

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DISMINUCIÓN DEL IMPACTO DE *Fusarium oxysporum* EN TOMATE  
UTILIZANDO COMPLEJOS PVA-QUITOSÁN-NPs Cu

**Tesis**

Que presenta YOSELIN ATHALIA RIVERA JARAMILLO  
como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DISMINUCIÓN DEL IMPACTO DE *Fusarium oxysporum* EN TOMATE  
UTILIZANDO COMPLEJOS PVA-QUITOSÁN-NPs Cu

Tesis

Que presenta YOSELIN ATHALIA RIVERA JARAMILLO  
como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

---

Dra. Susana González Morales  
Director interno

---

Dr. Gregorio Cadenas Pliego  
Director externo

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

DISMINUCIÓN DEL IMPACTO DE *Fusarium oxysporum* EN TOMATE  
UTILIZANDO COMPLEJOS PVA-QUITOSÁN-NPs Cu

Tesis

Elaborada por YOSELIN ATHALIA RIVERA JARAMILLO como requisito parcial  
para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Horticultura con la supervisión y la  
aprobación del Comité de Asesoría

  
Dra. Susana González Morales  
Asesor Principal

  
Dr. Adalberto Benavides Mendoza  
Asesor

  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Asesor

  
Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente  
Asesor

  
Dr. Gregorio Cadenas Pliego  
Asesor

  
Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente  
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico para realizar la maestría.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por darme nuevamente una oportunidad para cumplir mis metas en la vida. Gracias por contribuir a mi superación profesional y así concluir una Maestría en Ciencias en Horticultura.

Dra. **Susana González Morales** por su valiosa asesoría y apoyo en el transcurso de este proyecto. Y sobre todo por su apoyo incondicional, el tiempo dedicado, por la confianza depositada en mi durante mi estancia en el programa.

Dr. **Adalberto Benavides Mendoza** por su asesoría y apoyo durante la realización de este proyecto.

Dr. **Gregorio Cadenas Pliego** por su asesoría, por su tiempo, apoyo y colaboración en la realización de este proyecto.

Dr. **Alberto Sandoval Rangel** por su asesoría y apoyo durante la realización de este proyecto.

Dr. **Marcelino Cabrera De La Fuente** por su asesoría y apoyo durante la realización de este proyecto.

Dr. **Fabián Pérez Labrada** por su asesoría y tiempo durante la realización de este proyecto.

A todos aquellos que de alguna manera intervinieron en la realización de este proyecto **Irma Esther Dávila** y **Lupita López** gracias por su apoyo.

## DEDICATORIA

A mis padres el **Sr. José Antonio Rivera Rodríguez** y la **Sra. Mónica Jaramillo Ríos** por apoyarme incondicionalmente en mi estudio. Por no dejarme sola cuando más los necesite. Gracias por ser parte de mi crecimiento profesional y como persona, los amo.

A mis hermanos **Eva, Mónica** y **José**, por estar ahí cuando necesitaba un respiro, por sus palabras de aliento y ser parte de mi vida.

A **Eduardo Resendiz Neavez** por motivarme a ser mejor cada día, por tu paciencia y amor. Sobre todo por acompañarme en el camino rumbo a esta meta.

A mi abuela **Esther Rivera** (†) porque sigues en mi corazón y en cada uno de mis logros.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIA .....	v
ÍNDICE GENERAL .....	vi
LISTA DE TABLAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO GENERAL .....	4
Objetivos específicos .....	4
HIPÓTESIS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Importancia del tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) .....	5
Limitantes en la producción de tomate .....	5
Importancia de <i>Fusarium</i> como fitopatógeno .....	7
Mecanismos de control al estrés por patógenos.....	8
Nanotecnología en la agricultura.....	10
Absorción de nanopartículas en las plantas .....	11
Nanopartículas de cobre y su acción antifúngica .....	13
Quitosán y sus propiedades antifúngicas .....	13
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
Lugar del experimento.....	15
Primera etapa .....	16
Segunda etapa .....	18
Incidencia y severidad.....	19
Variables agronómicas.....	19
Evaluación de calidad de fruto.....	19
Actividad de enzimas relacionadas con la respuesta de defensa.....	21
Análisis de expresión génica .....	22

Diseño estadístico .....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
Primera Etapa.....	29
Prueba de inhibición <i>in vitro</i> .....	29
Prueba de fitotoxicidad.....	30
Segunda Etapa .....	32
Variables agronómicas en plantas de tomate.....	32
Variables de calidad de fruto en plantas de tomate.....	35
Actividad enzimática en hojas de tomate.....	38
Expresión del gen PR1.....	42
Severidad e incidencia .....	44
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Escala propuesta por la EWRS para evaluar la fitotoxicidad en el cultivo causada por herbicidas.....	17
<b>Tabla 2.</b> Condiciones específicas en el termociclador para la síntesis de cDNA.....	24
<b>Tabla 3.</b> Características de los iniciadores utilizados en la cuantificación del gen PR1.....	25
<b>Tabla 4.</b> Características para la preparación del cóctel mix correspondiente a cada gen.....	26
<b>Tabla 5.</b> Condiciones del programa en el termociclador para la qPCR.....	27
<b>Tabla 6.</b> Variables agronómicas evaluadas en la prueba de fitotoxicidad.....	31
<b>Tabla 7.</b> Efecto del complejo PVA-Cs-NPs Cu e inoculación de FOL en el crecimiento y desarrollo en plantas de tomate.....	34
<b>Tabla 8.</b> Efecto del complejo PVA-Cs-NPs Cu e inoculación de FOL en la calidad del fruto de tomate.....	37
<b>Tabla 9.</b> Evolución de la actividad enzimática en hojas de tomate cultivado con el complejo PVA-Cs-NPs Cu e inoculadas con FOL.....	40
<b>Tabla 10.</b> Incidencia y severidad de síntomas en plantas de tomate infectadas con FOL.....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de la metodología empleada para la preparación de los complejos PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs.....	16
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de FOL por el complejo PVA-Cs-NPs Cu.....	30
<b>Figura 3.</b> Crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate durante la prueba de fitotoxicidad.....	32
<b>Figura 4.</b> Actividad enzimática fenilalanina amonio liasa en plantas de tomate con la aplicación de PVA-Cs-NPs Cu e inoculadas con FOL.....	41
<b>Figura 5.</b> Expresión relativa del gen PR1 en hojas de tomate tratadas con PVA-Cs-NPs Cu e inoculadas con FOL .....	44

RESUMEN

DISMINUCIÓN DEL IMPACTO DE *Fusarium oxysporum* EN TOMATE  
UTILIZANDO COMPLEJOS PVA-QUITOSÁN-NPs Cu

POR

YOSELIN ATHALIA RIVERA JARAMILLO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DRA. SUSANA GONZÁLEZ MORALES –ASESOR

