Hasta ahora se sabe que señales de JA son transmitidas a larga distancia mediante los haces vasculares de la planta, induciendo en su camino la síntesis de más

jasmonatos (Koo et al., 2009). En cuanto al efecto de los jasmonatos en la regulación de transcripción génica, se ha identificado la activación de factores de transcripción MYC mediante la unión de JA-Ile al complejo proteínico COI1-JAZ (Sheard et al., 2010). Otros factores de transcripción relacionados en la señalización de JA son NAC, ERF y WRKY, estos regulan la expresión de múltiples genes relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas, especialmente las respuestas y adaptación al ambiente (Ruan et al., 2019).

Usualmente las vías de defensa de SA y JA/ET actúan de forma antagonista, así como se han reportado ocasiones donde interactúan entre sí. se ha sugerido que la activación de una u otra vía y la red de defensa resultante es dependiente de la naturaleza del patógeno y su modo de patogenicidad (Bari & Jones, 2009). Existen múltiples reguladores de estas vías, los factores de transcripción WRKY actúan como un regulador negativo de la defensa por JA, potenciando la defensa por SA, es decir hacia patógenos biótrosos o hemibiótrosos (Mao et al., 2007), por su parte, la cinasa MPK4 actúa como un regulador negativo para la vía de SA, favoreciendo la vía de señalización de JA/ET y de esta forma, la defensa contra organismos necrótrofos (Petersen et al., 2000).

2.4 Uso de PAMPs y DAMPs en el manejo integrado de enfermedades

Debido a las deficiencias de los sistemas agrícolas actuales frente a los nuevos retos de alimentación y nutrición que presenta la población actual y futura, algunos autores sugieren que la perspectiva de la agricultura requiere un cambio con énfasis en sustentabilidad (Vargas-Hernandez et al., 2017). Una herramienta que ha resultado muy útil para este propósito ha sido la aplicación de moléculas con función de DAMP o PAMP en los cultivos para elicitar el metabolismo secundario de las plantas.

La aplicación controlada de elicitors ha mostrado también, un efecto positivo en el contenido de compuestos bioactivos y como consecuencia una mejora en la

producción de cultivos (García-Mier et al., 2013). Actualmente contamos ya con múltiples ejemplos de elicitors del sistema inmune vegetal como los mostrados en la tabla 1. Para asegurar un efecto benéfico, es necesario identificar la curva de hormesis de cada elicitor. La hormesis es definida como una respuesta bifásica hacia un compuesto tóxico, que a bajas dosis induce un efecto benéfico y a dosis altas produce un efecto tóxico (Vargas-Hernandez et al., 2017).

Tabla 1. Estudios de elicitors del sistema inmune vegetal.			
Tejido elicitado	Elicitor	Efecto	Autores
Raíces de jitomate	Quitosano, ácido salicílico y mezcla de ambos	Incremento de resistencia a infecciones por nemátodos y mejor desarrollo vegetal	(Zinovieva et al., 2011).
Hojas de chile	peróxido de hidrógeno, ácido salicílico y quitosano	Aumento de producción de peróxido de hidrógeno, actividades de catalasa y fenilalanina amonio liasa y expresión génica de cat1, pal y pr1.	(Mejía-Teniente et al., 2013a)
Hojas de papaya	Quitosano	Reducción de síntomas de antracnosis	(Bautista-Baños et al., 2003)
Raíces y hojas de jitomate	Ácido salicílico	Incremento en la actividad de las enzimas PAL y peroxidasa y reducción de la severidad de la infección por Fol.	(Mandal et al., 2009a)
Semillas de jitomate	Ácido salicílico y polvo de hoja de <i>Amomum nilgricum</i>	Aumento de germinación, índice de vigor de plántulas y disminución de incidencia de pudrición por <i>Ralstonia solanacearum</i>	(Narasimhamurthy et al., 2019)

2.5 ADN exógeno propio como DAMP

Recientemente, se ha observado en numerosas investigaciones, que el eADN tiene una función como molécula de señalización biológica, ya que desencadena efectos relacionados con algunos sistemas de defensa al ser presentado en diferentes dosis a los organismos, como se describirá a continuación. Inicialmente, se describió un efecto de autotoxicidad en organismos de diversos grupos taxonómicos en presencia de eADN propio (Cartení et al., 2016; Ferrusquía-Jiménez et al., 2022; Mazzoleni et al., 2015), lo cual, de acuerdo con la ya mencionada teoría de la hormesis, es lo que comúnmente podemos encontrar en moléculas de señalización o elicitores pero a dosis distrésicas, activando de forma intensa y veloz rutas metabólicas del sistema inmune que ocasionan un efecto negativo al organismo.

Por lo anterior, se comenzó a explorar dosis menores para observar el efecto y se reportaron en plantas algunas respuestas relacionadas con los mecanismos de defensa activados por tratamientos con eADN propio, tales como la producción de especies reactivas de oxígeno y explosión oxidativa (Duran-Flores & Heil, 2018; Vega-Muñoz et al., 2018), generación y activación de MAP cinasas, secreción de néctar extrafloral (Duran-Flores & Heil, 2018), depolarización de membrana y señalización de Ca²⁺ (Barbero et al., 2016) e incluso cambios en la metilación de las islas CpG genómicas (Vega-Muñoz et al., 2018), lo cual sugiere una respuesta adaptativa hacia un ambiente peligroso artificial. De esta manera, se consideró que controlando las condiciones y concentraciones del tratamiento con eADN se podrían activar los mecanismos tempranos de defensa evitando la autotoxicidad (Ferrusquía-Jimenez et al., 2016).

Adicionalmente, Durán y Heil en 2017, hipotetizaron que el eADN podría funcionar como elicitador del sistema inmune innato en las plantas. Este mecanismo demostró ser altamente específico dependiendo de la distancia filogenética entre el organismo origen del ADN y el organismo que reacciona ante él (Duran-Flores & Heil, 2014; Vega-Muñoz et al., 2018; Jimenez 2020). Por esto, se sugiere que la distancia filogenética entre organismos define si el eADN actúa como DAMP (con eADN

propio) o como un PAMP (con eADN proveniente de un patógeno) (Duran-Flores & Heil, 2018).

III. Planteamiento del problema

En la industria agrícola, hasta ahora, se han desarrollado prácticas intensivas mediante el uso de fertilizantes químicos, monocultivos, herbicidas y pesticidas que incrementan el rendimiento de los cultivos (Dayan et al., 2009; García-Mier et al., 2013). Estas prácticas han favorecieron la ruptura de los ecosistemas naturales, ocasionando el surgimiento de microorganismos cada vez más virulentos (Möller & Stukenbrock, 2017; Nourmohammad et al., 2016).

Fol es un importante fitopatógeno cuyos efectos en cultivos de jitomate dentro y fuera de invernadero han reportado pérdidas en la producción de hasta el 70% (Akaeze & Aduramigba-Modupe, 2017; Mandal et al., 2009b; Srinivas et al., 2019; Worku & Sahe, 2018). Actualmente, las medidas más comunes para el manejo de esta enfermedad se enfocan en el uso de productos químicos.

El manejo de *Fol* mediante la aplicación de fungicidas químicos ha resultado una opción sencilla, práctica y eficaz contra enfermedades fúngicas de cultivos. Es la más usada en sistemas agrícolas y se conoce muy bien su aplicación. Se ha reportado la disminución de severidad de la enfermedad hasta en un 87% con el uso de diversos fungicidas (Song et al., 2004).

Por otro lado, se sabe que la mayoría de fungicidas químicos presentan toxicidad en un amplio rango de organismos, se ha reportado que muchos de ellos causan toxicidad en el desarrollo y oncogénesis (Gupta, 2018). A la fecha, solo algunos fungicidas han sido evaluados por la organización mundial de la salud por su potencial tóxico y se han establecido dosis aceptables de ingesta diaria. La toxicidad de los fungicidas afecta también a los organismos benéficos del suelo, animales y humanos presentes en el cultivo o que ingieran tejido tratado (Ajilogba & Babalola, 2013; Bonner & Alavanja, 2017; Dayan et al., 2009). Así como ocasionan un

aumento en la presión de selección y resistencia en los patógenos (Ajilogba & Babalola, 2013).

Por su parte, el control biológico de *Fol* ofrece mejores opciones de manejo desde el punto de vista ecológico, ambiental y de salud humana con prácticas como la elicitación controlada. Se ha reportado que la aplicación de organismos elicitors como *Pseudomonas* spp., *Trichoderma harzanium*, *Glomus intraradices* y microorganismos solubilizadores de fosfato han reducido la incidencia de marchitez vascular en jitomate hasta en un 67% (Khan & Khan, 2002; Srivastava et al., 2010); así como la aplicación de moléculas elicitoras como ácido salicílico redujo hasta un 75% la severidad en plantas de jitomate infectadas con *Fol* (Mandal et al., 2009).

Por lo anterior se ha identificado la necesidad de opciones para el manejo de marchitez vascular por *Fol* que cubran los márgenes de efectividad alcanzados con la aplicación de fungicidas y al mismo tiempo sean prácticas de nula o baja toxicidad con bajos costos ambientales y ecológicos.

Recientemente se ha explorado un nuevo mecanismo de elicitación por medio de la aplicación de moléculas que actúen como DAMPs en el sistema inmune innato de las plantas. Una de ellas, es la molécula del eADN propio (Duran-Flores & Heil, 2018; Vega-Muñoz et al., 2018), la cual sugiere un alto margen de eficacia en el manejo de enfermedades fúngicas, así como nula toxicidad.

IV. Justificación

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas de mayor importancia a nivel nacional e internacional, debido a su amplio consumo, al área cosechada y al valor económico de la producción (Escobar & Lee, 2009). En las áreas rurales, el cultivo de jitomate adquiere importancia tanto en el ámbito social como económico, debido a la gran mano de obra que su explotación demanda, es considerado altamente redituable y es un cultivo de inversión relativamente baja (Chaverría et al., 2012).

México, además de ser considerado el centro de domesticación de esta especie vegetal, es el principal proveedor a nivel mundial con una participación en el mercado de 24.1% del valor de las exportaciones mundiales (SAGARPA, 2017; Workman, 2020). Debido al crecimiento constante de la población y a cambios en los hábitos alimenticios mundiales, las importaciones han aumentado 39.41% en la última década, principalmente Estados Unidos, quien muestra una tendencia al alza en sus importaciones, con 7.8% de crecimiento anual (SADER, 2019).

Un gran factor de riesgo en el rendimiento de la producción nacional de jitomate es el hongo *Fusarium oxysporum*. Esta especie fúngica incluye cepas fitopatógenas para más de 120 cultivos de importancia agrícola (Dean et al., 2012). Tienen la capacidad de sobrevivir como un saprófito durante largos periodos en materia orgánica y en el suelo en forma de clamidosporas, dificultando su control en suelos agrícolas (Nirmaladevi et al., 2016). Ha sido considerado como uno de los 10 hongos fitopatógenos con mayor importancia económica y científica a nivel mundial (Dean et al., 2012).

Por otro lado, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, afecta específicamente a plantas de jitomate cultivadas en invernadero y en campo abierto ocasionando un conjunto de síntomas llamado comúnmente marchitez vascular, el cual ocasionan pérdidas de entre 20 y 60% en rendimiento de la producción y hasta 80% en condiciones ambientales favorables (Ascencio-álvarez et al., 2008; González et al., 2012; Nirmaladevi et al., 2016).

Actualmente, el manejo de la marchitez vascular consiste en múltiples medidas que en conjunto reducen la severidad de esta enfermedad. Las medidas aplicadas mediante el uso de productos químicos son constantemente cuestionadas debido a su alto costo ambiental, ecológico y de salud pública, así como por sus efectos negativos en el valor de la producción (Castro et al., 2004; Worku & Sahe, 2018).

Adicional a esto, estas estrategias tienen poca especificidad y generalmente ocasionan la pérdida de diversidad microbiana en el suelo del cultivo, lo que tiene graves consecuencias negativas en el desarrollo y producción de la planta (Partida-Martínez & Heil, 2011).

Por otro lado, existen también técnicas enfocadas principalmente en reducir la susceptibilidad del huésped como la identificación de variedades de jitomate resistentes a algunas razas de *Fol* (Akaeze & Aduramigba-Modupe, 2017; Ascencio-álvarez et al., 2008b), y la generación de líneas de jitomate transgénicas resistentes a la infección (Abdallah et al., 2010; Girhepuje & Shinde, 2011; Lin et al., 2004). Para asegurar la eficacia de estas medidas se necesita un control de los agentes fúngicos presentes en el suelo, adicionalmente estas medidas contribuyen a la reducción de biodiversidad en suelo, lo que ocasiona la selección involuntaria de cepas de *Fol* más virulentas.

Recientemente se han desarrollado técnicas de manejo de esta enfermedad con un enfoque biológico. Estas, tienen como objetivo elicitar al sistema inmune innato de la planta ocasionando mayor resistencia, mediante la presencia de microorganismos (Alam et al., 2016; Mohammed et al., 2019; Ramamoorthy et al., 2002) o elicitores (Mandal et al., 2009b; Worku & Sahe, 2018; Zehra et al., 2017). Pruebas tempranas de estas técnicas han sugerido la reducción de la susceptibilidad en plantas a diferentes factores de riesgo e incluso se han observado beneficios para el crecimiento de la planta (Henry et al., 2012; Michaud et al., 2018; Nel et al., 2006). Para que estas estrategias sustituyan a las comúnmente utilizadas, deben ser estudiadas a profundidad para establecer los elicitores más eficaces, tiempos y dosis de aplicación específicos (Vargas-Hernández et al., 2017; Mejía-Teniente et al., 2019).

