

Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
División de Investigación y Posgrado  
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Actividad elicitora del DNA extracelular (eDNA) homólogo sobre el microorganismo benéfico *Trichoderma asperellum*

### TESIS

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

Presenta:  
M.C. Noelia Isabel Ferrusquía Jiménez

Dirigido por:  
Dr. Irineo Torres Pacheco

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Presidente \_\_\_\_\_ Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Secretario \_\_\_\_\_ Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez  
Vocal \_\_\_\_\_ Firma

Dr. Enrique Rico García  
Suplente \_\_\_\_\_ Firma

Dr. Sergio de los Santos Villalobos  
Suplente \_\_\_\_\_ Firma

Centro Universitario,  
Querétaro, Qro.  
Agosto, 2025  
México

**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 licenciatario 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 licenciatario.

 **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.

*Dedico este trabajo a mi esposo e hija,  
que dieron luz a mi vida en mis momentos más oscuros.*

*A mis padres, hermanas, y hermano,  
quienes nunca me soltaron y creyeron siempre en mí.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas las personas involucradas en la realización de este proyecto. A los doctores Irineo Torres Pacheco y Ramón Gerardo Guevara González, quienes siempre me guiaron y alentaron. A mis sinodales, por su asesoría y valiosa contribución.

Agradezco especialmente a mi esposo Fernando, que me dio compañía, consuelo y amor en todo el trayecto del doctorado, quien siempre me apoyo a salir adelante, aún cuando me encontraba enferma y débil, me sostuvo y con su amor me dio valentía para volver a empezar. Agradezco a mi hija Amelia por mostrarme una nueva forma de amar incondicionalmente y a ser valiente ante los momentos más difíciles. A mi amorosa familia, por siempre apoyarme y darme aliento para superar los obstáculos de la vida.

También, agradezco al Dr. Alvaro Cabrera y a la Dra. Virginia Medina, por su excelente labor profesional y valor humano, quienes atendieron mi salud en su estado más crítico y me dieron otra oportunidad de vida.

Gracias a todos mis compañeros del posgrado y del laboratorio CIAB que me ayudaron cuando más lo necesite. Al Dr. Joel Martínez Camacho, por su inigualable apoyo en la realización de este trabajo, a las maestras Linda Gilary Acosta Lizarraga, Byanka Cruz Moreno y Mónica Vanessa Oviedo Olvera, por su apoyo y amistad.

Finalmente, agradezco a la La Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

A todos, gracias infinitas.  
Gracias Dios, por esta vida.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL DNA.....	4
2.1.1 Función del DNA.....	5
2.1.2 DNA extracelular (eDNA) .....	5
2.2. ELICITACIÓN.....	6
2.3 El EDNA COMO DAMP (PATRÓN MOLECULAR ASOCIADO A DAÑO) .....	8
2.4 EDNA COMO ELICITOR.....	10
2.5 CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES AGRÍCOLAS .....	12
2.5.1 <i>TRICHODERMA SPP.</i> .....	13
2.5.2 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> .....	13
2.5.2.1 Antibiosis.....	14
2.5.2.2 Micoparasitismo.....	21
2.5.2.3 Competencia por nutrientes y espacio.....	21
2.5.2.4 Inducción de la resistencia .....	22
2.5.2.5 Capacidad bioestimulante .....	23
2.6 PRODUCTOS COMERCIALES Y PATENTES .....	23
3. HIPÓTESIS .....	24
4. OBJETIVOS .....	24
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 PREPARACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA <i>TRICHODERMA ASPERELLUM T8A</i> .....	25
5.2 OBTENCIÓN DE EDNA HOMÓLOGO.....	26
5.3 OBTENCIÓN DE EDNA HETERÓLOGO .....	27
5.4 DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA LA EXPOSICIÓN DE <i>TRICHODERMA ASPERELLUM</i> A EDNA <i>IN VITRO</i> .....	27
5.4.1 Evaluación del eDNA sobre el proceso germinativo de <i>Trichoderma asperellum</i> .....	27
5.4.2 Evaluación del eDNA sobre la actividad SOD y CAT, competencia por espacio, producción de giberelinas, auxinas, y VOC'S de <i>Trichoderma asperellum</i> .....	29
5.5 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA EN ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	30
5.5.1 Germinación de espora.....	30
5.5.2 Actividad SOD y CAT .....	31
5.5.3 Competencia por espacio/nutrientes .....	32
5.5.4 Liberación de VOC's .....	32
5.5.5 Secreción de auxinas totales y giberelina 3 (GA3) .....	33
5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA EXPOSICIÓN DE <i>TRICHODERMA ASPERELLUM</i> ELICITADO CON EDNA EN CHILE. .....	33
5.7 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA EN ENSAYOS <i>IN VIVO</i> .....	34

<i>5.7.1 Determinación de SOD, CAT y PAL en chile.....</i>	35
<i>5.7.2 Expresión relativa de los genes PR1a y ERF1.....</i>	35
<b>5.8 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<i>6.1 EFECTO DEL EDNA SOBRE EL PROCESO GERMINATIVO DE T. ASPERELLUM .....</i>	37
<i>6.2 EFECTO DEL EDNA SOBRE LAS ACTIVIDADES SOD Y CAT. ....</i>	39
<i>6.3 EFECTO DE T. ASPERELLUM ELICITADO CON EDNA SOBRE LA COMPETENCIA DE ESPACIO/NUTRIENTES CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS IN VITRO. ....</i>	40
<i>6.4 EFECTO DEL EDNA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE VOCs DE T. ASPERELLUM .....</i>	41
<i>6.5 EFECTO DEL EDNA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE GIBERELINA 3 Y AUXINAS TOTALES DE T. ASPERELLUM</i>	44
<i>6.6 EFECTO DEL EDNA SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE T. ASPERELLUM. ....</i>	45
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>8. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Perfil de VOCs emitidos por <i>Trichoderma asperellum</i> T1.....	20
Cuadro 2. Tratamientos para evaluar el proceso germinativo.....	28
Cuadro 3. Tratamientos para evaluar la bioestimulación de chile con <i>T. asperellum</i> elicitedo.....	34
Cuadro 4: Efecto de <i>T. asperellum</i> elicitedo con eDNA homólogo y heterólogo sobre el porcentaje de inhibición por competencia de espacio/nutrientes de <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	40
Cuadro 5: Análisis de VOC's de <i>T. asperellum</i> elicitedo con eDNA homólogo.....	42
Cuadro 6. Efecto de la aplicación de <i>Trichoderma asperellum</i> elicitedo con eDNA homólogo sobre plantas de chile bajo estrés hídrico.....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de doble hélice del DNA.....	4
Figura 2: Señalización celular mediada por elicidores en plantas.....	7
Figura 3: Enfoque biotecnológico del eDNA .....	11
Figura 4: Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.....	14
Figura 5. Ruta de Biosíntesis de VOCs representativos en <i>Trichoderma</i> spp.....	17
Figura 6. Esquema representativo de las interacciones de los VOCs emitidos por <i>Trichoderma</i> con otros hongos, bacterias y las raíces de las plantas.....	19
Figura 7. Distribución de tratamientos en caja de 24 pozos .....	29
Figura 8. Efecto del eDNA homólogo y heterólogo sobre el proceso germinativo de <i>T. asperellum</i> .....	38
Figura 9. Efecto del eDNA homólogo y heterólogo sobre <i>T. asperellum</i> , 120 horas después de la aplicación.....	39
Figura 10. Efecto del eDNA homólogo sobre la actividad antioxidante de <i>T. asperellum</i> , después de 24 horas de exposición.....	40
Figura 11. Cromatograma obtenido del análisis HS-SPME y GC-MS del hongo elicitado y sin eliciar.....	41
Figura 12. Efecto del eDNA homólogo en la producción de giberelina 3 por <i>T. asperellum</i> .....	44
Figura 13. Efecto del eDNA homólogo en la producción de auxinas totales por <i>T. asperellum</i> .....	45
Figura 14. Efecto del eDNA homólogo sobre el crecimiento radial de <i>T. asperellum</i> , 72 horas después de la exposición.....	45
Figura 15. Efecto de <i>Trichoderma asperellum</i> elicitado y no elicitado sobre las plantas de chile.....	46
Figura 16: Observación del efecto de <i>Trichoderma asperellum</i> elicitado con DNA homólogo sobre plantas de chile bajo estrés hídrico.	47
Figura 17. Esquema representativo del efecto del DNA extracelular homólogo ante diferentes dosis y tiempos de exposición propuesto.....	49

## **RESUMEN**

Los hongos del género *Trichoderma*, usados como agentes de control biológico, han demostrado ser eficientes en el combate de enfermedades vegetales. Sin embargo, estos presentan una baja persistencia en suelo debido a las condiciones físico-químicas del ambiente agrícola que enfrentan al ser aplicados, o a la incompatibilidad con las prácticas agrícolas actuales, lo cual impide una actividad antagónica efectiva. Por tal motivo, se han propuesto estrategias que permitan favorecer la permanencia y actividad de los agentes de control biológico con ayuda de estresores biológicos o elicidores. Un elicitor de nuevo enfoque es el DNA extracelular homólogo, el cual previamente ha sido reportado como una molécula que es reconocida por las células del organismo del cual proviene, cuyos efectos dependen de la concentración en la que se aplique. Por tal motivo, este trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes dosis de DNA extracelular homólogo sobre el microorganismo benéfico *Trichoderma asperellum*, con la finalidad de mejorar su persistencia en suelo a través de un mejor crecimiento, desarrollo, y a su vez, mejorar su actividad antagónica y bioestimulante. Los resultados obtenidos sugieren que dosis desde 5 hasta 200 ug/mL de DNA extracelular elicitán el desarrollo del hongo cuando es expuesto al tratamiento por 24 horas. De igual manera, se observó un incremento en la producción de giberelinas, en la actividad antioxidante de SOD y CAT, y un mayor número de VOCs emitidos; así como un incremento en el porcentaje de inhibición de *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum* en ensayos *in vitro*. En la aplicación del hongo elicitado a plantas de chile se observó un aumento de la expresión relativa de los genes PR1a y ERF1, involucrados en la activación de la defensa vegetal, así como el aumento de las actividades SOD, CAT y PAL de las plantas de chile.

**Palabras clave:** DNA extracelular, *Trichoderma*, control biológico, VOCs, elicitor.

## ABSTRACT

Fungi of the genus *Trichoderma*, used as biological control agents, have proven effective in combating plant diseases. However, they exhibit low persistence in soil due to the physicochemical conditions of the agricultural environment they encounter upon application, or due to incompatibility with current farming practices, which hinders effective antagonistic activity. Therefore, strategies have been proposed to enhance the persistence and activity of biological control agents by using biological stressors or elicitors. A novel elicitor under investigation is homologous extracellular DNA (eDNA), which has previously been reported as a molecule recognized by the cells of the organism from which it originates, with effects that depend on the concentration applied. The objective of this study was to evaluate various doses of homologous extracellular DNA on the beneficial microorganism *Trichoderma asperellum*, aiming to enhance its growth, development, and, consequently, its antagonistic and biostimulant activities. The results obtained suggest that doses ranging from 5 to 200 µg/mL of extracellular DNA elicit fungal development when exposed to the treatment for 24 hours. Similarly, an increase in gibberellin production, in the antioxidant activity of SOD and CAT, and the number of VOCs emitted was observed; as well as an increase in the inhibition percentage of *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum* in *in vitro* assays. Upon application of the elicited fungus to chili pepper plants, an upregulation in the relative expression of the PR1a and ERF1 genes—associated with plant defense activation—was observed, along with increased SOD, CAT, and PAL enzyme activities in the chili plants.

Key words: extracellular DNA, *Trichoderma*, biological control, VOCs, elicitor

## 1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las actividades económicas más importantes, la cual apoya al desarrollo y crecimiento de muchos países (Baker et al., 2020). En años previos, la productividad agrícola se ha visto amenazada por el aumento de enfermedades vegetales. Factores bióticos, como hongos y bacterias fitopatógenas, suelen causar pérdidas entre 10-40% en los cultivos, y son considerados la principal causa de pérdida de alimentos en todo el mundo (Ghorbanpour et al., 2018).

Actualmente, los pesticidas químicos son el método más utilizado para controlar las enfermedades vegetales causadas por factores bióticos (Zhang, 2018). Los pesticidas químicos han permitido mejorar los rendimientos agrícolas, sin embargo, a su vez se ha registrado un impacto severamente negativo en la salud humana, animal y ambiental (Singh et al., 2018). El uso progresivo e intensivo de pesticidas ha provocado la aparición de fitopatógenos resistentes a los mismos, contaminación de sistemas acuáticos y terrestres, alteraciones del microbioma natural, y afectaciones a polinizadores e insectos benéficos (Singh et al., 2018; Tyskiewicz et al., 2022).

Se han propuesto diferentes estrategias para contrarrestar los efectos negativos que han causado los pesticidas químicos, como el uso de agentes de control biológico en el Manejo Integral de Plagas y Enfermedades (MIPE) y prácticas agroecológicas, con la finalidad de reducir gradualmente el uso de pesticidas (Grasswitz et al., 2019). El uso de microorganismos (hongos y bacterias) como agentes de control biológico (ACB) es una herramienta innovadora que se sustenta en la aplicación de microorganismos vivos y sus metabolitos para prevenir y reducir las enfermedades agrícolas (Thambugala et al., 2020). Dentro de los microorganismos más estudiados y comercializados como ACB se encuentran *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Gliocadium* spp., *Beauveria bassiana*, y *Trichoderma* spp., los cuales son vendidos como productos líquidos o sólidos (Niu et al., 2020).

Las especies del género *Trichoderma* han sido ACB relevantes debido a que presentan diversas herramientas metabólicas que les permiten inhibir el crecimiento de

microorganismos fitopatógenos, y a su vez, promueven el crecimiento y desarrollo de los cultivos agrícolas, actuando como bioestimuladores naturales (Alfiky et al., 2021; Tyskiewicz et al., 2022). Comercialmente, la atención de su aplicación ha estado enfocada en su actividad de biocontrol de organismos fitopatógenos importantes como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Armillaria mellea*, y *Chondrostereum purpureum* (Behiry et al., 2023; Zehra et al., 2023). En particular, *Trichoderma asperellum* es una especie relevante dada su capacidad para producir una gran cantidad de metabolitos antimicrobiales, clasificados como volátiles (VOCs) y no volátiles, los cuales son eficientes en el control de fitopatógenos; y por su habilidad para activar la resistencia sistémica inducida (ISR) en las plantas (Wonglom et al., 2020; Pratap Singh et al., 2021).

Investigaciones recientes reportan la falta de persistencia de los ACB en el suelo, debido a incompatibilidad con prácticas agrícolas actuales, y a factores físicos y químicos del suelo agrícola, que impiden su estancia y desarrollo (de Moraes et al., 2021). Recientemente, se ha propuesto la elicitation de microorganismos usados como ACB como un método para mejorar su actividad antagónica y sobrelevar las barreras físico-químicas que enfrentan cuando son aplicados en el suelo (Godínez-Mendoza et al., 2023). Estudios previos reportan que diferentes estresores como las nanopartículas de SiO<sub>2</sub> y el DNA extracelular homólogo pueden tener efectos elicidores en el crecimiento y desarrollo de microorganismos como bacterias y oomicetos (Ferrusquía-Jiménez et al., 2022a-b; de Moraes et al., 2021; Boroumand et al., 2020; Tian et al., 2020); por lo tanto, el estudio detallado de moléculas elicitoras que mejore la aplicación de agentes de control biológico es relevante.

En particular, el uso del DNA como elicitor resulta importante debido a que es considerado una molécula orgánica no contaminante y especie-específica (Serrano-Jamaica et al., 2021). El DNA extracelular homólogo, es el DNA de una especie que por métodos físicos ha sido fragmentado, y es reconocido por las células de la especie de la cual provenga. Se han evaluado varias dosis de DNA homólogo en diferentes tipos de organismos, como plantas, hongos, bacterias e insectos (Mazzoleni et al., 2015a), sin embargo, hasta ahora su rol como elicitor solo ha sido comprobado en plantas. El uso del DNA extracelular homólogo como elicitor de plantas ha sido ampliamente estudiado, teniendo beneficios como la promoción del crecimiento vegetal, síntesis de metabolitos secundarios, y la defensa general contra

enfermedades (Vega-Muñoz et al, 2018; Chiusano et al, 2021). Hasta ahora se tiene poca información del uso del DNA extracelular como elicitador de microorganismos. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de la aplicación del DNA extracelular en el agente de control biológico *Trichoderma asperellum* en cuanto a su crecimiento, desarrollo, actividad antagónica y bioestimulante. De igual forma, la motivación para realizar esta tesis fue abordar los fundamentos para el desarrollo de nuevas estrategias que puedan ser implementadas en el manejo agroecológico e integrado de enfermedades vegetales.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Características generales del DNA

El DNA (ácido desoxirribonucleico) es un polinucleótido que tiene como característica principal ser una hélice de doble cadena que contiene la información hereditaria de los organismos. El DNA esta conformado por 4 bases nitrogenadas apareadas entre sí a través de puentes de hidrógeno, las cuales son: adenina (A), timina (T), citosina (C), guanina (G); donde la complementariedad entre las bases es A-T y C-G. Cada base esta unida a una molécula de azúcar y una molécula de fosfato, formando estos dos últimos un esqueleto azucar-fosfato orientado hacia el exterior de la molécula (Figura 1). La unión de una base nitrogenada + azúcar + fosfato se le conoce como nucleótido. Además, tiene la característica de ser antiparalela, es decir, el extremo 5' de una cadena esta emparejado con el extremo 3' de su cadena complementaria, y viceversa (Pray, 2008).