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

En la agricultura moderna el uso de los agroquímicos ha permitido un incremento en la producción; sin embargo, el monocultivo y uso indiscriminado de agroquímicos ha reducido la diversidad del agroecosistema, causando una inestabilidad manifestándose así plagas y enfermedades en los cultivos. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la aplicación del complejo alcohol polivinílico-quitosán-nanopartículas de cobre (PVA-Cs-NPs Cu) tiene un efecto en los mecanismos de defensa en las plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* (FOL). En la primera etapa se estableció una prueba de inhibición *in vitro* usando diferentes concentraciones del complejo PVA-Cs-NPs Cu (2, 4, 6, 12, 24, 48, 96, 192, 384 mg L<sup>-1</sup>) y alcohol polivinílico-quitosán (PVA-Cs 250, 384 mg L<sup>-1</sup>). Lo anterior para determinar el poder antifúngico del complejo. Para la segunda etapa se establecieron dos cultivos de tomate híbrido cv. Cid F1, uno sometido a estrés biótico, estas plantas fueron inoculadas con *Fusarium oxysporum* al trasplante. Para activar el mecanismo de defensa los complejos alcohol polivinílico-quitosán-nanopartículas de cobre (PVA-Cs 500 mg L<sup>-1</sup>-NPs Cu 500 mg L<sup>-1</sup>) y alcohol polivinílico-quitosán (PVA-Cs 500 mg L<sup>-1</sup>) fueron aplicados de manera foliar, las plántulas tuvieron una aplicación dos días previos al trasplante, posterior a esto se aplicaron en intervalos de 20 días iniciando después del trasplante con un total de 7 aplicaciones durante el ciclo. Se evaluaron variables agronómicas, calidad de fruto, severidad e incidencia, actividad de enzimas defensivas y la expresión del gen PR1. En la primera etapa los complejos PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs controlaron efectivamente el crecimiento *in vitro* del hongo. Para la segunda etapa las plantas sin estrés biótico y con la aplicación de PVA-Cs-NPs Cu incrementaron las variables relacionadas con el vigor en las plantas, rendimiento, número de frutos, peso promedio de frutos, peso fresco aéreo, peso seco aéreo, peso fresco de raíz, la actividad de PAL en hoja y aumento la expresión del gen PR1. En el cultivo inoculado con *Fusarium oxysporum* no se encontraron diferencias para las variables severidad e incidencia de la enfermedad provocada por FOL. El tratamiento FOL+PVA-Cs-NPs Cu incrementó el peso promedio de fruto y el peso fresco de la raíz. FOL+PVA-Cs incrementó la actividad de PAL en hojas y la expresión del gen PR1. Se sugiere que PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs podrían jugar un papel importante como potenciales inductores para mejorar la respuesta de defensa en las plantas.

**Palabras clave:** Nanopartículas, estrés biótico, bioestimulante, respuesta de defensa, hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

DECREASE IN THE IMPACT OF *Fusarium oxysporum* IN TOMATO USING  
COMPLEXES PVA-QUITOSÁN-NPs Cu

*BY*

YOSELIN ATHALIA RIVERA JARAMILLO  
MASTER IN SCIENCE IN HORTICULTURE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DRA. SUSANA GONZÁLEZ MORALES –ADVISER

Saltillo, Coahuila

July 2020

In modern agriculture the use of agrochemicals has allowed an increase in production; however, monoculture and indiscriminate use of agrochemicals have reduced the diversity of the agroecosystem, causing instability, thus manifesting pests and diseases in crops. The objective of the present work was to determine if the application of the polyvinyl alcohol-chitosan-copper nanoparticles complex (PVA-Cs-NPs Cu) has an effect on defense mechanisms in tomato plants infected with *Fusarium oxysporum* (FOL). In the first stage, an in vitro inhibition test was established using different concentrations of the PVA-Cs-NPs Cu complex (2, 4, 6, 12, 24, 48, 96, 192, 384 mg L<sup>-1</sup>) and polyvinyl alcohol-chitosan (PVA-Cs 250, 384 mg L<sup>-1</sup>). The above to determine the antifungal power of the complex. For the second stage, two hybrid tomato crops cv. Cid F1, one subjected to biotic stress, these plants were inoculated with *Fusarium oxysporum* at transplant. To activate the defense mechanism, the complexes polyvinyl alcohol-chitosan-copper nanoparticles (PVA-Cs 500 mg L<sup>-1</sup>-NPs Cu 500 mg L<sup>-1</sup>) and polyvinyl alcohol-chitosan (PVA-Cs 500 mg L<sup>-1</sup>) were applied foliarly, the seedlings had an application two days prior to transplantation, after which they were applied at intervals of 20 days starting after transplantation with a total of 7 applications during the cycle. Agronomic variables, fruit quality, severity and incidence, activity of defensive enzymes and the expression of the PR1 gene were evaluated. In the first stage, the PVA-Cs-NPs Cu and PVA-Cs complexes effectively controlled the in vitro growth of the fungus. For the second stage, plants without biotic stress and with the application of PVA-Cs-NPs Cu increased the variables related to plant vigor, yield, number of fruits, average weight of fruits, fresh air weight, aerial dry weight, fresh root weight, leaf PAL activity and increased expression of the PR1 gene. In the culture inoculated with *Fusarium oxysporum*, no differences were found for the variables severity and incidence of the disease caused by FOL. The FOL + PVA-Cs-NPs Cu treatment increased the average fruit weight and the fresh root weight. FOL + PVA-Cs increased PAL activity in leaves and expression of the PR1 gene. It is suggested that PVA-Cs-NPs Cu and PVA-Cs could play an important role as potential inducers to improve the defense response in plants.

**Keywords:** Nanoparticles, biotic stress, biostimulant, defense response, phytopathogenic fungi.

## INTRODUCCIÓN

En la agricultura moderna el uso excesivo de agroquímicos ha permitido un incremento en la producción; sin embargo, sus efectos adversos impactan de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura. El monocultivo y uso indiscriminado de agroquímicos ha reducido la diversidad del agroecosistema, causando una inestabilidad manifestándose así plagas y enfermedades en los cultivos. Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas parasitando más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de las plantas. Las enfermedades y los agentes abióticos que afectan a las plantas pueden interferir uno o varios de los cinco procesos fisiológicos básicos: 1) absorción y transporte de agua y nutrimentos, 2) fotosíntesis y metabolismo, 3) transporte de fotosintatos, 4) desarrollo de frutos y 5) maduración y senescencia de tejidos.

La producción de tomate es importante en México debido a que se encuentra en continuo aumento la demanda y producción del mismo, este cultivo se encuentra afectado por la presencia de diversos microorganismos patógenos los cuales son la principal causa de las enfermedades, dentro de los cuales se destaca la presencia de hongos. Una de las enfermedades de mayor importancia para este cultivo es la marchitez vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) (Sacc.) Snyder y Hansen, la cual puede causar pérdidas superiores al 50%. Esta enfermedad ha sido identificada como una de las más devastadoras en todas las regiones del mundo donde se cultiva el tomate y es particularmente severa en áreas con clima cálido.

Los materiales metálicos tienen un papel muy importante en nuestra vida cotidiana, los nanomateriales (<100nm) muestran propiedades físicas y químicas peculiares, debido a su tamaño, área superficial y efectos cuánticos. La nanotecnología ha sido ampliamente explorada en el área de la química, física, biología, medicina y las ingenierías, entre otras disciplinas, y tiene el potencial para la creación de productos que aporten soluciones a problemas críticos dentro de la agricultura. Uno de los productos de la nanotecnología son los nanocompuestos que están conformados por un metal, polímeros y materia biológica que tienen un comportamiento multifuncional y son aplicados como

antisépticos entre otros, el desarrollo de la nanotecnología dentro del campo de la agricultura ha llevado al desarrollo de plaguicidas nanométricos con ingredientes activos encapsulados. Los nanomateriales representa la nueva generación de remediación, ya que pueden proveer soluciones a algunos de los retos más importantes a nivel ambiental como lo es la eliminación de los plaguicidas convencionales que pueden ser muy persistentes en el ambiente. El Cu es un elemento tóxico para los microorganismos ya que posee la propiedad para adoptar distintos estados de reducción tanto oxidativo como  $\text{Cu}^{+2}$  o en un estado reducido como  $\text{Cu}^{+}$  esto le otorga un potencial redox, estas transiciones de los iones libres da lugar a la generación de radicales superóxido e hidroxilo que pueden provocar lesiones a nivel del ADN, oxidación de proteínas, peroxidación lipídica y generación de ERO. Los cambios inducidos por metales en la actividad metabólica de las plantas se relacionan con la alteración de la producción de pigmentos fotosintéticos, azúcares, proteínas y tioles no proteicos y con la estimulación del metabolismo de defensa. Los nanomateriales pueden penetrar los tejidos vegetales y esto puede ser explicado mediante estos mecanismos: uno de ellos es vía apoplasto en la raíz (entre las células o a través de heridas o en lugares donde la banda de caspary aún no se ha formado), vía simplasto (a través de las células vía plasmodesmos desplazándose a través del floema), formación del poro (algunos nanomateriales pueden alterar la membrana plasmática, induciendo la formación de poros para cruzar en la célula y alcanzar directamente el citosol sin ser encapsuladas en cualquier organelo).