Se propone desarrollar estrategias de elicitación por medio de moléculas DAMPs como ha demostrado ser el ADN propio (Duran-Flores & Heil, 2018; Vega-Muñoz et al., 2018). Debido a que éstas activan una respuesta inmune innata basal, la cual podría ser suficiente para limitar la infección de un patógeno sin disminuir el rendimiento de la planta por la energía utilizada. Estas estrategias ofrecen una alternativa eficaz con bajos costos ambientales y ecológicos.

V. Hipótesis

La aplicación de ADN propio en *Solanum lycopersicum* en interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* reducirá la severidad de marchitez vascular, en contraste con los controles sin tratamiento, debido a que el ADN propio funciona como DAMP en el sistema inmune de la planta, activa vías de señalización de defensa y tiene efectos en variables morfológicas y rendimiento de la planta.

VI. Objetivos

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la aplicación de ADN propio de *S. lycopersicum* en interacción con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre la severidad de marchitez vascular, variables morfológicas y rendimiento del cultivo.

6.2 Objetivos específicos

- Extraer y fragmentar ADN de jitomate en cantidad suficiente para trabajos a nivel invernadero.
- Establecer cinética de efecto del ADN propio en el sistema inmune innato de plantas de jitomate.
- Evaluar la severidad de la infección por *FoI* en cultivos de jitomate tratados con ADN propio.

- Determinar el efecto de la aplicación de ADN propio en cultivo de jitomate en interacción con *FoI* respecto a la morfología y rendimiento de la planta.

VII. Materiales y métodos

La experimentación fue llevada a cabo en los laboratorios e invernaderos de la Facultad de Ingeniería campus Amazcala y campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro por la estudiante.

7.1 Material biológico

El material biológico utilizado consta de la cepa *Fusarium oxysporum* obtenida de la colección de Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), así como semillas de *Solanum lycopersicum* variedad Rio grande (King Seeds Inc. Guadalajara, México), la cual es susceptible a la marchitez vascular y es una variedad comercial.

7.2 Extracción de ADN

Se colectó tejido vegetal a partir de la poda de cultivos comerciales anteriormente establecidos en el campus. Se ajustó el método de extracción por Rodrigues et al., 2018 para mayores cantidades de tejido y evitar el uso de reactivos tóxicos o equipo especializado en el protocolo.

En lugar de utilizar mortero y pistilo para lisar el tejido vegetal con nitrógeno líquido, se evaluó el realizar la lisis con un procedimiento mecánico mezclando 100mL de bufer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% (w/v) SDS por cada 50g de tejido vegetal y homogenizando en una licuadora común de cocina Oster 6662-13 durante 10 segundos aproximadamente.

Posteriormente la mezcla resultante se filtró con un colador de metal con poros de 5mm de apertura para eliminar los residuos sólidos y la mezcla líquida fue transferida a tubos Falcon de 50mL. Con el fin de precipitar las proteínas presentes

en la muestra, se agregó acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) 3M en una proporción de 2:1 al líquido obtenido en el paso anterior. Cada tubo Falcon fue mezclado mediante vortex y puesto en reposo durante 20 minutos a 4°C. Una vez pasado el tiempo de reposo, cada tubo fue centrifugado a 12000RPM a 4°C durante 15 minutos en una centrifuga de modelo ScienceMED DM0412S, el sobrenadante fue recuperado y transferido a tubos Falcon limpios. Por último, se precipitaron ácidos nucleicos mediante la adición de isopropanol frío en una proporción de 2:1 nuevamente y se mezcló gentilmente. Los tubos se dejaron reposar durante 1h a -20°C. Los tubos fueron centrifugados a 12000RPM a 4°C durante 15 minutos y esta vez se desechó el sobrenadante guardando la pastilla sedimentada. Con el fin de fragmentar el ADN obtenido, la pastilla se deja secar a temperatura ambiente durante 36h y luego se disuelve en agua destilada con ayuda de un agitador magnético y se almacena en frío hasta su aplicación.

El protocolo adaptado de extracción de ADN fue evaluado por medio de la visualización de su integridad en electroforesis con gel de agarosa al 1.5% y medición de absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermofisher para conocer su pureza y concentración.

Ya que se ha reportado que el ADN debe tener un tamaño menor a 1000pb para efectuar función de molécula de señalización en plantas, se debe asegurar esta fragmentación. De ser necesaria, la fragmentación de ADN se realizó mediante la técnica de sonicación directa emitiendo pulsos de 26 kHz a 10W cada segundo con una amplitud al 50% por 10 minutos (Vega-Muñoz et al., 2018). El tamaño del ADN se confirmó por medio de electroforesis anteriormente mencionado.

7.3 Cinética de efecto de ADN propio en marcadores inmunes de la planta

Establecimiento del cultivo y diseño experimental

Con el fin de establecer el periodo y concentración en que los tratamientos deben ser aplicados para mantener al sistema inmune de la planta activo continuamente,

se realizó una cinética del efecto elicitor del ADN propio comparando también el efecto de diferentes fuentes, concentraciones y tiempos de aplicación. La metodología será basada en la utilizada por Mejía-Teniente y colaboradores (2013). Las semillas de jitomate fueron germinadas en sustrato peat Moss hasta desarrollar 3-4 hojas verdaderas. Se realizó el transplante de plántulas a bolsas de plástico de 1Kg con gravilla como sustrato. Las plantas fueron establecidas en un invernadero de 12m² con un sistema de riego por goteo que suministraba 200mL/día de solución Steiner a cada planta (Figura 1). La solución nutritiva fue elaborada con insumos agrícolas individuales siguiendo la proporción común de una fertilización tipo Steiner, y la cantidad suministrada fue aumentando hasta alcanzar el litro diario de solución por planta acorde a sus necesidades de crecimiento. El cultivo fue desarrollado en los meses de noviembre de 2021 a enero de 2022. Con temperaturas y humedad máximas de 39°C y 70%.



Figura 1. Cultivo de cinética de efecto de eADN propio

Los tratamientos experimentales fueron asperjados foliarmente. Se establecieron completamente al azar 3 plantas por tratamiento y por tiempo de muestreo, ya que

en las etapas tempranas del ensayo cada muestreo era altamente destructivo para las unidades de muestreo. El diseño de tratamientos se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Diseño de tratamientos en cinética de respuesta inmune.		
Tratamiento	Primer aplicación (1 semana después del trasplante)	Segunda aplicación (45 días después del trasplante)
Control	Agua destilada	Agua destilada
Propio	ADN propio 50ppm	ADN propio 50ppm
Propio tardío	Agua destilada	ADN propio 50ppm

Las muestras fueron tomadas por triplicado en los tiempos: 1, 5 y 24 horas después de la aplicación y a los 5 y 10 días después de la aplicación. Una segunda aplicación fue realizada a los 45 días de la primera aplicación con las mismas condiciones y un segundo set de muestras fue tomado inmediatamente después de la segunda aplicación y a los 5 y 10 días después de la segunda aplicación como se describe en la figura 2.

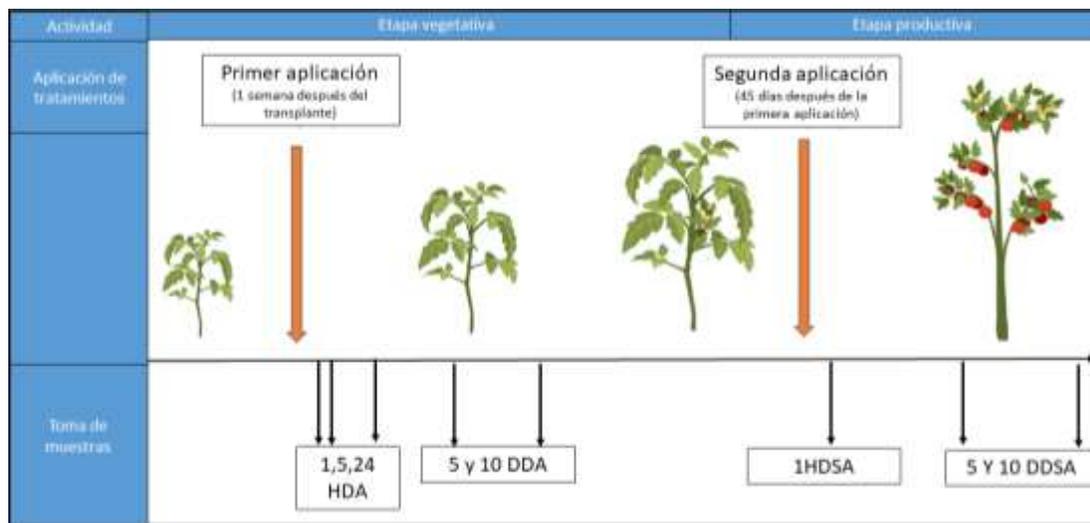


Figura 2. Esquema temporal de la cinética de efecto ADN en plantas de jitomate. HDA= horas después de la aplicación, DDA= días después de la aplicación, HDSA= horas después de la segunda aplicación y DDSA= días después de la segunda aplicación

En cada tiempo de muestreo se cortaron 2 hojas de 3 individuos completamente al azar de cada tratamiento, las muestras fueron unidas en un pool por tratamiento y congeladas para su posterior procesamiento.

VARIABLES DE ACTIVACIÓN DE SISTEMA INMUNE VEGETAL

Para determinar la activación del sistema inmune por los tratamientos aplicados se midieron múltiples marcadores de inmunidad en plantas. Los marcadores fueron peróxido de hidrógeno (H_2O_2), actividad de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y fenil alanino amonio liasa (PAL). Adicionalmente la presencia de fenoles (FEN) y flavonoides (FLAV) totales.

Para la determinación de H_2O_2 los tejidos fueron pulverizados en mortero y pistilo con nitrógeno líquido y 150mg de polvo fino fue homogenizado mediante vortex con 1mL de búfer de reacción (25% ácido tricloroacético al 0.1%, 50% de ioduro de potasio (KI) 1M y 25% de búfer de fosfatos 10mM). La mezcla fue incubada durante 10min a temperatura ambiente protegida de la luz. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 12000RPM durante 15min y 250uL del sobrenadante fue transferido

a microplaca y reposado durante 20min a temperatura ambiente. La absorbancia es medida a 350nm. Para eliminar la absorción por coloración de fondo, se realizaron controles de reacción preparados con muestra y agua destilada en vez de ioduro de potasio. La curva de calibración se realiza con soluciones de H₂O₂ en vez del volumen del ácido tricloroacético y el tejido vegetal.

Para la determinación de las actividades enzimáticas fue necesario obtener un extracto enzimático (EE) como se indica a continuación: 0.3g de tejido pulverizado con nitrógeno líquido fue mezclado por vortex con 1mL de búfer de fosfatos durante 1min. La mezcla obtenida fue centrifugada durante 15min con 12000RPM y el sobrenadante colectado y almacenado.

La actividad de catalasa fue determinada mediante el monitoreo de la oxidación de una solución conocida de H₂O₂ por la catalasa contenida en el EE. Esta metodología fue adaptada de la anteriormente establecida por Cakmak & Horst, 1991. La mezcla de reacción contenía 200uL de búfer de reacción, 20uL de peróxido de hidrógeno y 100uL de EE, inmediatamente la absorbancia se comenzó a medir y fue medida cada minuto durante 6 minutos en una celda de cuarzo a 240nm.

Para SOD, la mezcla de reacción contenía 50uL de EE, búfer de fosfatos (50mM), cloruro de tetrazolio nitroazul (NBT), metionina y riboflavina. Una vez mezclados por vortex, se expuso cada reacción a luz uniforme de 12.5lux durante 15min. La absorbancia de cada reacción fue medida a 560nm. La actividad de SOD fue reportada como la cantidad de enzima que inhibe la reducción de NBT a un 50% (Beauchamp & Fridovich, 1971).

La actividad de PAL se midió determinando la presencia de ácido cinámico leído a 290nm. La reacción se realizó con 100uL de EE y 100uL de L-fenilalanina a 60ppm mezcladas e incubadas a 37°C durante 1h. La reacción se detuvo por la adición de 50uL de ácido tricloro acético (Dickerson et al., 1984).

Finalmente, los fenoles y flavonoides totales fueron determinados a partir de extractos metanólicos (ME) de las muestras. Los tejidos se pulverizaron en

nitrógeno líquido y liofilizados, 50mg de cada muestra fueron mezclados con 500uL de metanol, sonicados durante 30min en un sonicador de baño maría Elmasonic E30 H y centrifugados durante 15min a 12000RPM. El sobrenadante fue colectado y almacenado.

Los fenoles fueron determinados siguiendo el protocolo por Singleton et al., en 1965. Fueron mezclados 40uL de ME, 460uL de agua destilada y 250uL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N. Pasados 5min, 1250uL de carbonato de sodio al 20% fueron agregados a la mezcla. La solución fue mezclada por vortex e incubada durante 2h en obscuridad. La absorbancia fue medida a 760nm y los resultados reportados como mg equivalentes de ácido gálico.

A partir del mismo ME, los flavonoides fueron determinados de la siguiente manera: 50uL de ME fueron mezclados en pozos de microplacas con 180uL de agua destilada y 20uL de 2-aminoetildifenilborato, la absorbancia de cada pozo fue medida a 404nm y los resultados obtenidos fueron expresados como mg equivalentes de rutina (Oomah et al., 2005).

Adicionalmente, el contenido de proteína fue determinado para expresar las actividades enzimáticas en función de este mediante el método de Bradford (Hammond & Kruger, 1988).

Todas las mediciones espectrofotométricas fueron realizadas en un multiscan de modelo SkyHigh de Thermo scientific.

Análisis de datos y estadísticos

Los datos obtenidos para cada variable evaluada fueron sometidos al test de Shapiro-Wilks para confirmar su distribución normal y a un ANOVA y test de Tukey ($p = 0.05$) para identificar diferencias significativas entre tratamientos. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software JMP versión 13.2.0 (JMP statistical discovery Cary, NC, USA).