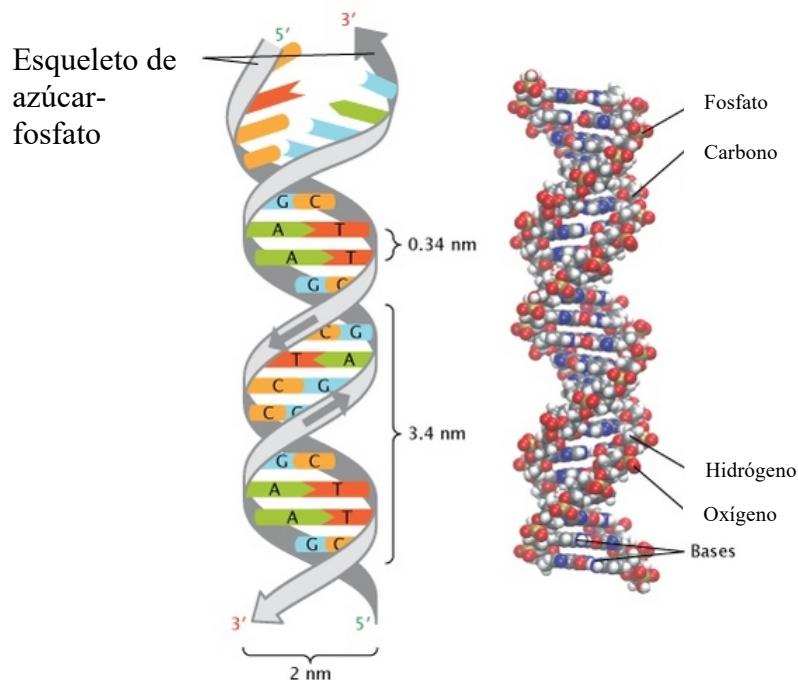


Figura 1. Estructura de doble hélice del DNA. La longitud entre cada par de bases (residuo) es de 0.34 nm, mientras que la longitud de 10 pares de bases es de 3.4 nm. Fuente: Nature Education ©, 2013.

### ***2.1.1 Función del DNA***

El DNA alberga la información genética esencial para el desarrollo, supervivencia y reproducción de los organismos. Para que estas funciones se lleven a cabo, las secuencias específicas de DNA —conocidas como genes— deben ser transcritas y traducidas en mensajes funcionales que dirigen la síntesis de proteínas. Las proteínas, a su vez, son moléculas complejas que desempeñan un papel central en la mayoría de los procesos celulares, actuando como catalizadores, estructuras, transportadores o reguladores. La información genética completa de un organismo se le conoce como genoma, y contiene la información para la síntesis de todas las proteínas que un organismo necesitará durante toda su vida ( Alberts et al., 2002).

En un organismo eucariota a mayor parte del DNA se concentra en su núcleo, sin embargo, también existe DNA en menor cantidad en las mitocondrias y los cloroplastos. En los organismos procariotas el DNA se encuentra en el citosol (Pray et al., 2008).

### ***2.1.2 DNA extracelular (eDNA)***

El DNA de forma natural se encuentra localizado al interior de las células, sin embargo, muchos estudios han demostrado que el DNA se puede encontrar en casi todos los tipos de ambientes, es decir, al exterior de la célula, y tiene la capacidad de realizar diferentes funciones. Para poder diferenciarlo de su forma intracelular, a este tipo de DNA se le conoce como DNA extracelular (eDNA). Pietramellara et al. (2009), define al eDNA como aquel originado por mecanismos pasivos o activos de extrusión o de lisis celular a partir del DNA intracelular.

Dentro de las principales funciones que se han atribuido al eDNA se encuentran: 1) la participación para dar estructura y estabilidad a los biofilms bacterianos; 2) la inmovilización de patógenos en las trampas extracelulares de neutrófilos en el cuerpo humano; 3) diseminación de información genética en el suelo y ambientes marinos; 4) protección del crecimiento apical de las raíces de las plantas por medio de la formación de una capa en la raíz que inmoviliza patógenos y 5) inhibición del desarrollo de individuos conespecíficos

(Nagler et al., 2018). Esta versatilidad eDNA, lo coloca com una molécula de gran interés para ser estudiado en diferentes áreas como la medicina, agricultura, y nanotecnología, entre otras.

## 2.2. Elicitación

La elicitación es un concepto ampliamente utilizado en el área agrícola. En su sentido más amplio un “elictor”, es toda aquella molécula que puede ser percibida por una célula como un factor de estrés de origen biogénico (Mejía-Teniente et al., 2010). El estrés percibido puede ser favorable o no favorable en las plantas, y dependera de la concentración y tipo de elictor. En plantas, se puede mencionar que un elictor es un eustresor, cuando genera un efecto positivo o un estrés positivo (eustrés); o bien puede actuar como un distresor si provoca efectos negativos (distrés) (Vázquez-Hernández et al., 2019). Un elictor necesita ser reconocido por un receptor celular, el cual activa la expresión de genes relacionados con la defensa celular. Dentro de los principales elicitores vegetales se encuentran el extracto de levadura, fitohornomas (ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno), peróxido de hidrógeno, poli/oligosacáridos, extractos celulares, ácidos nucleicos (DNA, RNA) y células completas (PGPBs, Micorrizas) (Guevara-González et al., 2019). Además, pueden clasificarse en exógenos o endógenos. Los exógenos son todas las moléculas externas a la planta, y pueden clasificarse como: los Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos/Patógenos (MAMPs/PAMPs), los Patrones Moleculares Asociados a Herbívoros (HAMPs) y los Patrones Moleculares Asociados a Nemátodos (NAMPs). Los elicitores endógenos son aquellos que se encuentran de manera interna en la célula, tales como los Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) (Mejía-Teniente et al., 2010; Vega-Muñoz et al., 2018).

En las plantas, uso de los elicitores ha estado destinado al incremento de tolerancia ante diferentes tipos de estrés o al incremento de fitoquímicos de interés (Figura 2). Estudios demuestran que aplicaciones de 18 mM de peróxido de hidrógeno en chile resultan eficientes para prevenir infecciones por el geminivirus del mosaico dorado del chile, debido a la inducción de respuestas relacionadas con la defensa (Mejía-Teniente et al., 2019). Otro estudio,

reporta el incremento de glicosilados de steviol, fitoquímicos responsables del poder endulcorante de la stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni cv. Morita II*), en respuesta a la aplicación de peróxido de hidrógeno, ácido salicílico y quitosano (Vázquez-Hernández et al., 2019). También, se ha observado que aplicaciones foliares de peróxido de hidrógeno y un oligosacárido de xiloglucano incrementan el contenido total de capsíato en *C. annuum L.* (Zunun-Pérez et al., 2017).

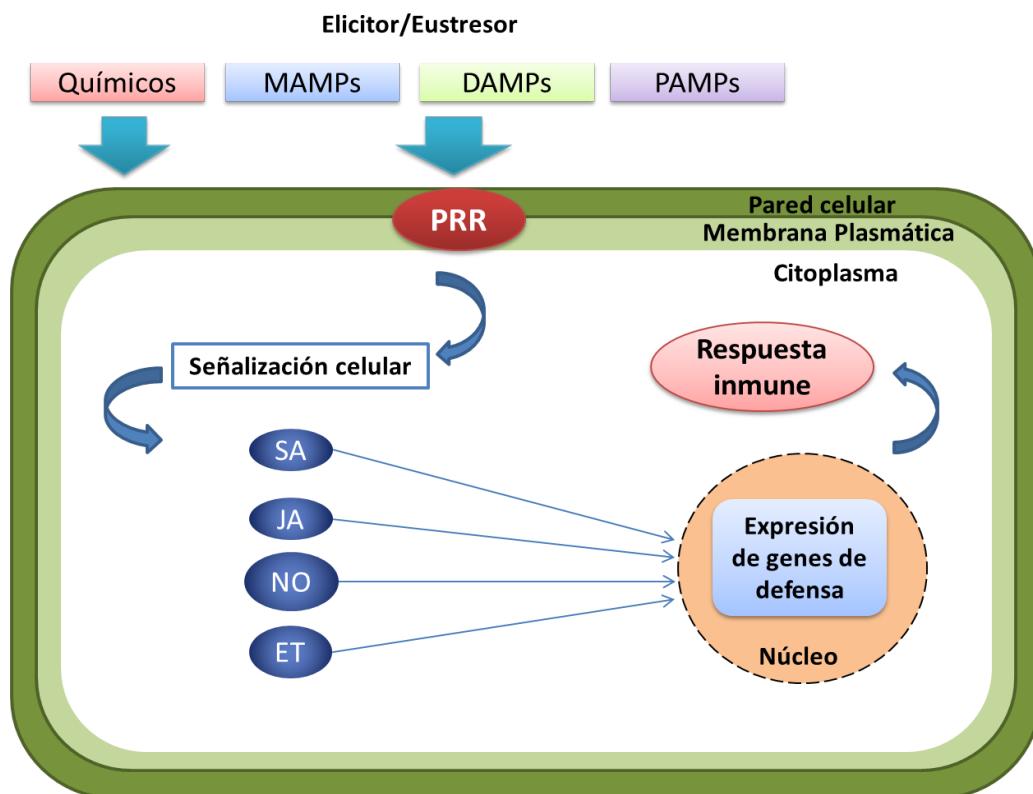


Figura 2: Señalización celular mediada por elicidores en plantas. Los elicidores pueden desencadenar respuestas de defensa vegetal. Incluyen sustancias químicas, PAMPs/MAMPs y DAMPs. Estos son reconocidos a nivel receptor celular y desencadenan respuestas que involucran a una o más moléculas señalizadoras como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET), y óxido nítrico (NO); para finalmente inducir de genes relacionados con la defensa. Fuente: Guevara-González et al., 2019.

La elicitation de especies vegetales ha sido una estrategia estudiada para favorecer el aumento de metabolitos secundarios útiles en la industrias farmacéutica y aromática. La mejora en la producción de metabolitos secundarios como alcaloides, antocianinas,

flavonoides, quinonas, terpenoides y esteroideos se ha logrado gracias a procesos de elicitation, por lo que la elicitation ha sido reconocida como la estrategia más factible en la práctica para aumentar la producción de metabolitos secundarios deseables de los sistemas de células, órganos y plantas (Thakur et a., 2018).

En el caso de los hongos, se ha usado también la elicitation para el aumento de metabolitos secundarios. Se observó que mediante la adición de micelio triturado, proveniente de hongos fitopatógenos, es posible incrementar el rendimiento de la producción de trichodermina, un metabolito secundario con actividad antifúngica, en *Trichoderma brevicompactum* (Shentu et a., 2013). Otro estudio, muestra que la producción de exoenzimas y VOCs con actividad antifúngica se incrementan cuando *T. harzianum*-E5 se encuentra en contacto con micelio inactivo de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Zhang et al., 2014). En este sentido los elicidores microbiales usados hasta la fecha entran dentro de la clasificación de PAMPs.

El estudio de la elicitation ha estado ligada a la generación de modelos horméticos, en los cuales son aplicadas diferentes dosis del factor de estrés para poder observar un efecto positivo o negativo. Actualmente, se han realizado propuestas como la implementacion de inteligencia artificial (IA) para precedir estrategias que favorezcan el manejo de la elicitation controlada (Rico-Chávez et a., 2022).

### **2.3 El eDNA como DAMP (Patrón Molecular Asociado a Daño)**

Los DAMPs son moléculas conservadas evolutivas originadas en el propio anfitrión que permiten a los organismos reconocer el “daño propio” (Heil, 2009) cuando estos aparecen en compartimentos anormales de manera extracelular o, si se trata de moléculas mitocondriales o nucleares, en citoplasma (Heil y Land, 2014, Yatim et al., 2017). Es decir, estas moléculas permanecen invisibles al sistema inmune cuando mantienen su rol fisiológico en estado normal, pero se hacen visibles (inmunogénicas) en situaciones de peligro (Heil y Vega, 2018). Se ha demostrado que los DAMPs activan señales de defensa como la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), aumento en los flujos de calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y la activación de quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Heil y Land, 2014; Duran-Flores y Heil, 2016). Algunas moléculas clasificadas como DAMP son: péptidos, proteínas,

carbohidratos, fragmentos de pared celular, ATP extracelular, DNA extracelular, y compuestos volátiles orgánicos (VOCs) (Ferrusquía-Jiménez et al., 2020).

El DNA es la fuente de información genética, pero puede salir de la célula al espacio extracelular principalmente durante la muerte celular, ya sea apoptosis o necrosis (Pisetsky, 2012). Las moléculas de DNA nuclear o mitocondrial fragmentado que aparecen en el compartimento extracelular o citosólico indican disfunción o daño celular, incluida la pérdida de la integridad de los núcleos, de las mitocondrias o de las células completas (O'Neill, 2013). Por lo cual el eDNA actúa como DAMP dando una señal de peligro que denota daño o lesión al organismo que a su vez desencadena la respuesta inmune (Duran-Flores y Heil, 2016).

Dos estudios reportan una nueva función del DNA extracelular: cuando este eDNA pertenece al anfitrión (DNA propio u homólogo) inhibe el desarrollo de una manera dependiente de la concentración, de un diverso rango taxonómico de organismos, incluyendo plantas, bacterias, protozoos, algas, hongos y animales (Mazzoleni et al., 2015a-b). En los organismos estudiados, la aplicación de eDNA heterólogo (eDNA que proviene de especies taxonómicamente distantes) no causó inhibición. Por esta razón, Mazzoleni et al., (2015a) sugiere que la inhibición por el eDNA homólogo es el agente causal de la retroalimentación negativa planta-suelo, y que es un mecanismo para el mantenimiento de la biodiversidad. Por otra parte, Veresoglou et al (2015), propone que el eDNA homólogo actúa como una molécula señal de estrés conespecífico, individuos conespecíficos se refiere a individuos de la misma especie, la cual permite indicar a los conespecíficos un medio no apto para la supervivencia, en lugar de actuar como una molécula inhibitoria.

Trabajo previo de Duran y Heil, (2014) provee información experimental sugiriendo la acción del eDNA homólogo como una señal de estrés, es decir, un DAMP. Se observó que la aplicación de homogenizados de hojas conespecíficos a hojas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) inducen el desarrollo local de especies reactivas del oxígeno (ROS) y otras respuestas relacionadas a la resistencia, mientras que homogenizados de otras especies de plantas no activaron ninguna respuesta estadísticamente significativa sobre el frijol (Duran y Heil, 2014). Por otro lado, estudios posteriores indican que el DNA de plantas o insectos induce la despolarización del plasma de membrana e incrementa los flujos intracelulares de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Barbero et al., 2016), lo cual también es concebido como una respuesta de

estrés. Además, se ha observado que el eDNA actúa como DAMP e induce cambios en la metilación del DNA y respuestas relacionadas a la defensa en lechuga (Vega et al., 2018). Los estudios anteriores apuntan que el DNA extracelular, obtenido mediante técnicas de extracción de DNA genómico total y su posterior fragmentación por sonicación (Barbero et al., 2016; Vega et al., 2018), actúa como un patrón molecular asociado a daño, y tiene la capacidad de limitar el crecimiento del anfitrión al indicar daño o peligro para la supervivencia. Recientemente, un estudio confirma que la aplicación de ARN extracelular genera efectos similares a los encontrados por el DNA extracelular, clasificándolo también como un DAMP. Dicho estudio demostró el efecto protector de la aplicación de ARN extracelular contra infecciones virales y bacteriales en plantas de chile (Kim et al., 2022).

## 2.4 eDNA como elicitor

El DNA extracelular (eDNA) puede ser entendido como un elicitor de tipo biogénico endógeno, y también se encuentra clasificado como un DAMP. Como se mencionó anteriormente, existen varios estudios donde el eDNA genera respuestas relacionadas con la defensa o activación de la inmunidad en plantas y animales, como lo es la generación de ROS, activación de MAPKs y el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Choi y Klessig, 2016; Vega et al., 2018; Duran-Flores y Heil, 2017); además, otros estudios reportan su reconocimiento sobre microorganismos como bacterias, hongos y algas, provocando un fenómeno de inhibición del desarrollo (Mazzoleni et al., 2015a-b; Duran-Flores y Heil, 2015). Derivado de lo anterior, el estudio del eDNA como un modulador de la respuesta inmune celular, o bien como un elicitor, se hace interesante desde una perspectiva evolutiva y tecnológica al estar presente en todos los organismos vivos y ser especie-específico.

Esta área de conocimiento ha llevado al planteamiento de nuevas propuestas donde se establece una tecnología dual del eDNA homólogo (Figura 3). En esta propuesta el eDNA homólogo puede ser utilizado en altas concentraciones para suprimir el desarrollo celular de la especie de la cual proviene. Por otro lado, la tecnología puede ser aplicada desde la perspectiva de la elicitation, utilizando bajas dosis de eDNA homólogo, que provoquen respuestas controladas favorables de ciertos procesos celulares relacionados con la

supervivencia (Ferrusquía-Jiménez et al., 2020). De esta manera, puede ser posible pensar en la generación de biopesticidas (Mazzoleni et al., 2014) o bien vacunas para plantas (Quintana-Rodríguez et al., 2018). Así mismo, la tecnología puede representar el punto de partida para la generación de paquetes biotecnológicos altamente específicos para generar respuestas inmunes positivas, mejor entendido como eustrés, que favorezcan la protección del organismo contra ataques bióticos (Ferrusquía-Jiménez et al., 2020).

Considerando la vía de la elicitation como una posible estrategia para potenciar las capacidades de supervivencia de los cultivos, es posible imaginar que esta propuesta pueda ser abordada para la elicitation de microorganismos de interés agrícola, los cuales muchas veces se encuentran en grandes desventajas cuando son aplicados como parte de un programa de control biológico. La activación de la respuesta inmune podría ser percibido como mejorías en la persistencia de los microorganismos en diferentes ambientes, así como una actividad antagónica potenciada mediante el incremento de metabolitos o enzimas relacionadas con su actividad de supervivencia, que favorezca su desarrollo y establecimiento para los fines agrícolas deseados.

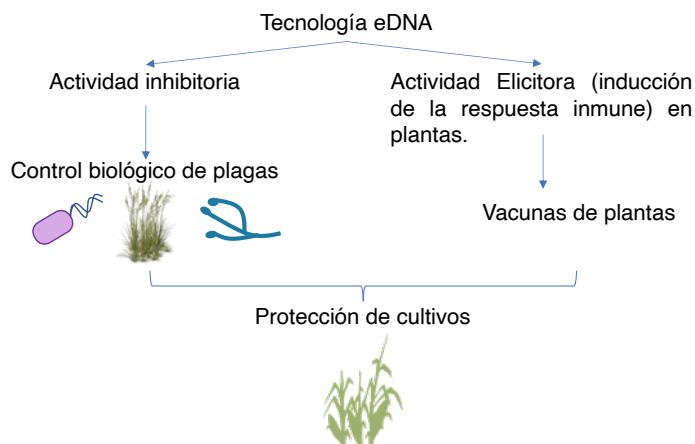


Figura 3: Enfoque biotecnológico del eDNA. Propuesta tecnológica para la obtención de vacunas vegetales y herramientas de control biológico. Fuente: Ferrusquía-Jiménez et al., 2021.