El quitosán es un polisacárido lineal que se obtiene de la quitina (polímero biodegradable que forma parte del caparazón de los crustáceos), es un copolímero lineal formado por unidades de glucosamina en menor medida de N-acetil D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$  1-4. El quitosán posee un grupo amino ( $\text{NH}_2^+$ ) que puede interactuar con la membrana celular de hongos que tienen carga negativa y como resultado provocar el deterioro de las proteínas haciéndolos más susceptibles. La quitina y el quitosán se han utilizado para el control de la enfermedad o la reducción de su extensión, para quelatar los nutrientes y minerales y en la prevención de patógenos o para mejorar las defensas naturales de la planta. El quitosán induce respuestas de defensa en monocotiledóneas y dicotiledóneas. Estas respuestas incluyen lignificación,

activación de quitinasa y glucanasa, biosíntesis de fitoalexinas, generación de ERO, biosíntesis del ácido jasmónico y la expresión de genes relacionados con la defensa.

En cuanto a la aplicación algunos estudios han demostrado que al aplicar nanocompuestos con la técnica de aspersión o aerosol solo se pierde el 14.7% del producto, en comparación con la pérdida del 32.5% o más con los productos agrícolas convencionales. Por lo tanto, se desarrolló este trabajo de investigación, planteándonos la posibilidad del uso de un nanocompuesto para evitar el desarrollo de *Fusarium oxysporum* que causa la enfermedad de la marchitez vascular.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si la aplicación del complejo de alcohol polivinílico (PVA)-quitosán (Cs)-nanopartículas de cobre (NPs Cu) induce cambios en los mecanismos de defensa en plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum*.

### Objetivos específicos

- Evaluar el impacto del complejo PVA-Cs-NPs Cu sobre el desarrollo de la enfermedad en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*.
- Determinar el efecto del complejo PVA-Cs-NPs Cu sobre el crecimiento y desarrollo de la planta y calidad de fruto.
- Evaluar la efectividad del complejo PVA-Cs-NPs Cu para modificar el contenido de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta de defensa en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*.
- Valorar el efecto del complejo PVA-Cs-NPs Cu en la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*.

## HIPÓTESIS

La aplicación del complejo PVA-Cs-NPs Cu producirá una activación de los mecanismos de defensa en plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum* que permitirá reducir la severidad de la enfermedad.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Importancia del tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

México es el principal proveedor a nivel mundial de tomate con una participación en el mercado internacional de 25.11% del valor de las exportaciones mundiales. A pesar de que durante el periodo 2003-2016 se experimentó una reducción en la superficie sembrada, presentó un crecimiento acumulado en la producción (54.25%) y en las exportaciones en fresco (77.87%), convirtiéndolo en uno de los cultivos con mayor incremento en productividad. (López Enrique *et al.*, 2017). El tomate es un cultivo que se desarrolla en todas entidades del país; las cinco principales son Sinaloa (551 mil ton), San Luis Potosí (296.8 mil ton), Baja California (225.9 mil ton), Zacatecas (185.2 mil ton) y Michoacán (178.2 mil ton) (SAGARPA, 2016).

En México el consumo de tomate es diario, esto ha llevado a que el tomate sea uno de los principales contribuyentes de nutrientes y antioxidantes en la dieta, ya que es rico en potasio, ácido fólico,  $\beta$ -caroteno, vitamina C, flavonoides, fenoles, ácido ascórbico y licopeno. El consumo regular de tomates se ha correlacionado con la reducción en el riesgo de padecer una variedad de patologías como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Coronado *et al.*, 2015; Gutiérrez Tlahque *et al.*, 2019). Los beneficios a la salud humana se asocian a los metabolitos antioxidantes presentes en el fruto que pueden clasificarse como lipídicos e hidrosolubles, capaces de detoxificar las especies reactivas del oxígeno y prevenir los cambios oxidativos en el cuerpo humano. El licopeno es un carotenoide liposoluble que representa el 80% de los carotenoides totales en los frutos de tomate y es el responsable de su color rojo. El  $\beta$ -caroteno es otro carotenoide presente en los frutos de tomate, es un fotoprotector que actúa en la fotosíntesis como un pigmento colector de luz en el fruto. Ambos carotenoides son considerados excelentes antioxidantes principalmente a su capacidad de inhibir la acción del oxígeno singlete, inhibir la oxidación de lípidos y la capacidad de atrapar radicales peroxilo (ROO•) (López-Palestina *et al.*, 2017).

### **Limitantes en la producción de tomate**

La producción de tomate en México es importante debido a que se encuentra en continuo aumento la demanda y producción del mismo. Sin embargo, en cuantiosas

ocasiones su rendimiento se ve mermado por la incidencia de diversas plagas y enfermedades. El cultivo de tomate se encuentra afectado por la presencia de diversos microorganismos patógenos los cuales son la principal causa de las enfermedades, dentro de estos se destaca la presencia de hongos (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016). Entre 2012 y 2015 se observó una mayor proporción de la superficie establecida de este cultivo con tecnologías de agricultura protegida (malla sombra e invernaderos), en promedio del 25% de la superficie total. El incremento en la superficie con infraestructura de agricultura protegida se atribuye principalmente al éxito en la cosecha de tomate de calidad. La agricultura protegida ayuda a ejercer determinado grado de control sobre los diversos factores bióticos y abióticos del medio ambiente, permitiendo con ello minimizar las restricciones que las condiciones climáticas adversas tienen sobre los cultivos (FIRA, 2016).

Entre los factores limitantes se encuentran los bióticos y abióticos, los factores abióticos principalmente el medio ambiente pueden ejercer sobre las plantas un estrés ya sea por altas y bajas temperaturas, lluvia, granizo, heladas entre otros, estas condiciones pueden perjudicar el desarrollo de las plantas dando problemas como disminución en la producción, retrasos en el crecimiento y generar las condiciones adecuadas para un ataque por plagas y enfermedades (Jaramillo Noreña *et al.*, 2012). Dentro de los factores bióticos que están dados por organismos patógenos como bacterias, hongos, nematodos, entre otros, traen consigo problemas fitosanitarios, estos se han acrecentado debido a la falta de un diagnóstico certero y oportuno que permita a los productores manejar apropiadamente el impacto de las enfermedades. Tradicionalmente el diagnóstico de las enfermedades se llevaba a cabo con la observación de los síntomas de la enfermedad, lo cual no es lo más apropiado ya que diferentes patógenos pueden provocar los mismos síntomas para distintas enfermedades, o bien pueden deberse a un factor abiótico como toxicidad por agroquímicos, deficiencia o exceso de minerales en la nutrición. El diagnóstico correcto del agente causal del problema es la clave para el manejo de la enfermedad (Borboa Flores *et al.*, 2009).

### **Importancia de *Fusarium* como fitopatógeno**

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas (Tapia & Amaro, 2014). La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y con pocas microconidias y otra de tipo pionotal con la formación de poco o nulo micelio aéreo y abundantes microconidias.

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas parasitando más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Palacio *et al.*, 2014), tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular. Son considerados principalmente como hongos de campo, ya que causan un sinnúmero de enfermedades en cultivos. Sus daños desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas considerables (Villa-Martínez *et al.*, 2015).

