



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
CAMPUS TUXTEPEC

**“Uso de nanopartículas para el control de  
*Penicillium digitatum* en frutos de naranja (*Citrus  
sinensis*) mediante silenciamiento génico  
inducido por aspersión”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
Maestro en Biotecnología

PRESENTA:  
Jose Ignacio Basilio Olvera

Directora: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, 2024



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/560
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de noviembre de 2024

**M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA**  
VICE-RECTOR ACADÉMICO  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que, el jurado evaluador del examen para obtener el grado de **Maestro en Biotecnología** del **c. José Ignacio Basilio Olvera**, con número de **Matrícula 22140006**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Uso de nanopartículas para el control de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja (*Citrus sinensis*) mediante silenciamiento génico inducido por aspersión”**, para su posterior presentación y defensa por el sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Atentamente  
*terra uberrima, mens aperta*  
Bøu Lo-tama, chí jí jú

**Dr. José Abad Zavaleta**

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa – Directora de tesis.  
C.c.p. Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo – Coordinador de la Maestría en Biotecnología  
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo.



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/561
ASUNTO	Jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de noviembre de 2024

**C. JOSÉ IGNACIO BASILIO OLVERA**  
**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestro en Biotecnología** estará integrado por los siguientes investigadores.

Profesor Investigador	Jurado de Examen
Dr. Oscar Núñez Gaona	Presidente
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Secretario
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	Vocal
Dr. Enrique Villalobos Amador	Primer Suplente
Dr. José Abad Zavaleta	Segundo Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú

**Dr. José Abad Zavaleta**  
Jefe de la división de estudios  
de posgrado.



**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vicerrector Académico

Vo. Bo. **VICE-RECTORIA  
ACADEMICA**



C.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa – Directora de tesis.  
C.c.p. Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo – Coordinador de la Maestría en Biotecnología  
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Con apoyo del Proyecto de Ciencia de Frontera-FORDECYT-PRONACES-CONACYT con número 552286.

El sustentante, Jose Ignacio Basilio Olvera, Contó con beca CONACYT para estudios de maestría, asignada al programa de Maestría en Biotecnología (PNPC 003131)

## **Hoja de originalidad**

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Los resultados de este trabajo se presentaron en modalidad de cartel en el “XXX National Plant Biochemistry and Molecular Biology congress”, celebrado en la ciudad de Oaxaca, Oaxaca. Del 16 al 20 de octubre de 2023:

Jose Ignacio Basilio-Olvera, Julián Mario Peña-Castro, Blanca Estela Barrera Figueroa (2023). “Double-stranded RNAs (dsRNAs) as biofungicides against *Penicillium digitatum* for the protection of orange fruits (*Citrus sinensis*) in the postharvest stage”

Los resultados de este trabajo se presentaron en modalidad oral en el “1er Simposio, Avances de la Investigación Básica y Aplicada en el Agro Mexicano”, celebrado en la ciudad de Loma Bonita, Oaxaca. El 14 y 15 de Marzo de 2024:

Jose Ignacio Basilio-Olvera, Julián Mario Peña-Castro, Blanca Estela Barrera Figueroa (2023). “RNAs de doble cadena (dsRNAs) como biofungicidas contra *Penicillium digitatum* para la protección de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) en la etapa poscosecha”

## **Agradecimientos**

A Dios por permitirme alcanzar este logro y ponerme al lado de personas que me han impulsado.

A mis padres, Ignacio Basilio Flores y Emilia Olvera Gasperin por creer en mí y darme la oportunidad de tener una carrera universitaria, por los sacrificios y esfuerzos que hicieron por mí, este logro y los que están por venir son de ustedes también, sin ustedes respaldándome no hubiera podido llegar tan lejos.

A mis abuelos maternos por el apoyo incondicional y siempre inculcarme el amor a la ciencia, por sus consejos y amor sin medida. A mis tíos por sus motivaciones y por brindarme de su ayuda. Mis hermanos, hermanas y familiares que han estado en el trayecto del camino.

A Albóndiga, Mi gato, quien me acompañó en mis noches de desvelo con los trabajos de la maestría.

A mis compañeros de laboratorio, MBt. Lucisabel, MBt. Saribel, IBt. Jorge García, por su amistad y la ayuda brindada durante mi estadía y trabajo experimental, por sus consejos, motivación y de esta manera haciendo que el ambiente de trabajo fuera ameno.

Al Dr. Julián Mario Peña Castro, por todo el apoyo brindado, tanto académico, moral y personal. Por los consejos y estar siempre dispuesto a resolver dudas que surgieran.

Agradecimiento a MCQ. Beatriz Castro Hilario por su apoyo en el análisis en la FE-SEM (FIELD EMISSION SCANNING ELECTRON MICROSCOPE), marca TESCAN MIRA 3 LMU.

Finalmente agradecer a la Dra. Blanca Estela Figueroa por haber aceptado ser mi directora de tesis (Ingeniería y Maestría), por la dirección, consejos, apoyo académico y personal, por los recursos. Por la confianza que depositó en mí y por el cariño brindado. Es una persona a la cual admiro mucho y tengo en gran estima, fue de las mejores decisiones haber trabajado con usted y me inspira a ser un investigador, es un ejemplo a seguir.

# Índice

1	Introducción .....	1
1.1	Los hongos fitopatógenos y su control.....	1
1.2	Generalidades del RNAi .....	2
1.3	El RNAi en la interacción planta-hongo patógeno .....	3
1.4	El uso de RNAi como estrategia para el control de hongos fitopatógenos .....	4
1.4.1	Silenciamiento génico inducido por aspersión (SIGS).....	5
1.4.2	Consideraciones para la aplicación de SIGS .....	8
1.5	Uso de nanopartículas en la estrategia SIGS .....	10
1.6	El patosistema <i>Citrus sinensis:Penicillium digitatum</i> .....	14
1.7	Antecedentes directos de SIGS para el control de <i>P. digitatum</i> en naranja ...	17
2	Justificación .....	20
3	Hipótesis.....	21
4	Objetivos.....	21
4.1	Objetivo general.....	21
4.1.1	Objetivos específicos.....	21
5	Materiales y métodos.....	23
5.1	Establecimiento del patosistema de estudio en el laboratorio .....	23
5.1.1	Material biológico.....	23
5.1.2	Ensayos de infección y actividad fungicida preliminares .....	23
5.2	Elaboración y caracterización de nanopartículas de LDH (MgAl).....	25
5.2.1	Síntesis de nanopartículas LDH (MgAl) .....	25
5.2.2	Caracterización de nanopartículas LDH (MgAl) .....	26
5.3	Elaboración y caracterización de las bioarcillas .....	26
5.3.1	Generación de construcciones para la síntesis de dsRNAs .....	26
5.3.2	Síntesis de RNAs.....	28
5.3.3	Formulación de la bioarcilla y caracterización.....	30
5.4	Bioensayos de actividad fungicida sobre frutos de naranja .....	31
5.4	Análisis estadístico .....	32
6	Resultados y discusión .....	33
6.1	Establecimiento del patosistema <i>Penicillium digitatum-Citrus sinensis</i> en condiciones de laboratorio.....	33
6.1.1	Evaluación del efecto de la concentración del inóculo .....	33



6.1.2	Efecto de la luz sobre la incidencia y desarrollo de la infección .....	36
6.1.3	Efecto de un fungicida químico sintético en la incidencia y desarrollo de la infección	39
6.1.4	Efecto del modo de aplicación del fungicida sintético sobre la incidencia y desarrollo de la infección .....	45
6.1.5	Investigación de <i>Vitis vinifera</i> como modelo alternativo para la infección con <i>P. digitatum</i> .....	48
6.2	Síntesis de nanopartículas de LDH.....	49
6.3	Selección de la región de diseño de los dsRNAs de Quitina sintasa VII y $\beta$ -tubulina .....	52
6.3.1	Clonación de fragmentos de $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII .....	54
6.4	Síntesis de RNAs.....	55
6.4.1	Elaboración y caracterización de la bioarcilla.....	58
6.5	Evaluación de la actividad fungicida de bioarcillas de dsRNAs:LDH sobre <i>P. digitatum</i> .....	60
6.5.1	Bioensayo preliminar con dsRNAs y dsRNA:LDH contra FET5 y Mic-33/NIP	60
6.5.2	Bioensayo de actividad fungicida de dsRNAs FET5, Mic/NIP, DCL1/2 y $\beta$ -Tubulina, desnudos y en bioarcillas con LDH .....	63
7	Conclusiones .....	73
8	Perspectivas .....	74
9	Referencias .....	75

# Índice de figuras

Figura 1 Representación del mecanismo de RNA de interferencia..	2
Figura 2 Intercambio de RNAi entre planta y patógeno.....	4
Figura 3 Efecto fungicida de dsRNAs empleados en SIGS.....	7
Figura 4 Eventos en la toma y procesamiento de dsRNAs que son relevantes para la efectividad de la estrategia SIGS.....	9
Figura 5 Adherencia de dsRNA cargado en nanopartículas de LDH.....	11
Figura 6 Evidencia de la estabilidad aumentada de dsRNAs con el uso de nanopartículas LDH. ....	12
Figura 7 Efectos de SIGS en la protección de plantas de garbanzo, empleando dsRNAs para el silenciamiento de DCL1/2 en el patógeno <i>Botrytis cinerea</i> .....	13
Figura 8 Síntomas del moho verde causado por <i>P. digitatum</i> .....	15
Figura 9 Progresión temporal de los síntomas en naranja infectada con <i>P. digitatum</i> a 25°C.....	15
Figura 10 Diagrama simplificado de los factores moleculares involucrados en la infección de <i>P. digitatum</i> sobre el fruto de naranja.....	17
Figura 11 Efecto inhibitorio de ldsRNAs y sdsRNAs sobre la germinación de esporas <i>in vitro</i> .....	19
Figura 12 Desarrollo de la infección de <i>P. digitatum</i> en naranjas tratadas con agua (control) y con dsRNAs contra FET, Mic-33 y NIP..	19
Figura 13. Secuencia experimental.....	22
Figura 14. Recuperación de <i>P. digitatum</i> .....	33
Figura 15. Efecto de la concentración del inóculo sobre el desarrollo de la infección, desde $1 \times 10^3$ hasta $1 \times 10^7$ esporas/mL. ....	34
Figura 16. Efecto de dos concentraciones de inóculo ( $1 \times 10^5$ y $1 \times 10^3$ esporas/mL) sobre la incidencia y desarrollo de la infección. ....	36
Figura 17. Incidencia y desarrollo de infección por <i>P. digitatum</i> en frutos de naranja en condiciones de luz y oscuridad. i.....	37
Figura 18. Análisis estadístico de efecto de la luz en el desarrollo de infección de frutos de naranja por <i>P. digitatum</i> .	
Figura 19. Evaluación de la incidencia y desarrollo de infección de <i>Penicillium digitatum</i> . ....	40
Figura 20. Análisis estadístico de efecto de benomilo sobre el desarrollo de la infección de frutos de naranja por <i>P. digitatum</i> . ....	41
Figura 21. Incidencia de infección de <i>P. digitatum</i> en frutos de naranja.....	42
Figura 22. Imágenes transversales de frutos de naranja utilizadas en el ensayo con fungicida..	44

Figura 23. Análisis estadístico del efecto de los métodos de aplicación del fungicida sobre el desarrollo de la infección de frutos de naranja por <i>P. digitatum</i> .....	46
Figura 24. Bioensayo con fungicida químico.....	47
Figura 25. Bioensayo para evaluar la capacidad infectiva de <i>P. digitatum</i> en uvas.....	48
Figura 26. Solubilidad de MgAl-LDH's en agua.. ..	49
Figura 27. Nanopartículas de MgAl-LDH observadas por SEM.....	50
Figura 28. Resultados de caracterización microscópica de MgAl-LDH. ....	51
Figura 29. Resultados del análisis BLAST de los genes seleccionados contra la base de RNA mensajeros de <i>C. sinensis</i> .....	52
Figura 30. Región seleccionada de 500pb del gen $\beta$ -tubulina para su amplificación... 53	
Figura 31. Resultados de BLASTn para evaluar homologías entre la región de 500pb seleccionada de $\beta$ -tubulina y el genoma de <i>Citrus sinensis</i> . ....	54
Figura 32. Productos de amplificación de PCR de colonia de la clonación de los fragmentos de $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII.....	55
Figura 33. Productos de amplificación de la región de $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII..56	
Figura 34. Productos de síntesis de ldsRNAs de $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII. Gel de agarosa 1% en TAE 1X .....	57
Figura 35. Amplicones de <i>FET5</i> , las construcciones <i>Mic-33/NIP</i> y <i>DCL 1/2</i> .....	57
Figura 36. Productos de la síntesis de ldsRNAi y sdsRNAi de <i>FET5</i> , la construcción <i>Mic33-NIP</i> y <i>DCL 1/2</i> .. ..	58
Figura 37. Ensayo de retención de dsRNAs en nanopartículas mediante electroforesis.. ..	59
Figura 38. Ensayo de retención de dsRNAs en nanopartículas mediante electroforesis.. ..	60
Figura 39. Evaluación de efectos no esperados de nanopartículas sobre <i>P. digitatum</i> .. ..	61
Figura 40. Evaluación de los efectos fungicidas de dsRNAs (desnudos e hibridados con LDH).. ..	62
Figura 41. Bioensayo de efecto fungicida de dsRNAs.....	63
Figura 42. Ensayo de retención. Antes de realizar el bioensayo se exploró la relación correcta de dsRNAs:LDH.....	64
Figura 43. Réplica 1 del bioensayo de efectos de dsRNAs sobre <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja.....	65
Figura 44. Réplica 2 del bioensayo de efectos de dsRNAs sobre <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja.....	66
Figura 45. Réplica 3 del bioensayo de efectos de dsRNAs sobre <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja.....	67
Figura 46. Agrupaciones de Tukey con un nivel de confianza del 95%. ....	69
Figura 47. Incidencia de infección.....	70
Figura 48. Trabajo realizado por Gu <i>et al.</i> (2018).....	71

Figura 49. Evaluación de la capacidad infectiva de <i>P. italicum</i> mutantes en genes DCL1 (A) y DCL2 (B)..	72
---	----

## Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros de BLASTn utilizados para evaluar los efectos off-target.	27
Tabla 2. Componentes del mix para la PCR de colonia usando de molde parte de la colonia.	28
Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificar la construcciones con el promotor T7 a partir de plásmido	28
Tabla 4. Oligonucleótidos para amplificar las regiones seleccionadas y añadir a los extremos el promotor T7.	29
Tabla 5. Preparación de reacciones de síntesis de ldsRNAi y sdsRNAi	29
Tabla 6. Preparación de reacciones de PCR para la amplificación de las construcciones seleccionadas.	30
Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR	30
Tabla 8. Formulaciones y controles de los bioensayos de actividad fungicida	31
Tabla 9. Diseño experimental para los bioensayos	31
Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía del bioensayo con fungicida químico (benomilo) con 3 réplicas.	42
Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía de la incidencia de infección con 3 réplicas.	43
Tabla 12. ANOVA de Bioensayo de actividad fungicida de dsRNAs FET5, Mic/NIP, DCL1/2 y $\beta$ -Tubulina, desnudos e hibridados a LDH.	68

# 1 Introducción

## 1.1 Los hongos fitopatógenos y su control

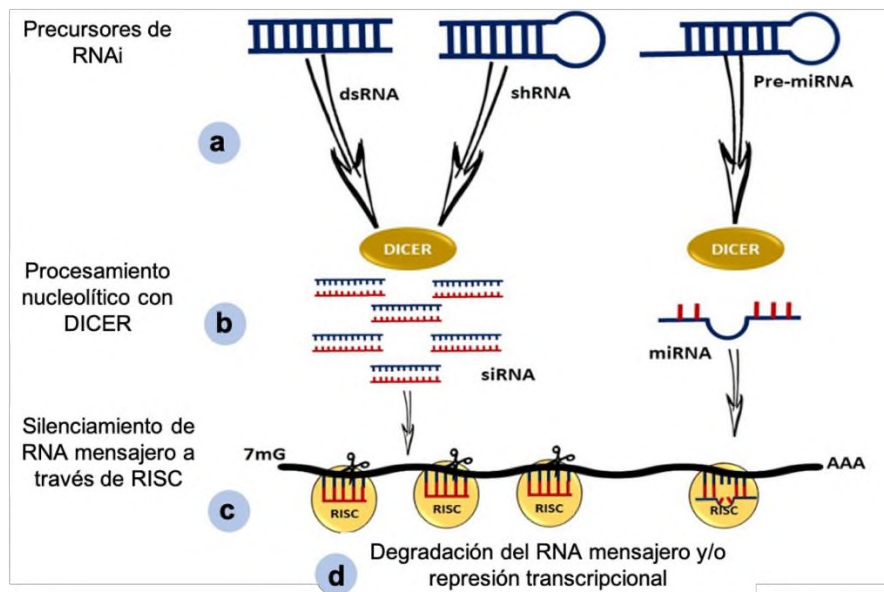
Las enfermedades causadas por hongos en plantas se ubican como uno de los problemas más graves que impactan negativamente los rendimientos y la calidad de diversos cultivos en todos los niveles de la escala productiva (Yang *et al.*, 2017). Se estima que existen cerca de 19,000 hongos fitopatógenos que afectan los cultivos alrededor del mundo (Jain *et al.*, 2019), lo que los convierte en el grupo más diverso de amenazas biológicas para las plantas (Doehlemann *et al.*, 2017).

Los hongos fitopatógenos poseen una gran diversidad de estilos de vida y de estrategias para infectar a las plantas, produciendo una variedad de síntomas como antracnosis, marchitamiento, pudrición, tumores, manchas y royas, entre otros. Varios hongos fitopatógenos son biótrosos, por lo que dependen de su interacción con las plantas y sus tejidos vivos, mientras que otros son necrótrofos, es decir, que causan necrosis y eventualmente la muerte de las plantas, y otros son hemibiótrosos pues inician como biótrosos y finalizan como necrótrofos (Yang *et al.*, 2017).

El crecimiento de las poblaciones humanas en las últimas décadas se ha sustentado en el incremento de la producción de alimentos a través de la agricultura intensiva. El control de las enfermedades causadas por hongos ha sido de vital importancia en este proceso, y se ha logrado principalmente mediante el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, el uso indiscriminado de éstos ha provocado daños al ambiente por su acumulación, y ha potencializado la emergencia y dispersión de patógenos resistentes a los fungicidas en nuevos cultivos y en nuevos lugares (Fones *et al.*, 2020). Debido a esto, en los últimos años se han buscado estrategias de base biotecnológica para el control de las enfermedades causadas por hongos, que no dañen al ambiente ni promuevan la adquisición de resistencia en los fitopatógenos (Bocos-Asenjo *et al.*, 2022). Una de estas estrategias se basa en el fenómeno de RNA de interferencia, o RNAi.

## 1.2 Generalidades del RNAi

El RNAi es un mecanismo altamente conservado en organismos eucariotas, donde desencadena un proceso conocido como silenciamiento génico postranscripcional. En el RNAi, moléculas cortas (20-25 nt) de RNA duplex (double-stranded RNA o dsRNA) son generadas a partir de moléculas largas (Fig. 1a) por la actividad de corte de la enzima DICER (DCL; Fig. 1b). Posteriormente, una de las cadenas del RNA duplex corto se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por RNA-Inducing Silencing Complex; Fig. 1c). La cadena corta de RNA puede reconocer la secuencia de RNAs mensajeros específicos por complementación de bases, lo que resulta en el rompimiento endonucleolítico del RNA mensajero y/o en su represión transcripcional, y por consecuencia, en su silenciamiento (Fig. 1d) (Muhammad *et al.*, 2019; Wilson y Doudna, 2013).

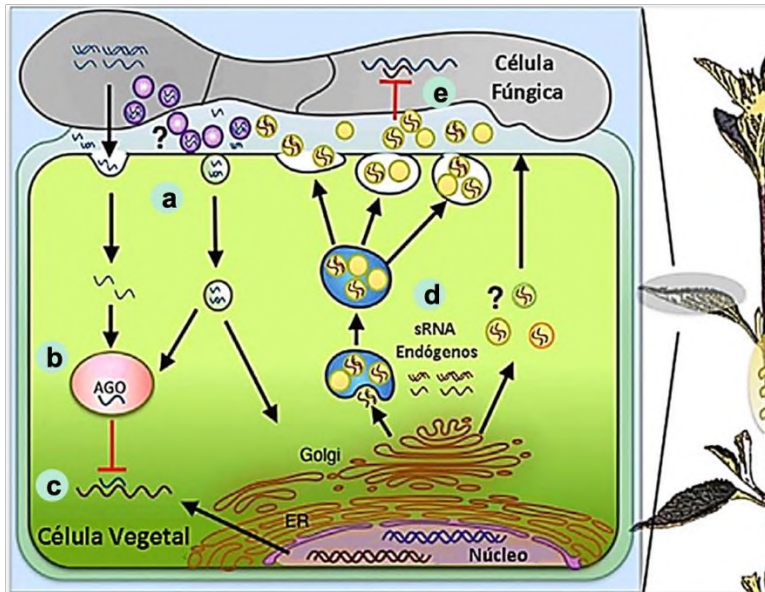


**Figura 1 Representación del mecanismo de RNA de interferencia.** a) El proceso inicia con la biosíntesis de los precursores de RNA de doble cadena (dsRNAs). b) los precursores se procesan por DICER para generar dsRNAs cortos. c) Los RNAs pequeños son tomados por el complejo RISC para inducir el silenciamiento génico, d) por degradación del mRNA objetivo y/o la represión transcripcional (modificado de Mello y Conte 2004).

### 1.3 El RNAi en la interacción planta-hongo patógeno

En plantas, el RNAi es parte esencial de la defensa ante el ataque de hongos patógenos. La presencia de dsRNAs exógenos desencadena la respuesta de RNAi en la planta para controlar la virulencia del agente invasor, así como para inducir los mecanismos de inmunidad y mediar la comunicación entre planta y patógeno. Por su parte, el hongo patógeno también activa las respuestas de RNAi para inducir el silenciamiento de genes en la planta e inhibir sus respuesta inmunitarias. El movimiento de RNAi de la planta hacia el hongo, y del hongo hacia la planta sucede gracias a que el RNAi puede atravesar los límites celulares y viajar de un organismo a otro. A este proceso se le conoce como comunicación entre reinos o RNAi *cross-kingdom* (Wang *et al.*, 2016).

En la Fig. 2 se esquematiza el proceso de intercambio de RNAi que se establece en la interacción planta-patógeno. Los hongos patógenos, al ser eucariotas, poseen la ruta de biosíntesis de RNAi. Los dsRNAs sintetizados por el patógeno se transportan a la célula vegetal por vía directa o a través de vesículas extracelulares (Fig 2a), y una vez dentro, se integran a las proteínas ARGONAUTA (AGO) en el complejo RISC (Fig. 2b), desde el cual reconocen RNA mensajeros de defensa de la planta y los conducen al silenciamiento por degradación nucleolítica o represión transcripcional, debilitando su capacidad de responder al ataque del patógeno (Fig. 2c). Por su parte, la planta también produce dsRNAs (Fig. 2d) que son transportados en vesículas extracelulares hacia el patógeno para silenciar genes de virulencia y así controlar el ataque (Fig. 2e).



**Figura 2 Intercambio de RNAi entre planta y patógeno.** a) Síntesis y transporte de dsRNA fúngicos hacia la planta. b) Incorporación de RNAi en el complejo RISC. c) procesamiento nucleolítico y represión transcripcional de RNA mensajeros de la planta. d) Síntesis de dsRNAs endógenos vegetales, e) transporte de dsRNAs en vesículas para el silenciamiento de genes de virulencia fúngicos (modificada de Huang *et al.*, 2019).

## 1.4 El uso de RNAi como estrategia para el control de hongos fitopatógenos

A partir del conocimiento del proceso de intercambio de dsRNA que ocurre naturalmente entre la planta y los patógenos eucariotas se han desarrollado estrategias para el control de las enfermedades en plantas. Una de éstas, conocida como HIGS (Silenciamiento inducido por el huésped), se basa en la modificación genética de la planta para que exprese dsRNAs dirigidos contra RNA mensajeros importantes en el patógeno. Con la tecnología HIGS se ha probado que es posible controlar enfermedades vegetales causadas por hongos como *Fusarium verticillioides* en tabaco (Tinoco *et al.*, 2010), *Blumeria graminis* en cebada y trigo (Nowara *et al.*, 2010), *F. graminearum* en trigo (Cheng *et al.*, 2015), y *F. oxysporum* en banana (Dou *et al.*, 2020), entre otros.



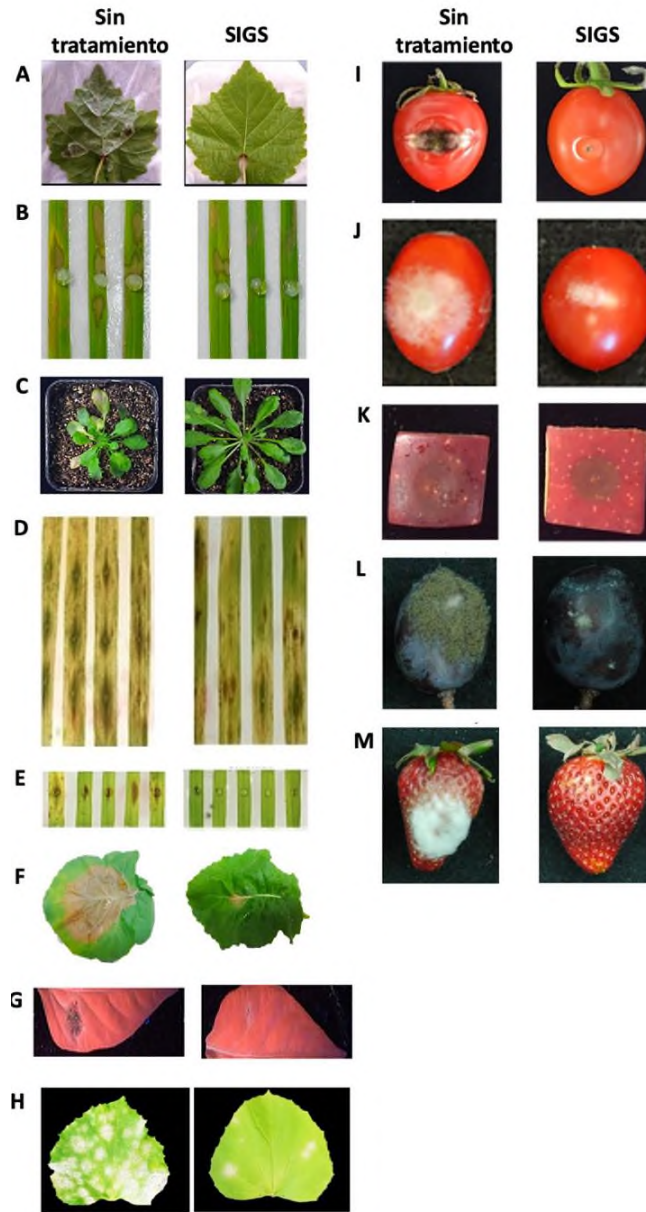
Aunque HIGS ha mostrado resultados positivos en el control de enfermedades fúngicas, tiene la desventaja de que requiere la transformación genética de la planta para que produzca los dsRNAs de interés. El cultivo de plantas transformadas genéticamente no está permitido en un gran número de países, lo que ha frenado la aplicación de esta tecnología a una escala mayor.

Para evadir la generación de plantas transformadas genéticamente, es posible obtener efectos de protección vegetal similares si los dsRNAs se agregan de forma externa al sistema planta-patógeno en forma de aspersión (Koch *et al.*, 2019). Esta técnica se denomina silenciamiento génico inducido por aspersión, o SIGS, por sus siglas en inglés.