## 2.5 Control biológico de enfermedades agrícolas

El control biológico es una forma de “manejo de plagas ecológico” que usa un tipo de organismo, los “enemigos naturales”, para controlar a otro organismo, que se comporta como plaga (Hoddle y Van Driesche, 2009). Los enemigos naturales incluyen a los parasitoides, predadores, nemátodos entomopatogénicos, microorganismos competidores, hiperparásitos de patógenos de plantas, organismos que producen toxinas, denominada antibiosis o alelopatía (Flint, 2012; Heimpel y Mills, 2017). El control biológico puede ocurrir de diferentes formas: forma natural; por medio de la introducción y establecimiento clásico de agentes foráneos; por medio la liberación de agentes nativos o foráneos para aumentar poblaciones; o mediante la liberación de agentes nativos o foráneos conservados o mejorados. Las liberaciones aumentativas pueden ser inoculativas, construyendo poblaciones que se espera actúen durante generaciones, o bien inundativas, donde se espera que los organismos liberados generen reducciones inmediatas del organismo plaga (Baker et al., 2020).

Esta es una alternativa de manejo de las enfermedades agrícolas que puede implementarse dentro de programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) convencional, así como en la producción orgánica de alimentos (Zavaleta, 1994, Baker et al., 2020). Entre los microorganismos más importantes usados como agentes de control biológico de enfermedades del suelo se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF), como *Actinomucor elegans* y *Podospora bulbillosa*, los hongos micorrícicos arbúsculares y algunas especies del género *Trichoderma* (Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Kazerooni et al., 2022). Los principales mecanismos responsables del control biológico de hongos y bacterias patógenas son: 1) la competencia por los nutrientes o espacios en la rizósfera de las plantas; 2) la inducción de resistencia sistémica inducida (RSI); y 3) la producción de metabolitos antimicrobianos (Kloepper et al., 2004).

### **2.5.1 *Trichoderma* spp.**

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* (División- Ascomycota, Subdivisión-Pezizomycotina, Clase- Sordariomycetes, Orden-Hypocreales, Familia- Hypocreaceae) han sido conocidos desde 1920 por su actividad como agentes de biocontrol (BCA- 'biocontrol agents') (Samuels, 1996). Estos hongos se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo, y pueden ser aislados a partir del suelo, madera en descomposición, u otras formas de materia orgánica vegetal. Se caracterizan por tener un rápido crecimiento y una alta producción de esporas (conidios) en varios tonos de verde (Howell, 2003). Pueden ser usados para mejorar la salud general de los cultivos o para incrementar la habilidad natural de degradar compuestos tóxicos por algunas plantas en suelo y agua. A un gran número de estos hongos se les ha clasificado como hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF-plant growth promoting fungi, por sus siglas en inglés), considerados como bioestimulantes naturales. De forma comercial, la atención en su uso ha estado sobre su actividad de biocontrol, ya que han demostrado ser eficientes en el control de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Armillaria mellea* y *Chondrostereum purpureum* (Benítez et al., 2004; El-Komy et al., 2015; Tys'kiewicz et al., 2022). Dentro de las especies mejor estudiadas del género, debido a sus características de biocontrol, se encuentran *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens*, y *T. viride*, la cuales, en su mayoría, también exhiben una alta capacidad bioestimulante (López-Bucio et al., 2015; Guzmán-Guzmán et al., 2019; Tys'kiewicz et al., 2022).

### **2.5.2 Mecanismos de acción de *Trichoderma***

*T. asperellum* es una especie representativa del grupo con diferentes mecanismos de acción para prevenir enfermedades causadas por fitopatógenos (Figura 4). Dentro de sus principales formas de acción se encuentra la competencia por nutrientes y espacio, la secreción de enzimas extracelulares, inducción de resistencia sistémica, promoción de tolerancia a salinidad y estrés osmótico, producción de metabolitos secundarios no volátiles y compuestos volátiles con bioactividad, así como la promoción del desarrollo y crecimiento vegetal (Zhang et al., 2014; López-Bucio et al., 2015).

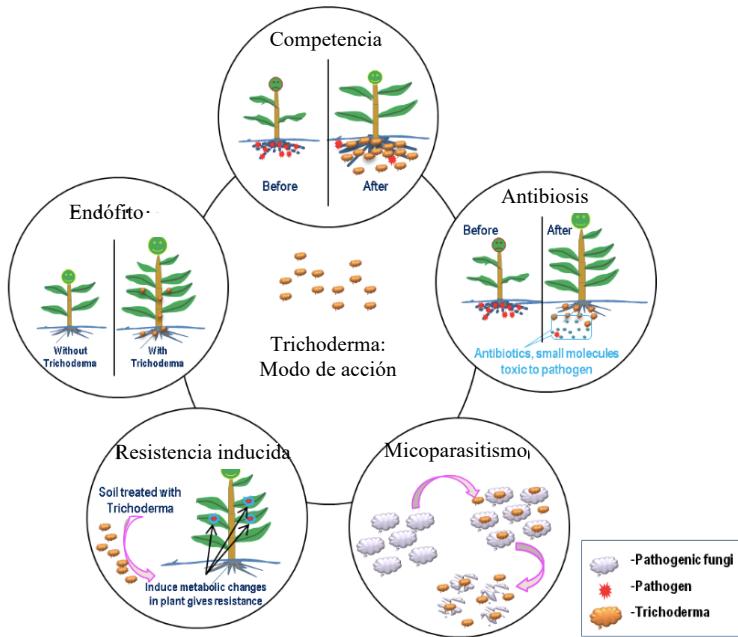


Figura 4: Mecanismos de acción de Trichoderma spp. Fuente: Waghunde et al., 2016.

### 2.5.2.1 Antibiosis

El mecanismo de antibiosis está reportado comúnmente en varias especies de Trichoderma spp. Este mecanismo de acción consta en la producción de compuestos pequeños difusibles, denominados metabolitos secundarios, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Benítez et al., 2004). Los metabolitos secundarios son un grupo heterogéneo de compuestos naturales cuya producción tiene el objetivo de mediar la supervivencia u otras funciones como competencia, simbiosis, diferenciación, del organismo que los produce (Demain y Fang, 2000).

Los hongos del género Trichoderma son bien conocidos por su producción de metabolitos con actividad antibiótica. Esta producción de antibióticos usualmente se combina con otros mecanismos de control como el micoparasitismo, la producción de enzimas degradadoras, competencia y la inducción de resistencia (Reino et al., 2008). La producción de metabolitos secundarios es dependiente de la cepa, e incluye compuestos antifúngicos volátiles y no volátiles, como el 6-n-pentil-6H-pyran-2-1 (6PP), gliotoxina, viridina, harzianopiridona, harziandiona y peptabioles (Butt et al., 2001). Una mutante de *T. harzianum*, cepa 2413, con niveles altos de producción de enzimas extracelulares y de α-pyrone incrementaron la

resistencia contra *R. solani* y *B. cinerea*, bajo diferentes condiciones ambientales (Rey et al., 2001). En *T. harzianum*, se ha identificado la producción de un metabolito lladamo iso-HA (iso- Ácido harziánico), un esteroisómero del ácido harziánico, el cual ha demostrado actividad antibiotica por medio de la inhibición de crecimiento de *R. solani* and *S. sclerotiorum*, *in vitro*. Además, se observó que la aplicación del iso-HA en plantas de jitomate promovió también su desarrollo (Vinale et al., 2014).

Los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) constituyen los productos finales de varias vías metabólicas, incluyen muchos compuestos como los sesquiterpenos, alcoholes, cetonas, entre otros (Korpi et al., 2009). Un estudio realizado demuestra que la combinación de VOCs pueden inhibir significativamente el crecimiento del micelio y el proceso germinativo de *F. oxysporum f. sp. cubense* (Yuan et al., 2012). Otro estudio demuestra que cepas de *T. atroviride* y *T. asperellum* producen una alta cantidad de metabolitos antimicrobianos, clasificados como compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, los cuales son eficientes para inhibir el crecimiento de fitopatógenos como *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium sporotrichoide*, *Fusarium verticillioides* y *Colletotrichum acutatum*, entre otros (Stracquadanio et al., 2020).

#### **2.5.2.1.1 Compuestos orgánicos volátiles sintetizados por *Trichoderma spp.***

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs-Volatile organic compounds) son intermediarios y productos finales de diversas rutas metabólicas, producidos por plantas, bacterias y hongos. Aproximadamente más de 300 VOCs, a partir de 96 especies fúngicas, pertenecen a la clase estructural de los alcoholes (isómeros de butanol, pentanol, octanol), hidrocarburos, cetonas, terpenos, alcanos y alquenos (Effmeert et al., 2012).

La producción de VOCs por microorganismos es ampliamente afectada por diferentes condiciones de crecimiento como temperatura, disponibilidad de nutrientes, y condiciones de luz-oscuridad. Además, las interacciones con otros microorganismos también modifican su producción (Zeilinger y Schuhmacher, 2013).

Las especies del género *Trichoderma* producen diversos compuestos volátiles y no volátiles, incluyendo a los peptabioles, sideforófatos, policétidos, terpenoides y pirones. En su genoma

se han descubierto un gran número de genes relacionados con el metabolismo secundario (Cruz-Magalhães et al., 2022). En *Trichoderma* la producción de VOCs y otros metabolitos secundarios esta usualmente combinada con otros mecanismos como la competencia por espacio y la liberación de enzimas degradadoras de pared celular, y se ha identificado que muchos de estos compuestos tienen actividad antimicrobiana. Además, los metabolitos secundarios han demostrado tener un rol en la activación de la inmunidad vegetal y en la mejora del crecimiento y desarrollo (Vinale et al., 2008; Phoka et al., 2020).

a) *Biosíntesis de VOCs en Trichoderma spp.*

*Trichoderma* spp. tiene un gran potencial como agente de biocontrol gracias a su capacidad para producir VOCs. Los VOCs son típicamente compuestos de bajo peso molecular (100-500 Dalton), fácilmente evaporables, y generan un aroma distintivo (Wonglom et al., 2020). Estos compuestos volátiles pertenecen a diferentes grupos químicos como los mono- y sesquiterpenos, alcoholes, cetonas, ésteres y lactonas (Patil et al., 2016). Se ha identificado que los VOCs de hongos son sintetizados a partir de diferentes precursores como aminoácidos, acetato, ácidos grasos y ceto-ácidos. Los VOCs del grupo de los terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos, son sintetizados a partir del acetil-CoA de la vía del mevalonato y son convertidos a sus estructuras finales por la acción de sintetasas de terpeno (Zeilinger y Schuhmacher, 2013) (Figura 5-A). Existe una gran diversidad estructural de terpenos y sesquiterpenos que supera en número a la cantidad de sintetasas de terpeno encontradas en los hongos. Sin embargo, esta gran diversidad de moléculas se puede explicar debido al mecanismo de catálisis que tienen las sintetasas de terpeno, las cuales pueden catalizar la formación de más de un tipo de terpeno o sesquiterpeno. De esta manera, con un solo tipo de sintasa se pueden generar distintos tipos de moléculas.

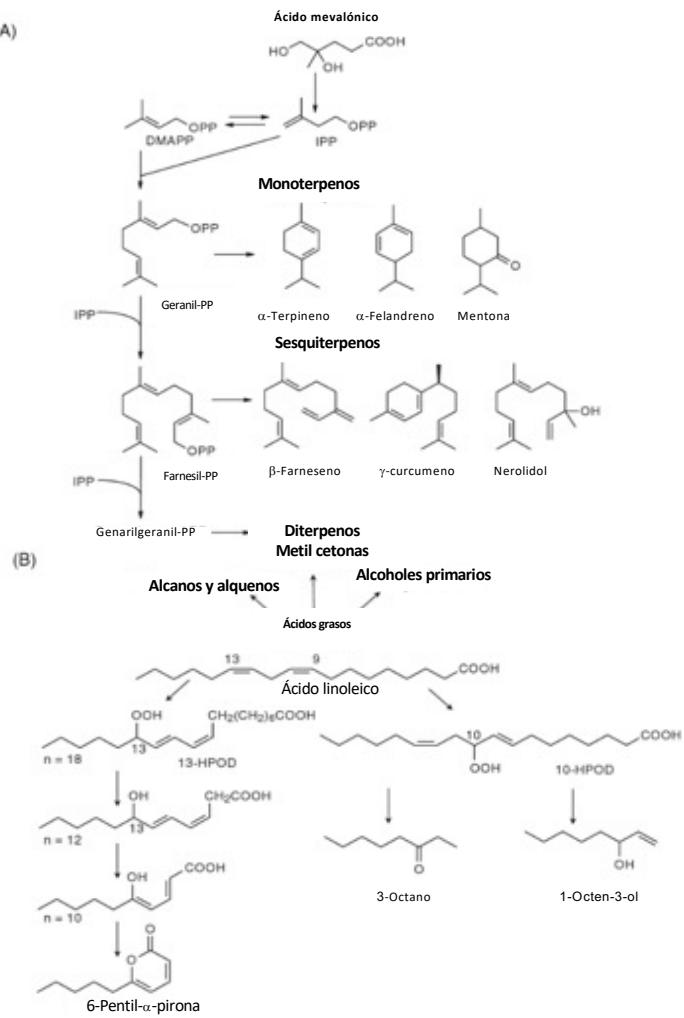


Figura 5. Ruta de Biosíntesis de VOCs representativos en *Trichoderma* spp. A) Monoterpenos y sesquiterpenos son obtenidos por la conjugación de difosfato de dimetilalilo (DMAPP) con unidades de isopentil difosfato (IPP) por vía geranil difosfato (geranil-PP) y farnesil difosfato (farnesil-PP). B) Los ácidos grasos son precursores importantes para la formación de VOCs, incluyendo a los alcanos alquenos, metil cetonas, alcoholes primarios, volátiles-C8 y 6PP (6-pentil- $\alpha$ -pirona). Fuente: Zeilinger y Schuhmacher, 2013.

Otros grupos de VOCs como las metil cetonas, alcanos, alquenos, alcoholes primarios, pironas, y los volátiles de 8 carbonos (volátiles-C8) se generan a partir de ácidos grasos (Figura 5-B). El 6-PP (6-pentil- $\alpha$ -pirona) se deriva del ácido linoleico.

Se propone que el ácido linoleico se oxida a 13-hidroperóxido-dieno (13-HPOD), el cual posteriormente se metaboliza por  $\beta$ -oxidación seguido de isomerización para dar como resultado al ácido 5-hidroxi-2,4-decenoico; finalmente, este hidroxi-ácido se esterifica para formar 6-PP. Los volátiles-C8 se producen también a partir del ácido linoleico por oxidación para generar el ácido 10-hidroperoxioctadeca-8,12-dienoico. Este último posteriormente es escindido por una liasa de hidroperóxido para obtener compuestos de 8 y 10 carbonos (Zeilinger y Schuhmacher, 2013).

b) *Actividad de los VOCs emitidos por Trichoderma spp.*

Dadas sus características, los VOCs pueden difundirse con facilidad a través de la membrana celular para llevar a cabo su actividad. Además, los VOCs pueden transportarse a través de los poros interconectados que se forman en las capas del suelo e influir en diferentes procesos como la nitrificación, mineralización, y mediar procesos de desarrollo en los hongos (Wheatley, 2008). Dentro de las actividades reportadas para VOCs emitidos por *Trichoderma* se encuentra la actividad antifúngica, antibacteriana, y nematicida. Dichas actividades confieren protección a las raíces de las plantas, previniendo el ataque de microorganismos fitopatógenos. Dentro de los VOCs más relevantes se encuentran aquellos con actividad antifúngica como los sesquiterpenos, el 6-PP (6-pentil- $\alpha$ -pirona), 1-octen-3-ol, 3-octanona, 3-octanol, y 1-octen-3-ona (Patil et al., 2016).

Además de esta actividad antimicrobiana, se ha reportado que diferentes VOCs promueven el crecimiento vegetal y la inducción de la respuesta de defensa de las plantas (Vinale et al., 2008; Phoka et al., 2020). Por ejemplo, se ha reportado que el 6-PP, inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* y algunas especies de *Fusarium*; sin embargo, también se ha observado que este mismo compuesto en bajas concentraciones promueve el crecimiento vegetal (Zeilinger y Schuhmacher, 2013).

Entre las especies de *Trichoderma* se ha encontrado que los perfiles de VOCs difieren en cuanto a la cantidad y variedad de VOCs que son emitidos. Generalmente en cada especie se encuentran entre 15 y 25 VOCs, donde al menos uno tiene actividad fungicida (Ruangwong et al., 2021). Dado que los VOCs son liberados en forma de mezcla, se propone que estos

actúan de manera sinérgica para tener un efecto potenciado en cuando a su actividad antimicrobiana (Wonglom et al., 2020) (Figura 6).

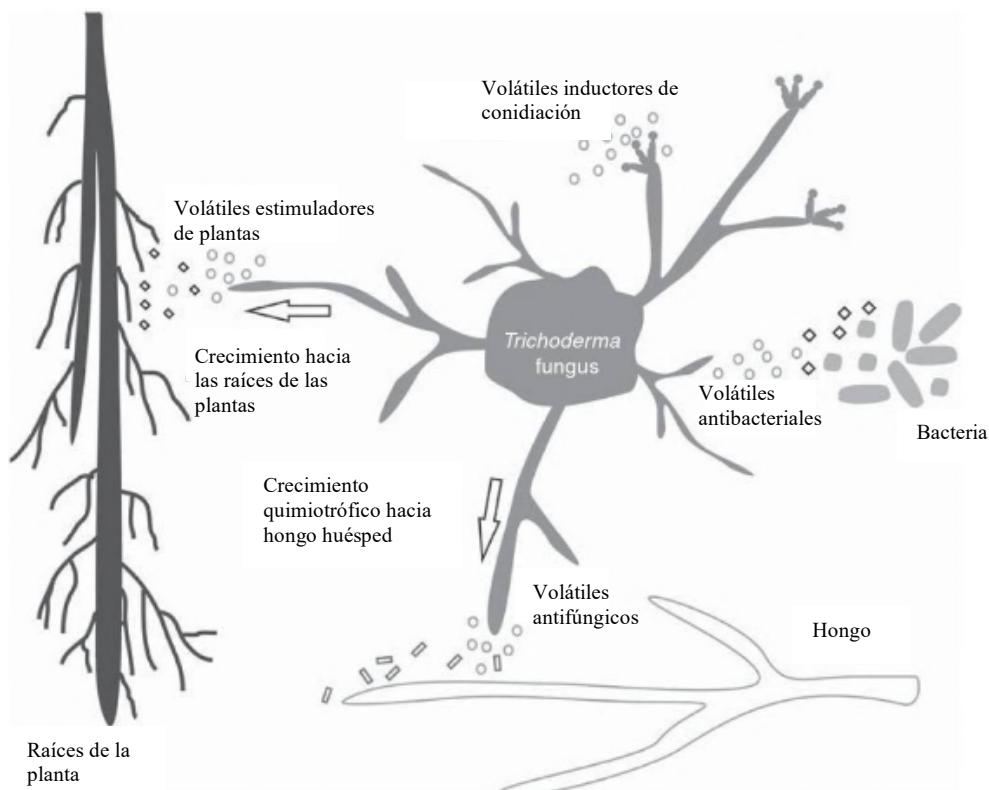


Figura 6. Esquema representativo de las interacciones de los VOCs emitidos por *Trichoderma* con otros hongos, bacterias y las raíces de las plantas. *Trichoderma* puede ser atraído por exudados vegetales y otras sustancias secretadas por microorganismos. Esta interacción conlleva a la liberación de VOCs de *Trichoderma* que pueden provocar diferentes respuestas, como inducir el crecimiento de raíces, o bien inhibir el crecimiento de otras bacterias y hongos, como medida de supervivencia. Fuente: Zeilinger y Schuhmacher, 2013.