Una de las enfermedades de mayor importancia para el cultivo de tomate es la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) (Sacc.) Snyder y Hansen, la cual puede causar pérdidas superiores a 50%. Esta enfermedad ha sido identificada como una de las más devastadoras en todas las regiones del mundo donde se cultiva el tomate y es particularmente severa en áreas con clima cálido (Hernández Martínez *et al.*, 2014). Las formas especiales de *F. oxysporum* se subdividen en razas fisiológicas, con base en su especificidad patogénica sobre determinadas variedades de una misma especie de planta, actualmente se conocen cuatro razas de este patógeno, razón por la cual las pruebas de patogenicidad y las características de virulencia de los aislamientos del hongo son el principal criterio para diferenciar las formas especiales de *F. oxysporum* y sus razas fisiológicas (De Granada *et al.*, 2001). El síntoma inicial de la infección por *F. oxysporum* es el amarillamiento de las hojas más viejas; dichos síntomas suelen afectar

solo un lado de la planta, y con frecuencia los foliolos a un lado del peciolo se vuelven amarillos antes que los del otro lado. Esta marchitez va avanzando gradualmente en todo el follaje, hasta que la planta muere. La coloración amarillenta del sistema vascular en los tallos es característica de esta enfermedad, si se realiza un corte transversal en el tallo se puede observar un oscurecimiento en los vasos (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016). Este patógeno causa pudrición radical y lesiones necróticas extensivas en el cuello y base del tallo, marchitez y muerte. Las lesiones necróticas con frecuencia ascienden hasta 30 cm a partir del cuello de la planta, las cuales mueren generalmente al inicio de la maduración de los frutos, causando la pérdida total de la producción (Palacio *et al.*, 2014).

Para que la planta logre defenderse del patógeno, se debe responder a la señalización de la interacción del hongo-planta, con la activación de genes que le dan una respuesta temprana a la planta, la descomposición enzimática de barreras físicas, así como la producción de compuestos antifúngicos y la activación y muerte de células huésped (Agrios, 2005). Algunas de las reacciones de la planta al detectar el ataque patógeno son la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el incremento en el flujo de  $\text{Ca}^{+2}$ , producción de fitoalexinas y compuestos tales como lignina y callosa capaces de reforzar la estructura de la pared celular (García & Ruíz, 2005). El patrón de infección de las especies de *Fusarium* causantes de marchitez consiste en penetrar por la raíz y colonizar en el tallo. Cuando los cultivares son resistentes la región de entrada del patógeno se restringe debido a la oclusión de los vasos por geles, deposiciones de calosa y tilosa. En los cultivares susceptibles la colonización es continua debido a la degradación de los geles por efecto de enzimas pectolíticas del patógeno (Villa-Martínez *et al.*, 2015).

### **Mecanismos de control al estrés por patógenos**

Las plantas tienen que lidiar con diversos y complejos tipos de interacciones que involucran numerosos factores ambientales. En el curso de la evolución, han desarrollado mecanismos específicos que les permiten adaptarse y sobrevivir a eventos estresantes. La exposición de las plantas al estrés biótico y abiótico induce una interrupción en el metabolismo de las plantas, lo que implica costos fisiológicos (Rejeb

*et al.*, 2014). De acuerdo a Borboa Flores *et al.* (2009), las enfermedades y agentes abióticos que afectan a las plantas pueden interferir en uno o varios de los cinco procesos fisiológicos básicos: 1) absorción y transporte de agua y nutrientes; 2) fotosíntesis y metabolismo; 3) transporte de fotosintatos; 4) desarrollo de frutos y 5) maduración y senescencia de tejidos.

Después de la exposición al estrés abiótico y/o biótico, canales de iones específicos y las cascadas de la quinasa se activan regulando la respuesta a la acumulación de hormonas vegetales, las ERO, fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (AS), el ácido jasmónico (AJ), y el etileno se acumulan actuando de forma sinérgica o antagónicamente para regular la respuesta a patógenos o estrés abiótico, una reprogramación de la maquinaria genética resulta en reacciones de defensa adecuada y un aumento en la tolerancia de la planta para reducir al mínimo el daño biológico causado por el estrés (AbuQamar *et al.*, 2009; Rejeb *et al.*, 2014). Las vías de señalización de la respuesta de defensa esta mediada por dos formas de resistencia sistémica, la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA), mediada por el ácido salicílico (AS) y la Resistencia Sistémica Inducida (RSI) mediada por el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET) estos dos trabajando de manera cooperativa siendo generalmente antagónicos a la vía de señalización de AS. Para el caso de RSA esta puede ser inducida por un amplio número de elicitores bióticos o abióticos, por otra parte RSI puede ser activada por bacterias colonizadoras de la rizosfera, por heridas provocadas por insectos comedores o por heridas mecánicas. La red de señalización que la planta active depende de la naturaleza del patógeno y el modo en el que puede infectar. Se han descrito múltiples interacciones entre las rutas de señalización de AJ, ET y AS estas hormonas no trabajan de forma aislada y regulan múltiples procesos. Algunos estudios indican al gen NPR1 como regulador de la señalización tanto para RSA como de RSI. Este gen podría activar de forma simultánea la RSA y RSI incrementando en la planta la capacidad de defenderse (Laredo Alcalá *et al.*, 2017; Samaniego-Gómez *et al.*, 2017).

La vía de señalización de ET es capaz de activar los receptores de la cascada de quinasas (MAPK) cuya señal promueve el factor de transcripción de respuesta a etileno (ERF1), este regula la expresión génica de respuesta a patógenos (PR1, PR2, PR3, PR5) y la represión de genes de respuesta a heridas. El gen ERF1 se induce sinérgicamente por las

vías de señalización de AJ y ET, en este gen podría estar la clave del punto de integración entre AJ y ET para regular la respuesta a patógenos (Samaniego-Gómez *et al.*, 2017). Los jasmonatos se relacionan a procesos de respuesta de estrés en plantas, están implicados con la inducción de genes que activan la RSI, algunas de sus funciones en este proceso de defensa es la de inhibir proteasas, lipasas entre otros. La síntesis de AJ parte del ácido linolénico que al ser liberado genera señales que lo convierten en jasmonatos. Entre las situaciones de estrés que regulan la producción de AJ están las heridas, exposición a sequía, ataque por patógenos y plagas. Los jasmonatos pueden participar en diferentes procesos en la planta como crecimiento, maduración de frutos, formación de yemas y flores. El AJ y los jasmonatos (JAs) han demostrado inducir la biosíntesis de enzimas relacionadas con la resistencia en plantas tales como polifenol oxidases, fenilalanina-amonio liasa (PAL), entre otras (Robayo & Cabezas, 2014; Laredo Alcalá *et al.*, 2017).

En ataques por patógenos las plantas reconocen el gen de virulencia mediante receptores específicos, esta interacción provoca en el sitio de infección una explosión de ERO, la inducción rápida de una respuesta hipersensible que implica la regulación de la muerte celular y la expresión de genes relacionados con la patogénesis. Posterior a estos eventos las hojas sin infección exhiben un mayor nivel del gen PR y desarrollan una resistencia de larga duración llamada resistencia sistémica adquirida (RSA) (Yasuda *et al.*, 2008).

Si las plantas sobreviven a un ataque inicial de patógenos ya sean virus, hongos o bacterias; pueden protegerse contra ataques posteriores de ellos. Se ha observado que el primer patógeno infectante, o algún daño, “inmuniza” a la planta contra infecciones posteriores. Obviamente, el primer patógeno infectante, o un daño, “indujo” la expresión de reacciones de resistencia. Esta capacidad de las células para repeler los ataques subsecuentes, se dispersa a través de toda la planta. A esta respuesta se le llama resistencia sistémica adquirida (RSA) (Camarena-Gutiérrez & Torre-Almaráz, 2007).