#### **1.4.1 Silenciamiento génico inducido por aspersión (SIGS)**

SIGS consiste en la aplicación de RNAs de doble cadena (RNAi, dsRNAs) exógenos, diseñados para silenciar genes clave para el desarrollo, el crecimiento y/o la infectividad del patógeno, de tal manera que afecten su capacidad de interactuar con la planta y de establecer la infección y sus efectos. La aplicación de los dsRNAs se realiza de forma tópica en forma de aspersión sobre las superficies de la planta infectada. A partir de ahí existen dos vías posibles para entrar a las células fúngicas: de forma directa, ya que se ha demostrado que una gran parte de hongos son capaces de internalizar moléculas de dsRNAs a partir del ambiente (Šečić y Kogel, 2021), y de forma indirecta, cuando la planta primariamente toma los dsRNAs ambientales y el hongo los recibe de ésta.

Desde sus inicios en 2016, la tecnología SIGS ha demostrado su efectividad para controlar hongos fitopatógenos como *Fusarium graminearum* en cebada (Koch *et al.*, 2016) mediante la aplicación de dsRNAs para silenciar el gen p450 lanosterol C-14 $\alpha$ -desmetilasa (CYP51), o como *Botrytis* y *Verticillium spp.*, al silenciar los genes DCL1 y DCL2 implicados en la biogénesis de dsRNAs en los hongos (Wang *et al.*, 2016), así como para el silenciamiento de  $\beta$ -tubulina, Gu *et al.*(2018) el cual mostró una actividad antifúngica contra *Fusarium spp.*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae* y *Colletotrichum truncatum*. Entre otros ejemplos que se citan en la Fig. 3. En todos los casos, la aplicación de dsRNAs en las 24 horas previas a la inoculación con esporas del patógeno limitó el desarrollo de las lesiones causadas por el hongo, tanto en hojas como en frutos de diversas plantas.



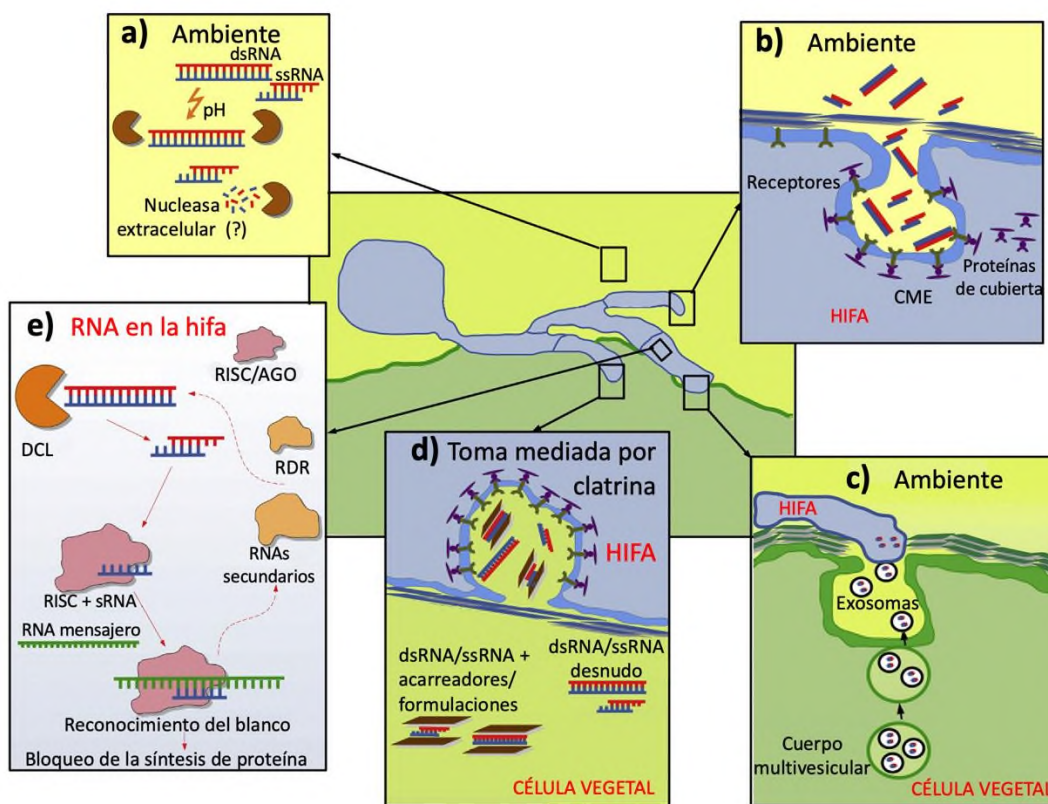
**Figura 3 Efecto fungicida de dsRNAs empleados en SIGS.** Patosistema/gen(es) diana: A) Uva-*Plasmopara viticola*, DCL1 y DCL2 (Haile et al., 2021), B) Arroz-*Rhizoctonia solani*, DCTN y SAC, y C) *A. thaliana*-*Verticillium dahliae*, DCL1 y DCL2 (Qiao et al., 2021); D) Cebada-*Fusarium graminearum*, DCL1 y DCL2 (Werner et al., 2020); E) Cebada-*F. graminearum*, CYP51 (Koch et al., 2019); F) *Brasica napus*-*Sclerotinia sclerotiorum*, Tioredoxina reductasa (McLoughlin et al., 2018); G) *Capsicum annum*-*Phytophthora capsici*, efectores RLXR1 y RLXR4 (Cheng et al., 2022), H) *Cucurbita pepo*-*Podosphaera xanthii*, glycosil transferasa putativa (Ruíz-Jiménez et al. 2021), I) Jitomate-*Aspergillus niger*, DCTN y SAC, J) Jitomate-*Botrytis cinerea*, DCL1 y DCL2, K) Manzana-*A. niger*, DCTN y SAC (Qiao et al., 2021); L) Uva-*B. cinerea*, DCL1 y DCL2, y M) Fresa-*B. cinerea*, DCL1 y DCL2 (Wang et al., 2016). DCTN: Dinactina. SAC: Supresor de actina. DCL: Dicer-like. CYP51: Esterol 14 $\alpha$  demetilasa.

## 1.4.2 Consideraciones para la aplicación de SIGS

Uno de los aspectos más importantes para la aplicación de SIGS en patógenos de interés es el potencial de los dsRNAs para silenciar a los genes diana, lo que depende de una buena elección del gen diana y de la región que sea apropiada para lograr el silenciamiento efectivo, maximizando la eficiencia específica, y minimizando la probabilidad de silenciar genes en especies no blanco (Höfle *et al.*, 2020). Entre los genes más empleados en SIGS se encuentran DCL1 y DCL2, así como la familia de genes CYP51, mencionados anteriormente en los trabajos pioneros. Además, se han explorado otros genes, como tubulina (Gu *et al.*, 2018), dinactina, quitina-sintasa y supresor de actina, entre otros citados en la Fig. 3. En cuanto a la selección de la región para el silenciamiento, Song *et al.* (2018) demostraron que al elegir diferentes regiones del gen de Miosina 5 en *Fusarium asiaticum* para el diseño de dsRNAs obtuvieron eficiencias distintas en el efecto fungicida, lo que indica que el silenciamiento de Miosina 5 depende de la región seleccionada.

Además de la elección correcta del gen diana y de la región de diseño, la efectividad de SIGS depende de la capacidad del patógeno para internalizar dsRNAs ambientales (Fig. 4a). Para la toma de los dsRNAs ambientales directamente se requiere que éstos pasen a través de la pared celular y la membrana plasmática del hongo. Se ha demostrado, por ejemplo, que mientras algunas especies como *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *Verticillium dahliae*, entre otros, logran absorber dsRNAs ambientales, otras especies como *Colletotrichum gloeosporioides* no lo hacen eficientemente (Qiao *et al.*, 2021). Se ha reportado en el caso del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* que la entrada de dsRNAs hacia las células fúngicas se lleva a cabo por endocitosis mediada por clatrina o CME (Wytinck *et al.*, 2020), por lo que la funcionalidad de CME en el patógeno podría ser un factor determinante para el éxito de la estrategia SIGS (Fig. 4b).

Por otra parte, los dsRNAs pueden pasar primariamente hacia la planta y posteriormente ser entregados por éstas al patógeno (Fig. 4c-d). Para esto, los dsRNAs deben ser capaces de atravesar las barreras estructurales de la célula vegetal (cutícula, pared celular y membrana plasmática), así como evitar la degradación por nucleasas vegetales (Bennett *et al.*, 2020). Aunque el proceso de entrega de RNAi de la planta hacia el hongo aún no se ha dilucidado completamente, se ha propuesto que los dsRNAs son transportados al hongo a través de vesículas extracelulares (Cai *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021), y que este proceso está mediado por proteínas de unión a RNA (He *et al.*, 2021).



**Figura 4 Eventos en la toma y procesamiento de dsRNAs que son relevantes para la efectividad de la estrategia SIGS.** a) Estabilidad de los dsRNAs ante el ambiente y posibles nucleasas. b) Toma de dsRNAs directamente del ambiente hacia el hongo. c) toma de dsRNAs a partir de la planta vía vesículas extracelulares. d) Toma de dsRNAs protegidos por acarreadores/formulaciones mediante endocitosis. e) Maquinaria fúngica de procesamiento y amplificación de RNAs secundarios. Modificado de Šečić y Kogel (2021).

El paso de dsRNAs hacia la planta tiene además el beneficio de que las células vegetales poseen el mecanismo para producir sRNAs secundarios mediante la actividad de sus RDRs (RNA polimerasas dependientes de RNA), con lo cual logran amplificar la señal inicial y potenciar el efecto silenciador (Chen *et al.*, 2020). Este mecanismo también está presente en los hongos, aunque en algunos casos de forma insuficiente. Por ejemplo, en *Fusarium asiaticum* la amplificación de sRNAs secundarios es débil, y por lo tanto, no es posible mantener el silenciamiento de forma consistente a menos que se apliquen los dsRNAs repetitivamente de forma exógena (Song *et al.*, 2018). Esta es una condición a considerar cuando se diseña una estrategia SIGS contra ciertos hongos patógenos con maquinaria de RNAs secundarios limitada, o que no posee las proteínas para el adecuado procesamiento del RNAi (Fig. 4e; Šečić y Kogel, 2021).

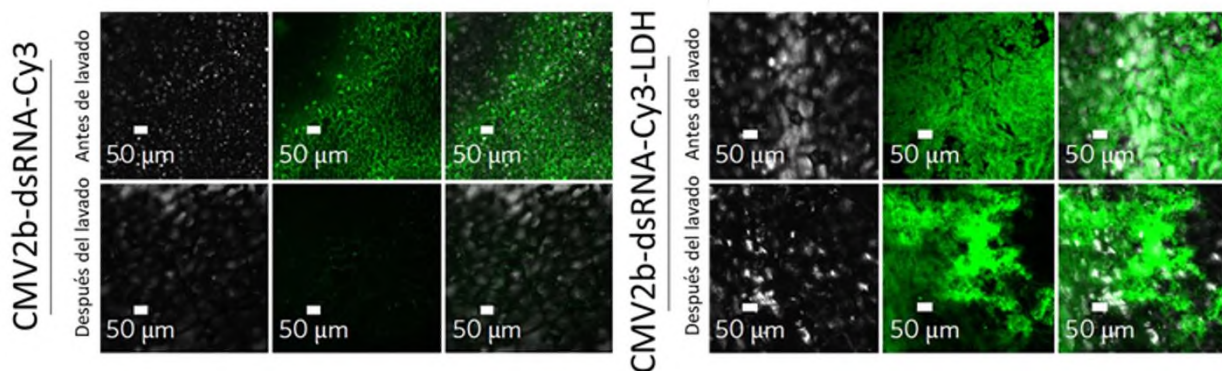
Independientemente de que la vía de toma por parte del hongo sea directamente del ambiente o a través de la planta, la estabilidad de los dsRNAs es un factor determinante primario, por lo tanto, se requiere que en el proceso se evite su degradación por efecto del ambiente, de las propias nucleasas fúngicas o de las nucleasas vegetales. La protección de la estabilidad de los dsRNAs puede lograrse con el uso de acarreadores (Fig. 4d), tales como nanovesículas artificiales (Qiao *et al.*, 2023) y nanopartículas (Niño-Sánchez *et al.*, 2022).

## **1.5 Uso de nanopartículas en la estrategia SIGS**

Las nanopartículas comúnmente empleadas en SIGS son las LDH (hidróxidos de doble capa). Estas son una clase de arcillas aniónicas con una estructura similar a la brucita ( $Mg[OH]_2$ ), en la que parte de los cationes divalentes de las capas formadas son sustituidos por trivalentes, produciendo capas cargadas positivamente en posición apilada. El espacio intermedio de las capas se llena electrostáticamente (con un equilibrio de carga) de aniones hidratados con moléculas de  $H_2O$  formando una estructura laminar (Choi y Choy, 2011).

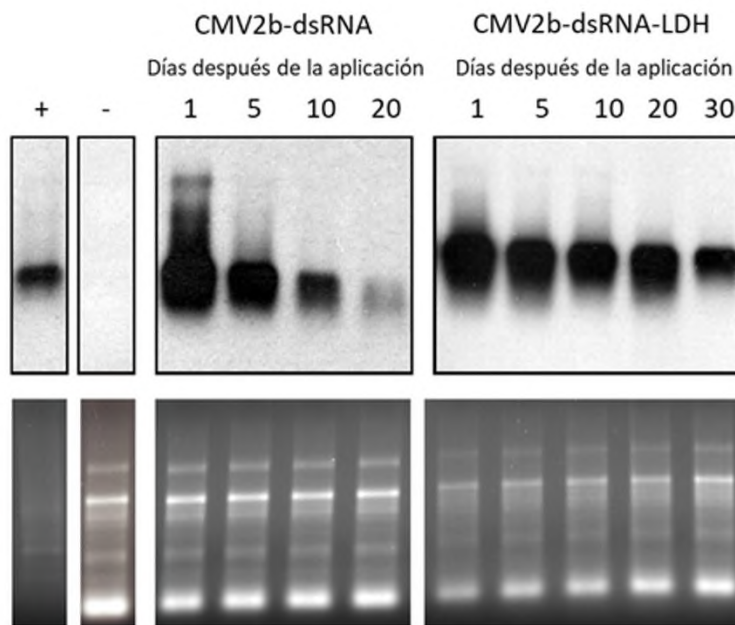
La carga positiva de LDH permite interactuar con las cargas negativas de la membrana celular mediando eficientemente la entrega intracelular. Debido a sus diversas aplicaciones, la síntesis de LDH y su caracterización ha aumentado al igual que su desarrollo (Yan *et al.*, 2019).

Mitter *et al.* (2017) demostraron que las nanopartículas de LDH se pueden cargar con dsRNAs largos, formando el complejo dsRNA-LDH (*BioClay*, o Bioarcilla). Los dsRNAs en el BioClay están protegidos de nucleasas y pueden permanecer hasta 30 días sobre la superficie de la hoja, manteniéndose protegidos de las condiciones ambientales, aunado a que las nanoláminas de LDH se degradan completamente después de un periodo de tiempo. De esta manera se brinda protección sistémica a las hojas rociadas y a las hojas emergidas después de la aplicación contra patógenos específicos. En la Figura 5A se muestran imágenes microscópicas de hojas de *Arabidopsis thaliana* que fueron tratadas con RNAs marcados (Cy3) contra CMV2b. En el panel izquierdo los dsRNAs se aplicaron desnudos, mientras que en el panel derecho se aplicaron en nanopartículas LDH, observando que cuando los dsRNAs no estaban protegidos, no se retenían en las hojas pues el lavado los eliminaba. En cambio, cuando los dsRNAs se aplicaron en nanopartículas, éstos se adhirieron a las hojas de forma eficiente.



**Figura 5 Adherencia de dsRNA cargado en nanopartículas de LDH.** Microscopia confocal de hojas de *Arabidopsis* 24 horas postratamiento antes y después del lavado. Imagen BF, Bright-field (columna 1), Cy3 fluorescente (columna 2), una fusión de ambas (Columna 3). Panel izquierdo: dsRNAs desnudos. Panel derecho: dsRNAs en nanopartículas LDH. (Mitter *et al.*, 2017)

Además de mejorar la capacidad de adherencia a las hojas, el uso de nanopartículas permitió aumentar la estabilidad de los dsRNAs. En la Fig. 6, se muestra la integridad de los dsRNAs a lo largo del tiempo transcurrido tras su aplicación en la superficie de las hojas. Se observa que cuando los dsRNAs se aplican desnudos (panel izquierdo, CMV2b-dsRNA), éstos se degradan en un lapso de 20 días, mientras que cuando se aplican en nanopartículas, su estabilidad se extiende más allá de 30 días (panel derecho).

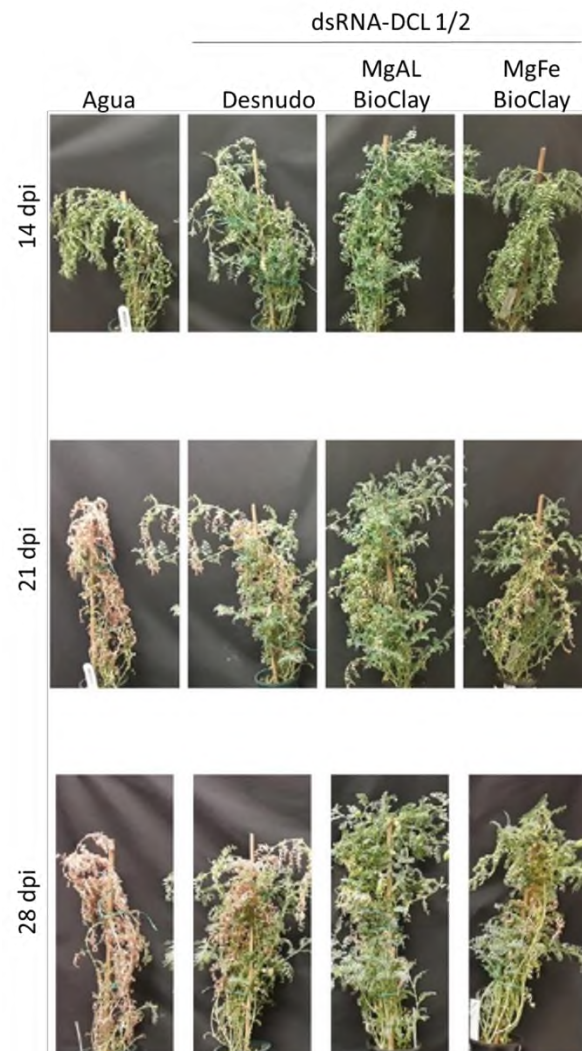


**Figura 6 Evidencia de la estabilidad aumentada de dsRNAs con el uso de nanopartículas LDH.** Análisis por Northern blot que muestra que CMV2b-dsRNA está completamente degradado a los 20 días mientras que CMV2b-dsRNA-LDH aún puede ser detectado a los 30 días. El carril (+) es un transcrito *in vitro* de CMV2b-dsRNA como control, carril (-) es RNA extraído de hojas de *N. tabacum* sin tratamiento. El panel inferior muestra la carga igual de RNA (Mitter *et al.*, 2017).

Trabajos posteriores al de Mitter *et al.*, (2017) han demostrado la efectividad del Bioclay contra insectos plaga como la mosquita blanca (Jain *et al.*, 2022). Por su parte, Niño-Sánchez *et al.* (2022) comparó la longevidad de dsRNA desnudo y con BioClay, dirigido a brindar protección contra *Botrytis cinerea* y demostró que el BioClay prolonga la protección mediada por RNAi contra *B. cinerea* en hojas de tomate y sus frutos, así como



en plantas maduras de garbanzo. Para esto generó dos tipos de nanopartículas: de MgAl y de MgFe, observando efectos de protección similares en plantas de jitomate (Fig. 7).



**Figura 7 Efectos de SIGS en la protección de plantas de garbanzo, empleando dsRNAs para el silenciamiento de DCL1/2 en el patógeno *Botrytis cinerea*.** Se muestran los tratamientos con agua, dsRNAs desnudos, y dsRNAs con nanopartículas de MgAl y MgFe, a los 14, 21 y 28 días posteriores a la infección (dpi) (Niño-Sánchez *et al.*, 2022).

Teniendo en cuenta el potencial de la estrategia SIGS como herramienta amigable al ambiente que no requiere la generación de plantas modificadas genéticamente, es

importante continuar la exploración de patosistemas en los que aún no se ha probado. Un patosistema interesante por su importancia para el trópico mexicano y que amerita la implementación de una estrategia SIGS efectiva es *Citrus sinensis:Penicillium digitatum*.

## 1.6 El patosistema *Citrus sinensis:Penicillium digitatum*

La naranja (*Citrus sinensis*) es el cítrico de mayor producción mundial, y México ocupa el cuarto lugar como país productor (FAOSTAT, s.f.). El estado de Veracruz ha sido por mucho el mayor productor de naranjas, con el 50% de la superficie plantada y el 55% de la producción total durante 2018/19, por ejemplo. Otros estados productores importantes son Tamaulipas, San Luis Potosí y Puebla, además de otros estados que en conjunto contribuyen con las 342,716 Ha totales dedicadas al cultivo de 4,389,364 toneladas de naranja en el país (USDA, 2020).

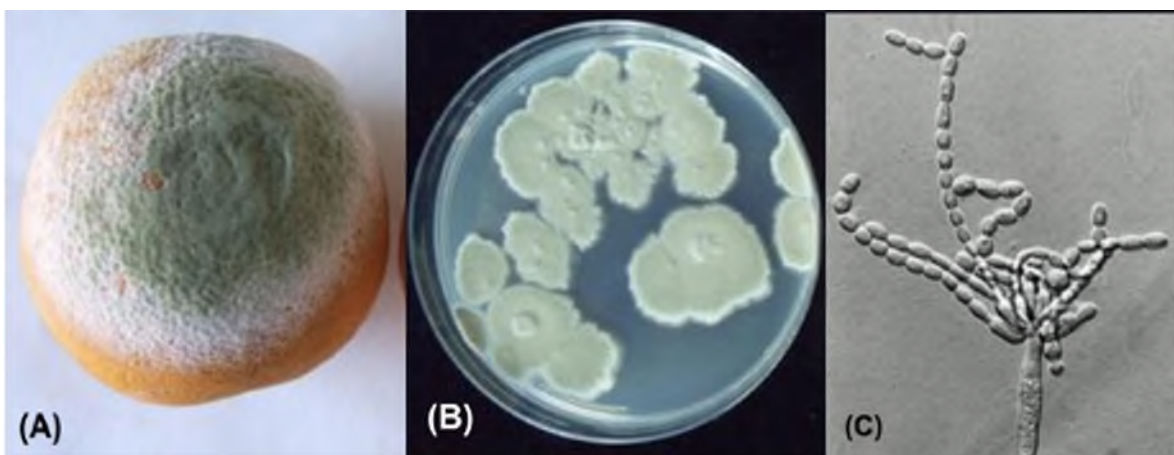
El cultivo de naranja enfrenta una serie de problemáticas ocasionadas por una diversidad de organismos fitopatógenos que originan enfermedades derivando en un bajo rendimiento y/o estropeando en fruto cosechado. En particular, una de las más graves es la pudrición poscosecha conocida comúnmente como moho verde o moho azul, causadas por *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*. Estas formas de pudrición poscosecha causan hasta el 90% de las pérdidas totales de cítricos (Cheng *et al.*, 2020).

*Penicillium digitatum* es un hongo necrotrófico que crece en la superficie de la naranja en estadio poscosecha, este produce esporas color verde oliva características y comúnmente se conoce como “moho verde” (Ariza *et al.*, 2002). Pertenece a la división *Ascomycota* y genero *Penicillium*. Sus conidiosporas asemejan manos con dedos largos, siendo esto la causa del nombre “digitatum” (Fig. 8).

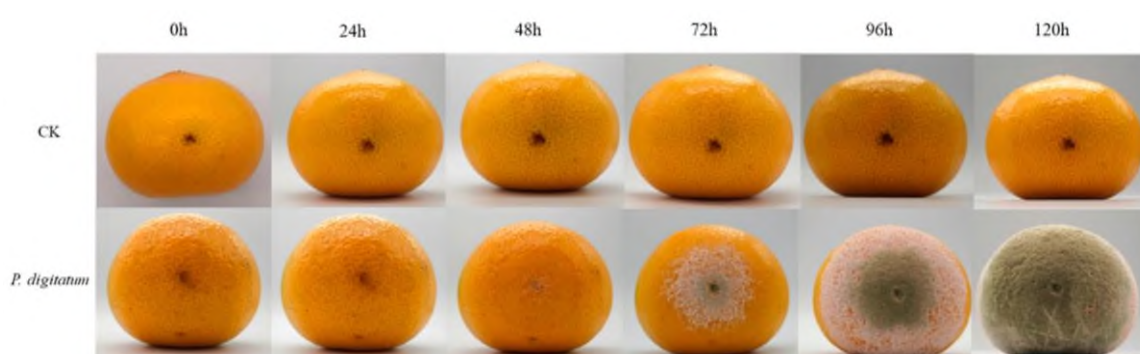
*P. digitatum* es capaz de infectar a los cítricos a través de heridas que se pueden originar por factores ambientales, tal como el viento, granizo o insectos (Costa *et al.*, 2019) o de igual forma durante la etapa poscosecha, siendo que la infección ocurra mientras se cortan los frutos del árbol, en el transporte, en las casas de empaquetado o en la

comercialización, por lo que, para reducir las pérdidas por pudrición del fruto en la cosecha, es crucial establecer medidas para el correcto manejo, transporte y almacenamiento de los frutos (Yang *et al.*, 2019).

El proceso de infección comienza cuando las esporas entran en contacto con las heridas del fruto, en el área de infección aparece una mancha acuosa blanda sobre la cáscara del fruto, si las condiciones son las correctas, aparecerá micelio blanco y posteriormente (48h-72h) producirá esporas color verde oliva características de la infección (Fig. 9).



**Figura 8 A) síntomas del moho verde causado por *P. digitatum*; B) Colonias de *P. digitatum*; C) Conidiosporas de *P. digitatum* (Bautista-Baños 2014).**

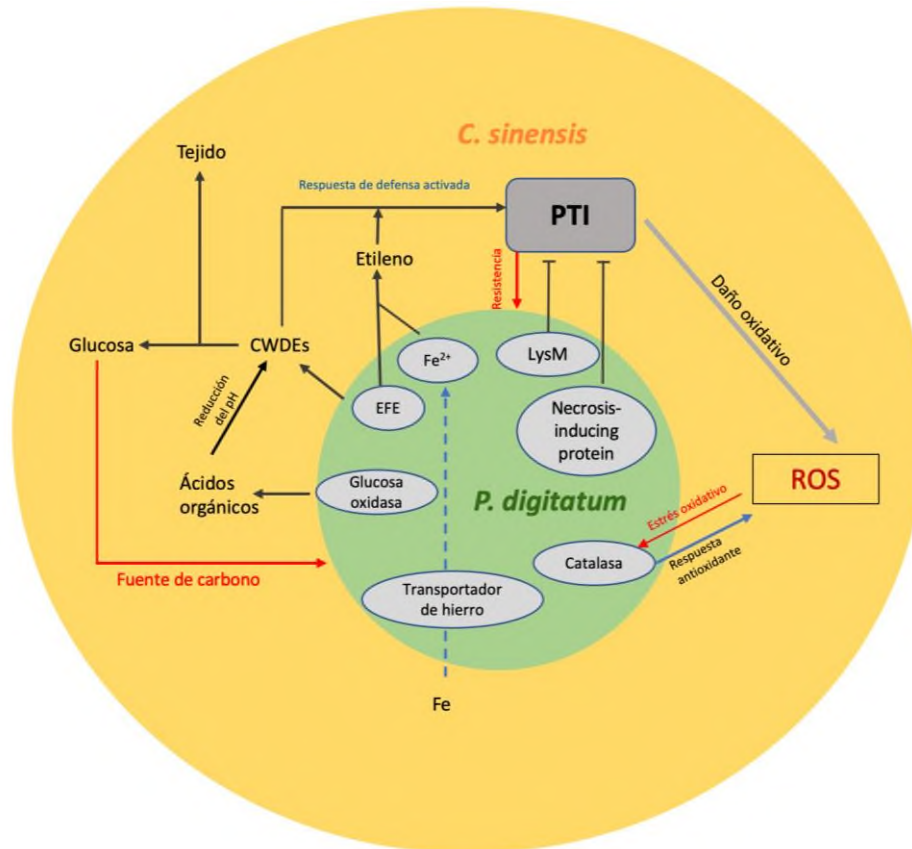


**Figura 9 Progresión temporal de los síntomas en naranja infectada con *P. digitatum* a 25°C. CK: Control inoculado con agua (Qian *et al.*, 2019).**

Estudios de transcriptómica de *P. digitatum* han dilucidado una serie de genes que están involucrados en el establecimiento de la infección (Fig. 10). Estos genes no solo se relacionan con el desarrollo del patógeno, sino también con su respuesta ante la defensa

oxidativa del huésped, la necesidad de romper las barreras celulares del fruto, la acidificación del sustrato, y la producción de efectores patogénicos.

