



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

Actividad antimicrobiana del DNA extracelular (eDNA) homólogo sobre los microorganismos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum* y *Phytophthora spp.*).

Tesis

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

Presenta:

Noelia Isabel Ferrusquía Jiménez

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Presidente

Dr. Enrique Rico García  
Secretario

Dra. Ana Angélica Feregrino  
Vocal

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Suplente

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Junio, 2020  
México

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

**A Fernando,  
gracias por amarme y creer siempre en mí.**

**A mi primo Miguel,  
por vivir eternamente “*feliz-feliz*”**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis Padres por formar la persona que soy y darme la fortaleza para seguir adelante a pesar de las dificultades. A mis queridos hermanos, por ser parte esencial de mi felicidad, quienes me motivan todos los días a ser mejor. Muchas gracias a mi amado Fernando, quien me brindo su comprensión y apoyo en todo el transcurso de mi maestría y estuvo a mi lado tardes largas ayudándome en todos los sentidos.

Igualmente agradezco a mis compañeros y amigos de la maestría, en quienes pude encontrar apoyo y consejo durante las clases y la sección experimental de este trabajo; así como a mis maestros quienes lograron transmitir el conocimiento de una forma excepcional en las clases.

Agradezco ampliamente al CONACYT por la beca otorgada, con la cual pude sustentar la realización de este trabajo. También, agradezco a mi Director de tesis, Dr. Ramón Gerardo Guevara González, por ser un excelente guía y apoyar mis ideas; a mis sinodales por sus consejos y atenciones durante la planeación y ejecución del proyecto. Muchas gracias a todos los que se mantuvieron cerca de mi y llenaron de felicidad mi etapa de maestría.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A DAÑO (DAMPs-DAMAGE-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS').....	3
2.2 DAMPs DE ANIMALES .....	4
2.3 DAMPs DE PLANTAS.....	5
2.4 EDNA COMO DAMP.....	7
2.5 MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA .....	9
2.5.1 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	11
2.5.2 <i>Phytophthora spp.</i> .....	13
2.6 MÉTODOS DE CONTROL DE FITOPATÓGENOS .....	15
2.6.1 Fungicidas químicos.....	16
2.6.2 Aplicación de aceites esenciales.....	16
2.6.3 Control biológico .....	17
3. HIPÓTESIS .....	19
4. OBJETIVOS .....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1 PREPARACIÓN DE CEPAS DE HONGOS FITOPATÓGENOS .....	20
5.2 OBTENCIÓN DE EDNA HOMÓLOGO FRAGMENTADO .....	21
5.3 OBTENCIÓN DE EDNA HETERÓLOGO FRAGMENTADO .....	22
5.4 ESTABLECIMIENTO DE LOS ENSAYOS PARA LA EXPOSICIÓN DE LOS FITOPATÓGENOS A EDNA FRAGMENTADO <i>IN VITRO</i> . .....	22
5.4.1 Evaluación del eDNA sobre la germinación de esporas de los fitopatógenos .....	23
5.4.2 Evaluación del eDNA sobre la respuesta SOD y CAT de los fitopatógenos .....	24
5.5 MEDICIÓN DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA EN ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	25
5.5.1 Germinación de spora.....	25
5.5.2 Actividad SOD y CAT.....	26
5.5.3 Niveles de metilación de DNA genómico .....	27
5.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DIRECTO DEL EDNA HOMÓLOGO FRAGMENTADO APLICADO AL SISTEMA DE INFECCIÓN <i>P. CAPSICI</i> - <i>CAPSICUM ANNUM</i> .....	27
5.7 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN RESULTADOS .....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1 EXTRACCIÓN Y FRAGMENTACIÓN DE DNA DE LOS FITOPATÓGENOS.....	31
6.2 EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN DE ESPORA .....	34
6.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	34
6.2.2 <i>Phytophthora capsici</i> .....	38
6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SOD Y CAT.....	42

6.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	42
6.3.2 <i>Phytophthora capsici</i> .....	44
6.4 ANÁLISIS MICROSCÓPICO DEL MICELIO DE LOS FITOPATÓGENOS.....	48
6.5 NIVELES DE METILACIÓN DE DNA GENÓMICO.....	50
6.6 EFECTO DEL DNA HOMÓLOGO SOBRE EL SISTEMA DE INFECCIÓN <i>P. CAPSICI</i> -CHILE.....	51
7. CONCLUSIONES.....	54
8. REFERENCIAS.....	55
ANEXOS .....	64

Dirección General de Bibliotecas UAG

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Establecimiento de tratamientos para evaluar la germinación de espora.....	23
Cuadro 2. Características de las semillas Hot Pepper-Serrano Magnun 45 por Lakr Seeds International.....	27
Cuadro 3. Resumen de tratamientos para evaluación <i>P. capsici</i> -Chile.....	29
Cuadro 4. Escala de severidad del marchitamiento foliar por <i>P. capsici</i> .....	29
Cuadro 5. Escala de severidad de necrosis radicular por <i>P. capsici</i> .....	30
Cuadro 6. Cuantificación de extracciones de DNA genómico por método CTAB.....	31
Cuadro 7. Valores de germinación de espora de <i>Fusarium oxysporum</i> bajo tratamiento con DNA homólogo, después de 120 horas.....	36
Cuadro 8. Valores de germinación de espora de <i>Fusarium oxysporum</i> bajo tratamiento con DNA heterólogo, después de 120 horas.....	37
Cuadro 9. Valores de germinación de espora de <i>P.capsici</i> bajo tratamiento con DNA homólogo, después de 120 horas.....	39
Cuadro 10. Valores de germinación de espora de <i>P. capsici</i> bajo tratamiento con DNA heterólogo, después de 120 horas.....	41
Cuadro 11. Valores de actividad enzimática de <i>Fusarium oxysporum</i> bajo tratamiento con DNA homólogo y heterólogo, después de 24 horas.....	44
Cuadro 12. Valores de actividad enzimática de <i>P. capsici</i> bajo tratamiento con DNA homólogo y heterólogo, después de 24 horas.....	46
Cuadro 13. Nivel de metilación del DNA genómico de <i>F. oxysporum</i> bajo tratamiento con DNA homólogo.....	50
Cuadro 14. Valores de severidad de marchitamiento y necrosis radicular, 8 días después de la aplicación de tratamientos. ....	53

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Percepción y respuestas comunes activadas por DAMPs en plantas....	6
Figura 2. Reconocimiento del eDNA propio u homólogo.....	8
Figura 3. Morfología de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	12
Figura 4. Apariencia microscópica de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	12
Figura 5. Morfología microscópica de <i>Phytophthora capsici</i> .....	13
Figura 6. Diferencias morfológicas según el ciclo de enfermedad de <i>Phytophthora capsici</i> .....	14
Figura 7. Esquema de aplicación de tratamientos en caja de 24 pozos.....	24
Figura 8. Diseño de ensayo de infección de <i>P. capsici</i> en plántula de chile.....	28
Figura 9. Verificación de integridad de extracciones y de fragmentación.....	32
Figura 10: Mecanismos posibles para el reconocimiento de eDNA.....	33
Figura 11. Cinética de germinación de espóra de <i>Fusarium Oxysporum</i> bajo el tratamiento de eDNA homólogo a diferentes concentraciones.....	34
Figura 12. Efecto del eDNA homólogo fragmentado sobre <i>F. oxysporum</i> , 120 horas después del tratamiento.....	35
Figura 13. Observación del efecto del eDNA homólogo fragmentado sobre la germinación de espóra de <i>F. oxysporum</i> , 120 horas después del tratamiento.....	36
Figura 14. Cinética de germinación de espóra de <i>P. capsici</i> bajo el tratamiento de eDNA homólogo a diferentes concentraciones.....	38
Figura 15. Efecto del eDNA homólogo fragmentado sobre <i>P. capsici</i> , 120 horas después del tratamiento.....	39
Figura 16. Observación del efecto del eDNA homólogo fragmentado sobre la germinación de espóra de <i>P. capsici</i> , 120 horas después del tratamiento. ....	40
Figura 17. Actividad SOD <i>F. oxysporum</i> , 24 horas después del tratamiento de eDNA.....	43

<b>Figura 18. Actividad CAT <i>F. oxysporum</i>, 24 horas después del tratamiento de eDNA.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 19. Actividad SOD <i>P. capsici</i>, 24 horas después del tratamiento de eDNA.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 20. Actividad CAT <i>P. capsici</i>, 24 horas después del tratamiento de eDNA.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 21: Observaciones microscópicas del efecto del eDNA a diferentes concentraciones sobre el micelio de <i>Fusarium oxysporum</i>, después de 24 hr.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 22: Observaciones microscópicas del efecto del eDNA a diferentes concentraciones sobre el micelio de <i>P capsici</i>, después de 24 hr.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 23. Niveles de metilación del DNA genómico de <i>Fusarium oxysporum</i> después de 120 horas de exposición de eDNA-homólogo.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 24. Efecto de los tratamientos de eDNA en plantas de chile inoculadas con <i>P. capsici</i> a los 8 días.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 25. Actividad dual del eDNA y su potencial biotecnológico.....</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

La agricultura moderna demanda la generación de nuevas alternativas para el control de plagas y enfermedades agrícolas que sean menos tóxicas y efectivas. Recientemente, se le ha atribuido una nueva función al DNA extracelular (eDNA) homólogo, la cual consiste en mediar la inhibición del crecimiento del organismo del cual proviene. Lo anterior ha sido entendido como un fenómeno de respuesta a estrés, en donde el reconocimiento del eDNA por las células es indicativo de un medio hostil y, por lo tanto, actúa como un “Patrón Molecular Asociado a Daño” (DAMP). Este fenómeno ha sido propuesto como una posible alternativa para la generación de productos de tipo herbicida. En el presente trabajo se evaluó dicho fenómeno para generar la inhibición específica de los microorganismos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora spp.*, por medio de ensayos de exposición directa de los fitopatógenos a su propio eDNA a diferentes concentraciones, estimando la germinación de espora, niveles de metilación del DNA y la actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Dosis de 500 µg/mL del eDNA homólogo causaron una reducción significativa en la germinación de espora de ambos fitopatógenos; además, se observó que eDNA heterólogo, proveniente de lechuga (*Lactuca sativa*), no generó dicho efecto; por lo tanto, los resultados indican que el tratamiento es especie-específico. Por otro lado, se identificó el aumento de la actividad SOD y CAT en ambos fitopatógenos después de la aplicación de eDNA homólogo, por lo que el fenómeno de inhibición indica estar relacionado con el proceso de estrés oxidativo. Además, cambios en la metilación del DNA genómico fueron observados, vinculando al fenómeno a modificaciones en la expresión génica. Así mismo, se estableció la aplicación de eDNA en un sistema de infección de plántula de chile con *P. capsici*, observando efectos negativos en la prevención de enfermedad, por lo que estudios de dosis-patógeno serán necesarios para corroborar el resultado. A partir de los resultados anteriores, se concluye que el eDNA inhibe la germinación de espora de los fitopatógenos estudiados a concentraciones de 500 µg/mL en ensayos *in vitro*, y funge como DAMP al activar respuestas relacionadas con el estrés.

**Palabras clave:** eDNA, DAMP, estrés oxidativo, control biológico

## SUMMARY

Modern agriculture demands the generation of new effective and less toxic alternatives for the control of agricultural pests and diseases. Recently, a new function has been attributed to homologous extracellular DNA (eDNA), which is to mediate the growth inhibition of the organism from which it comes. This has been understood as a stress response phenomenon, where the recognition of the eDNA by the cells indicates a hostile environment and, therefore, acts as a "Damage Associated molecular Pattern" (DAMP). This phenomenon has been proposed as a possible alternative for the generation of herbicide-type products. In the present work, the specific growth inhibition phenomenon was evaluated in the phytopathogenic microorganisms *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora spp.*, through tests of direct exposure of the plant-pathogens to their own eDNA at different concentrations, estimating spore germination, levels of DNA methylation and enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Homologous eDNA doses of 500 µg/mL caused a significant reduction in spore germination of both plant pathogens; in addition, it was observed that heterologous eDNA, derived from lettuce (*Lactuca sativa*), did not generate this effect; therefore, the results indicate that the treatment is specie-specific. On the other hand, the increase in SOD and CAT activity in both phytopathogens was identified after the application of homologous eDNA, so the inhibition phenomenon indicates to be related to the oxidative stress process. Furthermore, changes in genomic DNA methylation were observed, linking the phenomenon to modifications in gene expression. Likewise, the application of eDNA was established in the infection system of pepper seedlings with *Phytophthora capsici*, observing negative effects in the prevention of disease, therefore, dose-pathogen studies will be necessary to corroborate the result. From the above results, it is concluded that eDNA inhibits spore germination of the studied plant-pathogens at concentrations of 500 µg/mL in *in vitro* assays, and functions as DAMP by activating stress related responses.

Key words: eDNA, DAMP, oxidative stress, biological contro

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de pesticidas químicos para el combate de organismos fitopatógenos es necesario en la producción agrícola moderna; lo anterior se deriva de la creciente demanda de alimentos debido al aumento de la población mundial (Oerke, 2005; Zhang, 2018; Hedlund *et al.*, 2019; Reeves *et al.*, 2019). De hecho, aproximadamente un tercio de los productos agrícolas son producidos por medio del uso de pesticidas (Liu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011). Por ejemplo, los fungicidas son usados en el 80% de los cultivos de vegetales y de frutas en Estados Unidos (Zhang, 2018). Este uso se hace necesario ya que se estima que sin el control de plagas y enfermedades se podrían generar pérdidas agrícolas de hasta un 40% de rendimiento del cultivo (OECD-FAO; 2012). Sin embargo, el sobreuso de los pesticidas y la contaminación por su uso ha incrementado (Zhang y Liu, 2017). Entre los principales problemas encontrados por el sobreuso de pesticidas están: 1) la acumulación en alimentos, suelos y aguas (Fan, 2017); 2) afectaciones a organismos benéficos y fauna silvestre (Serrano y Galindo, 2007; Mancini *et al.*, 2019; Al Naggar y Boaer, 2019); 3) resistencia inducida de organismos fitopatógenos del suelo (Hideo, 2006; Hawkins *et al.*, 2019); y 4) efectos negativos sobre la calidad de vida de las poblaciones humanas (USDHHS, 1992; UNEP, 1995; Hedlund *et al.*, 2019).

El control de organismos fitopatógenos habitantes del suelo es difícil de lograr debido a su gran variedad y cantidad, lo que implica el desarrollo de nuevos pesticidas y a su vez genera un incremento en el costo de los mismos (Zavaleta, 1987). En México, en la agricultura contemporánea el combate de plagas y enfermedades llega a representar hasta un 20% o más del costo de producción, dependiendo de la severidad del daño causado por los organismos fitopatógenos (Serrano y Galindo, 2007). Actualmente, las metodologías para el desarrollo de pesticidas siguen un método convencional que se basa en el análisis al azar de compuestos bioactivos, y siguen presentando las limitantes de contaminación ambiental, daño a organismos no plaga e inducción de resistencia del organismo a ser controlado (Mazzoleni *et al.*, 2014; Serrano y Galindo, 2007). Las alternativas como el control biológico se

encuentran en auge, pero a pesar de los avances en este campo siguen manteniéndose por debajo, un 20-30% en países desarrollados, del uso de pesticidas global (Zhang, 2018).

Lo anterior permite observar que la agricultura demanda la disminución del uso de pesticidas químicos y la búsqueda de nuevas alternativas de control de enfermedades que sean amigables con el medio ambiente y no tóxicas; así como una eficiente producción agrícola de alimentos saludables (Montes, 1996, López *et al.*, 2005; Reeves *et al.*, 2019). Por tal motivo, a través de nuestro quehacer científico es posible la búsqueda de nuevas opciones que resulten en soluciones de una problemática de carácter nacional y mundial; mediante la generación de nuevos productos con actividad antimicrobiana que puedan ser usados en el control de fitopatógenos. De esta manera, el descubrimiento del efecto de inhibición de crecimiento observado sobre diferentes tipos de organismos (como bacterias, hongos, plantas, animales, protozoarios y algas) el cual es mediado por la aplicación de Ácido desoxirribonucleico extracelular (eDNA) homólogo (Mazzoleni *et al.*, 2015 a,b), sugiere una novedosa estrategia que puede ser aplicada como un método de control biológico. Esta actividad de inhibición ha sido atribuida al eDNA homólogo, es decir DNA que pertenece a la misma especie y que se encuentra de forma extracelular, al encontrar que esta molécula tiene un rol como Patrón Molecular Asociado a Daño (DAMP-Damage Associated Molecular Patter); por lo que puede ser “sensado” como un factor de estrés que indica un medio hostil no apto para la supervivencia (Veresoglou *et al.*, 2015; Duran y Heil, 2014; Barbero *et al.*, 2016; Vega-Muñoz *et al.*, 2018), lo cual puede generar un efecto fenotípico como la disminución del crecimiento. Surgiendo de esta manera las preguntas de investigación ¿Podrá el eDNA homólogo fungir como una molécula de inhibición del crecimiento/antimicrobiana de fitopatógenos?, y ¿Cuáles podrían ser las respuestas de estrés de los organismos asociadas a este fenómeno? Por otro lado, al tratarse de una molécula orgánica presente en la naturaleza, se vuelve un excelente candidato para mitigar los problemas de contaminación y toxicidad encontrados en los pesticidas actuales.

Con el presente trabajo se busca describir el efecto que tiene la aplicación del eDNA homólogo sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora spp.* los cuales afectan a muchos cultivos de interés comercial como jitomate,

chile, maíz, ajo, papa, arroz, entre otros (Fernández *et al.*, 2007). Así como encontrar una posible respuesta metabólica de estrés que pueda causar dicho efecto en los organismos fitopatógenos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs-Damage-Associated Molecular Patterns')

A través de la evolución todos los organismos han desarrollado mecanismos variados para enfrentar estrés de tipo biótico y abiótico, para así mantener su homeostasis. El éxito para poder contrarrestar dicho estrés se basa en la capacidad inmune de poder identificar los posibles peligros que rodean al organismo, seguido de la activación de cascadas de señalización que coordinan una respuesta específica para eliminar y reparar el daño (Choi y Klessig 2016; Hou *et al.*, 2019; Saijo y Loo 2020). Las plantas, por ejemplo, al ser atacadas por otros organismos perciben señales de peligro a través de dos vías principalmente. A través de la vía del “reconocimiento de lo propio” en donde participan moléculas conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs-por sus siglas en inglés ‘Damage-Associated Molecular Patterns’), y a través del “reconocimiento de lo no propio”, que serán moléculas exógenas conocidas como los patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Vega-Muñoz *et al.*, 2018).

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

activación de quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Heil y Land, 2014; Duran y Heil, 2016).

Se considera una señal de peligro a fragmentos de DNA mitocondrial o nuclear que se encuentran de forma extracelular o citosólica debido a que es indicativo de diversos tipos de disfunción celular, como pérdida de la integridad mitocondrial, nuclear o de la célula entera (O'Neill, 2013). De la misma manera el ATP extracelular (eATP), DNA extracelular (eDNA) o DNA de doble cadena (dsDNA) citosólicos del propio anfitrión actúan como DAMP (Duran y Heil, 2016, Yatim *et al.*, 2017). El mecanismo por el cual se genera la fragmentación del DNA que luego es liberado como DAMPs se conoce como piroptosis (Shrivastava *et al.*, 2016, Kolb *et al.*, 2017).

Se ha reportado que, dadas sus características, los fragmentos de ácidos nucleicos pueden representar DAMPs o PAMPs (Deguine, 2017; Yakushiji *et al.*, 2009), y pueden desencadenar inmunidad en diferentes especies. De esta manera se vuelve de particular interés el estudio del dsDNA, y particularmente del eDNA, como modulador de la inmunidad (Heil y Vega, 2018).

## **2.2 DAMPs de animales**

Los DAMPs de animales fueron los primeros en ser descritos y los que más se han estudiado. Entre algunos DAMP de animales se encuentran: las purinas, pirimidinas, ADN, lipoproteínas oxidadas de baja densidad y una gran variedad de proteínas. Algunos DAMPs forman complejos con otras moléculas, conocidas como interactores, para potenciar o facilitar la señalización.