### **Nanotecnología en la agricultura**

La nanotecnología es el estudio de las propiedades de la materia a una escala nanométrica (<100 nm). Los nanomateriales muestran propiedades físicas y químicas peculiares, debido al efecto de tamaño, área superficial y efectos cuánticos. La

nanotecnología ha sido ampliamente explorada en el área de la química, física, biología, medicina y las ingenierías, entre otras disciplinas, la nanotecnología tiene el potencial para la creación de productos que aporten soluciones a problemas críticos dentro de la agricultura (Aguilar-Tapia & Zanella, 2017; Padilla-Vaca et al., 2018; R. Prasad et al., 2017). Uno de los productos de la nanotecnología son los nanocompuestos que están conformados por un compuesto metal, polímeros y materia biológica que tienen un comportamiento multifuncional y son aplicados como antisépticos entre otros, el desarrollo de la nanotecnología dentro del campo de la agricultura ha llevado al desarrollo de plaguicidas nanométricos con ingredientes activos encapsulados (Quintili, 2012). La formulación de los llamados nanoplaguicidas se ha llevado a cabo debido a la búsqueda constante de mejorar la efectividad y liberación de los compuestos activos, ya que en los plaguicidas comunes está influenciada por procesos naturales tales como la evaporación, la fotodegradación, la hidrólisis, y otros como el pH del suelo y el contenido de carbono. Del total de estudios para la formulación de pesticidas el 30% habla de fungicidas, algunos de los materiales más usados son plata (Ag) y cobre (Cu) por sus propiedades biocidas, se atribuye el incremento de la efectividad debido a su gran área superficial además de tener una mejor adhesión a bacterias y hongos. Los nanomateriales representan la nueva generación de remediación, ya que pueden proveer soluciones a algunos de los retos más importantes a nivel ambiental como lo es la eliminación de los plaguicidas convencionales que pueden ser muy persistentes en el ambiente (Robles & Cantú, 2017). En cuanto a la aplicación algunos estudios han demostrado que al aplicar nanomateriales con la técnica de aspersión o aerosol solo se pierde el 14.7% del producto, en comparación con la pérdida del 32.5% o más con los productos agrícolas convencionales (Lira Saldivar *et al.*, 2018).

#### **Absorción de nanopartículas en las plantas**

La absorción de las nanopartículas (NPs) en la planta no es solo afectada por varios factores relacionados con la naturaleza del nanomaterial, sino también con la fisiología de la planta y la interacción del nanomaterial con el medio ambiente. De los factores relacionados con la naturaleza de los nanomateriales el tamaño parece ser una de las principales restricciones para la penetración en los tejidos vegetales, algunos informes

mencionan 40-50 nm como un máximo en las dimensiones que permiten a las nanopartículas moverse y acumularse dentro de las células (Pérez-de-Luque, 2017).

Existen diferentes mecanismos que explican cómo los nanomateriales penetran los tejidos vegetales uno de ellos es vía apoplasto en la raíz (entre las células o a través de heridas o en lugares donde la banda de caspary aún no se ha formado), vía simplasto (a través de las células vía plasmodesmos desplazándose a través del floema), formación del poro (algunos nanomateriales pueden alterar la membrana plasmática, induciendo la formación de poros para cruzar en la célula y alcanzar directamente el citosol sin ser encapsuladas en cualquier organelo) (Pérez-de-Luque, 2017; Schymura *et al.*, 2017).

Zhu *et al.* (2008) evaluaron en plantas de *Cucurbita máxima* NPs  $Fe_3O_4$  con un diámetro de 20 nm estas fueron expuestas a una concentración de 0.5g/L, estas fueron absorbidas a través de la raíz y traslocadas a través de los tejidos vegetales encontrándose que el 45.5% de estas se acumularon en la raíz y solo el 0.6% se traslocaron a las hojas. Lin *et al.* (2009) evaluaron la captación y traslocación de nanomateriales de carbono en plantas de arroz, descubriendo que estos podían fácilmente tomarse en las raíces y ser transportado a los brotes, de igual manera demostraron que al ser suministrados por la hoja podían ser potencialmente transportados desde las hojas hasta las raíces a través del floema. En otro ensayo se investigó la absorción de NPs ZnO en *Lolium perenne*, en este no notaron una translocación ascendente de la raíz a los brotes, adhiriéndose principalmente a la raíz y observándose también en el apoplasto y protoplasto de la endodermis en la raíz y la estela (Lin & Xing, 2008). Lee *et al.* (2008) evaluaron la absorción y acumulación de NPs Cu en frijol y trigo, encontrando una relación entre la concentración y la acumulación, las concentraciones de NPs más altas dieron como resultado una mayor absorción y acumulación en los tejidos vegetales. Ma *et al.* (2010) utilizaron NPs Ag en *A. thaliana* encontrando que las raíces pueden absorber NPs Ag de hasta 40 nm y además ser transportadas hasta los brotes, aunque estas mayormente se acumularon en la raíz y fueron secuestradas en la columela. Etxeberria *et al.* (2006) evaluaron la absorción de NPs en células de *Ficus sycomorus* encontrando NPs de 40 nm de tamaño almacenadas en las vacuolas, pero las NPs de tamaño de 20 nm permanecían en los compartimentos membranosos citoplasmáticos, ellos plantean que las NPs pueden pasar a través de la membrana plasmática.

### **Nanopartículas de cobre y su acción antifúngica**

Las nanopartículas de cobre (NPs Cu) han atraído mucha la atención en los últimos años por ser un metal semiconductor, por sus propiedades físicas, químicas, antimicrobianas, y por las extensas aplicaciones en nanocompuestos poliméricos, además de su bajo costo y gran abundancia (Betancourt-Galindo *et al.*, 2014; Sierra-Ávila *et al.*, 2018).

El cobre ha sido de interés particular porque a diferencia de otros metales antimicrobianos, presenta un amplio espectro de acción contra bacterias y hongos. La eficacia del Cu depende de las condiciones del medio ambiente, la concentración de iones de Cu y el tipo de microorganismos. Dada la efectividad del Cu contra organismos patógenos asociados con enfermedades de plantas y animales, ha sido utilizado ampliamente en el sector agropecuario como pesticida desde hace miles de años y últimamente como promotor de crecimiento vegetal (Jaiswal *et al.*, 2012).

Las NPs Cu-quitosán se han utilizado para evaluar la acción antifúngica en tomate (*Solanum lycopersicum* Mill). El tratamiento con NPs Cu-quitosán demostró un efecto importante en el desarrollo del tomate, tanto en la germinación, como el desarrollo de las plántulas, peso seco y peso fresco. El crecimiento micelial *in vitro* y la germinación de las esporas de *A. solani* y *F. oxysporum* se inhibió eficazmente en las concentraciones 0.10 y 0.12% de NPs de Cu-quitosán. La síntesis de NPs Cu-quitosán abre la posibilidad para su uso contra hongos y enfermedades a nivel de campo abierto (Saharan *et al.*, 2015).

En un ensayo *in vitro* se evaluó el efecto antifúngico de NPs Cu contra *Fusarium spp.* El tratamiento en una concentración de 450 ppm inhibió el desarrollo de las colonias fúngicas (Viet *et al.*, 2016). Shende *et al.* (2015), evaluaron la efectividad de NPs Cu contra el desarrollo micelar de *Fusarium oxysporum*, el cual mostró ser susceptible al tratamiento.

