

Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Maestría en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

Efecto del uso del DNA extracelular (eDNA) propio para el manejo de *Fusarium*  
*spp* en suelo.

Tesis

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

Presenta:

Alejandra Jiménez Hernández

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco

Secretario

Dr. Enrique Rico García

Vocal

M.C. Ileri Alejandra Carbajal Valenzuela

Suplente

M.C. Adán Mercado Luna

Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.

Diciembre 2022

México

## RESUMEN

En la agricultura, una limitante importante son las plagas y enfermedades, entre estas últimas las ocasionadas por hongos fitopatógenos son las más relevantes, en donde *Fusarium spp.* genera importantes pérdidas de hasta 20-40% de producción. El control de *Fusarium spp.* ha sido difícil debido a su capacidad para persistir en el suelo y su progreso en los tejidos vasculares. Existen varias opciones de manejo para *Fusarium spp.* que van desde el control cultural modificando las prácticas agrícolas generando un entorno desfavorable para el patógeno, el control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas y el control químico, sin embargo, estos métodos han perdido eficacia, además el uso indiscriminado de productos químicos afecta severamente el agroecosistema y la salud humana, por lo que se ha visto en la necesidad de desarrollar métodos alternativos para el manejo de *Fusarium spp.* Actualmente, la investigación se ha centrado en comprender los mecanismos de defensa natural de las plantas, siendo uno de los enfoques más prometedores el uso del DNA extracelular (eDNA), además de diversos estudios sobre el efecto inhibitor del eDNA fragmentado propio y específico de cada especie enfocado a microorganismos fitopatógenos, fundamentándose en que la respuesta de un organismo depende de la detección de “peligro” o patrones moleculares asociados al daño (DAMP). Por lo anterior, el desarrollo del presente trabajo se enfocó en evaluar este fenómeno de inhibición usando eDNA propio de *Fusarium spp.* en suelo como una alternativa más amigable con el medio ambiente, por medio de aplicaciones de diferentes concentraciones (0, 50 y 500 µg/mL) y diferentes tiempos de aplicación (1 hora después de inocular el hongo y hasta 2 días después de la inoculación) del eDNA fragmentado en suelo inoculado con *Fusarium spp.*, además se realizó un ensayo en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con las mejores concentraciones. En donde la dosis de 500 µg/mL presentó mejores resultados disminuyendo el crecimiento del patógeno en placa, observando que la aplicación más efectiva fue la realizada dos días después de que se inoculó el suelo con *Fusarium spp.*, asimismo, la respuesta de las plántulas de tomate a tratamientos con el patógeno y el eDNA disminuyó significativamente su severidad de daño.

**Palabras clave:** eDNA, DAMP, control biológico, *Fusarium spp.*

## SUMMARY

In agriculture, an important limitation is pests and diseases, among the diseases caused by phytopathogenic fungi are the most relevant, where *Fusarium spp.* generates significant losses of up to 20-40% of production. Control of *Fusarium spp.* has been difficult due to its ability to persist in the soil and its progress within vascular tissues. Several management options have been used for *Fusarium spp.*, since cultural control by modifying agricultural practices to generate an unfavorable environment for the pathogen, biological control through the use of antagonistic microorganisms and chemical control, however, these methods have lost effectiveness, in addition the indiscriminate use of chemical products severely affects the agroecosystem, as well as human health, for these reasons it has been necessary to develop alternative methods for the management of *Fusarium spp.* Currently, research has focused on understanding the natural defense mechanisms of plants, one of the most promising approaches being the use of extracellular DNA (eDNA), in addition to various studies of the inhibitory effect of fragmented self eDNA and specific of each species focused on phytopathogenic microorganisms, based on the fact that the response of an organism depends on the detection of “danger” or damaged-associated molecular patterns (DAMP). Therefore, the development of this work focused on evaluating this inhibition phenomenon using eDNA from *Fusarium spp.* in soil as an alternative friendlier to the environment, through applications of different concentrations (0, 50 y 500 µg/mL) and different application times (1 hour after inoculating the fungus and up to 2 days after inoculation) of the fragmented eDNA in soil inoculated with *Fusarium spp.*, in addition, an assay was carried out on tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) with the best concentrations. Where the doses of 500 µg/mL presented better results, reducing the growth of the pathogen in plaque, observing that the most effective application was the one carried out two days after the soil was inoculated with *Fusarium spp.*, likewise, the response of the tomato plants to treatments with the pathogen and the eDNA significantly decreased its severity of damage.

**Key words:** eDNA, DAMP, biological control, *Fusarium spp.*

**A mis padres y hermanos por todo su apoyo incondicional, amor, confianza y seguridad.**

**A Emmanuel por apoyarme y motivarme siempre.**

**A mis compañeras de la maestría que hicieron más ameno el proceso.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de todo corazón a mis padres que me estuvieron apoyando incondicionalmente durante todo mi desarrollo personal y profesional, por haber sido una parte muy importante en mi formación y brindarme siempre su confianza, motivación, apoyo y seguridad. A mis hermanos por motivarme a seguir adelante y apoyarme en todo mi proceso. Agradezco mucho a mi novio Emmanuel quien me proporcionó toda su comprensión y cariño durante el transcurso de mi maestría y que me estuvo apoyando siempre para lograr mis objetivos.

Además, agradezco a mis compañeras de maestría quienes hicieron que el proceso fuera más ameno a pesar de las adversidades de la pandemia. También agradezco a mis maestros que me transmitieron sus conocimientos y que trabajaron aún más duro para lograr realizar los cursos de manera virtual.

De igual manera agradezco a mi director de tesis, Dr. Ramón Gerardo Guevara González quien me guio en todo el proceso de la maestría, gracias por toda la paciencia, todos los conocimientos que logró dejarme y por despertar en mi una gran curiosidad y amor por la ciencia. También agradezco a mis sinodales que estuvieron siempre atentos en mi desarrollo y por todos los consejos y apoyo que me proporcionaron para el proyecto.

Agradezco mucho al CONACYT por la beca proporcionada con la cual fue posible desarrollar el proyecto, así como a la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería Campus Amazcala por permitirme desarrollarme tanto profesionalmente como en investigación en esta gran casa de estudios.

## INDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Acido desoxirribonucleico (DNA)	5
2.2 DNA extracelular (eDNA)	7
2.3 eDNA en suelo	10
2.4 Uso potencial del eDNA como DAMP	12
2.5 <i>Fusarium spp.</i>	14
2.6 Enfermedades causadas por <i>Fusarium spp.</i>	17
2.7 Métodos del manejo de enfermedades causadas por <i>Fusarium spp.</i>	20
2.7.1 Prácticas culturales	20
2.7.2 Prácticas de manejo biológico	20
2.7.3 Prácticas de manejo químico	21
3 HIPÓTESIS	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5 METODOLOGÍA	23
5.1 Extracción y fragmentación a menos de 1500 pb el DNA de <i>Fusarium spp.</i>	24
5.2 Determinación del efecto de la aplicación del eDNA de <i>Fusarium spp.</i> en la sobrevivencia del hongo en el suelo modelo de estudio.	25
5.3 Determinación del efecto protector de la aplicación del eDNA de <i>Fusarium spp.</i> en plántulas de tomate cultivado en suelo infestado con <i>Fusarium spp.</i>	27
5.3.1 Diseño experimental con plántulas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum L.</i> )	27
5.3.2 Evaluación del nivel de severidad e incidencia de la enfermedad en las plántulas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum L.</i> )	29

5.4.	Evaluación de la respuesta de las plántulas de tomate cultivadas en suelo infestado con <i>Fusarium spp.</i> en cuanto a la producción de metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides totales).	31
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1	Extracción y fragmentación a menos de 1500 pb del DNA de <i>Fusarium spp.</i>	32
6.2	Determinación del efecto de la aplicación del eDNA de <i>Fusarium spp.</i> en la sobrevivencia del hongo en el suelo modelo de estudio.	34
6.2.1	Sobrevivencia y desarrollo de <i>Fusarium spp.</i> en el suelo modelo de estudio.	34
6.2.2	Determinación del efecto de la aplicación del eDNA de <i>Fusarium spp.</i> en el suelo.	39
6.3	Determinación del efecto de la aplicación del eDNA de <i>Fusarium spp.</i> en plántulas de jitomate cultivado en suelo infestado con <i>Fusarium spp.</i>	45
6.4	Evaluación de la respuesta de las plántulas de tomate cultivadas en suelo infestado con <i>Fusarium spp.</i> en cuanto a la producción de metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides totales).	50
7	CONCLUSIONES	54
8	REFERENCIAS	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación de las bases nitrogenadas y su estructura química.	7
Tabla 2.- Taxonomía de <i>Fusarium spp.</i>	15
Tabla 3.- Descripción de las estructuras microscópicas de <i>Fusarium spp.</i>	17
Tabla 4.- Tratamientos llevados a cabo para la determinación del efecto del eDNA de <i>Fusarium spp.</i> en su sobrevivencia en suelo.	26
Tabla 5.- Grupos que se llevaron a cabo para la determinación del efecto protector de la aplicación del eDNA de <i>Fusarium spp.</i> en plántulas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum L.</i> ).	27
Tabla 6.- Nivel de severidad de plantas de tomate con infección por <i>Fusarium spp.</i> (Bosland y Lindsey, 1991).	29
Tabla 7.- Concentración obtenida de la extracción del DNA de <i>Fusarium spp.</i> y volumen final obtenido.	32
Tabla 8.- Resultados obtenidos de la cuenta viable de UFC/g de suelo de <i>Fusarium spp.</i> del grupo control.	34
Tabla 9.- Resultados obtenidos de la cuenta viable de UFC/g de suelo de <i>Fusarium spp.</i> del grupo que se pasteurizó.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura del DNA (Modificada de Alnaji, 2018).	6
Figura 2.- Sistema de Quórum sensing (QS) en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Modificada de Shankar y Ravishankar, 2018).	9
Figura 3.- Percepción y respuestas comunes provocadas por DAMP (Modificada de Ferrusquia-Jiménez et al., 2020).	14
Figura 4.- Morfología microscópica de <i>Fusarium</i> spp (Tomada de Vera-Roman, 2013).	16
Figura 5.- Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> spp; a) marchitamiento vascular, b) Pudrición de raíz.	18
Figura 6.- Conteo de esporas de <i>Fusarium</i> spp. en cámara de Neubauer.	25
Figura 7.- Plántulas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.), en donde el recuadro rojo señala aproximadamente el corte transversal en las raíces.	28
Figura 8.- Arreglo de las plántulas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) de los diferentes grupos.	29
Figura 9.- Parte basal del tallo de plántula de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.).	30
Figura 10.- Verificación del nivel de fragmentación del DNA en donde el carril 1 corresponde a la muestra de DNA de <i>Fusarium</i> spp. sonicada, y el carril 2 corresponde a la escalera molecular de 10 kb.	33
Figura 11.- Gráfico de los resultados obtenidos de la cuenta viable de <i>Fusarium</i> spp, reportado en UFC/g de suelo (log 10), en donde los círculos representan los resultados del grupo control, y los cuadros los obtenidos del tratamiento llevado a cabo de pasteurización. Letras diferentes al final de cada grupo indica diferencias significativas (Anova de 2 vías y prueba de Tukey con $\alpha=0.05$ ).	36
Figura 12.- Gráfico de los resultados obtenidos del ensayo de germinación de esporas en el suelo modelo de estudio, en donde lo círculos negros representan los porcentajes obtenidos de esporas, y los círculos blancos el porcentaje obtenido de células vegetativas. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de 2 vías y prueba de Tukey con $\alpha=0.05$ ).	38
Figura 13 Cuenta viable de <i>Fusarium</i> spp. bajo el tratamiento de eDNA propio a diferentes concentraciones, en donde los círculos representan el grupo control (se inoculó las esporas y luego agua destilada), los cuadros representan el grupo con eDNA a 50 $\mu\text{g/ml}$ (se inoculó primero las esporas y luego el eDNA), los triángulos representan el grupo con eDNA a 500 $\mu\text{g/ml}$ (se inoculó primero las esporas y luego el eDNA) y los triángulos invertidos	

representan el grupo con eDNA a 500 µg/ml (se inoculó primero el eDNA y después las esporas). Letras diferentes al final de cada grupo indica diferencias significativas (ANOVA de 2 vías y prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$ ). 40

Figura 14 Disminución del crecimiento de *Fusarium* spp. en placa en el tiempo, utilizando eDNA propio fragmentado a 500 ppm con el tiempo 42

Figura 15.- Efecto De la aplicación en suelo de 500 µg/ml de eDNA propio de *Fusarium* spp. en diferentes tiempos con respecto a la inoculación con esporas del hongo. Panel A), cuenta viable total; Panel B), porcentaje de esporas; Panle C), porcentaje de células vegetativas. En donde; E+DNA= esporas de hongo y aplicación de eDNA, DNA+E= aplicación de eDNA e inoculación de esporas, E+2dDNA= esporas de hongo y 2 días después aplicación del eDNA. Letras diferentes en cada curva de cada panel indican diferencias significativas (ANOVA de 2 vías y prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$ ). 43

Figura 16.- Cuenta viable de *Fusarium* spp. en tejido de plántula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) expresadas en UFC/gramo de tejido, en donde; CSHE=grupo control plnta sin herida y con esporas del hongo, CHDNA=grupo control planta heriday con eDNA, CSHA=grupo control planta sin herida y con agua destilada estéril, CHA=grupo control planta herida y con agua destilada estéril, CHE=grupo control planta herida y con esporas del hongo, TDNA+E=tratamiento planta herida inoculando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo y TE+2dDNA=tratamiento planta herida inoculando primero las esporas y dos días después el eDNA. Letras diferentes en cad grupo indican diferencias significativas (ANOVA de una vía y prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$ ). 46

Figura 17.- Nivel de severidad de *Fusarium* spp. en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), en donde; CSHE= grupo control planta sin herir y con esporas del hongo, CHDNA= grupo control planta herida y con eDNA, CSHA= grupo control planta sin herida y con agua destilada estéril, CHA= grupo control planta herida y con agua destilada estéril, CHE= grupo control planta herida y con esporas del hongo, TDNA+E= tratamiento planta herida inoculando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo y TE+2dDNA= tratamiento planta herida inoculando primero las esporas y dos días después el eDNA. Letras diferentes en cada grupo indican diferencias significativas con prueba de H Kruskal Wallis y prueba de Dunn con  $P=0.05$ . 47

Figura 18.- Plántula con fenotipo típico del grupo CHE (Control planta herida + esporas) en el día 7 de observación. 47

Figura 19.- Plántulas del grupo CHE (Control planta herida + esporas), en donde; A) es una planta muerta observada en el día 8 y B) es la primera planta que presentó marchites en este grupo observada el día 10. 49

Figura 20.- Plántulas de tomate 3 semanas después de aplicar los tratamientos, en donde; a) se refiere al grupo control de planta sin herida + agua destilada esteril, b) corresponde al grupo de las plantas heridas + agua destilada esteril, y c) al grupo control de la planta herida + el eDNA. 48

Figura 21.- Plántulas de tomate 3 semanas después de aplicar los tratamientos, en donde; a) se refiere al tratamiento de plantas heridas aplicando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo, y b) corresponde a las plantas heridas inoculando primero las esporas del hongo y 2 días después el eDNA. 49

Figura 22.- Contenido de fenoles totales en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) reportado en  $\mu\text{g}$  ácido gálico/mg muestra seca, en donde; CSHE= grupo control planta sin herir y con esporas del hongo, CHDNA= grupo control planta herida y con eDNA, CSHA= grupo control planta sin herida y con agua destilada esteril, CHA= grupo control planta herida y con agua destilada esteril, CHE= grupo control planta herida y con esporas del hongo, TDNA+E= tratamiento planta herida inoculando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo y TE+2dDNA= tratamiento planta herida inoculando primero las esporas y dos días después el eDNA. Letras diferentes en cada grupo indican diferencias significativas (ANOVA de una vía y prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$ ). 51

Figura 23.- Contenido de flavonoides totales en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) reportado en  $\mu\text{g}$  rutina/mg muestra seca, en donde; CSHE= grupo control planta sin herir y con esporas del hongo, CHDNA= grupo control planta herida y con eDNA, CSHA= grupo control planta sin herida y con agua destilada esteril, CHA= grupo control planta herida y con agua destilada esteril, CHE= grupo control planta herida y con esporas del hongo, TDNA+E= tratamiento planta herida inoculando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo y TE+2dDNA= tratamiento planta herida inoculando primero las esporas y dos días después el eDNA. Letras diferentes en cada grupo indican diferencias significativas (ANOVA de una vía y prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$ ). 52

## 1 INTRODUCCIÓN

En la agricultura, uno de los aspectos importantes es el manejo de plagas y enfermedades, debido a que éstas son una amenaza para la seguridad alimentaria, siendo las responsables de las pérdidas de 20 a 40% de la producción mundial de alimentos (Tovar-Castaño, 2008; FAO, 2017).

Dentro de las enfermedades en la producción agrícola, las ocasionadas por hongos fitopatógenos son de las más importantes (Kenneth *et al.*, 2018). De acuerdo con estimaciones de la FAO, la agricultura mundial pierde cada año el 12% de su producción por daños causados por hongos fitopatógenos, más que por cualquier otro patógeno (Martínez-Bolaños, 2012). Entre los géneros fitopatógenos, uno de las más relevantes es *Fusarium spp.*, el cual está presente en muchos cultivos hortícolas causantes de una gran cantidad de enfermedades en los cultivos, generando importantes pérdidas económicas (Villa-Martínez *et al.*, 2014).