La respuesta de defensa por parte de la planta involucra la producción de especies reactivas de oxígeno, como el  $H_2O_2$ , que actúan para inhibir directamente el crecimiento del hongo y/o para señalar la respuesta hipersensible de muerte celular, a lo que *P. digitatum* responde suprimiendo la producción de  $H_2O_2$  (Macarisin *et al.*, 2007). Para esto, *P. digitatum* induce la expresión de enzimas antioxidantes en el proceso de infección como la catalasa y la glutatión-S-transferasa, logrando bloquear la respuesta de defensa del huésped (Fig. 10). Además de esto, varios genes de virulencia conocidos por codificar enzimas degradadoras de pared celular, CWDEs por sus siglas en inglés, como pectinasas y celulasas (Qian *et al.*, 2019) se expresan fuertemente para ayudar a los patógenos a romper las barreras del tejido del fruto y de esta manera acceder a los nutrientes que requiere para crecer (Fig. 10), añadiendo que también se ha demostrado que por parte del huésped se producen flavonoides, estos actúan como una barrera química en el tejido cítrico más externo y pueden considerarse fitoalexinas contra *P. digitatum*, como las polimetoxiflavonas (Costa *et al.*, 2019).



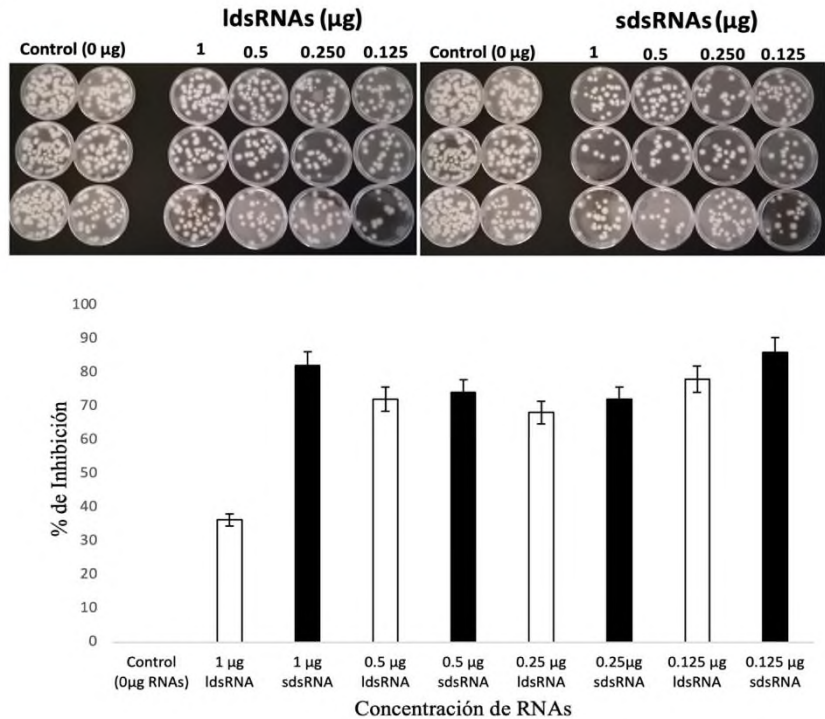
**Figura 10 Diagrama simplificado de los factores moleculares involucrados en la infección de *P. digitatum* sobre el fruto de naranja.** EFE: Enzima formadora de etileno; CWDEs: Enzimas degradadoras de pared celular; LysM: Efecto que contiene dominio de Lisina; PTI: I. Modificado de Yang *et al.* (2019).

## 1.7 Antecedentes directos de SIGS para el control de *P. digitatum* en naranja

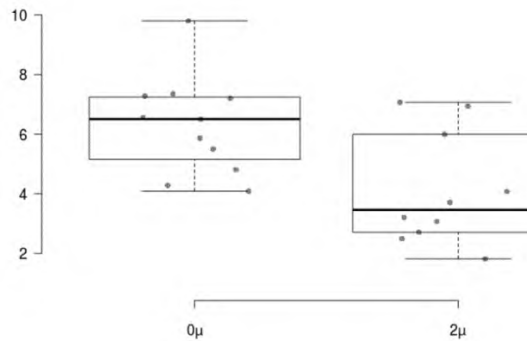
El primer antecedente del uso potencial de SIGS para el control de *Penicillium* se enfoca en *P. italicum* (Yin *et al.*, 2020). En dicho trabajo se observó que la aplicación de dsRNAs dirigidos al silenciamiento de DCL1 y DCL2 lograron controlar la progresión de la infección sobre frutos de mandarina, demostrando la capacidad de *P. italicum* para tomar dsRNAs ambientales o a través del tejido vegetal. Dado que *P. italicum* está relacionado genéticamente con *P. digitatum*, y tienen preferencias similares de huéspedes, es posible que *P. digitatum* posea capacidades similares para la toma de dsRNAs ambientales para el silenciamiento de genes DCL. Por lo tanto, existen altas posibilidades de que la estrategia SIGS sea efectiva para el control de *P. digitatum* sobre el fruto de naranja.

Previamente en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan se diseñó una construcción que consiste de una fusión de DCL1 y DCL2 de *P. digitatum* flanqueada por la secuencia del promotor T7 en ambos extremos (Santiago, 2019). Dicha construcción se empleó como molde para la síntesis dsRNAs largos y cortos, los cuales fueron aplicados a diferentes dosis sobre esporas de *P. digitatum* mediante un bioensayo *in vitro* (Ramírez, 2022). Como resultado se observó que los dsRNAs cortos lograron reducir la germinación de las esporas hasta en un 80% lo que sugiere que *P. digitatum* logra tomar dsRNAs ambientales (Fig. 11). No obstante, a pesar de la alta efectividad de los dsRNAs cortos para inhibir la germinación de las esporas, cuando los tratamientos se aplicaron directamente en frutos no se observaron diferencias contundentes en la inhibición del desarrollo del hongo.

Posteriormente, con base en el conocimiento de los mecanismos de infección de *P. digitatum* (Costa *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020), se diseñaron dsRNAs para silenciar los genes *FET5*, *Mic-33*, *NIP*, que participan en el transporte de hierro, precursores de etileno y en la inducción de la necrosis, respectivamente. Estos dsRNAs se probaron desnudos en bioensayos en frutos de naranja (Basilio, 2022), observando diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo del hongo debidas al efecto de la aplicación de los dsRNAs (Fig. 12). Sin embargo, no se descarta que el efecto pueda incrementarse mediante el empleo de nanopartículas que promuevan una mayor estabilidad y transferencia eficiente de los dsRNAs hacia el hongo.



**Figura 11 Efecto inhibitorio de ldsRNAs y sdsRNAs sobre la germinación de esporas *in vitro*.** En la gráfica inferior se muestra el porcentaje de inhibición. El mayor efecto ocurre a concentraciones de sdsRNA de 1 µg y 0.125 µg, con 82 % y 86 %, respectivamente (Ramírez, 2022).



**Figura 12 Desarrollo de la infección de *P. digitatum* en naranjas tratadas con agua (control) y con dsRNAs contra FET, Mic-33 y NIP.** Las líneas centrales muestran las medianas; los límites de las casillas indican los percentiles 25 y 75 determinados por el software R; los bigotes se extienden 1,5 veces el rango intercuartílico desde los percentiles 25 y 75. n = 11, 10 puntos de muestra (Basilio, 2022).

## 2 Justificación

El cultivo de naranja (*Citrus sinensis*) es una actividad agrícola importante y de alta derrama económica que enfrenta pérdidas por el ataque de patógenos en distintas etapas de la cadena productiva. Entre estos patógenos, *Penicillium digitatum* es uno de los más importantes ya que causa hasta el 90% de las pérdidas en la etapa poscosecha.

El combate de *P. digitatum* se lleva a cabo principalmente mediante el uso de fungicidas químicos que contaminan el ambiente, constituyen un riesgo a la salud y tienden a crear resistencia en el patógeno. Debido a lo anterior, la estrategia SIGS (Spray-Induced Gene Silencing) surge como alternativa biotecnológica viable, que emplea RNAs de doble cadena (dsRNAs) para silenciar genes claves del patógeno.

Estudios previos realizados en el laboratorio de Biotecnología Vegetal indican que es posible emplear SIGS para el control de *P. digitatum* en frutos de naranja. Al aplicar dsRNAs dirigidos al silenciamiento de DCL1 y DCL2, dos genes clave para la síntesis de RNAs pequeños, se inhibió la germinación de esporas de *P. digitatum* en bioensayos *in vitro*, demostrando así el potencial de la herramienta SIGS. Por otra parte, la aplicación de dsRNAs contra tres genes importantes para la virulencia del patógeno (FET5, Mic-33, NIP) ocasionó una disminución en el crecimiento del hongo en bioensayos con frutos de naranja. Sin embargo, estos efectos podrían incrementarse, ya que la poca estabilidad y corta vida media del RNA en condiciones ambientales hace que sea necesario que se les proteja para extender su efectividad, y esto puede ser facilitado por usando nanotransportadores de hidróxidos de doble capa o nanopartículas de arcilla. Partiendo de esto se propone en este protocolo prolongar la vida de los dsRNAs sobre el fruto por medio de LDH y así incrementar su efectividad para silenciar genes involucrados en la virulencia con un efecto protector sobre los frutos de naranja.



### **3 Hipótesis**

El uso de nanopartículas de LDH incrementará la efectividad de una formulación de dsRNAs dirigidos contra los genes *DCL1/2*, *FET5* y *Mic-33/NIP* para la protección de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) en la etapa poscosecha.

### **4 Objetivos**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el uso de nanopartículas de LDH para incrementar la efectividad de una formulación de dsRNAs para el control de *P. digitatum* en naranjas.

#### **4.1.1 Objetivos específicos**

1. Establecer el patosistema *P. digitatum-Citrus sinensis* en condiciones de laboratorio reproducibles.
2. Elaborar nanopartículas de LDH (MgAl) para la entrega del biofungicida.
3. Elaborar y caracterizar la formulación de bioarcilla constituida por nanopartículas LDH y los dsRNAs diseñados.
4. Determinar el efecto de la formulación de bioarcilla en el control de *P. digitatum* en bioensayos sobre frutos de naranja.

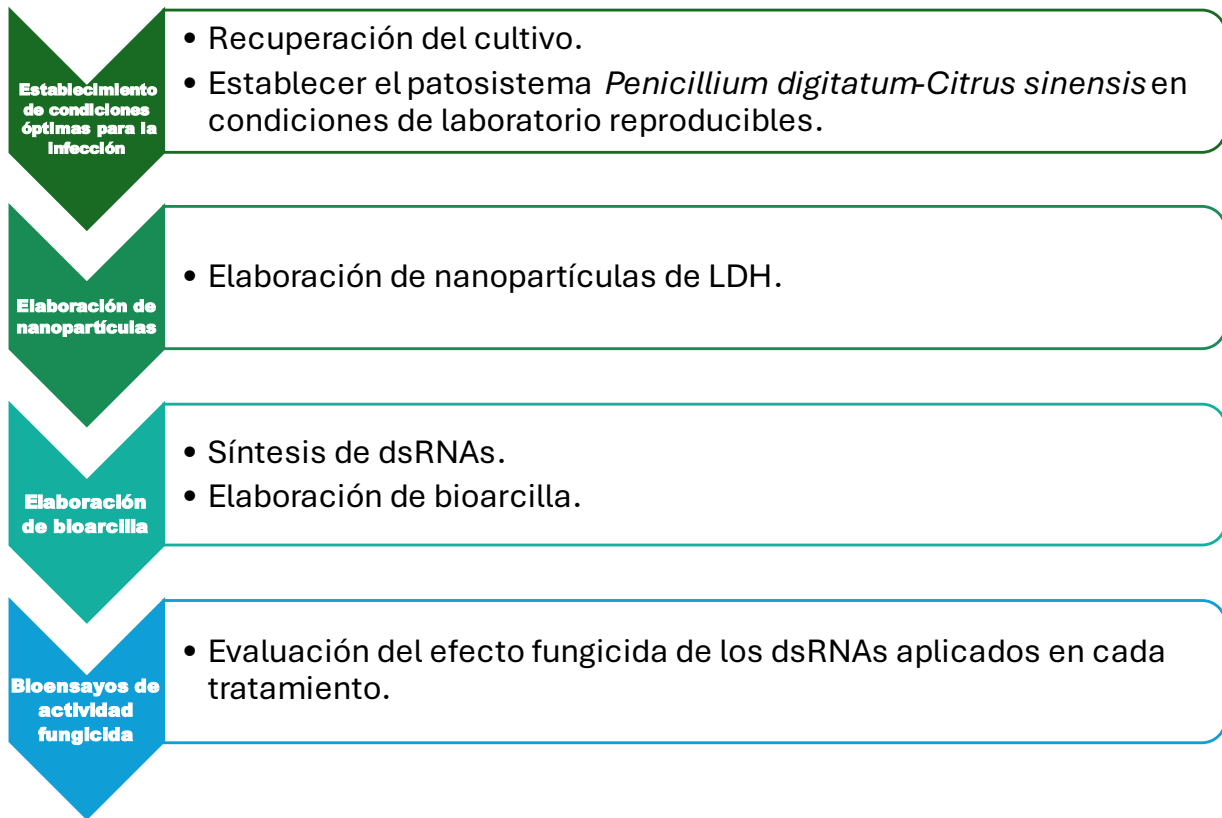


Figura 13. Secuencia experimental

## 5 Materiales y métodos

### 5.1 Establecimiento del patosistema de estudio en el laboratorio

#### 5.1.1 Material biológico

Para la realización del presente trabajo se usó una cepa de *Penicillium digitatum* aislada de frutos de naranja y almacenada en el banco patogenómico del laboratorio de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec. La cepa se recuperó en cajas de Petri con medio agar papa-dextrosa (PDA) y se incubó a  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 4 días con el propósito de tener cultivos frescos y para generar esporas para los bioensayos.

#### 5.1.2 Ensayos de infección y actividad fungicida preliminares

##### 5.1.2.1 Evaluación de la concentración óptima de esporas

Con el propósito de reducir la variabilidad en el desarrollo de la infección, se realizaron bioensayos para dilucidar la concentración óptima de esporas. Los bioensayos se realizaron en recipientes de plástico transparentes y cerrados, con una intensidad lumínica de  $15\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  (temperatura a la cual se llevaron a cabo los subsecuentes bioensayos).

Se evaluaron 5 concentraciones diferentes de esporas siendo las siguientes:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  (esporas/mL). Cada concentración contó con 3 unidades experimentales, se dejaron durante 7 días.

##### 5.1.2.2 Bioensayos en *Vitis vinifera*

Con el conocimiento de que el fruto de naranja es de temporada, se consideró a *Vitis vinifera* como posiblemente útil para el estudio de la infección por *P. digitatum*. Esto con base en que *V. vinifera* puede ser infectada por *Penicillium sp.* (Lorenzini *et al.*, 2013), está disponible todo el año y reduce costos y espacio requerido para los bioensayos. Para evaluar la posibilidad de establecer la infección de *P. digitatum* en frutos de uva, se inocularon uvas verdes con: 1  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 7  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas

con una concentración de  $10^5$  esporas/mL (concentración previamente dilucidada de bioensayos en frutos de naranja).

Los bioensayos se llevaron a cabo en recipientes de plástico transparentes y cerrados, con una intensidad lumínica de  $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , con 3 unidades experimentales por cada volumen, más un control inoculado con agua.

### **5.1.2.3 Bioensayo con fungicida químico**

Con la finalidad de observar el efecto típico de un fungicida químico y conocer la distribución de la actividad fungicida que este tipo de compuestos produce sobre un grupo de naranjas, se llevó a cabo un ensayo con 3 réplicas experimentales con el fungicida sistémico perteneciente al grupo de los benzimidazoles, llamado benomilo, el cual es de amplio espectro y se usa para prevenir la infección por *Penicillium spp.* Para esto se realizaron soluciones de diferentes concentraciones de fungicida, siendo éstas:  $5 \mu\text{g/mL}$ ,  $50 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{g/mL}$ ,  $125 \mu\text{g/mL}$ ; cada concentración contó con 5 unidades experimentales por réplica (frutos de naranja). Las naranjas se inocularon con  $10 \mu\text{L}$  de la solución del fungicida, más  $10 \mu\text{L}$  de esporas ( $10^5$  esporas/mL).

### **5.1.2.4 Bioensayos de efecto de la luz en la incidencia y desarrollo de la infección**

Con el propósito de dilucidar si la luz es un factor importante en el desarrollo e infección de *P. digitatum* en el fruto de naranja se llevó a efecto un bioensayo con 12 unidades experimentales ( inoculadas con  $10 \mu\text{L}$  de esporas con una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/mL) para cada condición, con un total de 3 réplicas. Las naranjas se almacenaron en recipientes de plástico transparente y con una intensidad lumínica de  $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (para la condición de luz), para las condiciones de obscuridad los recipientes se cubrieron completamente.

### **5.1.2.5 Bioensayos de modo de aplicación: sumersión e incubación con fungicida**

Para poder inferir cual sería el mejor método para la inoculación y aplicación de los dsRNAs se desarrolló un bioensayo con benomilo en el que, por una parte, se realizó la sumersión de la naranja hasta su ecuador en una solución de fungicida para después inocularse con esporas del hongo y, por otra parte, se realizó una incubación previa de las esporas con el fungicida para después aplicarse en una herida en el ecuador del fruto.

Para esto, se prepararon 180 mL de una solución de fungicida con una concentración de 125 µg/mL, suficiente para sumergir a los frutos hasta su ecuador, y a continuación se inocularon los frutos. Para el otro caso, la solución de esporas ( $10^5$  esporas/mL) y la solución de fungicida para la incubación se prepararon por separado y se mezclaron para su inmediata aplicación en la superficie de la herida de la naranja.

Para ambos casos se ocuparon 10 unidades experimentales, incluyendo un control positivo y uno negativo. Los frutos se mantuvieron en obscuridad durante 7 días (168h), tiempo suficiente para que se complete la infección

## **5.2 Elaboración y caracterización de nanopartículas de LDH (MgAl)**

### **5.2.1 Síntesis de nanopartículas LDH (MgAl)**

Se elaboraron las nanopartículas de LDH (MgAl) de acuerdo lo especificado por Dong *et al.* (2014) y Ladewig *et al.* (2010) con modificaciones. Brevemente, se añadió una solución de  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  y  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  en agua desionizada a una solución NaOH en agua desionizada con agitación constante durante 15 min, luego se centrifugó, el pellet se lavó dos veces con agua desionizada y posteriormente se centrifugó. Terminada la centrifugación el pellet fue resuspendido en agua desionizada, y la suspensión heterogénea obtenida fue transferida a un autoclave vertical a 100°C por 4 horas.

## 5.2.2 Caracterización de nanopartículas LDH (MgAl)

La caracterización de las nanopartículas LDH consistió en la determinación de su tamaño mediante su observación en un Microscopio electrónico de transmisión (SEM, TESCAN MIRA 3 LMU).

## 5.3 Elaboración y caracterización de las bioarcillas

### 5.3.1 Generación de construcciones para la síntesis de dsRNAs

Se eligieron siete genes como objetivo para el silenciamiento mediante dsRNAs: FET5, mic-33, NIP, DCL1, DCL2, Quitina sintasa VII y  $\beta$ -tubulina. Las construcciones necesarias para la síntesis de dsRNAs de los primeros cinco genes ya estaban disponibles (Ramírez, 2022; Basilio, 2022). A continuación, se detalla el procedimiento para obtener las construcciones correspondientes a los dos últimos genes.

#### 5.3.1.1 Alineamientos de Quitina sintasa VII y $\beta$ -tubulina

Se empleó el NCBI (Sayers *et al.*,2021) para extraer las secuencias de los RNAs mensajeros de quitina sintasa VII y  $\beta$ -tubulina de *P. digitatum*. Adicionalmente se realizó la búsqueda de similitudes en el genoma de *C. sinensis*. Con las secuencias se realizaron alineamientos contra el genoma de *C. sinensis* usando BLASTn (Altschul *et al.*,1990), y así determinar si existía similitudes y evaluar posibles efectos off-target. Para realizar la selección de la región con menor homología para el diseño de los dsRNAs se usó EMBOSS Needle.

Posteriormente, con el objetivo de conocer las posibilidades de que ocurra un efecto off-target (blanco de silenciamiento no deseado), se introdujeron las regiones de los genes seleccionados en la herramienta BLASTn del NCBI utilizando los parámetros por defecto.

**Tabla 1.** Parámetros de BLASTn utilizados para evaluar los efectos off-target.

Organismos	<i>Citrus sinensis</i>
	<i>Penicillium digitatum</i>
Optimizado para	Highly similar sequences (megablast)
Umbral esperado	0.05
Tamaño de palabra	20
Puntaje para match	1, -2
Gap cost	Linear

### 5.3.1.2 Amplificación de fragmentos de los genes de Quitina sintasa VII y $\beta$ -tubulina

Las regiones de menor similitud con el genoma de *C. sinensis* en los tres genes seleccionados se amplificaron mediante PCR a partir de DNA genómico para obtener los fragmentos necesarios para la construcción de templados para la síntesis de RNAi. Las reacciones se prepararon en un volumen de 20  $\mu$ L, con los componentes especificados en la Tabla 3 y el programa de la Tabla 4. Al término, los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1% para corroborar el tamaño del amplicón. Posteriormente, se realizó la purificación por kit (MinElute PCR purification , 28004, QUIAGEN) y se cuantificaron

### 5.3.1.3 Clonación

Los fragmentos purificados se ligaron al vector de clonación pGEM-T easy y se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* (One Shot Top 10, Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Las colonias blancas fueron seleccionadas y para la confirmación del inserto se realizó PCR de colonia (tomando parte de una colonia con una punta estéril y mezclando en un microtubo con mezcla de reacción para PCR) usando los primers M13 (forward y reverse), como se especifica en la tabla 2, posteriormente se cultivaron en medio líquido LB con ampicilina (100 $\mu$ g/mL) durante 24h a 37°C. Más adelante se realizó la extracción de plásmido por medio de lisis alcalina.

**Tabla 2.** Componentes del mix para la PCR de colonia usando de molde parte de la colonia.

PCR de colonia	
H <sub>2</sub> O	8μL
Taq polimerasa	10μL
M13 F	0.5μL
M13 R	0.5μL

### 5.3.2 Síntesis de RNAs

A partir de plásmidos que contienen las construcciones de regiones de los genes fusionados DCL1/2, Mic33/NIP y FET5, (Ramírez, 2022; Basilio, 2022) y de las regiones seleccionadas de quitina sintasa VII y  $\beta$ -tubulina, todas flanqueadas por la secuencia de del promotor T7, se realizó una PCR para amplificar las regiones específicas. Las reacciones de PCR se prepararon como se indica en las Tablas 6 y 7. Los productos de PCR se verificaron por electroforesis, y enseguida se purificaron y se emplearon como molde para la síntesis del RNAi mediante el kit MEGAScript RNAi (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante, de acuerdo con lo que se describe en la tabla 5. De estas reacciones se generaron fragmentos largos de dsRNAs (ldsRNAs), y una fracción del RNAi que resultante de ésta fue posteriormente empleada en una reacción catalizada por la enzima ShortCut RNaseIII (New England Biolabs), para la generación de fragmentos cortos (21-14pb) de RNAi (sdsRNAs) (Tabla 5). La concentración de RNAi fue cuantificada mediante un equipo Nanodrop (ThermoFisher Scientific) y su integridad se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos para amplificar la construcciones con el promotor T7 a partir de plásmido

GEN/ CONSTRUCCIÓN	OLIGONUCLEÓTIDOS	
	FORWARD	REVERSE
<i>FET5</i>	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGATTCAGGTTGACAGCGTCGATGCA 3'	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGACGTGGTAGTGATGCTAATGGAATAGG 3'
<i>mic-33/NIP</i>	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGATCGTCCATCCGCACTGGGGATCA 3'	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGACCATAGTGAGAAGCGGCACTTCC 3'
DCL 1/2	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGATCAAAAGCAACCAACGCT 3'	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGATTCGTCATTGTTGCGCTGC 3'



**Tabla 4.** Oligonucleótidos para amplificar las regiones seleccionadas y añadir a los extremos el promotor T7.

GEN/ CONSTRUCCIÓN	OLIGONUCLEÓTIDOS	
	FORWARD	REVERSE
Quitina sintasa VII	5'ACTACACTTTTGAATGCCCTCCA 3'	5'AAGGCATCAAACGCACGATAGCC 3'
	T7	T7
	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTACACTTTTGAATGCCCTCCA 3'	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAAGGCATCAAACGCACGATAGCC 3'
β-Tubulina	FORWARD	REVERSE
	5'CAAGCTCGCCGTC AACATGGTTC 3'	5'GGTCGTTTCATGTTGCTCTCGGCC 3'
	T7	T7
	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAGCTCGCCGTC AACATGGTTC 3'	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTCGTTTCATGTTGCTCTCGGCC 3'

**Tabla 5.** Preparación de reacciones de síntesis de ldsRNAi y sdsRNAi

Síntesis de dsRNAi	
H <sub>2</sub> O	3μL
ATP	2μL
CTP	2μL
GTP	2μL
UTP	2μL
10X reaction buffer	2μL
Molde (DNA)	5μL
T7 enzyme mix	2μL
Incubar 4 h	
Digestión con RNase y DNase I	
dsRNAs	20μL
H <sub>2</sub> O	21μL
10X digestion buffer	5μL
DNase I	2μL
RNase	2μL
síntesis de sdsRNA	
H <sub>2</sub> O	60μL
10x shortcut buffer	10μL
dsRNAi	10μL
ShortcurRNase III	10μL
10X MgCl <sub>2</sub>	10μL
Detener la reacción con 10μL de EDTA 10X	

**Tabla 6.** Preparación de reacciones de PCR para la amplificación de las construcciones seleccionadas.

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	8
Dream Taq Green Master Mix	10
Oligo específico directo (10 $\mu\text{M}$ )	0.5
Oligo específico reverso (10 $\mu\text{M}$ )	0.5
Molde	1 (hasta 100ng)

**Tabla 7.** Condiciones de la reacción de PCR

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95		
Alineamiento	65	30 s	30
	60		
Extensión	72	30 s	1
Extensión final	72	5 min	1

### 5.3.3 Formulación de la bioarcilla y caracterización

La formulación de la bioarcilla se llevó a cabo intercalando los dsRNAs en las nanopartículas de LDH. Para esto, 100 ng de dsRNAs con concentraciones equimolares obtenidas de las tres construcciones se incubaron con nanopartículas en relaciones dsRNAs:LDH (peso/peso; 1:70, 1:75, 1:80, 1:85,1:90, 1:169). La incubación se llevó a cabo en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  a 37° C por 15 min en un agitador orbital. La eficiencia en la retención de dsRNAs en los complejos de bioarcilla (dsRNAs-LDH) se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La retención completa se observó como la incapacidad del RNA para migrar al polo positivo durante la electroforesis.