### **Quitosán y sus propiedades antifúngicas**

El quitosán es un polisacárido lineal que se obtiene de la quitina (polímero biodegradable que forma parte del caparazón de los crustáceos) parcialmente desacetilada y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, es un

copolímero lineal formado por unidades de glucosamina en menor medida de N-acetil D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$  1-4 (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

La quitina y el quitosán han demostrado propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas y han sido exploradas para usos agrícolas. Se han utilizado para el control de la enfermedad o reducir su extensión, para quelatar los nutrientes y minerales, prevención de patógenos o para mejorar las defensas naturales de la planta. Al mejorar las defensas de la planta, el quitosán induce respuestas de defensa en monocotiledóneas y dicotiledóneas. Estas respuestas incluyen lignificación, activación de quitinasa y glucanasa, biosíntesis de fitoalexinas generación de ERO, biosíntesis del ácido jasmónico, salicílico y abscísico y la expresión de genes relacionados con la defensa (El Hadrami *et al.*, 2010).

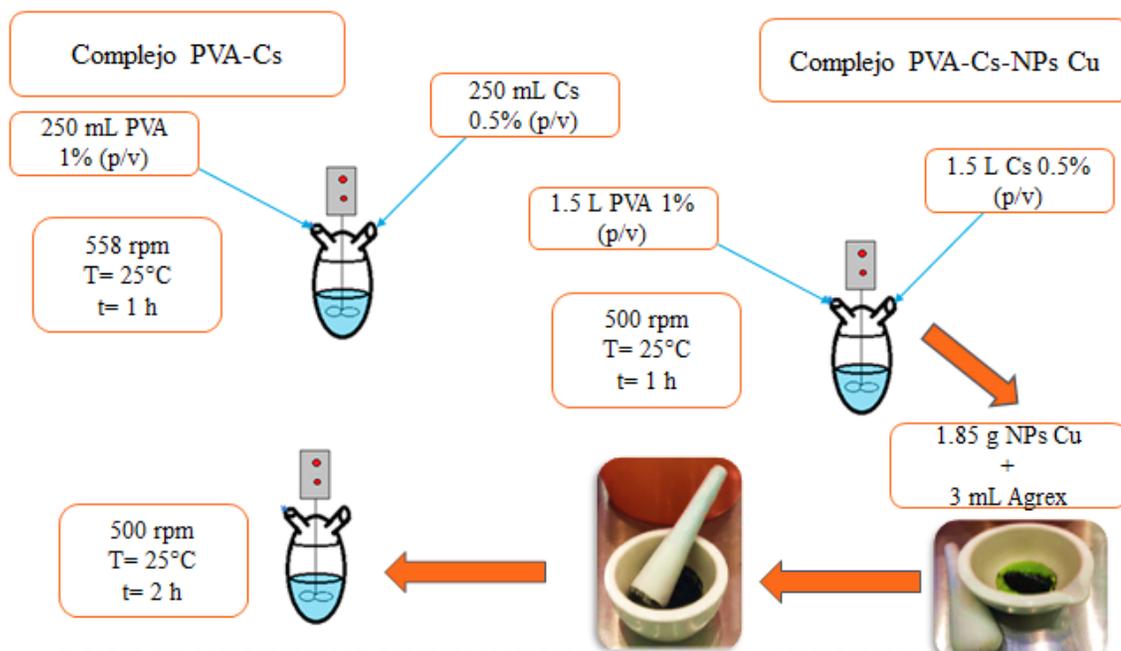
Sathiyabama & Parthasarathy (2016), evaluaron la actividad antifúngica de NPs quitosán contra algunos hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, *Pyricularia grisea* y *Alternaria solani* por el método de difusión de disco encontrando que el crecimiento *in vitro* de los hongos fue controlado significativamente por las NPs quitosán en una concentración de 100  $\mu$ g. Por otra parte Xing *et al.* (2016), evaluaron el efecto sobre el crecimiento del micelio de hongos fitopatógenos en un ensayo *in vitro* en medio PDA que contenían distintas concentraciones de NPs quitosán (0.5, 1 y 2 mg/ml) mostrando un efecto inhibitorio que se incrementó a medida que aumentaba la concentración de NPs de quitosán.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del experimento

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal, y en un invernadero de tipo túnel sin control ambiental con cubierta de polietileno orientación sur-norte que se localiza en las coordenadas 25°21'27.17" latitud norte y 101° 2'00.16" longitud oeste, a un altitud 1763 msnm. Ambos están ubicados en el Departamento de Horticultura en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila. El estudio constó de dos etapas que se describen a continuación.

El complejo PVA-Cs-NPs Cu utilizado en el estudio fue sintetizado en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) utilizando la siguiente metodología, la solución de Cs al 0.5% (p/v) se preparó disolviendo 5.0 g de Cs en una solución de ácido acético al 1% (v/v), la cual se mantuvo en agitación a una temperatura de 60°C y se aforó a 1 L con agua destilada y se filtró al vacío con embudo Buchner. Para la preparación del PVA 1% (p/v), a 600 mL de agua destilada se le adicionó 1 mL de ácido acético, 10 g de PVA y se aforó a 1L, se mantuvo en agitación a una temperatura de 60°C hasta su disolución. Para la preparación de PVA-Cs, se colocó 250 mL de PVA 1% (p/v) en agitación mecánica a 558 rpm, se adicionó 250mL de la solución Cs 0.5% (p/v) y se dejó agitando por una hora a temperatura ambiente ( $25\pm 2$  °C). Para la preparación del complejo PVA-Cs-NPs Cu, se mezcló 1.5 L de PVA al 1% (p/v) con 1.5 L de Cs al 0.5% (p/v) mediante una agitación mecánica a 500 rpm por una hora. Las NPs Cu (1.85 g) se molieron previamente en un mortero con 3 mL de Agrex y posteriormente se adicionó a la solución PVA-Cs, la mezcla se agitó a 500 rpm por dos horas a temperatura ambiente ( $25\pm 2$  °C) (Figura 1). Las NPs Cu fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento reportado por Sierra-Ávila *et al.* (2014), presentaron forma esférica y un tamaño de partícula promedio de 50 nm.



**Figura 1.** Representación de la metodología empleada para la preparación de los complejos PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs.

### Primera etapa

En esta etapa se desarrolló una prueba *in vitro* con el objetivo de evaluar diferentes concentraciones del complejo y determinar si éste mostraba un efecto antifúngico en *F. oxysporum*, además se evaluaron estas concentraciones en plántulas de tomate (Cid F1) y se observó si se presentaban síntomas de fitotoxicidad, ambas pruebas con la finalidad de obtener la mejor concentración para inhibir el crecimiento micelial y mejorar las características de desarrollo en las plántulas de tomate.

En la primera etapa se desarrolló una prueba *in vitro* usando la técnica de medio envenenado de Saharan *et al.* (2013), utilizada para medir el poder antifúngico del complejo. Se evaluaron diferentes concentraciones del complejo PVA-Cs-NPs Cu (2, 4, 6, 12, 24, 48, 96, 192, 384 mg L<sup>-1</sup>), PVA-Cs (250, 384 mg L<sup>-1</sup>), y un testigo absoluto. Se preparó medio PDA con las diferentes concentraciones de PVA-Cs-NPs Cu, PVA-Cs y T0 por separado. Se vertieron en cajas Petri se tomó un explante de micelio de *F. oxysporum* de 8 mm de diámetro de 15 días de crecimiento procedente de una cepa del CICY Mérida, Yucatán (proporcionada por la empresa Biocampo) y se colocó al centro de las cajas Petri. Todas las cajas Petri se incubaron a 28°C durante 7 días, se registró el

crecimiento radial del micelio cuando el tratamiento testigo cubrió la totalidad de la caja Petri. Todos los tratamientos constaron de ocho repeticiones. El crecimiento micelial en las cajas Petri de los tratamientos se comparó con el testigo (sin complejo), para calcular la inhibición del crecimiento del micelio patógeno, se utilizó la fórmula dada por Vincent (1947). La cual se describe a continuación:

$$\text{Inhibición} = \frac{m_c - m_t}{m_c}$$

Donde MC es el crecimiento de micelio en el control, MT es el crecimiento del micelio en el tratamiento. Multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje (Saharan *et al.*, 2013).