*Fusarium spp.* es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica por largos periodos debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas (Kenneth *et al.*, 2018). Son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, son considerados principalmente como hongos de campo, ya que causan un sinnúmero de enfermedades en cultivos. Sus daños desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas considerables (Villa-Martínez *et al.*, 2014).

Dentro de este género se encuentra *Fusarium oxysporum*, considerado como uno de los fitopatógenos más importantes transmitidos en el suelo, éste ha sido objeto de diversos estudios debido a que produce severas enfermedades como la podredumbre por proliferación fúngica sobre los sistemas radicales de las plantas ocasionando su marchitez en alrededor de 120 plantas de interés comercial para el hombre, además de reducir hasta un 60 % el rendimiento de cultivos hortícolas y ornamentales (Aguilar-Gastelum, 2016; Dinolfo *et al.*, 2017).

El estudio de *Fusarium oxysporum* ha sido tal que hoy en día es reconocida como un complejo de especies debido a su alto nivel de diversidad filogenética y funcional, la evidencia de dicha diversidad radica en su impresionante gama de plantas hospedantes que incluye tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Lecomte *et al.*, 2016; Edel-Hermann & Lecomte 2019), además, de acuerdo con Gordon (2017), *Fusarium oxysporum* ha sido identificado en suelos nativos de muchas partes del mundo, recuperándose aislamientos de éste en raíces de plantas y materia orgánica muerta.

El control de *Fusarium spp* ha sido difícil debido a su capacidad para persistir en el suelo por muchos años mediante sus estructuras de reposo (clamidiosporas) y debido a su progreso dentro de los tejidos vasculares (Mejdoub-Trabelsi *et al.*, 2019). Por otro lado, se han utilizado varias opciones de manejo como el control cultural que incluye la modificación de las prácticas agrícolas para generar un entorno desfavorable para el patógeno, el control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas y el control químico que consiste en el uso de moléculas químicas como benzimidazoles, carbendazim, entre otros (Ajillogba *et al.*, 2013; Wanjohi *et al.*, 2018; Arie, 2019).

Algunas otras opciones que se pueden definir como control genético mediante el uso de variedades genéticamente modificadas, ha sido de lo más actual que se ha realizado para el manejo de dicho patógeno, en conjunto con actividades como el uso de injertos resistentes al ataque. Sin embargo, estos métodos han sido insuficientes debido a la naturaleza del suelo, la resistencia a los fungicidas desarrollada por los patógenos y la aparición de nuevas especies (Aguilar-Gastélum, 2016; Rampersad, 2020). Es importante resaltar la resistencia a los fungicidas, la cual se refiere a una reducción adquirida o hereditaria de la sensibilidad de un hongo a una sustancia activa antifúngica específica, debido a que, en los últimos años, se han notificado cada vez más en todo el mundo varios casos de resistencia a fungicidas en hongos fitopatógenos (Carmona *et al.*, 2020), siendo *Fusarium spp.* uno de los agentes fitopatógenos que desde 1998 se ha

reportado mostrar resistencias a las moléculas químicas utilizadas para su control (Han *et al.*, 2021).

Además, cabe mencionar que el uso de moléculas químicas como los fungicidas afectan severamente el agroecosistema al ser compuestos químicos cuya residualidad persiste en los suelos y pueden migrar a aguas superficiales y subterráneas, así como afectar a la salud humana (Wightwick *et al.*, 2010; Delgado-Morato, 2019). De acuerdo con el Consejo Nacional de Investigación en Agricultura de Estados Unidos, estos productos constituyen el 60% de los pesticidas usados en la producción de alimentos con riesgos oncogénicos por lo que su uso debe ser restringido (Rodríguez-Ruvalcaba, 2002). Cabe mencionar que el uso de fungicidas afecta negativamente otros microorganismos benéficos del suelo, afectan la salud humana y también contaminan el medio ambiente (Ajilogba *et al.*, 2013).

La creciente preocupación por los riesgos asociados con los productos químicos, la alta frecuencia de su uso, la pérdida de eficacia debido al desarrollo de resistencia, la capacidad de los fitopatógenos de ser viables durante muchos años, así como el riesgo a la salud humana, han llevado a la necesidad de desarrollar sustitutos no químicos o métodos alternativos para el manejo de *Fusarium spp.* con enfoques ambientalmente amigables (Bawa 2016; Salah *et al.*, 2019).

En los últimos años, la investigación se ha centrado en comprender los mecanismos de defensa natural de las plantas con el fin de desarrollar nuevos tratamientos de agricultura natural para hacer frente a las plagas y enfermedades, siendo uno de los enfoques más prometedores el uso del DNA extracelular (eDNA), el cual tiene múltiples roles en el metabolismo de las plantas (Carbajal-Valenzuela *et al.*, 2021), como los estudios recientes que han encontrado que el eDNA propio fragmentado (<700 pb) desencadena respuestas tempranas de defensa en plantas (Vega-Muñoz *et al.*, 2020).

La activación de las respuestas de las plantas requiere la percepción de moléculas del patógeno y de la planta que desencadenan respuestas de resistencia a través de diversos sistemas moleculares (Mélida *et al.*, 2020), dicha percepción ocurre durante el estrés celular o daño mecánico ocasionado por el ataque de patógenos,

en donde los compuestos endógenos dependientes de la concentración, activan las respuestas locales y sistemáticas relacionadas con la inmunidad innata de la planta (Meents & Mithöfer, 2020; Pontiggia *et al.*, 2020). En las plantas, está bien establecido que el DNA no propio (con menor relación filogenética) de origen bacteriano, desencadena respuestas inmunológicas con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y deposición de calosa (Monticolo *et al.*, 2020).

Sin embargo, el consumo de energía por parte de las plantas en las respuestas inmunes afecta el crecimiento de las mismas, debido a que utilizan sus recursos para defenderse de la enfermedad (Serrano-Jamaica *et al.*, 2021). Por otro lado, diversas investigaciones se han enfocado en el estudio del efecto inhibitor del DNA extracelular fragmentado propio y específico de cada especie como bacterias, hongos, algas, plantas, entre otros, cabe mencionar que dicha respuesta es dependiente de la concentración (Mazzoleni *et al.*, 2015). Estos hallazgos se fundamentan en que la respuesta de un organismo depende de la detección del “peligro” o patrones moleculares asociados al daño (DAMP), debido a que durante la lesión celular diversas macromoléculas fragmentadas se liberan al medio extracelular, siendo potencialmente percibidas por células intactas del mismo organismo como DAMP, sugiriendo que esta señal de daño puede ser un factor de estrés que indique un medio no apto para su sobrevivencia (Duran-Flores & Heil, 2018; Ferrusquia-Jiménez *et al.*, 2020; Barbero *et al.*, 2021).

Investigaciones previas han descrito que el eDNA propio de cada especie funciona como un DAMP, debido a que han suprimido el crecimiento y desarrollo de varios organismos, sugiriendo que dicha molécula es una señal de estrés indicando un entorno inadecuado para su supervivencia (Mazoleni *et al.*, 2015; Ferrusquia-Jiménez *et al.*, 2020). Estas investigaciones argumentan que este mecanismo de inhibición, al facilitar la coexistencia, representa un mecanismo de mantenimiento de la diversidad, generando con estas observaciones importantes reflexiones en los aspectos ecológicos, fisiológicos y moleculares (Veresoglou *et al.*, 2015).

Para explicar la acción del eDNA, se han propuesto dos mecanismos, la presencia de receptores de reconocimiento de patrones localizados en la membrana

plasmática (PRR) capaces de desencadenar una cascada de transducción de señales o la posibilidad de que pueda entrar de alguna manera al citosol e interferir en los procesos biológicos (Barbero *et al.*, 2021; Barghahn *et al.*, 2021).

A partir de estas observaciones, Ferrusquia-Jiménez (2020) reportó que el eDNA fragmentado propio de *Fusarium spp.* en medio de cultivo líquido suprime la germinación de las esporas a concentraciones de 500 ppm. Por lo tanto, la incógnita científica en esta investigación consiste en determinar si el eDNA propio funciona como DAMP y en consecuencia puede incidir en el desarrollo o crecimiento de *Fusarium spp.* en suelo, sin embargo, en el suelo al ser una matriz más dinámica debido a sus propiedades físicas como la temperatura, tipo de suelo, textura, así como sus propiedades químicas como el pH, concentración de salinidad, materia orgánica, además de la diversidad de microorganismos que están presentes, por lo que debemos de considerar algunas otras variables.

Hasta ahora se sabe que el eDNA en el suelo puede llegar a persistir de semanas hasta años, esto depende de varios factores ambientales y biológicos, como las características físico-químicas del suelo (Carini *et al.*, 2016), siendo considerado el eDNA en el suelo como una fuente de nutrientes para los microorganismos presentes en éste, ya que puede proporcionar hasta un 4% de carbono, 7% de nitrógeno y 47% de fósforo (Ibáñez de Aldeoca *et al.*, 2017; Vuillemin *et al.*, 2017).

## **2 REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Acido desoxirribonucleico (DNA)**

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es una macromolécula polimérica y es el material genético predominante en el mundo viviente. El descubrimiento de que el DNA es la molécula que lleva toda la información hereditaria dentro de los cromosomas, inmediatamente se centró la atención en su estructura (Travers y Muskhelichvili, 2015).

Hace poco más de 60 años, Watson y Crick publicaron su artículo sobre la estructura del DNA, en él, enfatizaron dos características principales de la molécula: la complementariedad de las secuencias de bases en las dos cadenas y la naturaleza de doble hélice del polímero (Travers y Muskhelichvili, 2015).

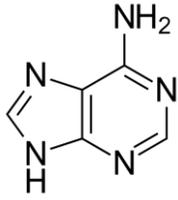
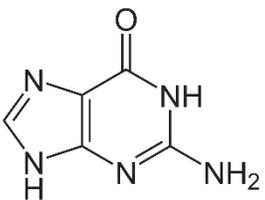
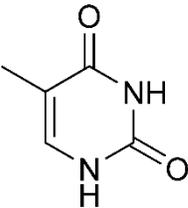
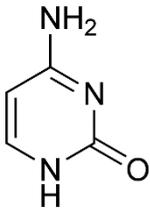
La molécula de DNA está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias (Figura 1). Los cuatro nucleótidos que forman el DNA contienen las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) (Alnaji, 2018) (Tabla 1).



Figura 1.- Estructura del DNA (Modificada de Alnaji, 2018).

La estructura del DNA es muy estable y se debe a la regla del “par de bases”; donde las dos hebras almacenan realmente la misma información biológica, pero corriendo en direcciones opuestas (“antiparalelo”) (Spencer, 2020).

Tabla 1.- Clasificación de las bases nitrogenadas y su estructura química.

Base nitrogenada	Tipo	Estructura química
Adenina (A)	Purinas	
Guanina (G)		
Timina (T)	Pirimidinas	
Citosina (C)		

## 2.2 DNA extracelular (eDNA)

El ácido desoxirribunocléico extracelular (eDNA) son moléculas de DNA de cadena sencilla o doble, que se encuentran circulando fuera de las células (Martínez-Esquerro, 2007).

Las moléculas de DNA no se encuentran exclusivamente dentro de las células, también está presente en el medio extracelular. EL eDNA se conoce desde hace mucho tiempo como una de las moléculas más abundantes en matrices biológicas viscosas formadas por diferentes microorganismos (Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017).

Además, el eDNA se ha encontrado en la matriz extracelular de comunidades multicelulares como las biopelículas formadas por bacterias, arqueas y hongos (Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017).

EL DNA puede migrar del interior de la célula al espacio extracelular principalmente durante la muerte celular, ya sea por apoptosis o necrosis (Pisetsky, 2012). La molécula de DNA no puede atravesar la membrana celular de forma pasiva debido a su complejidad, por lo que, para su liberación al medio extracelular, debe existir un mecanismo que facilite el paso a través de la membrana. Las formas mediante las cuales el DNA puede alcanzar el medio extracelular son, principalmente, la lisis celular o bien el transporte activo (Lamprecht-Grandío, 2012).

El eDNA puede originarse en parte por la lisis de células microbianas por fagos líticos o necrosis (Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017), durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen (Taberlet *et al.*, 2012).

Mientras que el transporte activo se refiere al transporte de una sustancia en contra de su gradiente electroquímico por lo que requiere del aporte de energía del ATP, al ser un movimiento no espontáneo requiere de energía aportada por la hidrólisis de ATP o algún otro nucleótido de alta energía (Rigalli, 2017).

Por otro lado, la mayoría de los mecanismos conocidos de liberación de eDNA en bacterias están regulados por la detección de señales de *quórum sensing* (QS) presentes en la célula; siendo un sistema de comunicación dependiente de la densidad celular que regula los comportamientos cooperativos (Lamprecht-Grandío, 2012) (Figura 2).

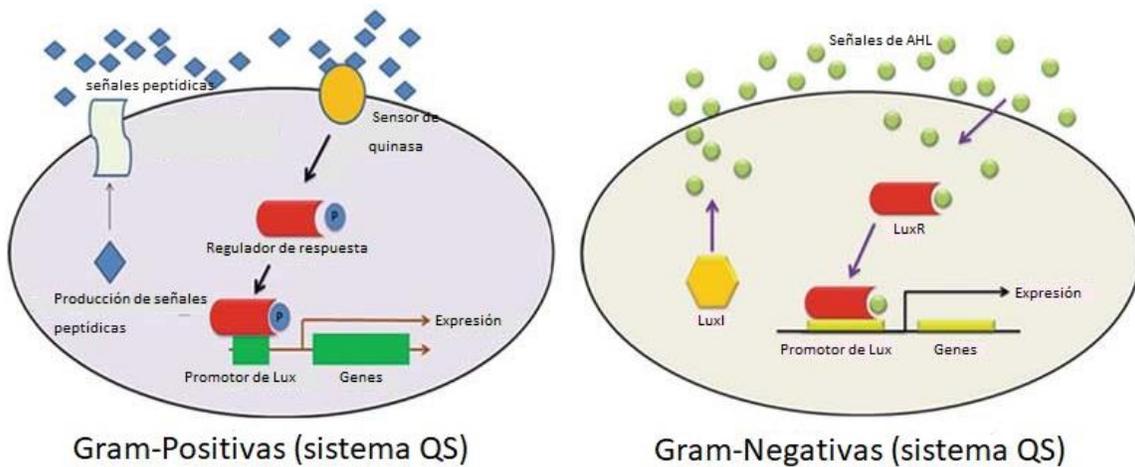


Figura 2.- Sistema de Quórum sensing (QS) en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Modificada de Sankar y Ravishankar, 2018).

Debido a que la presencia de eDNA está muy extendida en entornos como ecosistemas marinos, sedimentos, suelos y biopelículas, su importancia en el estudio de dicho fenómeno ha incrementado para elucidar su papel en el mantenimiento de los ecosistemas y en la evolución (Ibáñez de Aldeoca *et al.*, 2017).

Muchas investigaciones se han llevado a cabo con el eDNA en diferentes entornos naturales como su persistencia y relevancia ecológica en suelo (Nagler *et al.*, 2018). El eDNA puede representar una fracción relevante del DNA total presente en el suelo y por lo tanto una porción significativa de todo el metagenoma del suelo (Pietramellara *et al.*, 2009). Representa más del 10 % del fósforo extraíble en el suelo y contiene elementos esenciales como nitrógeno y carbono, por lo que el eDNA puede actuar como fuente de nutrientes y energía, especialmente en suelos con bajo aporte de nutrientes (Nagler *et al.*, 2018).

De acuerdo con Ibáñez de Aldeoca *et al.* (2017) el eDNA representa el 4% de carbono, 7% de nitrógeno y 47% de fosfato por procarionota al día en los sedimentos y suelos los cuales reflejan su importancia como fuente de materia orgánica para las comunidades microbianas.

Recientemente se ha enfocado más la atención en el papel del eDNA en la formación de biopelículas bacterianas en el suelo y ante la posibilidad de que pueda ser transportado por el agua a través del perfil del suelo (Pietramellara *et al.*, 2009).

Además, se asume que el eDNA actúa como un inhibidor del crecimiento especie-específico (Nagler *et al.*, 2018). De acuerdo con Mazzoleni *et al.* (2015), existe evidencia significativa de que el eDNA fragmentado tiene un efecto inhibidor específico de la especie sobre el crecimiento de las plantas y que éste depende de la concentración en que es aplicado, por lo que dichos hallazgos sugieren un papel funcional del eDNA en interacciones intra e interespecíficas de las plantas a nivel de ecosistema.

### **2.3 eDNA en suelo**

A diferencia del DNA intracelular, que se refiere al ubicado dentro de las membranas celulares, el DNA extracelular (eDNA) que está ubicado fuera de las mismas, puede ser encontrado en cualquier tipo de muestras ambientales (Nagler *et al.*, 2018), siendo un componente importante del medio extracelular de comunidades multicelulares como las biopelículas formadas por bacterias, arqueas y hongos (Ibañez de Aldeoca *et al.*, 2017). El DNA total del suelo incluye tanto el DNA intracelular como el extracelular, siendo éste último originado a partir de mecanismos activos o pasivos, así como por lisis celular, representando una fracción relevante del DNA total y por lo tanto una porción significativa de todo el metagenoma del suelo (Pietramellara *et al.*, 2009).

El DNA es un componente principal de carbono derivado de comunidades microbianas, ya que se ha informado que representa del 2-10% de la biomasa bacteriana y hasta un 60 % de biopelículas de sustancias poliméricas extracelulares (Morrissey *et al.*, 2015). Las comunidades microbianas juegan un papel crítico en la biogeoquímica terrestre y el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Carini *et al.*, 2016). Por lo que la liberación del eDNA en el medio ambiente podría ser un

componente importante de materia orgánica y una fuente de nutrientes para los microorganismos (Morrissey *et al.*, 2015).