Uno de los DAMP de animales mejor caracterizado es el HMGB1 (High Mobility Group Box 1) el cual es una proteína asociada a cromatina muy abundante y presente en todas las células animales (Lotze y Tracey, 2005). Al estar en el núcleo, HMGB1 se une al ADN para facilitar el proceso de condensación; una vez generado algún daño, este funciona como DAMP con actividades inductoras de citosinas o quimio-atrayentes (Andersson y Tracey, 2011).

### 2.3 DAMPs de plantas

A diferencia de los DAMPs animales, para plantas solo han sido reconocidos algunos hasta la fecha (figura 1). Algunos DAMPs vegetales son: carbohidratos como la sacarosa extracelular (Duran-Flores and Heil 2016; Cooksey et al. 1983), los nucleótidos como el ATP extracelular (eATP) (Tanaka et al. 2014; Chen et al. 2017), el DNA extracelular (eDNA) (Duran-Flores and Heil, 2016; Vega- Muñoz et al. 2018), proteínas y péptidos pequeños (Choi et al. 2016; Souza et al. 2017). También, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) pueden actuar como DAMP debido a que estos son liberados en segundos al ocurrir un daño y son capaces de activar la respuesta inmune en partes distales de una planta (Quintana-Rodriguez et al. 2018).

La clase más grande es la de polipéptidos y péptidos producidos a partir de proteínas precursoras más grandes. Estos incluyen tres familias de polipéptidos que fueron descubiertos por Ryan y colaboradores durante sus estudios para identificar la sistemina (Pearce et al., 2001): 1) polipéptido de 18 aminoácidos aislado a partir de plántulas de jitomate, 2) polipéptidos de 18 aminoácidos ricos en hidroxiprolina y 3) polipéptidos de 23 aminoácidos, encontrados en *Arabidopsis*.

Otra clase de DAMPs encontrados en plantas son aquellos derivados de la matriz extracelular. Uno de ellos es el homogalacturonano es un polisacárido peptídico que al ser hidrolizado genera oligogalacturonoides los cuales que promueven la activación de MAPK, producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), aumento de calcio intracelular y activación de genes de defensa. Otro DAMP es el ATP extracelular (eATP), a pesar de que ya se tenía evidencia de su función como una molécula de señalización se descontinuo su estudio debido a que el ATP es ubicuo en la naturaleza con un rol central como molécula de energía. Fue hasta la identificación de receptores de ATP en células animales y vegetales cuando su función como molécula de señalización tomo importancia. Se ha demostrado que el eATP en plantas actúa como DAMP ya que induce respuestas inmunes innatas como la activación de MAPK, aumento de calcio intracelular, inducción de genes de defensa asociados a la biosíntesis de ácido jasmónico y etileno (Tanaka et al., 2014). De la misma forma la aplicación del propio ADN exógeno (eADN) activa la inmunidad (Duran-Flores y

Heil, 2018). El ADN es la fuente de información genética, pero puede salir de la célula al espacio extracelular principalmente durante la muerte celular, ya sea apoptosis o necrosis (Pisetsky, 2012). Las moléculas de ADN nuclear o mitocondrial fragmentado que aparecen en el compartimento extracelular o citosólico indican disfunción o daño celular, incluida la pérdida de la integridad de los núcleos, de las mitocondrias o de las células completas (O'Neill, 2013). Por lo cual el eADN homólogo actúa como DAMP dando una señal de peligro que denota daño o lesión al organismo que a su vez desencadena la respuesta inmune (Duran-Flores y Heil, 2016). En general los fragmentos de ácidos nucleicos pueden representar DAMP o PAMP y activar la inmunidad en el organismo (Kawasaki et al., 2011).

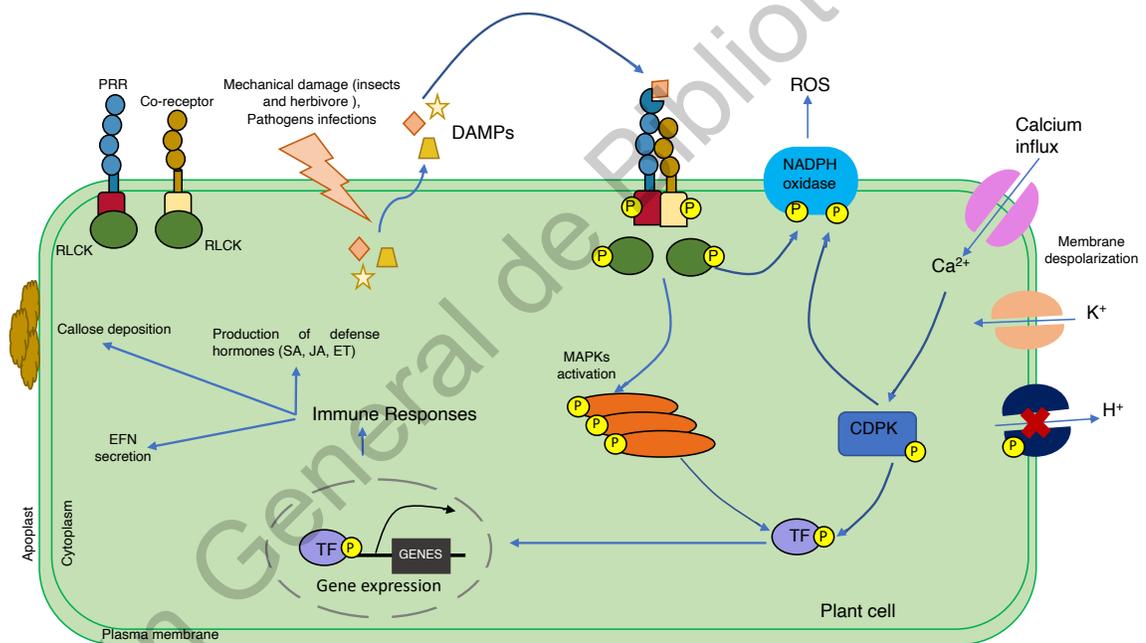


Figura 1. Percepción y respuestas comunes activadas por DAMPs en plantas. El reconocimiento de DAMPs por receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors-PRRs), se basa en su asociación con co-receptorres y quinasas citoplasmáticas parecidas a receptor (Receptor-Like Cytoplasmic Kinases-RLCK); donde la fosforilación de estos complejos inicia la transducción de señales río abajo. Estas señales son transmitidas mediante posteriores fosforilaciones de quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y quinasas dependientes de calcio (CDPKs). Algunas respuestas tempranas activadas por DAMPs son la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), señalización de calcio, despolarización de membrana y la fosforilación de  $H^+$ -ATPasas residentes en membrana y factores de transcripción (TF), lo que conlleva a la integración de una respuesta de defensa robusta. Esta respuesta puede incluir la deposición de calosa, la secreción de nectar

extrafloral (EFN) y la producción de hormonas como ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ácido jasmónico (JA). Fuente: Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2020.

## 2.4 eDNA como DAMP

El eDNA ha sido detectado en una gran variedad de ambientes naturales que van desde los sedimentos, suelos, biofilms hasta ecosistemas marinos y de agua dulce; y se ha demostrado que este puede derivar de bacterias, arqueas, eucariontes y virus. Su importancia no solo deriva dada su gran distribución, sino también por las funciones que se le han atribuido (Duran y Heil, 2015). El eDNA representa el vector de la transferencia génica horizontal (Thomas y Nielsen, 2005) y contribuye a la formación estructural de los biofilms y de las trampas extracelulares de neutrófilos (células del sistema inmune de mamíferos que deshabilitan y destruyen bacterias) (Brinkmann *et al.*, 2004). En plantas, se ha encontrado que el eDNA es requerido en las puntas de las raíces para mediar la resistencia al ataque de patógenos (Wen *et al.*, 2009)), y puede servir también como una fuente de nutrientes (principalmente como fuente de fósforo) (Paungfoo *et al.*, 2010).

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

Trabajo previo de Duran y Heil, (2014) provee información experimental sugiriendo la acción del eDNA homólogo como una señal de estrés, es decir, un DAMP (figura 2). Se

observo que la aplicación de homogenizados de hojas conespecíficos a hojas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) inducen el desarrollo local de especies reactivas del oxígeno (ROS) y otras respuestas relacionadas a la resistencia, mientras que homogenizados de otras especies de plantas no activaron ninguna respuesta estadísticamente significativa sobre el frijol (Duran y Heil, 2014). Por otro lado, estudios posteriores indican que el DNA de plantas o insectos induce la despolarización del plasma de membrana e incrementa los flujos intracelulares de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Barbero *et al.*, 2016), lo cual también es concebido como una respuesta de estrés. Además, se ha observado que el eDNA actúa como DAMP e induce cambios en la metilación del DNA y respuestas relacionadas a la defensa en lechuga (Vega *et al.*, 2018). Los estudios anteriores apuntan que el DNA extracelular, obtenido mediante técnicas de extracción de DNA genómico total y su posterior fragmentación por sonicación (Barbero *et al.*, 2016; Vega *et al.*, 2018), actúa como un patrón molecular asociado a daño, y tiene la capacidad de limitar el crecimiento del anfitrión al indicar daño o peligro para la supervivencia.

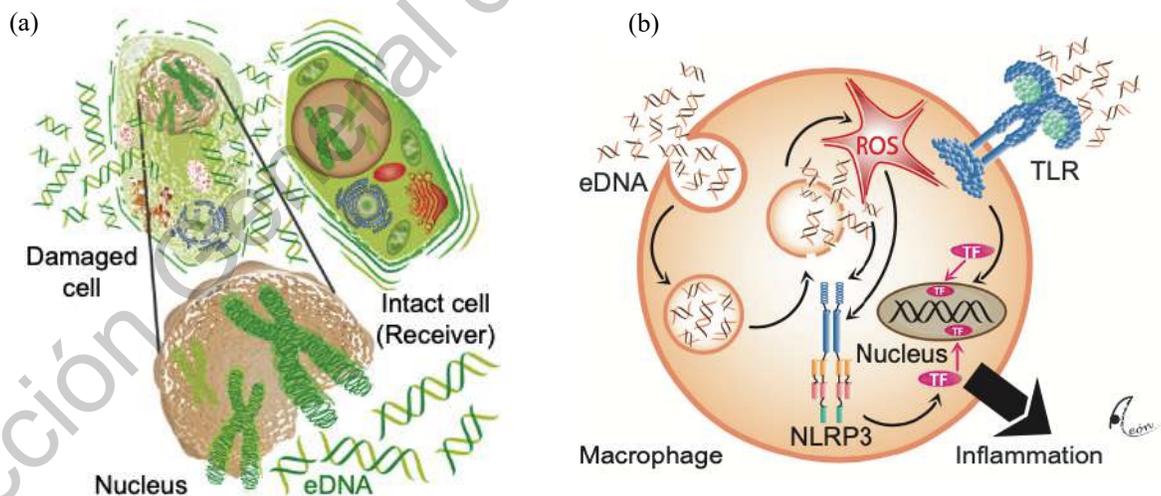


Figura 2. Reconocimiento del eDNA propio u homólogo. La desintegración de células debido a daños mecánicos o infecciones conlleva la liberación de moléculas endógenas hacia el medio extracelular, entre ellas el DNA. A) El DNA deslocalizado funge como un patrón molecular asociado a daño (DAMP) en plantas y puede ser reconocido por células vecinas para la activación de la respuesta de defensa ante el daño; el mecanismo de reconocimiento aún no es conocido en plantas. B) En mamíferos el reconocimiento de DAMPS esta ampliamente estudiado y se lleva a través de dos vías: la primera mediante su reconocimiento por receptores parecidos a Toll (Toll-like receptors TLRs) lo que lleva a la liberación de factores de transcripción

que inducen respuestas pro-inflamatorias; y la segunda a través de la vía de fagocitosis, la cual puede activar el inflamasoma NLRP3 (NOD-like receptor family protein 3) directa o indirectamente (a través de la vía de ROS) para la inducción de respuestas pro-inflamatorias. Fuente: elementos tomados y re-arreglados de las Fig. 1 y 2 de Duran-Flores y Heil, 2015.

## **2.5 Microorganismos fitopatógenos de importancia agrícola**

Los microorganismos fitopatógenos son aquellos que causan enfermedades en las plantas a través de disturbios en el metabolismo celular, al secretar enzimas líticas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias. Constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su gran número, aproximadamente de 50,000 especies (Zhang *et al.*, 2011), y a su enorme capacidad de reproducción, lo que con frecuencia dificulta su control (Juárez, 2010); estos incluyen nemátodos, bacterias, hongos, protozoarios y virus (Oerke, 2005).

Los fitopatógenos son causantes de graves pérdidas económicas. A nivel mundial se consideran el grupo de mayor relevancia en cuando a su frecuencia y daño que pueden causar. El daño que ocasionan no solo se refiere a las pérdidas económicas, sino también a las pérdidas en la producción biológica (Agriós, 2005).

Se sabe que un fitopatógeno puede infectar a uno o más tipos de plantas, aunque éstas sean de diferentes familias. La mayoría de los fitopatógenos pasan gran parte de su ciclo de vida en la planta que les sirve de huésped, como parásitos; otros residen en el suelo, en los desechos vegetales que se encuentran ahí, como saprófitos.

Los efectos que producen algunos fitopatógenos, como los hongos, en las plantas pueden ser de tipo local, cuando afectan una porción pequeña del tejido, o general, si causan un daño completo a toda la planta, lo cual depende del tipo de planta que parasiten. Sin embargo, en una misma planta pueden producir un efecto local y luego uno generalizado; el daño producido por los hongos es, principalmente, una muerte del tejido (necrosis) que infectan. También pueden producir atrofia de la planta completa o de algunas de sus partes y, en otros casos, pueden causar un crecimiento excesivo (hipertrofia). Además, los hongos que afectan la raíz, o bien el sistema vascular, tienden a marchitar a la planta (Juárez, 2010; García, 2004). Las manchas foliares, el tizón y la putrefacción de la raíz son ejemplos de signos necróticos, mientras que los signos asociados con la hipertrofia de partes de las plantas pueden ser agallas

de las raíces, verrugas o tumores. Todos los efectos mencionados pueden causar atrofia o disminución de la vitalidad de las plantas lo que lleva a la muerte de la planta (García, 2004). A continuación, se habla de dos fitopatógenos de gran importancia debido a que los problemas fitosanitarios que generan son de importancia internacional (Erwin, 1996; Dean *et al.*, 2012).

En la literatura muy poco es conocido acerca de las posibles respuestas de estrés metabólicas que pueden generar los fitopatógenos a partir de algún tratamiento pesticida. Es decir, se le presta poca importancia al entendimiento de como es su actividad o respuesta en contacto con los pesticidas químicos que se aplican, ya que en primera instancia lo único que importa es matarlos o detener su crecimiento. Sin embargo, es interesante conocer como es dicha respuesta para comprender como se puede atacar alguna parte de su ciclo reproductivo que sea más eficiente en su atenuación. Es bien conocido que todas las células, ya sean eucariotas o procariontes, contienen sistemas que les ayudan a contrarrestar el estrés inducido por la presencia de oxidantes, limitación nutricional, y el daño causado por agentes físicos y químicos (Choi y Klessig 2016). Las especies reactivas del oxígeno (ROS) como el superóxido ( $O^{\bullet-}$ ), radicales hidroxilos ( $OH^{\bullet}$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) son generados por procesos de respiración celular y otras vías metabólicas, así como por condiciones de estrés oxidativo (Heller y Tudzynski, 2011); en particular, el  $H_2O_2$  funge como segundo mensajero para la transducción de señales (Apel y Hirt, 2004). Por lo tanto, el balance de desecho y producción de ROS es delicado y altamente regulado.

Los sistemas de detoxificación mediados por las enzimas superóxido dismutasas (SOD) y catalasa (CAT), las cuales se encargan de la eliminación de iones superóxido y  $H_2O_2$ , respectivamente, son uno de los métodos comunes utilizados para contrarrestar la acumulación de ROS a consecuencia del estrés oxidativo (Heller y Tudzynski, 2011; Lee *et al.*, 2018). Además, ha sido observado que las enzimas SOD y CAT tienen un rol en la diferenciación celular de *Fusarium oxysporum* (Kono *et al.*, 1995).

### 2.5.1 *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* Schlecht es un hongo patógeno ubicuo presente en el suelo que causa marchitamiento vascular en una gran variedad de plantas y es considerado uno de los 10 hongos fitopatógenos de mayor importancia económica y científica (Dean *et al.*, 2012). Los síntomas característicos de la enfermedad incluyen pardeamiento vascular, epinastia foliar, retraso del crecimiento, marchitamiento progresivo, defoliación y muerte de la planta (Agrios, 2005).

El grupo de especies de *Fusarium oxysporum* comprende diferentes formas especiales (f. sp.) las cuales colectivamente infectan a más de 100 huéspedes diferentes, provocando pérdidas severas en los cultivos como melón, jitomate, algodón, plátano, entre otros (Michielse y Rep, 2009).

Este hongo emplea diferentes estrategias de infección en plantas y animales. Otros estudios están abordando la presencia de mecanismos de virulencia comunes que son requeridos en ambos tipos de huéspedes (Dean *et al.*, 2012).

Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa dextrosa agar (PDA) a 25 °C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos (figura 3-4): 1) una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable que va desde blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias (Booth, 1970); y 2) una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias. Este hongo produce tres clases de esporas: Microconidias, macroconidias y clamidosporas (Garcés *et al.*, 2001).

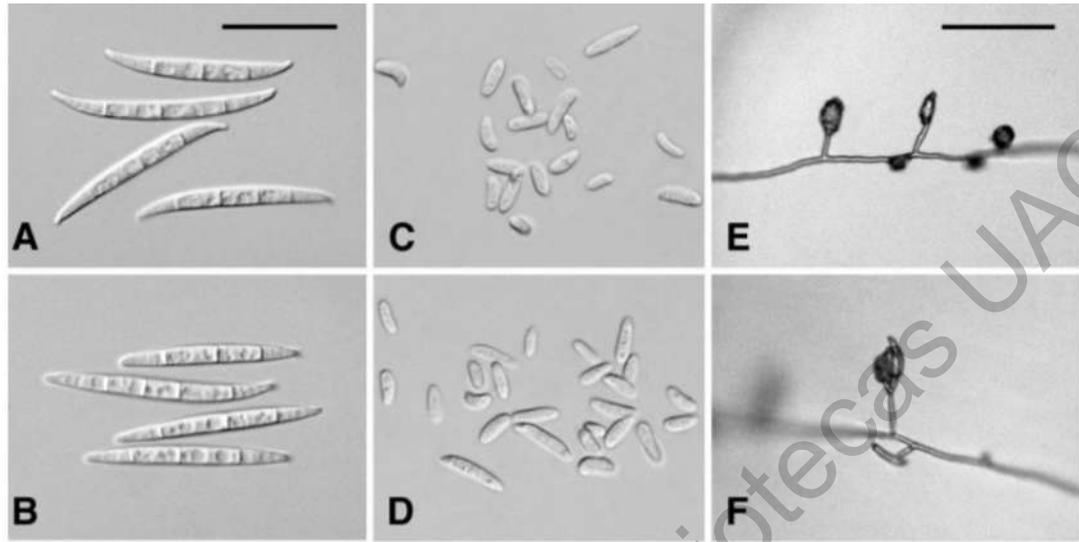


Figura 3. Morfología de *Fusarium oxysporum*. A-B: Macroconidios; C-D: Microconidios; E-F: Microconidia *in situ*, A-D, escala=25  $\mu\text{m}$ ; E-F, escala=50  $\mu\text{m}$ . Fuente: Leslie y Summerell, 2006.