Para la prueba de fitotoxicidad se trasplantaron plántulas de tomate híbrido tipo saladette de crecimiento indeterminado cv. El Cid F1 (Harris Moran<sup>®</sup> Seed Company) en vasos de poliestireno de 1 L de capacidad con una mezcla de sustrato perlita-peat moss en una proporción 1:1 (v/v). Se aplicaron los complejos vía foliar en diferentes concentraciones PVA-Cs-NPs Cu (2, 4, 6, 12, 24, 48, 96, 192, 384 mg L<sup>-1</sup>), PVA-Cs (250, 384 mg L<sup>-1</sup>), y un testigo absoluto.

Para determinar el efecto de los tratamientos en las plántulas de tomate se evaluaron las variables relacionadas al desarrollo como altura de planta, diámetro de tallo y número de hojas. Se evaluó también la fitotoxicidad del cultivo con la escala propuesta por la Sociedad Europea de Investigación de Malezas EWRS (Champion, 2000).

**Tabla 1.** Escala propuesta por la EWRS para evaluar el control de malezas y la fitotoxicidad al cultivo causado por herbicidas.

Valor	Control de maleza (%)	Efecto en maleza	Toxicidad al cultivo (%)	Efecto en el cultivo
1	99.0-100.0	Muerte	0.0-1.0	Sin efecto
2	96.5-99.0	Muy buen control	1.0-3.5	Síntomas muy ligeros
3	93.0-96.5	Buen control	3.5-7.0	Síntomas ligeros
4	87.5-93.0	Control suficiente	7.0-12.5	Síntomas evidentes sin efecto en rendimiento
5	80.0-87.5	Control medio	12.5-20.0	Daño medio
6	70.0-80.0	Control regular	20.0-30.0	Daño elevado
7	50.0-70.0	Control pobre	30.0-50.0	Daño muy elevado
8	1.0-50.0	Control muy pobre	50.0-99.0	Daño severo
9	0.0-1.0	Sin efecto	99.0-100.0	Muerte

## Segunda etapa

Consistió en la aplicación foliar del tratamiento a una concentración de 500 mg L<sup>-1</sup>, tomando en cuenta que ningún tratamiento causó fitotoxicidad en plántulas y de acuerdo a la literatura (Rodríguez-Romero *et al.*, 2019; Saharan *et al.*, 2015) se decidió evaluar esa concentración. Esta prueba se estableció inoculando plantas con *F. oxysporum*, se evaluaron parámetros agronómicos y de calidad de fruto, así como la actividad de enzimas relacionadas con la respuesta de defensa, componentes antioxidantes, incidencia y severidad por el daño de *F. oxysporum* y un análisis de expresión génica.

Se estableció la prueba con plantas de tomate híbrido tipo saladette de crecimiento indeterminado cv. Cid F1 (Harris Moran). Las plántulas se trasplantaron a bolsas de polietileno negras de 14 L de capacidad con una mezcla de sustrato perlita-peat moss en una proporción 1:1 (v/v). Las plantas se manejaron a un tallo y se realizaron todas las labores culturales. Para la nutrición del cultivo se utilizó solución tipo Steiner (Steiner, 1961), manejando la concentración de acuerdo a la etapa fenológica del cultivo. Los tratamientos usados consistieron en las siguientes aplicaciones: PVA-Cs 500 mg L<sup>-1</sup>-NPs Cu 500 mg L<sup>-1</sup>, PVA-Cs 500 mg L<sup>-1</sup> y un testigo absoluto (T0). Para la evaluación de la actividad de inducción de resistencia en plantas del complejo se inocularon las plantas con *F. oxysporum* (FOL) los tratamientos consistieron en las siguientes aplicaciones: FOL+PVA-Cs 500 mg L<sup>-1</sup>-NPs Cu 500 mg L<sup>-1</sup>, FOL+PVA-Cs 500 mg L<sup>-1</sup> y un testigo patógeno (FOL T0). Las aplicaciones de los tratamientos fueron vía foliar, las plantas tuvieron una aplicación de los complejos 48 horas previo al trasplante posterior a esto se aplicó en intervalos de 20 días iniciando después del trasplante.

El inóculo se realizó de la siguiente forma, se dejó crecer el patógeno en cajas Petri con medio PDA (dextrosa 20 g L<sup>-1</sup>, infusión de papa 4 g L<sup>-1</sup> y agar 15 g L<sup>-1</sup>) durante 15 días a 28°C, se tomaron las cajas Petri y se mezcló con agua destilada estéril, se raspó el micelio y a continuación la mezcla se filtró con gasas estériles y se cosechó el micelio. Se concentró todo el líquido de las cajas Petri, y se realizó un conteo de esporas en una cámara de Neubauer para ajustar a una concentración de 1x10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>.

Para las plantas correspondientes a los tratamientos con FOL fueron inoculadas al momento del trasplante con una solución ajustada a 1x10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>, la inoculación se llevó de la siguiente manera, se extrajo la plántula de la charola de germinación y se

hizo un corte en la raíz, se dejaron sumergidas en la solución de esporas durante 30 minutos, esto porque al provocar heridas se favoreció la adherencia de las esporas a la raíz y por lo tanto la infección, posterior a este periodo las plántulas fueron trasplantadas y se aplicaron directo al sustrato 50 mL de la solución de esporas.

**Incidencia y severidad.** La incidencia del patógeno en las plantas de tomate se determinó con la presencia o ausencia de síntomas del patógeno en la planta, sin importar la severidad de éstos. Este parámetro se cuantificó como porciento de incidencia.

La severidad se midió mediante una escala visual, utilizando la escala propuesta por Diener y Ausubel (Diener & Ausubel, 2005). La cual se describe a continuación: 0= planta muerta (100%); 1= hojas viejas muertas y hojas jóvenes con crecimiento detenido (80%); 2= hojas viejas cloróticas y hojas jóvenes con crecimiento detenido (60%); 3= hojas viejas con clorosis vascular y hojas jóvenes con crecimiento detenido (40%); 4= peciolas de hojas con crecimiento detenido (20%); 5= sin síntomas visibles (0%).

**Variables agronómicas.** Se evaluó altura de la planta, se midió con una cinta métrica; diámetro de tallo, se midió con un vernier digital, se contabilizaron el número de hojas estas variables se midieron a los 20, 40, 60, 80 y 105 días después del trasplante (ddt). El crecimiento de las plantas se limitó a 105 ddt eliminando el crecimiento apical. La biomasa fresca y seca se midió a los 90 ddt (posterior a la cosecha del 1er y 2do racimo) y 120 ddt (Cuando se dio por concluido el periodo de experimentación). A los 120 días después del trasplante se determinó el rendimiento por planta, considerando todos los frutos de 7 racimos cosechados durante el tiempo de experimentación. La biomasa fresca de la raíz se determinó a los 120 ddt.

**Evaluación de calidad de fruto.** Se seleccionaron 5 frutos al azar después de la cosecha del primer y segundo racimo, se verificó que no tuvieran daño físico, fueran uniformes y en estado de madurez 6 (rojo ligero) de acuerdo al patrón de color visual utilizado por la USDA (1991), se cortaron y almacenaron en un congelador a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . El potencial de hidrógeno (pH) se determinó utilizando un potenciómetro digital (HANNA®), los sólidos solubles ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) se midieron con un refractómetro digital PR-

101ATAGO PALETTE, el porcentaje de acidez titulable se determinó de acuerdo a la metodología de (AOAC, 1990), se expresaron los datos como porcentaje de ácido cítrico, la firmeza de la fruta se determinó con un penetrómetro manual (WAGNER INSTRUMENTS, modelo FDK 20) utilizando la puntilla de 8 mm.