Los estudios realizados sobre la relevancia ecológica del eDNA en el suelo se han preocupado en la transferencia de genes a través de la transformación e interacción entre moléculas de eDNA con la superficie reactiva de arcilla, sustancias húmicas y partículas de arena. Recientemente se ha dirigido la atención al papel del eDNA en la formación de biopelículas bacterianas en el suelo y ante la posibilidad de que pueda ser transportado por agua a través del perfil del suelo (Pietramellara *et al.*, 2009).

Las biopelículas son agregados de microorganismos conectados por una sustancia polimérica extracelular (EPS), el cual se exporta desde el espacio intracelular para formar una matriz polimérica extracelular compuesto principalmente de biopolímeros que incluyen polisacáridos, proteínas, metabolitos y DNA extracelular, formando hasta el 80% de la masa seca de una biopelícula del suelo (Das *et al.*, 2013; Redmile-Gordon *et al.*, 2014)

Las biopelículas adhieren las bacterias a las superficies dentro de una estructura tridimensional que protege a la bacteria contra antibióticos y estrés abiótico (Sena-Vélez *et al.*, 2016).

De acuerdo con Das *et al.* (2013), en lodos activados en plantas de tratamiento de aguas residuales, se han informado concentraciones significativas del eDNA que varían de 20 a 300 mg eDNA/g de materia orgánica y las bacterias pueden usar el eDNA independientemente de su origen como fuente de nutrientes para su crecimiento y desarrollo de biopelículas. Al igual que en otros entornos como el que se describió anteriormente, el eDNA del suelo juega un papel crucial en la formación de biopelículas, exhibiendo principalmente partículas del suelo formando costras biológicas particularmente en la capa superior del suelo, en donde la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) incluido el eDNA conducen a una mayor retención de agua (Nagler *et al.*, 2018).

## 2.4 Uso potencial del eDNA como DAMP

El ataque de un fitopatógeno a su hospedero desencadena una serie de reacciones y señales en el organismo ya que implica un estrés biótico en estos. El éxito en contrarrestar este estrés se basa en la capacidad inmunológica para reconocer o detectar todos los posibles peligros que rodean al organismo, seguido de cascadas de señalización que coordinan una respuesta específica para eliminar y reparar el daño (Ferrusquia-Jiménez *et al.*, 2020).

Sin embargo, cabe mencionar que cualquier respuesta inmune exitosa depende de la detección de señales de peligro endógenas, también conocidas como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Los DAMPs son moléculas evolutivamente conservadas, presentes en el hospedador que permiten a los organismos reconocer el daño ya sea mecánico o provocado por patógenos (Choi y Lessig, 2016; Ferrusquia-Jiménez *et al.*, 2020). Durante una lesión, la alteración de los tejidos y la descompartmentalización resultante de las células conducen a la liberación de moléculas intercelulares en el espacio extracelular y a la fragmentación de macromoléculas. Todas estas moléculas potencialmente pueden ser percibidas por las células intactas circundantes como DAMPs (Duran-Flores y Heil, 2018).

Cualquier tipo de estos DAMPs permiten el autorreconocimiento del “daño”, informan al huésped sobre la alteración del tejido e inician procesos destinados a restaurar la homeostasis, como sellar la herida y preparar los tejidos adyacentes para la percepción de los invasores (Heil y Land, 2014).

De acuerdo con Duran-Flores y Heil (2018), los ácidos nucleicos propios deslocalizados como el DNA extracelular son bien conocidos como DAMPs en mamíferos, porque “son indicadores confiables de daño celular”. Tras su reconocimiento, el eDNA desencadena las respuestas relacionadas con la inmunidad.

El reconocimiento de DAMPs puede ser entendido como un método indirecto mediante el cual los organismos pueden detectar presencia de patógenos mediante el reconocimiento de moléculas endógenas. Los DAMPs son liberados por la acción

de enzimas líticas del patógeno o del propio huésped, que degradan compartimientos celulares que causan “daño” a la integridad celular (Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2020). Esta detección se basa en receptores específicos denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2020). Dichos receptores activan una o más vías de señalización, a menudo con ayuda de co-receptores, para inducir respuestas de defensa posteriores (Choi y Lessig, 2016).

Los DAMPs, tanto en mamíferos como en plantas, son reconocidos por un diverso conjunto de receptores (PRR) y desencadenan señales tempranas relacionadas con la inmunidad, como el flujo de  $Ca^{2+}$ , generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y otras respuestas fenotípicas de resistencia (Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2020) (Figura 3).

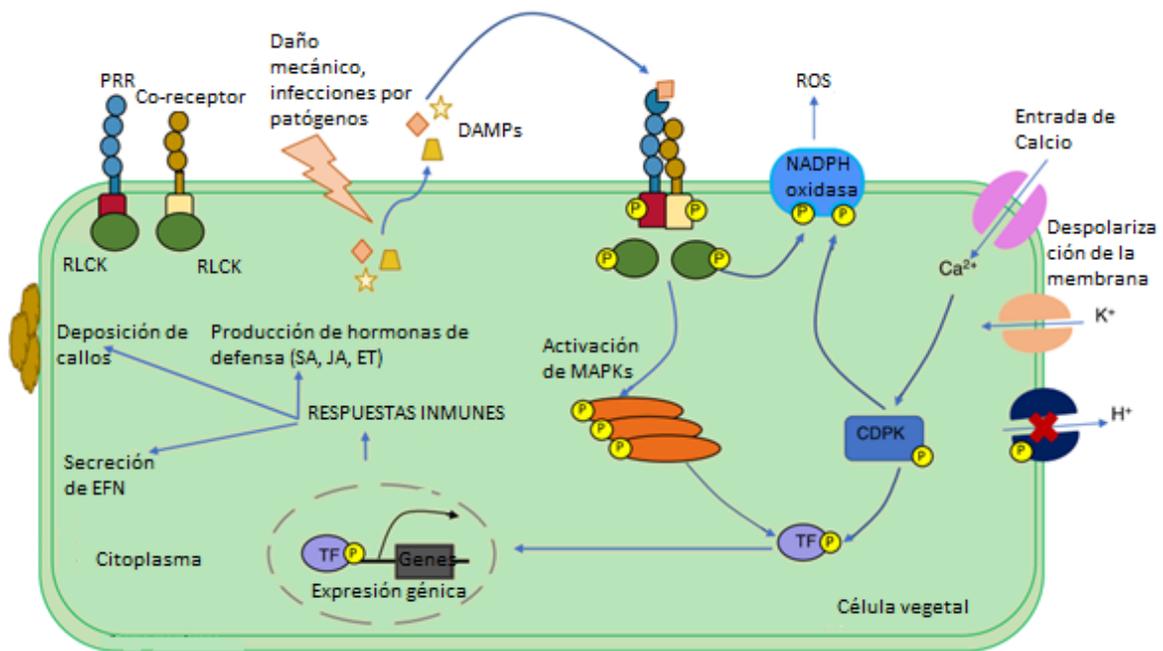


Figura 3.- Percepción y respuestas comunes provocadas por DAMP (Modificada de Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2020).

Se ha sugerido que el eDNA actúa en la inmunidad de las plantas por que se identificó como un indicador de infección bacteriana en *Arabidopsis thaliana*, como conductos de inmunidad a infecciones fúngicas en raíces y más recientemente como desencadenante de la señalización de  $Ca^{2+}$  y la despolarización de la membrana en lima, frijol y maíz (Duran-Flores y Heil, 2018).

Así mismo, recientes estudios reportan que el eDNA fragmentado tiene un efecto inhibitor específico de la especie y dependiente de la concentración sobre el crecimiento (Mazzoleni *et al.*, 2015), dicho efecto se ha observado en diferentes organismos como las plantas, bacterias, protozoos, algas, hongos y animales, este fenómeno se ha atribuido al reconocimiento del eDNA como una molécula que indica estrés o daño, limitando el crecimiento del organismo del que proviene (Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2020).

De acuerdo con Hawes *et al.* (2011), se han observado cambios en el crecimiento de hongos fitopatógenos y su invasión en las raíces de algunas hortalizas como el chícharo, incluso antes de que los síntomas de la enfermedad sean visibles.

Existen estudios que revelan una relación de autotoxicidad causada por la exposición de fragmentos de DNA propios que muestran efectos inhibitorios específicos de especies en plantas mediante la reducción del crecimiento de raíces y germinación; evidencia relevante de la función inmunogénica del eDNA como activador de la inmunidad que se ha observado en plantas (Serrano-Jamaica *et al.*, 2020). Además, cabe mencionar que estudios recientes han encontrado que el eDNA propio fragmentado (<1500 pb) desencadena respuestas tempranas de defensa en plantas, y que con fragmentos mayores a este no se logra observar alguna respuesta (Vega-Muñoz *et al.*, 2020).

## **2.5 *Fusarium spp.***

La clasificación taxonómica de *Fusarium spp* se encuentra en (Tabla 2) (Vera-Roman, 2013):

Tabla 2.- Taxonomía de *Fusarium spp.*

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>
Especies	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. esquiseti</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. reticulatum</i> , etc.

*Fusarium spp* se encuentra comúnmente en suelos, ambientes marinos o fluviales y en plantas. Algunas especies son fitopatógenos, mientras que otras son saprófitos del suelo (Dóczy *et al.*, 2014). Es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica y que a la vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance (Kenneth *et al.*, 2018).

El género *Fusarium spp.* incluye muchas especies patógenas y causa una amplia variedad de enfermedades en las plantas. La amplia distribución de las especies de *Fusarium spp.* puede atribuirse a la capacidad de estos hongos para crecer en una amplia gama de sustratos y sus eficientes mecanismos de dispersión (Cherhi, 2011). Diferentes principales mecanismos de dispersión del patógeno son los movimientos de suelo infectado, el agua de escorrentía y el uso de almácigo infectado (Kenneth *et al.*, 2018).

Se considera que este género exhibe un grado de variación con respecto a la morfología microscópica y a sus características fisiológicas, debido a su gran habilidad para colonizar diversos hábitats ecológicos (Vera-Roman, 2013) (Figura 4).

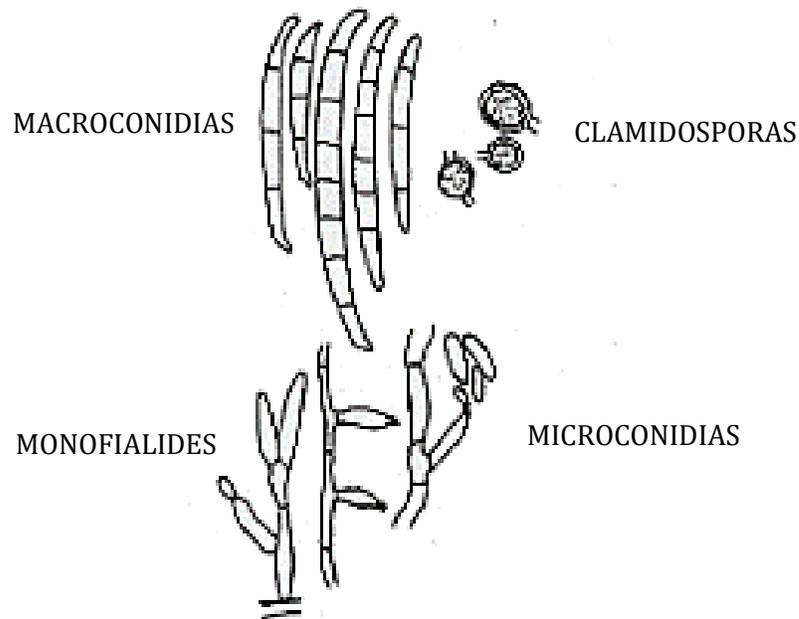


Figura 4.- Morfología microscópica de *Fusarium spp.* (Tomada de Vera-Roman, 2013).

Tabla 3.- Descripción de las estructuras microscópicas de *Fusarium spp.*

Estructura	Descripción
Macroconidias	<p>Se considera que este género exhibe un grado de variación con respecto a la morfología microscópica y a sus características fisiológicas, debido a su gran habilidad para colonizar diversos hábitats ecológicos (Vera-Roman, 2013).</p> <p>Con forma de canoa, hialinas y septadas. La célula apical es alargada y la basal tiene forma de pie. Se producen en sucesión basipetal a partir de las monofiálides (Monzón y Tudela, 2000).</p>
Clamidosporas	<p>Se originan por modificación de un segmento de la hifa. Tienen pared gruesa, lisa o rugosa. Se observan aisladas, en parejas, en grupos o en cadenas. Son formas de resistencia ante ambientes adversos que garantizan la</p>

propagación y supervivencia del hongo (Monzón y Tudela, 2000).

**Microconidias** Son pequeñas, generalmente unicelulares y con forma variable (ovoides, elipsoidales, sub-globosas, piriformes, etc.). Ocasionalmente tienen un tabique y la base puede ser redondeada, apiculada o truncada. Se producen en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides. Se pueden ver aisladas, en masas o en cadenas (Monzón y Tudela, 2000).

Microconidios no son producidos por todas las especies de *Fusarium spp* por lo que su sola presencia es una característica importante (Vera-Roman, 2013).

---

## **2.6 Enfermedades causadas por *Fusarium spp*.**

*Fusarium spp.* es un ascomiceto que causa infecciones en las plantas como el tizón de la cabeza, marchitez vascular, pudrición de las raíces y amarillamiento (Figura 5). Aunque pueden invadir las plantas a través de semillas y heridas, también entran a las plantas a través de sus raíces, especialmente si éstas están dañadas (Khan *et al.*, 2018).



Figura 5.- Ejemplos de enfermedades causadas por *Fusarium spp.*; A) marchitamiento vascular, B) Pudrición de raíz.

La mayoría de los hongos de este género que producen marchitamientos vasculares pertenecen a la especie *F. oxysporum*, mientras que otras 13 como *F. solani* y sus formas especiales, ocasionan marchitez vascular, pudrición de semillas y raíces, así como ahogamiento en tallos inferiores, coronas, cormos, bulbos, tubérculos y otras partes de la planta (Vera-Roman, 2013).

Las enfermedades causadas por *F. oxysporum* especialmente el marchitamiento y la pudrición de la corona de la raíz en tomate, han sido y son de las enfermedades de las plantas más estudiadas. Las pérdidas por marchitamiento pueden ser muy altas dadas las combinaciones de patógenos virulentos en el huésped susceptibles. Las pérdidas ocasionadas por la pudrición de la corona de la raíz en tomate de invernadero en hasta 90-95% en Canadá (McGovern, 2015).

La infección puede darse cuando las clamidosporas presentes en el suelo son diseminadas por el viento, insectos o por salpicaduras de agua de riego (Vera-Roman, 2013).

Los hongos fitopatógenos han desarrollado mecanismos sofisticados para invadir a su hospedero, superar sus defensas y colonizar sus tejidos vivos para provocar las enfermedades (Nadales y prieto, 2011). *F. oxysporum* penetra en las raíces del

hospedador hasta que alcanza los vasos del xilema, y coloniza el tejido; los primeros síntomas visibles de la marchitez son el amarillamiento progresivo del follaje aumentando gradualmente hasta que toda la planta se muere (Lecomte *et al.*, 2016).

Algunos hongos causan enfermedades en una sola especie huésped (específicos), mientras que otros tienen rangos de hospedadores extremadamente amplios. Los mecanismos moleculares que determinan la especificidad del rango de hospedadores fúngicos no se comprenden completamente (Ortoneda *et al.*, 2004).

Las principales especies de *Fusarium spp.* transmitidas en suelo son las más conocidas como patógenos vegetales en términos de daño económico en producciones agrícolas en todo el mundo (Saremi *et al.*, 2011).

Varias especies de *Fusarium spp.* producen micotoxinas que pueden contaminar una amplia variedad de cultivos agrícolas; por lo tanto, dichas micotoxinas pueden potencialmente presentarse en una amplia variedad de alimentos (Cherhi, 2011).

De acuerdo con Dóczy *et al.* (2014), en los últimos años se han reportado cada vez con mayor frecuencia a los hongos de *Fusarium spp.* como agentes etiológicos en infecciones oportunistas provocando con mayor frecuencia fusariosis.

Se ha informado que la pudrición seca causada por *Fusarium* es un problema importante en el cultivo de papa en diferentes partes del mundo (Saremi *et al.*, 2011).

Además, en México la producción de tomate ha estado limitada por factores bióticos y abióticos, entre ellos, los causados por patógenos fúngicos transmitidos por el suelo, destacando *Fusarium spp.* (Micah *et al.*, 2018).

Las enfermedades causadas por *Fusarium spp.*, especialmente el marchitamiento vascular y la pudrición de la raíz en el cultivo de tomate, han sido de las enfermedades de las plantas más estudiadas, debido a la importancia de este cultivo (McGovern, 2015).

## **2.7 Métodos del manejo de enfermedades causadas por *Fusarium spp.***

Diversos métodos para el manejo de las enfermedades causadas por *Fusarium spp.* han tenido un éxito limitado debido principalmente a la aparición de nuevas razas patógenas, además de presentar diferentes desventajas para el medio ambiente y otros organismos vivos (Bawa 2016; Jiménez-Hernández *et al.*, 2021).

Las estrategias que se han llevado a cabo para el manejo de estas enfermedades van desde el incluir más plantas que sean tolerantes a las enfermedades, así como prácticas agrícolas como la rotación de cultivos y al mismo tiempo complementando con aplicaciones de productos químicos y/o biológicos (Torres *et al.*, 2019).