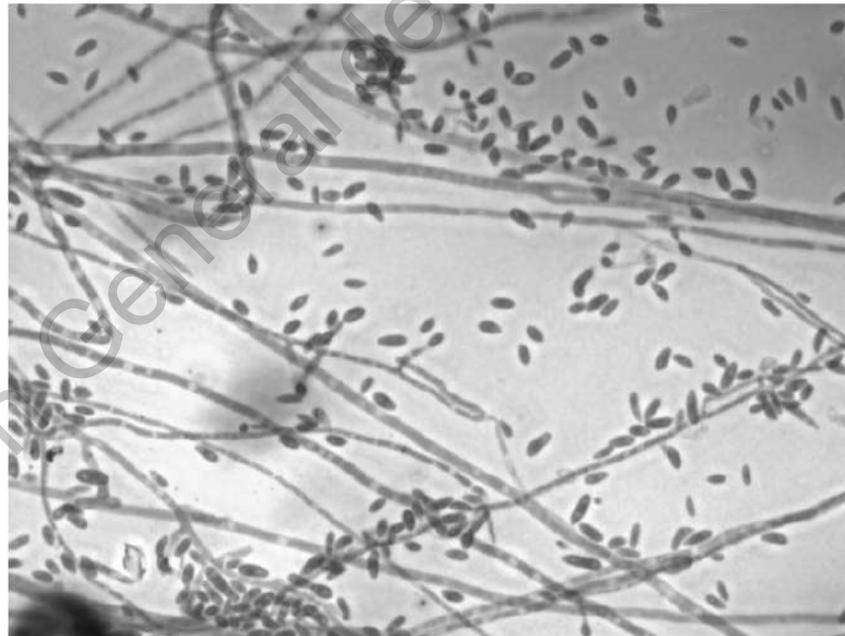


Figura 4. Apariencia microscópica de *Fusarium oxysporum*. Fuente: Tupaki y Kindo, 2018.

### 2.5.2 *Phytophthora spp.*

El género *Phytophthora* (del griego *Phyton*: planta; *phthora*: destructor) fue descrito por primera vez por de Bary en 1876 con *P. infestans* de Bary como especie tipo, pertenece al filo pseudofungi de la clase de los Oomycetes. Las especies de este género son patógenos hemibiotróficos de gran importancia en los cultivos agrícolas y forestales ya que causan grandes pérdidas económicas en un amplio rango de especies vegetales en el mundo (Erwin y Ribeiro, 1996; Roy y Grünwald, 2014). Las enfermedades causadas por los organismos de este género son podredumbre del cuello de la raíz y parte basal del tallo, la gomosis y el aguado o podredumbre marrón de los frutos, la pudrición de las raíces, cáncer del tronco y pudrición de yemas (Erwin y Ribeiro, 1996).

Comúnmente, *Phytophthora spp.* es referido como un organismo fúngico, pero está clasificado entre los protistas dentro del grupo de oomicetos, siendo un claro ejemplo de la evolución convergente. Los organismos del género *Phytophthora* son muy parecidos morfológicamente a los hongos verdaderos, aunque su evolución biológica es diferente (Erwin, 1983).

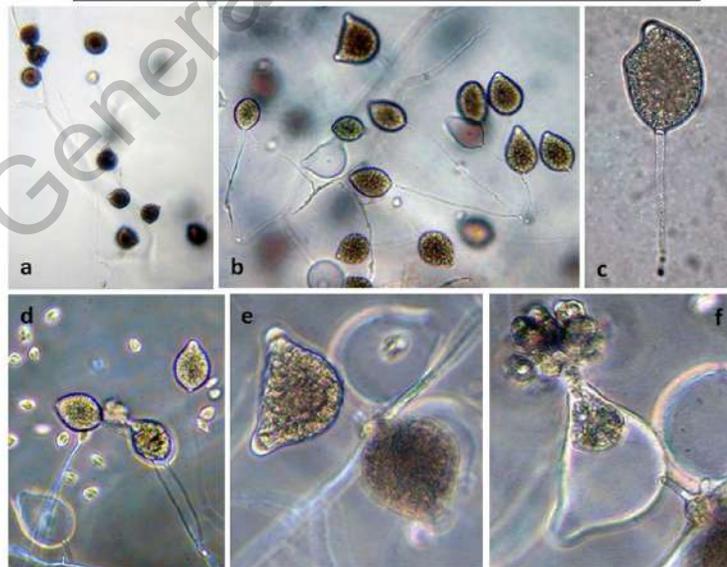


Figura 5. Morfología microscópica de *Phytophthora capsici*. A) Esporangio originado a partir de esporangióforos simples y no ramificados. B) Esporangio originado a partir esporangioforos irregulares y no ramificados. C) Esporangio. D-F) Zoosporas. Fuente: Abad et al., 2019

Entre las especies de este oomiceto que ocasionan mayores daños se encuentran: *Phytophthora ramorum*, agente causal de la enfermedad denominada muerte repentina del roble, que afecta también a otros árboles y arbustos; *P. palmivora* causante de la pudrición de brotes, yemas y frutos en palmas; *P. capsici* patógeno que causa marchitez y pudrición de la corona y raíz en Chile, cucurbitáceas y otros cultivos comerciales (Uribe *et al.*, 2014; Fernández *et al.*, 2007); *P. infestans* causante del tizón tardío de la papa, el tomate y otras plantas de la familia Solanaceae; y *P. cinnamomi* que infecta a más de 3 000 especies de plantas en el mundo (Soto *et al.*, 2017). La pudrición radicular es una de las enfermedades más importantes del cultivo de aguacate, cuyo agente causal es *Phytophthora cinnamomi* (Toapanta *et al.*, 2017).

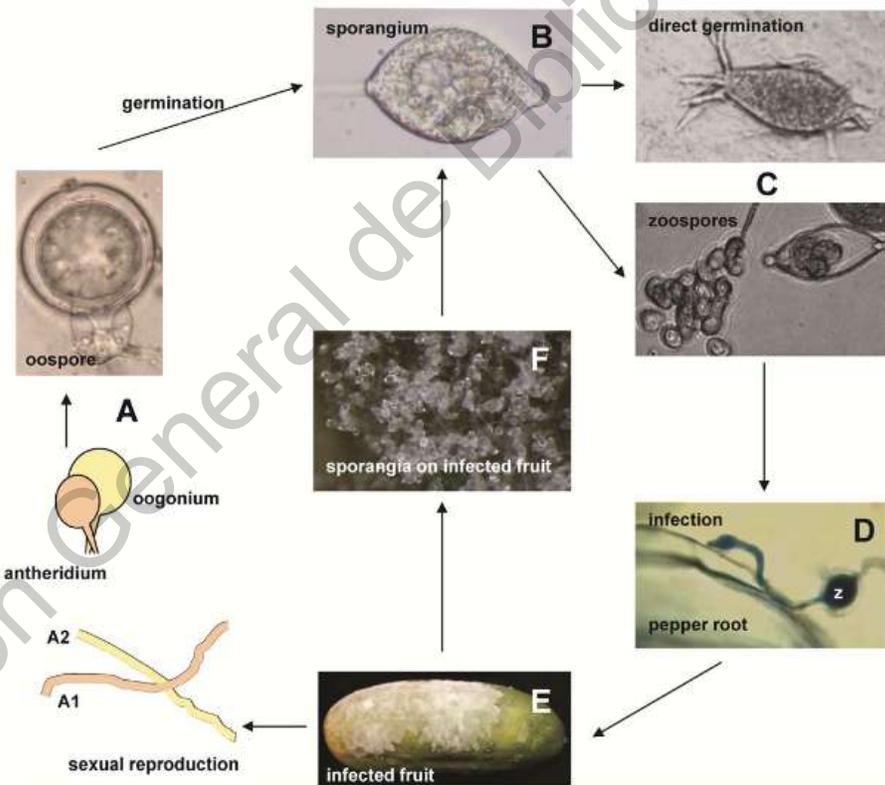


Figura 6. Diferencias morfológicas según el ciclo de enfermedad de *Phytophthora capsici*. A) Al estar presentes ambas formas de sexuales (oogonia y anteridia) se da la formación de las oosporas, las cuales le permiten al organismo pasar inviernos y sobrevivir por muchos años en suelo. B) Las oosporas inactivas germinan para producir esporangios con forma de limón; cada esporangio puede germinar directamente en presencia de humedad o C) indirectamente a través de la formación de 20-40 zoosporas biflageladas móviles; D) las cuales posteriormente pueden infectar al huésped por medio de la penetración de su raíz. Los esporangios pueden

dispersarse por viendo por la via de irrigación de planta a planta, mientras que las zoosporas pueden nadar a través del agua del suelo hacia las raíces de otras. E-F) Una vez que el patógeno invade al huésped se forman mas copias de esporangios, los cuales pueden infectar nuevamente a otras plantas o a partes diferentes de la misma planta huésped en una misma temporada de cultivo. Fuente: Granke et al., 2012.

Las especies del género *Phytophthora* se caracterizan por la producción de oosporas, como forma de reproducción sexual, las cuales son estructuras de pared celular gruesa con la capacidad de resistir durante años (figura 5-6). Las formas de reproducción asexual comprenden; 1) los esporangios, los cuales pueden ser dispersados fácilmente o permanecer en las hifas, 2) zoosporas, espora con dos flagelos que le dan movilidad y 3) clamidosporas, son generalmente esféricas, pigmentadas y de pared celular gruesa (Erwin, 1983).

La mayoría de las especies de *Phytophthora* son favorecidas por alta humedad, temperaturas entre 15 y 35 °C, climas húmedos con lluvias abundantes y sustrato o suelo pobres en nutrientes (Erwin y Ribeiro, 1996; Kong et al., 2009). Bajo condiciones de laboratorio es fácilmente cultivable en agar PDA o medio PDB (Ezziyyani *et al.*, 2004)

## **2.6 Métodos de control de fitopatógenos**

Existen diferentes métodos que pueden ser usados para el control de organismos fitopatógenos, dentro de los cuales se pueden mencionar la aplicación de pesticidas químicos, aplicación de aceites esenciales, uso de agentes de control biológico y tratamientos térmicos (Juárez *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2007). Los pesticidas químicos, son el método de control más usado en todo el mundo (Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, existe una gran preocupación debido a los problemas toxicológicos y medioambientales que provocan, además de la insuficiente especificidad y la resistencia inducida sobre los patógenos debido al uso excesivo de los mismos (Hideo, 2006; Mazzoleni *et al.*, 2014). El desarrollo de agentes de control biológico, también conocidos como biopesticidas, se encuentran en un rápido aumento y se espera que estos sean los pesticidas predominantes en el futuro (Zhang, 2018). A pesar de los grandes avances que se tienen en cuanto al control biológico, este tiene ciertas desventajas como el tiempo de estudio para escoger y probar el agente de control, lo que

muchas veces se traduce en incremento de costos; y su mecanismo de acción es lento, por lo tanto, es lenta la observación evidente el efecto (Csanyi, 2018).

### **2.6.1 Fungicidas químicos**

Los fungicidas son productos químicos utilizados para eliminar o evitar el desarrollo de los hongos que atacan a los cultivos, (Hamlen y Power, 1998). En la actualidad existen más de 113 ingredientes activos registrados como fungicidas comerciales en todo el mundo. Sin embargo, hay una serie de problemas contra el uso eficaz de estos productos químicos en las zonas donde los hongos han desarrollado resistencia (Bajpai y Kang, 2010). Por otro lado, existe una preocupación internacional por erradicar el uso de fungicidas químicos a nivel mundial.

El primer fumigante empleado fue el dibromuro de etileno, en 1984, el cual fue reconocido como carcinogénico por lo cual su uso fue prohibido (USDHHS,1992). Posteriormente, se generalizó el uso de bromuro de metilo como fumigante, por ejemplo, se usó extensamente sobre en plantas madre para el cultivo de fresas contra *Botrytis cinérea*. Sin embargo, se identificó que este compuesto provoca un alto deterioro de la capa de ozono (UNEP, 1995). A partir de estas observaciones, la Agencia de protección al Ambiente (EPA) de los Estados Unidos de América comenzó a establecer restricciones sobre el uso de fumigantes químicos (USEPA, 2001). Los tratamientos deben ser técnicamente efectivos, no dañar el medio ambiente y ser económicamente factibles (Hansen y Johnson, 2007).

### **2.6.2 Aplicación de aceites esenciales**

Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas prácticamente en todos los vegetales. En la actualidad los productos naturales tienen una alta aceptación y reemplazan cada vez más a los productos sintéticos. Como respuesta a esta tendencia, se ha producido un creciente interés en la investigación de la posible utilización de aceites esenciales y los extractos de plantas como fungicidas naturales, que sean relativamente menos perjudiciales para el medio ambiente (Bajpai & Kang, 2010). Por

ejemplo, se tienen reportes de la alta capacidad antifúngica de los aceites esenciales de canela y orégano sobre *Aspergillus flavus* (García *et al.*, 2006).

### **2.6.3 Control biológico**

Esta es una alternativa de manejo de las enfermedades causadas por organismos fitopatógenos habitantes de la rizósfera del suelo (Zavaleta, 1994). Entre los microorganismos más importantes usados como agentes de control biológico se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, los hongos micorrícicos arbusculares y algunas especies del género *Trichoderma* (Bloemberg y Lugtenberg, 2001). Los principales mecanismos responsables del control biológico de hongos y bacterias patógenas son: 1) la competencia por los nutrimentos o espacios en la rizósfera de las plantas; 2) la inducción de resistencia sistémica inducida (RSI); y 3) la producción de metabolitos antimicrobianos (Kloepper *et al.*, 2004).

En México son escasas las investigaciones que se han realizado para el manejo biológico de fitopatógenos habitantes del suelo mediante el uso de microorganismos antagonistas. La mayoría se han realizado en laboratorio o invernadero, y en menor número en campo (Fernández *et al.*, 2007).

Actualmente, se pueden distinguir algunos productos de control biológico con acción biofungicida dentro del mercado. Podemos clasificar los productos comercialmente disponibles en tres: a) biofungicidas a base de hongos, b) biofungicidas a base de bacterias y c) mezclas de los anteriores. A continuación, se describe cada uno de ellos:

#### **a) Biofungicidas a base de hongos:**

Estos productos están basados en la acción fungicida que algunos hongos presentan, ya sea por la competencia de nutrientes en el suelo y la secreción de metabolitos volátiles y solubles que degradan la pared celular de otros hongos. Algunos productos disponibles de este tipo son TrikoStar®, NatuControl®, PHC Rootmate®, PHC T-22®, TK Root®, TrichoBiol®, Tricho-Sin WP®.

b) Biofungicidas a base de bacterias:

Los fungicidas de este tipo contienen bacterias con la capacidad de secretar metabolitos solubles que degradan la pared celular fúngica y, además, se ha demostrado que inducen la respuesta de defensa de las plantas, teniendo una doble acción. Ejemplos de estos son Bacilia®, Baktillis®, Best Ultra F®.

c) Mezclas de los anteriores:

Los productos que vienen en mezclas de diferentes microorganismos están diseñados con la finalidad de dar una mejor protección al cultivo por medio de la combinación de diferentes modos de acción de estos. Algunos productos de este tipo son Bactiva®, Best Ultra S®, PHC Biopak-F®.

Existe una lista larga de patentes relacionadas con el control biológico de fitopatógenos. Las patentes ES 2 293 085 T3 y ES 2 294 348 T3 corresponden a invenciones en las cuales describen formulaciones líquidas y sólidas eficaces contra enfermedades por fitopatógenos basadas en los hongos filamentosos *Trichoderma spp.* y *Beauveria bassiana*, respectivamente. La patente US5389609 describe el método para la preparación de formulaciones antifúngicas basadas en proteínas derivadas de plantas que causan la inhibición de hongos, además, provee las secuencias específicas de dichas proteínas, así como el método de obtención y purificación de su forma activa. Otras patentes, como WO 2012/140304 A2 y WO 1996/018722 A2 hablan sobre los métodos para mejorar o aprovechar cepas virulentas de especies de *Trichoderma spp.* con la finalidad de usarlas como base de formulaciones antifúngicas; mientras que la patente WO 1997/16974 comprende una formulación líquida basada en la sinergia creada por cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* para la prevención de enfermedades fúngicas, suplementada con fuentes de carbono, sales minerales y trazas de elementos con nutrientes orgánicos e inorgánicos. Patentes como WO 2014/086758A3, describen composiciones que involucran cepas de *Paecilomyces lilacinus* y *Coniothyrium minitons*, o mutantes de ellos, para generar no solo un efecto fungicida, sino también nematocida e insecticida. Por otro lado, hay patentes muy especializadas que se desarrollaron para la disminución de un problema en particular, por ejemplo, la patente WO 2016/165037 A1 fue desarrollada para atacar nematodos; mientras

que la patente WO 2009/031874 A1 se basa en la cepa de *Bacillus subtilis* NRRL B-50055 que está destinada para el tratamiento de diferentes hongos fitopatógenos.

En general, las patentes antes mencionadas utilizan microorganismos benéficos del suelo para atacar las enfermedades por fitopatógenos, o bien proteínas con actividad anti fúngica. La relación entre estas patentes es la necesidad de utilizar un método convencional de búsqueda de dichos organismos o biomoléculas que deben presentar ciertas características para poder ser candidatos, lo cual requiere de prolongados tiempos de investigación y uso de grandes cantidades de recursos.

La patente con número de aplicación WO 2014/020624 A9 propuesta por Mazzoleni et al., 2014, es la primera patente en describir el uso del DNA exógeno, que después de ser extraído y fragmentado al azar, como una posible molécula para inhibir el desarrollo de diferentes tipos de organismos, siendo este tipo de inhibición especie-específico. Sin embargo, el autor de dicha patente hace una mención general de los organismos que podrían ser inhibidos y no genera evidencia de dosis de inhibición de los fitopatógenos tratados en el presente trabajo.

### **3. HIPÓTESIS**

La exposición de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora spp.* a fragmentos de eDNA homólogo disminuye su desarrollo, debido al efecto de señalización mediado por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), comparado con un modelo en el cual no se aplica dicho tratamiento y un modelo de eDNA heterólogo, *in vitro*; las variables asociadas a este fenómeno son germinación de spora, actividad antioxidante SOD, actividad antioxidante CAT y metilación del DNA.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Determinar el efecto que la exposición a fragmentos de eDNA homólogo tiene en el desarrollo de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora spp.* *in vitro*, así como de las variables

asociadas de germinación de espora, actividad antioxidante SOD, actividad antioxidante CAT y metilación del DNA.

#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Diseñar los ensayos *in vitro* para medir las variables asociadas de germinación de espora, dirigidos a la disminución de crecimiento de los fitopatógenos.
2. Diseñar los ensayos *in vitro* para medir actividad antioxidante SOD y actividad antioxidante CAT; dirigidos a la evaluación de la respuesta de estrés por la acción del eDNA como DAMP.
3. Evaluar los niveles de metilación del DNA por la aplicación de eDNA, en *Fusarium oxysporum*.
4. Evaluar el efecto directo que la exposición de eDNA homólogo fragmentado tiene sobre *Phytophthora capsici*, utilizando un modelo de plántula de chile, dirigido a la prevención de enfermedad causada por el fitopatógeno en cuestión.

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1 Preparación de cepas de hongos fitopatógenos**

Aislados de los fitopatógenos fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Bajío, las cuales fueron identificadas como FOX1 para *Fusarium oxysporum*; y PCAP-A308 para *Phytophthora capsici*. Las cepas de los fitopatógenos fueron mantenidas en cajas petri con agar PDA (agar de papa dextrosa, Difco) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , realizando subcultivos, de cada uno, una vez al mes.

Con la finalidad de obtener grandes cantidades de material biológico, cultivos puros de los fitopatógenos fueron crecidos en medio PDB (caldo papa dextrosa, Difco) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , utilizando la metodología descrita por Ezziyyani et al., (2004). Se utilizarán matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de medio PDB (caldo de patata dextrosa, Difco), previamente esterilizados en autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 15 psi, por 15 min. A cada matraz se añadirá un disco de 5 mm de diámetro de cultivo puro del fitopatógeno, cubriendo el matraz con aluminio para evitar la exposición a la luz. Durante 15 días se mantendrán con una agitación orbital constante de 120 rpm a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; lo anterior para cada fitopatógeno. El micelio total será recuperado después de 15 días por filtración en vacío y mantenido a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

## **5.2 Obtención de eDNA homólogo fragmentado**

Para llevar a cabo la extracción de DNA fueron necesarias 15 extracciones de 5 gramos de material biológico congelado de cada especie, y su posterior molienda en mortero con nitrógeno líquido. Las extracciones fueron llevadas a cabo por el método de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Lee et al., (1988), realizando el escalamiento para poder procesar una muestra mas grande. Se llenaron tubos de 50 mL con 5 gr del micelio previamente triturado en nitrógeno líquido, posteriormente se añadieron 37.5 mL de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoetanol), agitando hasta homogenizar la mezcla y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por una hora. Luego, se añadieron 35 mL de cloroformo:fenol (1:1) y se centrifugó a  $12,000\times g$  por 10 min hasta conseguir una fase acuosa clara. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo, y se añadieron 35 mL de SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1) y se centrifugó por 5 min. Después, se recuperó la fase acuosa nuevamente en un nuevo tubo y se añadió 1 mL de NaOAc 3 M, mezclando gentilmente. Posteriormente, se procedió a centrifugar los tubos por 30 segundos, desechar el sobrenadante, y añadir 15  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris- pH 8.0, 1 mM EDTA) e incubar a  $65\text{ }^{\circ}$  por 10 min. Luego, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de NaOAc 3 M y se mezcló gentilmente. Una vez mezclados se centrifugaron los tubos por 30 segundos, desechando el sobrenadante, luego se procedió a lavar con un volumen de etanol 70% frío por 1 min y se dejaron secar. Por último,

se resuspendió el DNA con 2.5 mL de agua inyectable de PiSA® 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 µL 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); los gels fueron corridos con buffer TAE 1X, a 80V por 30 min. Todos los reactivos antes mencionados fueron manipulados bajo las instrucciones y recomendaciones de su proveedor y en base a las buenas prácticas de laboratorio.