## 5.4 Bioensayos de actividad fungicida sobre frutos de naranja

La actividad fungicida se evaluó aplicando las formulaciones de bioarcilla preparadas con dsRNAs largos o cortos, y dsRNAs desnudos, así como controles de agua y nanopartículas de LDH sin dsRNAs. En total se probaron 6 formulaciones y 2 controles, de acuerdo con la Tabla 8:

**Tabla 8.** Formulaciones y controles de los bioensayos de actividad fungicida

Formulaciones	Controles
IdsRNAs-DCL 1/2-desnudos	Hongo Fungicida
IdsRNAs-DCL 1/2-LDH	
IdsRNAs-Mic33/NIP/FET5-desnudos	
IdsRNAs-Mic33/NIP/FET5-LDH	
IdsRNAs-Tub-desnudos	
IdsRNAs-Tub-LDH	

Previo a la aplicación de los tratamientos, se realizó un preacondicionamiento del inóculo fúngico con las preparaciones de dsRNAs, mezclando 10 µL de una solución de 0.1µg/µL de dsRNAs con 10 µL de una suspensión de  $1 \times 10^5$  esporas/mL de *P. digitatum*. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, la mezcla inóculo-dsRNA se aplicó en una gota sobre naranjas previamente lavadas y pinchadas puntualmente en el ecuador. Se emplearon 15 naranjas por tratamiento, incluyendo los controles. Los ensayos se realizaron por triplicado. Desde el momento de la aspersion hasta la observación final de los resultados (7 después de la inoculación, 7dpi), las naranjas se mantuvieron en cajas de plástico transparentes cerradas, a 25°C, bajo oscuridad. En la Tabla 9 se muestran los detalles del diseño experimental de los bioensayos.

**Tabla 9** Diseño experimental para los bioensayos

Factores	Niveles	Valores	Variable	Réplicas
Tratamientos	4	1	Diámetro Incidencia	3
		-1		

El efecto fungicida se determinó observando la incidencia y el avance de la infección mediante la medición del diámetro de las lesiones, así como de la forma de crecimiento del micelio (disperso, compacto).

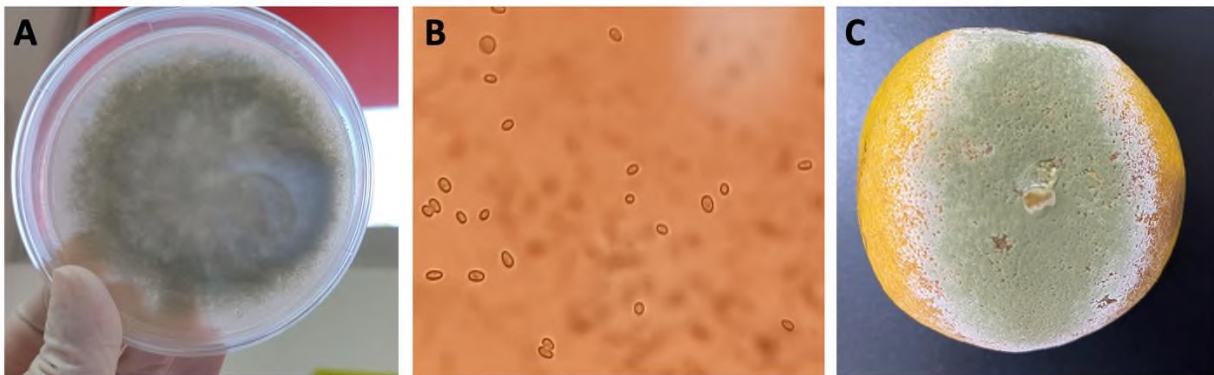
#### **5.4 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de todos los bioensayos se realizarán 3 réplicas. Los datos obtenidos se ajustarán en un análisis ANOVA con un diseño factorial  $4^1$  ( $P=0.05$ ) para evaluar la efectividad de los biofungicidas de dsRNAs. Posteriormente se realizará una prueba conclusiva, como la prueba de medias mediante el método de Tukey con ayuda de RStudio (R Core Team, 2022) y así establecer si hay diferencias significativas entre el tratamiento y el control en el desarrollo de *Penicillium digitatum*.

## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Establecimiento del patosistema *Penicillium digitatum*-*Citrus sinensis* en condiciones de laboratorio

El hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum* que se usó en la realización del presente trabajo fue aislado por Santiago-Tapia (2019). *P. digitatum* se recuperó exitosamente por resiembra en cajas Petri con medio PDA. El fitopatógeno conservó sus características morfológicas (colonia color verde oliva con reverso amarillo crema, micelio blanquecino y una textura aterciopelada) y la capacidad para infectar frutos de naranja, la cual se verificó inoculando a naranjas con esporas recuperadas del cultivo en medio PDA (Fig. 14).

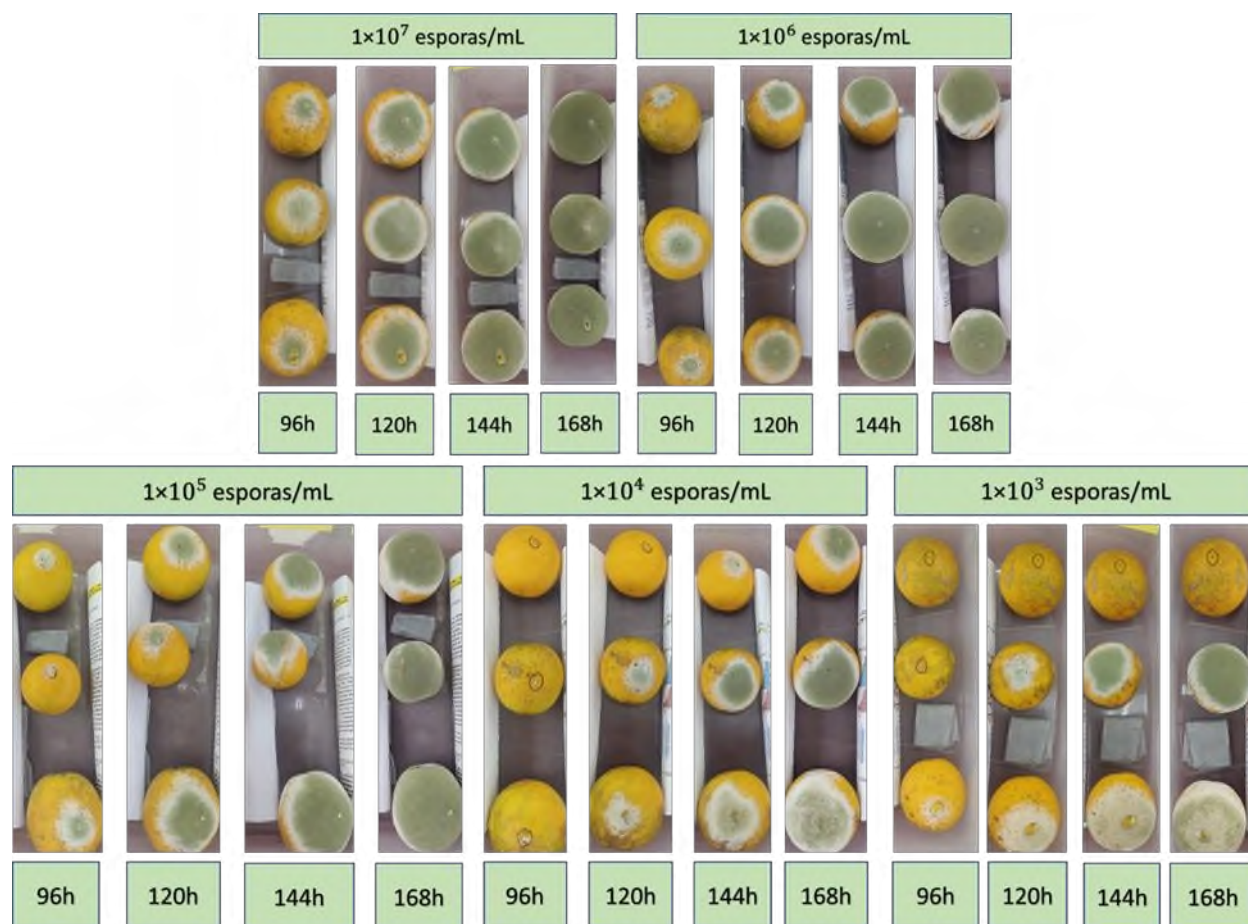


**Figura 14.** Recuperación de *P. digitatum*. A) Desarrollo en medio PDA tras 7 días de incubación, B) Esporas observadas al microscopio (40X), y C) capacidad infectiva de *P. digitatum* sobre naranja, donde se observan las lesiones características.

#### 6.1.1 Evaluación del efecto de la concentración del inóculo

Con el fin de reducir la variabilidad en el crecimiento y desarrollo del hongo se realizaron bioensayos donde se evaluó cual sería la concentración de esporas óptima para los ensayos de efectos del biofungicida.

Se requirió determinar la concentración mínima de esporas capaz de producir lesiones sobre naranjas mostrando la menor variabilidad en el crecimiento del hongo. Para esto se realizó un bioensayo donde se evaluaron 5 concentraciones diferentes de esporas. Después de inocular los frutos de naranja fue al día 4 cuando los síntomas aparecieron, predominantemente en las concentraciones de inóculo (esporas) de  $10^7$  y  $10^6$  (esporas/mL). Al día 7, los individuos de las concentraciones  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  (esporas/mL) estaban prácticamente cubiertos por el hongo, visualizándose completamente de un color verde oliva debido a las esporas (Fig. 15).

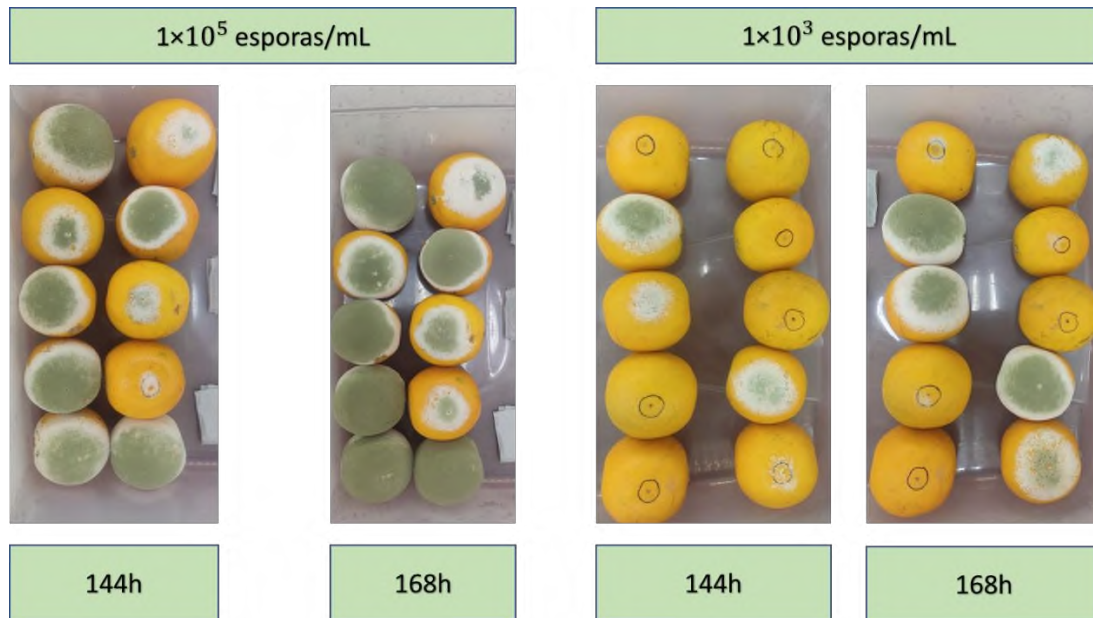


**Figura 15.** Efecto de la concentración del inóculo sobre el desarrollo de la infección, desde  $1 \times 10^3$  hasta  $1 \times 10^7$  esporas/mL. Bioensayo con 3 unidades experimentales por cada concentración. ,Fotografías de los frutos tomadas cada 24 horas a partir de las 96h hasta las 168h (4 a 7 dpi, respectivamente)

En los trabajos relacionados directamente con el uso de SIGS en *P. digitatum*:*Citrus sinensis* y *P. italicum*:*Citrus reticulata* (Yang *et al.*,2019; Ying *et al.*,2020) se utilizó una concentración de  $10^6$  esporas/mL, donde Yin *et al.* (2020) observó crecimiento del hongo

a los 3 días (72h) posteriores a la inoculación. En las investigaciones realizadas en *Penicillium digitatum*:*Citrus sinensis* por LaFuente *et al.* (2020, 2021) utilizaron una concentración de  $10^4$  esporas/mL, mientras que en trabajos con SIGS en otros hongos como *B. cinerea* (Wang *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2021, Niño-Sánchez *et al.*, 2022) y *Fusarium oxysporum* (Mumbanza *et al.*, 2013) usaron una concentración de  $10^5$  esporas/mL. En las investigaciones mencionadas no se realizó la evaluación de diferentes concentraciones, solo se menciona la utilizada, así que se tomaron como referencia para establecer concentraciones a evaluar. De esta forma con los resultados obtenidos y con base en el trabajo previo (Basilio, 2022) y la literatura se determinó que la concentración óptima sería de  $10^5$  esporas/mL para los siguientes experimentos.

Con el fin de confirmar que respecto a la menor concentración ( $10^3$  esporas/mL) la concentración elegida presenta menor variabilidad en el desarrollo de la infección y en la incidencia de infección se realizó otro bioensayo con 10 unidades experimentales para cada concentración (Fig. 16). Se puede observar que a las 144h y 168h para  $10^5$  esporas/mL hay una incidencia homogénea de la infección en las unidades experimentales, mientras que un 60% presenta un desarrollo de la infección prácticamente homogéneo, de forma contrastante la concentración de  $10^3$  esporas/mL tanto a los 6 y 7 dpi hay una variabilidad visible, para el día 6 hay una incidencia de la infección de un 40% y para el día 7 del 80% y solo un 30% de las unidades experimentales presenta desarrollo homogéneo de la infección.

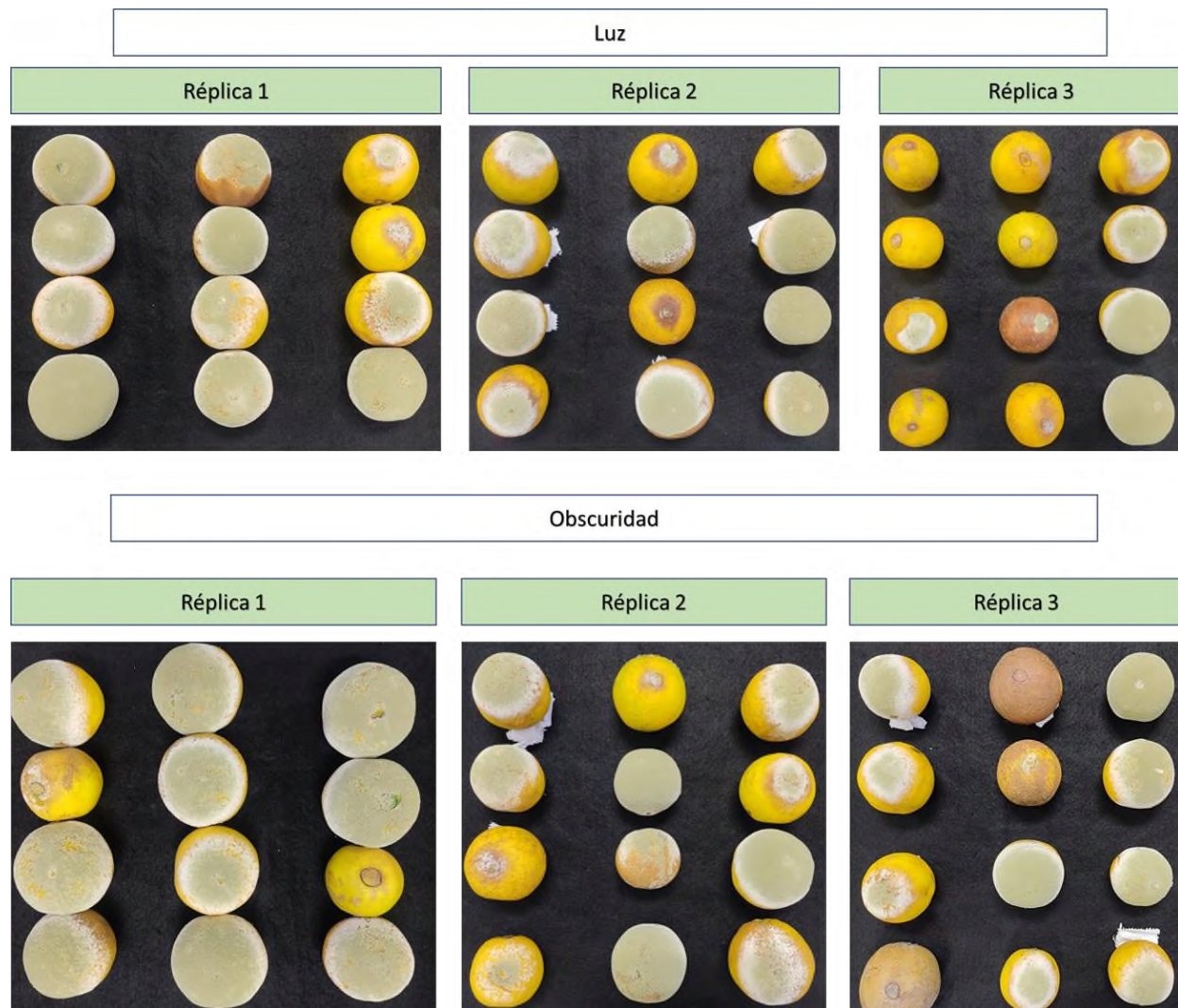


**Figura 16.** Efecto de dos concentraciones de inóculo ( $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^3$  esporas/mL) sobre la incidencia y desarrollo de la infección. Las fotografías muestran la variabilidad de la incidencia y desarrollo de la infección entre las concentraciones de esporas empleadas. Imágenes tomadas a las 144 h (as 144h y 168h (6 dpi) y 168 h (7 dpi)).

### 6.1.2 Efecto de la luz sobre la incidencia y desarrollo de la infección

Con el propósito de dilucidar si la luz es un factor importante en el desarrollo e infección de *P. digitatum* en el fruto de naranja se llevó a efecto un bioensayo con 12 unidades experimentales para cada condición, con un total de 3 réplicas. Donde se apreciaron resultados similares con Lafuente *et. al.*(2021) en condiciones de obscuridad, siendo los días 6 y 7 después de la inoculación donde se obtuvo el desarrollo del hongo e iniciando los síntomas a los 4 días (96 horas) que coincide con lo observado en ambas condiciones.

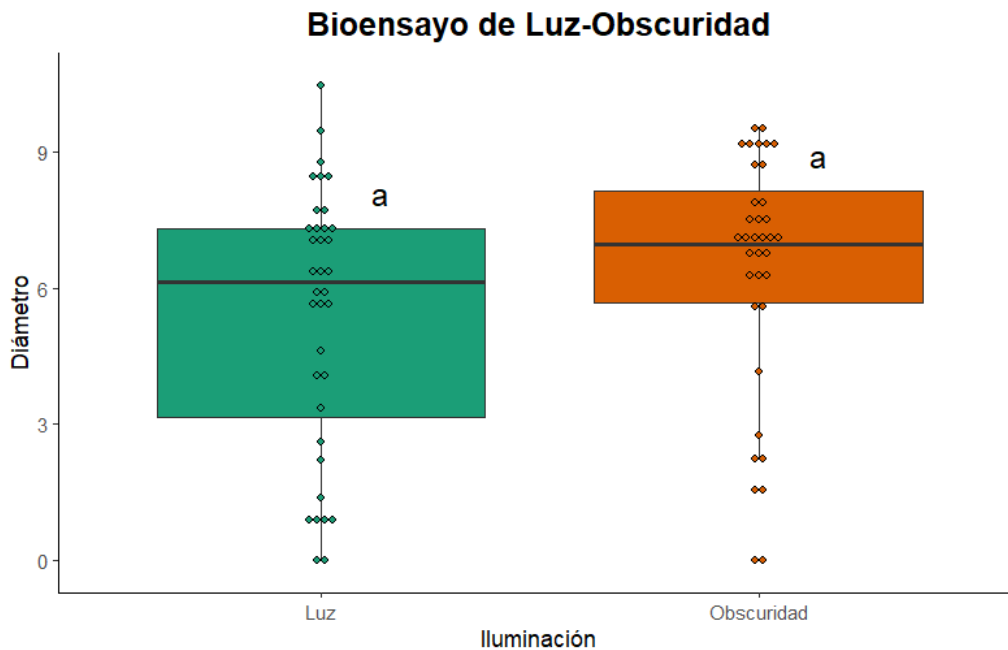




**Figura 17.** Incidencia y desarrollo de infección por *P. digitatum* en frutos de naranja en condiciones de luz y oscuridad. Experimento con 3 réplicas y 12 unidades experimentales por réplica. Imágenes tomadas a los 6 dpi.

En la figura 17 se puede observar que el crecimiento del hongo es similar entre las dos condiciones del experimento, siendo que de forma análoga presentaron menor desarrollo del hongo en la réplica 3. Para el bioensayo se inocularon los frutos de naranja con 10  $\mu\text{L}$  de esporas con una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/mL, se resalta de nuevo que la variabilidad del desarrollo de la infección es algo que inclusive se dio entre las réplicas, apoyando la propuesta de usar un control con fungicida químico a la par del bioensayo con dsRNAs, a fin de que la variabilidad propia del sistema biológico no se atribuya a la efectividad de la formulación fungicida de los dsRNAs. La variabilidad observada en el

bioensayo no es reportada en la literatura consultada, ni en la relacionada directamente con frutos de naranja y SIGS (Yang *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2020) ni por Lafuente *et al.*(2019, 2021, 2022, 2023) o Macarisin *et al.*, (2007) en sus trabajos con *P. digitatum* en frutos de naranja, en los cuales se utilizaron condiciones de obscuridad. Por lo que podemos inferir que no es relevante para los trabajos mencionados pese a ser algo atribuible a la naturaleza del patosistema. Los bioensayos con frutos de naranja y *P. digitatum* suelen ser en condiciones de iluminación, en el presente trabajo se tomó la decisión de utilizar condiciones de obscuridad ya que los resultados indican que las condiciones de iluminación no son un factor diferencial en el desarrollo del hongo, esto permitió un mejor manejo del espacio requerido para el bioensayo, además permitió que las condiciones de iluminación del experimento fueran más *ad hoc* a la situación lumínica del almacenamiento poscosecha.



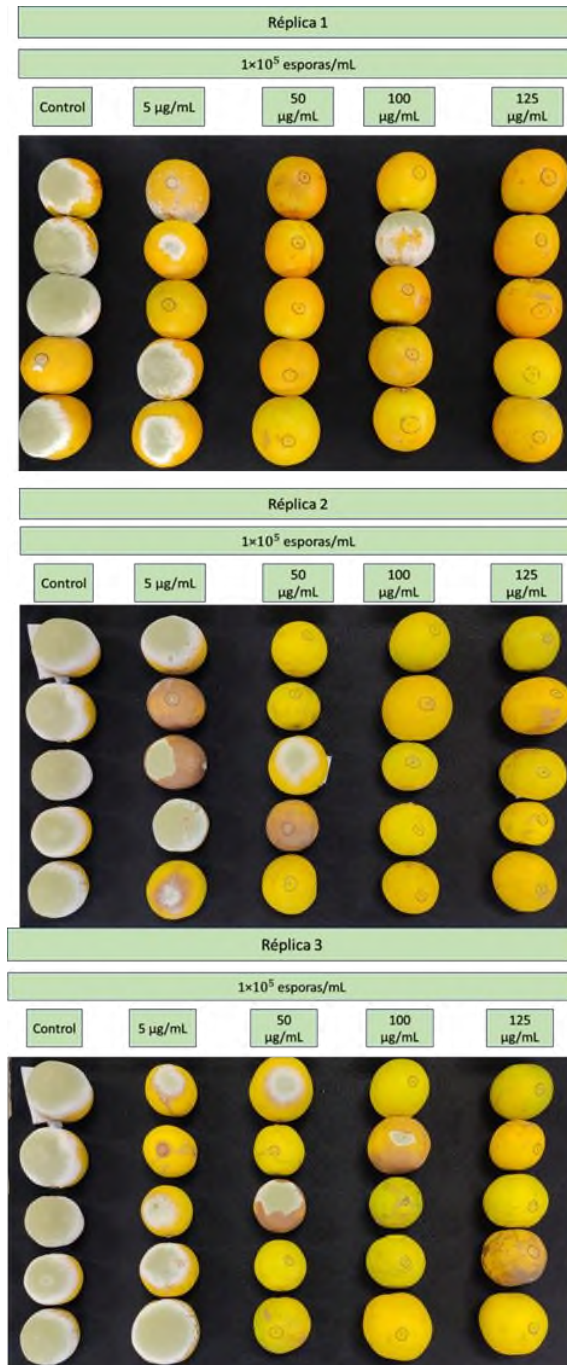
**Figura 18.** Análisis estadístico de efecto de la luz en el desarrollo de infección de frutos de naranja por *P. digitatum*. Las líneas centrales muestran las medianas; los límites del cuadro indican los percentiles 25 y 75 según lo determinado por el software R; los bigotes se extienden 1,5 veces el rango intercuartil desde los percentiles 25 y 75; los valores atípicos se representan mediante puntos; los puntos de datos se trazan como círculos abiertos. n = 15 puntos de muestra. Boxplot realizado en R Studio versión 2023.06.2.

### 6.1.3 Efecto de un fungicida químico sintético en la incidencia y desarrollo de la infección

Los fungicidas químicos son ampliamente usados para el control de *Penicillium digitatum*, principalmente los pertenecientes a la familia de los benzimidazoles, como lo es el benomilo, tiabendazol, y carbendazim (Rodríguez *et al.*, 2010). Kannan (2008) evaluó el efecto de benomilo en *P. digitatum* de forma *In vitro* en un rango de concentraciones de 0.01 µg/mL a 250 µg/mL. Por lo que, con la finalidad de observar el efecto típico de un fungicida químico y conocer la distribución de la actividad fungicida que este tipo de compuestos produce sobre un grupo de naranjas, se llevó a cabo un ensayo con 3 réplicas experimentales con benomilo. Para esto se realizaron soluciones de diferentes concentraciones de fungicida (tomando como referencia las utilizadas por Kannan en 2008) , siendo éstas: 5 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL; cada concentración contó con 5 unidades experimentales por réplica (frutos de naranja). Las naranjas se inocularon con 10 µL de la solución del fungicida, más 10 µL de esporas ( $10^5$  esporas/mL), el desarrollo de los síntomas se documentó hasta el día 6 posterior a la inoculación, donde a partir de los 50 µg/mL se notaron diferencias apreciables en el desarrollo de la infección respecto al control (Fig. 19).