### **2.7.1 Prácticas culturales**

El control cultural se refiere a las prácticas agrícolas para reducir la influencia de plagas y enfermedades. Incluye la modificación de dichas prácticas agrícolas para hacer que el entorno sea desfavorable para el crecimiento de patógenos (Ajillogba *et al.*, 2013). Son métodos simples y baratos y no presentan problemas por contaminación ambiental, sin embargo, generalmente son ineficaces debido a las estrategias efectivas de supervivencia del patógeno y no tienen un efecto inmediato o directo en la protección del cultivo (Centeno, 2016).

Una de las actividades que se realizan con la finalidad de bloquear la entrada de insectos vectores de enfermedades son el uso de barreras físicas como un cultivo de barrera o el uso de plásticos (Fang-Yu *et al.*, 2020). Así como el uso de medidas preventivas en la producción de plántulas sanas para controlar y prevenir enfermedades en el ciclo (Aires-Ventura *et al.*, 2018).

### **2.7.2 Prácticas de manejo biológico**

Este tipo de prácticas se define como el uso de enemigos naturales o agentes que afectan a los patógenos y/o plagas limitando su propagación (Lecomte *et al.*, 2016).

El término aplica también para el uso de agentes de biocontrol con el fin de suprimir enfermedades en las plantas ya sea directamente a través de sus actividades antagónicas o indirectamente mediante sus efectos modificadores sobre la fisiología y anatomía de la planta (Ghorbanpour *et al.*, 2017), así mismo, se le relaciona su concepto con el uso de productos naturales extraídos o fermentados (Krishna-Pal y McSpadden-Gardener., 2006).

Es considerado como una alternativa viable al manejo convencional debido a que reduce significativamente los síntomas de la enfermedad aumentando así los rendimientos de los cultivos (McGovern *et al.*, 2015), sin embargo, la eficacia de la capacidad antagónica de los agentes de biocontrol está influenciado por varios factores medioambientales (Ghorbanpour *et al.*, 2017), además, es necesario estudiar algunas cuestiones como los mecanismos de colonización, las interacciones planta-patógeno, las estrategias de implementación ecológicamente aceptables de los agentes de biocontrol y la comprensión de cómo actúan éstos en un medio dinámico para poder dirigir dicha investigación y generar productos de control biológico comerciales (Tripathi *et al.*, 2020).

### **2.7.3 Prácticas de manejo químico**

El manejo químico se refiere a el uso de moléculas químicas (fungicidas, bactericidas, entre otros) para controlar las enfermedades en las plantas (Ajillogba *et al.*, 2013). Muchos de estos productos químicos están enfocados en el manejo de enfermedades causadas por hongos como por ejemplo moléculas como procloraz, propiconazol, tiabendazol, carbendazim, benomyl, thiophant, fuberidazole y todos los bencimidazoles (Jiménez-Hernández *et al.*, 2021).

El manejo químico puede reducir efectivamente la severidad de la enfermedad, pero dicha efectividad es influenciada por otras prácticas agronómicas como la rotación de cultivos, fertilización nitrogenada, tratamientos de semillas y el uso de variedades resistentes (Torres *et al.*, 2019).

Sin embargo, cabe mencionar que el uso de agroquímicos afecta negativamente otros microorganismos benéficos del suelo, afectan la salud humana y también contaminan el medio ambiente (Ajilogba *et al.*, 2013). De acuerdo con Elahi *et al.* (2019), cada año se reportan en el mundo un promedio de 200 millones de personas que mueren y 3 millones envenenadas debido a la continua exposición a agroquímicos, aunado a esto, el Consejo Nacional de Investigación en Agricultura de la Academia de Ciencias de Estados Unidos, determinó que estos productos constituyen el 60% de los pesticidas usados en la producción alimentaria con riesgos oncogénicos (Rodríguez-Ruvalcaba, 2002).

Además, existen informes recientes sobre la alta posibilidad de desarrollo de resistencia a los fungicidas debido al uso excesivo de los mismos por parte de los agentes fitopatógenos (Dweba *et al.*, 2017). La exposición a los fungicidas durante muchos años ha llevado a un aumento en la resistencia en varios fitopatógenos, el primer reporte fue analizado en mildiú polvoso (*Sphaerotheca Fuliginea*) que afecta a las cucurbitáceas, y desde entonces se ha detectado resistencia en varios hongos fitopatógenos (Price *et al.*, 2015).

La alta frecuencia de uso de productos químicos, los efectos no deseados como el desarrollo de resistencia a muchos productos químicos y el riesgo para la salud humana han estimulado el desarrollo de más métodos para el manejo de enfermedades (Bawa, 2016).

### **3 HIPÓTESIS**

El uso de fragmentos de eDNA propio de *Fusarium spp.* en suelo disminuye los niveles del patógeno en al menos una unidad logarítmica, y su patogenicidad sobre plántulas de tomate, en comparación con tratamientos sin aplicación en el suelo de este tipo de DNA.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Reducir significativamente los niveles de *Fusarium spp.* en suelo, así como su patogenicidad en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*), por efecto de la aplicación de eDNA propio.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Extraer y fragmentar a menos de 1500 pb el eDNA de *Fusarium spp.*
2. Determinar el efecto de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en la sobrevivencia de este hongo en el suelo.
3. Determinar el efecto protector de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) cultivadas en suelo infestado con *Fusarium spp.*
4. Evaluar la respuesta de las plántulas de tomate cultivadas en suelo infestado con *Fusarium spp.* en cuanto a la producción de metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides totales).

## **5 METODOLOGÍA**

El desarrollo experimental se llevó a cabo en el Campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicado en la carretera Chichimequillas km 1, en el municipio de el Marqués del estado de Querétaro.

### **5.1 Extracción y fragmentación a menos de 1500 pb el DNA de *Fusarium spp.***

Se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Dellaporta *et al.* (1983), escalándolo con la cantidad de muestra a procesar. Se pesó en tubos falcon de 50 ml, 2 g de micelio de *Fusarium spp.* previamente triturado en nitrógeno líquido, posteriormente se añadieron 10 ml de buffer de Dellaporta (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 2% PVP, 500 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) y se agitó para homogeneizar la mezcla. Una vez homogeneizado, se pasó a agregar 500  $\mu$ L de SDS al 20% y se mezcló cuidadosamente, después se incubó a 65°C por 20 minutos. Luego se agregaron 3 ml de acetato de potasio 5M y se puso en hielo durante 20 minutos, se centrifugó a 8500 rpm por 25 minutos y se recuperó el sobrenadante en otro tubo, a este nuevo tubo con el sobrenadante se le agregó un volumen de isopropanol frío y se dejó reposar en hielo por 10 minutos. Finalmente se centrifugó a 8500 rpm por 25 minutos y se eliminó el sobrenadante, rescatando la pastilla que queda adherida en el fondo del tubo. Dicha pastilla se lavó con etanol al 70% frío y se dejó secar, después el DNA se resuspendió en 5 ml de agua destilada esteril y se guardaron los tubos a -70°C. La pureza del DNA y concentración se midió usando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 con salida espectral completa (190-840 nm), utilizando 1  $\mu$ L para la cuantificación de las muestras. Para verificar la integridad del DNA se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando la tinción con GelRed® (Biotium). Para obtener fragmentos de menos de 1000 pb, el DNA extraído fue fragmentado por sonicación con un sonotrodo Hielscher UP200Ht (200W, 26kHz), mediante pulsos de 26 KHZ a 10 W con una amplitud de 50 % cada 1 segundo por 20 min (Vega-Muñoz *et al.*, 2018).

## 5.2 Determinación del efecto de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en la sobrevivencia del hongo en el suelo.

Para desarrollar esta parte del proyecto, fue necesario realizar unas pruebas previas en cuanto a la evaluación de la sobrevivencia del hongo en el suelo modelo de estudio, y con esto garantizar la germinación de las esporas de *Fusarium spp.* en dicho suelo. Cabe mencionar que el suelo fue analizado en cuanto a textura y contenido de materia orgánica en el Laboratorio de Análisis y Fertilidad de suelos de INIFAP-Bajío (Anexo 1) por el método de Walkelet-Black, con la finalidad de conocer dichas propiedades y por lo tanto tomar decisiones en cuanto a la cantidad utilizada de cada inóculo, así como la capacidad que pueda tener el hongo en desarrollarse en el suelo debido a su contenido de materia orgánica.

Una vez conocidos estos factores del suelo, se llevó a cabo la inoculación de esporas de *Fusarium spp.* en suelo y se realizó un tratamiento de pasteurización con la finalidad de identificar esporas y células vegetativas al momento de hacer la siembra en cajas de PDA.

Dicho experimento se llevó a cabo de acuerdo con Figueroa-Rivera *et al.* (2010), en donde se pesaron 500 mg de suelo en unos viales de vidrio ambar, se esterilizaron a 220 kPa durante 15 minutos, después se inoculó a capacidad de campo (150  $\mu$ L) una cantidad conocida de esporas de *Fusarium spp.* las cuales fueron contadas previamente en cámara de Neubauer (Figura 6).

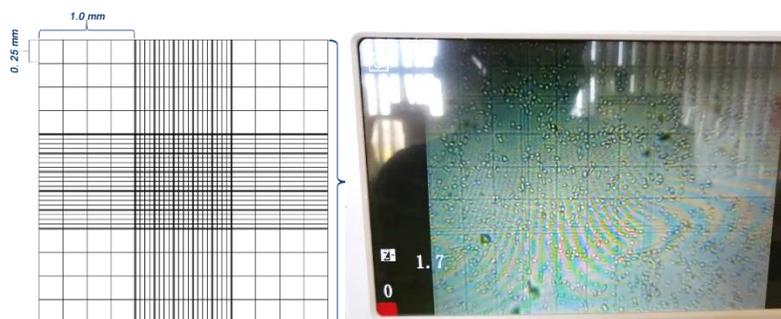


Figura 6.- Conteo de esporas de *Fusarium spp.* en cámara de Neubauer.

Se trabajó con un grupo control el cual no fue pasteurizado y el tratamiento que fue pasteurizado mediante baño maría a 70°C por 1 hora y media (Barbetti y Sivasithamparam 1987; Mcgonigle y Miller, 1996), se realizó una cuenta viable de *Fusarium spp.* reportándose como UFC/g de suelo en diluciones seriadas y haciendo la extensión en placa de PDA por triplicado en los tiempos 0, 2 y 4 días después de que se inoculó el suelo, las placas se incubaron por 48 horas a 25°C para su posterior cuantificación.

Una vez que se establecieron las condiciones adecuadas para el desarrollo del hongo en el suelo modelo de estudio, se realizó la evaluación del efecto de la aplicación del eDNA propio de *Fusarium spp.* en la sobrevivencia de éste. Para esto, se diseñaron diversos tratamientos con un diseño experimental completamente al azar cambiando la concentración del eDNA de acuerdo con lo reportado por Ferrusquía-Jiménez (2020) como se indican en la Tabla 4.

Tabla 4.- Tratamientos llevados a cabo para la determinación del efecto del eDNA de *Fusarium spp.* en su sobrevivencia en suelo.

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
Control	500 mg suelo + 100 µl de esporas de hongo + 50 µl agua destilada
50	500 mg suelo + 100 µl esporas de hongo + 50 µl eDNA a 50 ppm
500	500 mg suelo + 100 µl esporas de hongo + 50 µl eDNA a 500 ppm
500*	500 mg suelo + 50 µl eDNA a 500 ppm + 100 µl esporas de hongo

NOTA: la concentración de esporas utilizada en el inóculo de *Fusarium spp.* fue de  $2 \times 10^9$  esporas/ml.

Se llevó a cabo la misma metodología antes mencionada para la siembra en PDA tomando ahora los tiempos 0, 1, 3, 5 y 7 días después de que se inoculó el suelo y se aplicó el eDNA. Cabe mencionar que por cada tratamiento se trabajaron 2 viales y se sembraron en PDA 2 cajas Petri por vial, teniendo un total de 4 cajas para

realizar la cuenta viable de colonias de *Fusarium spp* por tratamiento. Se reportó finalmente dicha cuenta en UFC/g de suelo. Cabe mencionar, que los tratamientos de 500 y 500\* se utilizó el eDNA de la misma concentración (500 ppm), sin embargo, el orden de inoculación de las esporas y del eDNA fue diferente en cada uno, en donde el tratamiento etiquetado como 500, fue inoculado primero las esporas del fitopatógeno y una hora después su propio eDNA, mientras que en el tratamiento de 500\* primero se realizó la aplicación del eDNA del fitopatógeno en el suelo y una hora después las esporas del hongo, como se describe en la tabla 4.

### 5.3 Determinación del efecto protector de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) cultivadas en suelo infestado con *Fusarium spp.*

#### 5.3.1 Diseño experimental con plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

Para determinar el efecto protector de la aplicación del eDNA propio de *Fusarium spp* en plántulas de tomate, se diseñó un experimento completamente al azar con una unidad experimental de 6 plantas por cada tratamiento como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5.- Grupos que se llevaron a cabo para la determinación del efecto protector de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

Grupo	Planta	Descripción
Control	CHA	Herida
	CSHA	Sin herir
	CSHE	Sin herir
	CHE	Herida
		20g suelo + 6ml agua destilada estéril.
		20g suelo + 6ml esporas de <i>Fusarium spp.</i>

	CHDNA	Herida	20g suelo + 2ml eDNA a 500 ppm + 4ml agua destilada estéril.
	TDNA+E	Herida	20g suelo + 2ml eDNA a 500 ppm + 4ml esporas de <i>Fusarium spp</i>
Tratamientos	TE+2dDNA	Herida	20g suelo + 4ml esporas de <i>Fusarium spp.</i> y 2 días después 6ml eDNA a 500 ppm

Cabe mencionar que la variedad utilizada de tomate fue “Rio Grande” y que las plántulas se trasplantaron una vez que éstas tenían 2 hojas verdaderas, se utilizó una charola de unicel de 200 cavidades que se limpió y desinfectó previamente con sales cuaternarias de amonio, además, la cantidad aplicada de cada tratamiento fue con la finalidad de dejar el suelo a capacidad de campo (CC), partiendo de que dicho suelo tiene una CC de 300µl/g y por lo tanto para los 20 g de suelo utilizados se requirieron 6ml. Además, se limpió la parte radicular de las plántulas retirando todo el sustrato, se realizaron cortes transversales de la tercera parte inferior de las raíces (Figura 7) en los grupos donde se señalan que las plantas fueron heridas.



Figura 7.- Plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*), en donde el recuadro rojo señala aproximadamente el corte transversal en las raíces.

Por otro lado, es importante señalar que previamente se contaron las esporas del inóculo realizado de *Fusarium spp.*, en donde se obtuvo una cantidad conocida de esporas de  $1.92 \times 10^9$  esporas/ml.

Se trabajó con 6 plantas por cada grupo teniendo un total de 42 plantas (Figura 8), las cuales fueron monitoreadas cada tercer día durante 3 semanas y se midió ancho de tallo, altura de planta y número de hojas, así como observaciones en cuanto a sintomatología ocasionada por la invasión del hongo.



Figura 8.- Arreglo de las plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) de los diferentes grupos.

### 5.3.2 Evaluación del nivel de severidad e incidencia de la enfermedad en las plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

Una vez que se completó el periodo de 3 semanas, se clasificaron las plantas de acuerdo a la escala de severidad de Bosland y Lindsey (1991) (Tabla 6) observando desde raíz, tallo y hojas.

Tabla 6.- Nivel de severidad de plantas de tomate con infección por *Fusarium spp.* (Bosland y Lindsey, 1991).

Escala	Descripción
0	Sin respuesta, planta vigorosa y saludable.

- 1 Liger o oscurecimiento radicular, planta vigorosa, sana.
  - 3 Raíces marrones, ligero retraso en crecimiento, lesiones pequeñas del tallo.
  - 5 Raíces marrones, tallos con lesiones pequeñas, hojas inferiores marchitas, planta atrofiada.
  - 7 Raíces marrones, grandes lesiones en tallos, toda la planta marchita y enana.
  - 9 Muerte.
- 

Al clasificar a las plantas de acuerdo con dicha escala, y al tratarse de variables no paramétricas, las observaciones realizadas se analizaron primeramente con una prueba de H Kruskal Wallis y al encontrar que obtuvimos diferencias significativas, se procedió a realizar una prueba de Dunn con la finalidad de identificar los grupos que obtuvieran dichas diferencias estadísticas .

Además, se realizó una cuenta viable de colonias en el tejido de la planta, reportándolas como UFC/g de tejido, lo cual se llevó a cabo cortando las raíces y separando la parte basal del tallo (Figura 9), dicho tejido se trituró con agua destilada estéril y con ayuda de un mortero, se hicieron diluciones seriadas con el tejido triturado y se sembró en medio de agar papa dextrosa (PDA), se inocularon las cajas a 25°C por 48 horas y se procedió al conteo de colonias.