Posteriormente todos los datos fueron normalizados con los valores obtenidos del respectivo control y establecimos una regresión no lineal con ellos, considerando la etapa vegetal en que se realizó cada aplicación y el tiempo de muestreo después de la aplicación medido en horas. El modelado fue realizado en el software MATLAB R2022a (The MathWorks Inc.: Natick, MA, USA). Finalmente, un análisis de componentes principales (PCAs) se realizó con los datos para visualizar la distribución de las muestras por su varianza por tratamiento, así como la relevancia de información que cada variable aporta para conocer esta varianza. El PCA se realizó con la función 'prcomp' del software R version 4.1.3 (R Core Team: Vienna, Austria) y el paquete 'factoextra' (Kassambara and Mundt, 2017).

7.4 Efecto de ADN propio en cultivo de jitomate inoculado con *Fusarium oxysporum*

Establecimiento del cultivo y diseño experimental

Se germinaron semillas de jitomate en sustrato peat Moss hasta desarrollar 3-4 hojas verdaderas. Se realizó el transplante de plántulas a bolsas de plástico de 1Kg con gravilla como sustrato. Las plantas fueron establecidas en un invernadero de 100m² (Figura 3) con un sistema de riego por goteo que suministraba 200mL de solución Steiner al 50% a cada planta por día. La solución nutritiva fue elaborada con insumos agrícolas de forma individual, siguiendo una proporción de tipo Steiner, los requerimientos de las plantas fueron aumentando hasta alcanzar el litro diario de solución por planta. El cultivo fue desarrollado en los meses de diciembre de 2022 a enero de 2023. Con temperaturas de 15-30°C y humedad de 30-70%. Se establecieron tratamientos en un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones y 3 bloques por tratamiento orientados para mitigar la variación de la luz solar.



Figura 3. Cultivo de jitomate en invernadero establecido para evaluación de severidad en un diseño de bloques al azar

Los tratamientos aplicados son descritos en la tabla 3. La inoculación de *Fusarium oxysporum* fue realizada mediante la aplicación de 10mL de una solución de 1×10^6 esporas/mL en la rizósfera de cada planta, adicionalmente, las plantas fueron heridas con un bisturí estéril directamente en las raíces. El tratamiento de ADN propio fue realizado mediante aspersión foliar de 10mL de solución de ADN de jitomate a 50ppm. A partir de la inoculación se monitorearon las plantas evaluando variables de severidad y morfológicas semanalmente y enzimáticas y de expresión génica a partir de muestras de 2 hojas por bloque tomadas y almacenadas a -40°C al final del ensayo.

Tabla 3. Tratamientos aplicados a plantas de jitomate.				
Tratamiento	Descripción	Herida en raíz	Aplicación DNA propio	Inoculación de Fusarium
C	Control	-	-	-
CH	Control herido	Día 0	-	-
CN	Control negativo	Día 0	Día 0	-
CP	Control positivo	Día 0	-	Día 0
T1	Tratamiento 1	Día 0	Día 0	Día 0
TC	Tratamiento correctivo	Día 0	Día 7	Día 0
TP	Tratamiento preventivo	Día 0	Día 0	Día 7
TS	Tratamiento semanal	Día 0	Día 0	A partir del día 0 semanalmente

Evaluación de severidad de la infección

Para evaluar la severidad de la infección fúngica semanalmente se utilizó la escala reportada por Validov y colaboradores, la cual consiste en 5 niveles de severidad: las plantas sanas obtienen un nivel de 0, plantas con lesiones menos de 2mm obtienen un nivel de 1, plantas con lesiones más desarrolladas obtienen nivel 2 y plantas con lesiones mayores a 4 cm obtendrán un nivel 3. El nivel 4 fue otorgado a plantas muertas. Posteriormente se calculará el nivel general de la infección como el porcentaje de las plantas con lesiones y sus niveles (Validov et al., 2011).

Evaluación de variables morfológicas

Dos veces por semana se contará manualmente el número de hojas por planta, se medirá la altura de cada planta y el grosor del tallo con un vernier electrónico y un flexómetro.

Evaluación de variables enzimáticas

Se evaluaron las actividades de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y penilalanino amonio liasa (PAL) involucradas en la activación del sistema inmune vegetal. Las muestras almacenadas en un ultracongelador fueron trituradas con nitrógeno líquido y pistilo en un mortero de cerámica y los extractos enzimáticos (EE) fueron obtenidos con búfer de fosfatos. Estas actividades enzimáticas fueron evaluadas mediante espectroscopía a diferentes longitudes de onda de igual forma que la detallada en la sección 7.3.

Evaluación de expresión génica

Adicionalmente se evaluó la expresión génica del gen PR1a, que aparece de forma temprana en la ruta metabólica del ácido salicílico, y del gen Chalcona sintasa que aparece de forma temprana en la ruta metabólica de los flavonoides, es decir, la función de ambos está altamente relacionada con el sistema inmune vegetal. De las muestras congeladas se extrajo ARN siguiendo la metodología de TRIzol reportada por Pecinka (2013).

Se pesaron 300 mg de la muestra y se trituraron con nitrógeno líquido y pistilo en un mortero de cerámica obteniendo un polvo fino que fue puesto en un tubo eppendorf de 1.5mL con 1mL del reactivo TRIzol de Thermo fisher, el tubo fue mezclado con vortex e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, 600 μ L de cloroformo fueron añadidos y mezclados por vortex durante 1 minuto para después ser centrifugado a 12,000 rpm y 4 °C por 15 minutos. Una vez separadas las fases, la fase superior fue colectada en un nuevo tubo y mezclada gentilmente con 600 μ L de isopropanol frío y puesto en reposo durante 1 hora a -20°C. Los tubos fueron centrifugados en las mismas condiciones que anteriormente y el sobrenadante fue descartado. El pellet obtenido fue lavado con 200 μ L de etanol al 75% y secado a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Finalmente, el pellet seco fue resuspendido en agua destilada estéril. La solución de RNA fue evaluada por su concentración en un espectrofotómetro NanoDrop™

2000 (Thermo Fisher) y por su integridad con una electroforesis de gel de agarosa al 1.5% y almacenada a -80°C hasta su uso posterior.

A partir de la solución de RNA, se realizó la síntesis de ADN complementario (cADN) asegurándonos de que todas las soluciones de RNA estuvieran a la misma concentración. Se utilizó el kit Maxima First strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del manual y posteriormente se realizó una qPCR por triplicado por muestra utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific™), los primers utilizados fueron forward: 5'-GCCAAGCTATAACT ACGCTACCAAC-3' y reversa: 5'-GCAAGAAATGAACCACCATCC-3' para pr1a; forward: 5'-CCAAGGACTTGGCTGAGAAC-3' y reversa: 5'-TATCGGGGACAAGAGTTTGG-3' para chalcona sintasa y forward: 5'-AGTTGCCCCAGAAGAACACC-3' y reversa: 5'-CCACCACCTTGATC TTCATG-3' para el gen de la actina, utilizado como gen de normalización o gen de "housekeeping" como lo reporta Solano-Alvarez et al. (2021). El programa de PCR aplicado fue: 95 °C por 10 min, luego 40 ciclos de 95 °C 15 s, 55 °C 30 s y 72 °C 30 s y por ultimo una extensión final de 72 °C 30 s en una termocicladora de tiempo real (BIORAD Laboratories). Los niveles de expresión génica fueron calculados utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) y reportados normalizados en función del gen housekeeping y el control del experimento.

Análisis estadístico

Las mediciones obtenidas serán sometidas a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($p < 0.05$) para observar diferencias significativas.

7.5 Efecto de ADN propio en variables productivas del cultivo de jitomate

Establecimiento del cultivo y diseño experimental

Para este ensayo se germinaron semillas de jitomate y de forma similar a los ensayos anteriores se transplantaron una vez obteniendo 4 a 6 hojas verdaderas a bolsas llenas de gravilla como sustrato inerte en un invernadero de 12m² (Figura 4). El riego fue establecido por goteo con una solución Steiner común al 100%. El cultivo se mantuvo aproximadamente 4 meses hasta alcanzar el cuarto racimo de frutos con el fin de evaluar la cosecha de las plantas.

Los tratamientos evaluados consistieron en la aplicación de ADN propio de forma foliar a punto de goteo en una concentración de 50ppm en una sola ocasión una semana después del trasplante (T1) y de forma periódica cada 15 días (T2) comenzando una semana después del trasplante. Adicionalmente se aplicó agua destilada de forma foliar a punto de goteo en un grupo de plantas control. Los tratamientos fueron establecidos de forma completamente al azar con 10 plantas cada uno.

Se evaluaron variables morfológicas a lo largo del cultivo y variables productivas en la cosecha de este, adicionalmente se monitoreó, mediante actividad enzimática, la activación del sistema inmune de la planta y, finalmente variables de calidad del fruto descritas a continuación.



Figura 4. Ensayo de cultivo de jitomate y evaluación de variables productivas cultivo de jitomate

Evaluación de variables morfológicas

Se midió la altura de las plantas a lo largo del tiempo del cultivo con un flexómetro de forma manual, así como el ancho del tallo con un vernier electrónico. Al final del experimento, cuatro plantas por tratamiento fueron extraídas, limpiadas y seccionadas en tallo y raíz y pesadas en una báscula por secciones inmediatamente después de su extracción. Posteriormente se empaquetó cada sección en papel periódico y se puso a secar en un horno a 70°C durante 3 días hasta obtener el peso seco, el cual fue medido en una báscula para obtener la biomasa fresca y seca de los tratamientos.

Evaluación de variables enzimáticas

De igual forma que en los experimentos anteriores, se realizó el muestreo de tejido a la hora, 10 días y 30 días después de la aplicación, este consistió en 2 hojas por tratamiento al azar y fueron almacenadas a -40°C hasta su procesamiento en laboratorio. Se realizó la medición de las actividades de CAT, SOD y PAL con la metodología detallada en secciones anteriores.

Evaluación de rendimiento

Se realizó la cosecha de frutos de forma semanal a partir de la maduración del primer racimo, donde se cortaban los frutos en la etapa rojo maduro de acuerdo con las etapas de maduración del jitomate referencia. Todos los frutos fueron cosechados, contados por planta, pesados en una báscula y medidos en ancho y alto con un vernier electrónico. Dos frutos por tratamiento fueron evaluados en su color con un colorímetro Chroma meter CR-410 de KONIKA MINOLTA. El color de los frutos fue medido en tres escalas diferentes: L (luminosidad), a (posición entre rojo y verde) y b (posición entre amarillo y azul) que conforman el espacio de color CIELAB en cada cosecha y evaluados en el texturómetro Brookfield CT3 de Ametek en un test de tipo compresión con un objetivo a 17.0mm y una velocidad de 0.5mm/s,

la sonda utilizada fue la TA39 y se registraron las variables dureza y deformación como se muestra en la figura 5. Adicionalmente, dos frutos por tratamiento, en cada cosecha, fueron molidos en un extractor de jugos de cocina y se realizaron las mediciones de pH y sólidos solubles al jugo obtenido.



Figura 5. Medición de texturometría en jitomates cosechados del experimento

Análisis estadísticos

Para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos en las variables principales y secundarias se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

VIII. Resultados

8.1 Extracción de ADN

En esta etapa se logró establecer una metodología de extracción de ADN que no requiere de reactivos clasificados como tóxicos o de disposición especial y adicionalmente no requiere de equipo altamente especializado como lo son los sonotrodos utilizados anteriormente para este propósito referencia. En este caso, empleando la metodología descrita, se obtuvo una solución de ADN en grandes cantidades (hasta 1 litro) con valores de calidad mostrados en la tabla 4 y una integridad mostrada en el gel de electroforesis de la figura 6. Adicionalmente se puede observar que el ADN se encuentra fragmentado por debajo de los 1500pb cumpliendo uno de los objetivos principales del método. El volumen de solución de ADN obtenido se vio limitado solamente por el volumen admitido por la centrífuga en cada corrida, lo cual doblada los tiempos de proceso.

Tabla 4. Valores de calidad de ADN extraído		
ng/ μ L	260/280	260/230
250 \pm 10	1.5 \pm 0.15	0.5 \pm 0.15

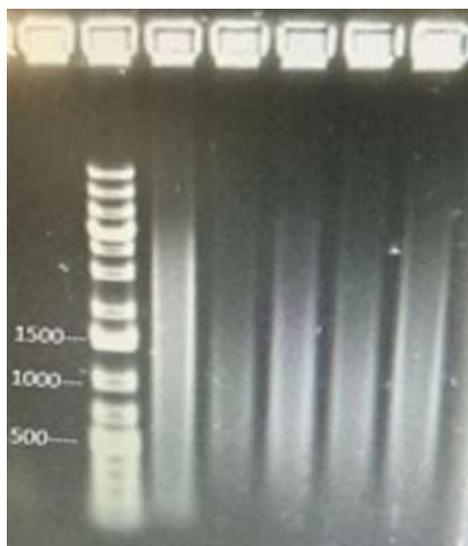


Figura 6. Medición de texturometría en jitomates cosechados del experimento con diferentes metodologías

8.2 Cinética de efecto de ADN propio en marcadores inmunes de la planta

Variables de activación del sistema inmune vegetal

Se obtuvieron comportamientos diferentes en plantas con el mismo tratamiento, dependiendo de la etapa vegetal en que fue aplicado. En la tabla 5 se pueden observar los valores obtenidos en cada variable para cada grupo evaluado, los valores señalados con un asterisco resultaron tener una diferencia significativa en comparación con el control (test de Tukey $p=0.05$). Las variables con respuesta más temprana fueron la actividad de SOD, CAT y PAL, con diferencias significativas desde la primera hora después de la aplicación del tratamiento (1HDA) y hasta los 10 días después de la aplicación (para la aplicación temprana) lo que sugiere la duración aproximada de la activación del sistema inmune del jitomate por la aplicación de ADN propio. Las variables FEN y FLAV mostraron diferencias significativas hasta los 10 días después de la aplicación del tratamiento (10DDA) cuando son aplicadas en etapas tempranas del desarrollo de la planta. Estas variables tienen en común que determinan la presencia de moléculas finales en la ruta metabólica de los fenilpropanoides y no reacciones tempranas ni intermedias de esta (como las otras variables). Por último, la cuantificación de H_2O_2 tiene un comportamiento diferente a las otras variables demostrando diferencia significativa 1 hora después de la aplicación y 5 días después de la aplicación únicamente (en etapa temprana de la planta), siendo esta la más temprana de las señales en el sistema inmune vegetal.