### c) Perfil de VOCs emitidos por *Trichoderma spp.*

La método más empleado para la obtención de los perfiles de VOCs en *Trichoderma* es la Micro-extracción en fase sólida (SPME) con su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS). Gracias a esta técnica muchos perfiles de VOCs han sido

reportados a partir de especies como *T. atroviride*, *T harzianum*, *T. viride*, y *T. konigiiopsis* (Patil et al., 2016).

Un estudio reciente, reporta el perfil de VOCs de la cepa *Trichoderma asperellum* T1 (Tabla 1). En este estudio se reportó que los VOCs emitidos impidieron el crecimiento de los fitopatógenos *Curvularia aeria* y *Corynespora cassiicola*, causantes de las manchas foliares en lechuga. Además, fue posible observar que las lechugas expuestas a estos VOCs mostraron un mayor número de raíces, hojas, clorofila total y biomasa (Wonglom et al., 2020).

Cuadro 1: Perfil de VOCs emitidos por *Trichoderma asperellum* T1, obtenido por SPME-GC/MS (Wonglom et al., 2020).

No	Compuesto	Fórmula
1	Etanol	CH3CH2OH
2	O-butilhidroxilamina	C4H11NO
3	2-metil-1-butanol	C5H12O
4	2-amilfurano	C9H14O
5	2-Etil-1-hexanol	C8H18O
6	Cicloheptano	C7H14
7	2,4-dihidroxibenzaldehído	C7H6O3
8	1-Nonanol	C9H20O
9	Ácido fosfonoacético	C2H5O5P
10	Sulfito de 2-etilhexilhexilo	C14H30O3S
11	Ciclometricona 6	C12H36O6Si6
12	N1, N1,N4-Tris(terc-butildimetilsilil)succinamida	C22H50N2O2Si3
13	6-pentil-2H-pirano-2-ona	C10H14O2
14	2,5-ciclohexadieno-1,4-diona	C14H20O2
15	6-undecilamina	C11H25N
16	10-Epi-gamma-Eudesmol	C15H26O
17	Ácido succínico, éster etílico de 2-(2-clorofenoxi)	C14H17ClO5
18	Éster de trifluoroacetato de 2,5-diisopropilfeol	C14H17F3O2

19	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-oxopropil)fenol	C17H26O2
20	Palmitato de etilo	C18H36O2

### **2.5.2.2 Micoparasitismo**

Una de las características más representativas de los hongos de este género es su capacidad de parasitar a otros hongos. El micoparasitismo puede observarse como un enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* sobre las hifas del patógeno, seguido de la penetración y subsecuente disolución del citoplasma del huésped (Howell, 2003). Este mecanismo involucra procesos complejos como reconocimiento del huésped, secreción de enzimas extracelulares (Beta-1,3 glucanasas, quitinasas, proteasas, xilananas), ataque a la maquinaria celular del huésped, para finalmente provocar la muerte celular. La secreción constitutiva de exoquitinasas que degradan las paredes celulares de los hongos, juegan un papel fundamental en la inhibición del crecimiento de cepas de hongos patógenos (Gajera et al., 2013). En algunas condiciones, modificaciones morfológicas como el enrollamiento y la formación de un apresorio con altas concentraciones de solutos osmóticos, como el glicerol, induce la penetración en las células del huésped. Una vez que el hongo penetra, libera el contenido del apresorio lo que provoca la formación de péptidos relacionados con la patogénesis, que ayudan a la entrada de las hifas de *Trichoderma* (Howell, 2003).

### **2.5.2.3 Competencia por nutrientes y espacio**

La limitación de nutrientes, resultado de la intensa competencia por recursos impuesta por *Trichoderma* spp., representa uno de los principales factores responsables de la muerte de microorganismos colindantes. De esta manera, *Trichoderma* spp. compite por fuentes de carbono y Fe contra los patógenos, evitando así su desarrollo. *T. harzianum* T35 ha demostrado controlar a *Fusarium oxysporum* por medio de la competencia de nutrientes y la colonización de la rizósfera (Waghunde et al., 2016). Existen muchos casos de éxito, donde la competencia por espacio y nutrientes está involucrada, lo que demuestra que las especies de este género son muy eficientes en la toma y mobilización de nutrientes, comparados con fitopatógenos u otros organismos. Se ha identificado que la producción de proteínas, como

la aspartil proteasa, por el Trichoderma, juega un papel crucial en la colonización de raíz y que, además, es crucial en la competencia por espacio con otros colonizadores de raíz (Viterbo et al., 2004; Brotman et al., 2008).

#### **2.5.2.4 Inducción de la resistencia**

Uno de los mecanismos más importantes de biocontrol que ejercen las cepas del género *Trichoderma* es la inducción de la resistencia sistémica. La inducción de resistencia en frijol por *T. harzianum* T-39 quedó demostrada mediante el tratamiento del suelo con esporas de este hongo. Se observó que las hojas de frijol mostraron resistencia ante el ataque de patógenos como *B. cinerea* y *C. lindemuthianum*, aún cuando las aplicaciones de T-39 solo habían sido en las raíces y no en las hojas (Bigirimana et al., 1997). Una gran variedad de cepas como *T. virens*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, y *T. atroviride* estimulan cambios metabólicos que promueven mejor tolerancia contra fitopatógenos y algunos virus. (Waghunde et al., 2016).

Actualmente, existen varias cepas reportadas capaces de inducir la resistencia sistémica contra patógenos. La cepa de *T. harzianum* T-22 es capaz de inducir resistencia sistémica contra patógenos en plantas modelo y en maíz (Harman et al. 2012). Aislados de *T. harzianum* T9 inducen resistencia en jitomate (cultivar cv. Sida), reduciendo un 69.23% la infección causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* después de 14 días de inoculación. De forma similar, un aislado de *T. asperellum* T18, genera resistencia sistémica, mostrando una reducción de la infección causada por *Stemphylium solani* en jitomate, después de 10 días de inoculación (Saksirirat et al., 2009). La cepa *T. pubescens* Tp21 ha demostrado eliciar la resistencia sistémica inducida (RSI) en tomate, siendo efectiva para el control de *Rhizoctonia solani*, promoviendo un incremento en el crecimiento y la activación del sistema antioxidante en tomate (Behiry et al., 2023). *Trichoderma hamatum* cepa Th23 promueve el crecimiento en tomate e induce la resistencia sistémica inducida (RSI) contra el virus del mosaico de tacabón (TMV), a través del incremento de las enzimas antioxidantes SOD, CAT Y PPO y la expresión de genes relacionados con la defensa (Abdelkhalek et al., 2022). Además de proveer resistencia contra factores bióticos, se ha observado que la

aplicación de cepas de *Trichoderma* también induce la tolerancia al estrés por factores abióticos. Un estudio reciente reporta que la cepa de *Trichoderma longibrachiatum* (TG1) tiene la capacidad de inducir la producción de SA y una mayor actividad antioxidante, confiriendo resistencia contra salinidad en plantas de trigo (Boamah et al., 2022)

#### **2.5.2.5 Capacidad bioestimulante**

La capacidad bioestimulante del hongo ha sido reportada como promoción en la toma de nutrientes y de crecimiento vegetal. Los mecanismos por los cuales los hongos del genero *Trichoderma* realizan la fitoestimulacion involucran la comunicación en la rizosfera, mediante la liberacion de auxinas, peptidos pequeños, volatiles y otros metabolitos activos, que promueven la ramificacion de raices y la capacidad en toma de nutrientes, impulsando así el crecimiento y el rendimiento de las plantas (López-Bucio et al., 2015). La cepa 1295-22 de *T. harzianum* incremento la disponibilidad de fósforo y otros micronutrientes como Fe, Mn, Zn, en medio de sucrosa-extracto de levadura líquido, *in vitro* (Altomare et al., 1999). *T. asperelloides*, antes identificado como *T. harzianum* T-203, incremento un 90% y 30% la concentración de P y Fe en raíz, respectivamente (Yedidia et al., 2001). Otros estudios indican que la inoculación de *T. harzianum* promueve el crecimiento en sorgo, gracias al favorecimiento en la toma de nutrientes o mediante la produccion de compuestos promotores del crecimiento vegetal (López-Bucio et al., 2015; Wu et al., 2022). Evaluaciones realizadas, demuestran que *T. harzianum* es capaz de solubilizar fosfato de calcio, lo que permite un incremento en la toma de fosforo en garbanzo, y además, esta habilidad de solubilización es mantenida por el hongo incluso en presencia de metales pesados como el cadmio, lo que indica que aún en suelos contaminados *T. harzianum* provee ventajas (Rawat y Tewari, 2011).

### **2.6 Productos comerciales y patentes**

Actualmente, se han desarrollado algunos elicidores agrícolas, comercializados bajo el nombre de agentes de “priming”, que se basan en el uso de moléculas como el quitosano, extractos de levaduras, proteínas y polisacáridos, los cuales son utilizados para prevenir

enfermedades agrícolas (Desmedt et al., 2021). Estos elicidores han estado enfocados en la activación de la respuesta inmune de cultivos vegetales comerciales, teniendo una creciente lista de productos comerciales disponibles (Desmedt et al., 2021). Hoy en día, no existen productos comerciales destinados a la elicitation de microorganismos benéficos usados en la agricultura, sin embargo, diferentes estudios indican que la elicitation de microorganismos puede ser provocada mediante el uso de choque térmico suave, dosis subinhibitorias de antibióticos, exposición a NaCl, exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y falta de nutrientes (Harish y Oserov, 2022), provocando efectos positivos en la supervivencia de los microorganismos. Por otro lado, la patente WO2017117089A1 describe un método para inducir la elicitation de esporas provenientes de bacterias usando temperatura, con el cual se consigue una mejora en las propiedades de germinación y composición de las esporas (Heffron, 2017). La elicitation de microorganismos es un fenómeno natural que ha existido a lo largo de la evolución, sin embargo, su estudio ha sido escaso. Este proceso resulta con alto potencial de aplicación y posiblemente explique diferentes procesos en la formación de comunidades microbiales.

### **3. HIPÓTESIS**

La exposición de *Trichoderma asperellum* a fragmentos de eDNA homólogo fragmentado elictita su desarrollo y actividad antagonista *in vitro* e *in vivo*, debido a su acción, como patrón molecular asociado a daño (DAMP), sobre la respuesta relacionada a la defensa y al metabolismo secundario, comparado con un modelo en el cual no se aplica dicho tratamiento y un modelo de eDNA heterólogo.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de la exposición de fragmentos de eDNA homólogo sobre la germinación de espora, actividad SOD y CAT, actividad antagonista por competencia de

espacio/nutrientes, secreción de giberelinas y auxinas, liberación de VOC's, y el efecto bioestimulante en plantas de chile, de *Trichoderma asperellum*.

#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de aplicación del eDNA *in vitro* sobre la germinación de espora, dirigido a la elicitation del desarrollo del microorganismo.
2. Determinar la actividad antioxidante SOD y CAT *in vitro*, dirigido a la evaluación de la respuesta ante el estrés oxidativo del microorganismo.
3. Determinar la actividad antagonista por competencia de espacio, secreción de giberelinas y auxinas, crecimiento radial, y liberación de VOC's *in vitro*, dirigido a la elicitation de la actividad del microorganismo.
4. Evaluar el efecto elicitor *in vivo* del eDNA homólogo fragmentado sobre *Trichoderma asperellum*, utilizando como modelo plantas de chile, dirigido a la mejora de la actividad bioestimulante del hongo.

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1 Preparación y mantenimiento de la cepa *Trichoderma asperellum* T8A**

La cepa de *Trichoderma asperellum* (T8A) utilizada en este estudio fue proporcionada por el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) para fines de investigación. Esta cepa fue conservada en cajas Petri con medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa, Difco) a una temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C, realizando subcultivos periódicos según se requiriera para su mantenimiento.

Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de material biológico, se cultivó un inóculo puro del hongo en medio líquido PDB (caldo papa dextrosa, Difco), siguiendo la metodología descrita por Ezziyyani et al. (2004). Para ello, se emplearon 250 mL de medio PDB estéril (121 °C, 15 psi, 15 min), al cual se le adicionaron dos discos de 5 mm de diámetro

proveniente de un cultivo de *T. asperellum*. Los matraces se mantuvieron en incubación estática a  $25 \pm 2$  °C durante un periodo de 15 días. Al finalizar la incubación, el micelio fúngico fue recuperado mediante filtración al vacío y conservado a -70 °C hasta su posterior utilización en los experimentos.

## 5.2 Obtención de eDNA homólogo

Para realizar la extracción de DNA genómico, se utilizaron 25 g de micelio congelado, los cuales fueron previamente pulverizados en un mortero empleando nitrógeno líquido para garantizar una disruptión celular eficiente. La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo basado en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), descrito por Lee et al. (1988). Por cada 5 g del micelio triturado se añadieron 25 mL de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercptoetanol). La mezcla se agitó hasta lograr una homogenización completa y posteriormente se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Luego se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, al cual se le añadió 1 volumen de clorofomo-alcohol isoamílico (24:1), y se agitó vigorosamente en vórtex. Esta mezcla se centrifugó nuevamente 10 minutos bajo las mismas condiciones. De la mezcla anterior se recuperó la fase acuosa y se le adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio (NaOAc) 5 M y 2/3 de volumen de isopropanol frío, y se incubó a -20 °C por 15 minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a  $10,000 \times g$ , y se eliminó el sobrenadante. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se lavó con etanol al 70% (previamente enfriado), incubando durante 1 minuto, y se dejó secar completamente. Finalmente, el DNA fue resuspendido en 2.5 mL de agua destilada estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La concentración y pureza del DNA extraído se evaluaron mediante espectrofotometría con un NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific), utilizando 1  $\mu$ L de muestra, con lectura en el rango espectral de 190–840 nm. El DNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con GelRed® (Biotium), utilizando tampón TAE 1X, corriendo los geles a 80 V durante 30 minutos.

Para obtener fragmentos de DNA en el rango de 700 a 50 pares de bases (pb), se sonicó el DNA con un sonotrodo Hielscher UP200Ht (200 W, 26 kHz). El protocolo consistió en pulsos de 26 kHz a 10 W, con una amplitud del 50%, aplicados cada segundo durante un total de 10 minutos, siguiendo el procedimiento descrito por Vega-Muñoz et al. (2018).

### **5.3 Obtención de eDNA heterólogo**

El eDNA heterólogo utilizado en este estudio fue obtenido a partir de hojas frescas de *Lactuca sativa* var. Climax (lechuga romana), recolectadas de un cultivo establecido en la Universidad Autónoma de Querétaro-Campus Amazcala, mantenido bajo condiciones controladas de invernadero. La extracción y la fragmentación del DNA vegetal se realizó empleando el mismo protocolo CTAB y sonicación, previamente descrito en la sección 5.2.

### **5.4 Diseños experimentales para la exposición de *Trichoderma asperellum* a eDNA *in vitro***

Con el objetivo de evaluar el efecto del eDNA fragmentado, tanto homólogo como heterólogo, sobre el proceso germinativo de espora y el desarrollo de la fase vegetativa (micelio) de *Trichoderma asperellum*, se diseñaron ensayos experimentales específicos. Estos diseños permitieron analizar de forma diferenciada la influencia del eDNA fragmentado en dos etapas clave del ciclo de vida del hongo.

#### **5.4.1 Evaluación del eDNA sobre el proceso germinativo de *Trichoderma asperellum***

Para la evaluación del efecto del eDNA sobre el proceso germinativo de *Trichoderma asperellum*, se utilizó un cultivo puro completamente colonizado en medio PDA como fuente de esporas. A partir de este, se realizó un subcultivo en medio líquido utilizando una placa estéril de 24 pozos, cada uno con 200 µL de medio PDB (Difco). La inoculación se llevó a cabo mediante la adición aproximada de 1000–2000 esporas por pozo, obtenidas del cultivo en PDA. Posteriormente, se adicionó 1 mL de los tratamientos correspondientes de eDNA homólogo fragmentado en concentraciones de 2, 5, 10, 50 y 200 µg mL<sup>-1</sup>. De manera

paralela, se evaluó el efecto del eDNA heterólogo fragmentado, utilizando una concentración única de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , bajo la misma metodología descrita (Cuadro 2).

Se incluyeron dos controles experimentales: el control 1, que consistió en esporas en medio PDB sin eDNA, se empleó para validar el crecimiento normal del hongo bajo las condiciones experimentales; el control 2, que incluyó únicamente el tratamiento con eDNA homólogo fragmentado sin esporas, tuvo como finalidad verificar la inocuidad del eDNA. Todos los tratamientos, incluidos los controles, se realizaron por triplicado (Figura 7).

Cuadro 2. Tratamientos para evaluar el proceso germinativo.