Para obtener fragmentos de entre 700 y 50 pb, el DNA extraído será 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 10 min (Vega et al., 2018).

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

Para obtener el DNA heterólogo usado en este trabajo se colectaron hojas de lechuga romana (*Lactuca sativa*) variedad Climax, a partir de un cultivo previamente instalado en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo condiciones de invernadero. Se procedió a realizar la misma metodología mencionada anteriormente para la extracción de DNA usando el método de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Lee et al., (1988). De igual manera, la fragmentación se llevo a cabo por sonicación, usando el sonotrodo Hielscher UP200Ht, descrito anteriormente.

### **5.4 Establecimiento de los ensayos para la exposición de los fitopatógenos a eDNA fragmentado *in vitro*.**

Para llevar a cabo la exposición del eDNA homólogo fragmentado y eDNA heterólogo fragmentado se proponen los siguientes diseños experimentales, que tienen como objetivo evaluar el efecto sobre las esporas y sobre la forma vegetativa (micelio) de los fitopatógenos.

#### 5.4.1 Evaluación del eDNA sobre la germinación de esporas de los fitopatógenos

Para evaluar la germinación de espora se dispuso previamente de un cultivo puro de cada fitopatógeno en PDA totalmente colonizado y se procedió a realizar un subcultivo en líquido en placa estéril de 24 pozos con medio PDB. Para lo anterior, el subcultivo fue realizado mediante la adición de 200  $\mu\text{L}$  de PDB por pozo seguido de la inoculación de ~300-400 esporas, mediante picado con asa bacteriológica a partir de los cultivos puros en PDA. Posteriormente se añadió 1 mL de cada uno de los tratamientos (2, 50, 100, 200 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de eDNA homólogo fragmentado. De igual manera se procedió a evaluar el DNA heterólogo fragmentado a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando la metodología anterior (Cuadro 1). Se utilizaron dos controles, con el control 1 se verificó el crecimiento normal del fitopatógeno bajo las condiciones experimentales establecidas; el control dos sirvió para verificar la inocuidad de los tratamientos de eDNA homólogo fragmentado. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Esta misma metodología se utilizó para la evaluación de ambos fitopatógenos, para *Fusarium oxysporum* se utilizó un cultivo puro con 15 días de crecimiento en PDA y para *P. capsici* se utilizó un cultivo puro con 30 días de crecimiento en PDA.

Cuadro 1. Establecimiento de tratamientos para evaluar la germinación de espora.

<b>Pozo con tratamiento eDNA homólogo y fitopatógeno</b>	200 $\mu\text{L}$ de PDB ~300-400 esporas 1 mL de tratamiento de eDNA homólogo (2, 50, 100, 200 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<b>Pozo con tratamiento eDNA heterólogo y fitopatógeno</b>	200 $\mu\text{L}$ de PDB ~300-400 esporas 1 mL de tratamiento de eDNA heterólogo ( <i>Latucca sativa</i> ) 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$

<b>Control 1. Pozo con fitopatógeno sin tratamiento</b>	200 $\mu$ L de PDB ~300-400 esporas 1 mL de agua destilada estéril
<b>Control 2. Pozo con tratamiento eDNA homólogo sin fitopatógeno</b>	200 $\mu$ L de PDB 1 mL de tratamiento de eDNA 500 $\mu$ g mL <sup>-1</sup>

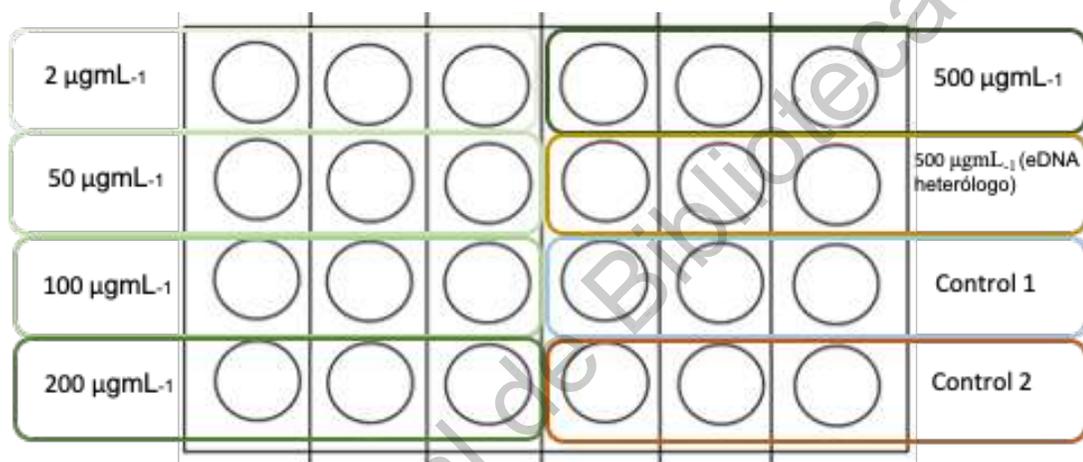


Figura 7. Esquema de aplicación de tratamientos en caja de 24 pozos.

#### 5.4.2 Evaluación del eDNA sobre la respuesta SOD y CAT de los fitopatógenos

Para evaluar la actividad SOD y CAT de los fitopatógenos por la aplicación de eDNA homólogo y heterólogo se optó por realizar subcultivos líquidos en cajas Petri de 5 cm. Se realizaron inóculos líquidos con 200 mL de PDB en matraces Erlenmeyer los cuales fueron inoculados con un disco de 5 mm de diámetro de cultivos puros de los patógenos, e incubados sin agitación a  $25 \pm 3$  °C por 15 días, en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se procedió a realizar un subcultivo, añadiendo 200  $\mu$ L del inóculo de fitopatógeno en 8 mL de PDB, en cajas de Petri de 5 cm. Las cajas Petri de 5 cm inoculadas fueron incubadas sin agitación a  $25 \pm 3$  °C por 4 días. Al cuarto día se retiró el medio junto con el tratamiento mediante succión con micropipeta, manteniendo el micelio, y se añadieron 3 mL de los tratamientos. Para este diseño solo fueron tomados los tratamientos de 2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> y 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de eDNA homólogo,

500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de eDNA heterólogo y un control al que solo se agregó agua destilada estéril. Los tratamientos se dejaron actuar por 24 horas; transcurrido el tiempo se filtró el micelio de cada tratamiento por filtración en vacío y se procedió a realizar el protocolo para la cuantificación de actividad SOD y CAT. El mismo procedimiento se utilizó para ambos fitopatógenos. Previo a la filtración del micelio, fueron tomadas alícuotas para la observación microscópica del micelio.

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

### **5.5.1 Germinación de espora**

Para medir el efecto sobre la germinación de esporas, se realizaron UFC/mL cada 24 hr de cada uno de los tratamientos puestos en las cajas de 24 pozos. Para lo anterior, de cada pozo se tomó una muestra de 33.34  $\mu\text{L}$ , teniendo un total de 100  $\mu\text{L}$  por tratamiento mezclados en un tubo eppendorf, ya que cada tratamiento se tenía por triplicado. A partir de esta mezcla (100  $\mu\text{L}$ ) se colocaron 20  $\mu\text{L}$  en una caja Petri con PDA y se realizó su extensión en placa, la extensión en placa se realizó por triplicado. En caso de observar concentración de micelio en los tratamientos se realizaron diluciones previas, agregando 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril a los 100  $\mu\text{L}$  de muestra, seguido de la extensión en placa de 20  $\mu\text{L}$  de dicha dilución, por triplicado. Las cajas de PDA fueron incubadas por 48 hr a  $25\pm 3$  °C hasta la observación de unidades formadoras de colonias correspondientes a la cantidad de esporas en los tratamientos. Para la cuantificación se utilizó la siguiente fórmula;

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

### 5.5.2 Actividad SOD y CAT

Para cuantificar la actividad superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) y catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se obtuvieron extractos enzimáticos del micelio previamente recuperado al cual fueron aplicados los tratamientos con eDNA homólogo y heterólogo. Para lo anterior se pesaron aproximadamente 500 mg de micelio y se homogenizaron con 2 mL de buffer de fosfatos (pH 7.8) en un mortero previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. El homogenizado se paso a un tubo eppendorf y se llevo a centrifugación por 20 min a 10,000 rpm. Posteriormente, se recupero el sobrenadante (incolore) y se colocó en un tubo nuevo. Dicho sobrenadante fue utilizado como extracto enzimático y se procuró mantener bajo  $4^{\circ}\text{C}$  si no se encontraba en uso. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

La actividad SOD total se estimó mediante la inhibición de la reducción fotoquímica del nitro blue tetrazolium (NBT) (Gao, 2006). La mezcla de reacción contenía 1.5 mL 0.05 M de buffer de fosfatos (pH 7.8), 0.3 mL  $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA- $\text{Na}_2$ , 0.3 mL  $0.13\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-metionina, 0.3 mL  $0.75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NBT, 0.3 mL  $0.02\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  riboflavina, 0.05 mL del extracto enzimático, y 0.25 mL de agua destilada, haciendo un total de 3 mL de la mezcla de reacción. Después de la exposición a luz natural por 20 min (punto de termino determinado por la mezcla de reacción) se midió la absorbancia a 560 nm. La actividad SOD se determinó como el 50 % de inhibición de la reducción del NBT causada por los superóxidos generados a partir de la reacción de foto-reducción de la riboflavina y el oxígeno. Para la cuantificación de CAT se utilizó el método descrito por Beers et al., 1952. La reacción contenía 2 mL de buffer de fosfatos (pH 7.8), 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM y 100  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático. Desde el tiempo cero se midio absorbancia a 240 nm, hasta completar 6 min. Para la determinación de CAT se mide la desaparición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la celda, lo cual se observa como una disminución de la absorbancia en el tiempo. Para conocer la cantidad de proteína de cada muestra se realizó la cuantificación proteica por el método de Bradford, 1976. Las actividades SOD y CAT fueron expresadas en U/mg de proteína.

### 5.5.3 Niveles de metilación de DNA genómico

La evaluación del porcentaje de metilación se realizó por medio del KIT ELISA para el % 5-mC (ZYMO RESEARCH), de acuerdo con las instrucciones provistas en el manual. La relación (ratio) de la ‘densidad de dinucleótidos CpG/ longitud del genoma’ fue aquel para el hongo fitopatógeno *H. parviporum* de 0.062 (Zeng *et al.*, 2019), dando un factor de corrección de 1.21 utilizado para el ajuste de datos resultantes. El DNA utilizado para esta evaluación fue extraído siguiendo la metodología descrita en el punto 5.2.

### 5.6 Evaluación del efecto directo del eDNA homólogo fragmentado aplicado al sistema de infección *P. capsici* - *Capsicum annum*

Este diseño se centro en el fitopatógeno *Phytophthora capsici*, con el cual se infectaron plántulas chile Serrano Magnun 45 (*Capsicum annum*) (Cuadro 2), y se procedió a la evaluación del efecto del eDNA homólogo fragmentado, en bloques completamente al azar.

Cuadro 2. Características de las semillas Hot Pepper-Serrano Magnun 45 por Lakr Seeds International.

Característica	Descripción
Tipo	Serrano
Nombre	Magnun 45
Madurez	Media-Tardía
Cosecha	Múltiple
Tamaño de planta	Alta vertical y vigorosa
Color	Verde-Rojo
Resistencias	Ninguna
Comentarios	Fruto largo de color verde oscuro con excelente vida útil

Se trataron 5 plántulas de chile por tratamiento, con 6 hojas verdaderas, crecidas en sistemas hidropónicos (tubos Falcon de 50 ml) estériles a las cuales se aplicaron los tratamientos de DNA homólogo o heterólogo una concentración de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , más dos controles que contenían solamente agua con y sin el fitopatógeno (cuadro 3). Las plantas serán infectadas con 3 discos de 5 mm tomados de un cultivo puro de *Phytophthora capsici*, los cuales serán colocados directamente en el sistema hidropónico. Cada sistema hidropónico consistirá en una planta de chile, 3 discos de 5 mm del cultivo del fitopatógeno, 15 mL del tratamiento de DNA homólogo o heterólogo a una concentración de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (figura 8); todas las plantas serán mantenidas en una cámara de crecimiento a  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo 16 hr luz/ 8 hr oscuridad. La evaluación de dicho efecto consistió en la verificación visual de la presencia o ausencia de enfermedad, al tiempo 0, y después de 4 y 8 días. Se tomaron en cuenta los síntomas de marchitamiento foliar y necrosis de raíz (cuadros 4 y 5), de acuerdo a lo descrito por Uribe *et al.*, (2014).

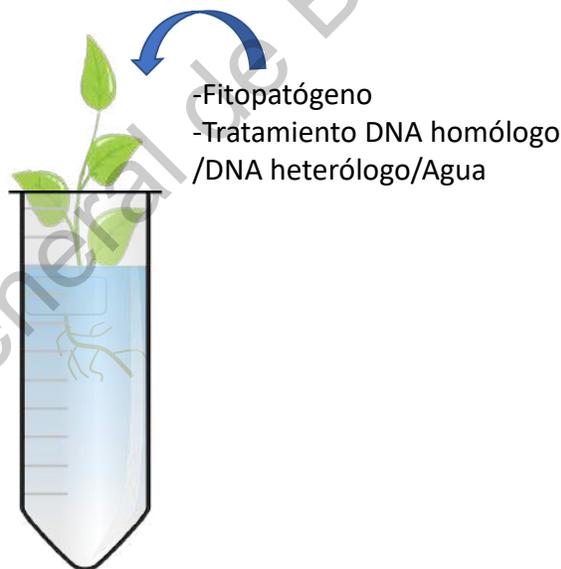


Figura 8. Diseño de ensayo de infección de *P. capsici* en plántula de chile.

Cuadro 3. Resumen de tratamientos para evaluación *P. capsici*-Chile.

Número de plantas de Chile	Tratamiento
5	T1=100 µg mL <sup>-1</sup> DNA homólogo + 3 discos de <i>P. capsici</i>
5	T2=Mezcla 1:1 de DNA heterólogo ( <i>Fusarium oxysporum</i> ) y DNA homólogo 100 µg mL <sup>-1</sup> + 3 discos de <i>P. capsici</i> .
5	Control 1= agua destilada
5	Control 2 = agua destilada + 3 discos de <i>P. capsici</i>

Cuadro 4. Escala de severidad del marchitamiento foliar por *P. capsici*.

(Uribe <i>et al.</i> , 2014)	ESCALA			
	1	2	3	4
Síntoma en área foliar	Planta sin marchitamiento foliar	Planta con algunas hojas con pérdida de turgencia.	Planta con todas las hojas con pérdida de turgencia.	Planta con hojas marchitas

Cuadro 5. Escala de severidad de necrosis radicular por *P. capsici*.

(Uribe <i>et al.</i> , 2014)	ESCALA				
	1	2	3	4	5
Síntoma en raíz	Planta sin lesiones de raíz.	Lesión circular seca, con necrosis ligera en base de raíz >0.5 cm.	Lesiones con necrosis de 2 cm, raíces empiezan a desprenderse	Desprendimiento de epidermis, dejando tejido vascular, pérdida de ~50% de raíces.	Desprendimiento de epidermis, pérdida de ~80% de raíces. Se observan raíces completamente necróticas.

### 5.7 Análisis e interpretación resultados

Los análisis estadísticos se llevarán a cabo con el programa Minitab.2019®. La información será sometida a un análisis ANOVA (95% de confianza) y las diferencias entre tratamientos serán comparados por medio de una prueba Tukey ( $P=0.05$ , 0.01 o 0.001). La información se expresará en valores medios  $\pm$  el error estándar (Barbero *et al.*, 2016, Vega *et al.*, 2018).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Extracción y fragmentación de DNA de los fitopatógenos

El método utilizado para la extracción y fragmentación del DNA permitió obtener rendimientos aceptables de DNA para ser utilizado en las pruebas. El cuadro 6 muestra valores representativos de cuantificación y calidad del DNA extraído para cada fitopatógeno. La visualización por gel de agarosa permitió observar integridad aceptable del DNA genómico extraído (Figura 9).

Cuadro 6. Cuantificación de extracciones de DNA genómico por método CTAB

Muestra	ng/ $\mu$ L	Abs 260/280	Abs260/230
<i>Fusarium oxysporum</i>			
1	963.3	2	1.57
2	1369.1	2	1.4
3	831	2	1.6
4	1382	2.1	2
5	1954.2	2.1	1.99
6	1304.8	2.1	1.68
<i>Phytpthora capsici</i>			
1	1396.6	2.1	2
2	835.7	2.1	2
3	795.3	2.1	1.92
4	850.2	2.1	1.92
5	682.9	2.1	2
6	722.4	2.1	1.98

Nota: Abs 260/280-valores entre 1.8-2 indican un 90-100% de pureza de ácidos nucleicos, valores >2 indican contaminación con RNA. Abs 260/230- valores < 1.5 indican contaminación por sales, arbohidratos o fenoles; o degradación de las moléculas.

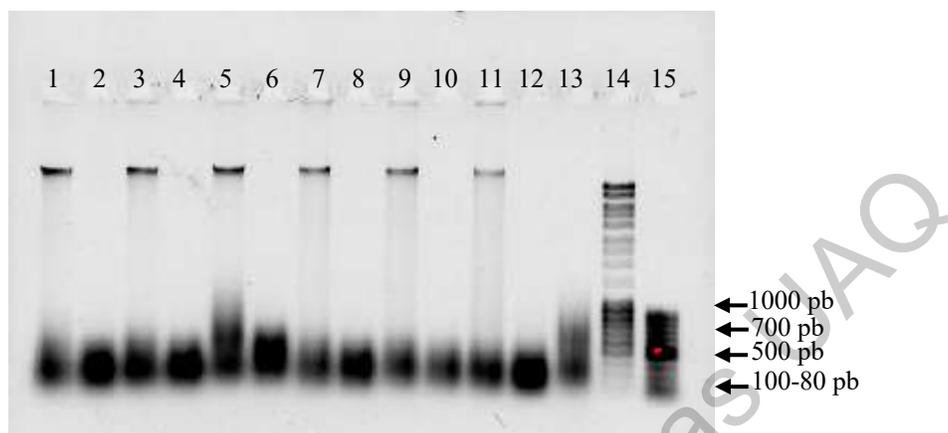


Figura 9. Verificación de integridad de extracciones y de fragmentación. Los carriles de 1-6 corresponden a muestras de *F. oxysporum* y los carriles de 7-12 corresponden a muestras de *P. capsici*. Los carriles 1,3,5,7,9,11 corresponden a las extracciones de DNA genómico, mientras que los carriles 2,4,6,8,12 corresponden a las fragmentaciones realizadas. El carril 13 muestra la fragmentación de DNA heterólogo (*L. sativa*). Los carriles 14 y 15 corresponden a las escaleras de peso molecular de 1kb y 100 pb, respectivamente.