Por otro lado, si observamos la respuesta de las variables evaluadas en plantas cuya aplicación fue realizada en una etapa tardía (45 días después de la primera aplicación y cuando el fruto comienza a llenarse) el comportamiento es diferente. Se obtuvieron pocos valores significativamente diferentes al grupo control, sin un patrón en común entre variables y sin una activación constante de la variable. La respuesta de las plantas adultas al ADN propio aplicado a 50ppm tiene, en general, una menor intensidad y menor duración de acuerdo a los tiempos que se muestrearon.

Tabla 5. Valores de marcadores de inmunidad en plantas de jitomate									
	TRATAMIENTO	1HDA	5HDA	1DDA	5DDA	10DDA	1HDSA	5DDSA	10DDSA
CAT	CONTROL	3.145	4.915	3.667	8.846	13.957	14.645	12.187	12.524
	PROPIO	65.462*	64.325*	60.252*	54.872*	64.675*	5.486	6.006	5.937
	PROPIO TARDÍA	-	-	-	-	-	20.549	17.168	22.765*
FLAV	CONTROL	3.313	4.289	3.505	3.585	3.771	4.681	5.096	5.786
	PROPIO	3.425	4.016	4.02	3.76	5.839*	6.478*	4.472*	4.600*
	PROPIO TARDÍA	-	-	-	-	-	3.781	8.291*	9.614*
H2O2	CONTROL	0.003	0.004	0.006	0.001	0.008	0.015	0.002	0.005
	PROPIO	0.008*	0.004	0.009	0.012*	0.012	0.02	0.012	0.003
	PROPIO TARDÍA	-	-	-	-	-	0.028	0.021*	0.027*
PAL	CONTROL	253.149	183.561	193.512	186.81	230.104	356.371	325.189	281.315
	PROPIO	454.699*	394.401*	519.680*	453.329*	449.059*	707.890*	436.558*	456.569*
	PROPIO TARDÍA	-	-	-	-	-	336.848	351.545	288.871
FEN	CONTROL	0.202	0.219	0.222	0.217	0.156	0.256	0.271	0.26
	PROPIO	0.241	0.21	0.207	0.237	0.332*	0.464*	0.419	0.420*
	PROPIO TARDÍA	-	-	-	-	-	0.247	0.277	0.297
SOD	CONTROL	1.78E-04	2.17E-07	1.83E-04	3.60E-04	3.67E-07	1.13E-06	1.42E-06	5.14E-05
	PROPIO	3.19E-04*	1.69E-04*	3.19E-05*	2.5E-04*	2.4E-04*	3.17E-07	7.59E-07	2.8E-04*
	PROPIO TARDÍA	-	-	-	-	-	1.53E-06	1.54E-04*	1.78E-06

En las regresiones obtenidas a partir de los valores de variables inmunes, mostrados en la figura 7 se observa la diferencia de respuesta de las plantas al mismo tratamiento con diferencias en tiempo de aplicación. El panel de la izquierda muestra las respuestas de las plantas que recibieron dos aplicaciones (en plántula y adultas). Las líneas discontinuas del panel de la izquierda comparan la respuesta a la primera aplicación (línea azul) y a la segunda aplicación (línea roja), los comportamientos de las variables PAL, H₂O₂ y SOD tienen las mismas tendencias, pero en diferentes intensidades, siendo la respuesta a la segunda aplicación menos intensa. En contraste, las variables FEN, FLAV y CAT demuestran no reducir sus respuestas a la primera aplicación incluso a las 250 horas posteriores y a la segunda aplicación la respuesta ya se ha estabilizado o terminado desde las 100 horas posteriores a la aplicación. Se resalta la actividad de la enzima SOD pues registra valores de más de 500 veces los valores del grupo control en todos los puntos de muestreo de la primera aplicación.

En el panel de la derecha observamos el grupo de plantas cuya única aplicación fue en la etapa tardía de su desarrollo, por lo que la línea discontinua azul no presenta cambios con el grupo control. Se observa una respuesta de poca intensidad cuya variable más destacable es la presencia de H₂O₂ con casi 10 veces más que el grupo control, todas las variables restantes presentaron menos de 2 veces la respuesta del grupo control. Adicionalmente podemos observar que en las variables FEN, FLAV y CAT la tendencia es similar a la aplicación en etapa temprana, ya que a las 250 horas después de su aplicación sigue subiendo la respuesta y los tiempos de muestreo no nos permiten conocer cuando disminuye.

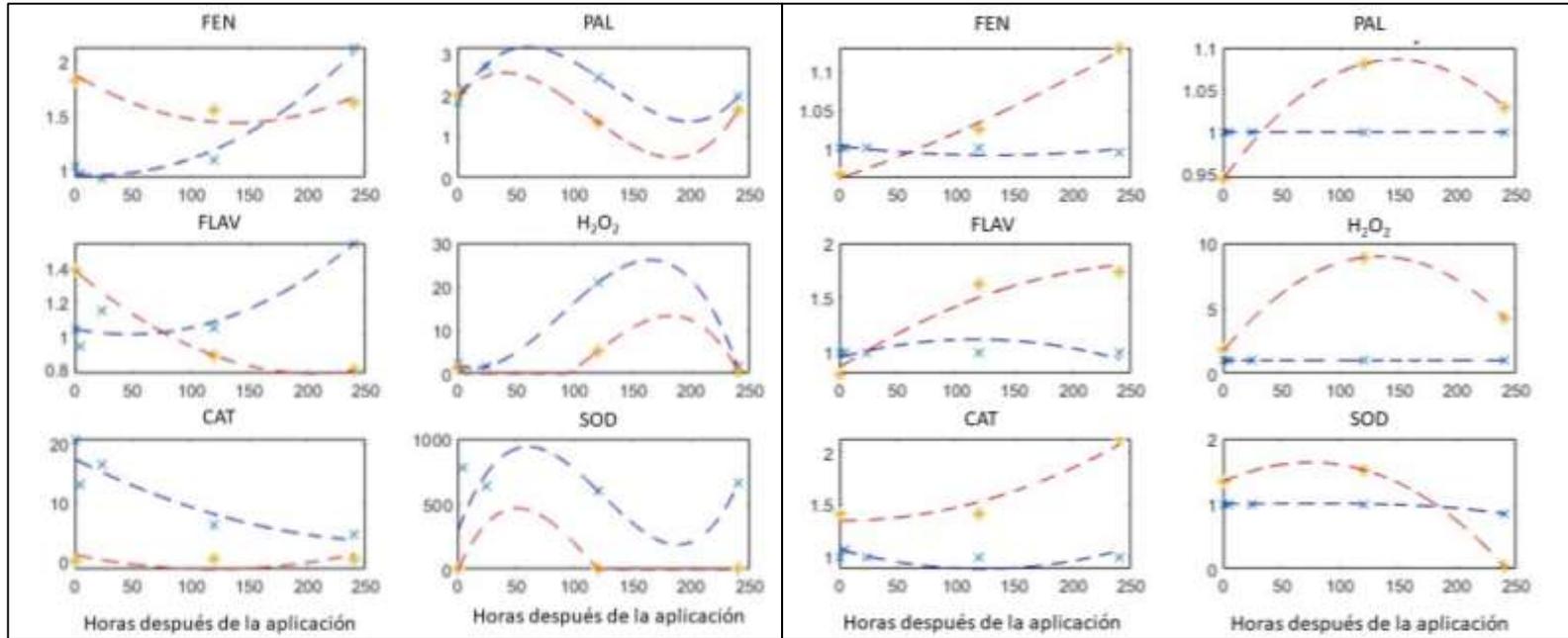


Figura 7. Modelo del comportamiento de variables de activación del sistema inmune vegetal. Los datos han sido normalizados con el grupo control cuando ADN propio a 50 ppm es aplicado (primera aplicación: línea discontinua azul y segunda aplicación: línea discontinua roja). El panel de la izquierda muestra el grupo de plantas que tuvieron 2 aplicaciones (temprana y tardía) y el panel de la derecha el grupo de plantas que solamente tuvieron una aplicación tardía.

8.3 Efecto de ADN propio en cultivo de jitomate inoculado con *Fusarium oxysporum*

Variables morfológicas

Se encontraron diferencias significativas entre algunos tratamientos evaluados en variables morfológicas y de severidad evidenciando efectos de los tratamientos en la fisiología de las plantas. En la variable altura de las plantas (Figura 8.a) se observa que el grupo control fue superior a partir de los 14 días después de la aplicación (dda) y permaneció de esta forma incrementando la brecha entre este y los demás grupos hasta el último día de medición. En segundo lugar, se encontró el grupo del control herido que no tuvo ninguna aplicación, pero sufrió estrés mecánico en una etapa temprana del cultivo y su crecimiento se vio aminorado a partir de los 18 dda para ser diferente al grupo control. Por otro lado, el grupo de tratamiento preventivo tuvo el menor crecimiento de todos, significativo desde los 14 dda. Fuera de estos, todos los demás grupos tuvieron mediciones sin diferencias significativas. Es importante notar que, en la última medición, el grupo de tratamiento semanal alcanzó la altura del control herido mostrando una recuperación de condiciones, aun cuando este grupo sufrió daño mecánico y la infección por *F. oxysporum*.

En la variable número de hojas (Figura 8.b) todos los grupos obtuvieron resultados sin diferencias estadísticas con excepción del grupo de tratamiento preventivo, cuyo número de hojas fue, a partir de los 11 dda y hasta el final del experimento menor que todos los demás. Para la variable ancho de tallo (Figura 8.c) no se presentó una tendencia constante en las diferencias entre grupos solamente el grupo de tratamiento preventivo tuvo las menores mediciones con diferencias significativas en los tiempos 11, 14 y 18 pero alcanza a recuperarse con los otros grupos al final del ensayo.

Finalmente, para la variable severidad (Figura 8.d) se observaron claras diferencias significativas desde los 14 dda teniendo la mayor severidad los grupos CP y TP, los grupos restantes recuperan un fenotipo sin síntomas llegando a tener un nivel de severidad de 0.2 a los 28 dda. El grupo del tratamiento preventivo se separa del

control positivo a partir del día 21 recuperando un fenotipo más sano, pero sin integrarse a los demás grupos.

Adicionalmente, para tomar en cuenta el estado general de las plantas, se tomaron fotografías a cada una y el estado representativo por cada grupo se observa en la figura 9. Se obtuvieron plantas muertas en los grupos control positivo (como se esperaba) pero también en el grupo tratamiento preventivo. En el control positivo había también, plantas totalmente desplomadas en el suelo y con hojas altamente afectadas. El grupo tratamiento preventivo tenía también plantas sanas en apariencia, erguidas y sin síntomas visibles. Los demás grupos tenían una morfología similar mayoritariamente sanas y síntomas menores en hojas más viejas.

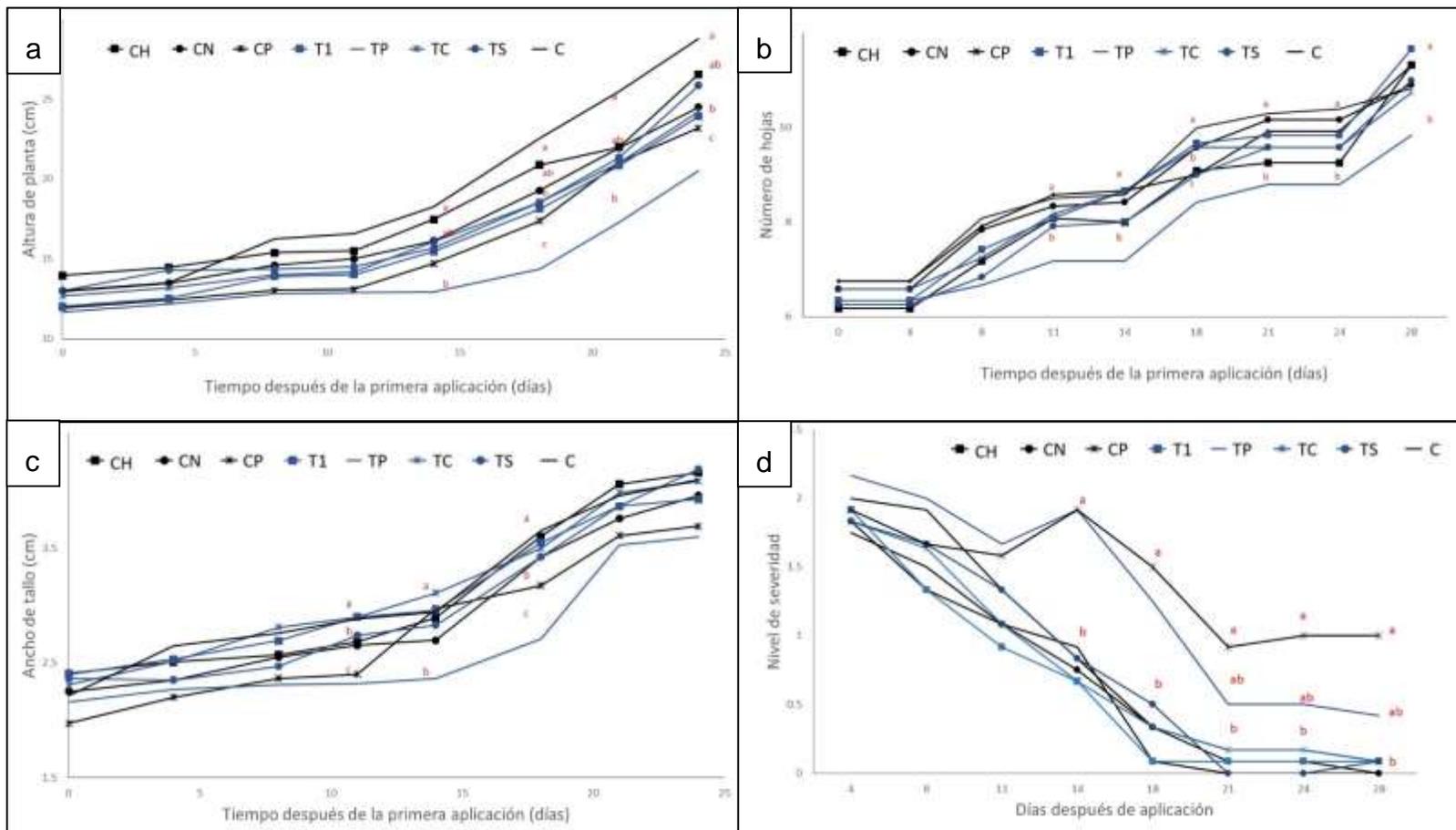


Figura 8. Valores obtenidos en las variables morfológicas (a, b y c) y de severidad (d) de las plantas evaluadas