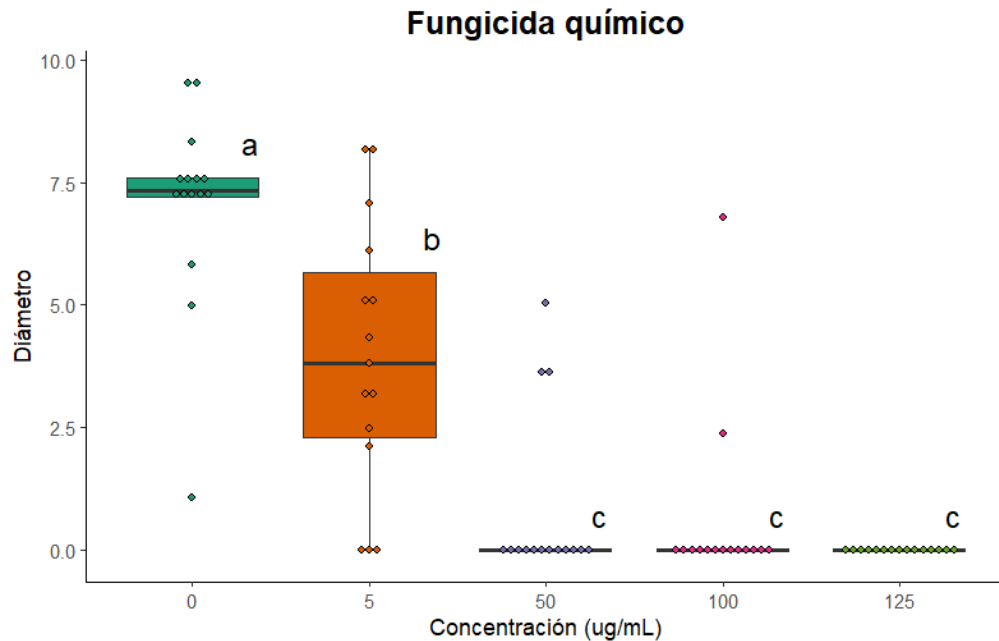
Con los resultados del bioensayo se observa que la incidencia de la infección y el desarrollo de esta es variable, por ejemplo, en el control de la primera réplica solo 4 de 5 naranjas muestran los síntomas de la infección completos y aun así con diferente grado de avance, siendo que en las demás réplicas se presenta tal variabilidad.

Respecto al fungicida, las naranjas con menor dosis presentan una gran variabilidad en la incidencia y en la inhibición del desarrollo de la infección, apreciándose que entre más alta es la concentración de fungicida esta variabilidad disminuye.

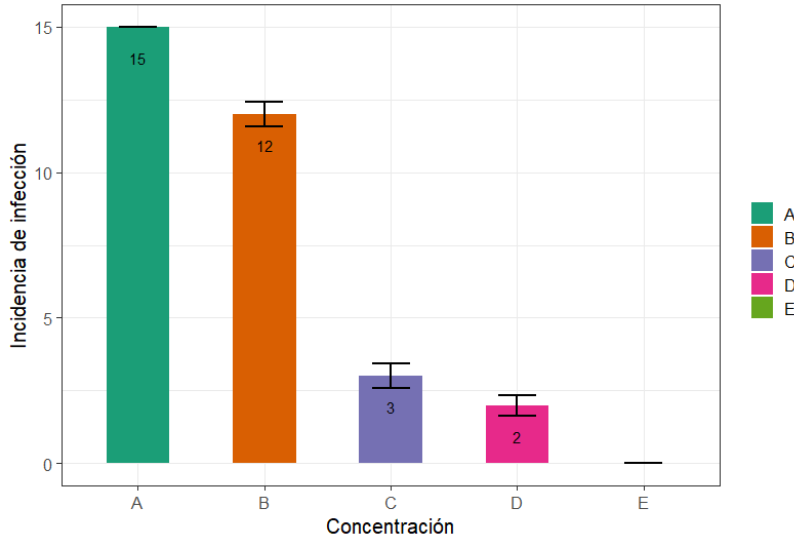


**Figura 19.** Evaluación de la incidencia y desarrollo de infección de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja con benomilo. Imagen tomada 6 después de la inoculación, se puede observar que a partir 50 µg/mL hay una casi nula aparición de síntomas de la infección. Experimento con 3 réplicas.

Para el análisis de los datos se visualizaron en un boxplot (Fig. 20) y posteriormente se realizó un ANOVA (Tabla 10) y una prueba de Tukey como análisis conclusivo. La disminución de la variabilidad de la efectividad del fungicida conforme se aumenta su concentración da pauta a que se necesite usar altas concentraciones de dsRNAs o realizar la aplicación de varias dosis.



**Figura 20.** Análisis estadístico de efecto de benomilo sobre el desarrollo de la infección de frutos de naranja por *P. digitatum*. Las líneas centrales muestran las medianas; los límites del cuadro indican los percentiles 25 y 75 según lo determinado por el software R; los bigotes se extienden 1,5 veces el rango intercuartil desde los percentiles 25 y 75; los valores atípicos se representan mediante puntos; los puntos de datos se trazan como círculos abiertos. n = 15 puntos de muestra. Boxplot realizado en R Studio versión 2023.06.2.



**Figura 21.** Incidencia de infección de *P. digitatum* en frutos de naranja. Se evaluó el número de naranjas infectadas en el bioensayo con benomilo, de esta manera estudiar otra variable de respuesta con la cual cuantificar la efectividad de cada concentración del fungicida. A=0  $\mu\text{g/mL}$  (control), B=5 $\mu\text{g/mL}$ , C=50  $\mu\text{g/mL}$ , D=100  $\mu\text{g/mL}$ , E=125  $\mu\text{g/mL}$ . Realizado en R Studio versión 2023.06.2.

El análisis de varianza nos muestra que existen diferencias significativas entre el control y el tratamiento, y que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las 3 últimas concentraciones. Las diferencias se empiezan a apreciar a partir de los 50 $\mu\text{g/mL}$ , similar a lo obtenido por Kannan (2008) donde observó disminución del desarrollo de *P. digitatum* a partir de una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$  de benomilo. La visualización de los datos en el boxplot nos muestra que la variabilidad que existe, pese a ser un fungicida comercial probado, parece ser propia del sistema biológico. Esto nos hace proponer el establecer un bioensayo con benomilo (como control) cada vez que coloquemos uno de dsRNAs, para de esta manera poder comparar la variabilidad de los resultados y dilucidar si ésta es debido al sistema biológico o a la efectividad del biofungicida.

**Tabla 10.** Análisis de varianza (ANOVA) de una vía del bioensayo con fungicida químico (benomilo) con 3 réplicas.

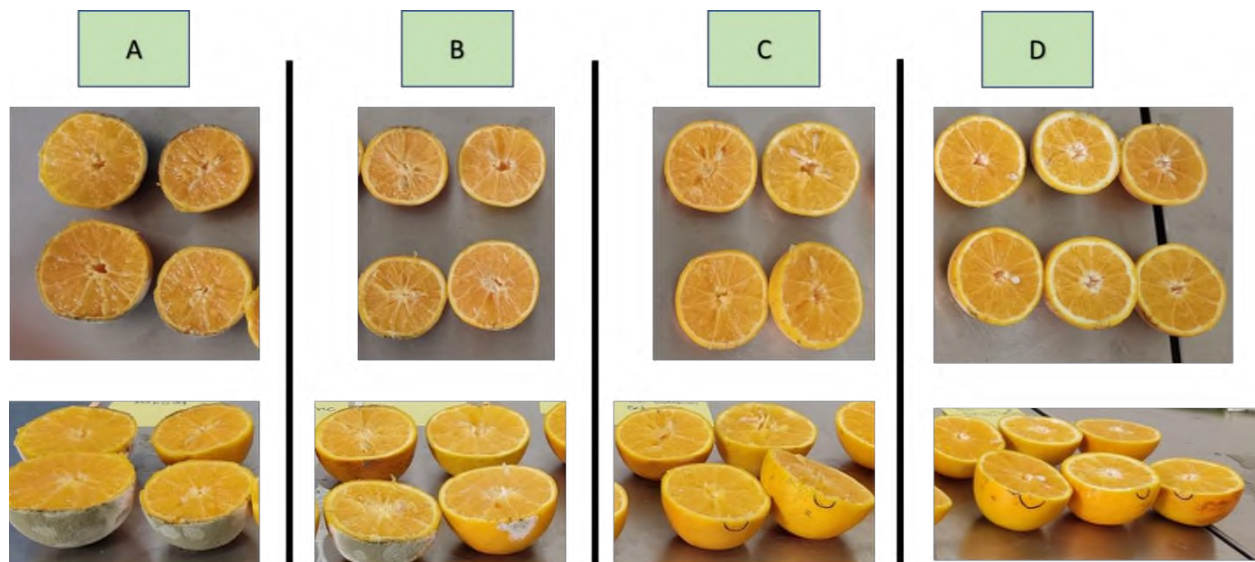
Análisis de Varianza							
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Conc. fungicida	4	532	67.93%	532	132.991	37.07	0.000
Error	70	251.1	32.07%	251.1	3.587		
Total	74	783.1	100.00%				

En cuanto a la incidencia de la infección, el ANOVA (tabla 11) indica que existen diferencias significativas entre el control y el tratamiento con las últimas 3 concentraciones ( 50 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL) como se observa en la tabla 10, de acuerdo con la prueba de Tukey. Esto para tener una variable de respuesta extra para evaluar la protección contra *P. digitatum*, mostrando que pese a disminuir el diámetro de la infección respecto al control, no existen diferencias en el número de naranjas infectadas en la concentración menor, sino hasta usar concentraciones mayores, siendo la concentración de 125 µg/mL la que presentó 0 incidencia de infección.

**Tabla 11.** Análisis de varianza (ANOVA) de una vía de la incidencia de infección con 3 réplicas.

Análisis de Varianza							
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Conc.	4	13.64	67.61%	13.64	3.40988	39.67	0
Error	76	6.533	32.39%	6.533	0.08596		
Total	80	20.173	100.00%				

Para confirmar si por el hecho de no mostrar síntomas de la infección exteriores esto significaba que no había daños en el interior de fruto, se procedió a cortar a las naranjas por la mitad para observar si existían cambios o mostraban síntomas al igual que las naranjas que mostraban un avance de los síntomas en el exterior. Hubo naranjas que, a pesar de no mostrar síntomas como el crecimiento del micelio o esporas en el exterior, si mostraban daño interior, aunque este no era tan severo como lo mostraban las naranjas con síntomas externos (Fig. 22). Algunos de los daños visibles son la disminución del albedo, de acuerdo con Lafuente *et al.* (2021) esto se debe a que este tejido en comparación del flavedo (parte exterior) como respuesta inmune produce ceras cuticulares y lignina, siendo menos susceptible a la infección de *P. digitatum*, por lo que las CWDEs degradan fácilmente al albedo una vez que es colonizado.



**Figura 22.** Imágenes transversales de frutos de naranja utilizadas en el ensayo con fungicida. A) Naranja con daño exterior total y daño interior, debilitamiento de la estructura interior, las vesículas oleíferas cerca del sitio de inoculación colapsadas y un albedo muy delgado. B) Naranja con daño parcial exterior e interior, mostrando integridad estructural pero un leve ablandamiento. C) Naranja sin daño exterior ni síntomas de infección exterior, pero con ablandamiento interior y leve colapso de vesículas oleíferas cercanas al sitio de inoculación. D) Naranjas sin síntomas de infección exterior ni daños estructurales interiores.



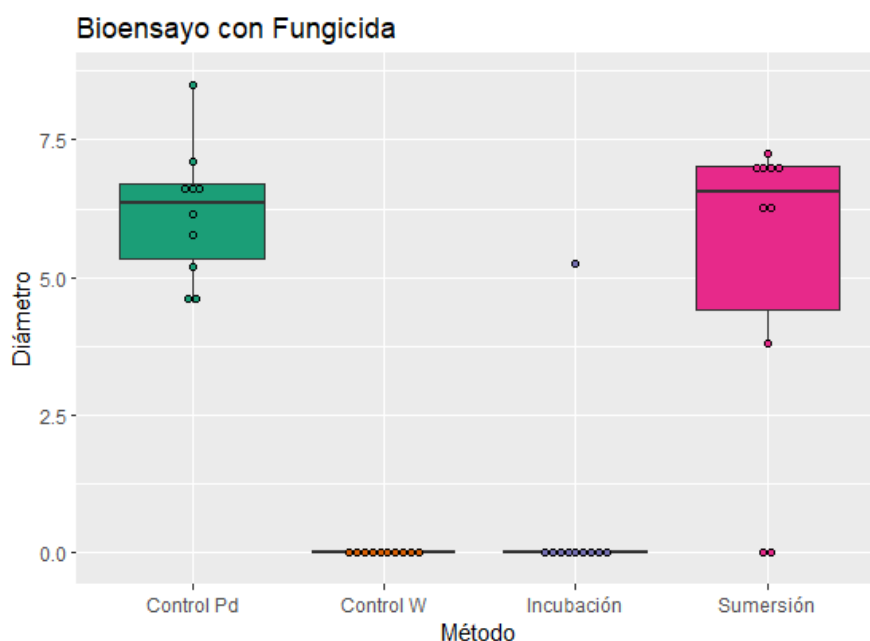
El ablandamiento de la naranja se debe a la acción de las pectin-hidrolasas secretadas por el hongo (Qian *et. al*, 2019). Siendo así que existe una pérdida de turgencia, menor resistencia al corte, por lo que el medir el radio de crecimiento del micelio y aparición de esporas no es un parámetro suficiente para determinar si el proceso de infección inició a pesar de no llegar a mostrar crecimiento del hongo en el exterior.

#### **6.1.4 Efecto del modo de aplicación del fungicida sintético sobre la incidencia y desarrollo de la infección**

Para dilucidar el mejor método para la inoculación y aplicación de los dsRNAs se indagó en la literatura métodos con los cuales se han evaluado fungicidas químicos. Altieri *et al.*, (2013) exploraron 3 métodos de aplicación de fungicida (asperjado, sumersión y aplicación de película de IMZ), obtuvieron que la sumersión era el mejor método para aplicar el fungicida. Por otra parte, Khalifa & Sameer. (2014) efectuaron bioensayos con la técnica de sumersión con el propósito de evaluar el efecto sobre *P. digitatum* de diversos fungicidas. Acorde a lo mencionado se desarrolló un bioensayo con benomilo en el que, por una parte, se realizó la sumersión de la naranja hasta su ecuador en una solución de fungicida para después inocularse con esporas del hongo y por otra parte, se realizó una incubación previa de las esporas con el fungicida para después aplicarse en una herida en el ecuador del fruto.

Para esto, se prepararon 180 mL de una solución de fungicida con una concentración de 125 µg/mL y a continuación se inocularon los frutos. Para el otro caso, la solución de esporas ( $10^5$  esporas/mL) y la solución de fungicida para la incubación se mezclaron para su inmediata aplicación en la superficie de la herida de la naranja.

Para ambos tratamientos se utilizaron 10 unidades experimentales, incluyendo un control positivo y uno negativo. Los frutos se mantuvieron en obscuridad durante 7 días (168h), tiempo suficiente para que se complete la infección.



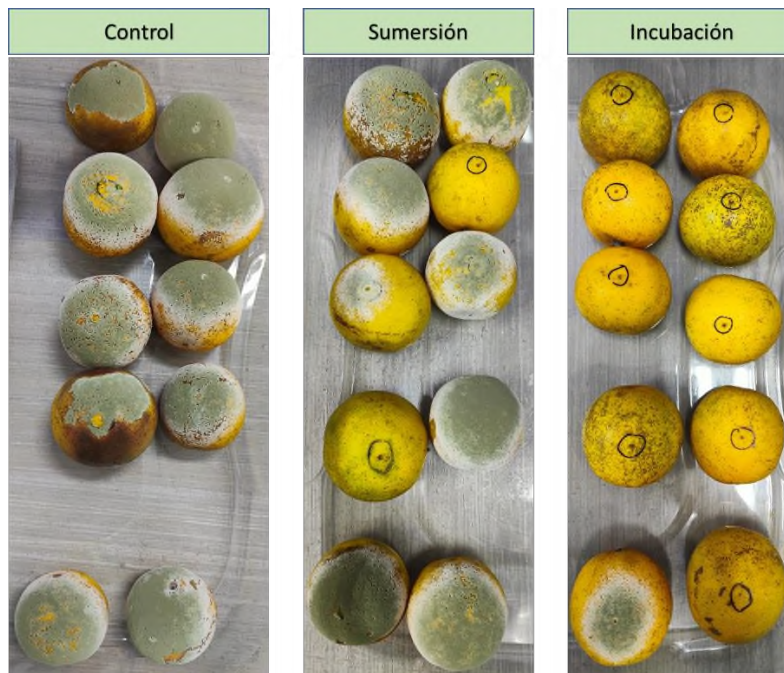
**Figura 23.** Análisis estadístico del efecto de los métodos de aplicación del fungicida sobre el desarrollo de la infección de frutos de naranja por *P. digitatum*. Las líneas centrales muestran las medianas; los límites del cuadro indican los percentiles 25 y 75 según lo determinado por el software R; los bigotes se extienden 1,5 veces el rango intercuartil desde los percentiles 25 y 75; los valores atípicos se representan mediante puntos; los puntos de datos se trazan como círculos abiertos. n = 10 puntos de muestra. Boxplot realizado en R Studio versión 2023.06.2.

Las naranjas inoculadas con la incubación de las esporas con benomilo mostraron un 10% de frutos infectados, mientras la sumersión presentó un 80%. El control negativo (W; frutos inoculados con agua) no presentó naranjas infectadas y el control positivo (Pd; inoculados con esporas) mostró un 100% de frutos infectados (Fig.24). Esto contrasta con lo obtenido por Altieri *et al.*, (2013) donde la sumersión solo tuvo 3% de índice de decaimiento y mostró diferencias significativas respecto a los otros tratamientos.

De acuerdo con el análisis de varianza (Tabla 12), sí existen diferencias significativas entre la sumersión y la incubación, siendo que Tukey agrupa al control negativo y a la incubación, mientras que deja con la misma letra al control positivo y a la sumersión. De esta forma se puede inferir que, para observar el efecto de los dsRNAs de forma consistente y para alcanzar los objetivos del proyecto, se deben incubar las esporas con los dsRNAs y posteriormente inocular las naranjas con la mezcla.

**Tabla 12.** Análisis de varianza (ANOVA) de una vía del diámetro de infección de naranjas tratadas con benomilo (sumersión e incubación).

Análisis de Varianza							
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tecnica	3	298.9	72.52%	298.9	99.643	31.67	0
Error	36	113.3	27.48%	113.3	3.146		
Total	39	412.2	100.00%				

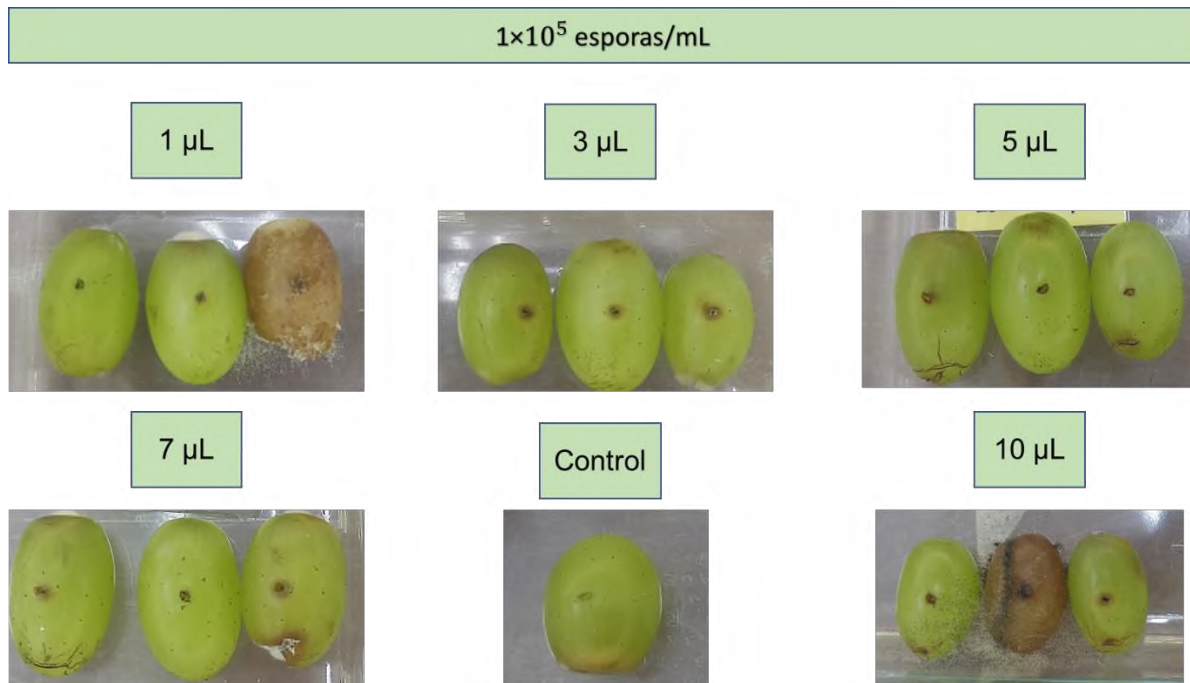


**Figura 24.** Bioensayo con fungicida químico: Incubación y sumersión. Ensayo de 1 réplica con 10 unidades experimentales por cada nivel del factor. Fotografía tomada a las 168h post-inoculación.

### 6.1.5 Investigación de *Vitis vinifera* como modelo alternativo para la infección con *P. digitatum*

En la búsqueda de frutos alternos a la naranja que pudieran ser útiles para el estudio de la infección por *P. digitatum* en la temporada en que no se produce naranja, se consideró a *Vitis vinifera*. Esto debido a que *V. vinifera* puede ser infectada por *Penicillium sp.*, (Lorenzini *et al.*, 2013), está disponible todo el año y reduce los costos y el espacio requerido para los bioensayos.

Para investigar la posibilidad de establecer la infección de *P. digitatum* en frutos de uva, se inocularon uvas verdes con: 1  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 7  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas con una concentración de  $10^5$  esporas/mL. Teniendo 3 unidades experimentales para cada volumen, más un control inoculado con agua.

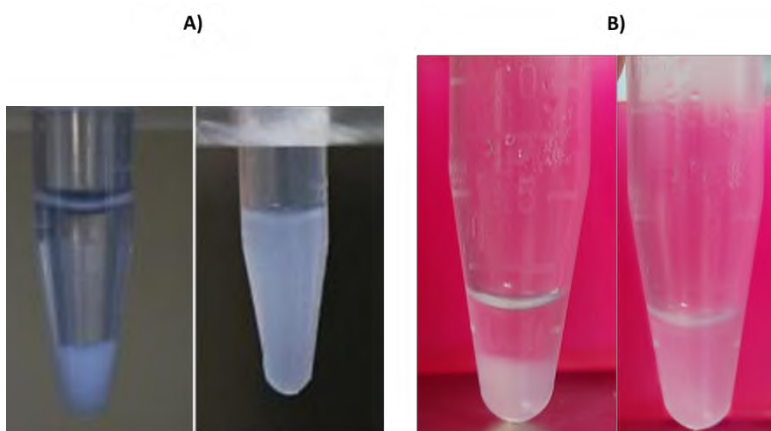


**Figura 25.** Bioensayo para evaluar la capacidad infectiva de *P. digitatum* en uvas. Para saber si las uvas serían una alternativa a usar como sistema biológico se inocularon diferentes volúmenes de una suspensión de esporas ( $10^5$  esporas/mL) de *Penicillium digitatum*.

Las condiciones en las que se estableció el experimento fueron las mismas que se utilizaron en bioensayos con naranjas. No se pudo observar la infección en ninguna de las unidades experimentales, solo una aparente necrosis en la zona de la inoculación, con lo que podemos suponer que el fruto fue capaz de inhibir la infección, con lo que la uva no es un sistema biológico viable para el propósito del trabajo, ya que pese a que *P. expansum* y *P. crustosum* pueden infectar, incluso de manera conjunta, frutos de uva en la etapa poscosecha, como lo mencionan Lorenzini *et al.* (2013) y estar relacionados genéticamente con *P. digitatum*, este último se restringe a infectar cítricos (Julca *et al.*, 2015) como se observó en el bioensayo.

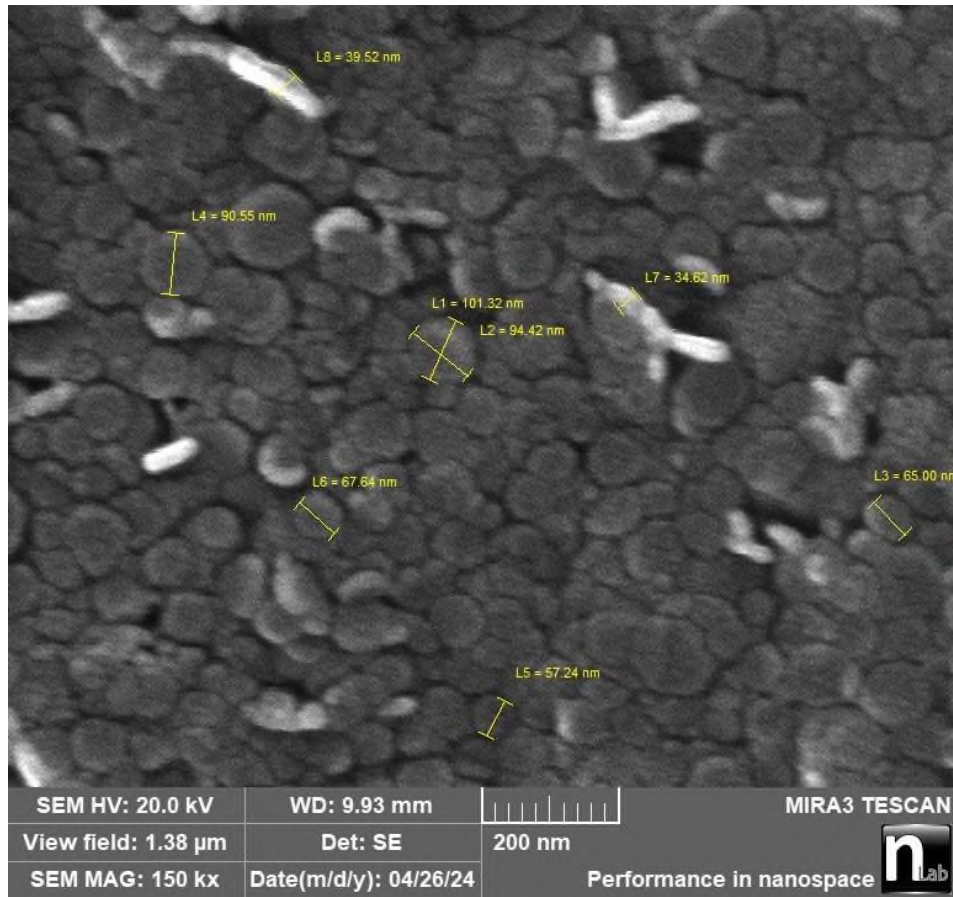
## 6.2 Síntesis de nanopartículas de LDH

Se obtuvo 50 mL una suspensión homogénea de nanopartículas de MgAl-LDH, con una concentración aproximada de 17.2 mg/mL. La solución de nanopartículas, posterior al tratamiento hidrotérmal, tiene una apariencia translúcida (Fig.26), la solubilidad es similar a la mostrada por Balcomb (2010).



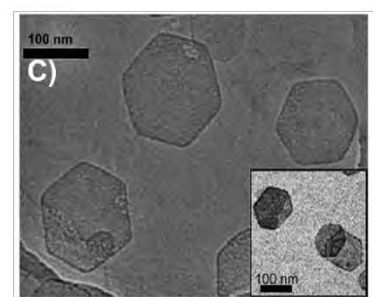
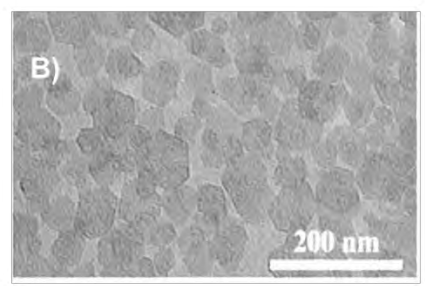
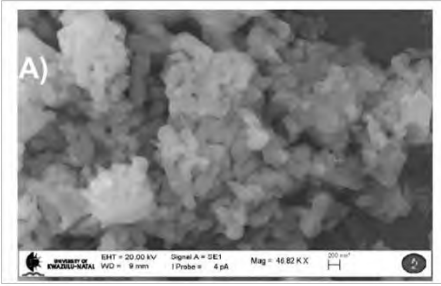
**Figura 26.** Solubilidad de MgAl-LDH's en agua. A) Resultado de Balcomb (2010). B) Resultado del presente trabajo.