Las muestras con valores mayores a 2 en la relación 260/280 fueron tratadas con RNasa (Thermo Scientific). Las muestras obtenidas tuvieron una calidad aceptable y fue posible utilizarlas como tratamiento. Los fragmentos obtenidos estuvieron dentro de los rangos aceptables que fueron <1000 pb, entre 700-100 pb. Estudios realizados por Duran-Flores y Heil (2018) sugieren que la actividad del DNA como DAMP se ve potenciada cuando los fragmentos son <700 pb, mientras que los fragmentos mayores a 1000 pb presentan nula actividad como DAMP. Esto sugiere que el DNA solo tiene acción como DAMP cuando se encuentra fragmentado, ya que esta es la forma natural en la que se encuentra cuando se presenta algún proceso traumático, de infección o necrosis (Choi y Klessig 2016; Heil 2009). Otro punto importante es el tamaño de los fragmentos que son reconocidos como DAMP. Actualmente no se conoce para plantas, hongos u oomicetos si se trata de algún receptor u otro mecanismo por el cual el eDNA es sentido. Por otra parte, en mamíferos se conoce que el eDNA es reconocido por receptores tipo Toll; y que además pueden fagocitarse moléculas de eDNA y ser reconocidas al interior de la célula (Duran-Flores y Heil, 2015). En plantas se ha propuesto el reconocimiento del eDNA a través de receptores de membrana, canales transportadores, o bien, a través de su traslocación hacia el interior de la célula por medio de vesículas (Figura 10) (Bhat y Ryu, 2016), sin embargo, hacen falta estudios que lo

demuestran. Los reportes obtenidos hasta la fecha apuntan a que este reconocimiento es un sistema fino de detección que puede estar ligado no solo al tamaño de los fragmentos, sino también estar relacionado con los procesos de metilación que el DNA puede sufrir y sobre todo a la cercanía filogenética de las especies (Vega-Muñoz et al, 2018, Duran-Flores y Heil, 2015, Barbero et al, 2016).

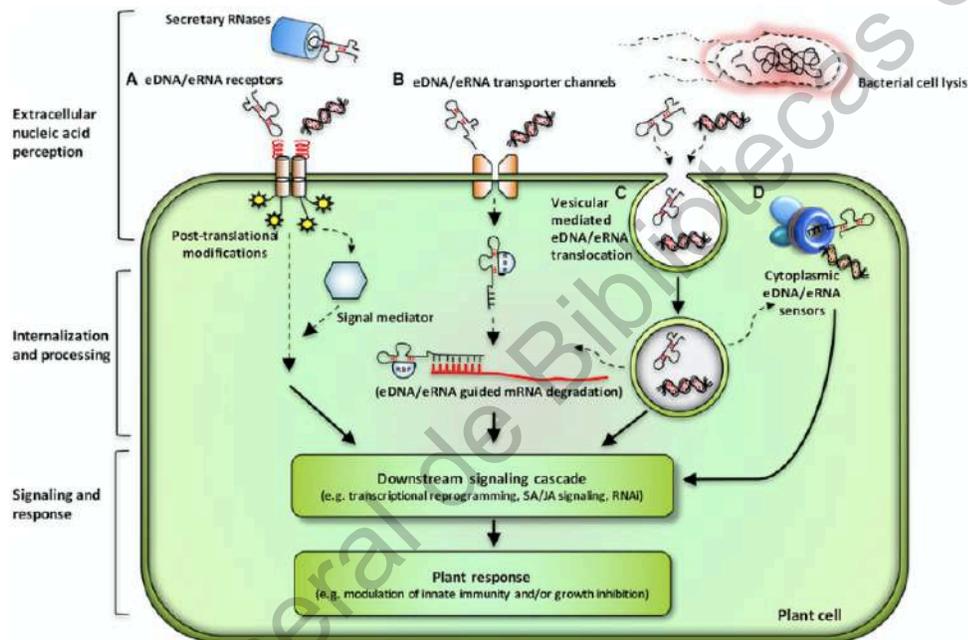


Figura 10: Mecanismos posibles para el reconocimiento de eDNA. A) Por medio de receptores transmembranales; b) a través del transporte por canales, c) internalización en vesículas membranales. Fuente: Bhat y Ryu, 2016

Es primordial conocer el mecanismo de reconocimiento del DNA en los diferentes tipos de organismos, ya que dicho mecanismo parece estar vinculado con varias respuestas metabólicas relacionadas con la inmunidad. Se ha descrito que la toma de DNA fragmentado por células vivas puede bloquear la traducción de RNA mensajero en una manera similar al RNA de interferencia o causar inestabilidad del genoma (Mazzoleni *et al.*, 2015b), por lo que el efecto de inhibición observado podría estar asociado a dichos eventos, donde la señal de “daño” principal resulta ser la fragmentación del DNA. Debido a la importancia del DNA

como una molécula de herencia, y a su ubicuidad, las respuestas generadas por este DAMP resultan relevantes.

## 6.2 Evaluación de germinación de espora

### 6.2.1 *Fusarium oxysporum*

Se evaluó la germinación de espora como una posible forma de mitigación del desarrollo de los fitopatógenos. En el caso de *Fusarium oxysporum*, la cinética de crecimiento obtenida mediante la evaluación de UFC/mL cada 24 por 5 días muestra que los tratamientos lograron ser eficaces para detener la germinación de espora de este hongo (figura 11).

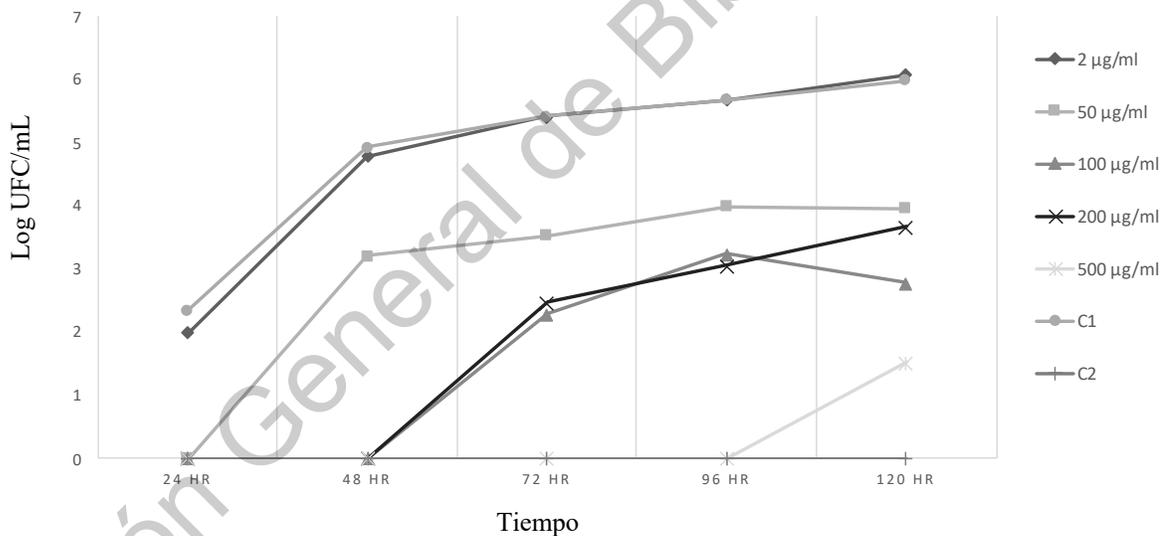


Figura 11. Cinética de germinación de espora de *Fusarium Oxysporum* bajo el tratamiento de eDNA homólogo a diferentes concentraciones (2, 50, 100, 200, 500 µg mL<sup>-1</sup>). C1= esporas sin tratamiento. C2= tratamiento a 500 µg mL<sup>-1</sup> sin esporas.

Durante las primeras 48 horas de incubación los tratamientos de 100 y 200 µg mL<sup>-1</sup> lograron mantener nula la germinación de esporas. Fue posterior a las 48 horas cuando se comenzó a observar un incremento en la germinación de esporas en los tratamientos de 100 y 200 µg mL<sup>-1</sup>. El tratamiento de 500 µg mL<sup>-1</sup> mostró los mejores resultados, obteniendo al final de las

120 horas un incremento en la germinación de esporas de solo 19%. Estos resultados sugieren que los tratamientos con DNA homólogo, es decir, DNA que pertenece al mismo hongo, tienen una actividad en la supresión de germinación de espора del hongo, lo cual puede compararse con resultados similares que se obtuvieron en la germinación de espора del hongo *Trichoderma harzianum* (Mazzoleni et al., 2015b); donde dichos autores realizan la aplicación de eDNA homólogo a una concentración de 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obteniendo porcentajes de germinación promedio de 9.1%, a las 24 horas.

Por otro lado, el tratamiento de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no mostró ningún efecto en la detención de germinación, comportándose de manera similar al Control 1 que solo contenía al hongo.

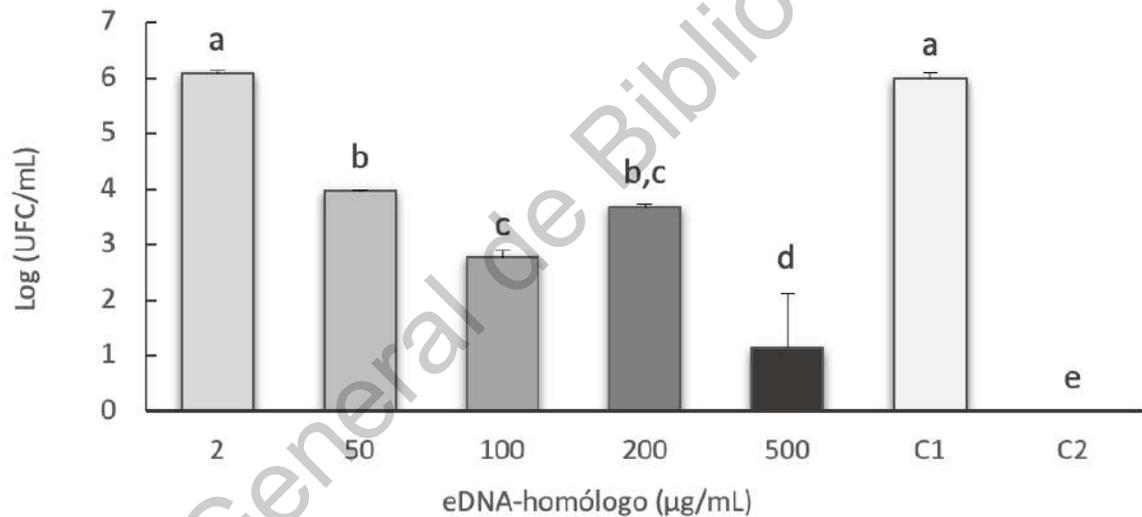


Figura 12. Efecto del eDNA homólogo fragmentado sobre *F. oxysporum*, 120 horas después del tratamiento. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

Los resultados obtenidos al final de las 120 horas en las que se mantuvo en contacto el patógeno con el eDNA homólogo demuestran que el tratamiento de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  fue altamente efectivo para reprimir la germinación de esporas y significativamente diferente a los demás tratamientos (figura 12). Se puede observar que el tratamiento de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  muestra un porcentaje de germinación de espора de 19% equivalente a 25 UFC/mL (cuadro 7). En la figura 13 resulta sencillo distinguir, mediante observación, el incremento de la población del hongo debido a la acumulación de micelio conforme los días. Además, se

puede observar que el tratamiento de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  fue estable a lo largo de 120 horas de contacto.

Cuadro 7. Valores de germinación de espóra de *Fusarium oxysporum* bajo tratamiento con DNA homólogo, después de 120 horas.

Tratamiento	Log (UFC/mL)	% de germinación	Comentarios
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	6.0769 $\pm$ 0.0546 $a$	100	Equivalente a 1.2x10 <sup>6</sup> UFC/mL
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3.966 $\pm$ 0.0117 $b$	66.165	Equivalente a 9.25x10 <sup>3</sup> UFC/mL
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2.767 $\pm$ 0.0117 $c$	46.16	Equivalente a 6x10 <sup>2</sup> UFC/mL
200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3.6781 $\pm$ 0.0454 $bc$	61.3628	Equivalente a 4.78x10 <sup>3</sup> UFC/mL
500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.133 $\pm$ 0.981 $d$	18.896	Equivalente a 25 UFC/mL
C1	5.9941 $\pm$ 0.0882 $a$	100	Equivalente a 1x10 <sup>6</sup> UFC/mL
C2	0.000 $\pm$ 0.000 $e$	0	Equivalente a 0 UFC/mL

Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC. Valores medios  $\pm$  el error estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa.



2  $\mu\text{g mL}^{-1}$

50  $\mu\text{g mL}^{-1}$

100  $\mu\text{g mL}^{-1}$

200  $\mu\text{g mL}^{-1}$

500  $\mu\text{g mL}^{-1}$

C1

C2

Figura 13. Observación del efecto del eDNA homólogo fragmentado sobre la germinación de espóra de *F. oxysporum*, 120 horas después del tratamiento.

En cuanto al efecto del eDNA heterólogo, es decir, DNA de una especie diferente, se utilizó DNA fragmentado de lechuga. El análisis estadístico demuestra que no existieron diferencias significativas entre el tratamiento con DNA heterólogo y un control 1 (hongo sin tratamiento), lo que puede sugerir que la acción del eDNA es especie-específica (cuadro 8), por lo que no se observan efectos en la inhibición de espores bajo este tratamiento.

Cuadro 8. Valores de germinación de espores de *Fusarium oxysporum* bajo tratamiento con DNA heterólogo, después de 120 horas.

Tratamiento	Log (UFC/mL)	% de germinación	Comentarios
<b>500</b> $\mu\text{g mL}^{-1}$ <i>(Lactuca sativa)</i>	$5.1598 \pm 0.0451a$	93.3	Equivalente a $1.45 \times 10^5$ UFC/mL
<b>C1</b>	$5.5345 \pm 0.0159a$	100	Equivalente a $3.43 \times 10^5$ UFC/mL
<b>C2</b>	$0.000 \pm 0.000b$	0	Equivalente a 0 UFC/mL

Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC. Valores medios  $\pm$  el error estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Los resultados anteriores indican que el eDNA homólogo ejerce un efecto de supresión en la germinación de espores a concentraciones elevadas. En este estudio la tendencia de inhibición de la germinación estuvo ligada con la concentración, es decir, a mayor concentración mayor inhibición, sin embargo, no fue así para el tratamiento de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , el cual tuvo un porcentaje de germinación mayor (61%) que el tratamiento de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (46%) y muy cercano al de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (66%).

### 6.2.2 *Phytophthora capsici*

En el caso de *P. capsici*, la cinética de germinación de espora (zoospora) obtenida mediante la evaluación de UFC/mL cada 24 por 5 días (empezando a las 48 horas de incubación) muestra que los tratamientos fueron eficaces para detener la germinación de espora de este oomiceto (figura 14).

Los tratamientos de 50, 100, 200 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mostraron un efecto similar en la supresión de germinación de espora del oomiceto, y esta se mantuvo a lo largo de los 5 días de evaluación; mostrando nuevamente un efecto de estabilidad de los tratamientos en el tiempo. El tratamiento de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no mostró efecto en la supresión de germinación obteniendo un crecimiento similar al control 1 (oomiceto sin tratamiento). Estos resultados indican que concentraciones a partir de los 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  lograr detener la germinación de espora, mientras que concentraciones menores podrían resultar en el efecto contrario.

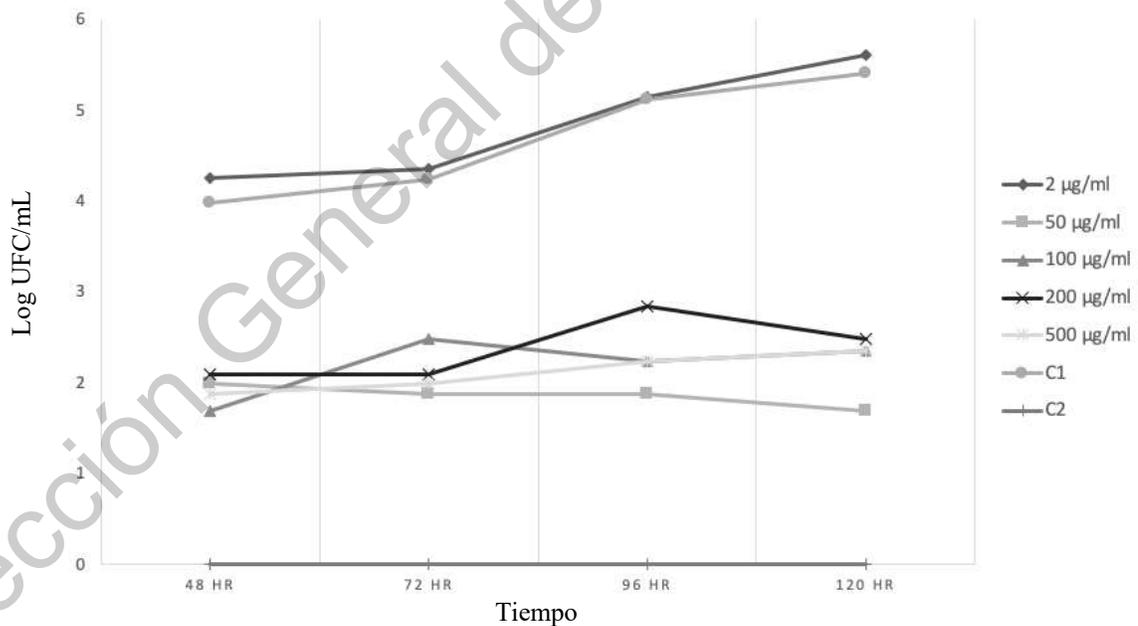


Figura 14. Cinética de germinación de espora de *P. capsici* bajo el tratamiento de eDNA homólogo a diferentes concentraciones (2, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). C1= esporas sin tratamiento. C2= tratamiento a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sin esporas.

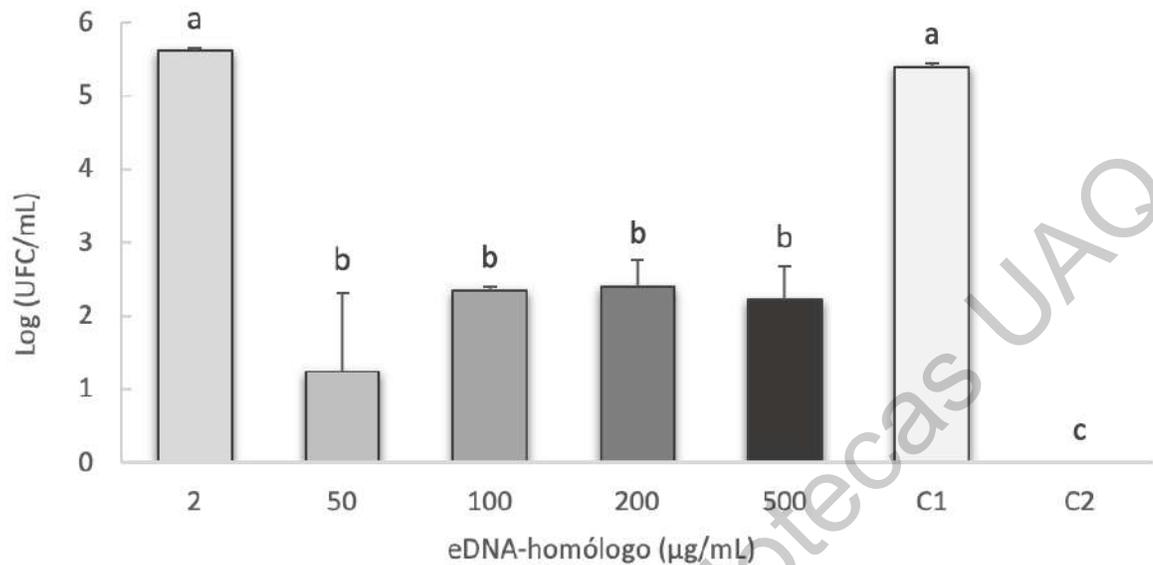


Figura 15. Efecto del eDNA homólogo fragmentado sobre *P. capsici*, 120 horas después del tratamiento. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

Cuadro 9. Valores de germinación de espora de *P.capsici* bajo tratamiento con DNA homólogo, después de 120 horas.