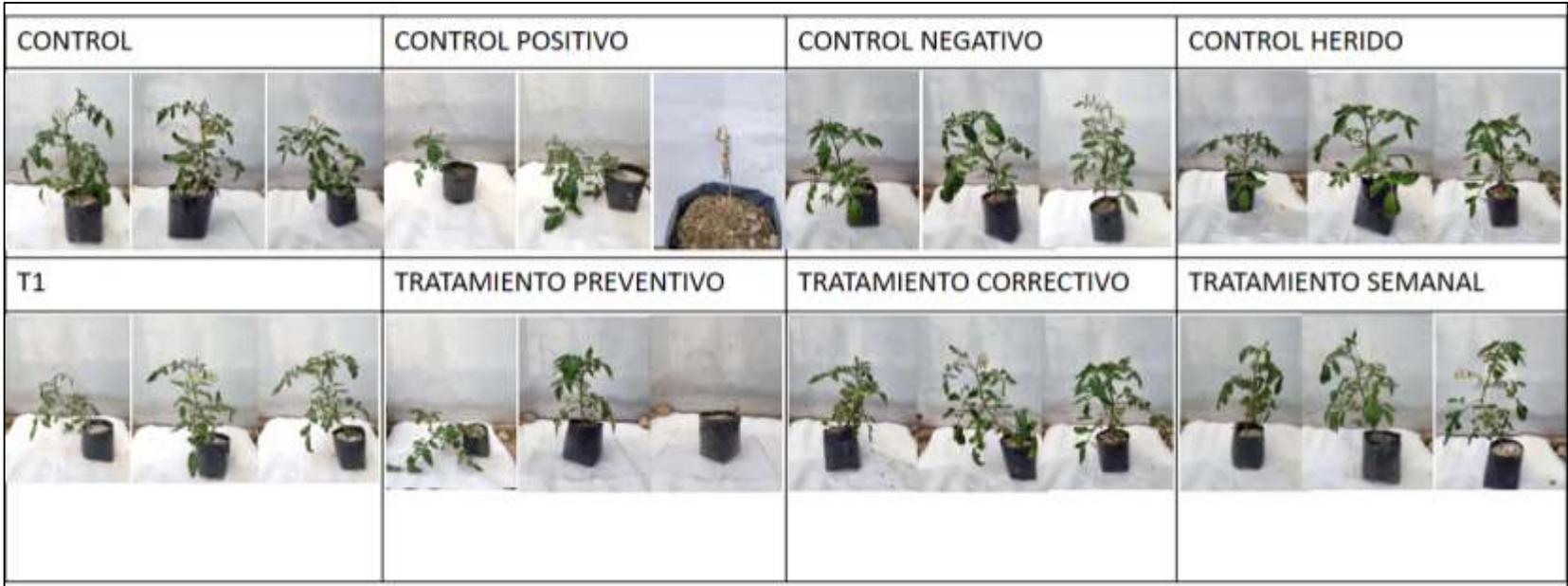


Figura 9. Fotografías representativas del estado de las plantas en cada grupo evaluado

Activación de marcadores de inmunidad

Se encontraron diferentes estados de activación del sistema inmune en las plantas sometidas a los tipos de estrés evaluados. Se midieron variables relacionadas al equilibrio de especies reactivas de oxígeno y a la ruta biosintética de los fenilpropanoides. En la figura 10 observamos los resultados de todas las variables determinadas. La actividad enzimática de CAT (Figura 10.a) y la presencia de H₂O₂ (Figura 10.b) en tejidos vegetales muestran la misma tendencia: con valores mayores significativamente al grupo control observamos al grupo del tratamiento semanal y con valores menores, al grupo del tratamiento preventivo, los grupos restantes presentan diferencias no significativas con el grupo control. La actividad enzimática SOD (Fig 10.c) muestra 4 grupos diferentes de valores, dos de ellos con mayor actividad que el control (incluyendo al tratamiento correctivo, control positivo y tratamiento semanal) y un grupo con menor actividad que el control (control herido, control negativo y tratamiento preventivo, el grupo del tratamiento simultáneo no muestra diferencias significativas con el control. La actividad enzimática de PAL (Fig 10.d) muestra diferencias al control en todos los grupos menos el tratamiento preventivo y el control negativo, con los valores más altos encontramos al tratamiento correctivo y en segundo lugar a los grupos del tratamiento simultáneo y semanal, en tercer lugar, encontramos al control positivo, el grupo del tratamiento preventivo no tuvo diferencias con el control y, finalmente, el grupo del control herido presentó una actividad menor al control. En cuanto a la síntesis de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides los resultados son diferentes: para los fenoles (Fig. 10.e) encontramos al grupo del tratamiento semanal con mayor concentración que el control, el grupo del control herido con menor concentración y los grupos restantes sin efecto para esta variable, para los flavonoides (Fig. 10.f) se encontraron concentraciones menores que del control en los grupos control negativo y tratamiento preventivo.

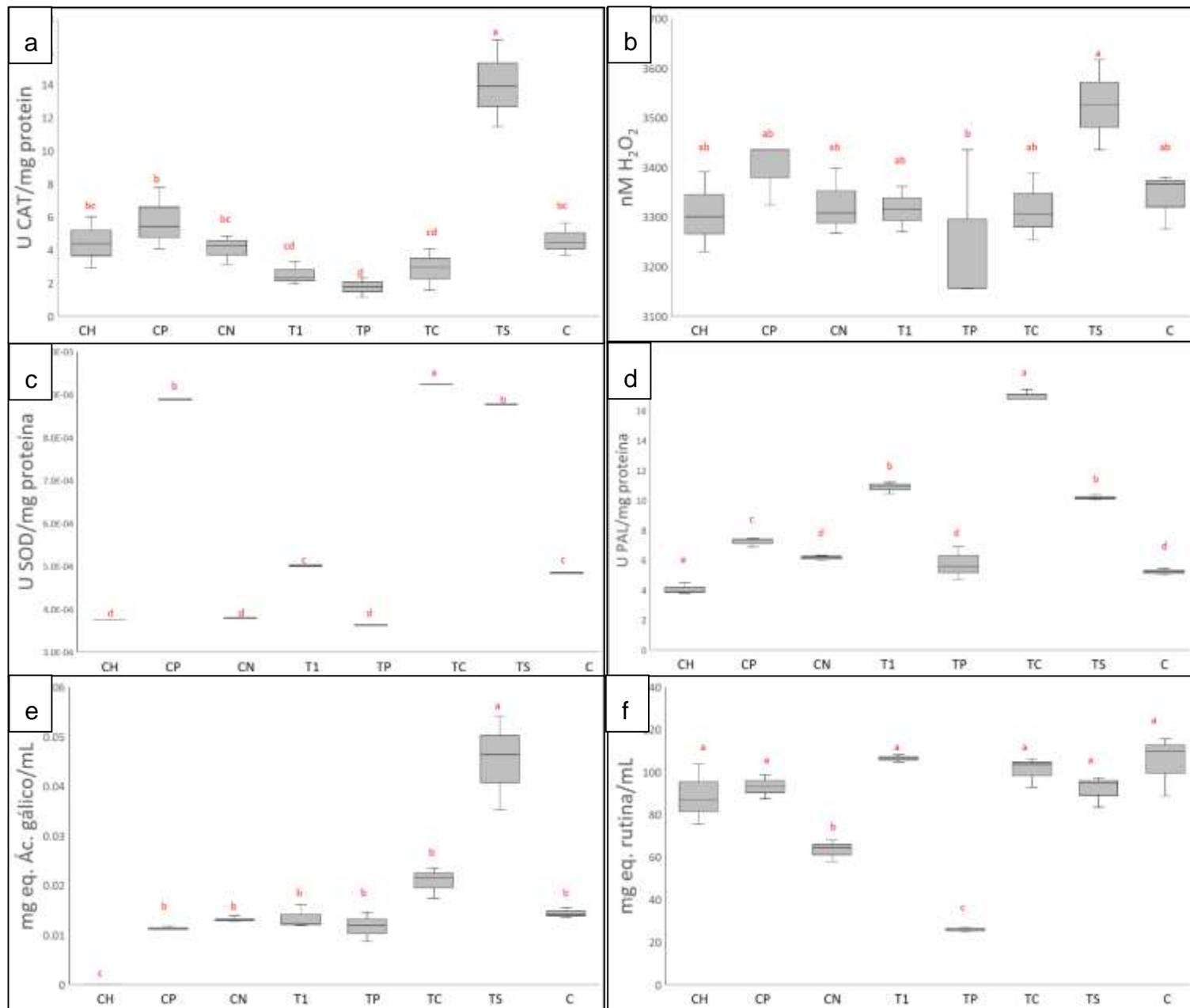


Figura 10. Valores obtenidos en las actividades enzimáticas y bioquímicas de las plantas evaluadas

Evaluación de la expresión genética

Los genes evaluados fueron CHS y PR1a y se obtuvo resultados de expresión diferentes. El gen PR1a (Figura 11. arriba) mostró una expresión diferencial en todos los tratamientos, pero solamente uno tuvo diferencia positiva, con 2.8 veces la expresión del control el tratamiento correctivo tenía el gen PR1a más activo. En contraste, los demás tratamientos tuvieron diferencia negativa en cuanto al control, siendo el menor el control herido, el control negativo y el tratamiento simultáneo con 0.001 veces la expresión del control. Por otro lado, el gen CHS (Figura 11. abajo) registró una activación mucho más intensa en el tratamiento del control positivo con casi 241 veces la expresión del control, seguido de este, otros grupos obtuvieron diferencias positivas conforme al control, como lo son el control herido (8.79), el control negativo (28.54) y el tratamiento semanal (2.05). Finalmente, algunos grupos mostraron una regulación negativa de este gen conforme al grupo control, los cuales fueron el tratamiento simultáneo (0.92), tratamiento preventivo (0.81) y el tratamiento correctivo (0.06).

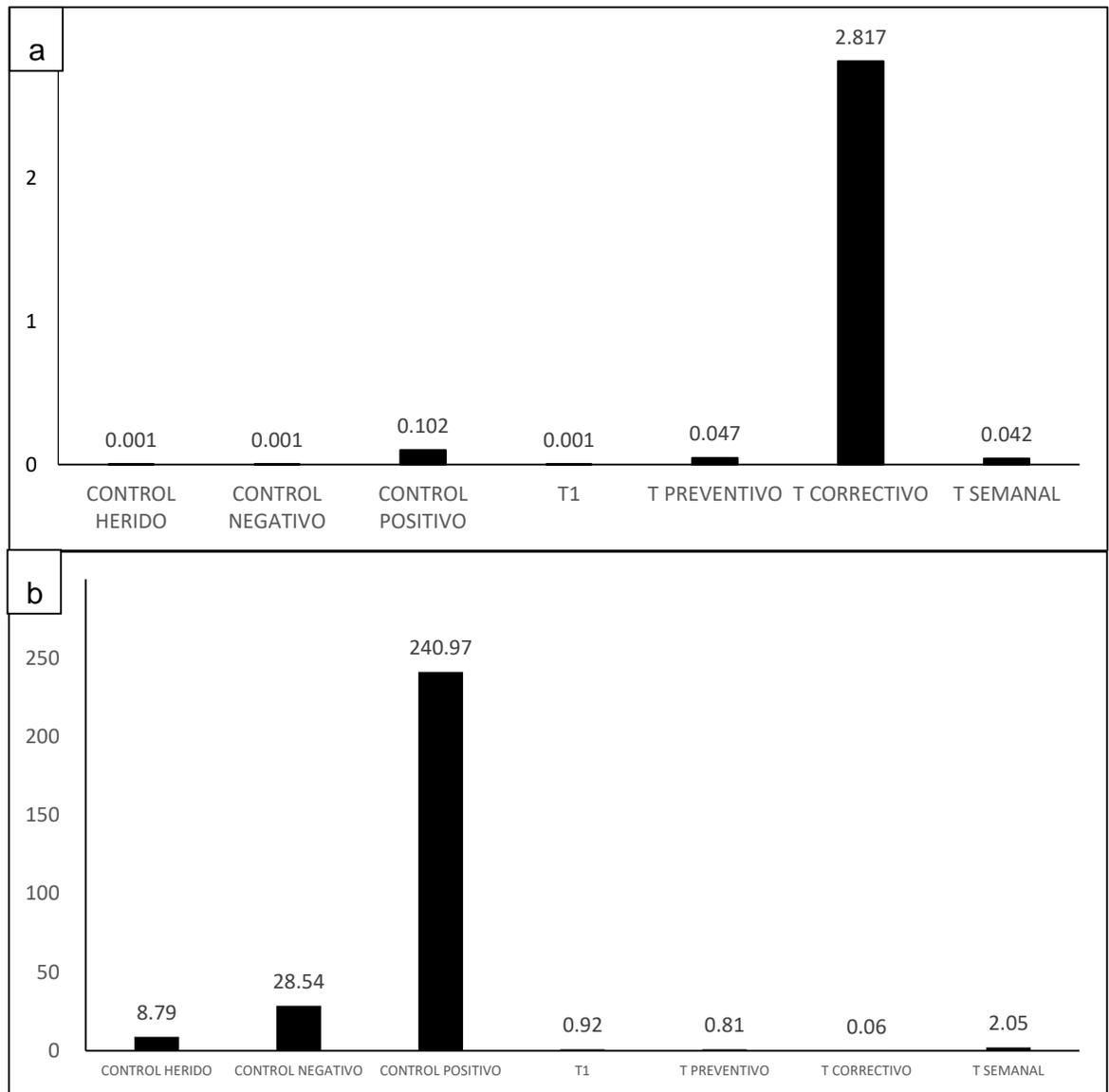


Figura 11. Expresión diferencial de los genes patogénesis related 1 (PR1a) (a) y chalcona sintasa (CHS) (b) en las plantas sometidas a diferentes tratamientos