Para la parte de la caracterización de las nanopartículas se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM, TESCAN) con un voltaje de aceleración de 20kV. Se obtuvieron nanopartículas de MgAl-LDH de forma hexagonal como se esperaba, con tamaños variables.

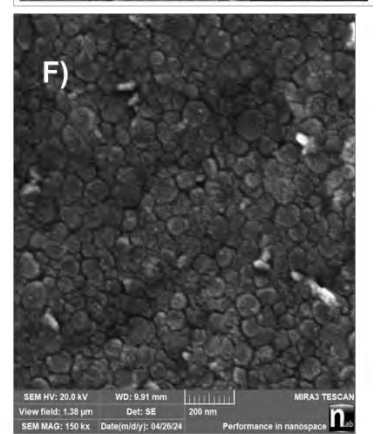
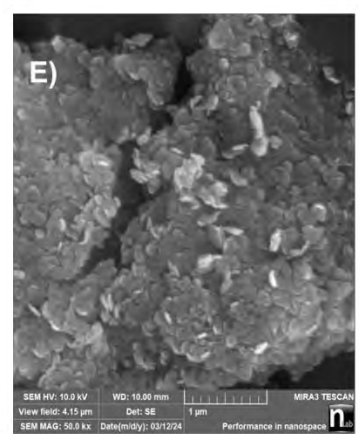
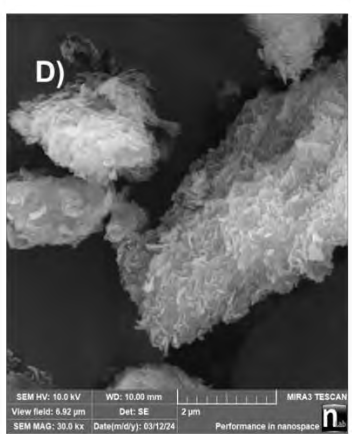


**Figura 27.** Nanopartículas de MgAl-LDH observadas por SEM. Se puede apreciar la forma hexagonal de las nanopartículas y que el tamaño obtenido no es homogéneo.

Imágenes de literatura



Imágenes de la investigación

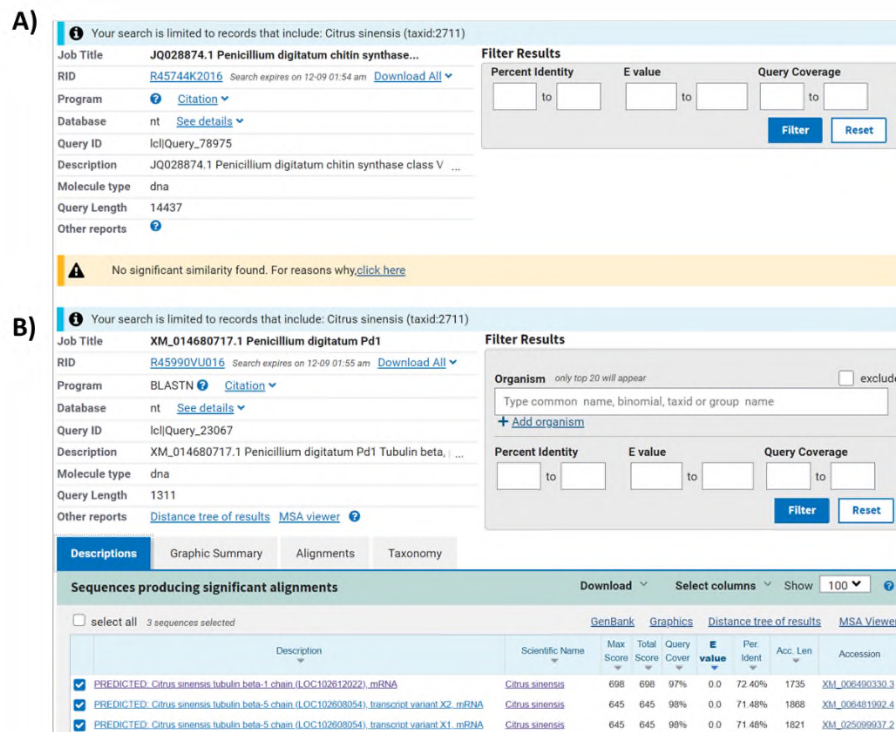


**Figura 28.** Resultados de caracterización microscópica de MgAl-LDH. A) Imagen SEM de MgAl-LDH obtenidas por Balcomb en 2010, con una magnificación de 46.8 kx. B) Imagen TEM de MgAl-LDH obtenidas por Dong *et al.* en 2014. C) Imagen TEM de MgAl-LDH realizada por Ladewig *et al.* en 2010. D) imagen SEM de MgAl-LDH obtenida en este trabajo, con una magnificación de 30kx. E) imagen SEM de MgAl-LDH obtenida en este trabajo, con una magnificación de 50kx. F) imagen SEM de MgAl-LDH obtenida en este trabajo, con una magnificación de 200kx.

La morfología de las nanopartículas obtenidas es congruente con la reportada en la literatura, pese a que Dong *et al.* (2014, Fig. 28B) y Ladewig *et al.* (2010, Fig. 28C) muestran imágenes obtenidas con TEM (Microscopio electrónico de transmisión), se logra apreciar la misma morfología con las imágenes de SEM obtenidas en este trabajo (Fig.28, D, E y F).

### 6.3 Selección de la región de diseño de los dsRNAs de Quitina sintasa VII y $\beta$ -tubulina

Con base en los antecedentes de SIGS, se identificaron otros genes blanco potenciales que han demostrado ser efectivos en otros patosistemas, tal es el caso de la Quitina sintasa y la  $\beta$ -tubulina, los cuales son genes constitutivos y esenciales. A través de BLASTn se obtuvieron resultados sobre si los genes tenían similitudes con genes de *C. sinensis* para posteriormente seleccionar la región con menor similitud. El gen de la  $\beta$ -tubulina fue el único que coincidió con genes del fruto de naranja, en este caso con  $\beta$ -tubulinas del fruto (Fig.29).

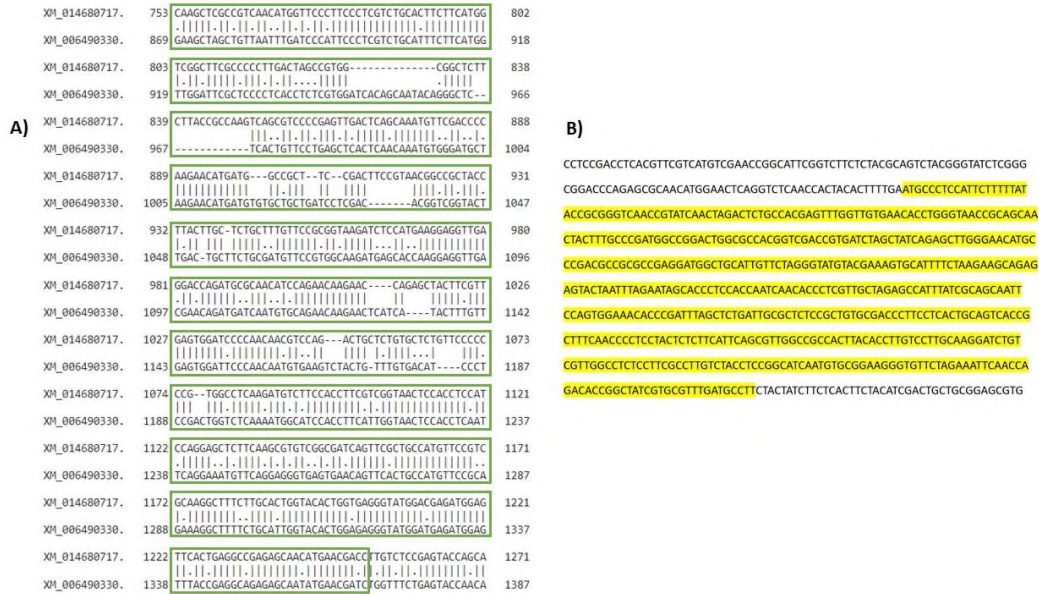


**Figura 29.** Resultados del análisis BLAST de los genes seleccionados contra la base de RNA mensajeros de *C. sinensis*. A) BLASTn del gen quitina sintasa VII, B) BLASTn del gen  $\beta$ -tubulina.

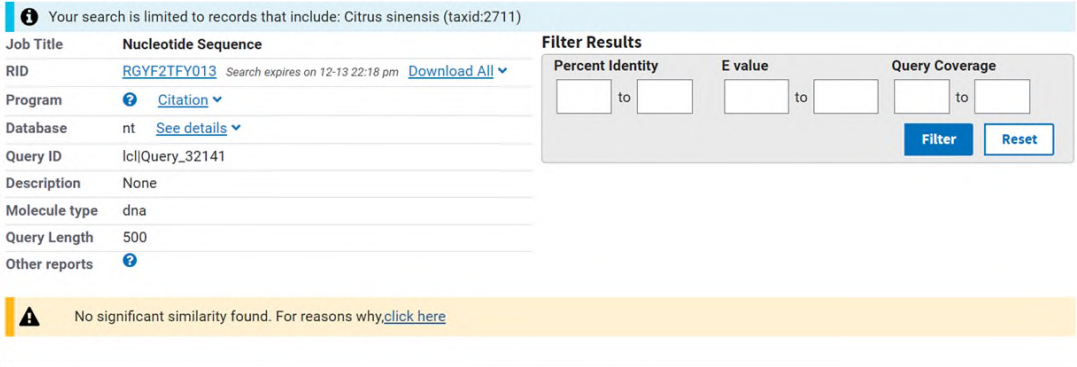
Con la herramienta bioinformática EMBOSS Needle se realizaron alineamientos de cada uno de los genes para seleccionar las áreas con menor similitud y evitar las regiones con dominios en común. El tamaño de la selección fue de 500pb (Fig. 30) para ambos genes. Adicionalmente, con las secuencias limitadas a los fragmentos seleccionados, se realizó

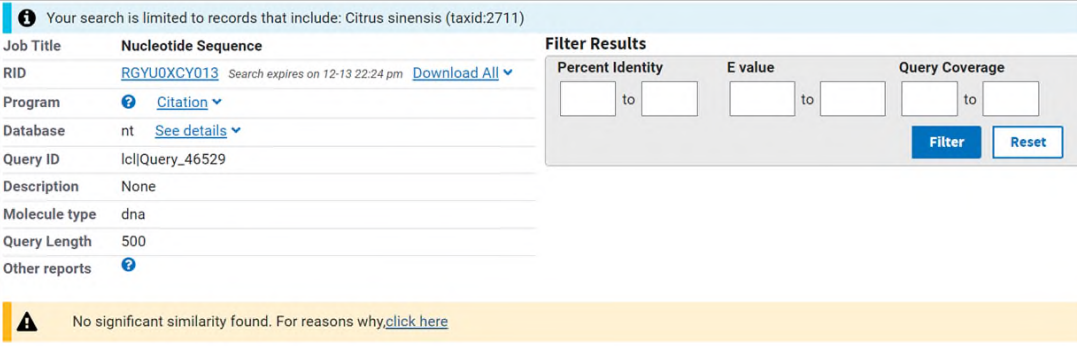


un análisis BLASTn para evaluar que no habría algún silenciamiento en genes de *Citrus sinensis*. Los resultados confirmaron que las construcciones seleccionadas tienen un potencial bajo o nulo de tener por blanco a cualquier RNA mensajero en naranjas, ya que no existe similitud entre el genoma de *Citrus sinensis* y los fragmentos diseñados para la síntesis de dsRNAi (Fig. 31). Por lo anterior no hay riesgos de efectos off-target en frutos de naranja.



**Figura 30.** A) Región seleccionada de 500pb del gen  $\beta$ -tubulina para su amplificación, B) Región seleccionada de 500pb del gen quitina sintasa VII para su amplificación.

**A)** 

**B)** 

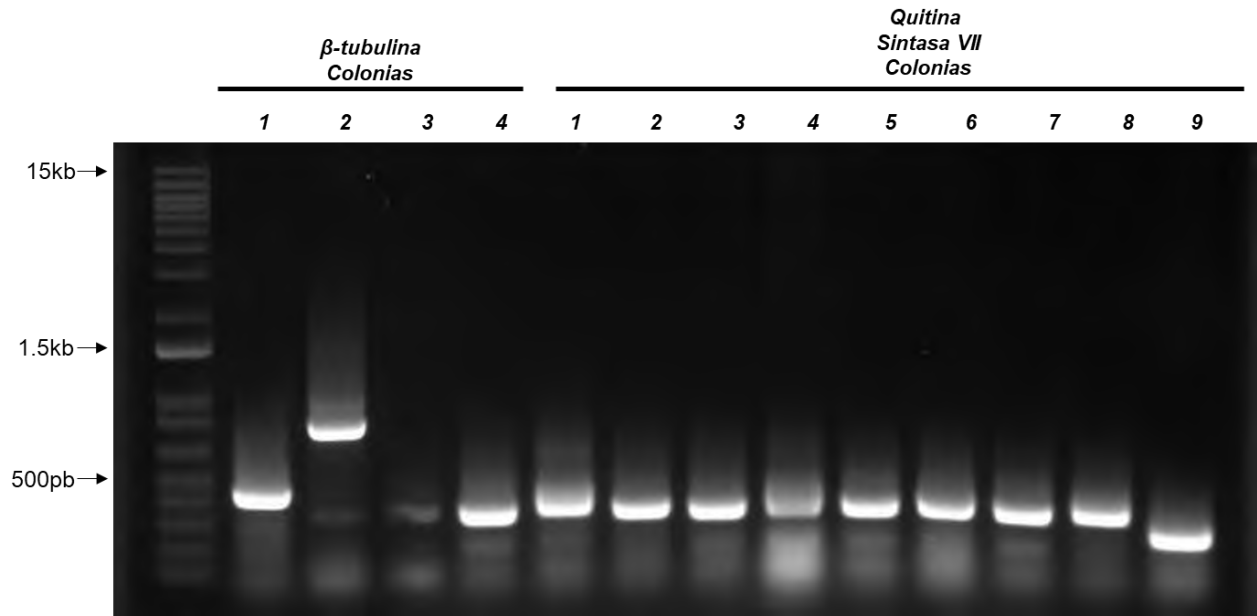
**Figura 31.** A) Resultados de BLASTn para evaluar homología entre la región de 500pb seleccionada de  $\beta$ -tubulina y el genoma de *Citrus sinensis*, B) Resultados de BLASTn para evaluar homología entre la región de quitina sintasa VII y el genoma de *Citrus Sinensis*.

### 6.3.1 Clonación de fragmentos de $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII

Para que la síntesis de dsRNAs proceda, una condición necesaria es la presencia del promotor T7. Por esta razón los fragmentos amplificados de  $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII se ligaron al vector pGEM-T easy y se realizó la transformación de *E. coli* para obtener el plásmido con las construcciones que contienen el promotor T7 flanqueando los fragmentos amplificados de  $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII.

La transformación de *E. coli* fue exitosa y se seleccionaron 4 colonias blancas para el fragmento de  $\beta$ -tubulina y 9 colonias para quitina sintasa VII. Realizando una PCR de colonia y usando los primers M13 se confirmó que 1 colonia contenía presuntamente el inserto de  $\beta$ -tubulina y de las 9 seleccionadas para quitina sintasa VII ninguna colonia tenía el inserto. La banda de la colonia número 2 de  $\beta$ -tubulina tuvo un tamaño de aproximadamente 732pb, que corresponde al tamaño del fragmento más una parte

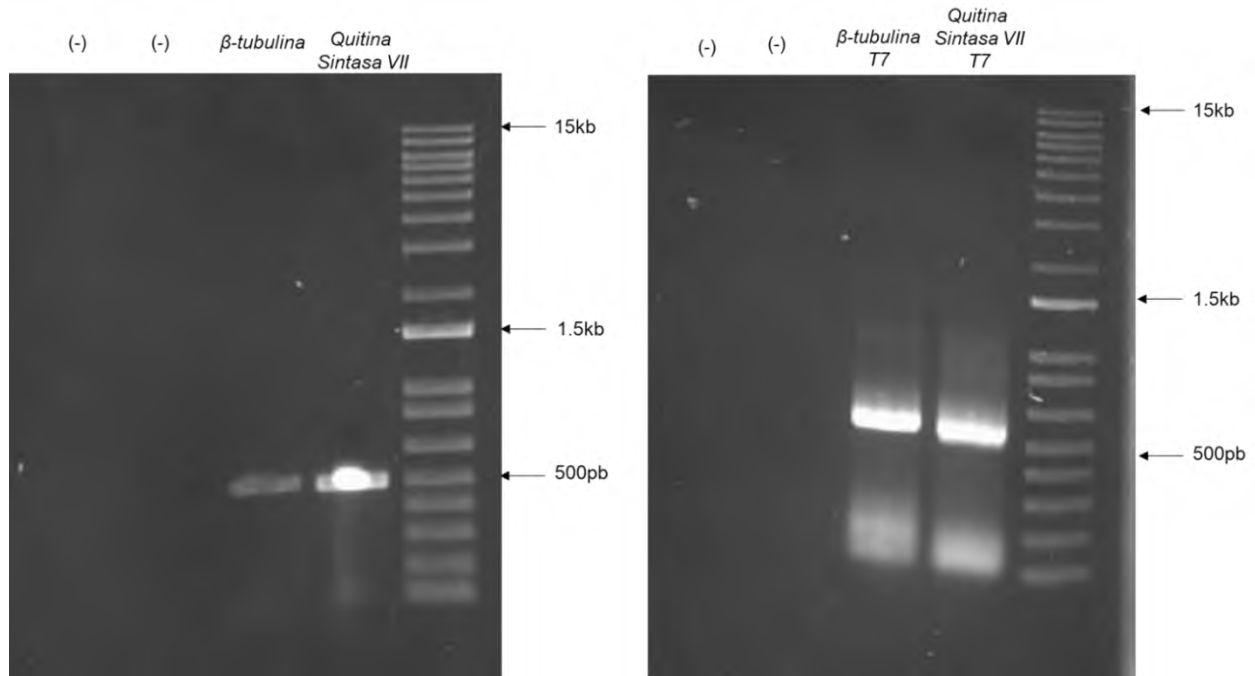
parcial del vector. La colonia 2 fue sembrada en medio LB líquido con ampicilina, posteriormente se extrajo el plásmido por el método de lisis alcalina.



**Figura 32.** Productos de amplificación de PCR de colonia de la clonación de los fragmentos de  $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII en células de *E. coli* químicamente competentes (One Shot Top 10), amplificada con primers M13 obteniendo una banda de 732pb en la colonias que contienen el inserto de  $\beta$ -tubulina (colonia 2). Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

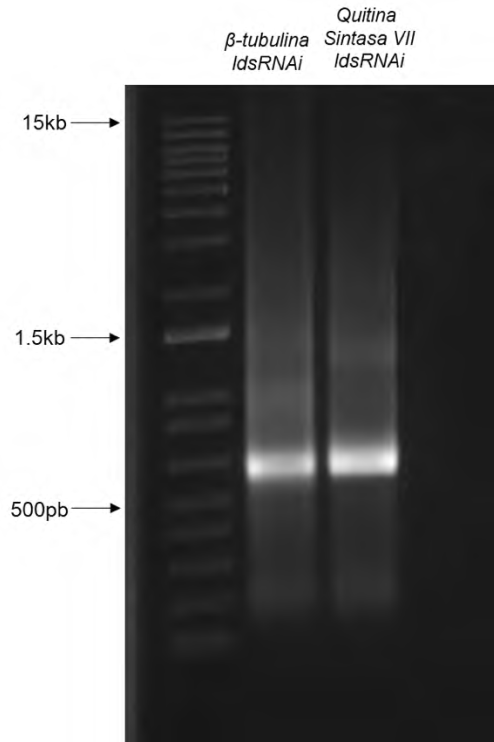
## 6.4 Síntesis de RNAs

A partir de plásmidos que contienen las construcciones de regiones de los genes DCL1/2, FET, Mic33/NIP, Tubulina y quitina sintasa, flanqueadas por el promotor T7 (Ramírez, 2022; Basilio, 2022), se realizó una PCR para amplificar las construcciones, para esto se ocuparon primers específicos con la secuencia del promotor T7.

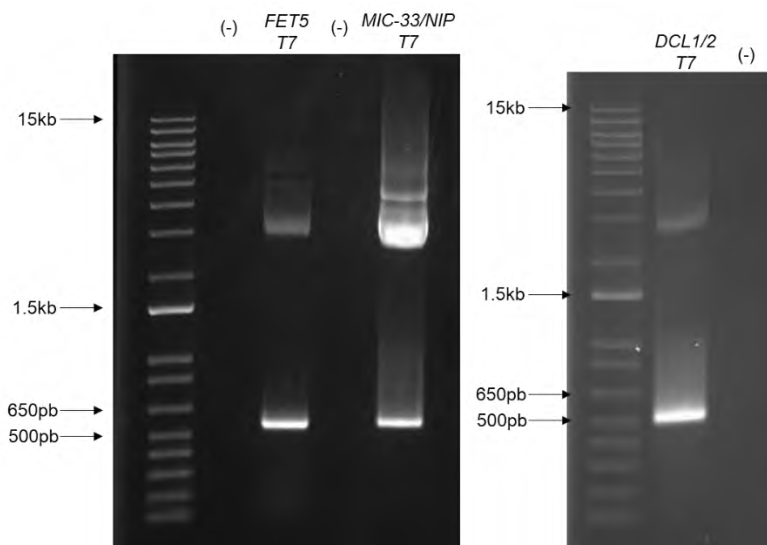


**Figura 33.** Productos de amplificación de la región de  $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII. Gel de agarosa 1% en TAE 1X, se visualiza la amplificación exitosa de los fragmentos de 500pb (izquierda) y adición de los extremos T7 con un tamaño de 546pb (derecha).

Después la purificación de los fragmentos con los extremos T7 (Fig. 33), estos se utilizaron como templado para la síntesis de dsRNAs. Mediante un gel de agarosa se verificó la obtención de los productos de la síntesis, con bandas de un tamaño esperado de 500pb (Fig.34).



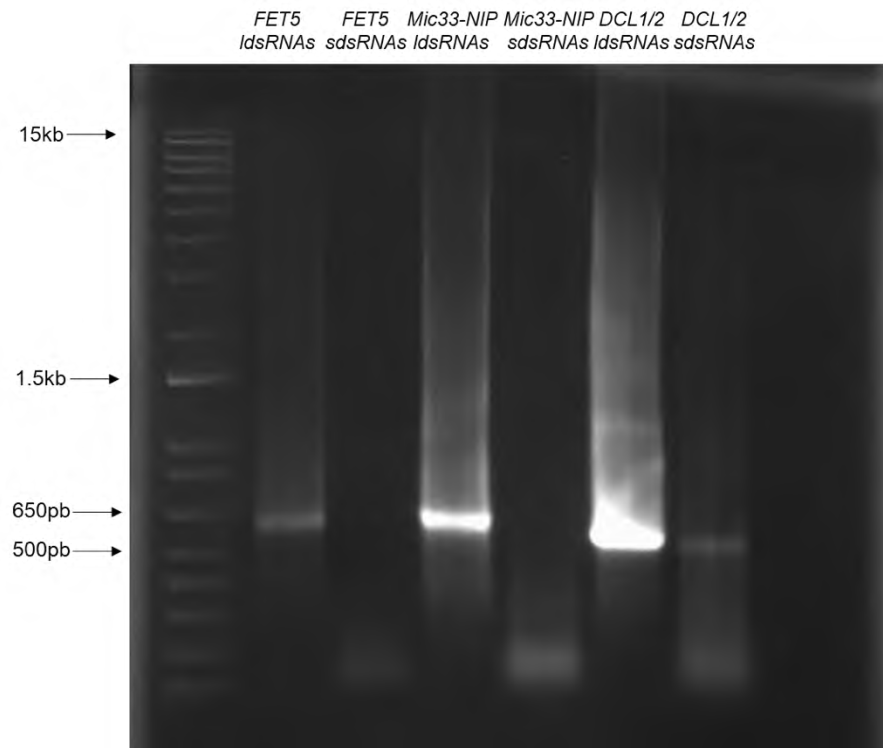
**Figura 34.** Productos de síntesis de IdsRNAs de  $\beta$ -tubulina y quitina sintasa VII. Gel de agarosa 1% en TAE 1X



**Figura 35.** Amplicones de *FET5*, las construcciones *Mic-33/NIP* y *DCL 1/2* con el promotor T7 a partir de plásmido. Los amplicones tienen un tamaño esperado de aproximadamente 546pb.

La purificación se llevó a cabo cortando la banda de interés y se purificó del gel (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, D4007, Zymo Research). Posteriormente el producto se utilizó como molde para la síntesis de dsRNAi. Mediante un gel de agarosa (1%) se verificó la obtención de los productos de la síntesis (Fig. 36).

Las bandas (observadas en el gel) de 500 pb corresponden al dsRNAi largo y las manchas debajo de 100 pb corresponden a dsRNAi cortos obtenidos por el tratamiento de ldsRNAs con RNAsa III.



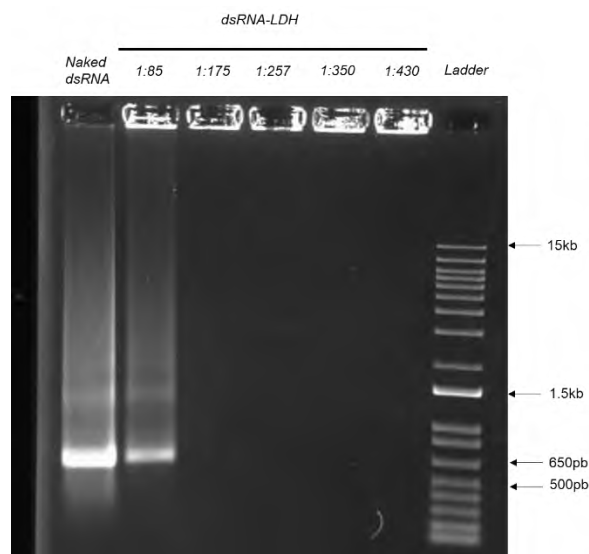
**Figura 36.** Productos de la síntesis de ldsRNAi y sdsRNAi de *FET5*, la construcción *Mic33-NIP* y *DCL 1/2*. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

#### 6.4.1 Elaboración y caracterización de la bioarcilla

Para evaluar la capacidad de retención de las nanopartículas se realizó un ensayo de retardación en gel de agarosa al 1% (120V, 40 min). Se mantuvo constante la concentración de dsRNA (100 ng) y se incrementó la concentración de LDH's, para determinar la relación donde se obtiene la hibridación completa del RNA de doble cadena.

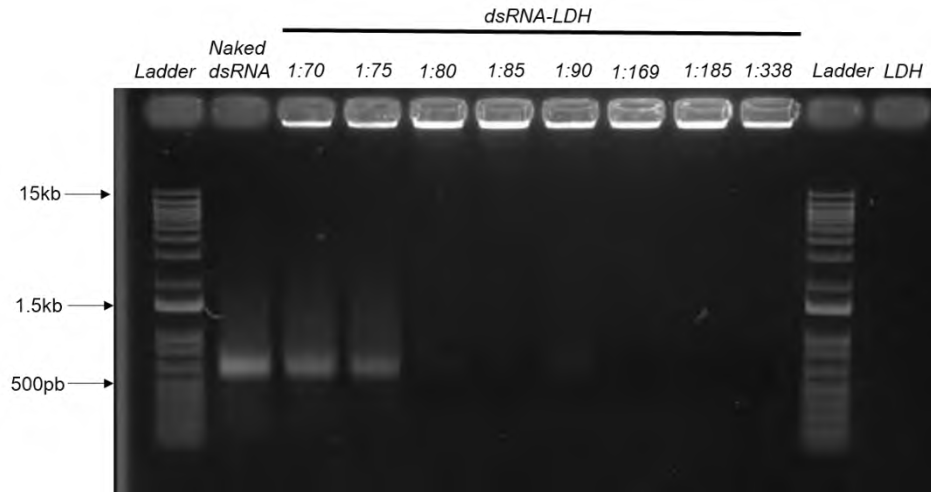
Para obtener la intercalación del ácido nucleico, este fue incubado con las nanopartículas a 37°C con agitación (400 RPM) durante 15 min en un termomezclador (Termomixer R, Eppendorf) con las relaciones 1:85, 1:175, 1:257, 1:350, 1:430.