Tratamiento	Log (UFC/mL)	% de germinación	Comentarios
2 µg mL <sup>-1</sup>	5.612 ± 0.0318 <i>a</i>	100	Equivalente a 4.1x10 <sup>5</sup> UFC/mL
50 µg mL <sup>-1</sup>	1.233 ± 1.078 <i>b</i>	22.8284	Equivalente a 50 UFC/mL
100 µg mL <sup>-1</sup>	2.3504 ± 0.0485 <i>b</i>	43.52	Equivalente a 225 UFC/mL
200 µg mL <sup>-1</sup>	2.392 ± 0.357 <i>b</i>	44.288	Equivalente a 300 UFC/mL
500 µg mL <sup>-1</sup>	2.218 ± 0.466 <i>b</i>	41.060	Equivalente a 225 UFC/mL
C1	5.4011 ± 0.0338 <i>a</i>	100	Equivalente a 2.53x10 <sup>5</sup> UFC/mL

C2	0.000±0.000 c	0	Equivalente a 0 UFC/mL
----	---------------	---	---------------------------

Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC. Valores medios ± el error estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Los tratamientos de 100, 200 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mostraron un efecto similar sobre el oomiceto, manteniendo la germinación de esporas en un rango de 200 a 300 UFC/mL (40 %) a las 120 horas de exposición (cuadro 9). El tratamiento de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mostró una germinación de solo un 23%, sin embargo no fue significativamente diferente a los tratamientos de 100, 200 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

En la figura 16 se aprecia la acumulación de micelio en el control (C1) y en el tratamiento de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los demás tratamientos no tuvieron una acumulación de micelio notable debido a la baja germinación de esporas que se mantuvo a lo largo del experimento.

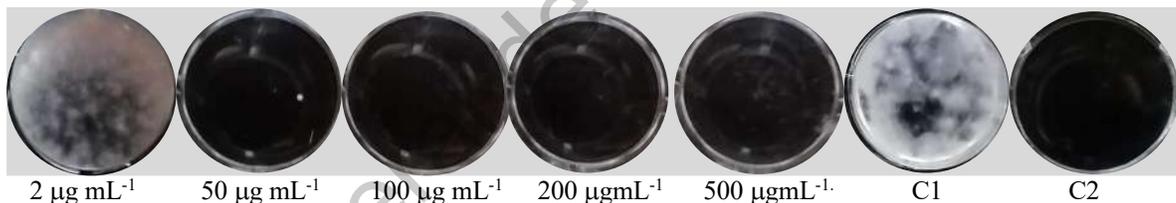


Figura 16. Observación del efecto del eDNA homólogo fragmentado sobre la germinación de espóra de *P. capsici*, 120 horas después del tratamiento.

Para la evaluación del efecto de DNA heterólogo en *P. capsici*, nuevamente se utilizó DNA de lechuga a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El tratamiento de DNA de lechuga a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  comparado con un Control 1, que contenía solo al oomiceto, no muestra diferencias significativas, lo que indica que nuevamente el efecto del eDNA sugiere ser específico sobre la especie (cuadro 10).

Cuadro 10. Valores de germinación de espора de *P. capsici* bajo tratamiento con DNA heterólogo, después de 120 horas.

Tratamiento	Log (UFC/mL)	% de germinación	Comentarios
<b>500</b> <i>(Lactuca sativa)</i> $\mu\text{g mL}^{-1}$	$4.433 \pm 0.666a$	95.37	Equivalente a $1.45 \times 10^5$ UFC/mL
<b>C1</b>	$4.5181 \pm 0.0159a$	100	Equivalente a $3.43 \times 10^5$ UFC/mL
<b>C2</b>	$0.000 \pm 0.000b$	0	Equivalente a 0 UFC/mL

Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC. Valores medios  $\pm$  el error estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Los resultados de germinación de espора de ambos fitopatógenos, sugieren que el eDNA homólogo, pero no heterólogo, tiene un efecto de inhibición de la germinación. Lo anterior queda respaldado por estudios anteriores que demuestran que el eDNA puede tener un efecto de inhibición del crecimiento en diferentes grupos de organismos (Mazzoleni et al., 2015 ab) y que este es dependiente de la concentración aplicada. Estudios realizados en planta demuestran que concentraciones de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  pueden inhibir la germinación de semilla de lechuga (Vega-Muñoz et al, 2018), y de frijol (Duran-Flores y Heil, 2018). Este trabajo resalta el fenómeno de hormesis, donde dicho efecto puede variar dependiendo de la especie con la cual se trabaje, de ahí la necesidad de estudiar la relación dosis-efecto. Por otro lado, también se verificó que solo el eDNA homólogo tiene un efecto de inhibición, mientras que el heterólogo no tuvo un efecto en la inhibición de germinación. Desde el punto de vista práctico, se podría utilizar esta característica para generar productos que sean altamente específicos contra lo que se desea atacar, y así evitar el daño a otros organismos. También, se puede sugerir que esta tecnología evitaría la rápida resistencia adquirida de los patógenos, debido que al ser un proceso que ocurre en la naturaleza, se necesitaría de mucho más tiempo de evolución para poder llegar a la resistencia; sin embargo, son necesarios estudios que puedan corroborar dicho evento.

Como pudo ser observado en ambos patógenos, al utilizar concentraciones bajas se obtuvo un crecimiento igual o ligeramente mayor al del control que solo contenía al patógeno, lo que puede indicar que dosis mal aplicadas pueden resultar en un efecto contrario o hasta de elicitación de fitopatógeno, por lo que son necesarios más estudios que avalen las dosis. Quintana-Rodríguez et al. (2018) habla sobre la posibilidad del uso del eDNA, así como de otras moléculas que actúan como DAMP, para lograr la activación de sistema de defensa de las plantas (elicitación), es decir, “vacunar a las plantas”; lo cual desde el punto de vista científico sugiere ser una estrategia viable de conseguir considerando que los DAMPs logran generar respuestas relacionadas con la defensa cuando son reconocidos en bajas concentraciones.

### **6.3 Evaluación de la actividad antioxidante SOD y CAT**

#### **6.3.1 *Fusarium oxysporum***

En la evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se encontró que los tratamientos de 2 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  aumentaron la actividad de esta enzima, comparado con el control (en el que solo se aplicó agua) y un tratamiento con eDNA heterólogo a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  los cuales dieron una actividad enzimática similar (figura 17). Estos resultados se correlacionan con la activación de una respuesta ante el estrés, es decir, al aumentar la concentración del tratamiento aumento la actividad de esta enzima. Lo anterior sugiere que los tratamientos de 2 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de eDNA homólogo, pero no heterólogo, generan una respuesta de estrés, lo que provoca un aumento en la actividad de SOD, debido a una posible acumulación de ROS.

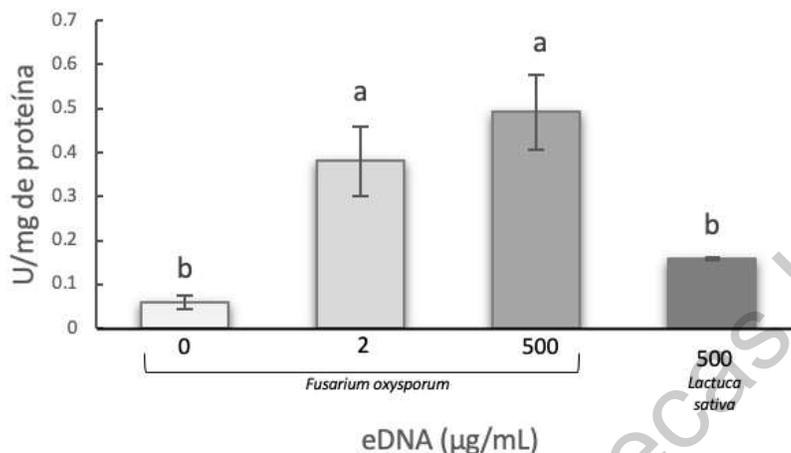


Figura 17. Actividad SOD *F. oxysporum*, 24 horas después del tratamiento de eDNA. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

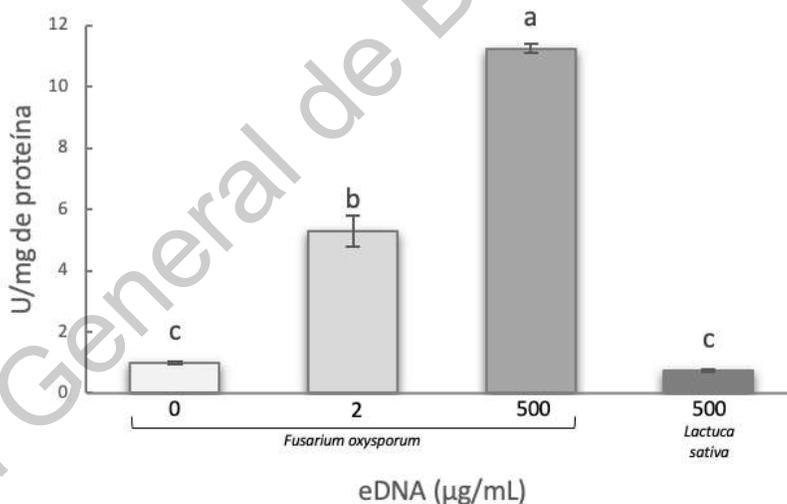


Figura 18. Actividad CAT *F. oxysporum*, 24 horas después del tratamiento de eDNA. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

Por otro lado, la actividad de la enzima catalasa también se vio potenciada en los tratamientos (figura 18). El aumento de la actividad se correlacionó con la concentración del tratamiento, de esta manera el tratamiento de 500 µg mL<sup>-1</sup> tuvo más del doble de actividad que el tratamiento de 2 µg mL<sup>-1</sup>, siendo la actividad de 11.25 y 5.3 U/mg de proteína, respectivamente. Estos resultados sugieren, al igual que los de SOD, la aparición de eventos

de estrés causados por el tratamiento con eDNA homólogo. En ambas actividades, SOD y CAT, el tratamiento con eDNA heterólogo no fue significativamente diferente al control, indicando que no genera la activación de respuestas relacionadas con procesos de estrés.

Cuadro 11. Valores de actividad enzimática de *Fusarium oxysporum* bajo tratamiento con DNA homólogo y heterólogo, después de 24 horas.

<b>Tratamiento</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>
<b>eDNA</b>	<b>(U/mg de proteína)</b>	<b>(U/mg de proteína)</b>
<b>0 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> <i>(Fusarium oxysporum)</i>	0.0574 $\pm$ 0.00216 <b>b</b>	0.983 $\pm$ 0.0451 <b>c</b>
<b>2 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> <i>(Fusarium oxysporum)</i>	0.38 $\pm$ 0.0797 <b>a</b>	5.297 $\pm$ 0.513 <b>b</b>
<b>500 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> <i>(Fusarium oxysporum)</i>	0.4913 $\pm$ 0.0865 <b>a</b>	11.255 $\pm$ 0.1631 <b>a</b>
<b>500 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> <i>(Lactuca sativa)</i>	0.1577 $\pm$ 0.0282 <b>b</b>	0.7353 $\pm$ 0.0455 <b>c</b>

Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC. Valores medios  $\pm$  el error estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa, por columna.

### 6.3.2 *Phytophthora capsici*.

En el caso de la actividad SOD para *P. capsici* se observó nuevamente un aumento de actividad en el tratamiento de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pero no así para el de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , el cual no tuvo diferencias significativas con el control ni con el tratamiento de eDNA heterólogo (figura 19).

En *P. capsici* se encontró alta actividad CAT en todos los tratamientos (figura 20). En este caso no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obteniendo actividades de 14.1 y 15.6 U/mg de proteína, respectivamente; sin embargo, estos fueron significativamente superiores al control y al tratamiento con DNA heterólogo.

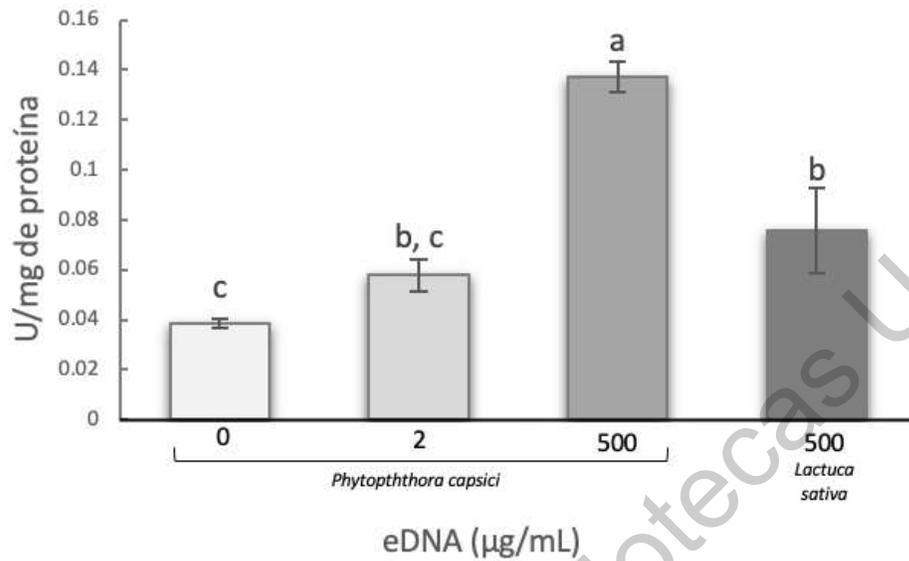


Figura 19. Actividad SOD *P. capsici*, 24 horas después del tratamiento de eDNA. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

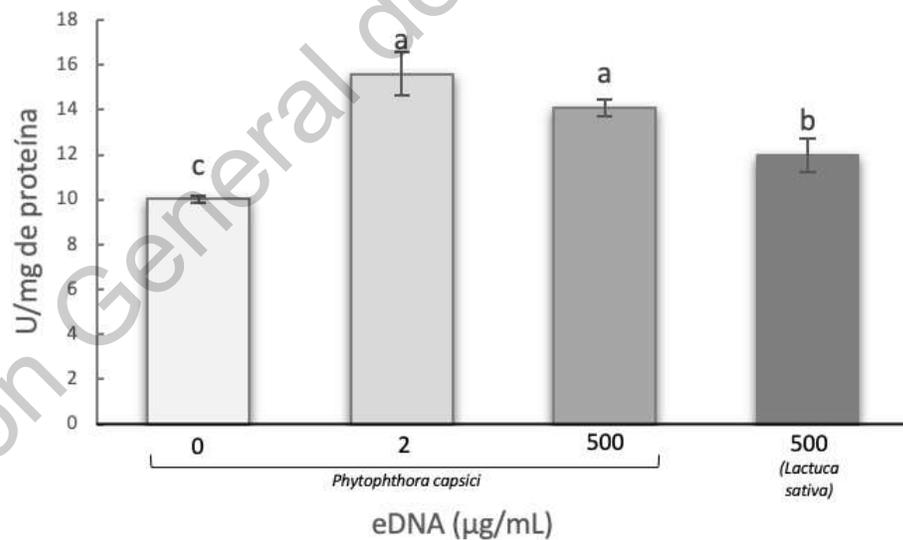


Figura 20. Actividad CAT *P. capsici*, 24 horas después del tratamiento de eDNA. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

Al igual que *F. oxysporum*, para *P capsici* los tratamientos indican un aumento de las actividades de ambas enzimas SOD y CAT, lo cual nuevamente indica que la acción del eDNA homólogo se vincula a procesos relacionados con estrés.

Cuadro 12. Valores de actividad enzimática de *P. capsici* bajo tratamiento con DNA homólogo y heterólogo, después de 24 horas.

<b>Tratamiento</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>
<b>eDNA</b>	<b>(U/mg de proteína)</b>	<b>(U/mg de proteína)</b>
<b>0 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> <b>(<i>P. capsici</i>)</b>	0.0383 $\pm$ 0.00166c	10.021 $\pm$ 0.182c
<b>2 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> <b>(<i>P. capsici</i>)</b>	0.05798 $\pm$ 0.0064bc	15.613 $\pm$ 0.976a
<b>500 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> <b>(<i>P. capsici</i>)</b>	0.137 $\pm$ 0.00655a	14.094 $\pm$ 0.376a
<b>500 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> <b>(<i>Lactuca sativa</i>)</b>	0.0758 $\pm$ 0.01708b	11.989 $\pm$ 0.747b

Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC. Valores medios  $\pm$  el error estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa, por columna.

Tanto eucariontes como procariontes han desarrollado una serie de mecanismos para contrarrestar gran variedad de eventos de estrés que se presentan cotidianamente, como la presencia de oxidantes ambientales, limitación de nutrición y daños causados por agentes mecánicos y químicos. Estos mecanismos permiten generar respuestas rápidas para adaptar el metabolismo a la condición alterada (Kono *et al.*, 1995). El mecanismo de producción y desecho de ROS resulta ser una de las principales vías que se encuentra altamente regulada para contrarrestar dicho estrés. En el caso de los fitopatógenos se ha estudiado que estos suelen estar expuestos a altas concentraciones de ROS durante el proceso de infección vegetal, ya que el incremento de ROS en la planta es una respuesta de defensa común ante el ataque por fitopatógenos; por lo tanto contienen mecanismos de desecho de ROS altamente efectivos (Lee *et al.*, 2017). Peroxidasas fúngicas, como la catalasa, se han identificado durante el inicio de la infección vegetal (Mir *et al.*, 2015); y además, se han identificado como controladores redox de varios procesos fisiológicos (König *et al.*, 2012). En *Fusarium graminearum*, se han identificado varios factores de transcripción involucrados en la

respuesta ante el estrés oxidativo por medio de la regulación de la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes (Jiang *et al.*, 2015). Los factores de transcripción Yap1 y Skn7 juegan un factor crucial en la respuesta ante estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae* (Lee *et al.*, 1999). Otros estudios reportan que también el estrés oxidativo está relacionado a la síntesis secundaria de metabolitos en hongos (Montibus *et al.*, 2015). En especies de *Aspergillus*, la biosíntesis de aflatoxinas se activa en respuesta al estrés (Hong *et al.*, 2013). Por otro lado, en *Fusarium oxysporum* se ha encontrado que existe un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) cuando se encuentra bajo la condición de estrés por inanición, y más haya se ha demostrado que el aumento de esta enzima es crucial para el cambio morfológico de hifa a clamidospora, estadio que le da ventajas de supervivencia (Kono *et al.*, 1995).

Como se puede apreciar, las enzimas antioxidantes de patógenos de plantas tienen un papel crucial en una gran cantidad de procesos. En particular, en este trabajo se ha identificado un aumento de las enzimas SOD y CAT en el micelio tratado con eDNA homólogo de ambos fitopatógenos. Dicho aumento sugiere estar relacionado con la actividad del eDNA como DAMP, ya que como se describió anteriormente, la producción de ROS es una respuesta común activada por DAMPs (Duran y Heil, 2016), lo que conduciría a un aumento de las enzimas antioxidantes para lograr contrarrestar los efectos de una producción excesiva de ROS. El aumento de esta actividad antioxidante puede corroborarse con futuros estudios de expresión de los genes que codifican para SOD y CAT de estos fitopatógenos, o bien de factores de transcripción previamente identificados, relacionados con la activación de dichos genes.

#### 6.4 Análisis microscópico del micelio de los fitopatógenos

Además del análisis enzimático, se tomaron previamente alícuotas de los tratamientos para su observación microscópica. La observación microscópica permitió detallar ciertos cambios morfológicos en las hifas *Fusarium oxysporum*, percibidos como hinchazón y alargamiento de vacuolas (vacuolización) en las hifas, en los tratamientos de 2 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Además, en el tratamiento de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  puede percibirse un alto grado de deformación de la hifa (figura 21).