8.4 Efecto de ADN propio en variables productivas del cultivo de jitomate

Variables morfológicas y biomasa

Para monitorear el estado físico de la planta, se midieron algunas variables morfológicas cuya diferencia entre tratamientos no fue significativa sugiriendo que la aplicación de ADN propio en 50ppm no tiene efecto en la longitud de las plantas ni el ancho de sus tallos después de los 25dda. Únicamente hubo diferencias significativas en el muestreo de los 8dda teniendo tallos más anchos las plantas del tratamiento 2, el cual recibió 2 aplicaciones del mismo tratamiento (Figura 12. a y b).

Por otro lado, la generación de biomasa si fue diferencial entre tratamientos, obteniendo mayor peso el grupo control tanto fresco como seco y en todas las secciones de la planta.

Variables de rendimiento

Al evaluar la cantidad de frutos, su tamaño y su peso entre tratamientos no hubo diferencias significativas como se observa en la figura 13.

Variables de calidad del fruto

Para identificar diferencias en las características de calidad de los frutos, se evaluaron las variables de colorimetría, firmeza, pH y sólidos solubles, las cuales podrían impactar directamente en la percepción sensorial como apariencia, sabor y textura del productor y consumidor. En cuanto al color, no hubo diferencia significativa entre los valores L a b de los tratamientos, en la figura 14.a se observa la distribución de la relación entre las variables L y a, aquí se observa que el tratamiento 2 tiene valores más alejados de la media para las dos variables mostrando una alta variabilidad. Para las variables que podrían definir el contenido de metabolitos y sabor del fruto los tratamientos obtuvieron valores mayores significativamente al grupo control el T2 para el pH y el T1 para los grados Brix.

Adicionalmente, en los valores de textura del fruto, se observa una mayor estabilidad en los grupos de tratamiento en comparación con el grupo control, el cual comienza con una mayor dureza (Figura 14.d) en el día 1 después de la cosecha (ddc) y sin diferencias en dureza al día 23 ddc igualando a los grupos con tratamiento. Los valores de deformación (Figura 14.e) muestran una diferencia importante del control a los 8 ddc, sugiriendo la pérdida de firmeza a la semana de cosechados, similar a la variable dureza, al día 23 ddc no hay diferencias significativas entre grupos. Finalmente, la variable trabajo (Figura 14.f) muestra una caída de firmeza en los grupos control y T1 hacia los 8 días ddc que se igual con el grupo T2 a los 23 ddc.

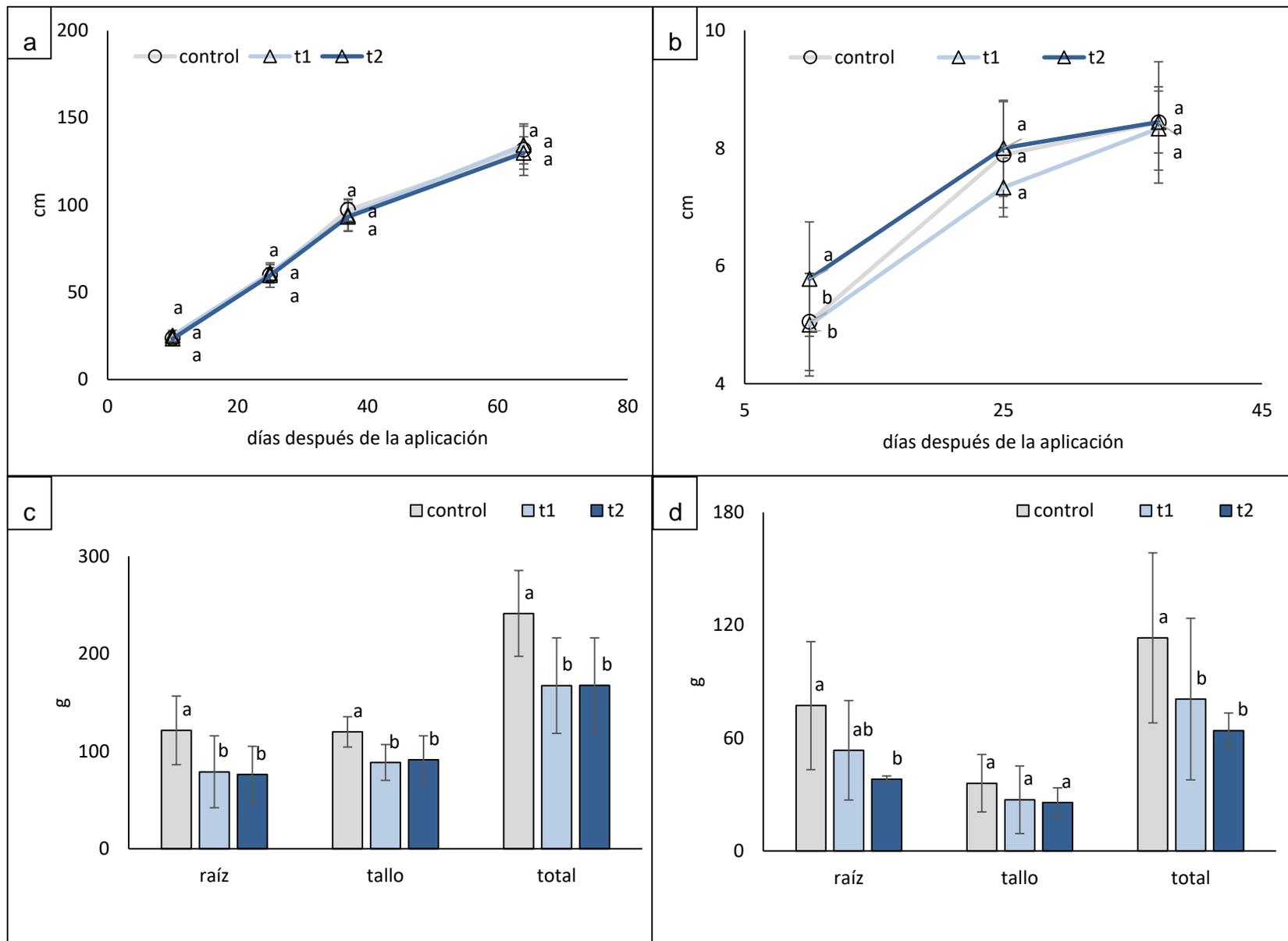


Figura 12. Crecimiento vegetal de las plantas evaluadas. a) altura de planta, b) ancho de tallo, c) peso fresco y d) peso seco

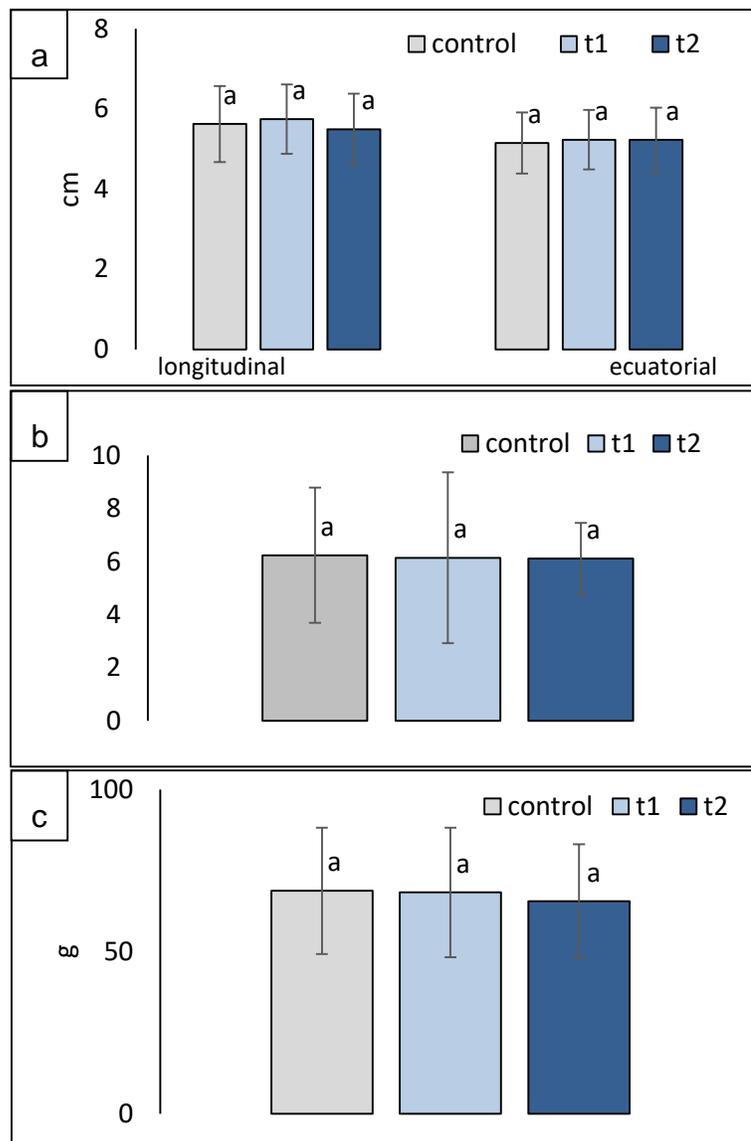


Figura 13. Variables de rendimiento del cultivo. A) Diámetro de fruto, b) número de frutos por planta, c) peso de fruto.

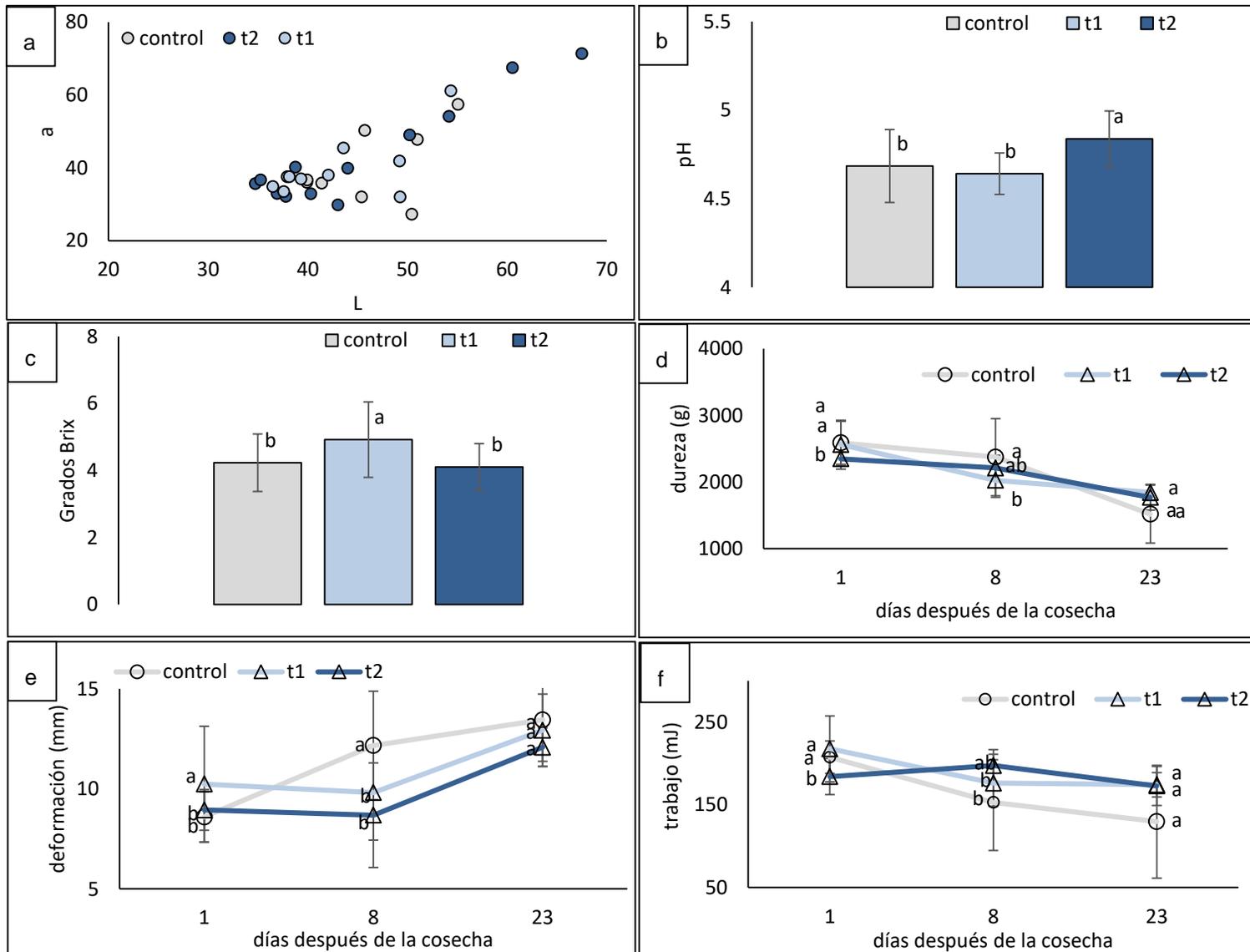


Figura 14. Variables de calidad del fruto. a) relación

IX. Discusión

Uno de los mayores efectos de la selección artificial de plantas con fines productivos que se ha destacado recientemente es la pérdida de la capacidad vegetal para identificar señales de peligro en el ambiente y responder a ellas oportunamente, lo cual permite a las plantas silvestres sobrevivir en ambientes con múltiples factores de estrés. De igual forma, se observa una disminución del metabolismo secundario vegetal, identificado principalmente por la síntesis de compuestos fenólicos y enzimas antioxidantes que protege a la planta de peligros potenciales y al mismo tiempo nos provee de sustancias bioactivas benéficas para los consumidores, relacionadas con la prevención de procesos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, desórdenes cardiovasculares y han demostrado tener propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiparasíticas (Pinto et al., 2021).