Se obtuvo que a partir de la relación 1:175 (dsRNA:LDH) ocurrió el intercambio iónico completo, dando paso a la hibridación de ácido nucleico y dada la carga positiva de la superficie de las LDH, mostraron su incapacidad de moverse hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis.



**Figura 37.** Ensayo de retención de dsRNAs en nanopartículas mediante electroforesis. Como control se muestra el dsRNA desnudo (Nacked dsRNAs, sin LDH's). La relación 1:85 mostró una retención parcial del ácido nucleico, mientras las relaciones siguientes mostraron una retención completa.

Se realizó un segundo ensayo de retención, ya que, se sintetizaron por segunda vez nanopartículas debido a que solo permanecen estables durante 30 días (Dong *et al.*,2014), junto con los dsRNAs de tubulina y quitina. En este ensayo se observó una hibridación completa en la relación 1:169 (Fig. 38).



**Figura 38.** Ensayo de retención de dsRNAs en nanopartículas mediante electroforesis. Como control se muestra el dsRNA desnudo (Naked dsRNAs, sin LDH's). La relación 1:90 mostró una retención parcial del ácido nucleico, mientras las relaciones siguientes mostraron una retención completa.

Las relaciones dsRNA:LDH son altas respecto a las obtenidas por Dong *et al.*(2014); donde se realizó la hibridación completa de 100ng de dsRNA con una relación de 1:10; y Balcomb *et al.*(2015) donde con una relación de 1:45 se hibridó completamente el dsRNA con las nanopartículas de MgAl. Tanto Dong *et al.*(2014), como Balcomb *et al.*(2015) comprobaron la retención de ácidos nucleicos en las nanopartículas con ensayos de retención y lo complementaron con difracción de rayos X (XDR).

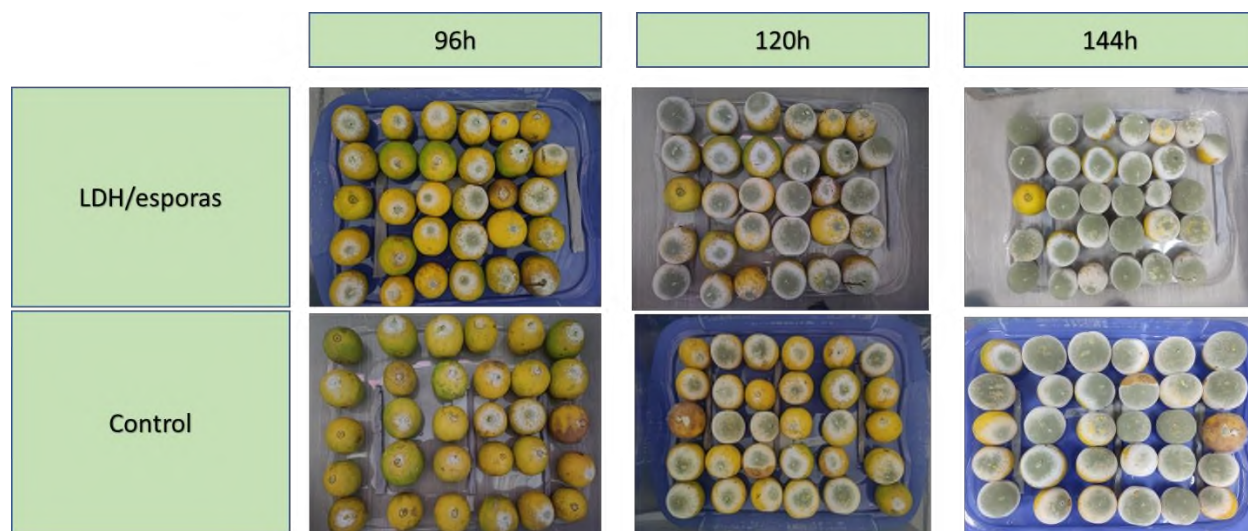
## 6.5 Evaluación de la actividad fungicida de bioarcillas de dsRNAs:LDH sobre *P. digitatum*

### 6.5.1 Bioensayo preliminar con dsRNAs y dsRNA:LDH contra FET5 y Mic-33/NIP

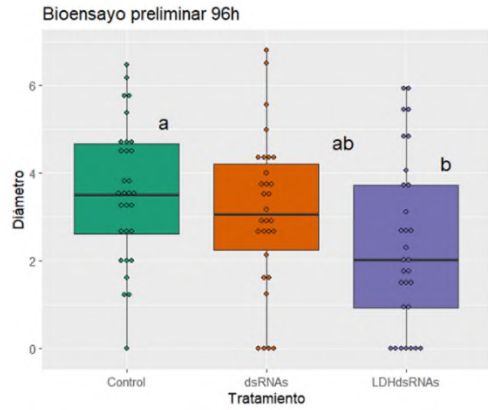
Para explorar los efectos del silenciamiento con dsRNAs desnudos e hibridados con LDH se diseñó un bioensayo con 30 unidades experimentales y una sola réplica. Se inocularon 30 naranjas por nivel del factor (grupo control, dsRNAs desnudos, dsRNAs:LDH y esporas:LDH. La relación dsRNAs:LDH se muestra en la figura 35) y las medidas del diámetro de infección fueron tomadas a las 96, 120 y 144 horas posteriores a la inoculación. Donde se observó que las nanopartículas no causan efectos negativos en el desarrollo de la infección por el hongo, por lo que la disminución del diámetro de



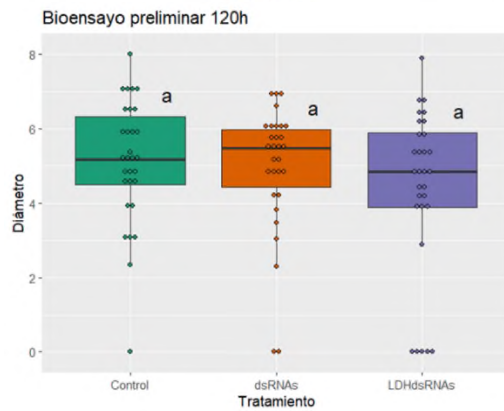
infección se le puede atribuir al tratamiento, ya que no tiene efectos tóxicos sobre el hongo (Fig. 39).



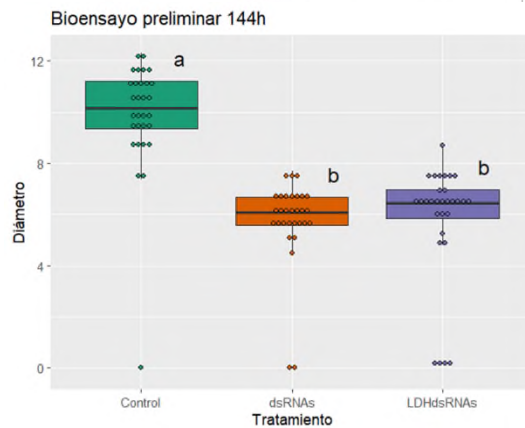
**Figura 39.** Evaluación de efectos no esperados de nanopartículas sobre *P. digitatum*. Tras 144 horas posteriores a la inoculación se pudo observar que el desarrollo del hongo tanto en el tratamiento como en el control continua de forma normal y no se aprecia un efecto tóxico de las nanopartículas sobre el hongo.



Análisis de Varianza							
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	2	21.08	7.13%	21.08	10.538	3.34	0.04
Error	87	274.56	92.87%	274.56	3.156		
Total	89	295.63	100.00%				



Análisis de Varianza							
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Trat.120	2	9.055	2.76%	9.055	4.528	1.23	0.296
Error	87	319.352	97.24%	319.352	3.671		
Total	89	328.407	100.00%				

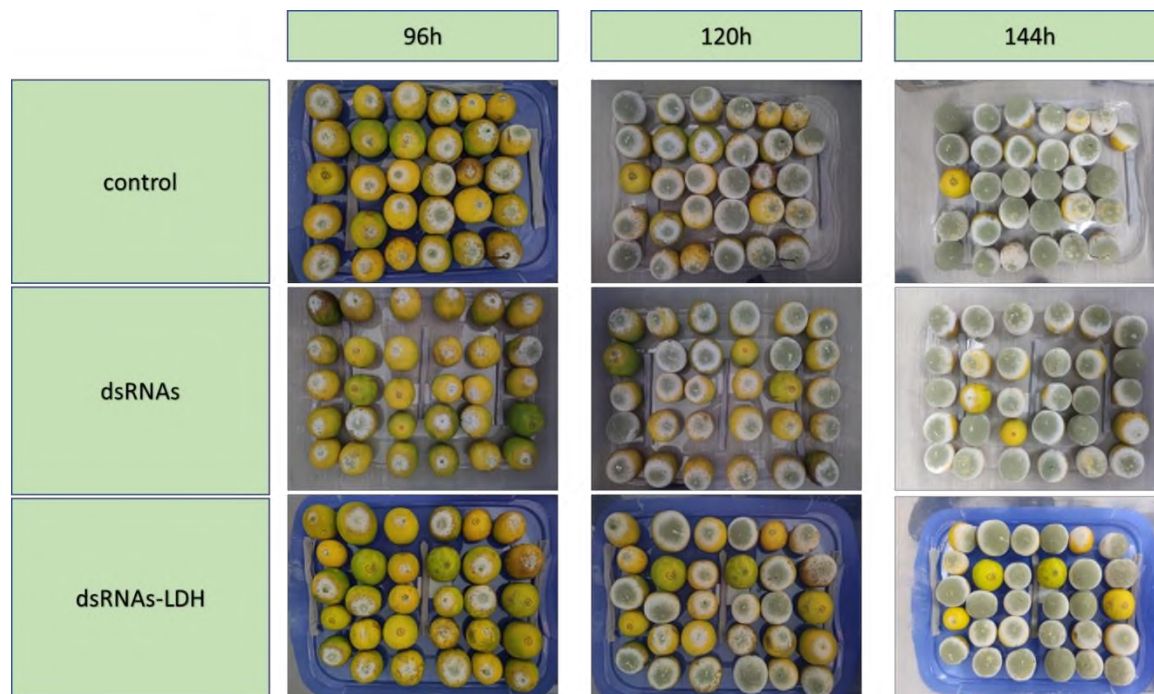


Análisis de Varianza							
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Trat.144	2	339.7	45.99%	339.7	169.85	37.04	0
Error	87	399	54.01%	399	4.586		
Total	89	738.7	100.00%				

**Figura 40.** Evaluación de los efectos fungicidas de dsRNAs (desnudos e híbridos con LDH). Boxplot y análisis de varianza 96,120 y 144 horas post-inoculación junto con el análisis conclusivo de Tukey. 30 unidades experimentales por tratamiento. Boxplot realizado en R Studio versión 2023.06.2.

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza y análisis conclusivo de Tukey (Fig. 40), a las 96 horas post-inoculación existen diferencias significativas entre el tratamiento dsRNA:LDH y los demás tratamientos, a las 120 horas no existen diferencias significativas entre los tratamientos y a las 144 horas no hay diferencias significativas entre los dsRNAs desnudos y los híbridos a nanopartículas de LDH pero sí de entre

estos y el control, por lo que podemos suponer que las nanopartículas de LDH potencian el efecto de los dsRNAs en un inicio a pesar que al final del ciclo de infección tengan el mismo efecto que los dsRNAs desnudos respecto al diámetro de infección, aunque en el índice de incidencia a las 96h es menor en contraste a los otros tratamientos (Fig.41) .



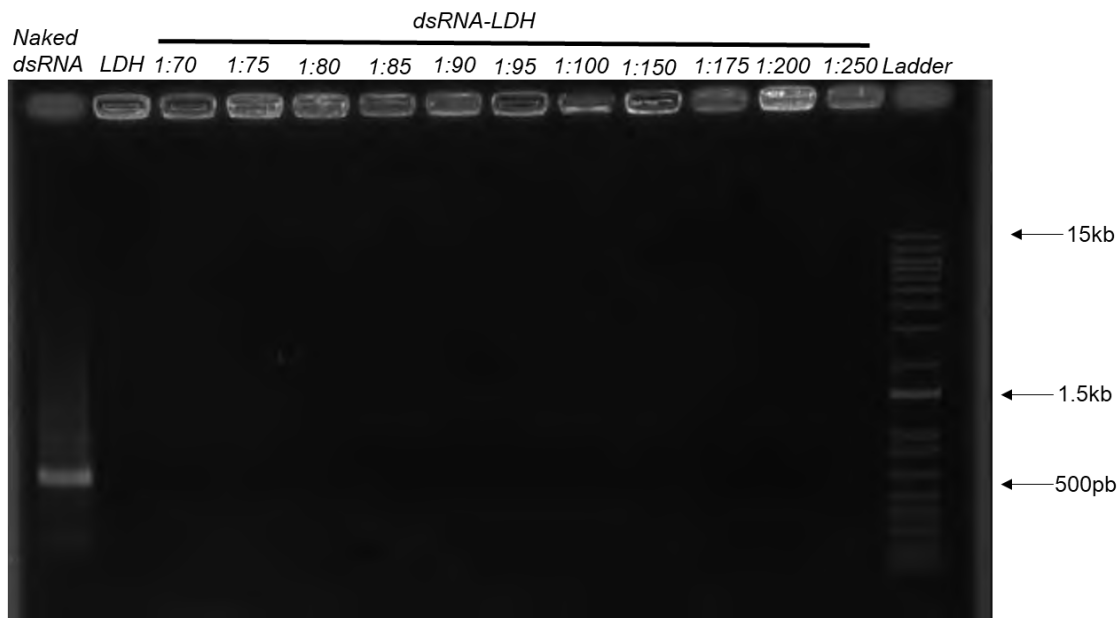
**Figura 41.** Bioensayo de efecto fungicida de dsRNAs. Se evaluó el efecto de RNAs de doble cadena sobre frutos de naranja contra *P. digitatum*, tanto desnudos como protegidos por MgAl-LDH. 30 unidades experimentales por tratamiento.

### 6.5.2 Bioensayo de actividad fungicida de dsRNAs FET5, Mic/NIP, DCL1/2 y $\beta$ -Tubulina, desnudos y en bioarcillas con LDH

Para evaluar el efecto que tienen los dsRNAs sobre *P. digitatum* e investigar si las nanopartículas de LDH pueden mejorar este efecto se realizó un bioensayo con 3 réplicas. Cada réplica constó de 15 unidades experimentales por tratamiento, siendo un total de 7 tratamientos más el control.

Las naranjas se inocularon con una solución de esporas con una concentración de  $10^5$  esporas/mL y con  $1\mu\text{g}$  de dsRNAs (desnudos e hibridados con LDH). Previamente se realizó una prueba de retención para saber la relación dsRNAs:LDH correcta, y de esta forma asegurar que los dsRNAs ( $1\mu\text{g}$ ) estuvieran completamente retenidos en las

nanopartículas (lo cual se logra por las interacciones electrostáticas entre los dsRNAs y las láminas de LDH) (Fig.42) la cual fue de 1:70.



**Figura 42.** Ensayo de retención. Antes de realizar el bioensayo se exploró la relación correcta de dsRNAs:LDH, así después de la incubación se realizó una electroforesis en gel de agarosa, donde se puede observar una hibridación desde la relación 1:70.

Posterior a la inoculación de los frutos de naranja, se tomaron medidas de los diámetros a las 96 horas, 120 horas y 144 horas. Los datos se ocuparon para realizar un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis conclusivo de Tukey para observar si había diferencias significativas.

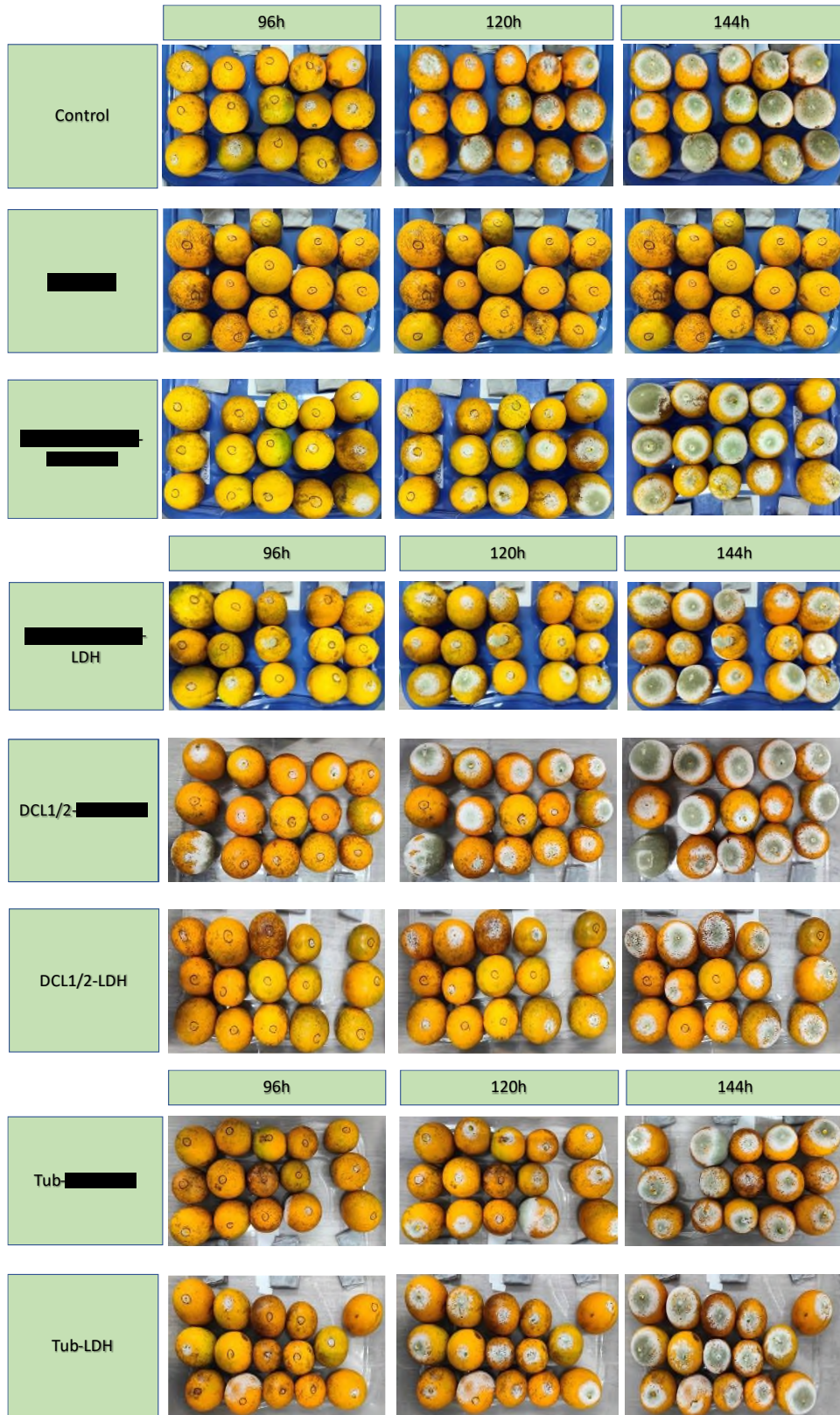


Figura 43. Réplica 1 del bioensayo de efectos de dsRNAs sobre *P. digitatum* sobre frutos de naranja.



Figura 44. Réplica 2 del bioensayo de efectos de dsRNAs sobre *P. digitatum* sobre frutos de naranja

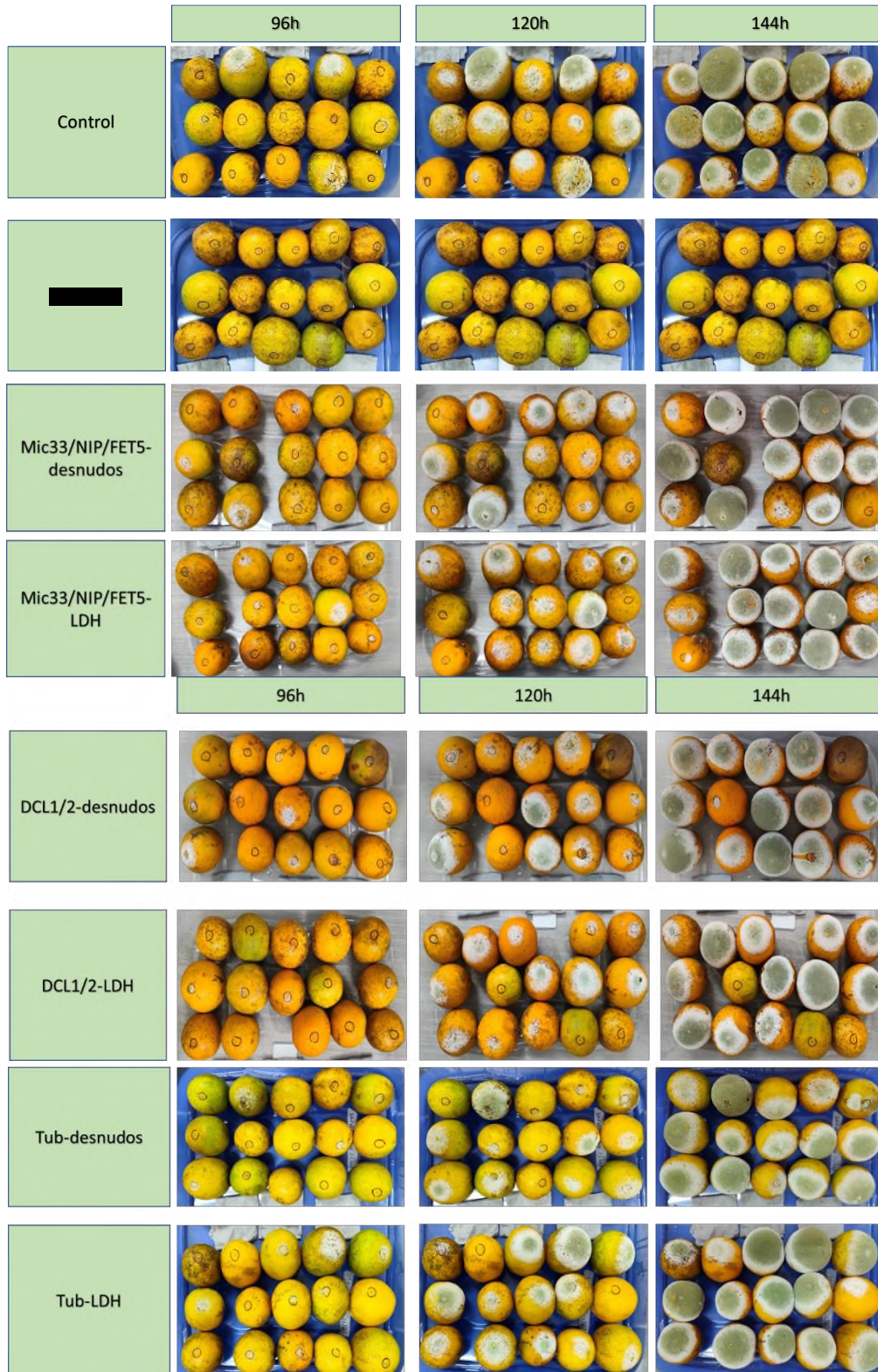


Figura 45. Réplica 3 del bioensayo de efectos de dsRNAs sobre *P. digitatum* sobre frutos de naranja

De acuerdo con los análisis estadísticos (Fig.46,Tabla 12) , a las 96 horas no existen diferencias significativas entre los tratamientos con dsRNAs y el control, pero a las 120 horas los tratamientos de Mic/NIP-FET5:LDH y DCL:LDH presentan diferencias significativas respecto al control. A las 144 horas DCL:LDH mantiene diferencias significativas respecto al control y al tratamiento de Tub:LDH.

**Tabla 12.** ANOVA de Bioensayo de actividad fungicida de dsRNAs FET5, Mic/NIP, DCL1/2 y  $\beta$ -Tubulina, desnudos e hibridados a LDH. 3 réplicas con 15 unidades experimentales por tratamiento (n=45 por tratamiento en el análisis). Realizado con RStudio con un  $\alpha=0.05$ .