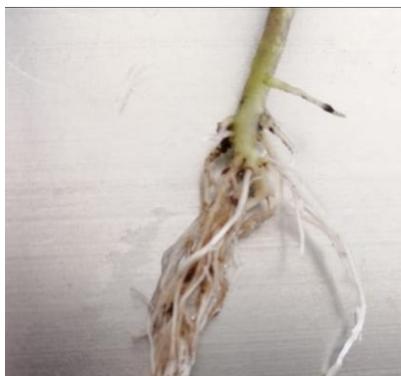


Figura 9.- Parte basal del tallo de plántula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

#### **5.4. Evaluación de la respuesta de las plántulas de tomate cultivadas en suelo infestado con *Fusarium spp.* en cuanto a la producción de metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides totales).**

Para la determinación de los metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides) se llevó a cabo primero la extracción de los compuestos fenólicos de cada una de las muestras de acuerdo con Cardador-Martínez *et al.* (2002), en donde se tuvieron que liofilizar las muestras, una vez las muestras secas se procedió a triturarlas con un mortero hasta dejar el tejido en partículas muy pequeñas (como polvo), se procedió a pesar aproximadamente 200 mg de la muestra seca y triturada y se le agregaron 10 ml de metanol, se sonicó por 30 minutos y finalmente se centrifugó a 5000 rpm y 4°C por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante (extracto metanólico) en tubos cubiertos con aluminio y se mantuvieron en obscuridad y refrigeración para su uso posterior.

Una vez obtenido el extracto metanólico, se realizó la determinación de fenoles totales, la cual se llevó a cabo de acuerdo con Dewanto *et al.* (2002), en donde se tomaron 40 µl del extracto, se le adicionaron 460 µl de agua destilada, 250 µl del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y 1250 µl de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20%, se mezcló con ayuda del vortex y se dejaron los tubos ámbar en completa obscuridad durante 2 horas. Cumpliendo el tiempo, se colocaron 200 µl de cada muestra en la microplaca y se leyó en el espectrofotómetro Multiskan Sky Hich (thermo scientific) a 760 nm, junto con la curva de calibración con concentraciones de 0, 20, 40, 60,

80, 100, 120, 140, 160  $\mu\text{M}$ . Finalmente, para la determinación de los flavonoides totales, se desarrolló de acuerdo con Domah *et al.* (2005), en donde se tomaron 50  $\mu\text{l}$  del extracto metanólico de cada muestra en tubos tapados con papel aluminio, se les agregó 180  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 20  $\mu\text{l}$  del reactivo 2-aminoetildifenilborato al 1%, se homogeneizó la mezcla con ayuda del vortex y se leyó en el espectrofotómetro Multiskan Sky Hich (thermo scientific) a 404 nm con su curva de calibración de concentraciones de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/ml}$ .

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Extracción y fragmentación a menos de 1500 pb del DNA de *Fusarium spp.*

La metodología desarrollada para la extracción de DNA nos permitió obtener concentraciones aceptables para posteriormente diluir a las concentraciones deseadas y por lo tanto tener al final más volumen del DNA a 500 ppm. En la Tabla 7 se presentan las concentraciones obtenidas en la extracción de diferentes muestras representadas en  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (ppm), así como el volumen final obtenido una vez realizada la dilución para tener la concentración deseada.

Tabla 7.- Concentración obtenida de la extracción del DNA de *Fusarium spp.* y volumen final obtenido.

Muestra	$\text{ng}/\mu\text{L}$	Volumen final (ml)
1	1254.2	5.02
2	982.93	3.93
3	1150.17	4.6
4	952.53	3.81

5	1287.7	5.15
6	1128.53	4.51
7	1285.37	5.14
8	1299.7	5.2
9	1216.47	4.86

---

Cabe mencionar que el volumen reportado en la Tabla 6, es el obtenido después de realizar las diluciones pertinentes de cada muestra para obtener la concentración deseada, obteniendo al final un volumen de 42.22 ml de DNA a 500 ng/ $\mu$ L.

Una vez que se obtuvo el volumen y concentración antes mencionadas, se fragmento en dos tiempos, cada uno de 10 minutos para evitar el calentamiento del equipo utilizado y con la finalidad de obtener fragmentos de menos de 1500 pb debido a que lo que se ha reportado de acuerdo con algunos autores como Vega-Vega-Muñoz *et al.* (2020) y Duran y Heil (2018), dichos segmentos de DNA desencadenan respuestas tempranas con diferentes rutas bioquímicas del organismo en cuestión.

Para poder asegurarnos de que obtuvimos los tamaños de fragmentos antes mencionados, se llevó a cabo una electroforesis con gel de agarosa y se corrió la muestra sonicada junto con una escalera molecular con la intención de poder comparar ambos carriles y con esto identificar el nivel de fragmentación de nuestra muestra (Figura 10).

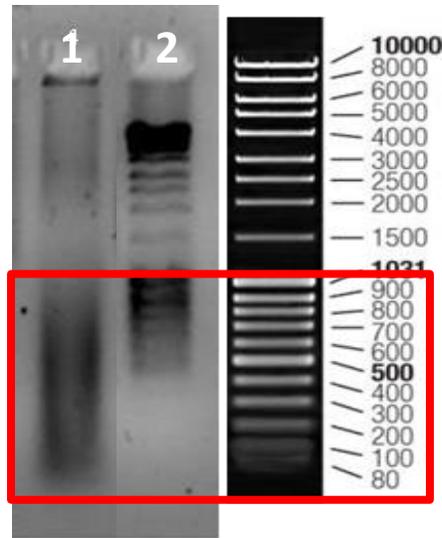


Figura 10.- Verificación del nivel de fragmentación del DNA en donde el carril 1 corresponde a la muestra de DNA de *Fusarium spp.* sonicada, y el carril 2 corresponde a la escalera molecular de 10 kb.

Como podemos observar en la Figura 10, el DNA obtenido se logró fragmentar a segmentos de menos de 1500 pb, por lo que podemos decir que la muestra obtenida fue aceptable tanto en concentración del DNA como el nivel de fragmentación para poder utilizar dicha extracción en los tratamientos propuestos y analizar su respuesta como DAMP en suelo.

## 6.2 Determinación del efecto de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en la sobrevivencia del hongo en el suelo.

### 6.2.1 Sobrevivencia y desarrollo de *Fusarium spp.* en el suelo.

Para la primera parte donde se hizo la evaluación de la sobrevivencia de *Fusarium spp.* en el suelo, se realizaron metodologías que nos permitieron cuantificar la germinación de las esporas del hongo en el suelo, esto con la finalidad de verificar que dicho suelo fuera apto para el desarrollo de *Fusarium spp.* y por lo tanto

asegurarnos de que los tratamientos posteriores con su propio DNA tengan efecto en éste.

Para la evaluación de la germinación se inoculó una cantidad conocida de esporas, las cuales se cuantificaron con la ayuda de la cámara de Neubauer obteniendo  $2 \times 10^9$  esporas/ml, dichas esporas se aplicaron en los viales de suelo a capacidad de campo, de cada vial se sembraron 3 cajas Petri con la dilución de  $10^{-5}$  y se realizó una cuenta viable, reportando los resultados como UFC/g de suelo como se muestra en las Tablas 8 y 9 para el grupo control y el grupo que se pasteurizó respectivamente.

Tabla 8.- Resultados obtenidos de la cuenta viable de UFC/g de suelo de *Fusarium spp.* del grupo control.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo (días)</b>	<b>UFC/g de suelo</b>	<b>Promedio (UFC/g)</b>
1	0	$7.2 \times 10^6$	$7.15 \times 10^6$
2	0	$7.1 \times 10^6$	
5	2	$6.6 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$
6	2	$5.8 \times 10^6$	
9	4	$4.6 \times 10^6$	$5.15 \times 10^6$
10	4	$5.7 \times 10^6$	

Tabla 9.- Resultados obtenidos de la cuenta viable de UFC/g de suelo de *Fusarium spp.* del grupo que se pasteurizó.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo (días)</b>	<b>UFC/g de suelo</b>	<b>Promedio (UFC/g)</b>
3	0	$9.7 \times 10^4$	$9.8 \times 10^4$
4	0	$9.9 \times 10^4$	

7	2	1.05x10 <sup>5</sup>	1.075x10 <sup>5</sup>
8	2	1.1x10 <sup>5</sup>	
11	4	1.33x10 <sup>5</sup>	1.41x10 <sup>5</sup>
12	4	1.5x10 <sup>5</sup>	

---

Así mismo, dichos resultados se graficaron y se realizó un análisis de varianza de 2 vías, con la finalidad de poder identificar las diferencias estadísticas entre ambos grupos. Como se observa en la Figura 11 la germinación de las esporas de *Fusarium spp.* en el grupo control tiene diferencias significativas en comparación con el grupo de pasteurización, sin embargo, en cuanto al tiempo no hubo diferencias estadísticas importantes en cada grupo, observando que en el control la germinación disminuyó a partir del día 2 aunque no de manera representativa, esto pudo ser debido a que el medio era limitado y por lo tanto los nutrientes se fueron acabando con el tiempo. En el caso del grupo de pasteurización, podemos decir que el ligero aumento en la germinación en el cuarto día (aunque no representativo) puede ser debido a la generación de nuevas esporas en el medio, es decir, el tiempo que estuvo el hongo en el suelo al cuarto día pudo desarrollarse de tal manera que generó más esporas además de las que se inocularon inicialmente.

### Germinación de esporas en un suelo modelo de estudio

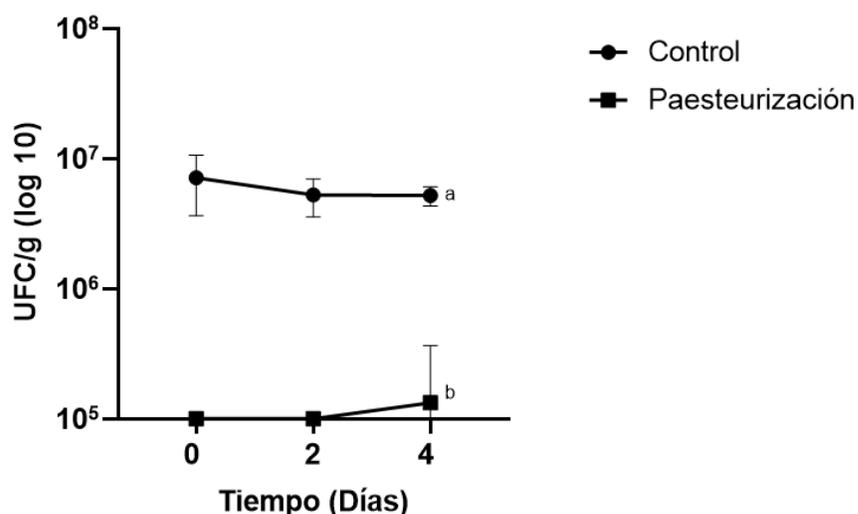


Figura 11.- Gráfico de los resultados obtenidos de la cuenta viable de *Fusarium spp.*, reportado en UFC/g de suelo (log 10), en donde los círculos representan los resultados del grupo control, y los cuadros los obtenidos del tratamiento llevado a cabo de pasteurización. Letras diferentes al final de cada grupo indica diferencias significativas (Anova de 2 vías y prueba de medias de Tukey con  $\alpha=0.05$ ).

Con estos resultados, se pudo analizar el porcentaje de las diferentes estructuras tanto de esporas como de células vegetativas, siendo estas últimas el crecimiento de hifas o micelio y desarrollo de una red de éstas de manera interconectadas a través de su fusión (Prados-Rosales y Di-Pietro 2008). El fundamento para poder identificar las estructuras de *Fusarium spp.* en el crecimiento de las colonias en placa se basa en que dichas estructuras tienen determinadas condiciones óptimas para su desarrollo, partiendo de que las temperaturas óptimas del desarrollo de esporas están entre 25 y 28°C con alta actividad de agua (Leplat *et al.*, 2013) y que el desarrollo de las célula vegetativas se ve influenciada principalmente por la temperatura debido a que su crecimiento se ve favorecido a temperaturas entre 22 y 25°C, viéndose inhibido su desarrollo con forme aumenta la temperatura desde los 35°C y siendo afectadas de manera definitiva hasta su muerte a partir de los 50°C (Kurian *et al.*, 2018). Además, cabe mencionar que las esporas del hongo son formas de resistencia ante ambientes adversos como lo es las altas temperaturas,

garantizando así su propagación y supervivencia (Monzón y Tuleda, 2000). Por lo que la metodología desarrollada en donde el grupo de pasteurización se sometió el suelo a temperaturas de hasta 70°C, podemos decir que las colonias que se desarrollaron en dicho grupo correspondían a estructuras de esporas del hongo debido a que pueden resistir las condiciones de temperatura a las que fueron sometidas, con esto, el conteo de las colonias se pudo separar en porcentaje de ambas estructuras como se muestra en la Figura 12. En donde el porcentaje de esporas aumentó de manera significativa de 70% a 80% en el cuarto día y de igual proporción se observa una disminución en las células vegetativas de 30% a 20%, por lo que podemos decir que desde el tiempo 0 las esporas en el suelo modelo de estudio germinan en un 30% aproximadamente, es decir, que el suelo con el que se está trabajando es apto para el desarrollo del hongo debido a que en cuestión de horas crece y desarrolla sus hifas en el medio. El éxito obtenido en cuanto a la germinación de las esporas en el suelo modelo de estudio puede estar relacionado de manera importante a las características propias del mismo, es por ello que los análisis realizados por el INIFAP nos permitió evaluar y por ende confirmar que dicho suelo fue apto para el desarrollo del patógeno, lo cual se le atribuye al porcentaje de materia orgánica que éste presenta (1.54%) debido a que el contenido de materia orgánica en un suelo promueve y mejora el crecimiento y desarrollo de los microorganismos presentes en éste (Murphy, 2015), además del tipo de suelo y su textura (franco, medio) las cuales permiten una buena retención de agua y por lo tanto los microorganismos además de estar en un medio rico en materia orgánica y en presencia de humedad suficiente, pueden desarrollarse el mismo tiempo que son inoculados al medio (tiempo 0).

### Porcentajes de esporas y células vegetativas

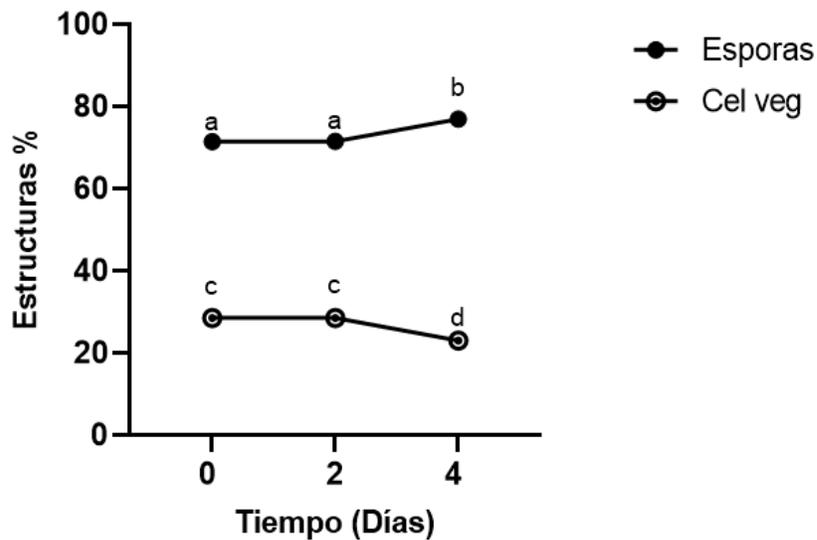


Figura 12.- Gráfico de los resultados obtenidos del ensayo de germinación de esporas en el suelo modelo de estudio, en donde los círculos negros representan los porcentajes obtenidos de esporas, y los círculos blancos el porcentaje obtenido de células vegetativas. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de 2 vías y prueba de medias de Tukey con  $\alpha=0.05$ ).

#### 6.2.2 Determinación del efecto de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en la sobrevivencia del hongo en el suelo.

En cuanto a la determinación del efecto de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en su sobrevivencia en el suelo, se llevó a cabo tomando en cuenta los resultados reportados por Ferrusquía-Jiménez (2020), en donde las concentraciones de 500  $\mu\text{g/ml}$  mostró mejores resultados, por lo que en la metodología desarrollada se manejaron concentraciones de eDNA del hongo de 50 y 500  $\mu\text{g/ml}$  y un grupo control en donde se inoculó agua destilada estéril con esporas del hongo.

Como podemos observar en la Figura 13 en el tiempo 0 el crecimiento de *Fusarium spp.* en placa fue el mismo estadísticamente en los diferentes grupos y fue a partir de las primeras 24 horas en donde se observó una diferencia significativa en el grupo de 500  $\mu\text{g/ml}$  en comparación con los demás tratamientos y el control, sin embargo, esta diferencia en cuanto al tiempo no representó gran cambio ya que el

análisis ANOVA no mostró diferencias significativas entre los días desde el tiempo 1 hasta el día 7 en dicho tratamiento.

Además, cabe mencionar que de acuerdo a los resultados obtenidos en los tratamientos de 50 µg/ml y 500\* (en donde se inoculo primero el eDNA y luego el hongo) (Figura 13) la tendencia fue igual a la obtenida en el control, por lo que podemos decir que la respuesta del hongo ante su propio eDNA es dependiente de la concentración del mismo, esto debido a que no hubo respuesta en la disminución del desarrollo del hongo en dichos tratamientos, a pesar de que en el grupo de 500\* se usó la misma concentración de 500 µg/ml del eDNA, sin embargo, podemos pensar que la espora de alguna manera está detectando su propio eDNA en el medio exterior debido a que mantiene el número de colonias en el tiempo sin diferencias significativas y por lo tanto podemos decir que mantiene sus estructuras de esporas sin germinar para evitar que éstas estén en “peligro” (DAMP en suelo), esto lo podemos relacionar con algunas demostraciones recientes por Aguilar *et al.* (2010) en donde mencionan que la presencia de una matriz extracelular con diversidad de moléculas en el suelo, tiene un profundo efecto sobre la esporulación de *B. subtilis* en biopelículas, debido a que la detección y respuesta a las fluctuaciones ambientales son fundamentales para la supervivencia de los microorganismos (Gao *et al.*, 2021).