<b>eDNA homólogo+<i>T. asperellum</i></b>	200 $\mu\text{L}$ de PDB $\sim 1 \times 10^3$ esporas 1 mL eDNA homólogo (2, 5, 10, 50, 200 $\mu\text{gmL}^{-1}$ )
<b>eDNA heterólogo+<i>T. asperellum</i></b>	200 $\mu\text{L}$ de PDB $\sim 1 \times 10^3$ esporas 1 mL eDNA heterólogo ( <i>Lactuca sativa</i> ) 100 $\mu\text{gmL}^{-1}$
<b>Control 1. <i>T. asperellum</i> sin tratamiento</b>	200 $\mu\text{L}$ de PDB $\sim 1 \times 10^3$ esporas 1 mL de agua estéril
<b>Control 2. eDNA homólogo</b>	200 $\mu\text{L}$ de PDB 1 mL eDNA homólogo 200 $\mu\text{gmL}^{-1}$

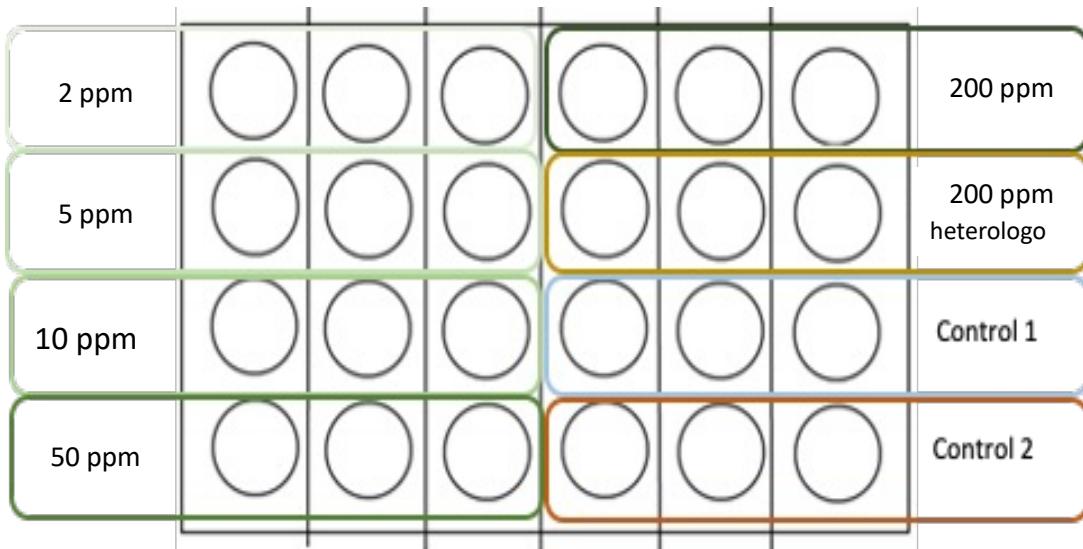


Figura 7. Distribución de tratamientos en caja de 24 pozos.

#### 5.4.2 Evaluación del eDNA sobre la actividad SOD y CAT, competencia por espacio, producción de giberelinas, auxinas, y VOC'S de *Trichoderma asperellum*

Para evaluar el efecto del eDNA, tanto homólogo como heterólogo, sobre la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), así como sobre la competencia por nutrientes, y la producción de giberelinas, auxinas y compuestos orgánicos volátiles (VOCs), se llevaron a cabo cultivos líquidos en cajas Petri de 5 cm de diámetro.

Inicialmente, se preparó un inóculo líquido cultivando un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo puro de *Trichoderma asperellum* en 200 mL de medio PDB. El cultivo fue incubado sin agitación, a  $25 \pm 3$  °C y en condiciones de oscuridad, durante un periodo de 15 días. Finalizada la incubación, se preparó un subcultivo a partir de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^5$  esporas/mL), de la cual se añadieron 200  $\mu$ L a 8 mL de PDB en cajas Petri estériles de 5 cm. Estas fueron incubadas bajo las mismas condiciones durante 4 días, sin agitación.

Al finalizar este periodo, el medio de cultivo fue retirado cuidadosamente, dejando únicamente el micelio adherido. Posteriormente, se añadieron 3 mL de los respectivos tratamientos: eDNA homólogo fragmentado en concentraciones de 2, 5, 10, 50 y  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , eDNA heterólogo fragmentado a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y un control negativo al que únicamente se agregó agua estéril. Los tratamientos se mantuvieron en contacto con el

micelio durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, el micelio fue separado del sobrenadante mediante filtración al vacío para su posterior análisis, de acuerdo con los protocolos establecidos para cada variable. Además, previo a la filtración, se tomaron alícuotas de los cultivos para realizar observaciones microscópicas del micelio. Para el análisis de VOCs se tomaron muestras completas (micelio+sobrenadante).

## 5.5 Determinación de las variables de respuesta en ensayos *in vitro*

### 5.5.1 Germinación de espora

Con el propósito de cuantificar el efecto de los tratamientos con eDNA fragmentado (homólogo y heterólogo) sobre la germinación de esporas de *Trichoderma asperellum*, se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) a las 24 y 120 horas de exposición. Estos análisis se realizaron a partir de los cultivos establecidos en placas de 24 pozos. De cada uno de los tres pozos correspondientes a un tratamiento específico (réplicas), se recolectaron 33.3 µL, obteniendo así un volumen total de ~100 µL por tratamiento, el cual fue homogeneizado en un tubo Eppendorf. A partir de esta mezcla, se tomó un alícuota de 20 µL que fue sembrada en placas Petri con medio PDA mediante extensión en placa, realizándose tres réplicas independientes por tratamiento. En los casos donde se observó una alta concentración de micelio que pudiera interferir con el conteo de colonias, se realizaron diluciones previas de la muestra. Para ello, se diluyeron los 100 µL de muestra en 900 µL de agua destilada estéril, y posteriormente se sembraron 20 µL de la dilución en medio PDA, también por triplicado. Las placas fueron incubadas a 25 ± 3 °C durante 24 horas. Finalizado este periodo, se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC), como indicador de la cantidad de esporas viables y activas presentes tras la exposición a los diferentes tratamientos. Para la cuantificación de UFC/mL se utilizó la siguiente formula;

$$UFC/mL = \frac{(promedio\ de\ colonias\ contadas)(Dilución)}{0.02\ mL}$$

Además del conteo en placa, se realizó el análisis por microscopía de las esporas inmediatamente después de ser retiradas del medio.

### **5.5.2 Actividad SOD y CAT**

La actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) y catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) fue evaluada a partir de extractos enzimáticos obtenidos del micelio de *Trichoderma asperellum* expuesto previamente a tratamientos con eDNA homólogo y heterólogo fragmentado. Para la obtención de los extractos, se pesaron aproximadamente 500 mg de micelio fresco, los cuales fueron homogeneizados en un mortero previamente enfriado a -20 °C durante una hora, utilizando 2 mL de tampón fosfato 0.05 M (pH 7.8). El homogenizado fue transferido a un tubo Eppendorf y centrifugado a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante (incoloro) fue cuidadosamente recuperado y utilizado como extracto enzimático. Todos los análisis fueron realizados por triplicado, manteniendo los extractos en hielo durante su procesamiento (Gao, 2006).

La actividad total de SOD se determinó con base en la inhibición de la reducción fotoquímica del nitro blue tetrazolium (NBT), siguiendo el protocolo descrito por Gao (2006). La mezcla de reacción se preparó con los siguientes componentes: 1.5 mL de tampón fosfato 0.05 M (pH 7.8), 0.3 mL de EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 mM, 0.3 mL de L-metionina 0.13 M, 0.3 mL de NBT 0.75 mM, 0.3 mL de riboflavina 0.02 mM, 0.05 mL del extracto enzimático y 0.25 mL de agua destilada. La mezcla fue expuesta a luz LED constante durante 20 minutos, y se midió la absorbancia a 560 nm. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50 % la reducción del NBT, atribuida a la acción de radicales superóxido generados en la reacción de fotoreducción de la riboflavina en presencia de oxígeno.

La determinación de la actividad catalasa se realizó conforme al método descrito por Beers et al. (1952). La mezcla de reacción consistió en 2 mL de tampón fosfato 0.05 M (pH 7.8), 200 µL de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración de 100 mM y 100 µL del extracto enzimático. La descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue monitoreada mediante la disminución de la absorbancia a 240 nm durante un periodo de 6 minutos, registrando lecturas desde el

tiempo cero, cada 10 segundos. La actividad de CAT fue calculada en función de la tasa de desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a lo largo del tiempo. Finalmente, para normalizar las actividades enzimáticas, se cuantificó la concentración de proteínas en los extractos enzimáticos mediante el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Las actividades enzimáticas de SOD y CAT se expresaron en unidades por miligramo de proteína (U/mg proteína).

### **5.5.3 Competencia por espacio/nutrientes**

A partir del micelio previamente tratado se realizaron cultivos duales en PDA, en presencia de los fitopatógenos *F. oxysporum* y *P. capsici* ( Ezziyyani et al., 2004). Para lo anterior, con ayuda de un asa bacteriológica se tomó micelio tratado y se colocó a una distancia de 3 cm del patógeno. Para cada uno de los tratamientos se realizó cultivo dual, por triplicado. Se midió el crecimiento radial con ayuda de un vernier cada 24 horas por 14 días, y se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno a partir de la siguiente fórmula (Stracquadanio et al., 2020);

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{radio control} - \text{radio tratamiento})}{\text{radio control}} (100)$$

### **5.5.4 Liberación de VOC's**

La evaluación de VOC's liberados por el micelio de *T. asperellum* tratado con eDNA se realizó por medio de un análisis HS-SPME (micro extracción de fase sólida) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), siguiendo la metodología descrita por Contreras-Cornejo et al., (2014). La recolección de VOCs se realizó usando una fibra SPME durante 60 min, para luego ser desasorbidos por 30 sg en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases acoplado a masas, equipado con una columna capilar HP-FFAP. Las condiciones de operación fueron las siguientes: helio como gas acarreador (1mL/min), temperatura de detección de 250 °C, temperatura de inyección de 180 °C. Los VOCs fueron tentativamente identificados utilizando una base de espectros NIST 2.0 y el software

AMDIS v2.0. los índices de retención fueron comparados con aquellos accesibles en la literatura.

### **5.5.5 Secreción de auxinas totales y giberelina 3 (GA3)**

La determinación de giberelina 3 (GA3) se realizó mediante análisis HPLC. Para esto, el sobrenadante del hongo previamente expuesto a los diferentes tratamientos fue recolectado y extraído con acetato de etilo para la determinación de ácido giberélico mediante cromatografía de alta resolución HPLC usando un equipo Agilent serie 1200, UV-VIS 6120, usando una columna Eclipse pPLUS C18 con un tamaño de partícula de 5 µm. Una solución de ácido gibelerico 3 (Sigma-Aldrich) fue usada como estándar para estos análisis. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Para la determinación de auxinas se utilizó el método del reactivo de Salkowski descrito por Solon y Weber, 1951. Para lo anterior, el sobrenadante del hongo previamente tratado fue mezclado con un volumen del reactivo de Salkowski, se mezcló con vórtex y se incubó por 30 min a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) en oscuridad. Posteriormente, se leyó en el espectrofotómetro a 530 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido indol-3-acético (AIA) 98% (Sigma-Aldrich) para el análisis de regresión lineal. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **5.6 Diseño experimental para la exposición de *Trichoderma asperellum* elicited con eDNA en chile.**

Para este diseño se utilizaron plantas de Chile jalapeño de 25 días de edad mantenidas a  $26 \pm 2$  °C, 65-70 % humedad, 12 horas luz/12 horas de oscuridad, usando como sustrato una mezcla Peat-moss:perlita 3:1. Previamente, se eligió *T. asperellum* con  $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  de DNA homólogo por 24 horas, realizando un subcultivo en líquido como anteriormente se describió en la sección 5.4.2. Pasadas las 24 horas, el hongo fue aplicado como tratamiento a las plantas de chile.

Cuadro 3. Tratamientos para evaluar la bioestimulación de chile con *T. asperellum* elicitedo.

No. de plantas	Tratamiento	Replica
3	<i>T. asperellum</i> elicitedo con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA homólogo	TriPLICADO
3	<i>T. asperellum</i> no elicitedo	TriPLICADO
3	Control-Agua	TriPLICADO

Para la apliación de *T. asperellum* elicitedo a las plantas de chile se propuso el siguiente diseño experimental:

Las condiciones mantenidas durante el experimento fueron de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70 % humedad, y un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas de oscuridad. A los 25 días de edad las plantas de chile fueron trasplantadas a nuevo sustrato (Peat-moss:perlita 3:1) y al mismo tiempo fue realizada la aplicación de 1 ml de los tratamientos menciodados en el cuadro 3 sobre el sustrato. Las plantas fueron mantenidas por 7 semanas con fertiriego y posteriormente se quito el fertiriego por una semana más. El tiempo total del experimento fue de 8 semanas. El diseño fue en bloques al azar, teniendo 3 plantas por tratamiento, con tres replicas.

### 5.7 Determinación de las variables de respuesta en ensayos *in vivo*

A las 7 semanas postrasplante se evaluó altura, ancho de tallo, contenido relativo de agua, la actividad SOD, CAT, PAL y la expresión relativa de los genes PR1a y ERF1. Una vez eliminado el riego, al finalizar la semana 8 se evaluó nuevamente altura, ancho de tallo. La altura y ancho de tallo basal fuero medidos con vernier. El contenido relativo de agua se estimó por medio de la diferencia del peso total de las plantas frescas contra el peso total de las plantas después de secado a  $90^\circ\text{C}$ , durante 24 h.

### **5.7.1 Determinación de SOD, CAT y PAL en chile**

Para la determinación de SOD, CAT y PAL de la muestra vegetal, se pesaron 600-500 mg de tejido y se procesaron como previamente se describió en el apartado 5.5.2. De igual manera, la determinación de SOD y CAT se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.5.2.

Para la determinación de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) fueron añadidos 100 µL de extracto enzimático a 1.5 mL de tampón de borato 0.1 M/10 mM de L-fenilalanina (pH 8.8). Luego, la mezcla se incubó a 40 °C por una hora, y posteriormente la reacción se detuvo agregando 250 µL de HCl 1N. Finalmente, se dejó reposar la muestra por 10 min a temperatura ambiente y se procedió a medir la absorbancia a 290 nm. Los datos recabados se compararon con una curva de calibración de ácido trans-cinámico. Se definió como una unidad de actividad PAL aquella cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 µmol de ácido trans-cinámico por minuto. La cantidad de proteína se cuantificó utilizando el método de Bradford, 1976. Las actividades de las tres enzimas se expresaron en U/mg de proteína.

### **5.7.2 Expresión relativa de los genes PR1a y ERF1**

Para la expresión relativa de los genes PR1a y ERF1 se llevó a cabo la extracción de RNA utilizando el kit miniprep Direct-zol RNA (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó usando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific) para la transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR). Se utilizaron 500 ng de RNA para la reacción. La reacción se incubó por 10 min a 25°C seguido de 15 min a 50°C, posteriormente se detuvo la reacción calentando a 85°C por 5 minutos. Las muestras fueron almacenadas a -20°C para posteriormente ser analizadas.

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó siguiendo el protocolo del kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). La reacción consistió en la mezcla de los reactivos mencionados por el fabricante y 500 ng del cDNA previamente sintetizado, realizando modificaciones en el protocolo. El protocolo de la qPCR consistió de una

desnatularización inicial a 95°C por 3 min, seguido de una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 58°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto, por 60 ciclos. Se utilizaron los siguientes primers: *PR1a* (forward: 5'-GCCAAGCTATAACTACGCTAAC-3'; reverse: 5'-GCAAGAAATGAACCACCATCC-3') y *ERF1*(forward: 5'-CGCGTAATGGAATTAGGGTTG-3'; reverse: 5'-CCTCATTGATAATGCGGCTT-3'). Se utilizó el software Bio-Rad CFX para calcular el valor del ciclo umbral (Ct) de cada reacción. La expresión de los genes se normalizó a la media del gen housekeeping actina-A (ACT-A), usando los primers reportados por Gao et al. (2015). Para la cuantificación de los niveles de mRNA se utilizó el método de cuantificación relativa 2 $-\Delta\Delta Ct$  (Livak & Schmittgen, 2001). Cada reacción se realizó por triplicado.

## 5.8 Análisis e interpretación resultados

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA-95% de confianza), seguido de una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), utilizando el software JMP.Pro16®. La información se expresó como valores medios  $\pm$  el error estándar.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Efecto del eDNA sobre el proceso germinativo de *T. asperellum*

Para la evaluación de la germinación de las esporas después de ser expuestas al DNA extracelular se realizó un plaqueo de las mismas en cajas Petri con PDA estéril para permitir su posterior crecimiento , y además, se observaron al microscopio inmediatamente después de ser retiradas del ensayo. Este ensayo mostró que los tratamientos de 5, 50 y 200 µg/ml de DNA homólogo incrementaron significativamente la recuperación del hongo (UFC/mL) en un medio libre de DNA (caja petri con PDA estéril) después de exponer sus esporas al tratamiento por 24 horas (Fig 8-I).

Los tratamientos de 2 y 10 µg/mL de DNA homólogo no mostraron diferencias significativas con el control. En la observación por microscopía de las esporas, luego se der expuestas por 24 horas a los tratamientos, se observó que estas mostraban patrones de germinación diferenciales, dependiendo de la concentración del tratamiento; de esta manenera el nivel de germinación iba de mayor a menor conforme el aumento de concentración. (Figura 8-II).

Por otro lado, la exposición de las esporas por 120 horas a los tratamientos de 2, 10, 50, y 200 µg/ml de DNA homólogo causó una reducción significativa de la viabilidad del hongo, la cual fue dependiente de la concentración (Figura 9). El tratamiento con DNA heterólogo (*Lactuca sativa* 200 µg/mL) mostró una reducción significativa de la recuperación del hongo después de 24 y 120 horas (Figura 8 y 9).