En el enfoque sostenible de la agricultura, propone promover la producción de metabolitos secundarios en los cultivos vegetales mediante la aplicación de factores de estrés en dosis no dañinas con base en el comportamiento hormético de estas respuestas (Vargas-Hernandez et al., 2017). Por lo anterior, es de suma importancia realizar experimentos para identificar la aplicación adecuada de cada tratamiento. En este trabajo se manejó el ADN propio como un eustresor biológico con el fin de activar el sistema inmune del jitomate y atenuar los síntomas de la enfermedad producida por *Fusarium oxysporum*.

Se identificó que marcadores de inmunidad evaluados permanecen activos como respuesta a la aplicación del ADN propio durante por lo menos 10 días después de su aplicación y esto sugiere una aplicación periódica del tratamiento cada 7-15 días. Comparado con otros elicitores evaluados anteriormente como el ácido salicílico, el peróxido y el quitosano (Mejía-Teniente et al., 2013b), la activación del sistema inmune por ADN propio tuvo una duración menor, pero hasta 10 veces más intensa, lo cual es esperado por ser una molécula tipo DAMP. En las variables PAL, SOD y peróxido de hidrógeno observamos una regulación mediante un ciclo de retroalimentación negativa, reportada anteriormente en algunos marcadores de inmunidad tales como los niveles de expresión del factor de transcripción WRKY33 (Li et al., 2020), un regulador maestro de

la respuesta inmune mediada por ácido jasmónico y patógenos necrotróficos (Birkenbihl et al., 2012).

Las respuestas inmunes a la aplicación tardía (52 días después del trasplante) de ADN propio, tuvieron una baja intensidad, siendo significativamente diferente al control, solo el peróxido de hidrógeno e incluso hubo una disminución de señal por parte de las otras variables en comparación con el control, esto sugiere una adaptación por parte de la planta a su entorno conforme crece. En este tiempo ha estado en contacto con otras moléculas de ADN propio y no propio y podría sufrir un proceso de desensibilización. Adicionalmente, se ha reportado que algunas hormonas reguladoras del sistema inmune vegetal como el etileno, al ser secretadas de forma diferencial dependiendo de la etapa fenológica en que se encuentren las plantas, ocasionan una respuesta diferencial dependiente de edad vegetal hacia los mismos estímulos (Baró-montel et al., 2019; Pieterse et al., 2012). Esto obedece al conocido intercambio de uso de energía entre el crecimiento y defensa a lo largo de la vida de la planta (Huot et al., 2014; Whitehead & Poveda, 2019). Para activar su sistema inmune con ADN propio se podrían evaluar concentraciones más altas de las evaluadas en plántulas. Por lo anterior, se sugiere que al utilizar ADN propio como un tratamiento agrícola se realice en etapas tempranas de la planta para mantener una baja concentración del tratamiento y esta se mantenga en una buena relación costo-beneficio.

En la evaluación del efecto de ADN propio en plantas con infección de *F. oxysporum*, se observó un aumento en la expresión del gen PR1a de casi tres veces la del control cuando el ADN fue aplicado una semana después de la inoculación de *F. oxysporum*, siendo estas plantas las más afectadas. En la expresión del gen CHS se observa un aumento de 240, 28.5, 8.8 y 2 veces la expresión del control en las plantas con únicamente la infección, plantas con únicamente el tratamiento de ADN, plantas con únicamente estrés mecánico en raíz y el tratamiento de ADN semanal, respectivamente. Estos resultados sugieren que el tratamiento de ADN puede desencadenar diferentes rutas de defensa dependiendo de otros factores, tales como estrés biótico presente y otras aplicaciones del tratamiento, estando la expresión del gen PR1a estrechamente relacionada con la ruta del ácido salicílico y la respuesta sistémica adquirida (Conrath, 2006) pero los tratamientos sin alta expresión en este gen presentan, de igual manera

activación en la defensa vegetal. Esta activación podría estar mediada por el ácido jasmónico que desencadena una alta expresión de la ruta de los fenil propanoides representada por la enzima PAL y el gen CHS. Por último, el tratamiento con ADN propio ha sido relacionado anteriormente con la ruta del ácido jasmónico (Zhou et al., 2023).

El tratamiento de ADN logró recuperar un fenotipo de grupo control en un grupo infectado con el tratamiento semanal de ADN propio, esto confirma los resultados de la cinética ya que la activación del sistema inmune vegetal que mantiene controlada la infección tendría una duración de 10 días aproximadamente. Aún a partir de una aplicación, los síntomas de la infección se vieron mitigados de forma similar a experimentos realizados anteriormente con ADN del patógeno (Serrano-Jamaica et al., 2021). En esta relación podemos comparar los efectos del tratamiento de ADN en plantas cuando es utilizado como un DAMP (propio) y cuando es utilizado como un PAMP (no propio, generalmente de patógenos), al ser más sensibles los organismos a su propio ADN, se puede observar una respuesta inmune a partir de dosis más pequeñas de ADN como 20 ug/mL a diferencia de los tratamientos de ADN no propio que son aplicados a partir de 150 ug/mL, considerando el proceso de extracción que hasta ahora sigue siendo complicado y costoso, esto es un factor importante a considerar, por otro lado, la materia prima para obtener ADN propio resulta ser altamente sostenible ya que puede tratarse de las mismas podas del cultivo que en ocasiones, significan un residuo cuyo manejo genera costos extras a los productores. De esta forma, la aplicación de ADN propio ofrece una alternativa efectiva y más sostenible que la aplicación del ADN no propio en escala productiva como se ha detallado en la publicación de revisión realizada como parte de esta tesis doctoral (Carbajal-valenzuela et al., 2021).

Sumado a la efectividad para mitigar los síntomas de una infección por *F. oxysporum*, la aplicación de ADN propio en cultivos de jitomate resultó no tener efectos adversos en variables agronómicas, lo cual sugiere que el gasto de energía necesario para la activación del sistema inmune por ADN propio, no interfiere con el gasto de energía que utiliza la planta para generar biomasa aérea, desarrollar flores y frutos y llenar el fruto. Se sabe que la presencia de *F. oxysporum* en cultivos de jitomate y otras especies ocasiona grandes pérdidas en el producto final por los síntomas clásicos que desarrolla en la planta, pero adicionalmente ocasiona una disminución en el crecimiento y desarrollo de

estas (Chaturvedi et al., 2022; Mejda et al., 2009; Response et al., 2023), esto pudiera ser explicado por la redirección de energía que la planta debe hacer para generar los mecanismos de defensa necesarios para sobrevivir, comúnmente descrito en la literatura (Figueroa-Macías et al., 2021; Neuser et al., 2019; Whitehead & Poveda, 2019). Por lo anterior, es necesario que un tratamiento aplicado desarrolle defensas en un nivel que al final no ocasionen un gasto de energía excesivo, tal como el conocido resistencia sistémica inducida, mediada por el ácido jasmónico (Choudhary et al., 2007) y el priming en jitomate y otras especies (Leibman-markus et al., 2023).

Finalmente, en la evaluación de variables agronómicas, el tratamiento de ADN no demostró tener un efecto bioestimulante que resaltar, pero demostró no gastar energía necesaria para el desarrollo y crecimiento de las plantas aún en su probado rol como elicitador del sistema inmune vegetal. Esta característica evita una disminución del rendimiento agrícola que un cultivo con infección por *F. oxysporum* pudiera presentar.

X. Conclusiones

El tratamiento de ADN propio a 50ppm en planas de jitomate activa la defensa vegetal y es mantenida durante por lo menos 10 días y las respuestas a este tratamiento dependen de la edad de la planta. Aminora los efectos adversos que *F. oxysporum* tiene cuando es inoculado en plantas de jitomate, incluyendo síntomas de la infección y disminución del crecimiento, especialmente cuando es aplicado semanalmente en etapas tempranas de la planta. El tratamiento no presenta efectos adversos en variables agronómicas del cultivo.

XI. Bibliografía

- Abdallah, N. A., Shah, D., Abbas, D., & Madkour, M. (2010). Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to fusarium wilt. *GM Crops*, 1(5), 344–350. <https://doi.org/10.4161/gmcr.1.5.15091>
- Ajillogba, C. F., & Babalola, O. O. (2013). Integrated management strategies for tomato fusarium wilt. *Biocontrol Science*, 18(3), 117–127. <https://doi.org/10.4265/bio.18.117>
- Akazeze, O. O., & Aduramigba-Modupe, A. O. (2017). Fusarium wilt disease of tomato:

- Screening for resistance and in-vitro evaluation of botanicals for control; the Nigeria case. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(1), 32–36. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.7.1.32-36>
- Alam, S. S., Shah, B., & Khan, N. (2016). *Study on the biological control of fusarium wilt of tomato* Study on the biological control of fusarium wilt of tomato Ilyas Hussain , Syed Sartaj Alam , Imran Khan , Bismillah Shah , Ahmad Khwaja Junaid , Syed Rizwan Ali Shah , Nazeer Ahmed , Mazhar Iqbal. 2(April).
- Ascencio-álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., & Gámez-Vázquez, A. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 114–120.
- Barbero, F., Guglielmotto, M., Capuzzo, A., & Maffei, M. E. (2016). Extracellular self-DNA (esDNA), but not heterologous plant or insect DNA (etDNA), induces plasma membrane depolarization and calcium signaling in lima bean (*Phaseolus lunatus*) and maize (*Zea mays*). *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101659>
- Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Baró-montel, N., Vall-llaura, N., Giné-bordonaba, J., Usall, J., Serrano-prieto, S., Teixidó, N., & Torres, R. (2019). Plant Physiology and Biochemistry Double-sided battle : The role of ethylene during *Monilinia* spp . infection in peach at di ff erent phenological stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144(May), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.048>
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22(9), 1087–1092. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Birkenbihl, R. P., Diezel, C., & Somssich, I. E. (2012). Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiology*, 159(1), 266–285. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192641>
- Bonner, M. R., & Alavanja, M. C. R. (2017). Pesticides, human health, and food security. *Food and Energy Security*, 6(3), 89–93. <https://doi.org/10.1002/fes3.112>
- Cakmak, I., & Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3), 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>
- Carbajal-valenzuela, I. A., Medina-ramos, G., Caicedo-lopez, L. H., Jim, A., Ortega-torres,

- A. E., Contreras-medina, L. M., & Torres-pacheco, I. (2021). *Extracellular DNA : Insight of a Signal Molecule in Crop Protection*. 1–20.
- Cartení, F., Bonanomi, G., Giannino, F., Incerti, G., Vincenot, C. E., Chiusano, M. L., & Mazzoleni, S. (2016). Self-dna inhibitory effects: Underlying mechanisms and ecological implications. *Plant Signaling and Behavior*, 11(4), 1–4. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1158381>
- Castro, P., Ramos, J., Estévez, S., & Rangel, A. (2004). Organophosphate pesticide residues in samples of tomato. *Revista de Ingeniería*, 20, 14–22.
- Chaturvedi, H., Singh, B., Jajoo, A., & Prakash, A. (2022). *Shielding of Photosynthetic Apparatus by Consortia of Bacterial Endophytes in Tomato Plants Suffering From Fusarium Wilt*. 4(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.831731>
- Chaverría, C. J., Gamiño, M. Á. M., Vázquez, J. R. Ch., Téllez, J. A. R., & Garza, E. (2012). *Guía para cultivar jitomate en condiciones de malla sombra en San Luis Potosí* (Issue SAGARPA-inifap).
- Choi, H. W., Manohar, M., Manosalva, P., Tian, M., Moreau, M., & Klessig, D. F. (2016). Activation of Plant Innate Immunity by Extracellular High Mobility Group Box 3 and Its Inhibition by Salicylic Acid. *PLoS Pathogens*, 12(3), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005518>
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
- Conrath, U. (2006). Systemic acquired resistance. *Plant Signaling and Behavior*, 1(4), 179–184.
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022–4034. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dickerson, D. P., Pascholati, S. F., Hagerman, A. E., Butler, L. G., & Nicholson, R. L. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiological Plant Pathology*, 25(2), 111–123. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(84\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(84)90050-X)
- Duran-Flores, D., & Heil, M. (2018). Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants. *Brain, Behavior, and Immunity*, 72, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.010>
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>