### Cuenta viable de *Fusarium spp.* en suelo

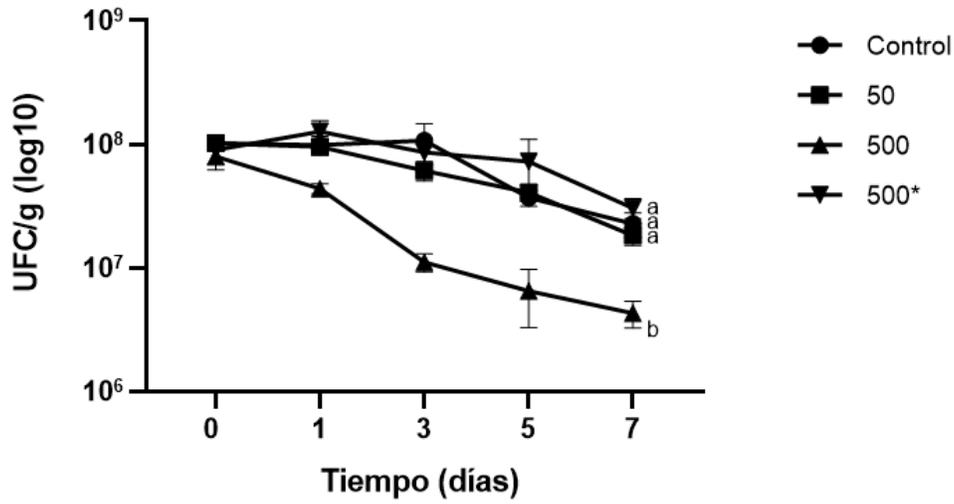


Figura 13.- Cuenta viable de *Fusarium spp.* bajo el tratamiento de eDNA propio a diferentes concentraciones, en donde los círculos representan el grupo control (se inoculó las esporas y luego agua destilada), los cuadros representan el grupo con eDNA a 50 µg/ml (se inoculó primero las esporas y luego el eDNA), los triángulos representan el grupo con eDNA a 500 µg/ml (se inoculó primero las esporas y luego el eDNA) y los triángulos invertidos representan el grupo con eDNA a 500 µg/ml (se inoculó primero el eDNA y después las esporas). Letras diferentes al final de cada grupo indica diferencias significativas (ANOVA de 2 vías y prueba de medias de Tukey con  $\alpha=0.05$ ).

Con lo anterior, podemos decir que el hongo está detectando su propio eDNA en un medio donde normalmente no lo encuentra (medio exterior) y como menciona Ferrusquía-Jiménez (2020), está funcionando como DAMP generando una respuesta en el desarrollo de *Fusarium spp.* disminuyendo con esto su crecimiento, como se observa en la Figura 14, en donde el conteo de colonias en placa disminuyó significativamente en el tiempo con el tratamiento de 500 µg/ml del eDNA y teniendo el hongo expuesto en el medio debido a que la inoculación del eDNA se realizó una hora después del patógeno en el suelo, por lo que tuvo oportunidad de germinar las esporas y por lo tanto estar más expuesto al tratamiento realizado.



Figura 14 Disminución del crecimiento de *Fusarium spp.* en placa en el tiempo, utilizando eDNA propio fragmentado a 500 ppm con el tiempo.

Cabe mencionar, que el DNA tiene una gran capacidad de adherirse a las partículas del suelo como lo menciona Kunadiya *et al.* (2020) por las características físico-químicas del mismo, esto nos da información en cuanto a la permanencia de estas moléculas en el medio y por lo tanto al menos en los primeros 7 días de que se aplicó, no se vio en la necesidad de realizar una segunda aplicación debido probablemente a esta cualidad, aunque para afirmar esto se necesita mayor investigación al respecto.

A partir de los resultados obtenidos, se estableció otro ensayo con la finalidad de verificar lo observado, manejando solo la concentración con que obtuvimos buenos resultados (500 µg/ml) y agregando un nuevo grupo el cual consistió en la aplicación de las esporas y dos días después el eDNA (E+2dDNA), además de los otros grupos en donde la diferencia es el orden de inoculación de los hongos y el eDNA, cabe mencionar que los resultados expresados en la Figura 13 son los obtenidos en el suelo no pasteurizado como se menciona en la metodología. En dicho experimento observamos que el tratamiento en donde se aplicó primero el eDNA en el suelo y después las esporas obtuvimos resultados muy parecidos al grupo control por lo que se verifica lo obtenido anteriormente, sin embargo, el grupo que obtuvimos diferencias significativas desde el día 2 fue el que se aplicó 2 días después el eDNA bajando casi una unidad logarítmica en comparación con el tiempo 0, y fue hasta el tercer día en donde la disminución de las colonias fue hasta de dos unidades logarítmicas en comparación con el grupo control (Figura 15, A).

Con esto, podemos decir que la aplicación del eDNA propio de *Fusarium spp.* una vez bien establecido el hongo en el suelo, genera mejores resultados que los obtenidos en los demás tratamientos realizados, aportando de esta manera un posible tratamiento para el manejo de *Fusarium spp.* en suelos utilizando eDNA propio donde tengamos dicho patógeno, con la finalidad de controlar su desarrollo en el medio y por lo tanto buscar disminuir la incidencia de la enfermedad que dicho patógeno genera en las plantas.

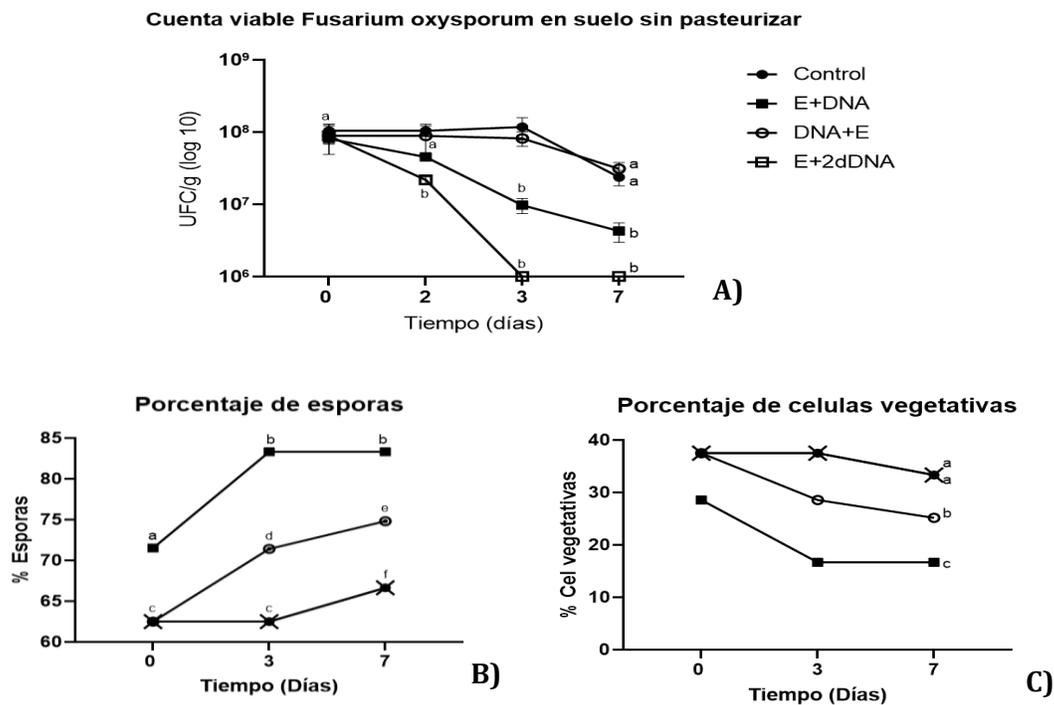


Figura 15.- Efecto De la aplicación en suelo de 500 µg/ml de eDNA propio de *Fusarium spp.* en diferentes tiempos con respecto a la inoculación con esporas del hongo. Panel A), cuenta viable total; Panel B), porcentaje de esporas; Panel C), porcentaje de células vegetativas. En donde; E+DNA= esporas de hongo y aplicación de eDNA, DNA+E= aplicación de eDNA e inoculación de esporas, E+2dDNA= esporas de hongo y 2 días después aplicación del eDNA. Letras diferentes en cada curva de cada panel indican diferencias significativas (ANOVA de 2 vías y prueba de medias de Tukey con  $\alpha=0.05$ ).

Al observar esta disminución en el conteo de colonias en placa de los tratamientos realizados, y gracias a la metodología realizada de pasteurización del suelo, pudimos realizar el análisis de las estructuras presentes en las cajas Petri sembradas como se muestran en la Figura 15 (B y C), en donde se separó el porcentaje de esporas presentes con el porcentaje de las células vegetativas. Con este análisis, podemos decir que la disminución del crecimiento de colonias en placa del suelo no pasteurizado se debe a un aumento importante en el desarrollo de esporas del hongo a partir del tercer día tanto en el tratamiento de la inoculación de esporas y 2 días después el eDNA (E + 2dDNA) como en el tratamiento de la inoculación de esporas y una hora después el eDNA (E + DNA) de aproximadamente un 9% y 12% respectivamente ya que refleja una disminución proporcional en las células vegetativas en cada tratamiento (Figura 15, C). Además, cabe mencionar que el grupo control como el tratamiento donde se aplicó primero el eDNA y una hora después el hongo (DNA + E) tuvieron un mismo desarrollo de las estructuras del hongo, observando que en el día 7 aumentó el porcentaje de esporas de casi un 5%, esto se puede atribuir a la generación de nuevas esporas desarrolladas por el patógeno en un medio más natural, es decir, sin presentar algún tipo de estrés o incluso percibir el eDNA presente en el suelo, como se mencionó previamente, en donde la espora del hongo está percibiendo su propio eDNA en el medio y por lo tanto mantiene su estructuras de esporas sin germinar de manera inmediata.

Así mismo, es importante señalar lo que se obtuvo en los días 3 y 7 con respecto al tratamiento de E + 2dDNA debido a que se mantuvo el porcentaje de esporas de aproximadamente un 85% en comparación con los demás grupos que tuvieron un aumento del tiempo 3 al 7 de aproximadamente un 5%.

### **6.3 Determinación del efecto de la aplicación del eDNA de *Fusarium spp.* en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) cultivadas en suelo infestado con *Fusarium spp.***

De acuerdo a los resultados obtenidos, se estableció un diseño en donde pudiéramos observar el nivel de patogenicidad en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). En donde la cuantificación de las esporas del hongo en la parte basal del tallo se expresa en la Figura 16, observando que los grupos control (CSHE, CHDNA) tenemos aproximadamente  $1 \times 10^3$  UFC/g de tejido sin diferencias significativas (Figura 16), cabe mencionar que los grupos en donde no se expuso a la planta al patógeno ni al eDNA (CSHA y CHA) no obtuvimos crecimiento del hongo en estos tejidos. Sin embargo, en el grupo control con planta herida en contacto con las esporas (CHE) se observó un aumento estadísticamente significativo en la cuenta viable (Figura 16). Además, cabe señalar que en los tratamientos se obtuvo una mayor cuenta viable en los tejidos, sobre todo en el tratamiento con planta herida primero, luego inoculada con las esporas del hongo y 2 días después se aplicó el eDNA (TE+2DNA) observando aproximadamente  $10^4$  UFC/g de tejido (Figura 16). De esta manera, comparando los resultados del tratamiento TE+2DNA con el control CHE, se puede mencionar que en el tratamiento las esporas al verse amenazadas o en peligro cuando se inoculó su propio eDNA comenzaron a infectar de manera más eficiente a los tejidos al encontrarse con un huésped (las plántulas de jitomate), lo anterior confirma lo reportado por Ferrusquía-Jiménez 2020, en donde menciona que la aplicación del eDNA propio del patógeno en presencia de un huésped puede ocurrir una aparente elicitación del mismo volviéndolo más agresivo en menos tiempo. Cabe mencionar que las dosis aplicadas fueron las que obtuvimos mejor respuesta (500  $\mu\text{g/ml}$ ), por lo que dicho fenómeno de infección observada por Ferrusquía-Jiménez 2020 con dosis más bajas, ocurre de manera similar en las dosis manejadas en este trabajo.

### Cuenta viable *Fusarium spp.* en tejido de plántula de tomate

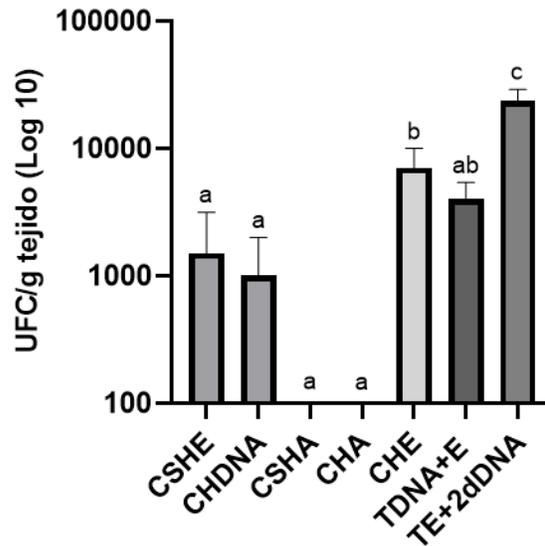


Figura 16.- Cuenta viable de *Fusarium spp.* en tejido de plántula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) expresadas en UFC/gramo de tejido, en donde; CSHE= grupo control planta sin herir y con esporas del hongo, CHDNA= grupo control planta herida y con eDNA, CSHA= grupo control planta sin herida y con agua destilada estéril, CHA= grupo control planta herida y con agua destilada estéril, CHE= grupo control planta herida y con esporas del hongo, TDNA+E= tratamiento planta herida inoculando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo y TE+2dDNA= tratamiento planta herida inoculando primero las esporas y dos días después el eDNA. Letras diferentes en cada grupo indican diferencias significativas (ANOVA de una vía y prueba de medias de Tukey con  $\alpha=0.05$ ).

Sin embargo, comparando la Figura 16 con la 17, en donde en esta última se graficó el nivel de severidad de acuerdo con Bosland y Lindsey (1991), observamos que el tratamiento con la planta herida en contacto solo con las esporas del hongo (CHE) fue la que presentó mayor severidad en comparación con los demás grupos, debido a que en dicho grupo presentamos hasta el nivel 9 de severidad (planta muerta) de hasta un 33% de nuestras plantas (Figuras 18 y 19), mientras que en los demás grupos obtuvimos entre el nivel 0 y 1 (sin respuesta, vigorosa y con ligeros oscurecimientos radiculares) (Figuras 20 y 21).

### NIVEL DE SEVERIDAD

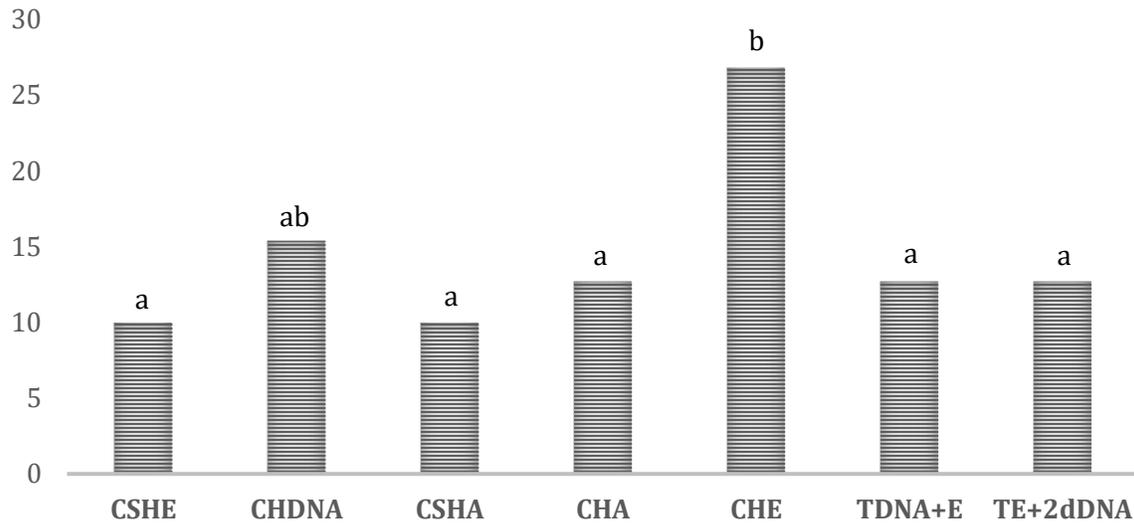


Figura 17.- Nivel de severidad de *Fusarium spp.* en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*), en donde; CSHE= grupo control planta sin herir y con esporas del hongo, CHDNA= grupo control planta herida y con eDNA, CSHA= grupo control planta sin herida y con agua destilada estéril, CHA= grupo control planta herida y con agua destilada estéril, CHE= grupo control planta herida y con esporas del hongo, TDNA+E= tratamiento planta herida inoculando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo y TE+2dDNA= tratamiento planta herida inoculando primero las esporas y dos días después el eDNA. Letras diferentes en cada grupo indican diferencias significativas con prueba de H Kruskal Wallis y prueba de Dunn con  $P=0.05$ .



Figura 18.- Plántula con fenotipo típico del grupo CHE (Control planta herida + esporas) en el día 7 de observación.



Figura 19.- Plántulas del grupo CHE (Control planta herida + esporas), en donde; A) es una planta muerta observada en el día 8 y B) es la primera planta que presentó marchites en este grupo observada el día 10.