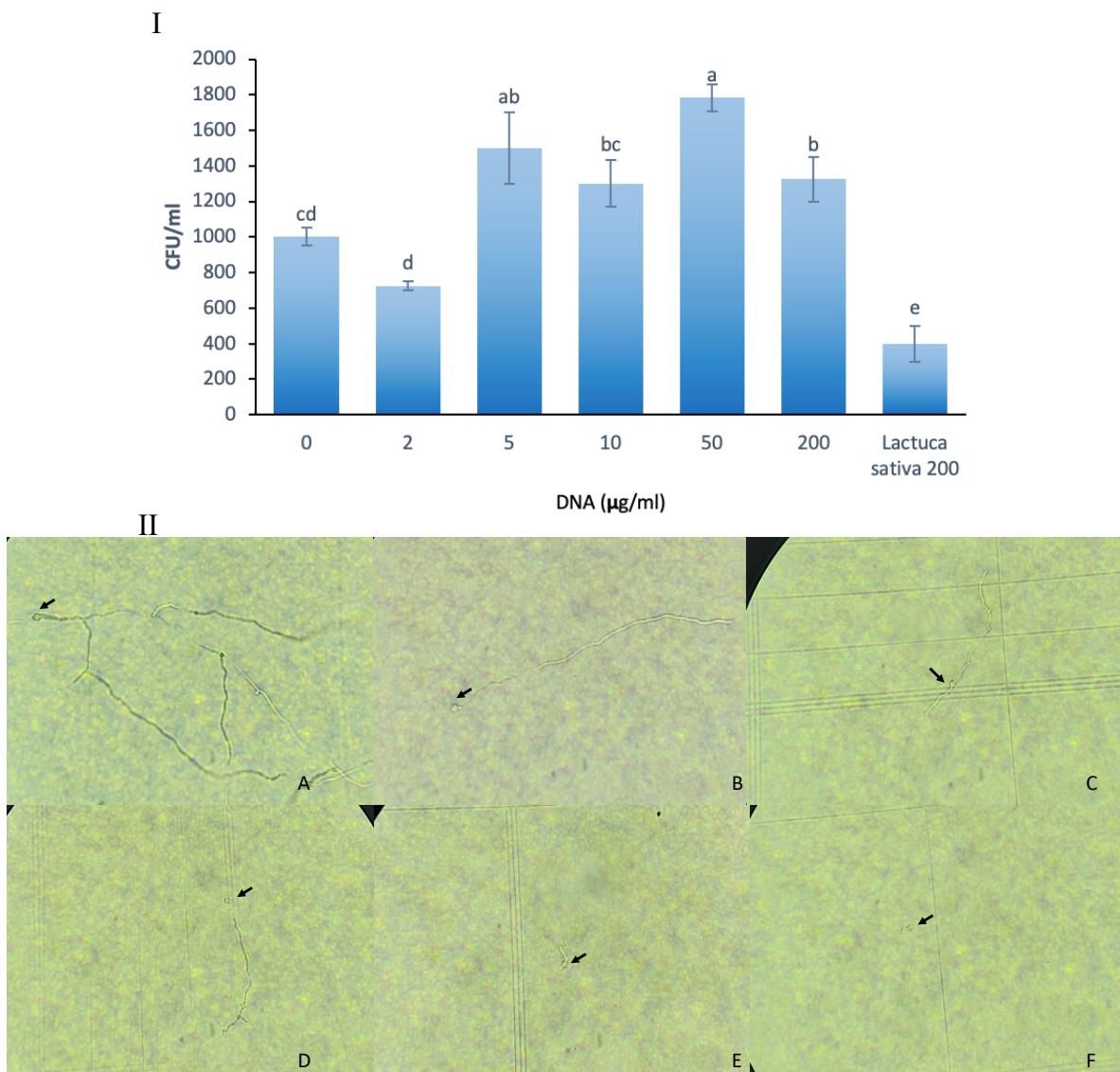
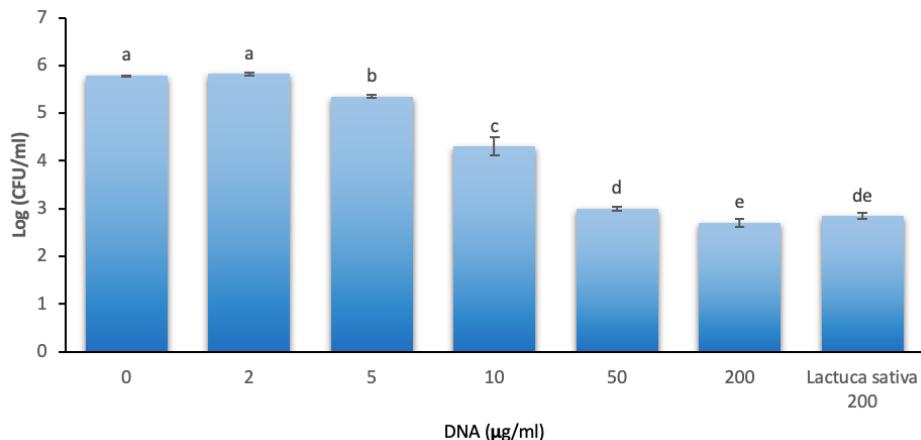


Figura 8. Efecto del eDNA homólogo y heterólogo sobre el proceso germinativo de *T. asperellum*. I) Esporas colocadas en medio libre de DNA luego de 24 horas de exposición a tratamientos. Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. II) Microscopía 40X de las esporas mantenidas en medio con DNA después de 24 horas, A) 0, B) 2 C) 5 D) 10 E) 50 F) 200. Flechas señalan la espora en su nivel de germinación.

I



II

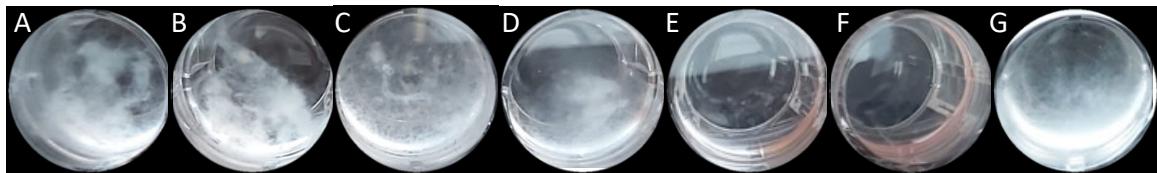


Figura 9. Efecto del eDNA homólogo y heterólogo sobre *T. asperellum*, 120 horas después de la aplicación. I) Efecto sobre el crecimiento del hongo. Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. II) Observación del desarrollo de micelio del hongo expuesto a diferentes concentraciones (ug/ml) de DNA homólogo y heterólogo. A) 0, B) 2 C) 5 D) 10 E) 50 F) 200 G) *Lactuca sativa* 200 ug/ml.

## 6.2 Efecto del eDNA sobre las actividades SOD y CAT.

En cuanto a la actividad antioxidante del hongo derivada de la exposición del mismo a DNA homólogo durante 24 horas, se observó un incremento de la actividad enzimática SOD y CAT. La figura 10 muestra que la actividad SOD aumento significativamente con los tratamientos de 2, 5, 10, y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mientras que el tratamiento de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  no tuvo diferencias significativas con el control. La actividad CAT incremento significativamente con los tratamientos de 5, 50, y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mientras que 2 y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  no tuvieron diferencias con el control.

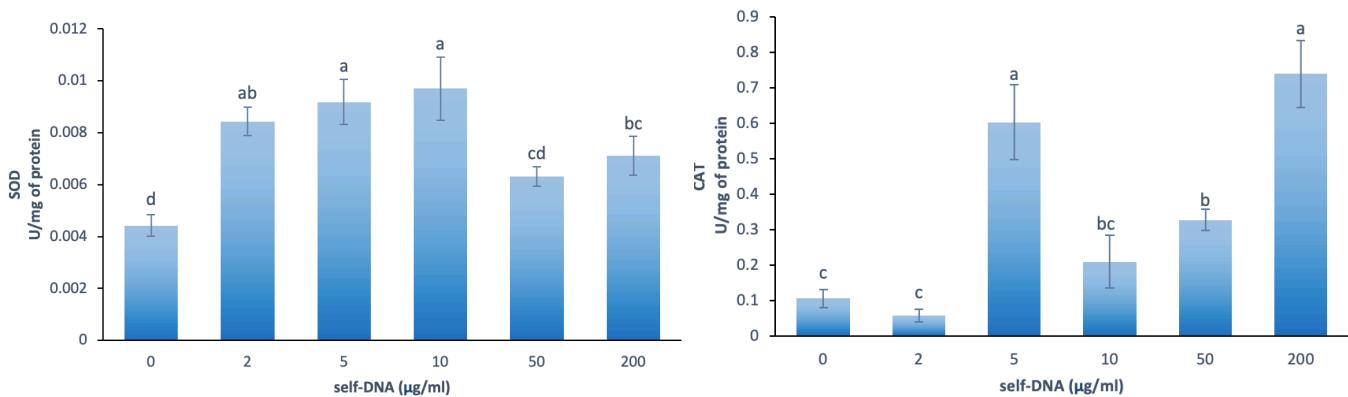


Figura 10. Efecto del eDNA homólogo sobre la actividad antioxidante de *T. asperellum*, después de 24 horas de exposición. Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

### 6.3 Efecto de *T. asperellum* elicitedo con eDNA sobre la competencia de espacio/nutrientes contra hongos fitopatógenos in vitro.

La colocación de *Trichoderma asperellum*, previamente elicitedo con DNA, en ensayos de confrontación mostraron la inhibición del crecimiento radial de los patógenos *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum* (Cuadro 4). Los tratamientos de 5, 10, y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  obtuvieron un porcentaje de inhibición de 65-66%, siendo estadísticamente superiores al control. Los tratamientos de 2 y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se comportaron de manera similar, teniendo un porcentaje del 64%, mientras que el tratamiento de 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Lactuca sativa* se comportó similar al control.

Cuadro 4: Efecto de *T. asperellum* elicitedo con eDNA homólogo y heterólogo sobre el porcentaje de inhibición por competencia de espacio/nutrientes de *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*.

Tratamiento (DNA $\mu\text{g/mL}$ )	Porcentaje de inhibición de <i>Phytophthora capsici</i> (%)	Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> (%)
0	56c	49c
2	64ab	62ab

5	65a	67ab
10	65a	70a
50	66a	60b
200	64ab	62ab
200 <i>Lactuca sativa</i>	58bc	67ab

Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

#### 6.4 Efecto del eDNA sobre la producción de VOCs de *T. asperellum*

El análisis de VOCs mostró una mayor abundancia de compuestos generados por la cepa elicitada con DNA homólogo. Se lograron identificar en el perfil compuestos de importancia para la actividad antagonista del hongo como 1-Hepten-3-ona, Trans-1-Butil-2-metilciclopropanona y 6-pentil-6-piran-2-ona (6PP) (Fig 11). En total se obtuvieron 24 compuestos diferenciales en el hongo elicitado con una abundancia mayor al 0.1% (Cuadro 5).

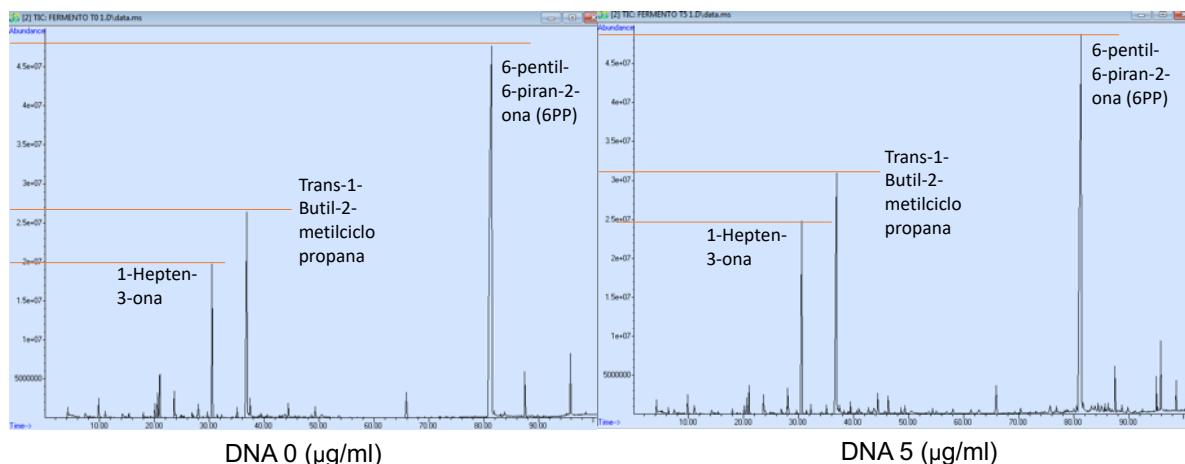


Figura 11. Cromatograma obtenido del análisis HS-SPME y GC-MS del hongo elicitado y sin eliciar.

Cuadro 5: Análisis de VOC's de *T. asperellum* elicitedo con eDNA homólogo.

Hongo sin eliciar			Actividad	Hongo elicido			Actividad
Pico	Área	ID		Pico	Área	ID	
8	0.87	Ethanol	Antifúngico	6	0.38	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	Antifúngico
9	0.44	3-Cyclohepten-1-one	Antifúngico	8	0.7	Ethanol	Antifúngico
11	0.42	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	Antifúngico	9	0.47	3-Cyclohepten-1-one	Antifúngico
16	0.48	Ethylbenzene	Antifúngico	11	0.35	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	Antifúngico
17	0.91	p-Xylene	Antifúngico	14	0.13	Hexanal	Antifúngico, antibacterial
18	1.62	Benzene, dimethyl-	1,3- Antifúngico	17	0.24	Ethylbenzene	Antifúngico
19	1.12	o-Xylene	Antifúngico	18	0.5	p-Xylene	Antifúngico
20	0.17	2-Heptanone	Antifúngico	19	0.89	p-Xylene	
21	0.18	D-Limonene	Antifúngico PGP	20	0.82	Benzene, 1,3-dimethyl-	Antifúngico
23	0.21	Furan, 2-pentyl-	Antifúngico	21	0.16	2-Heptanone	Antifúngico
26	0.56	3-Octanone	Antifúngico	22	0.11	D-Limonene	Antifúngico, PGP
29	7.51	1-Hepten-3-one	Antifúngico	24	0.18	Furan, 2-pentyl-	Antifúngico
32	0.45	Nonanal	Antifúngico	26	0.19	Styrene	Antifúngico
33	14.87	Trans-1-Butyl-2- methylcyclopropane	Antifúngico	27	0.86	3-Octanone	Antifúngico
34	0.83	1-Octen-3-ol	Antifúngico	28	0.14	2-Octanone	Antifúngico
43	0.39	,4-Nonanedione	Antifúngico	29	9.61	1-Hepten-3-one	Antifúngico
44	0.48	2-Octen-1-ol, (Z)-	Antifúngico	32	0.32	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	Antifúngico
49	0.55	cis-1-Butyl-2- methylcyclopropane	Antifúngico	33	0.2	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (Pinane)	Antifúngico, PGP
50	0.51	1,3- Cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4- hexenyl)-2-methyl-	Antifúngico	34	0.28	Nonanal	Antifúngico
51	0.23	Cyclohexene,3-(1,5- dimethyl-4-hexenyl)- 6-methylene	Antifúngico	36	16.55	trans-1-Butyl-2- methylcyclopropane	Antifúngico

52	1.61	Butylated Hydroxytoluene	Antifúngico	37	0.38	1-Octen-3-ol	Antifúngico
57	56.56	2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-	Antifúngico, PGP	42	0.32	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl	Antifúngico
58	0.55	2-Methoxy-4-vinylphenol	Antifúngico	44	0.27	Propenone, 1-(4-nitrophenyl)-3-phe	Antifúngico
65	1.27	3-Ethylphenol, isopropyl ether	Antifúngico	47	0.23	Cyclohexanol, 2-(1,1-dimethylethyl	Antifúngico
71	1.53	2,3-Dimethylphenol, n-pentyl ether	Antifúngico	50	0.53	2,4-Nonanedione	Antifúngico
				52	0.69	2-Nonen-1-ol, (E)-	Antifúngico
				55	0.5	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	Antifúngico
				58	0.4	cis-1-Butyl-2-methylcyclopropane	Antifúngico
				59	0.47	1,3-Cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-	Antifúngico
				60	0.2	Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hex	Antifúngico, nematicida
				61	0.22	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	Antifúngico
				64	0.27	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	Antifúngico, nematicida
				65	0.31	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester	Antifúngico, antibacterial
				66	0.43	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediolisobutyrate	Antifúngico
				67	1.53	Butylated Hydroxytoluene	Antifúngico
				69	0.3	1-Dodecanol	Antifúngico
				73	0.56	Isopropyl myristate	Antifúngico, antibacterial
				74	0.3	n-Tridecan-1-ol	Antifúngico
				81	46.84	2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-	Antifúngico, PGP
				82	0.71	1-Pentadecene	Antifúngico

			83	0.39	Nonanoic acid	Antifúngico,
			86	0.41	Isopropyl palmitate	herbicida
			92	1.15	3-Ethylphenol, isopropyl ether	Antifúngico, antibacterial
			99	0.63	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis2-methylpropyl ester	Antifúngico
			100	1.54	2-Pyridinamine, 4,6-dimethyl-	Antifúngico
			103	0.61	Dibutyl phthalate	Antifúngico

### 6.5 Efecto del eDNA sobre la producción de giberelina 3 y auxinas totales de *T. asperellum*

En la evaluación de la producción de giberelina 3 (GA3), se determinó que los tratamientos de 2, 5, y 200 µg/mL de DNA homólogo incrementaron significativamente su producción (Figura 12). El tratamiento de 50 µg/mL no fue significativamente diferente al control, mientras que el tratamiento de 10 µg/mL mostró una producción menor que el control. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre la producción de auxinas totales entre el control y los tratamientos con DNA homólogo, pero si con el DNA heterólogo (Figura 13).

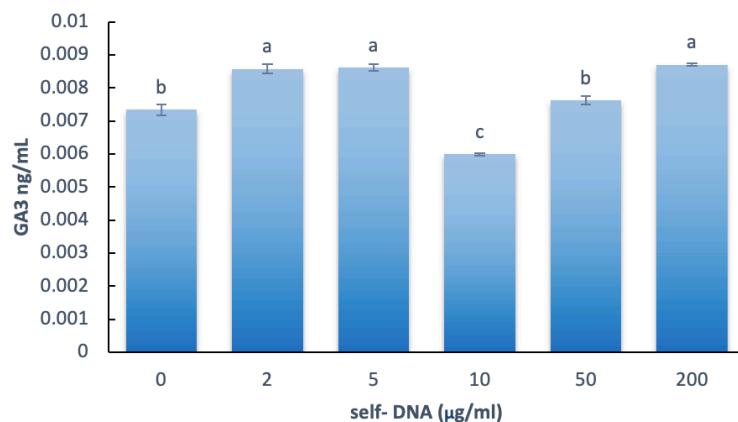


Figura 12. Efecto del eDNA homólogo en la producción de giberelina 3 por *T. asperellum*, 24 horas después de la exposición. Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

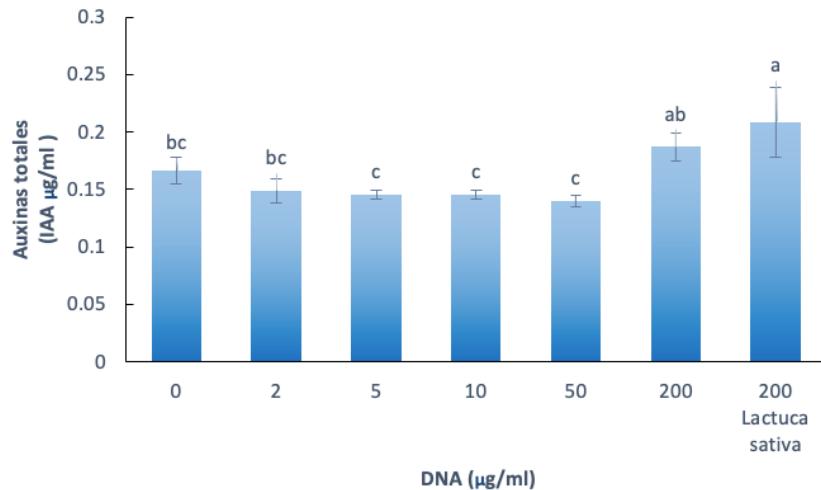


Figura 13. Efecto del eDNA homólogo en la producción de auxinas totales por *T. asperellum*, 24 horas después de la exposición. Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

#### **6.6 Efecto del eDNA sobre el crecimiento radial de *T. asperellum*.**

En la aplicación de DNA homólogo sobre el hongo en estapa vegetativa se observó un aumento significativo en el crecimiento radial del mismo al utilizar los tratamientos de 2, 5, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de forma similar se observó un aumento en el crecimiento al utilizar el DNA heterólogo en una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 14).