- Escobar, H., & Lee, R. (2009). Manual de producción de tomate bajo invernadero. In *Manual de producción de tomate bajo invernadero* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ferrusquía-Jiménez, N. I., Serrano-Jamaica, L. M., Martínez-Camacho, J. E., Sáenz de la O, D., Villagomez-Aranda, A. L., González-Chavira, M. M., Guerrero-Aguilar, B. Z., Torres-Pacheco, I., Feregrino-Pérez, A. A., Medina-Ramos, G., & Guevara-González, R. G. (2022). Extracellular self-DNA plays a role as a damage-associated molecular pattern (DAMP) delaying zoospore germination rate and inducing stress-related responses in *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, *71*(5), 1066–1075. <https://doi.org/10.1111/ppa.13545>
- Figueroa-Macías, J. P., Coll García, Y., Núñez, M., Díaz, K., Olea, A. F., & Espinoza, L. (2021). Plant Growth-Defense Trade-Offs: Molecular Processes Leading to Physiological Changes. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(693).
- García-Mier, L., Guevara-González, R. G., Mondragón-Olguín, V. M., Verduzco-Cuellar, B. del R., & Torres-Pacheco, I. (2013). Agriculture and bioactives: Achieving both crop yield and phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(2), 4203–4222. <https://doi.org/10.3390/ijms14024203>
- Girhepuje, P. V., & Shinde, G. B. (2011). Transgenic tomato plants expressing a wheat endochitinase gene demonstrate enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *105*(2), 243–251. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9859-5>
- Godínez-mendoza, P. L., Rico-chávez, A. K., Ferrusquía-jimenez, N. I., Carbajal-valenzuela, I. A., Villagómez-aranda, A. L., Torres-pacheco, I., & Guevara-gonzález, R. G. (2023). Science of the Total Environment Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. *Science of the Total Environment*, *894*(March), 164883. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164883>
- González, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, *27*(1), 1–7.
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium Wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, *55*(1), 23–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>
- Gupta, P. K. (2018). Toxicity of Fungicides. In *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition* (Third Edit, pp. 569–580). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00045-3>
- Hammond, J. B., & Kruger, N. J. (1988). Chapter 2 The Bradford Method for Protein Quantitation. *Ed Walker JM). Humana Press*, *10*(1), 25–32.
- Heil, M. (2009). Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in Plant Science*, *14*(7), 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.04.002>
- Henry, G., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society*

and Environment, 16(2), 257–268.

- Huffaker, A., Pearce, G., & Ryan, C. A. (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 10098–10103. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603727103>
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*, 7(8), 1267–1287. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature Reviews*, 444, 323–329.
- Kassambara, A. and Mundt, F. (2020) Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R Package Version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
- Khan, M. R., & Khan, S. M. (2002). Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. *Bioresource Technology*, 85(2), 213–215. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00077-9)
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., & Silva, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8849–8855. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8849>
- Koo, A. J. K., Gao, X., Daniel Jones, A., & Howe, G. A. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 59(6), 974–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.03924.x>
- Leibman-markus, M., Schneider, A., Gupta, R., Marash, I., & Rav-david, D. (2023). *Immunity priming uncouples the growth – defense trade-off in tomato*. <https://doi.org/10.1242/dev.201158>
- Li, P., Lu, Y. J., Chen, H., & Day, B. (2020). The Lifecycle of the Plant Immune System. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(1), 72–100. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1757829>
- Lin, W. C., Lu, C. F., Wu, J. W., Cheng, M. L., Lin, Y. M., Yang, N. S., Black, L., Green, S. K., Wang, J. F., & Cheng, C. P. (2004). Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research*, 13(6), 567–581. <https://doi.org/10.1007/s11248-004-2375-9>
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
- Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412->

- Ma, L. J., Van Der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P. M., Kang, S., Shim, W. B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J. R., Antoniw, J., Baker, S. E., Bluhm, B. H., ... Rep, M. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, *464*(7287), 367–373. <https://doi.org/10.1038/nature08850>
- Mandal, S., Mallick, N., & Mitra, A. (2009a). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*(7), 642–649. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.001>
- Mandal, S., Mallick, N., & Mitra, A. (2009b). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*(7), 642–649. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.001>
- Mao, P., Duan, M., Wei, C., & Li, Y. (2007). WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant and Cell Physiology*, *48*(6), 833–842. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm058>
- Matzinger, P. (2002). The danger model: A renewed sense of self. *Science*, *296*(5566), 301–305. <https://doi.org/10.1126/science.1071059>
- Mazzoleni, S., Carteni, F., Bonanomi, G., Senatore, M., Termolino, P., Giannino, F., Incerti, G., Rietkerk, M., Lanzotti, V., & Chiusano, M. L. (2015). Inhibitory effects of extracellular self-DNA: A general biological process? *New Phytologist*, *206*(1), 127–132. <https://doi.org/10.1111/nph.13306>
- Mejda, D., Ahmed, S., Hedia, B. O., Mohsen, M., & Bouzid, N. (2009). Salinity Effects on *Fusarium* Wilt Severity and Tomato Growth. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, *3*(January 2017).
- Mejía-Teniente, L., Duran-Flores, F. de D., Chapa-Oliver, A. M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M. M., Ocampo-Velázquez, R. V., & Guevara-González, R. G. (2013a). Oxidative and molecular responses in capsicum annum L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 10178–10196. <https://doi.org/10.3390/ijms140510178>
- Mejía-Teniente, L., Duran-Flores, F. de D., Chapa-Oliver, A. M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M. M., Ocampo-Velázquez, R. V., & Guevara-González, R. G. (2013b). Oxidative and molecular responses in capsicum annum L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 10178–10196. <https://doi.org/10.3390/ijms140510178>
- Michaud, J. P., Pell, J. K., & Vega, F. E. (2018). When insect endosymbionts and plant endophytes mediate biological control outcomes. *Biological Control*, *116*(November 2017), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.003>
- Mohammed, B. L., Hussein, R. A., & Toama, F. N. (2019). Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by endophytic rhizobacteria. *Energy Procedia*, *157*, 171–179.

<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.178>

- Möller, M., & Stukenbrock, E. H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 756–771. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.76>
- Montesano, M., Brader, G., & Palva, E. T. (2003). Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 73–79. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00150.x>
- Naika, S., Jeude, J., Goffau, M., Hilmi, M., & Dam, B. (2005). Cultivation of tomato: production, processing and marketing. In *Brassica oleracea* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.4067/S0718-95162012005000015>
- Narasimhamurthy, K., Soumya, K., Udayashankar, A. C., Srinivas, C., & Niranjana, S. R. (2019). Elicitation of innate immunity in tomato by salicylic acid and *Amomum nilgiricum* against *Ralstonia solanacearum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22(October), 101414. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101414>
- Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2004). The cellular localization of prosystemin: A functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta*, 218(3), 360–369. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1115-3>
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., & Viljoen, A. (2006). The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathology*, 55(2), 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01344.x>
- Neuser, J., Metzen, C. C., Dreyer, B. H., Feulner, C., van Dongen, J. T., Schmidt, R. R., & Schippers, J. H. M. (2019). HBI1 Mediates the Trade-off between Growth and Immunity through Its Impact on Apoplastic ROS Homeostasis. *Cell Reports*, 28(7), 1670-1678.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.029>
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., Clement Tsui, K. M., Srinivas, C., Niranjana, S. R., & Chandra, N. S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific Reports*, 6(January), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep21367>
- Nourmohammad, A., Otwinowski, J., & Plotkin, J. B. (2016). Host-Pathogen Coevolution and the Emergence of Broadly Neutralizing Antibodies in Chronic Infections. *PLoS Genetics*, 12(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006171>
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 935–942. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2019>
- Partida-Martínez, L. P., & Heil, M. (2011). The microbe-free plant: Fact or artifact? *Frontiers in Plant Science*, 2(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>
- Pecinka, L. (2013). *RNA extraction from plants using TRIZOL*. 7500.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharma, S. B., Klessig, D. F.,

- Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B., & Mundy, J. (2000). Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, *103*(7), 1111–1120. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00213-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00213-0)
- Pieterse, C. M. J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*(April), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pinto, T., Aires, A., Cosme, F., Bacelar, E., Morais, M. C., Oliveira, I., Ferreira-Cardoso, J., Anjos, R., Vilela, A., & Gonçalves, B. (2021). Bioactive (Poly)phenols, volatile compounds from vegetables, medicinal and aromatic plants. *Foods*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/foods10010106>
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2002). Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant and Soil*, *239*(1), 55–68. <https://doi.org/10.1023/A:1014904815352>
- Response, L. E., Maillot, Y., Mongelard, G., Qu, A., Demailly, H., Gutierrez, L., Pineau, C., Lecomte, S., Mathiron, D., Elboutachfaiti, R., Fontaine, J., Molini, R., & Petit, E. (2023). *Pathogen Stopping and Metabolism Modulation Are Key Points to *Linum usitatissimum* L. Early Response against *Fusarium oxysporum*.*
- Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2018). Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA? *Letters in Applied Microbiology*, *66*(1), 32–37. <https://doi.org/10.1111/lam.12822>
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>
- Saavedra, T. M., Figueroa, G. A., & Cauhi, J. G. D. (2017). Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in México. *Ciência Rural*, *47*(3). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160526>
- SADER. (2019). *Reporte del mercado de tomate rojo*. 1–20.
- SAGARPA. (2017). Agrícola Nacional JITOMATE. *Planeación Agrícola Naional 2017-2030*, 2–20.
- Serrano-Jamaica, L. M., Villordo-Pineda, E., González-Chavira, M. M., Guevara-González, R. G., & Medina-Ramos, G. (2021). Effect of Fragmented DNA From Plant Pathogens on the Protection Against Wilt and Root Rot of *Capsicum annuum* L. Plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.581891>
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F. F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., & Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, *468*(7322), 400–407. <https://doi.org/10.1038/nature09430>
- SINAVIMO. (2010). *Solanum lycopersicum*. *Solanum Lycopersicum*.

[https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/solanum-lycopersicum#:~:text=El tomate \(Solanum lycopersicum \) es,la taxonomía generalmente aceptada%2C es%3A&text=El tomate es una planta,planta erecta%2C rastrera o semirrecta.](https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/solanum-lycopersicum#:~:text=El%20tomate%20(Solanum%20lycopersicum%20),es,la%20taxonom%C3%ADa%20generalmente%20aceptada%20es%3A&text=El%20tomate%20es%20una%20planta,planta%20erecta%20rastrera%20o%20semirrecta.)

- Singleton, V. L., Rossi Jr., J. A., & Rossi J A Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/16/3/144>
- Solano-Alvarez, N., Valencia-Hernández, J. A., Rico-García, E., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velázquez, R. V., Escamilla-Silva, E. M., Romero-García, A. L., Alpuche-Solís, Á. G., & Guevara-González, R. G. (2021). A novel isolate of bacillus cereus promotes growth in tomato and inhibits clavibacter michiganensis infection under greenhouse conditions. *Plants*, 10(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10030506>
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., & Liu, X. (2004). Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Protection*, 23(3), 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.007>
- Srinivas, C., Nirmala Devi, D., Narasimha Murthy, K., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B. P., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F., & Chandra Nayaka, S. (2019). Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315–1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U. S., & Sharma, A. K. (2010). Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent Pseudomonas and Trichoderma harzianum formulation against Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.012>
- Validov, S. Z., Kamilova, F. D., & Lugtenberg, B. J. J. (2011). Monitoring of pathogenic and non-pathogenic Fusarium oxysporum strains during tomato plant infection. *Microbial Biotechnology*, 4(1), 82–88. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00214.x>
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R. G., Romero-Gomez, S. de J., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R. V., Alvarez-Arquieta, L. de L., & Torres-Pacheco, I. (2017). Plant hormesis management with biostimulants of biotic origin in agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01762>
- Vázquez-Hernández, M. C., Parola-Contreras, I., Montoya-Gómez, L. M., Torres-Pacheco, I., Schwarz, D., & Guevara-González, R. G. (2019). Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production. *Scientia Horticulturae*, 250(January), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.053>
- Vega-Muñoz, I., Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2018). Exogenous fragmented DNA acts as a damage-Associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in Lactuca sativa. *Functional Plant Biology*, 45(10), 1065–1072.

<https://doi.org/10.1071/FP18011>

- Whitehead, S. R., & Poveda, K. (2019). Resource allocation trade-offs and the loss of chemical defences during apple domestication. *Annals of Botany*, 123(6), 1029–1041. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz010>
- Workman, D. (2020). *tomato exports by country Workman 2020.pdf*. Tomatos Exports by Country. <http://www.worldstopexports.com/tomatoes-exports-country/>
- Worku, M., & Sahe, S. (2018). Review on Disease Management Practice of Tomato Wilt Caused Fusarium oxysporum in Case of Ethiopia. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 9(11), 9–12. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000460>
- Zehra, A., Meena, M., Dubey, M. K., Aamir, M., & Upadhyay, R. S. (2017). Synergistic effects of plant defense elicitors and Trichoderma harzianum on enhanced induction of antioxidant defense system in tomato against Fusarium wilt disease. *Botanical Studies*, 58(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0198-2>
- Zhou, X., Gao, H., Zhang, X., Khashi u Rahman, M., Mazzoleni, S., Du, M., & Wu, F. (2023). Plant extracellular self-DNA inhibits growth and induces immunity via the jasmonate signaling pathway. *Plant Physiology*, 192(3), 2475–2491. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad195>
- Zinovieva, S. V., Vasyukova, N. I., Udalova, Z. V., Gerasimova, N. G., & Ozeretskovskaya, O. L. (2011). Involvement of salicylic acid in induction of nematode resistance in plants. *Biology Bulletin*, 38(5), 453–458. <https://doi.org/10.1134/S1062359011050177>