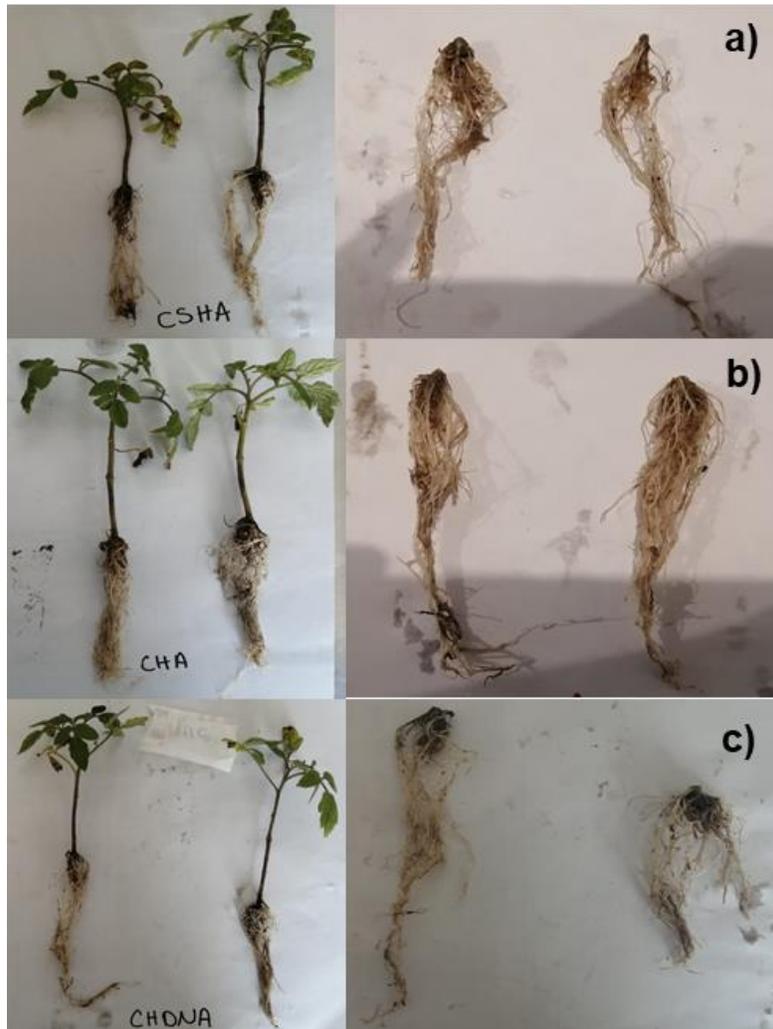


Figura 20.- Plántulas de tomate 3 semanas después de aplicar los tratamientos, en donde; a) se refiere al grupo control de planta sin herida + agua destilada esteril, b) corresponde al grupo de las plantas heridas + agua destilada esteril, y c) al grupo control de la planta herida + el eDNA.

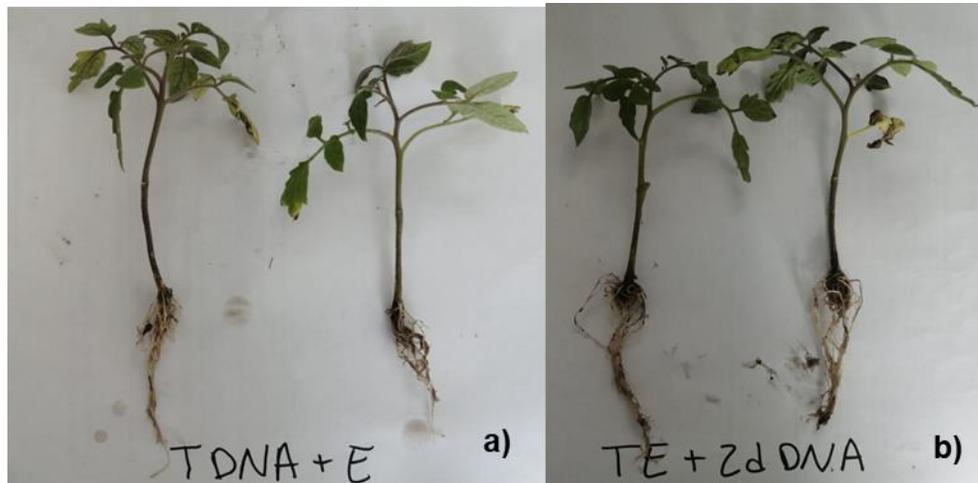


Figura 21.- Plántulas de tomate 3 semanas después de aplicar los tratamientos, en donde; a) se refiere al tratamiento de plantas heridas aplicando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo, y b) corresponde a las plantas heridas inoculando primero las esporas del hongo y 2 días después el eDNA.

Con estos resultados, podemos decir que de acuerdo con Quintana-Rodríguez *et al.* (2018) en donde discute que el eDNA como DAMP puede ser utilizado como una “vacuna”, es decir, como un compuesto utilizado para proteger contra enfermedades a las plantas a través de la manipulación de la respuesta inmune. En ese sentido, el desarrollo de este trabajo fue utilizando el eDNA como PAMP (Patrones moleculares asociados a patógenos) en las plantas al tratarse de moléculas orgánicas del patógeno, siendo de igual manera potenciales “vacunas de las plantas” al activar naturalmente la inmunidad en etapas tempranas (Quintana-Rodríguez *et al.*, 2018; Serrano-jamaica *et al.*, 2020).

#### **6.4 Evaluación de la respuesta de las plántulas de tomate cultivadas en suelo infestado con *Fusarium spp.* en cuanto a la producción de metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides totales).**

Uno de los mecanismos o procesos que las plantas han desarrollado para reforzar su respuesta de defensa contra patógenos y por lo tanto mejorar su supervivencia, es la producción de varios metabolitos secundarios (shitan, 2016; Alvarado *et al.*,

2019). Dentro de estos compuestos, los fenólicos son cruciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, así como para la respuesta de defensa de las plantas (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh 2011). Siendo una de las determinaciones importantes a desarrollar para evaluar la respuesta de las plantas ante algún tipo de estrés, es por ello que se evaluó la concentración de fenoles totales de cada uno de los tratamientos (Figura 22), en donde los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/mg de muestra seca, obteniendo diferencias significativas en la mayoría de los grupos observando un aumento en la concentración de fenoles totales que va aproximadamente de un 20% comparando los grupos control (CHA con CSHA) reflejando una mayor concentración en el grupo donde la planta fue herida (CHA), dicho aumento puede deberse al estrés que sufrió la planta al herir los tejidos de la rizosfera. Además obtuvimos un aumento de casi el 40% en la concentración de fenoles totales en el grupo CHDNA (control con planta herida y eDNA) en comparación con el grupo control sin herir (CSHA), en donde podemos confirmar el mismo fenómeno de estrés por la herida en la raíz y adjuntándole la posibilidad de detectar el eDNA del patógeno, sin embargo, la concentración obtenida en el grupo del primer tratamiento (TDNA+E) en donde las plantas fueron heridas y se les aplicó el eDNA y una hora después las esporas, en comparación con el grupo control CSHA observamos un ligero aumento de un 10% aunque estadísticamente no es significativo, por lo que podemos decir que el estrés que la planta sufrió por la herida fue prácticamente el mismo que el control (hablando de los fenoles totales) y que posiblemente el hongo al ser inoculado en la planta teniendo previamente el eDNA del mismo, éste no pudo desarrollar por completo la infección en el huésped y lo confirmamos si comparamos los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento de esporas en el tejido de la planta (Figura 16) así como el nivel de severidad observado en las mismas debido a que tampoco presentaron diferencias estadísticas importantes en comparación con los grupos control.

Finalmente, los grupos en donde obtuvimos un aumento de más del 100% en comparación con el grupo CSHA fue el grupo en donde herimos a la planta y le inoculamos únicamente las esporas del hongo (CHE) y el tratamiento en donde herimos a la planta, se le inoculó las esporas del hongo y se dejó pasar 48 horas

hasta aplicarle el eDNA (TE+2dDNA), debido a que la planta además de sufrir la herida de la raíz, tuvo una invasión de un patógeno en un tiempo tal que le permitió lograr una infección más fuerte en el caso del CHE, esto lo confirmamos con el nivel de severidad observado (Figura 17) así como un mayor número de colonias desarrolladas dentro del tejido en ambos grupos (Figura 16).

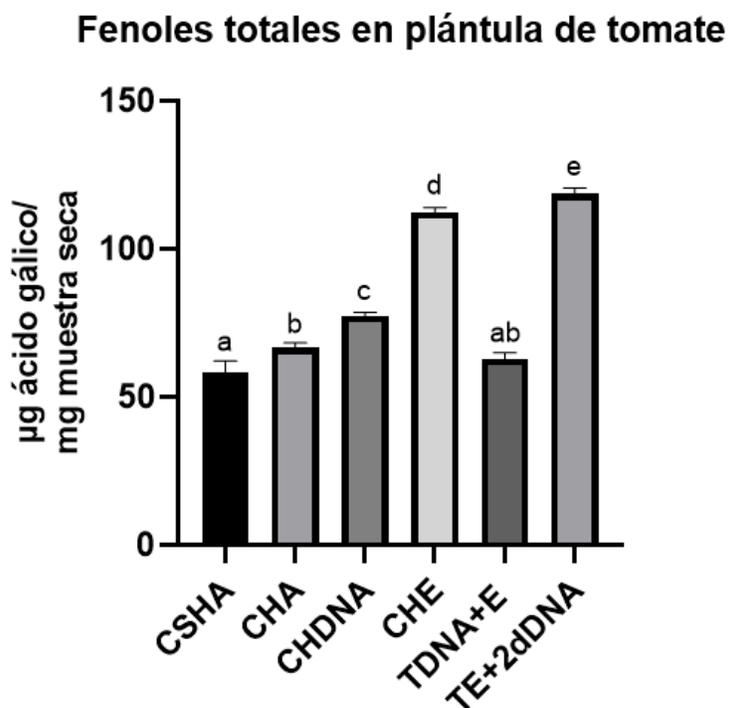


Figura 22.- Contenido de fenoles totales en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) reportado en  $\mu\text{g}$  ácido gálico/mg muestra seca, en donde; CSHE= grupo control planta sin herir y con esporas del hongo, CHDNA= grupo control planta herida y con eDNA, CSHA= grupo control planta sin herida y con agua destilada esteril, CHA= grupo control planta herida y con agua destilada esteril, CHE= grupo control planta herida y con esporas del hongo, TDNA+E= tratamiento planta herida inoculando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo y TE+2dDNA= tratamiento planta herida inoculando primero las esporas y dos días después el eDNA. Letras diferentes en cada grupo indican diferencias significativas (ANOVA de una vía y prueba de medias de Tukey con  $\alpha=0.05$ ).

En el caso de la concentración de flavonoides totales (Figura 23) reportados como  $\mu\text{g}$  de rutina/mg de muestra seca obtuvimos un comportamiento muy parecido en

todos los grupos sin obtener diferencias significativas importantes, el único grupo que resalta un poco tuvo un aumento de un 15% en la concentración de fenoles fue en donde la planta estuvo herida y le aplicamos primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo (TDNA+E) en comparación con el grupo control CSHA, sin embargo, estadísticamente dicho aumento no representa un incremento importante. En este sentido, estos resultados obtenidos están sujetos a determinar en un dado caso que tipo de flavonoides está interviniendo de mayor importancia en la concentración total de éstos, es decir, realizar una evaluación específica en cuanto a que flavonoide se ve afectada su concentración en la planta por el estrés al que fueron sometidas, esto debido a que de acuerdo con Agati *et al.* (2012) estos metabolitos secundarios se han visto mayormente relacionados con estrés ambiental, afectando así su biosíntesis.

### Flavonoides totales en plántulas de tomate

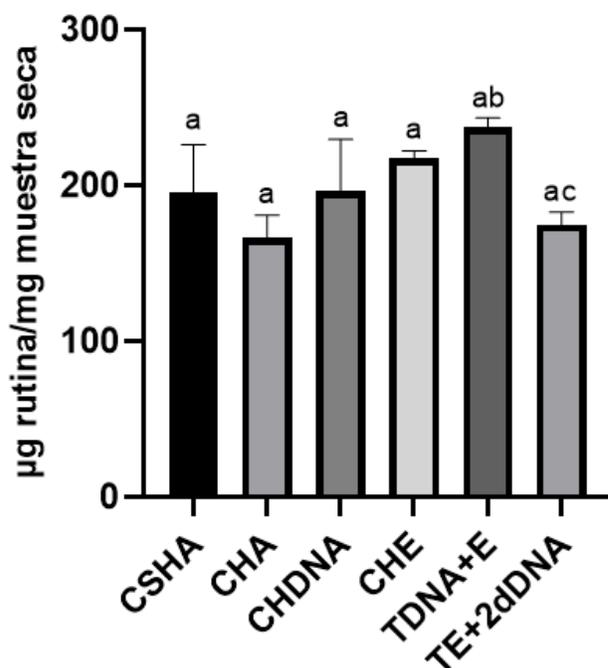


Figura 23.- Contenido de flavonoides totales en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) reportado en µg rutinina/mg muestra seca, en donde; CSHE= grupo control planta sin herir y con esporas del hongo, CHDNA= grupo control planta herida y con eDNA, CSHA= grupo control planta sin herida y con agua destilada esteril, CHA= grupo control planta herida y con agua destilada

esteril, CHE= grupo control planta herida y con esporas del hongo, TDNA+E= tratamiento planta herida inoculando primero el eDNA y una hora después las esporas del hongo y TE+2dDNA= tratamiento planta herida inoculando primero las esporas y dos días después el eDNA. Letras diferentes en cada grupo indican diferencias significativas (ANOVA de una vía y prueba de medias de Tukey con  $\alpha=0.05$ ).

## 7 CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que el eDNA propio fragmentado de *Fusarium spp.* disminuyó de manera significativa los niveles del patógeno en suelo a concentraciones de 500 ppm, siendo más efectiva la aplicación del eDNA 2 días después de haber inoculado el hongo en el suelo reduciendo los niveles hasta 2 unidades logarítmicas, favoreciendo así la esporulación en comparación con los demás tratamientos.

De la misma manera, parece que se logró disminuir el nivel de severidad de la infección del patógeno en las plántulas de tomate que fueron tratadas con el eDNA del hongo, a pesar de obtener mayores niveles de desarrollo del patógeno en los tejidos de las mismas, sobre todo en aquellas que se dejaron en contacto con el patógeno por 2 días y se aplicó después el eDNA, por lo que estos resultados sugieren una posible elicitación del patógeno al detectar su propio DNA en el medio extracelular y al encontrarse con un huésped, éste lo coloniza aún más con la finalidad de desarrollarse en estos tejidos. Cabe mencionar que la respuesta de las plántulas de tomate evaluando la generación de los metabolitos secundarios, podemos decir que obtuvimos un aumento de biosíntesis de fenoles totales en los grupos donde la planta herida estuvo en contacto con las esporas del patógeno, en comparación con los tratamientos, sin embargo, dicho aumento no se observó en los flavonoides totales.

Por lo anterior, podemos decir que la hipótesis planteada fue cierta debido a los resultados obtenidos en cuanto a la disminución del desarrollo de *Fusarium spp.* en suelo con presencia de su propio DNA fragmentado en el medio extracelular, así

como reducir la patogenicidad de dicho hongo en plántulas de tomate al observar una disminución importante en el nivel de severidad del daño ocasionado por el patógeno, tras la manipulación de la respuesta inmune propia de la planta al detectar dichas moléculas como PAMP (Patrones moleculares asociados a patógenos) y, por lo tanto, activar naturalmente la inmunidad de las plántulas. Siendo una posible alternativa complementaria sostenible para el manejo de este patógeno en los sistemas de producción agrícolas.

## 8 REFERENCIAS

Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*. 196:67-76.

Aguilar-Gastelum I. 2016. Inducción del sistema de defensa en plantas de tomate por un extracto hidroalcohólico de ajo para el control de *Fusarium oxysporum*. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C.

Aires-Ventura J., Melo-Lima I., Valentim Martins M., Paul-Culik M., Costa H. 2018. Impact and management of diseases in the propagation of fruit plants. *Revista Brasileira de Fruticultura*. ISSN 0100-2945.

Ajilogba C., Olubukola O. 2013. Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. *Biocontrol Science*. 18,3:117-127.

Alnaji H. 2018. DNA structure. *Molecular biology*.

Alvarado A.M., Aguirre-Becerra H., Vázquez-Hernández M.C., Magaña-López E., Parola-Contreras I., Caicedo-López L.H., Contreras-Medina L.M., García-Trejo J.F., Guevara-González R.G., Feregrino-Perez A.A. 2019. Influence of elicitors and eustressors on the production of plant secondary metabolites. (Chapter 11).

Arie T. 2019. *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*. 10.1584/jpestics.J19-03.

Barbero F., Guglielmotto M., Islam M., Maffei M. 2021. Extracellular fragmented self-DNA is involved in plant responses to biotic stress. *Frontiers in Plant Science*. Sci. 12:686121.

Barbetti M.J., Sivasithamparam K. 1987. Effects of soil pasteurization on root rot, seedling survival and plant dry weight of subterranean clover inoculated with six fungal root pathogens. *Aust. J. Agric. Res.* 38:317-27.

Barghahn s., Arnal G., Jain N., Petutschnig E., Brumer H., Lipka V. 2021. Mixed linkage  $\beta$ -1,3/1,4-glucan oligosaccharide induce defense responses in hordeum vulgare and Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*. Sci. 12:682439.