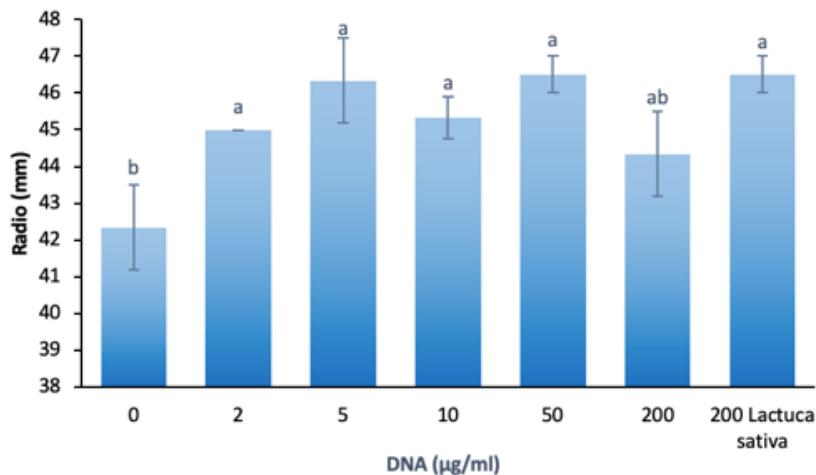


Figura 14. Efecto del eDNA homólogo sobre el crecimiento radial de *T. asperellum*, 72 horas después de la exposición. Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

## 6.7 Efecto de la aplicación de *Trichoderma asperellum* elicitado con eDNA sobre plantas de chile.

En este ensayo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en diámetro de tallo y altura de las plantas entre tratamientos, a las 7 semanas post-trasplante. Por otro lado, se observaron diferencias significativas en las actividades enzimáticas SOD y CAT, mostrando una mayor actividad en las plantas tratadas con el hongo elicitado. En el caso de PAL no se encontraron diferencias significativas entre las plantas tratadas con el hongo elicitado o no elicitado, pero si con el control.

El contenido relativo de agua disminuyó con los tratamientos, siendo estadísticamente inferior en el tratamiento con el hongo elicitado. En cuanto a los genes PR1a y ERF1 se observó una expresión relativa significativamente mayor en las plantas que fueron tratadas con el hongo elicitado (Figura 15).

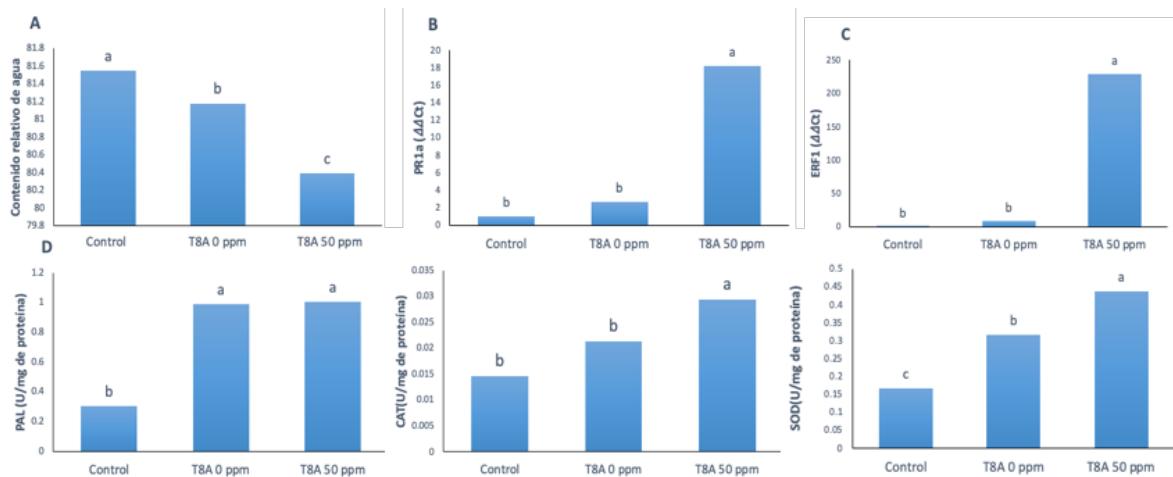


Figura 15. Efecto de *Trichoderma asperellum* elicitado y no elicitado sobre las plantas de chile. Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Posterior a las 7 semanas, se continúo el ensayo dejando a la mitad de las plantas del experimento sin fertirriego. Los resultados muestran que la altura y diámetro del tallo de las

plantas incremento significativamente al ser tratado con el hongo elicitedo y sin elicitar en condiciones de sequía. (Cuadro 6, Figura 16).

Cuadro 6. Efecto de *Trichoderma asperellum* elicitedo con DNA homólogo sobre plantas de chile bajo estrés hídrico.

	Altura			Diámetro de tallo		
	Control	T8A 0 ppm	T8A 50 ppm	Control	T8A 0 ppm	T8A 50 ppm
Con Fertilriego	63.5 <sup>b</sup>	86 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	4.38 <sup>c</sup>	5.26 <sup>b</sup>	5.46 <sup>a</sup>
Sin Fertilriego	50.5 <sup>b</sup>	62 <sup>a</sup>	61 <sup>a</sup>	3.9 <sup>b</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>

Anova-Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

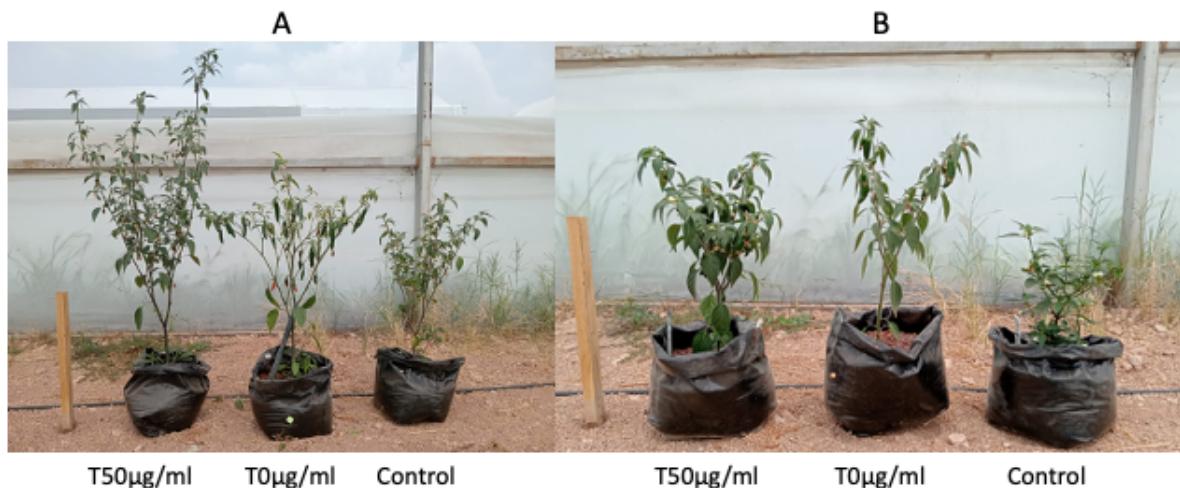


Figura 16: Observación del efecto de *Trichoderma asperellum* elicitedo con DNA homólogo sobre plantas de chile bajo estrés hídrico. A: Con fertirriego, B: Sin fertirriego.

## 7. DISCUSIÓN

Los resultados aquí presentados indican que *T. asperellum* puede reconocer diferentes concentraciones de eDNA homólogo y heterólogo y que este reconocimiento puede estar relacionado con la activación de mecanismos antioxidantes, una mayor actividad antagonista, la producción de ácido giberélico, y la emisión de un mayor número de VOCS del hongo; así como con la activación del sistema de defensa en chile cuando el hongo elicido es aplicado. Por un lado, los tratamientos con eDNA homólogo de 5, 50 y 200 µg/mL promovieron un aumento en la recuperación del hongo (UFC/mL) luego de exponer sus esporas durante 24 horas a los tratamientos (Fig. 1). Por otro lado, la exposición de las esporas durante 120 h a los tratamientos con eDNA homólogo mostró una reducción significativa en la viabilidad del hongo, encontrándose una baja recuperación y poco desarrollo del micelio en los tratamientos de 10, 50 y 200 µg/mL, es decir, a medida que aumentaba la concentración de eDNA homólogo (Fig. 2). Respecto a la exposición de las esporas de *T. asperellum* al eDNA heterólogo, se observó que el hongo también fue sensible a la aplicación, encontrándose una baja recuperación del hongo después de 24 y 120 h (Fig. 1 y 2).

Anteriormente, Mazzoleni et al (2015) evaluaron la tasa de germinación de esporas de *Trichoderma harzianum* y encontraron que concentraciones de 800 µg/mL de eDNA homólogo reducían significativamente la viabilidad del hongo después de 20 h de exposición *in vitro*. Otros estudios encontraron que concentraciones de 50-500 µg/mL de eDNA homólogo mostraron un efecto negativo sobre la viabilidad del oomiceto *P. capsici* *in vitro*, luego de 120 horas de exposición al tratamiento; mientras que la aplicación de 100 µg/mL eDNA homólogo sobre el sustrato de plantas de chile, donde el eDNA pudo verse degradado o diluido con el tiempo, promovió la patogenicidad del hongo (Ferrusquía-Jiménez et al., 2022).

Lo anterior es consistente con nuestros resultados al encontrar que un tiempo de exposición prolongado y/o altas concentraciones de eDNA homólogo pueden afectar negativamente el desarrollo del hongo, mientras que concentraciones bajas o un tiempo de exposición corto pueden no tener efecto o un efecto contrario en su tasa de germinación de esporas y

crecimiento. Por otro lado, el aumento en la recuperación fúngica (medio libre de eDNA) después de 24 h de exposición podría indicar un efecto elicitor debido al corto tiempo de exposición y al uso de concentraciones de eDNA homólogo inferiores que las estudiadas previamente en otras especies de microorganismos (Figura 17). Serán necesarios otros estudios que evalúen diferentes tiempos de exposición a concentraciones bajas y altas para dilucidar este fenómeno. Además, serán necesarios estudios que evalúen las condiciones *in vivo*.

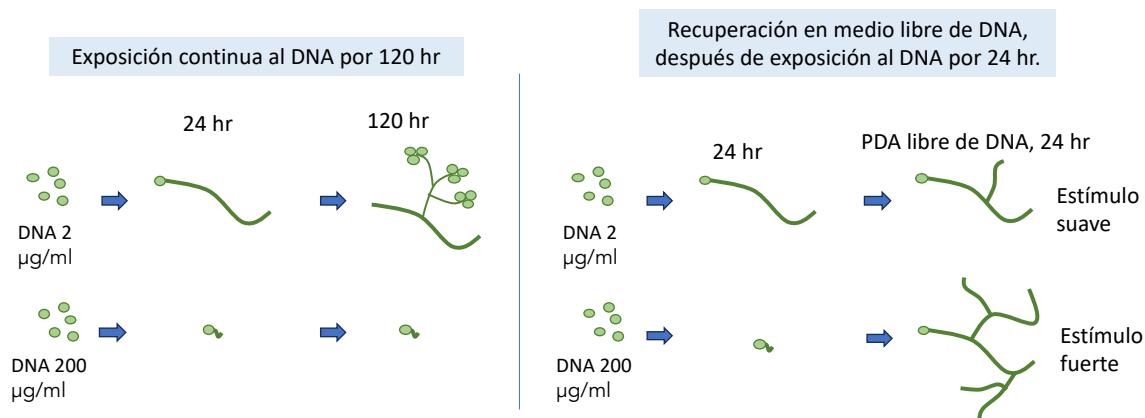


Figura 17. Esquema representativo del efecto del DNA extracelular homólogo ante diferentes dosis y tiempos de exposición propuesto.

A diferencia de otros estudios, el eDNA heterólogo utilizado en este trabajo afectó significativamente la viabilidad del hongo. Sin embargo, después de 120 horas de exposición a eDNA heterólogo, se observó desarrollo de micelio, a diferencia del tratamiento con eDNA homólogo, donde no se observó (Fig. 3). Esto es consistente con informes previos que sugieren que el eDNA heterólogo también puede ser reconocido por diferentes organismos a través de otras vías, generando efectos diferentes a los del eDNA homólogo (Chiusano et al., 2021; Ferrusquía-Jiménez et al., 2022; Vega -Muñoz et al., 2023). Para establecer asociaciones simbióticas o mutualistas planta-microorganismo, las plantas reconocen diferentes patrones moleculares asociados a los microorganismos (MAMPs-Microorganism Associated Molecular Patterns); y, a su vez, los microorganismos detectan señales provenientes de las plantas que favorecen el establecimiento de asociaciones y evitan que el hongo cause daño a los tejidos vegetales (Mattoo et al., 2021; Bartholomew et al., 2022). De

esta manera, *Trichoderma asperellum*, al establecer asociaciones mutualistas con plantas, pudo reconocer el DNA de la lechuga como una señal asociada al establecimiento de relaciones mutualistas, generando un crecimiento paulatino y desacelerado del hongo. El resultado obtenido sugiere que *Trichoderma asperellum* percibe el DNA de la lechuga y disminuye su tasa de crecimiento, fenómeno que puede estar involucrado con el estilo de vida endofítico del hongo. Algunos autores sugieren que la distancia filogenética es la propiedad que define si el eDNA heterólogo es fuertemente reconocido o no entre especies, es decir, cuanto mayor es la distancia filogenética entre especies, el eDNA tiene menor nivel de reconocimiento o menos efectos (Vega- Muñoz et al., 2018). Serán necesarios otros estudios bioquímicos y moleculares para esclarecer este fenómeno.

Para evaluar la existencia de respuestas relacionadas con el estrés o mecanismos antioxidantes se midió la actividad SOD y CAT del hongo. Se encontró que la actividad de SOD aumentó significativamente con los tratamientos de 2, 5, 10 y 200 µg/mL de eDNA homólogo, mientras que los tratamientos de 5 y 200 µg/mL aumentaron significativamente la actividad de CAT. Lo anterior indica un aumento en la actividad antioxidante del hongo luego de haber sido expuesto a tratamientos con eDNA homólogo. Estos resultados están en concordancia con lo encontrado previamente (Ferrusquía-Jiménez et al., 2022) donde se observó un aumento en el metabolismo oxidativo de *P. capsici* al exponerse al eDNA homólogo. Además, esto sugiere que el reconocimiento del eDNA homólogo por parte de *T. asperellum* está asociado con la generación de una respuesta de estrés en la que está involucrado el procesamiento fino de ROS.

En cuanto al efecto del eDNA homólogo sobre la producción de ácido giberélico 3, nuestros resultados sugieren que el tratamiento aumenta la producción de esta fitohormona. Diferentes autores reportan la producción de ácido giberélico en diferentes cepas de *Trichoderma*, sugiriendo que la producción de esta fitohormona aporta grandes beneficios al estado de salud general de cultivos de interés agronómico como el trigo, mejorando la resistencia a condiciones climáticas como la sequía (Illescas et al. ., 2021; Jarosuk et al., 2019). Por tal motivo, un aumento en la producción de giberelinas por el hongo puede estar asociado a la percepción de una condición de estrés, lo que favorece la producción de esta fitohormona.

Los ensayos de antagonismo por competencia de espacio/nutrientes realizados contra los patógenos *P. capsici* y *Fusarium oxysporum* mostraron que *T. asperellum* previamente elicitado con DNA homólogo inhibe el crecimiento radial del patógeno. Lo anterior indica que la elicitación previa de *T. asperellum* en la etapa vegetativa (micelio) promueve su crecimiento, compitiendo más efectivamente por el espacio contra otros hongos patógenos. Otros estudios han obtenido resultados similares mejorando la actividad antagonista de algunos microorganismos utilizando nanopartículas como elicidores (Ferrusquía-Jiménez et al., 2022a; de Moraes et al., 2021; Boroumand et al., 2020; Tian et al., 2020), lo que se correlaciona positivamente con nuestros resultados.

En cuanto a la producción de VOCs los resultados sugieren que los tratamientos benefician la producción de un mayor espectro de VOCs. La producción de VOCs, esta fuertemente involucrada en el desarrollo vegetal, y en el combate contra patógenos, siendo 6PP el VOC más relevante para la defensa contra hongos patogénos. La cepa *Trichoderma asperellum* 6S-2 coincide con una alta producción de 6PP y, por lo tanto, el biocontrol contra el hongo *Fusarium proliferatum* f. sp. *malus domestica* MR5 (Wang et al., 2021). El potencial de los VOCs en el combate de patógenos esta ampliamente estudiada (Ruangwong et al., 2021; Wonglom et al., 2020; Inayati et al., 2019; Nieto-Jacobo et al., 2017; López-Bucio et al., 2015). Hasta el momento son escasos los estudios que han utilizado inductores para la producción de VOCs o el aumento del porcentaje de inhibición de patógenos. Los existentes se basan en la suplementación de nutrición o uso de fungidas (Carrero-Carrón et al., 2021). En la aplicación del hongo (elicitado y no elicitado) sobre las plantas de chile, no se observaron diferencias significativas en las variables de altura y diámetro de tallo entre tratamientos. Por otro lado, se observó un aumento de la expresión relativa de los genes ERF1 (Ethylene-response-factor1) y PR1 (Pathogenesis-Related protein 1) aplicando a *T. asperellum* elicitado, sugiriendo la activación de diferentes mecanismos de defensa (ISR y SAR) contra una gran variedad de patógenos biótropos y necrótopos (Dutta et al., 2023). Los tratamientos promovieron un aumento de la actividad antioxidante SOD, CAT y PAL, sugiriendo la activación de respuestas de inmunidad, relacionadas a la regulación de ROS y de la ruta de los fenilpropanoides (producción de fitoalexinas, síntesis de proteínas PR) (Vega-Muñoz et al., 2018; Dutta et al., 2023). Estos resultados sugieren que el hongo

elicitado promueve el estado de alerta de las plantas de chile, al activar varios mecanismos de defensa, sin afectar sus características fisiológicas como altura y diámetro de tallo.