Análisis de Varianza 96h

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	7	18.77	8.01%	18.77	2.682	4.38	0
Error	352	215.72	91.99%	215.72	0.6128		
Total	359	234.49	100.00%				

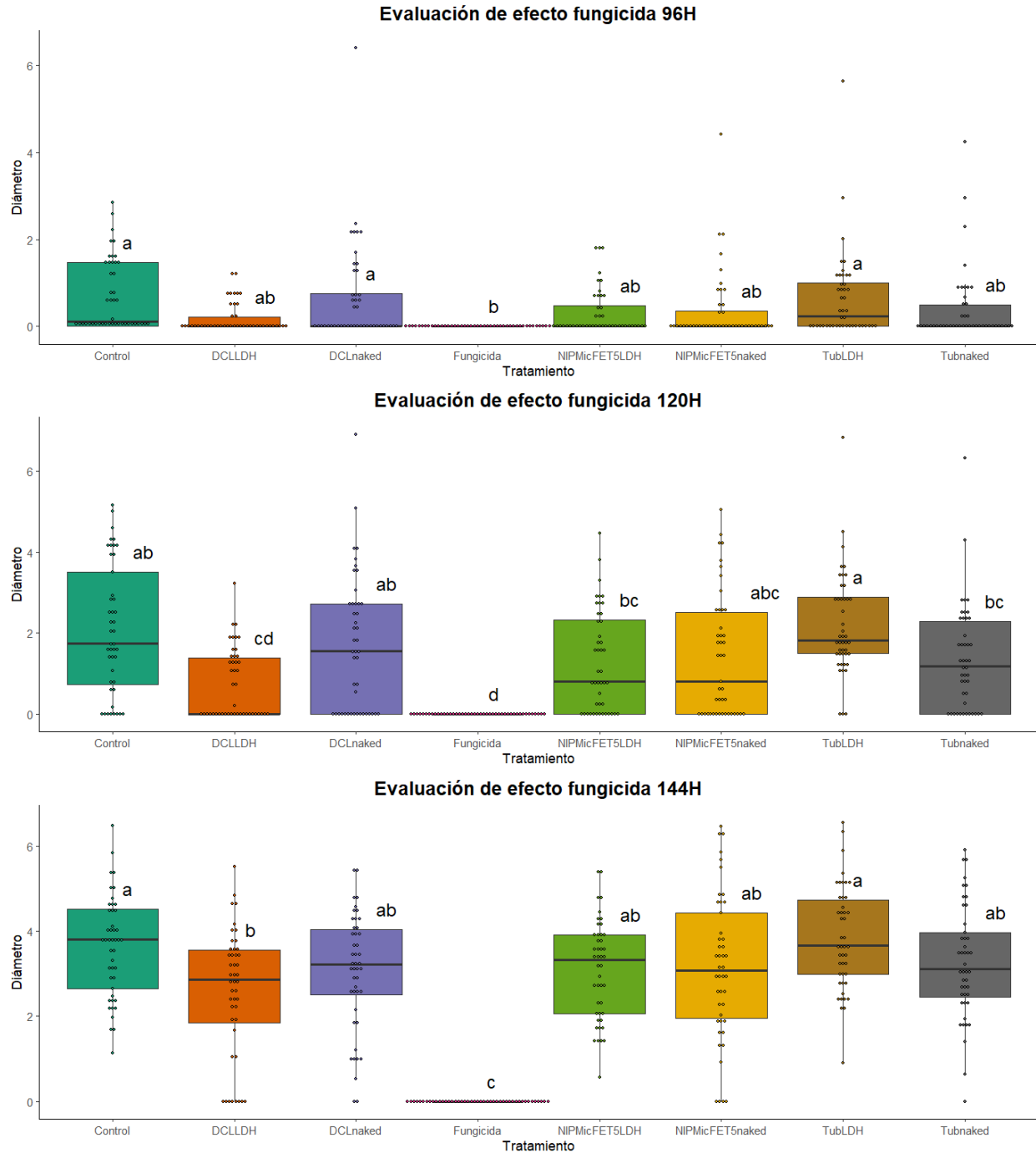
Análisis de Varianza 120h

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
T120	7	161.1	21.65%	161.1	23.008	13.89	0
Error	352	582.9	78.35%	582.9	1.656		
Total	359	743.9	100.00%				

Análisis de Varianza 144h

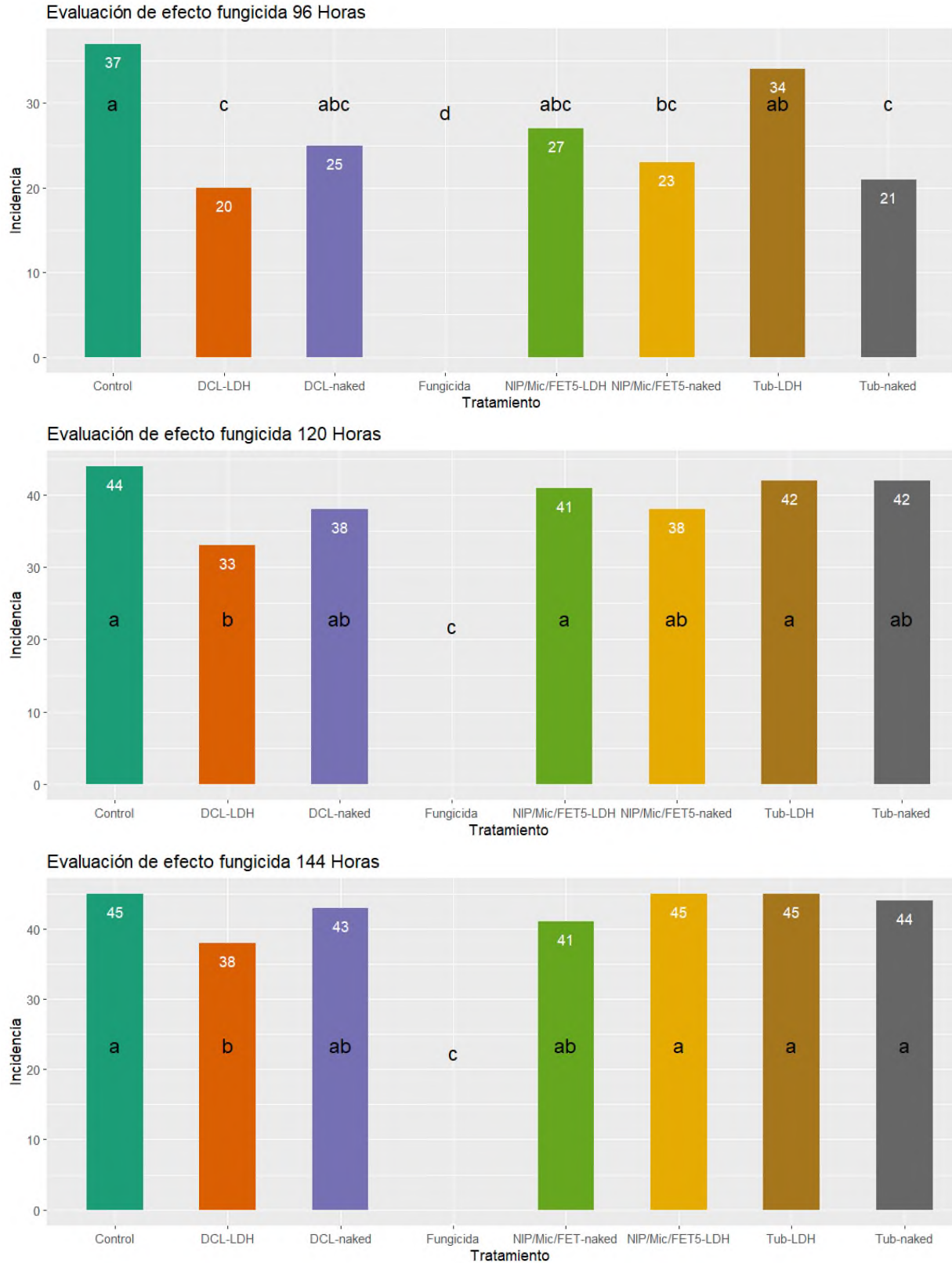
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
T144	7	453.9	43.95%	453.9	64.838	39.43	0
Error	352	578.8	56.05%	578.8	1.644		
Total	359	1032.6	100.00%				





**Figura 46.** Agrupaciones de Tukey con un nivel de confianza del 95%. 3 réplicas con 15 unidades experimentales por tratamiento (n=45 por tratamiento en el análisis). Realizado con la paquetería ggplot2 en RStudio.

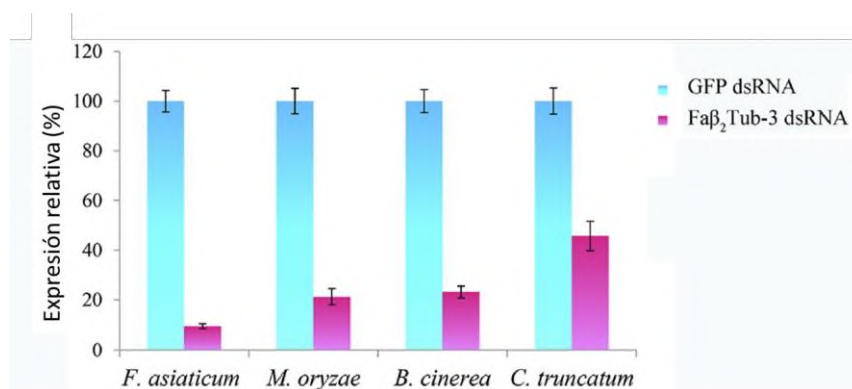
Con el fin de tener un parámetro extra sobre la efectividad de los dsRNAs evaluados, se contabilizó la incidencia de infección, y así dilucidar si los tratamientos ayudan a disminuir las pérdidas de los frutos al ser infectados.



**Figura 47.** Incidencia de infección. Graficas de barras y agrupaciones de Tukey de la incidencia de infección de *P. digitatum* sobre frutos de naranja. 3 réplicas con 15 unidades experimentales (n= 45 por tratamiento en el análisis). Realizado con la paquetería ggplot2 en RStudio.

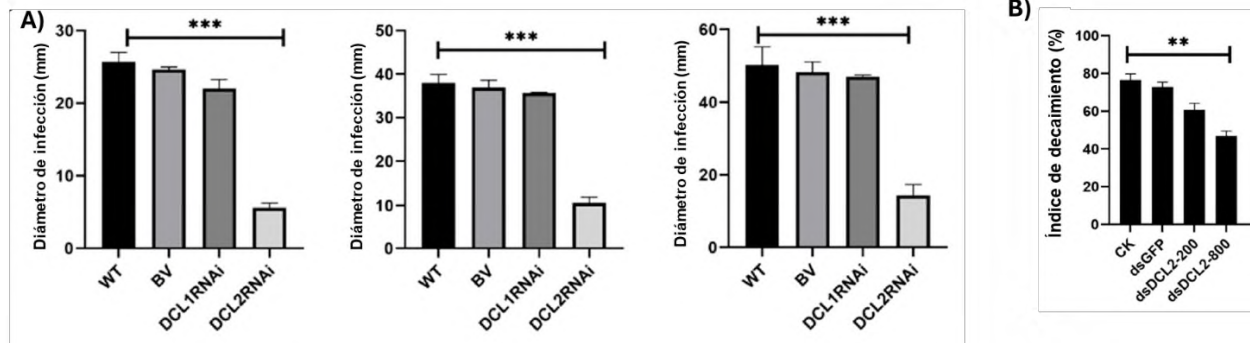
De acuerdo con la figura 47, se observa que, de 96 a 144 horas, el tratamiento DCL-LDH mantiene diferencias significativas respecto al control, siendo que a las 96h hubo una disminución de la incidencia en un 46%, a las 120h de 25% y a las 144h de un 15%. En el caso del tratamiento de DCL de forma desnuda, a las 96h hubo una disminución de la incidencia de 32%, a las 120h del 13% y a las 144h de solo 4%. Por lo que, en los 3 tiempos reportados, las nanopartículas mejoraron el efecto de los dsRNAs es aproximadamente en un 10%-15%.

El uso de SIGS para el silenciamiento de  $\beta_2$ -tubulina, (Gu *et al.*, 2018) mostró actividad antifúngica contra *Fusarium spp.*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae* y *Colletotrichum truncatum*, mostrando efectos negativos en el crecimiento de micelio, reproducción asexual y virulencia. En este trabajo, los dsRNAs dirigidos al silenciamiento de Tubulina no mostraron efectos en el desarrollo de la infección, ni desnudos ni en nanopartículas. Gu *et al.* 2018) probaron diferentes regiones del gen, siendo una de ellas la que presentó mejores efectos. , lo que apunta a que podría requerirse la selección de otras regiones del gen para lograrlo.



**Figura 48.** Trabajo realizado por Gu *et al.*(2018) Biomasa fúngica relativa en la planta. Después de 48 h de cultivo, se aisló el ADN del sitio de inoculación de la planta. La qPCR en tiempo real se realizó utilizando una cantidad igual (30 ng) del ADN correspondiente de los grupos de control y tratamiento.

Yin y colaboradores (2020) exploraron el efecto de mutar los genes DCL1 y DCL2 en *P. italicum* en frutos de mandarina, y obtuvieron una reducción significativa en el diámetro de infección (a 3,4,5 dpi, Fig. 49 A). Sin embargo, al aplicar SIGS, no reportaron el efecto en el diámetro de infección, sino que utilizaron el índice de decaimiento basado en pruebas organolépticas (Fig. 49 B).



**Figura 49.** Evaluación de la capacidad infectiva de *P. italicum* mutantes en genes DCL1 (A) y DCL2 (B). Índice de decaimiento de frutos en una estrategia SIGS con dsRNAs dirigidos al silenciamiento de DCL2 en *P. italicum* (Yin *et al.*, 2020).

El índice de decaimiento tiende a ser subjetivo, y el hecho de que este valor haya experimentado una baja al emplear mutantes de *P. digitatum* solo demuestra la importancia de los genes DCL para el proceso infectivo. Por lo que, si bien es el único trabajo relacionado, no se puede comparar con los resultados de esta investigación directamente, ya que para la determinación del efecto se empleó un parámetro diferente. Por tal razón, este trabajo es el primero en evaluar la estrategia SIGS en frutos de naranja contra *P. digitatum* y en cuantificar la incidencia y desarrollo de la infección.

## 7 Conclusiones

- La concentración óptima de esporas para los bioensayos del patosistema *Penicillium digitatum*:*Citrus sinensis* es de  $1 \times 10^5$  esporas/mL, apareciendo los síntomas a los 4 días y completando el ciclo de infección a los 7 días.
- La iluminación no es un factor importante en el crecimiento de *P. digitatum*, ya que no existen diferencias significativas en su desarrollo si éste se encuentra iluminado o en obscuridad
- 50 µg/mL de benomilo son suficientes para apreciar diferencias en el desarrollo de *P. digitatum* en frutos de naranja.
- El mejor método de aplicación del dsRNA para obtener resultados analizables en los bioensayos es una incubación previa con el inóculo.
- La morfología de las nanopartículas de LDH es congruente con lo reportado en la literatura y se requiere determinar la capacidad de retención en cada lote de nanopartículas que se genere.
- Con ayuda de herramientas bioinformáticas se logró seleccionar regiones de los genes de quitina sintasa y  $\beta$ -tubulina con baja similitud al genoma de *Citrus sinensis* y con baja probabilidad de efectos *off-target*.
- Las nanopartículas de LDH mejoraron el efecto de los tratamientos con dsRNAs dirigidos a Mic/NIP-FET5 y DCL 1/2 a las 120 horas y de DCL1/2 a las 144 horas, respecto a el desarrollo de la infección.
- Respecto a la incidencia las nanopartículas de LDH mejoraron el efecto de los dsRNAs dirigidos a DCL 1/2, manteniendo diferencias significativas respecto al control desde las 96 a 144 horas.

## 8 Perspectivas

- A partir de los resultados de la síntesis de nanopartículas de LDH, se recomienda evaluar distintas temperaturas, presiones y tiempos en el tratamiento hidrotermal con el fin de dilucidar las condiciones necesarias para estandarizar el tamaño de las nanopartículas obtenidas.
- Explorar otros instrumentos para caracterizar las nanopartículas de LDH además del SEM.
- Se recomienda realizar una cinética de silenciamiento de los genes blanco a lo largo del tiempo del desarrollo de la infección y en ambos tratamientos (dsRNAs-desnudos y dsRNAs:LDH)
- Dado que la efectividad de entrega de los dsRNAs por parte de las nanopartículas es dependiente del tamaño, se podría considerar marcar los ácidos nucleicos con fluorescencia y así evaluar si ingresan al citoplasma correctamente.

## 9 Referencias

- Altieri, G., Di Renzo, G. C., Genovese, F., Calandra, M., & Strano, M. C. (2013). A new method for the postharvest application of imazalil fungicide to citrus fruit. *Biosystems Engineering*, 115(4), 434–443. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2013.04.008>
- Ariza, M. R., Larsen, T. O., Bent O. Petersen, Duus, J. Ø., & Barrero, A. F. (2002). *Penicillium digitatum* Metabolites on Synthetic Media and Citrus Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6361-6365. <https://doi.org/10.1021/jf020398d>
- Basilio O.J. I. (2022) Evaluación de un biofungicida basado en RNAs de doble cadena (dsRNAs) contra genes de patogénesis de *Penicillium digitatum* para la protección de frutos de naranja en etapa postcosecha. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Universidad del Papaloapan.
- Bennett, M., Deikman, J., Hendrix, B., & landolino, A. (2020). Barriers to Efficient Foliar Uptake of dsRNA and Molecular Barriers to dsRNA Activity in Plant Cells. *Frontiers in Plant Science*, 11, 816. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00816>
- Bhatta, U. K. (2022). Alternative Management Approaches of Citrus Diseases Caused by *Penicillium digitatum* (Green Mold) and *Penicillium italicum* (Blue Mold). *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.833328>
- Bocos-Asenjo, I. T., Niño-Sánchez, J., Ginésy, M., & Diez, J. J. (2022). New Insights on the Integrated Management of Plant Diseases by RNA Strategies: Mycoviruses and RNA Interference. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9236. <https://doi.org/10.3390/ijms23169236>
- Cai, Q., He, B., & Jin, H. (2019). A safe ride in extracellular vesicles – small RNA trafficking between plant hosts and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 52, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.001>
- Chen, H.-M., Chen, L.-T., Patel, K., Li, Y.-H., Baulcombe, D. C., & Wu, S.-H. (2010). 22-nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15269-15274. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001738107>
- Cheng, W., Lin, M., Chu, M., Xiang, G., Guo, J., Jiang, Y., Guan, D., & He, S. (2022). RNAi-Based Gene Silencing of RXLR Effectors Protects Plants Against the Oomycete Pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 35(6), 440-449. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-21-0295-R>
- Cheng, W., Song, X.-S., Li, H.-P., Cao, L.-H., Sun, K., Qiu, X.-L., Xu, Y.-B., Yang, P., Huang, T., Zhang, J.-B., Qu, B., & Liao, Y.-C. (2015). Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to Fusarium head blight and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 13(9), 1335-1345. <https://doi.org/10.1111/pbi.12352>
- Cheng, Y., Lin, Y., Cao, H., & Li, Z. (2020). Citrus Postharvest Green Mold: Recent Advances in Fungal Pathogenicity and Fruit Resistance. *Microorganisms*, 8(3), 449. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030449>
- Choi, S.-J., & Choy, J.-H. (2011). Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers: Uptake mechanism and toxicity. *Nanomedicine*, 6(5), 803-814. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.86>

- Costa, J. H., Bazioli, J. M., de Moraes Pontes, J. G., & Fill, T. P. (2019). Penicillium digitatum infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biology*, 123(8), 584-593. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.004>
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(1), 5.1.14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016>
- Dong, H., Chen, M., Rahman, S., Parekh, H. S., Cooper, H. M., & Xu, Z. P. (2014). Engineering small MgAl-layered double hydroxide nanoparticles for enhanced gene delivery. *Applied Clay Science*, 100, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.04.028>
- Dou, T., Shao, X., Hu, C., Liu, S., Sheng, O., Bi, F., Deng, G., Ding, L., Li, C., Dong, T., Gao, H., He, W., Peng, X., Zhang, S., Huo, H., Yang, Q., & Yi, G. (2020). Host-induced gene silencing of *Foc TR 4 ERG 6/11* genes exhibits superior resistance to Fusarium wilt of banana. *Plant Biotechnology Journal*, 18(1), 11-13. <https://doi.org/10.1111/pbi.13204>
- FAOSTAT. (s. f.). Recuperado 27 de octubre de 2022, de <https://www.fao.org/faostat/en/>
- Fones, H. N., Bebbler, D. P., Chaloner, T. M., Kay, W. T., Steinberg, G., & Gurr, S. J. (2020). Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. *Nature Food*, 1(6), 332-342. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0075-0>
- Haile, Z. M., Gebremichael, D. E., Capriotti, L., Molesini, B., Negrini, F., Collina, M., Sabbadini, S., Mezzetti, B., & Baraldi, E. (2021). Double-Stranded RNA Targeting Dicer-Like Genes Compromises the Pathogenicity of *Plasmopara viticola* on Grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 12, 667539. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.667539>
- He, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C.-Y., Wang, S., Miao, W., Ha, T., Wang, Y., & Jin, H. (2021). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature Plants*, 7(3), 342-352. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00863-8>
- Höfle, L., Biedenkopf, D., Werner, B. T., Shrestha, A., Jelonek, L., & Koch, A. (2020). Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the *Fusarium CYP51* genes. *RNA Biology*, 17(4), 463-473. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700033>
- Huang, C.-Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R., & Jin, H. (2019). Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, 26(2), 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.021>
- Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., & Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, 10(1), 409-424. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1649520>
- Jain, R. G., Fletcher, S. J., Manzie, N., Robinson, K. E., Li, P., Lu, E., Brosnan, C. A., Xu, Z. P., & Mitter, N. (2022). Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control. *Nature Plants*, 8(5), 535-548. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01152-8>
- Julca, I., Droby, S., Sela, N., Marcet-Houben, M., & Gabaldón, T. (2015). Contrasting genomic diversity in two closely related postharvest Pathogens: *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. *Genome Biology and Evolution*, 8(1), 218-227. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv252>
- Kanan, G. J. M. (n.d.). In vitro Evaluation of *Penicillium digitatum* Sacc Strains Sensitivity to Various Fungicides from Jordan. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(12), 1517–1529. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1517.1529>



- Khalifa, & Sameer, W. (2014). Control of the green mold of orange using fungicides alone and in combination with antioxidants. Department of Plant Protection, Fac. Of Agric. (Cairo), Al-Azhar Univ. Cairo, Egypt. <https://www.semanticscholar.org/paper/Control-of-the-Green-Mold-of-Orange-Using-Alone-and-Khalifa-Sameer/baaafd454ab2e54f35810659cd8bb744c104154c>
- Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., Linicus, L., Johannsmeier, J., Jelonek, L., Goesmann, A., Cardoza, V., McMillan, J., Mentzel, T., & Kogel, K.-H. (2016). An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLoS Pathogens*, 12(10), e1005901. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>
- Koch, A., Höfle, L., Werner, B. T., Imani, J., Schmidt, A., Jelonek, L., & Kogel, K. (2019). SIGS vs HIGS: A study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium FgCYP51* genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology*, 20(12), 1636-1644. <https://doi.org/10.1111/mpp.12866>
- Lafuente, M. T., & González-Candelas, L. (2024). Phytohormones in the *Penicillium digitatum*-citrus fruit interaction. *Postharvest Biology and Technology*, 209, 112704. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112704>
- Lafuente, M. T., Ballester, A., & González-Candelas, L. (2019). Involvement of abscisic acid in the resistance of citrus fruit to *Penicillium digitatum* infection. *Postharvest Biology and Technology*, 154, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.04.004>
- Lafuente, M. T., Romero, P., & González-Candelas, L. (2021). Albedo- and Flavedo-Specific transcriptome profiling related to *penicillium digitatum* infection in citrus fruit. *Foods*, 10(9), 2196. <https://doi.org/10.3390/foods10092196>
- Liu, G., Kang, G., Wang, S., Huang, Y., & Cai, Q. (2021). Extracellular Vesicles: Emerging Players in Plant Defense Against Pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 12, 757925. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.757925>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorenzini, M., Azzolini, M., Tosi, E., & Zapparoli, G. (2013). Postharvest grape infection of *Botrytis cinerea* and its interactions with other moulds under withering conditions to produce noble-rotten grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 762-770. <https://doi.org/10.1111/jam.12075>
- Macarasin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M., & Droby, S. (2007). *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. *Phytopathology*, 97(11), 1491–1500. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-11-1491>
- McLoughlin, A. G., Wytinck, N., Walker, P. L., Girard, I. J., Rashid, K. Y., de Kievit, T., Fernando, W. G. D., Whyard, S., & Belmonte, M. F. (2018). Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, 8(1), 7320. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25434-4>
- Mello, C. C., & Conte, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431(7006), 338-342. <https://doi.org/10.1038/nature02872>
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R. G., Taochy, C., Fletcher, S. J., Carroll, B. J., Lu, G. Q., & Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 3(2), 16207. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>

- Muhammad, T., Zhang, F., Zhang, Y., & Liang, Y. (2019). RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors. *Cells*, 8(1), 38. <https://doi.org/10.3390/cells8010038>
- Mumbanza, F. M., Kiggundu, A., Tusiime, G., Tushemereirwe, W. K., Niblett, C., & Bailey, A. (2013). In vitro antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, 69(10), 1155–1162. <https://doi.org/10.1002/ps.3480>
- Niño-Sánchez, J., Sambasivam, P. T., Sawyer, A., Hamby, R., Chen, A., Czislawski, E., Li, P., Manzie, N., Gardiner, D. M., Ford, R., Xu, Z. P., Mitter, N., & Jin, H. (2022). BioClay™ prolongs RNA interference-mediated crop protection against *Botrytis cinerea*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(11), 2187–2198. <https://doi.org/10.1111/jipb.13353>
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., & Schweizer, P. (2010). HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the Obligate Biotrophic Fungal Pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, 22(9), 3130–3141. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>
- Nsamba, E. T., & Gupta, M. L. (2022). Tubulin isotypes – functional insights from model organisms. *Journal of Cell Science*, 135(9). <https://doi.org/10.1242/jcs.259539>
- Qian, X., Yang, Q., Zhang, Q., Abdelhai, M. H., Dhanasekaran, S., Serwah, B. N. A., Gu, N., & Zhang, H. (2019). Elucidation of the Initial Growth Process and the Infection Mechanism of *Penicillium digitatum* on Postharvest Citrus (*Citrus reticulata* Blanco). *Microorganisms*, 7(11), 485. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110485>
- Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Nino Sanchez, J., Hamby, R., Heller, J., Zhao, H., Glass, N. L., Judelson, H. S., Mezzetti, B., Niu, D., & Jin, H. (2021). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1756–1768. <https://doi.org/10.1111/pbi.13589>
- Qiao, L., Niño-Sánchez, J., Hamby, R., Capriotti, L., Chen, A., Mezzetti, B., & Jin, H. (2023). Artificial nanovesicles for dsRNA delivery in spray induced gene silencing for crop protection. *Plant Biotechnology Journal*, pbi.14001. <https://doi.org/10.1111/pbi.14001>
- Ramírez H. J. E. (2022). Evaluación de un biofungicida a base de RNAi para el control de hongos fitopatógenos, mediante Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS). Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan.
- Ruiz-Jiménez, L., Polonio, Á., Vielba-Fernández, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2021). Gene Mining for Conserved, Non-Annotated Proteins of *Podosphaera xanthii* Identifies Novel Target Candidates for Controlling Powdery Mildews by Spray-Induced Gene Silencing. *Journal of Fungi*, 7(9), 735. <https://doi.org/10.3390/jof7090735>
- Santiago T. L. B. (2019). Diseño de biofungicidas compuestos de RNAs pequeños sintéticos contra hongos patógenos de frutos tropicales. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan.
- Schmidt, L. S., Ghosop, J. M., Margosan, D. A., & Smilanick, J. L. (2006). Mutation at B-Tubulin Codon 200 indicated thiabendazole resistance in *penicillium digitatum* collected from California citrus packinghouses. *Plant Disease*, 90(6), 765–770. <https://doi.org/10.1094/pd-90-0765>
- Šečić, E., & Kogel, K.-H. (2021). Requirements for fungal uptake of dsRNA and gene silencing in RNAi-based crop protection strategies. *Current Opinion in Biotechnology*, 70, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.04.001>
- Song, X.-S., Gu, K.-X., Duan, X.-X., Xiao, X.-M., Hou, Y.-P., Duan, Y.-B., Wang, J.-X., Yu, N., & Zhou, M.-G. (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene

silencing: Secondary siRNA amplification limits SIGS. *Molecular Plant Pathology*, 19(12), 2543-2560. <https://doi.org/10.1111/mpp.12728>

- Tinoco, M. L. P., Dias, B. B., Dall'Asta, R. C., Pamphile, J. A., & Aragão, F. J. (2010). In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. *BMC Biology*, 8(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-27>
- USDA. (2020, enero). *Mexico: Citrus Annual* (N.º MX2019-0067). Foreign Agricultural Service.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.-M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H.-D., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2(10), 16151. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- Wang, Y., Zhao, Y., Wu, R., Gao, J., Chen, M., Cui, Y., Hao, J., Han, J., & Matthews, K. (2023). Photodynamic inactivation of curcumin combined with ascorbic acid against *Penicillium italicum* in vitro and on fresh-cut orange. *LWT*, 182, 114900. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114900>
- Werner, B. T., Gaffar, F. Y., Schuemann, J., Biedenkopf, D., & Koch, A. M. (2020). RNA-Spray-Mediated Silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL Genes Improve Barley Disease Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11, 476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00476>
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 217-239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
- Wytinck, N., Sullivan, D. S., Biggar, K. T., Crisostomo, L., Pelka, P., Belmonte, M. F., & Whyard, S. (2020). Clathrin mediated endocytosis is involved in the uptake of exogenous double-stranded RNA in the white mold phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, 10(1), 12773. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69771-9>
- Yan, L., Gonca, S., Zhu, G., Zhang, W., & Chen, X. (2019). Layered double hydroxide nanostructures and nanocomposites for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(37), 5583-5601. <https://doi.org/10.1039/C9TB01312A>
- Yang, J., Hsiang, T., Bhadauria, V., Chen, X.-L., & Li, G. (2017). Plant Fungal Pathogenesis. *BioMed Research International*, 2017, 1-2. <https://doi.org/10.1155/2017/9724283>
- Yang, Q., Qian, X., Dhanasekaran, S., Boateng, N. A. S., Yan, X., Zhu, H., He, F., & Zhang, H. (2019). Study on the Infection Mechanism of *Penicillium Digitatum* on Postharvest Citrus (*Citrus Reticulata* Blanco) Based on Transcriptomics. *Microorganisms*, 7(12), 672. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120672>
- Yin, C., Zhu, H., Jiang, Y., Shan, Y., & Gong, L. (2020). Silencing Dicer-Like Genes Reduces Virulence and sRNA Generation in *Penicillium italicum*, the Cause of Citrus Blue Mold. *Cells*, 9(2), 363. <https://doi.org/10.3390/cells9020363>
- Zhang, J., Jin, K., & Xia, Y. (2017). Contributions of B-tubulin to cellular morphology, sporulation and virulence in the insect-fungal pathogen, *metarhizium acridum*. *Fungal Genetics and Biology*, 103, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.03.005>