Bawa I. 2016. Management strategies of Fusarium wilt disease of tomato incited by *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc.): a review. *International Journal of Advanced Academic Research*. 2:5.

Bosland P.W., Lindsey D.L. 1991. A seedling screen for Phytophthora root rot of pepper (*Capsicum annum*). *Plant Dis.* 75:1048-1050.

Carbajal-Valenzuela I., Medina Ramos G., Caicedo-Lopez L., Jiménez-Hernández A., Ortega-Torres A., Contreras-Medina L., Tores-Pacheco I., Guevara-González R. 2021. Extracellular DNA: insight of a signal molecule in crop protection. *Biology*. 10:1022.

Cardador-Martínez A., Castaño-Tostado E., Loarca-Piña G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Additives & Contaminants*. 19,1:62-69.

Carini P., Marsden P., Left J., Morgan E., Strickland M., Fierer N. 2016. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature Microbiology*. 2:16242.

Carmona S., Villareal-Navarrete A., Burbano-David D., Gómez-Marroquín G., Torres-Rojas E., Soto-Suárez M. 2020. Boosting photosynthetic machinery and defense priming with chitosan application on tomato plants infected with *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.18.256628>.

- Centeno G. Métodos de controles: cultural, físico y mecánico. 2016. Disponible en: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/CONTROL\\_CULTURAL\\_FISICO\\_Y\\_MEC%C3%81NICO\\_2016](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/CONTROL_CULTURAL_FISICO_Y_MEC%C3%81NICO_2016)
- Chehri K. 2011. Occurrence of *Fusarium* species associated with economically important agricultural crops in Iran. African Journal of Microbiology Research. 24:4043-4048.
- Choi H., Lessig D. 2016. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. BMC Plant Biology. 6:232.
- Das T., Sehar S., Manfield M. 2013. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. Environmental Microbiology Reports. 5:778-786.
- Delgado-Morato L. 2019. Evaluación de inducción de resistencia en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con silicio y antagonismo de *Trichoderma viride* contra la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Programa de ingeniería agronómica.
- Dellaporta S., Wood J., Hicks J. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reporter. 1:19-21.
- Dewanto V., Wu X., Adom K., Liu R. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J. Agric. Food. Chem. 50:3010-3014.
- Dinolfo M., Castañares E., Stenglein S. 2017. *Fusarium*-Plant interaction: state of the art-a review. Plant Protect. Sci. 53:61-70.
- Dóczi I., Gyetvai T., Kredics L., Nagy E. 2014. Involvement of *Fusarium* spp. In fungal keratitis. Clin Microbiol Infect. 10:773-776.
- Duran-Flores D., Heil M. 2018. Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants. Brain, Behavior, and Immunity. 72:78-88.

Dweba C.C., Figlan S., Shimelis H.A., Motaung T.E., Sydenham S., Mwadzingeni L., Tsilo T.J. 2017. Fusarium head blight of wheat: pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*. 91:114-122.

Edel-Hermann V., Lecomte C. 2019. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*. 109:512-530.

Elahi E., Weijun C., Zhang H., Nazeer M., 2019. Agricultural intensification and damages to human health in relation to agrochemicals: Application of artificial intelligence. *Land use policy*. 83:461-474.

Fang-Yu H., De-Fen M., Chi-Wei T. 2020. Evaluation of barrier plants for the cultural control of tomato yellow leaf curl disease. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 23:132-137.

FAO. 2017. Plant health and food security. International Plant Protection Convention (IPPC).

Ferrusquía-Jiménez N, Chandrakasan G, Torres-Pacheco I, Rico-García E, Feregrino-Pérez A, Guevara-González R. 2020. Extracellular DNA: A Relevant Plant Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) for Crop Protection Against Pest-A review. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10129-w>.

Figueroa-Rivera M.G., Rodríguez-Guerra R., Guerrero-Aguilar B.Z., González-Chavira M.M., Pons-Hernández J.L. 2010. Characterization of *Fusarium* species associated with rotting of corn root in Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28,2.

Gao J., Xu X., Huang K., Liang Z. 2021. Fungal G-protein-coupled receptors: a promising mediator of the impact of extracellular signals on biosynthesis of ochratoxin A. *Frontiers in Microbiology*. Sci. 12:631392.

Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N. 2011. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5,31:6697-6703.

Ghorbanpour M., Omidvari M., Abbaszadeh-Dhaji P., Omidvar R., Kariman K. 2017. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological control*. 117:147-157.

Gordon T. 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *Phytopathology*. 55:23-39.

Han C., Yu Z., Zhang Y., Wang Z., Zhao J., Xiong-Huang S., Ma Z., Wen Z., Liu C., Xiang W. 2021. Discovery of frenolicin b as potential agrochemical fungicide for controlling *Fusarium* head blight on wheat. *Agricultural Food Chemistry*. 69:2108-2117.

Hawes M., Curlango-Rivera G., Wen F., White G., VanEtten H., Xiong Z. 2011. Extracellular DNA: The tip of root defenses?. *Plant Science*. 180:741-745.

Heil M., Land W. 2014. Danger signals-damaged-self recognition across the tree or life. *Front. Plant. Sci*. 5:578.

Ibáñez de Aldecoa A., Zafra O., González-Pastor J. 2017. Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Front. Microbiol. Sci*. 8:1390.

Jiménez-Hernández A., Guevara-González R.G., Rico-García E., Torres-Pacheco I. 2021. Evaluation of chemical and biological fungicides for the management of *Fusarium Oxysporum*. *International Engineering Congress (CONIIN)*. 1-6.

Kenneth R., Ramírez-Coché J., Castro O., Blanco-Meneses M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. sp. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agron. Costarricense*. 42:1.

Khan N., Martínez-Hidalgo P., Ice T., Maymon M., Humm E., Nejat N., Sanders E., Kaplan D., Hirsch A. 2018. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Front. Microbiol*. 9:2363.

Krishna-Pal K., McSpadden-Gardener B. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Kunadiya M.B., Burgess T.I., Dunstan W.A., White D., Hardy G.E. 2020. Persistence and degradation of *Phytophthora cinnamoni* DNA and RNA in different soil types. *Environmental DNA*. 3:92-104.

Kurian S.M., Di-Pietro A., Read N.D. 2018. Lice-cell imaging of conidial anastomosis tube fusion during colony initiation in *Fusarium oxysporum*. *PLoS*. 13,5.

Lamprecht-Grandío M. 2012. Producción de DNA extracelular en una estirpe natural de *Bacillus subtilis*. Departamento de biología molecular.

Lecomte C., Alabouvette C., Edel-Hermann V., Robert F., Steinberg C. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review". *Biological Control*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.004>.

Leplat J., Friberg H., Abid M., Steinberg C. 2013. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33:97-111.

Martínez.Bolaños A. 2012. Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma sp.* para control biológico de *Fusarium sp.* en maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad *Flavicarpa*), en condiciones *in vitro*.

Martínez-Ezquerro J., Trejo-Becerril C, Dueñas-González A. 2007. El ADN circulante y su potencial clínico. *Revista de ciencia*.

Mazzoleni S., Carteni F., Bonanomi G., Senatore M., Termolino P., Giannino F., Inceti G., Rietkerk M., Lanzotti V., Chiusano M.L. 2015. Inhibitory effects or extracelular self-DNA: a general biological process?. *New Phytologist*. 206:127-132.

Mcgonigle T., Miller M. 1996. Development of fungi below ground in association with plants growing in disturbed and undisturbed soils. *Soil. Biol. Biochem.* 28,3:263-269.

McGovern R. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*. 1-15.

Meents A., Mithöfer A. 2020. Plant-plant communication: is there a role for volatile damage-associated molecular patterns?. *Frontiers in Plant Science*. *Sci.* 11:583275.

Mejdoub-Trabelsi B., Touihri S., Ammar N., Riahi A., Daami-Remadi M. 2019. Effect of chitosan for the control of potato diseases caused by *Fusarium* species. Journal of Phytopathology. 00:1-10.

Mélida H., Bacete L., Ruprecht C, Rebaque D., Hierro I., López G., Brunner F., Pfrengle F., Molina A. 2020. Arabinoxylan-oligosaccharides act as damage associated molecular patterns in plants regulating disease resistance. Frontiers in Plant Science. Sci. 11:1210.

Micah R., Santos G., Sahagún-Castellanos J., Câmara-Correia K., Tovar-Pedraza J., Rodríguez-Pérez J. 2018. Occurrence, identification, and pathogenicity of *Fusarium spp.* associated with tomato wilt in México. Not Bot Horti Agrobo. 46(2):484-493.

Monticolo F., Palomba E., Termolino P., Chiaiese P., Alteriis E., Mazzoleni S., Chiusano M. 2020. The role of DNA in the extracellular environment: a focus on NETs, RETs and biofilms. Frontiers in Plant Science. Sci. 11:589837.

Monzón A., Tudela J. 2000. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Centro Nacional de Microbiología. Control Calidad SEIMC.

Morrisey E., McHugh T., Preteska M., Hayer M., Dijkstra P., Hungate B., Schwartz E. 2015. Dynamics of extracellular DNA decomposition and bacterial community composition in soil. Soil Biology & Biochemistry. 86:42-49.

Murphy B.W. 2015. Impact of soil organic matter on soil properties-a review with emphasis on Australian soils. Soil Research. 52:605-635.

Nadales E., Prieto A. 2011. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. The Plant Cell. 23:1171-1185.

Nagler M., Insam H., Pietramellara G., Ascher-Jenull J. 2018. Extracellular DNA in natural environments features, relevance and applications. Appl Microbiol Biotechnol. 102:6343-6356.

Ortoneda M., Guarro J., Madrid M., Caracuel Z., Roncero M., Mayayo E., Pietro A. 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal

virulence in plants and mammals. American Society for Microbiology. 72,3:1760-1766.

Pietramellara G., Ascher J., Borboni F. Ceccherini M., Guerri G., Nannipieri P. 2009. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. Biol Fertil Soils. 45:219-235.

Pisetsky D. 2012. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. Clinical Immunology. 144:32-40.

Pontiggia D., Beneditti M., Costantini S., Lorenzo G., Cervone F. 2020. Dampening the DAMPs: how plants maintain the homeostasis of cell wall molecular patterns and avoid hyper-immunity. Frontiers in Plant Science. Sci. 11:613259.

Prados-Rosales R., Di-Pietro A. 2008. Vegetative hyphal fusión is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. Eukaryotic Cell. 7,1:162-171.

Price C., Parker J.E., Warrilow A., Kelly D., Kelly S.L. 2015. Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. 71,8:1054-1058.

Quintana-Rodríguez E., Duran-Flores D., Heil M., Camacho-Coronel X. 2018. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) as future plant vaccines that protect crops from pests. Scientia Horticulturae. 237:207-220.

Rampersad S. 2020. Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants. Pathogens. 9:340.

Redmile-Gordon M., Brookes P., Evershed R., Goulding K., Hirsh P. 2014. Measuring the soil-microbial interface: extraction of extracellular polymeric substances (EPS) fro soil biofilms. Soil Biology & Biochemistry. 72:163-171.

Rigalli A. 2017. Transporte a través de membranas. Disponible en: <https://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/7329/transporte%20a%20traves%20de%20membranas.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Rodríguez-Ruvalcaba R. 2002. Extractos de origen vegetal para el control de *Fusarium oxysporum* y *Erwinia sp*, aislados de agave (*Agave tequilana weber* variedad azul). Posgrado interinstitucional en ciencias agrícolas y forestales.

Salah H., Bouaziz H., Allouche N. 2019. Chemical composition of essential oil from *Rhanterium sauveolens* desf. and its antimicrobial activity against foodborne spoilage pathogens and mycotoxigenic fungi. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 10.1080/0972060X.2019.1624199.

Sankar-Ganesh P., Ravishankar-Rai V. 2018. Alternative strategies to regulate quorum sensing and biofilm formation of pathogenic pseudomonas by quorum sensing inhibitors of diverse origins. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4_3).

Saremi H., Okhovvat S., Ashrafi S. 2011. *Fusarium* diseases as the main soil borne fungal pathogen on plants and their control management with soil solarization in Iran. African Journal of Biotechnology. 10(80):18391-18396.

Sena-Vélez M., Redondo C., Graham J., Cubero J. 2016. Presence of extracelular DNA during biofilm formation by *Xanthomonas citri* subsp. Citri strains with different host range. PLoS. 10.1371/journal.pone.0156695.

Serrano-Jamaica L., Villordo-Pineda E.,\_González-Chavira M., Guevara-González R., Medina-Ramos G. 2020. Effect of fragmented DNA from plant pathogens on the protection against wilt and root rot of *Capsicum annum* L. plants. Frontiers in Plant Science. Sci. 11:581891.

Shitan N. 2016. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 80,7:1283-1293.

Spencer H. 2020. Cell-nucleus: a functional approach to the nucleus of human cells.

Tarberlet P., Prud´homme S., Campione E., Roy J., Miquel C., Shehzad W., Girilly L., Rioux D., Choler P., Clément J., Melodelima C., Pompanon F., Coissac E. 2012. Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. Molecular ecology. 21:1816-1820.

Torres A.M., Palacios S.A., Yerkovich N., Palazzini J.M., Battilani P., Leslie J.F., Logrieco A.F., Chulze S.N. 2019. Fusarium head blight and mycotoxins in wheat: prevention and control strategies across the food chain. *World Mycotoxin Journal*. 12,4:333-355.

Tovar-Castaño J. 2018. Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de *Trichoderma spp* frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

Travers A., Muskhelishvili G. 2015. DNA structure and function. *The FEBS Journal*. 282:2279-2296.

Tripathi A.N., Meena B.R., Pandey K.K., Singh J.M. 2020. Microbial bioagents in agriculture: current status and prospects. *New frontiers in stress management for durable agriculture*. 331-368.

Vega-Muñoz I., Duran-Flores D., Fernández-Fernández A., Heyman J., Ritter A., Stael S. 2020. Breaking bad news: dynamic molecular mechanisms of wound response in plants. *Frontiers in Plant Science*. Sci. 11:610445.

Vega-Muñoz I., Feregrino-Pérez A.A., Torres-Pacheco I., Guevara-González R.G. 2018. Exogenous fragmented DNA acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa*. *Functional Plant Biology*. 45,10:1065-1072.

Vera-Roman E. 2013. Identificación morfológica y molecular de especies de Fusarium en plantas de nochebuena.

Veresoglou, S.D., Aguilar-Trigueros, C.A., Mansour, I. & Rillig, M.C. 2015. Self-DNA: a blessing in disguise?. *New Phytologist*. 207:488–490.

Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales H, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra J, Martínez-Escudero E. 2014. Situación actual en el control de Fusarium spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta agronómica*. 64(2):194.

Vuillemin A., Horn F., Alawi M., Henny C., Wagner D., Crowe S., Kallmeyer J. 2017. Preservation and significance of extracellular DNA in ferruginous sediments from lake towyti, Indonesia. *Frontiers in Microbiology*. 8:1440.

Wanjohi W., Wafula G., Macharia C. 2018. Integrated management of Fusarium wilt-root knot nematode complex on tomato in central highlands of Kenya. *Sustainable Agriculture Research*. 7,2.

Wightwick A., Walters R., Graeme A., Reichman S., Menzies N. 2010. Environmental risks of fungicides used in horticultural production systems. Capítulo de libro *Fungicides*.

## ANEXOS

1.- Resultados del análisis del suelo modelo de estudio realizado en el inifap.

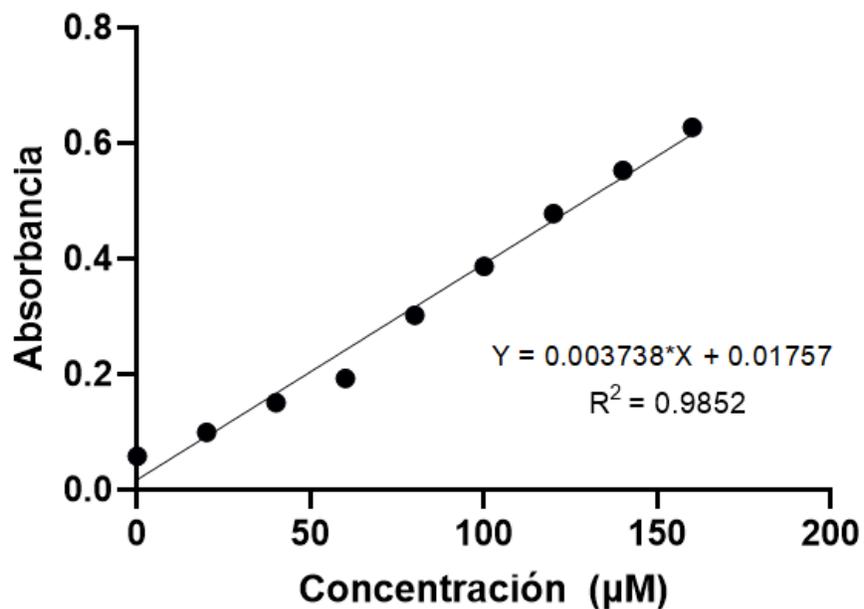


**Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos  
Y Nutrición Vegetal  
(Campo Experimental Bajío)**

NO. DE REGISTRO	PROPIETARIO	ARENA %	ARCILLA %	LIMO %	TIPO DE SUELO	TIPO DE TEXTURA	MATERIA ORGANICA (%)
SU-19675	Universidad Autónoma de Querétaro	44.76	23.24	32	FRANCO	MEDIO	1.54

2.- Curvas de calibración de las determinaciones de fenoles y flavonoides.

### Curva de Fenoles



### Curva de Flavonoides