Al exponer las plantas a sequía (estrés abiótico), no se encontró diferencia significativa en la altura y diámetro de tallo de las plantas entre tratamientos, pero si con el control que no contenía al hongo. Lo anterior puede estar relacionado con la vía de defensa que se activa al aplicar a *Trichoderma* elicitado con DNA, la cual se sugiere va ligada al ataque de patógenos (estrés biótico). Sin embargo, se sugiere ampliar el número de individuos en próximos ensayos para esclarecer este fenómeno.

## 8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que se acepta la hipótesis planteada, debido a que los mismos indican un proceso de elicitation que modificó el metabolismo del hongo bajo diferentes tratamientos con DNA extracelular, lo que a su vez indujo cambios en el perfil metabólico y molecular de plantas de chile tratadas con el hongo elicitado.

Los resultados de este estudio sugieren que el DNA extracelular (eDNA) homólogo actúa como un elicitor eficaz para mejorar el desempeño biológico de *Trichoderma asperellum*. El tratamiento con eDNA no solo estimuló el crecimiento y desarrollo del hongo, sino que también mejoró su capacidad antagónica frente a fitopatógenos clave (*Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*) en ensayos *in vitro*. Además, el tratamiento promovió el aumento en la producción de giberelinas, la actividad de enzimas antioxidantes y la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) del hongo. La aplicación de *T. asperellum* elicitado con eDNA en plantas de chile indujo respuestas de defensa vegetal, evidenciadas por la sobreexpresión de los genes PR1a y ERF1, así como por el incremento en las actividades enzimáticas SOD, CAT y PAL en las plantas.

Estos hallazgos sugieren que el eDNA homólogo es una herramienta prometedora para potenciar la eficacia y persistencia de microorganismos benéficos en suelos agrícolas, contribuyendo potencialmente al desarrollo de estrategias de control biológico más sostenibles y efectivas. Se recomienda realizar estudios adicionales en condiciones de campo

para validar estos resultados y explorar las implicaciones a largo plazo de la elicitation basada en eDNA sobre los microbiomas del suelo y la sanidad de los cultivos.

## 9. REFERENCIAS

- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E., 1999. Solubilization of phosphate and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2926–2933.
- Baker B.P. Green T.A. Loker A.J. (2020) Biological control and integrated pest management in organic and T conventional systems. *Biological Control* 140: 104095
- Barbero F. Guglielotto M. Capuzzo A. Maffei M. (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*). *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1659; doi:10.3390/ijms17101659
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7: 249-260.
- Bigirimana J, Meyer G de, Poppe J, Elad Y, Hofte M (1997). Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 62:1001-1007.
- Bloemberg, V.G., and Lugtenberg, J.J. B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Biotic Interactions* 4:343-350.
- Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* 147:779-789.
- Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Bristol: CAB International; 2001. p. 311–46.
- Carvalho F.P. (2017) Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6(2): 48–60
- Choi HW, Klessig DF (2016) DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol* 16:232
- Contreras-Cornejo X. Macías-Rodríguez L. Herrera-Estrella A. López- Bucio J. (2014) The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant Soil.* DOI 10.1007/s11104-014-2069-x
- Demain AL, Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2000;69:1–39.
- Desmedt W. Vanholme B, Kyndt T. (2021) Chapter 5 - Plant defense priming in the field: a review. Academic Press: 87-124. ISBN 9780128210352.
- Duran-Flores D, Heil M. 2014. Damaged-self recognition in common bean (*Phaseolus vulgaris*) shows taxonomic specificity and depends on reactive oxygen species (ROS) signalling. *Frontiers in Plant Science* 5: 585.

- Duran-Flores, D., Heil, M. (2017) Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants. *Brain Behav. Immun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.010>.
- Duran-Flores, D., Heil, M., 2015. Growth inhibition by self-DNA: a phenomenon and its multiple explanations. *New Phytol.* 207, 482–485. <https://doi.org/10.1111/nph.13542>.
- Duran-Flores, D., Heil, M., 2016. Sources of specificity in plant damaged-self recognition. *Curr. Opin. Plant Biol.* 32, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.019>.
- El-Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A., Molan, Y.Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato Fusarium wilt. *Plant Pathol. J.* 31, 50–60.
- Ezziyyani M. Pérez C. Requena M. Ahmed A. Candela M. (2004). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con Burkholderia cepacia. *Anales de Biología* 26: 61-68.
- Ferrusquía-Jiménez, N.I., Chandrakasan, G., Torres-Pacheco, I. et al. Extracellular DNA: A Relevant Plant Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) for Crop Protection Against Pests—A Review. *J Plant Growth Regul* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10129-w>
- Flint, M.L., 2012. IPM in Practice: Principles and Methods of Integrated Pest Management, second ed. University of California Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA.
- Gajera H, Domadiya R, Patel S, Kapopara M, Golakiya B (2013). Molecular mechanism of Trichoderma as bio-control agents against phytopathogen system – a review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 1:133-142.
- Gao, J., 2006. The Guidance of Plant Physiology Experiments. Higher Education Press, Beijing.
- Ghorbanpour, M.; Omidvari, M.; Abbaszadeh-Dahaji, P.; Omidvar, R.; Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biol. Control*:117, 147–157.
- Guevara Gonzalez R.G. Villagomez-Aranda A.L. Ferrusquía-Jiménez N.I. Martinez-Resendiz M. (2019). Elicitores en la agricultura: bases teóricas y algunas aplicaciones. Editorial Universidad de Almería. Colección de Agronomía 2. ISBN: 978-84-1351-007-1
- Guzmán-Guzmán P. Porras-Troncoso M. Olmedo-Monfil V. Herrera-Estrella A. (2019). Trichoderma species: Versatile plant symbionts. *Phytopathology* 109: 6-16.
- Harman GE, Herrera-Estrella AH, Benjamin A, Matteo L (2012). Special issue: Trichoderma – from Basic Biology to Biotechnology. *Microbiology* 58:1-2.
- Heil M. (2009) Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in Plant Science*, 14, 356-363.
- Heil M. Land W. (2014) Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life. *Frontiers in Plant Science*, 5, art. 579.
- Heil M. Vega I. (2018). Nucleic acid sensing in plants and mammals - facts and caveats. MS submitted for 'NUCLEIC ACID SENSING AND IMMUNITY - PART B' serial INTERNATIONAL REVIEW OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY
- Heimpel, G.E., Mills, N., 2017. Biological Control – Ecology and Applications. Cambridge University Press <https://doi.org/10.1017/9781139029117>.

- Henry G, Thonart P, Ongena M (2012) PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biol Agron Soc Environ* 16(2):257–268
- Hideo I. (2006). Impact of Fungicide Resistance in Plant Pathogens on Crop Disease Control and Agricultural Environment. *JARQ* 40 (3), 205 – 211.
- Hoddle, M.S., Van Driesche, R.G., 2009. Biological control of insect pests. In: Resh, V.H., Cardé, R.T. (Eds.), *Encyclopedia of Insects*, second ed. Academic Press, San Diego, pp. 91–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00148-X>.
- Howell, C.R (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87:4-10
- Kloepfer, J. Ryu C. Zhang S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.
- Korpi A, Jarnberg J & Pasanen AL (2009) Microbial volatile organic compounds. *Crit Rev Toxicol* 39: 139–193.
- Lee S. Milgroom M. Taylor J. (1998). A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from Fungi. *Fungal Genetics Reports*: Vol. 35, Article 11. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1531>
- Liu CJ, Men WJ, Liu YJ, et al. (2002). The pollution of pesticides in soils and its bioremediation. *System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*, 18(4): 295-297
- López A. López S. Vázquez M. Rodríguez S. (2005). Inhibición del Crecimiento Micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante Extractos Vegetales Acuosos. *Revista mexicana de Fitopatología* 23(2): 183-190.
- López- Bucio J. Pelagio-Flores R. Herrera-Estrella A (2015). Trichoderma as biopesticidal agent: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* 196 (2015) 109–123.
- Mazzoleni S. Bonanomi G. Incerti G. Chiusano M. Termolino P.<sup>[REMOVED]</sup> Mingo A. Senatore M. Giannino F. Cartenì F. Rietkerk M. Lanzotti V. (2015a). Inhibitory and toxic effects of extracellular self-DNA in litter: a mechanism for negative plant–soil feedbacks?. *New Phytologist* 205: 1195–1210 doi: 10.1111/nph.13121
- Mazzoleni S. Bonanomi G. Incerti G. Chiusano M. Termolino P. Migliozzi A. Senatore M. Giannino F. Cartenì F. Rietkerk M. Risitano A. Lanzotti V. (2014). New perspectives on the use of nucleic acids in pharmacological applications: inhibitory action of extracellular self-DNA in biological systems. *Phytochem Rev* 13:937–946 DOI 10.1007/s11101-014-9386-9.
- Mazzoleni S. Cartenì F. Bonanomi G. Senatore M. Termolino P. Giannino F. Incerti G. Rietkerk M. Lanzotti V. Chiusano M.(2015b) Inhibitory effects of extracellular self-DNA: a general biological process? *New Phytologist* 206: 127–132 doi: 10.1111/nph.13306
- Mejía-Teniente L, et al. (2019) Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annuum* L.) against pepper T golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106: 23–29.
- Mejía-Teniente L. Torres-Pacheco I. González-Chavira M.M. Ocampo-Velazquez R.V. Herrera-Ruiz G. Chaparro Oliver A.M. Guevara-González R.G. (2010) Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology* 9 (54): 9155-9162.
- Montes R. (1996). Productos naturales de origen vegetales para el combate de fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14:9-14.
- O'Neill, L. A. J. (2013) Sensing the dark side of DNA. *Science*, 339, 763-764.

- Oerke E. (2006). Crop losses to pest. Journal of Agricultural Science 144, 31–43. doi:10.1017/S0021859605005708
- Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Mudge SR, Schenk PM, Christie M, Carroll BJ, Schmidt S. 2010. DNA is taken up by root hairs and pollen, and stimulates root and pollen tube growth. Plant Physiology 2010: 799–805.
- Pisetsky, D. S. (2012). The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. Clinical Immunology, 144(1), 32-40.
- Popoola A. R. Durosomo. A. H. Afolabi C. G. Idehen E. O. (2015) Regeneration of Somaclonal Variants of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) for Resistance to Fusarium Wilt, Journal of Crop Improvement, 29:5, 636-649, DOI: 10.1080/15427528.2015.1066287
- Quintana-Rodriguez E, Duran-Flores D, Heil M, Camacho-Coronel X (2018) Damage-associated molecular patterns (DAMPs) as future plant vaccines that protect crops from pests. Sci Hortic 237:207–220
- Rawat, R., Tewari, L., 2011. Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. Curr. Microbiol. 62, 1521–1526.
- Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica, Documento Técnico Nº 11. (2013). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. Washington, DC.
- Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Gala R, Collado IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochem Rev 2008;7: 89–123.
- Rey M, Delgado-Jarana J, Benítez T (2001). Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55:604-608.
- Saksirirat W, Chareerak P, Bunyatrachata W (2009). Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. Asian J. Food Agro-Industry 2:S99- S104.
- Samuels, G.J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100, 923–935.
- Serrano L, Galindo E. (2007). Control Biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. Ciencia: 77-88.
- Shentu X, Liu W, Zhan X, Yu X, Zhang C. (2013) The Elicitation Effect of Pathogenic Fungi on Trichodermin Production by *Trichoderma brevicompactum*. The Scientific World Journal 2013: 607102. doi.org/10.1155/2013/607102
- Singh A, Shukla N, Kabadwal B.C, Tewari A.K, Kumar J. (2018) Review on Plant-Trichoderma-Pathogen Interaction. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 7(2): 2382-2397.
- Pratap Singh, S., Keswani, C., Pratap Singh, S., Sansinenea, E., Xuan Hoat, T. (2021). *Trichoderma* spp. mediated induction of systemic defense response in brinjal against *Sclerotinia sclerotiorum*. Curr. Res. Microb. Sci. 2. https://doi.org/10.1016/j.crmicr. 2021.100051.
- Thakur M, Bhattacharya S, Khosla P.K, Puri S. (2019) Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 12: 1–12.
- U. S. Department of Health and Human Services (USDHHS). (1992). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for 1,2-dibromoethane. Public Health Service. Atlanta, GA.
- United Nations Environmental Program (UNEP). (1995). Montreal Protocol on Substances that deplete the Ozono Layer. Report of methyl bromide technical options committee: Assessment, Ozone Secretariat, Nairobi, Kenya.

- Vázquez-Hernández M.C. Parola-Contreras I. Montoya-Gómez L.M. Torres-Pacheco I, Schwarz D. Guevara-González R.G. (2017) Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables T production. *Scientia Horticulturae* 250 (2019) 223–229.
- Vazquez-Hernandez M.C., Feregrino-Perez A.A. Perez-Ramirez I., Ocampo-Velazquez R. Rico-García E., Torres-Pacheco I. Guevara-Gonzaleza R.G. (2019). Controlled elicitation increases steviol glycosides (SGs) content and gene T expression-associated to biosynthesis of SGs in Stevia rebaudiana B. cv. Morita II. *Industrial Crops & Products* 139: 111479
- 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 2015 Biology*, publ. online, May 2018, DOI: 10.1071/FP18011.
- Veresoglou SD, Aguilar-Trigueros CA, Mansour I, Rillig MC. 2015. Self-DNA: a blessing in disguise? *New Phytologist* 207: 488–490.
- Vinale F. et al. (2014). A Novel Fungal Metabolite with Beneficial Properties for Agricultural Applications. *Molecules* 19: 9760-9772. doi:10.3390/molecules19079760
- Vinale F. Sivasithamparam K. Ghisalberti E.L. Marra R. Barbetti M.J. Li H. Woo S.L. Lorito M. (2008) A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72, 80–86.
- Viterbo A, Harel M, Chet I (2004). Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 238:151-158.
- Waghunde R. Shelake R. Sabalpara A (2016) Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research* 11 (22): 1952-1965.
- Yatim, N., Cullen, S. Albert, M. L. (2017). Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *2055 Nature Reviews Immunology*, 17, 262-275.
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I., 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235, 235–242.
- Yuan J, Raza W, Shen Q & Huang Q (2012) Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense*. *Appl Environ Microbiol* 78: 5942–5944.
- Zavaleta-Mejía, E. (1994). Control biológico de fitopatógenos con origen en el suelo y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 12:107-111
- Zhang F. Yang X. Ran W. Shen Q. (2014). *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. *EMS Microbiol Lett* 359: 116–123.
- Zhang W. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 8(1): 1-27
- Zhang WJ, Liu GH. (2017). Situation and development of worldwide agri-environment: Agricultural land uses, fertilizers consumption and carbon dioxide equivalent emissions. *Environmental Skeptics and Critics*, 6(1): 1-8
- Zhang WJ. (2011). Constructing ecological interaction networks by correlation analysis: hints from community sampling. *Network Biology*, 1(2): 81-98
- Zunun-Pérez AY, Guevara-Figueroa T, Jimenez-Garcia SN, Feregrino-Pérez AA, Gautier F and Guevara-González RG (2017) Effect of foliar application of salicylic acid, hydrogen peroxide and a xyloglucan

- oligosaccharide on capsiate content and gene expression associated with capsinoids synthesis in Capsicum annuum L. *J. Biosci.* 42 245–250
- Pray, L. (2008) Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education* 1(1):100
  - Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Structure and Function of DNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/>
  - <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Deoxyribonucleic-Acid-Fact-Sheet#:~:text=What%20does%20DNA%20do%3F,the%20work%20in%20our%20bodies>.
  - Thambugala, K.M.; Daranagama, D.A.; Phillips, A.J.L.; Kannangara, S.D.; Promputtha, I. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 718.
  - Tyskiewicz, R.; Nowak, A.; Ozimek, E.; Jaroszuk-S'ciseł, J. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *Int. J. Mol. Sci.*:23,2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>.
  - Zhang W. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 8(1): 1-27.
  - Niu, B.; Wang, W.; Yuan, Z.; Sederoff, R.R.; Sederoff, H.; Chiang, V.L.; Borris, R. (2020) Microbial interactions within multiple-strain Biological Control Agents impact soil-borne plant disease. *Front Microbiol*, 11, 585404.
  - Alfiky, A.; Weisskopf, L. (2021) Deciphering Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. *J. Fungi*, 7, 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>
  - Behiry, S.; Soliman, S.A.; Massoud, M.A.; Abdelbary, M.; Kordy, A.M.; Abdelkhalek, A.; Heflish, A. (2021) Trichoderma pubescens Elicit Induced Systemic Resistance in Tomato Challenged by Rhizoctonia solani. *J. Fungi* 2023, 9, 167. <https://doi.org/10.3390/jof9020167>
  - Zehra A., Aamir M., Dubey M., Ansari W., Meena M., Swapnil P., Upadhyay R.S., et al. (2023) Enhanced protection of tomato against Fusarium wilt through bioprimering with Trichoderma harzianum, *Journal of King Saud University – Science* 35 (2), 102466, ISSN 1018-3647, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102466>.
  - Stracquadanio, C.; Quiles, J.M.; Meca, G.; Cacciola, S.O. Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by Trichoderma asperellum and Trichoderma atroviride in Liquid Medium. *J. Fungi* 2020, 6, 263. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>
  - Wonglom P., Ito S., Sunpapao A. (2020) Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus Trichoderma asperellum T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*), *Fungal Ecology* 43, 100867, ISSN 1754-5048, <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100867>.
  - Waghunde R. Shelake R. Sabalpara A (2016) Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research* 11 (22): 1952-1965
  - De Moraes, A.C.P., Ribeiro, L. da S., de Camargo, E.R., Lacava, P.T., (2021) The potential of nanomaterials associated with plant growth-promoting bacteria in agriculture. 3 Biotech. vol. 11. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02870-0> Issue 7.
  - 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) Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in sustainable agricultural production, *Science of The Total Environment* 894, 164883, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164883>.
  - Boroumand, N., Behbahani, M., Dini, G., 2020. Combined effects of phosphate solubilizing bacteria and nanosilica on the growth of land cress plant. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 20 (1), 232–243. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00126-8>.

- Tian, L., Shen, J., Sun, G., Wang, B., Ji, R., Zhao, L., 2020. Foliar application of SiO<sub>2</sub> nanoparticles alters soil metabolite profiles and microbial community composition in the pakchoi (*Brassica chinensis* L.) rhizosphere grown in contaminated mine-soil. *Environ. Sci. Technol.* 54, 13137–13146.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03767>.