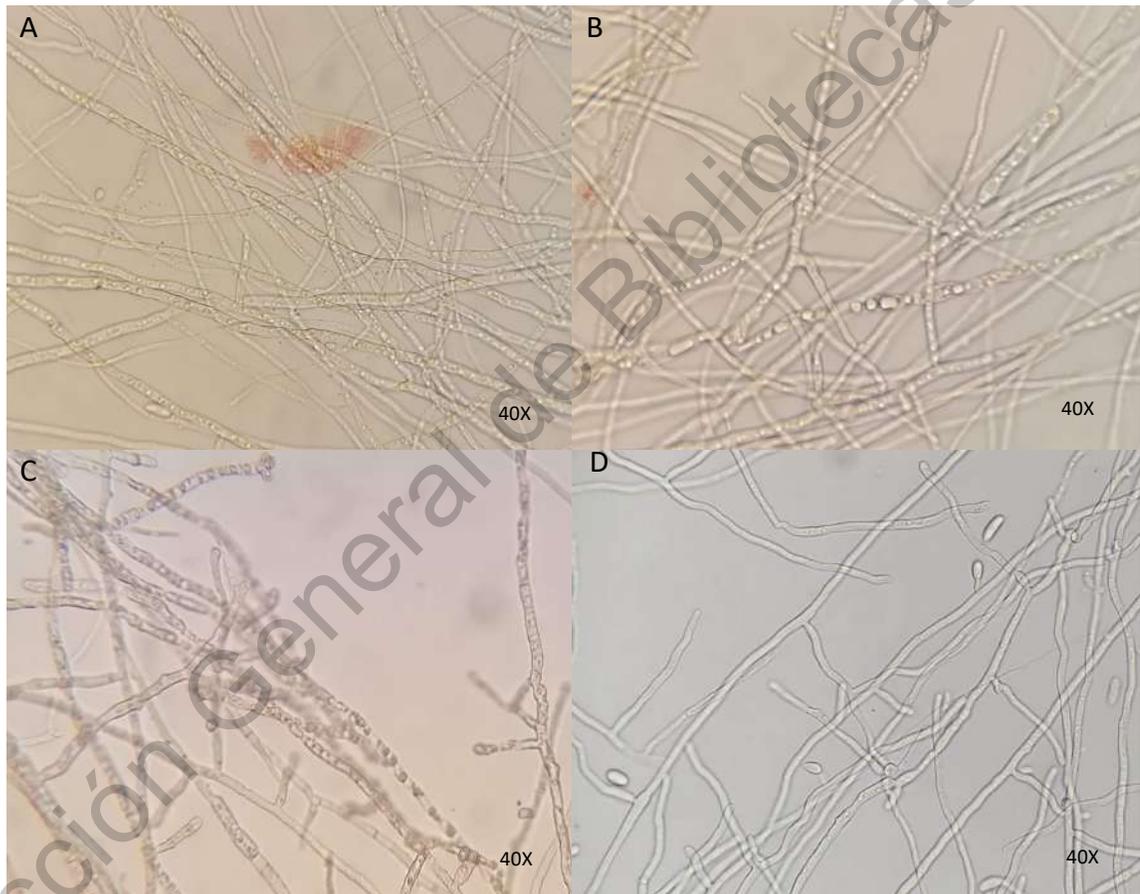


Figura 21: Observaciones microscópicas del efecto del eDNA a diferentes concentraciones sobre el micelio de *Fusarium oxysporum*, después de 24 hr. Tratamientos de A) eDNA homólogo 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (control), B) eDNA homólogo 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , C) eDNA homólogo 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , D) eDNA heterólogo (*Lactuca sativa*) 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

La morfología y fisiología vacuolar alterada en hongos se ha relacionado con el deterioro del crecimiento hifal y de virulencia en *Ustilago maydis* y *Magnaporthe grisea* (Steinberg *et al.*,

1998; Weber *et al.*, 2001). Además, reportes indican deformación y vacuolización en hifas de *Rizhoctonia solani* después de estar en contacto con el sobrenadante de *B. subtilis* V26, el cual puede presentar una composición bioquímica (proteinasas y quitinasas) que afecta el estado integral de la hifa (Ben Khedher *et al.*, 2015). De esta manera se puede sugerir que resultados de hifas deformes y con vacuolización excesiva son indicadores de daño y deterioro.

En la observación de las hifas de *P. capsici* no se lograron detectar cambios morfológicos en los tratamientos con eDNA homólogo o heterólogo, siendo similares al control (figura 22). Al ser un oomiceto las respuestas morfológicas pueden no percibirse con facilidad, debido a la complejidad metabólica del organismo.

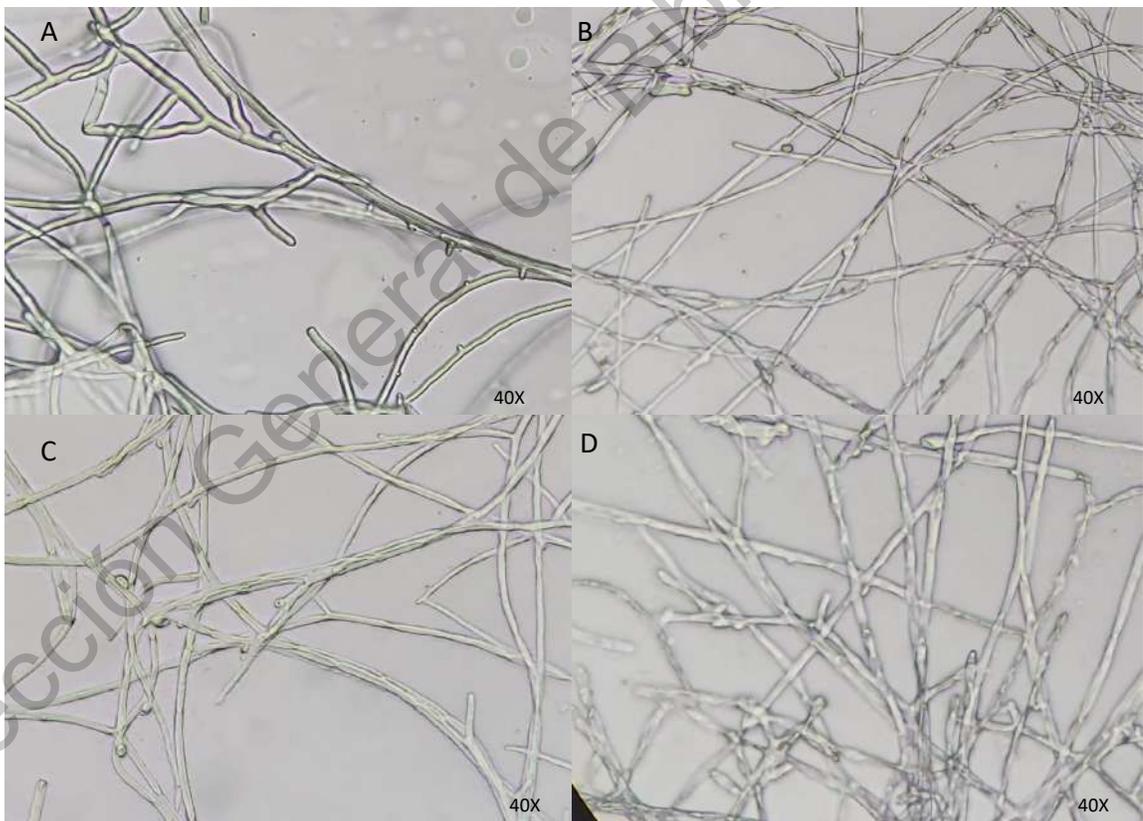


Figura 22: Observaciones microscópicas del efecto del eDNA a diferentes concentraciones sobre el micelio de *P capsici*, después de 24 hr. Tratamientos de A) eDNA homólogo 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (control), B) eDNA homólogo 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , C) eDNA homólogo 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , D) eDNA heterólogo (*Lactuca sativa*) 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 6.5 Niveles de metilación de DNA genómico

Se evaluaron los niveles de metilación del DNA genómico en *F. oxysporum* después de su exposición a eDNA homólogo (figura 23). Los resultados muestran que el DNA obtuvo un porcentaje menor de metilación en los tratamientos de 50, 100, 200 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (cuadro 13), indicando una hipometilación, a diferencia del control donde el porcentaje de metilación se encontró de  $1.501\% \pm 0.489$ . Lo anterior sugiere que los tratamientos aplicados activan la expresión de diferentes genes que pueden estar involucrados con la respuesta ante el reconocimiento del eDNA, lo que induce una hipometilación del DNA genómico. El tratamiento de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no se encontró significativamente diferente al control.

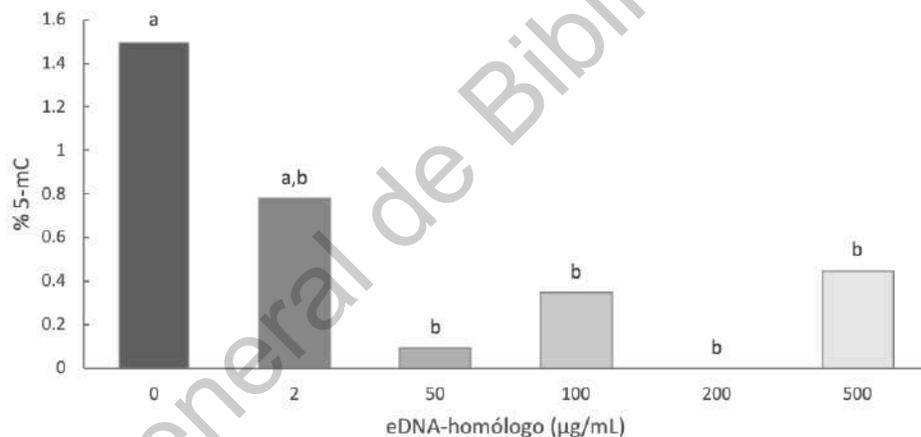


Figura 23. Niveles de metilación del DNA genómico de *Fusarium oxysporum* después de 120 horas de exposición de eDNA-homólogo. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

Cuadro 13. Nivel de metilación del DNA genómico de *F. oxysporum* bajo tratamiento con DNA homólogo.

Tratamiento eDNA	% 5-mC
0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$1.501 \pm 0.489a$
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$0.776 \pm 0.260ab$
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$0.0927 \pm 0.0925b$

<b>100 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>0.346 <math>\pm</math> 0.347<b><i>b</i></b></b>
<b>200 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>0.00 <math>\pm</math> 0.00<b><i>b</i></b></b>
<b>500 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>0.446 <math>\pm</math> 0.447<b><i>b</i></b></b>

Análisis ANOVA-Tukey (95% de confianza). Valores medios  $\pm$  el error estándar.

La metilación del DNA en hongos es menos estudiada en comparación con otros eucariontes, sin embargo, se tiene la noción de que este proceso está dedicado primeramente a la supresión de elementos transponibles (TEs) para mantener la integridad del genoma (Zemach *et al.*, 2010). Estudios sugieren que la metilación del DNA en hongos tienen patrones más complejos y variados de lo que se pensaba; además, se ha estudiado que existe una gran variedad en el porcentaje de citosinas genómicas metiladas, por ejemplo 0.22% en *Magnaporthe oryzae* (Jeon *et al.*, 2015), 0.38-0.42% en *Metarhizium robertsii* (Li *et al.*, 2017), 1.8% en *Ganoderma sinense* (Zhu *et al.*, 2015), y hasta 36.9–39.6% en *Tuber melanosporum* (Montanini *et al.*, 2014).

### 6.6 Efecto del DNA homólogo sobre el sistema de infección *P. capsici*-Chile

Para este ensayo se utilizaron concentraciones de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , debido a que los ensayos de germinación apuntaban que *P. capsici* era altamente sensible al eDNA homólogo. Sin embargo, no se observó prevención de la enfermedad, sino que al día 8, las plantas de los tratamientos mostraron síntomas más severos de enfermedad comparados con el control (figura 24).

Lo anterior sugiere que la dosis utilizada en los tratamientos no fue la indicada, sino que debió utilizarse una dosis mayor de eDNA. Por otro lado, existió una aparente elicitación del oomiceto, que lo volvió más agresivo en un menor tiempo al estar expuesto al tratamiento. Dicha elicitación ha sido sugerida en reportes anteriores al no manejar la dosis adecuada para lograr inducir un efecto de inhibición, por el contrario, se induce un efecto positivo (elicitación) ya que la dosis no logra generar una respuesta fuerte de estrés. Dicho fenómeno ha sido explicado como una doble acción que puede tener el eDNA (Ferrusquía-Jiménez *et*

*al.*, 2020) (figura 25). Quintana-Rodríguez *et al* (2018) menciona que el eDNA, al igual que otros DAMPs, puede ser utilizado como una “vacuna de plantas” debido a que en dosis moderadas induce respuestas relacionadas con la inmunidad vegetal, lo que conlleva al priming de la inmunidad vegetal. Es decir, el eDNA puede actuar como un modulador de la inmunidad vegetal y ser utilizado como elicitador, cuando se usa en concentraciones relativamente bajas. Por el contrario, puede utilizarse como una molécula con actividad de inhibición, si se usa en altas concentraciones (Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2020). Esta actividad dual del eDNA puede tener diferentes enfoques con potencial biotecnológico; usado como elicitador para mejorar la inmunidad de cultivos comerciales o bien como molécula con actividad de inhibición para el control de plagas agrícolas, tal como se plantea en el presente trabajo.

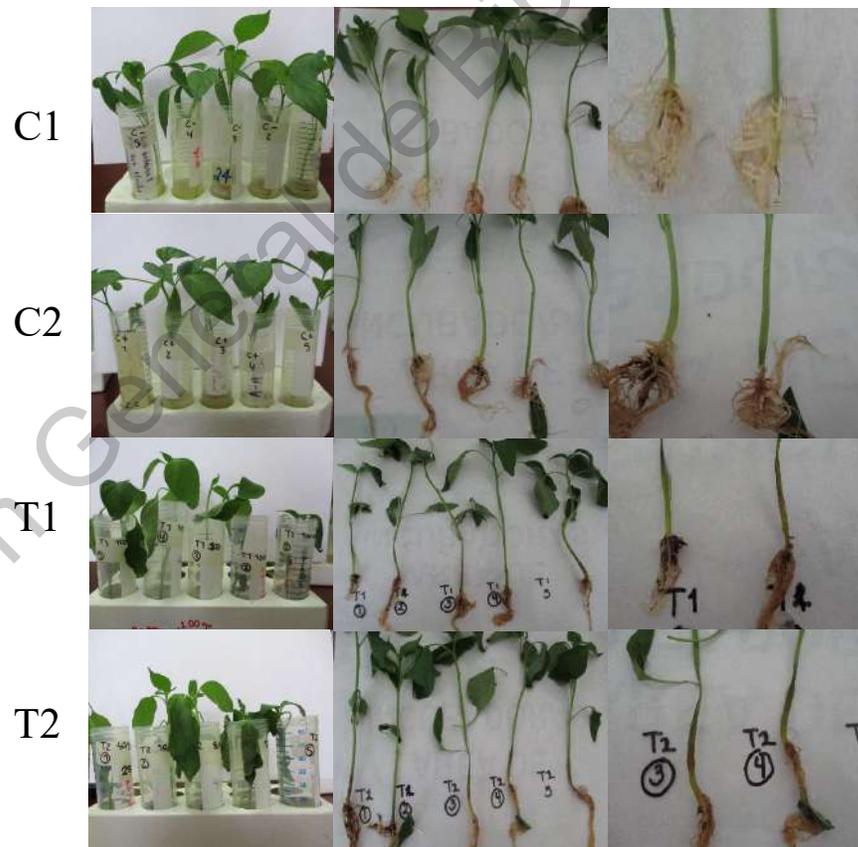


Figura 24. Efecto de los tratamientos de eDNA en plantas de chile inoculadas con *P. capsici* a los 8 días. C1: plantas con agua, C2: plantas inoculadas con *P. capsici* + agua, T1: eDNA homólogo a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  + *P. capsici*, T2: Mezcla 1:1 de eDNA heterólogo (*Fusarium oxysporum*) y DNA homólogo  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  + *P. capsici*.

Cuadro 14. Valores de severidad de marchitamiento y necrosis radicular 8 días después de la aplicación de tratamientos.

Tratamiento	Día 8	
	Marchitamiento	Necrosis de raíz
<b>Control 1</b>	1a±0.0	1a±0.0
<b>Control 2</b>	1a±0.0	1.6b±0.548
<b>T1</b>	4.2b±0.447	3c
<b>T2</b>	4.4b±0.548	4d

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. Análisis ANOVA- Tukey con 95% de IC.

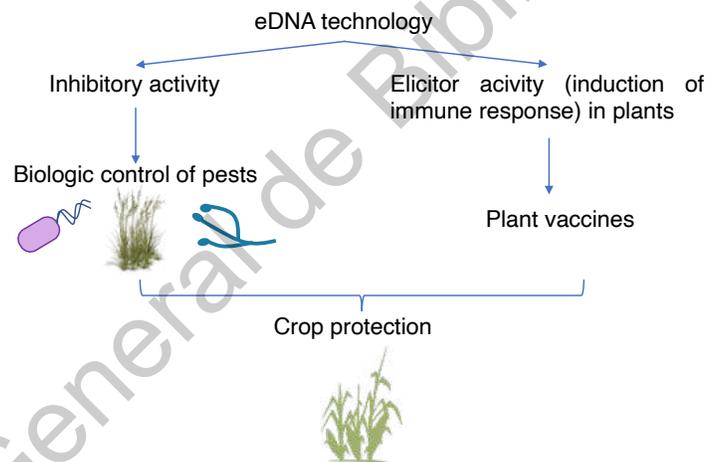


Figura 25. Actividad dual del eDNA y su potencial biotecnológico. Basado en la acción del eDNA como DAMP, esta tecnología puede ser usada para el desarrollo de productos de control biológico y como vacunas para plantas. Usando la tecnología para el control de plagas y enfermedades agrícolas la aplicación de eDNA homólogo en dosis  $>200 \mu\text{g mL}^{-1}$  es propuesta, donde el origen del eDNA deberá ser cualquier tipo de patógeno o plaga agrícola (bacteria, maleza, hongo). Para la inducción de inmunidad, con un enfoque de “vacuna de planta”, dosis  $<200 \mu\text{g mL}^{-1}$  podrían ser usadas en plantas desarrolladas (por ejemplo: en plantas de 4 semanas de edad); el eDNA deberá obtenerse de las plantas de interés agronómico. Fuente: Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2020.

El efecto resultante puede explicarse sugiriendo que la dosis de eDNA no fue suficiente para la cantidad de inóculo que se utilizó del patógeno, recordando que el sistema de infección está diseñado con un exceso de *P. capsici* para lograr inducir la infección. Por lo que resulta pertinente estudiar la relación dosis-patógeno en futuros experimentos.

## 7. CONCLUSIONES

La aplicación de eDNA homólogo genera cambios metabólicos, morfológicos y en la respuesta de germinación de espora en los fitopatógenos aquí estudiados. Los principales resultados sugieren que aplicaciones de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en el caso de *Fusarium oxysporum*, y  $>50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para *Phytophthora capsici*, resultan efectivas en tratamientos *in vitro* para suprimir la germinación de espora de ambos patógenos.

En cuanto a los fenómenos metabólicos se observó que, para ambos microorganismos, la aplicación de eDNA homólogo a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  aumenta la actividad superóxido dismutasa y catalasa, ambas relacionadas con el sistema de producción y desecho de ROS (especies reactivas del oxígeno), lo que sugiere una respuesta de estrés y, por lo tanto, una actividad del eDNA homólogo como DAMP. Por otro lado, el eDNA heterólogo no generó respuestas metabólicas significativas en los patógenos. En *F. oxysporum* pudieron ser observados cambios morfológicos como el hinchazón y vacuolización de hifas sometidas a los tratamientos con eDNA homólogo. Además, pudo observarse sobre este mismo patógeno una reducción en los niveles de metilación del DNA al estar en contacto con tratamientos con eDNA homólogo, sugiriendo una activación de la expresión génica.

En el ensayo de aplicación de eDNA al sistema de infección de *P. capsici*-Chile, no logró observarse una prevención de enfermedad, de hecho, la enfermedad tuvo mayor severidad en los tratamientos. Una de las razones expuestas es que la dosis no fue suficiente en relación al inóculo de patógeno colocado, por lo que sería pertinente realizar más estudios para lograr evaluar la relación dosis-patógeno y así observar lo encontrado en los resultados *in vitro*.

## 8. REFERENCIAS

Aballa E. (2016). Composición biológica para el control de nemátodos. WO 2016/165037A1. 20/10/2016.

Agrios G. (2005) Plant Pathology. Quinta edición. Academic Press. Nueva York. 803 p.

Alberts B. Johnson A. Lewis J. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. The Structure and Function of DNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/>

Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:139–62.

Bajpai V. Kang S. (2010). Antifungal Activity of leaf essential oil extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society:* 87:327-336

Barbero F. Guglielmotto M. Capuzzo A. Maffei M. (2016). Extracellular Self-DNA (esDNA), but Not Heterologous Plant or Insect DNA (etDNA), Induces Plasma Membrane Depolarization and Calcium Signaling in Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) and Maize (*Zea mays*). *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1659; doi:10.3390/ijms17101659

Barroso J. (2012) Cepas De Trichoderma Útiles Para El Tratamiento y/o Prevención De Infecciones Provocadas Por Microorganismos Fitopatógenos. WO 2012/140304A2. 18/10/2012.

Bloemberg, V.G., and Lugtenberg, J.J. B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Biotic Interactions* 4:343-350.

Booth C. (1970). *Fusarium oxysporum* CMI descriptions of plant pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Agricultural Bureaux, 211.

Brinkmann V. Reichard U. Goosmann C. Fauler B. Uhlemann Y. Weiss D. Weinrauch Y. Zychlinsky A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535.

Charles P. Woloshuk. (1995). Antifungal preparations and Process for making such Preparations. Estados Unidos de America. Patente US5389609. 14/02/1995.

Csanyi, C. (2018). Advantages & Disadvantages of Biological Control. Sciencing. Leaf Group Education. <https://sciencing.com/advantages-disadvantages-biological-control-8088070.html>.

Dean R. Van J, Pretorius Z. Hammond-Kosack K. Di Pietro A. Spanu P. Rudd J. Dickman M. Kahmann R. Ellis J. Foster G. (2012). The Top 10 Fungal Pathogens In Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*: 1-19. Doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X

Deguine, J. (2017) Common Senses. *Trends in Immunology*, 38, 691-692.

Duran-Flores D, Heil M. 2014. Damaged-self recognition in common bean (*Phaseolus vulgaris*) shows taxonomic specificity and depends on reactive oxygen species (ROS) signalling. *Frontiers in Plant Science* 5: 585.

Duran-Flores, D., Heil, M. (2017) Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants. *Brain Behav. Immun*, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.010>.

Duran-Flores, D., Heil, M., 2015. Growth inhibition by self-DNA: a phenomenon and its multiple explanations. *New Phytol.* 207, 482–485. <https://doi.org/10.1111/nph.13542>.

Duran-Flores, D., Heil, M., 2016. Sources of specificity in plant damaged-self recognition. *Curr. Opin. Plant Biol.* 32, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.019>.

Erwin D. (1983) *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology* American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, ISBN 0-89054-050-0

Erwin D. Ribeiro O. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul, MN.USA. 562 p.

Ezziyyani M. Pérez C. Requena M. Ahmed A. Candela M. (2004). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología* 26: 61-68.

Fan LY. (2017). China Finds Pesticide Office to Combat Pollution, Overuse. <http://www.sixthtone.com/news/1000987/china-finds-pesticide-office-to-combatpollution%2C-overuse#>

Fernández E. Acosta M. Ponce F. Pinto M. (2007). Manejo Biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) revista mexicana de fitopatología 25(1): 35-42.

Ferrusquía-Jiménez, N.I., Chandrakasan, G., Torres-Pacheco, I. et al. Extracellular DNA: A Relevant Plant Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) for Crop Protection Against Pests—A Review. *J Plant Growth Regul* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10129-w>

G. Steinberg, M. Schliwa, C. Lehmler, M. Bolker, R. Kahmann, J.R. McIntosh. Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J. Cell Sci.*, 111 (1998), pp. 2235-2246

Garcés E. Orozco M. Bautista G. Valencia H. (2001). El hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana* 6 (1): 7-25.

García C. (2004). Introducción a la Microbiología. Segunda edición. Editorial EUNED. Costa rica: 103-107 pp.

García E. Quezada M. Moreno J. Sánchez G. Moreno E. Pérez M. (2006). Actividad Antifúngica de aceite esencial de canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume) y orégano (*Origamun vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(001):8-12.

Gomis M. (2008). Agente de control biológico y formulaciones. España. Patente ES 2293085T3. 16/03/2008.

Gomis M. (2008). Agente de control biológico y formulaciones. España. Patente ES 2294348T3. 01/04/2008.

Hamlen R. Power R. (1998). Distribution of sensitivity responses to cymoxanil within global populations of *Phytophthora infestans*. *Pesticide science* 53: 101-103.

Hansen R. Johnson J. (2007). Heat Treatments for postharvest pest Control. CABI, Wallingford, Reino Unido: 349.

Heil M. (2009) Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in Plant Science*, 14, 356-363.

Heil M. Land W. (2014) Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life. *Frontiers in Plant Science*, 5, art. 579.

Heil M. Vega I. (2018). Nucleic acid sensing in plants and mammals - facts and caveats. MS submitted for 'NUCLEIC ACID SENSING AND IMMUNITY - PART B' serial INTERNATIONAL REVIEW OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

Hideo I. (2006). Impact of Fungicide Resistance in Plant Pathogens on Crop Disease Control and Agricultural Environment. *JARQ* 40 (3), 205 – 211.

Hong, S.-Y., Roze, L.V. and Linz, J.E. (2013a) Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins*, 5, 683–702.

Ibáñez A. Zafra O. González P. (2017). Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology* (8) 1390: 1-19.

Jiang, C., Zhang, S., Zhang, Q., Tao, Y., Wang, C. and Xu, J.R. (2015) FgSKN7 and FgATF1 have overlapping functions in ascospore germination, pathogenesis and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environ. Microbiol.* 17, 1245–1260.

Juárez G. Sosa M. López A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 4(2): 14-23.

Kawasaki, T., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunological reviews*, 243(1), 61-73.

Kloepper, J. Ryu C. Zhang S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.

Kolb, J. P., Oguin, T. H., Oberst, A. Martinez, J. (2017) Programmed cell death and inflammation: 1630 winter is coming. *Trends in Immunology*, 38, 705-718.

Kong P. Moorman. G. Lea-cox J. Ross D. Richardson P. Hong C. (2009). Zoospore tolerance to pH stress and its implications for *Phytophthora* species in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(13):4307-4314.

König, J., Muthuramalingam, M. and Dietz, K.-J. (2012) Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and targets. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 261–268.

Kono Y. Yamamoto H. Takeuchi M. Komada H (1995) Alterations in superoxide dismutase and catalase in *Fusarium oxysporum* during starvation-induced differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1268:35-40

Lee S. Milgroom M. Taylor J. (1998). A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from Fungi. *Fungal Genetics Reports*: Vol. 35, Article 11. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1531>

Lee Y. Son H. Shin JY. Choi GJ. Lee YW (2017) Genome-wide functional characterization of putative peroxidases in the head blight fungus *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology* (2018) 19(3), 715–730

Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. and Toledano, M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulations in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16 040–16 046.

Liu CJ, Men WJ, Liu YJ, et al. (2002). The pollution of pesticides in soils and its bioremediation. *System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*, 18(4): 295-297

LiWZ, WangYL, ZhuJY, et al. Differential DNA methylation may contribute to temporal and spatial regulation of gene expression and the development of mycelia and conidia in entomopathogenic fungus *metarhizium robertsii*. *Fungal Biol-Uk*. 2017 Mar;121(3):293–303. PubMed PMID: WOS:000395614700008; English.

López A. López S. Vázquez M. Rodríguez S. (2005). Inhibición del Crecimiento Micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante Extractos Vegetales Acuáticos. *Revista mexicana de Fitopatología* 23(2): 183-190.

Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 331–42.

Mazzoleni S (2014). Composition comprising nucleic acids of parasitic, pathogenic or weed biological systems for inhibiting and/or controlling the growth of said systems and process for the preparation thereof. Patent Application WO 2014/020624A9.

Mazzoleni S. Bonanomi G. Incerti G. Chiusano M. Termolino P. Mingo A. Senatore M. Giannino F. Carteni F. Rietkerk M. Lanzotti V. (2015a). Inhibitory and toxic effects of extracellular self-DNA in litter: a mechanism for negative plant–soil feedbacks?. *New Phytologist* 205: 1195–1210 doi: 10.1111/nph.13121

Mazzoleni S. Bonanomi G. Incerti G. Chiusano M. Termolino P. Migliozi A. Senatore M. Giannino F. Carteni F. Rietkerk M. Risitano A. Lanzotti V. (2014). New perspectives on the use of nucleic acids in pharmacological applications: inhibitory action of extracellular self-DNA in biological systems. *Phytochem Rev* 13:937–946 DOI 10.1007/s11101-014-9386-9.

Mazzoleni S. Carteni F. Bonanomi G. Senatore M. Termolino P. Giannino F. Incerti G. Rietkerk M. Lanzotti V. Chiusano M. (2015b) Inhibitory effects of extracellular self-DNA: a general biological process? *New Phytologist* 206: 127–132 doi: 10.1111/nph.13306

Medina E. Esquivel E. Heil M. Herrera A. (2014). Extracellular ATP activates MAPK and ROS signaling during injury response in the fungus *Trichoderma atroviride*. *Frontiers in Plant Science* 659 (5): 1-11. doi: 10.3389/fpls.2014.00659

Michielse C.B. and Rep M. (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 10, 311–324.

Mir, A.A., Park, S.-Y., Sadat, M.A., Kim, S., Choi, J., Jeon, J. and Lee, Y.H. (2015) Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in Magnaporthe oryzae. *Sci. Rep.* 5, 11 831.

Montanini B, Chen PY, Morselli M, et al. Non-exhaustive DNA methylation-mediated transposon silencing in the black truffle genome, a complex fungal genome with massive repeat element content. *Genome Biol.* 2014;15(7). ARTN 411. DOI:10.1186/s13059-014-0411-5. PubMed PMID: WOS:000346603300007; English.

Montes R. (1996). Productos naturales de origen vegetales para el combate de fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14:9-14.

Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C. and Ponts, N. (2015) Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 295–308.

NORMA Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003, Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial. DOF: 20/10/2004

O'Neill, L. A. (2013). Sensing the dark side of DNA. *Science*, 339(6121), 763-764.

Oerke E. (2006). Crop losses to pest. *Journal of Agricultural Science* 144, 31–43. doi:10.1017/S0021859605005708

Okshevsky M. Meyer R. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 341-352. doi: 10.3109/1040841X.2013.841639

Olmos J. (2009). Cepa De Bacillus Subtilis Para Uso Agrícola. Patente WO 2009/031874A1. 12/03/2009.

Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Mudge SR, Schenk PM, Christie M, Carroll BJ, Schmidt S. 2010. DNA is taken up by root hairs and pollen, and stimulates root and pollen tube growth. *Plant Physiology* 2010: 799–805.

Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA. Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*. 2001;411:817–20.

Pisetsky, D. S. (2012). The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clinical Immunology*, 144(1), 32-40.

R.W.S. Weber, G.E. Wakley, E. Thines, N.J. Talbot. The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma*, 216 (2001), pp. 101-112

Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica, Documento Técnico N° 11. (2013). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. Washington, DC.

Romero J. (1996). Método para la obtención de cepas mejoradas de *Trichoderma spp.* Patente WO 1996/018722A2. 08/12/1995

Roy S. Grünwald N. (2014). The plant destroyer genus *Phytophthora* in the 21st century. *Rev. Plant Pathol.* 6:388-412.

S. Ben Khedher, et al., Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato, *C. R. Biologies* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2015.09.005>

Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:469–78.

Serrano E. (1997). Formulación líquida en base de cepas de los hongos filamentosos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*. Patente WO 1997/016974A1. 07/11/1996

Shrivastava, G., León-Juárez, M., García-Cordero, J., Meza-Sánchez, D. E. Cedillo-Barrón, L. (2016) Inflammasomes and its importance in viral infections. *Immunologic Research*, 64, 1101-1117.

Soto A. Rodríguez G. Fernández Y. Pedraza M. López L. Díaz M. Fernández S. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora spp.* enfoque aplicado a la investigación. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 8 (8): 867-1880.

Tanaka K, Choi J, Cao Y, Stacey G. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front Plant Sci.* 2014;5:446.

Thomas C. Nielsen K. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3: 711–721

Toapanta D, Morillo L, Viera W. (2017). Diagnóstico molecular de *Phytophthora cinnamomi* asociado a la pudrición radicular en zonas productoras de aguacate en Ecuador. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 18(2):285-294

U. S. Department of Health and human Services (USDHHS). (1992). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for 1,2-dibromoethane. Public Health Service. Atlanta, GA.

U. S. Environmental Protection Agency (USEPA). (2001). Protection of stratospheric ozone: proces for exempting quarantine and preshipment applications of methyl bromide. Rules an Regulations. *Federal Register*, 66 (139): 37752-37769.

United Nations Environmental Program (UNEP). (1995). Montreal Protocol on Substances that deplete the Ozono Layer. Report of methyl bromide technical options commitee: Assessment, Ozone Secretariat, Nairobi, Kenya.

Uribe L. Castro L. Arauz F. Henríquez C. Blanco M. (2014). PUDRICIÓN BASAL CAUSADA POR *Phytophthora capsici* EN PLANTAS DE CHILE TRATADAS CON VERMICOMPOST1. *Agron. Mesoam*. 25(2):243-253. ISSN:2215-3608

Vega-Muñoz, I., Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I. Guevara-González, R. G. (2018) Exogenous fragmented DNA acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa*. *Functional Plant 2015 Biology*, publ. online, May 2018, DOI: 10.1071/FP18011.

Veresoglou SD, Aguilar-Trigueros CA, Mansour I, Rillig MC. 2015. Self-DNA: a blessing in disguise? *New Phytologist* 207: 488–490.

Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. 2009. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiology* 151: 820–829.

Wolfram A. (2014). Composition comprising a biological control agent and an insecticide. Bayer Cropscience AG. International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (Pct). Patente WO 2014/086758 A3.

Yakushiji, S., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. Ichinose, Y. (2009) Bacterial DNA activates immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, 75, 227-234.

Yatim, N., Cullen, S. Albert, M. L. (2017). Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *2055 Nature Reviews Immunology*, 17, 262-275.

Zavaleta E. (1987). Modificadores orgánicos en el manejo de enfermedades de la raíz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 5:159-168.

Zavaleta-Mejía, E. (1994). Control biológico de fitopatógenos con origen en el suelo y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 12:107-111

Zemach A, McDaniel IE, Silva P, et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*. 2010 May 14;328(5980):916–919. PubMed PMID: WOS:000277618800056; English.

Zhang W. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 8(1): 1-27

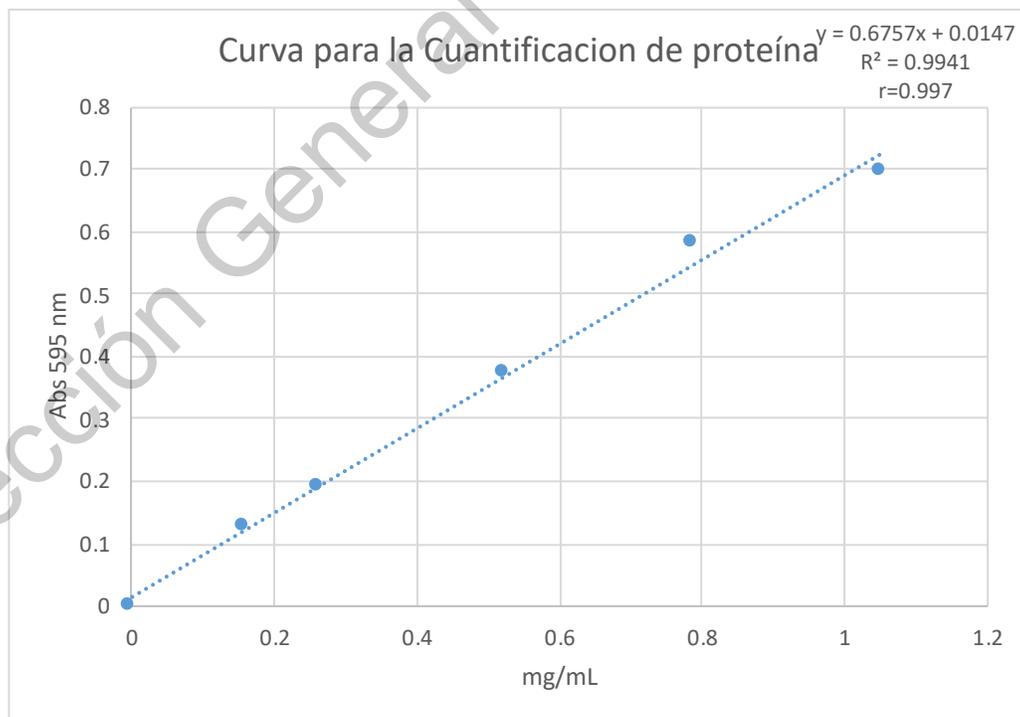
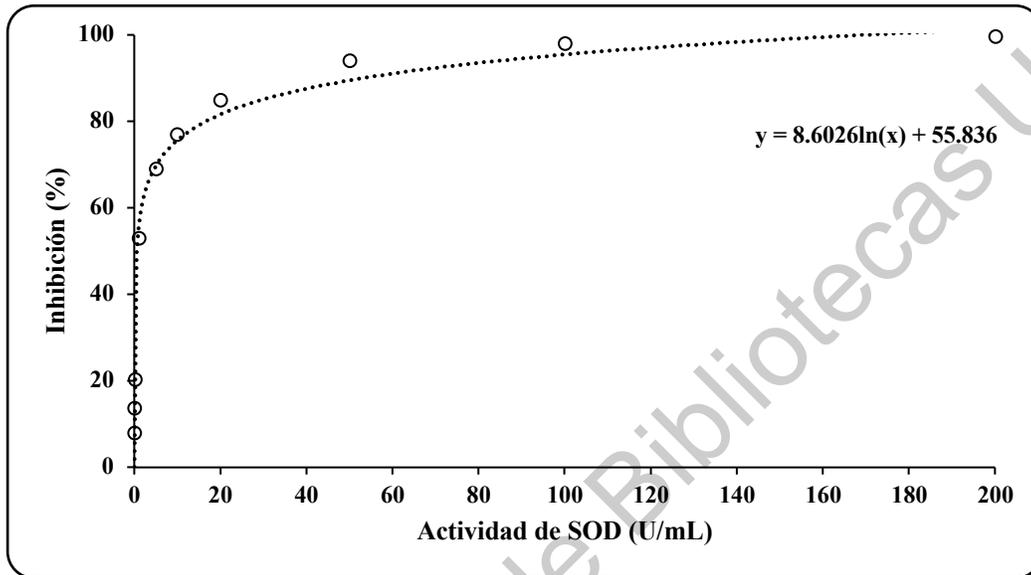
Zhang WJ, Liu GH. (2017). Situation and development of worldwide agri-environment: Agricultural land uses, fertilizers consumption and carbon dioxide equivalent emissions. *Environmental Skeptics and Critics*, 6(1): 1-8

Zhang WJ. (2011). Constructing ecological interaction networks by correlation analysis: hints from community sampling. *Network Biology*, 1(2): 81-98

Zhu YJ, Xu J, Sun C, et al. Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense*. *Sci Rep-Uk*. 2015 Jun 5;5. UNSP 11087. DOI:10.1038/srep11087. PubMed PMID: WOS:000355879400001; English.

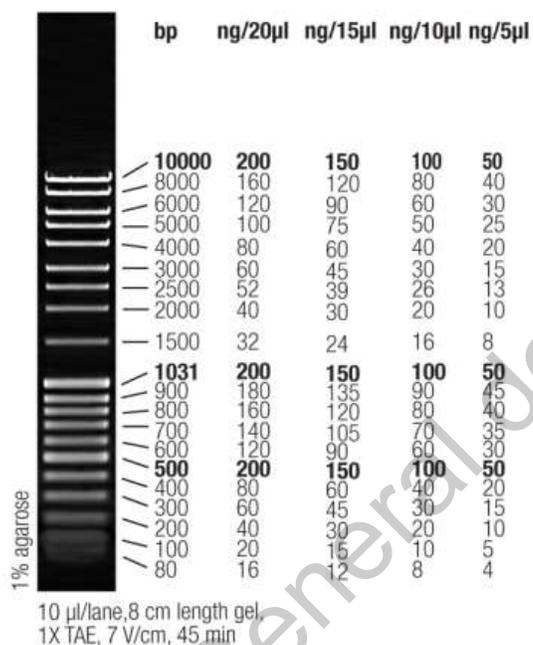
## ANEXOS

### A. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ENSAYOS ENZIMÁTICOS



## B. MARCADORES DE PESO MOLECULAR UTILIZADOS

**MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use**



**GeneRuler 100 bp DNA Ladder**