El contenido de vitamina C se determinó por el método de titulación con 2,6 diclorofenolindofenol (Padayatt *et al.*, 2001). Se pesaron 10 g de fruto fresco y se maceraron en un mortero con 10 mL de HCl al 2%, después se filtró a través de una gasa absorbente estéril sobre un matraz de aforación de 100 mL. Se tomó una alícuota de 10 mL y se tituló con 2,6 diclorofenolindofenol hasta obtener una coloración rosácea persistente. Los resultados se expresaron en mg 100 g de peso fresco<sup>-1</sup>.

También se determinó el contenido de licopeno de acuerdo a la metodología de Fish *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Se pesaron 100 mg de tejido liofilizado y se agregó 1.5 mL de hexano, se mezcló con un pulso de vórtex por 30 segundos, posterior a eso se sónico durante 5 minutos. Se centrifugó a 12,500 rpm por 10 min a 4°C. Por último, se leyó a una absorbancia de 470 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Modelo G10S, Waltham, MA, EE. UU.) Los resultados se expresaron en mg 100 g de peso fresco<sup>-1</sup>.

La cantidad de fenoles totales se determinó de acuerdo a la metodología de Yu & Dahlgren (2000) con algunas modificaciones. Se pesaron 200 mg de tejido liofilizado y se agregó 1 mL de agua:acetona (1:1), se mezcló con un pulso de vórtex por 30 segundos, posterior a eso se sónico durante 5 minutos. Se centrifugó a 12,500 rpm por 10 min a 4°C. Se extrajo el sobrenadante (en caso de ser necesario se realizó una dilución en una proporción 1:2 con solución agua: acetona). A continuación se tomaron 50 µL del extracto y se agregaron 200 µL de reactivo Folin-Ciocalteu, enseguida se añadió 500 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%, se adicionaron 5 mL de agua destilada y se mezcló con un pulso en el vortex, finalmente se sometió a baño maría durante 30 min a 45°C. Se leyó a una absorbancia de 750 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Modelo G10S, Waltham, MA, EE. UU.). Se utilizó una curva de calibración con ácido gálico (0.02-0.4 mg mL<sup>-1</sup>) y los resultados se expresaron en mg EQ de ácido gálico por 100 g de peso seco.

**Actividad de enzimas relacionadas con la respuesta de defensa.** Se determinó la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), quitinasa y  $\beta$ - 1,3 glucanasa. Las determinaciones se realizaron en hojas en 3 tiempos diferentes, a las 48 horas posteriores a la primera aplicación del complejo (primer muestreo) los siguientes fueron cada 40 días, las hojas se colectaron en bolsas de aluminio previamente identificadas y se introdujeron en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento en un ultracongelador a una temperatura de  $-78^{\circ}\text{C}$ .

La extracción de las enzimas (extracto enzimático) (EE) se llevó a cabo pesando 200 mg de fruto liofilizado u hoja criogenizada con nitrógeno líquido se añadieron 20 mg de polivinilpirrolidona. Después se le agregaron 1.5 mL de buffer de fosfatos pH 7-7.2 (0.1 M), se sónico durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue recolectado y filtrado con filtros de PVDF de 0.45 micras de diámetro de poro (Ramos *et al.*, 2010). Se prepararon diluciones del extracto en una proporción de 1:20 con buffer de fosfatos. Con este EE se cuantificaron las proteínas totales y se determinó la actividad de la PAL.

La cuantificación de proteínas se determinó mediante el método Bradford (Bradford, 1976), se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del EE o estándar y se agregaron 1.5 mL del reactivo Bradford. Después de 5 minutos, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Modelo G10S, Waltham, MA, EE. UU.). Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino estándar (0.005-0.5  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Los resultados se expresaron como  $\text{mg g}^{-1}$  de proteínas totales en peso fresco.

La actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) (EQ 4.3.1.5) se determinó de acuerdo a Sykłowska-Baranek *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Se tomaron 0.1 mL del EE y se agregaron 0.9 mL de L-fenilalanina (6 mM). Después de 30 min de incubación a  $40^{\circ}\text{C}$  se detuvo la reacción con 0.25 mL de HCl 5 N. Las muestras se colocaron en baño de hielo y se les adicionaron 5 mL de agua destilada. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 290 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se realizó una curva de calibración con ácido transcinámico (300-3000  $\mu\text{mol}$ ) y los resultados se expresaron como  $\mu\text{moles}$  de ácido transcinámico producidos por min por proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Para la extracción de las enzimas quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa se pesó 1 g de hoja crioconservada y posteriormente se maceró en un mortero congelado. Se procedió a la extracción con una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 M pH 5.2.

La actividad quitinasa se determinó adicionando a 250  $\mu$ L de EE, 500  $\mu$ L de solución amortiguadora de ácido cítrico 0.1 M y fosfato de sodio 0.1 M a pH 5.2 y 250  $\mu$ L de quitina coloidal 0.5%. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos con agitación continua. La reacción se detuvo al calentarla a ebullición por 5 minutos (Rodríguez Guillén *et al.*, 2006). Se determinó el incremento de azúcares reductores por la técnica de Miller (Miller, 1959), se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. La actividad enzimática se determinó por la medición del nivel de producción de azúcares reductores y se expresó en términos de producción de  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de glucosa por minuto por proteínas totales (mg g<sup>-1</sup>).

La actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa se determinó agregando a 100  $\mu$ L de EE, 200  $\mu$ L de sustrato laminarina a una concentración de 1mg mL<sup>-1</sup> y 100  $\mu$ L de solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 M a pH 5.2, las muestras se incubaron a 40°C durante 30 minutos (Rodríguez Guillén *et al.*, 2006). La actividad enzimática se determinó por la medición del nivel de producción de azúcares reductores y se expresara en términos de producción de  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de glucosa por minuto por proteínas totales (mg g<sup>-1</sup>) (Miller, 1959).

#### **Análisis de expresión génica**

Para el muestreo del análisis de expresión de genes se aplicó el complejo y 48 horas posteriores a la aplicación se colectó la muestra de hoja de todos los tratamientos, teniendo tres muestreos al trasplante, a los 40 ddt y 80 ddt. Estas se colocaron en nitrógeno líquido y almacenaron en un ultracongelador a una temperatura -78°C.

Para la extracción de ARN se usó el método de Trizól<sup>®</sup>. Se pulverizó la muestra de hojas con nitrógeno líquido, se pesaron 100 mg de muestra y se colocaron en un tubo para micro centrifuga de 2 mL, inmediatamente se le adicionó a la muestra 1 mL de TRI reagent<sup>®</sup> y se homogenizó suavemente, se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo y la mezcla se agitó en vortex vigorosamente hasta que tuvo un aspecto lechoso, la mezcla se incubo a temperatura ambiente por 15 min, a continuación fue centrifugada a 12,000 g por 15 min

a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo al cual se le adicionaron 500 µL de isopropanol frío mezclando suavemente, en seguida se incubo a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C, se removió el sobrenadante por decantación y la pastilla de ARN formada se lavó adicionando 1 mL de etanol frío al 70%, se agitó haciendo suaves inversiones de tubo para después centrifugar a 7,500 g por 5 min a 4°C, nuevamente se removió el sobrenadante y la pastilla de ARN se dejó secar por 15 min, finalmente la pastilla se re suspendió en 50 µL de Formazol<sup>®</sup> y se almacenó en un congelador a -20°C.

La cuantificación del ARN extraído se realizó por medio del espectrofotómetro usando el método de ARN, para lo cual se preparó un blanco que consistió en 2 µL Formazol<sup>®</sup> y 198 µL de agua DEPC, la lectura de muestras se preparó con 2 µL de ARN y 198 µL de agua DEPC, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm y se obtuvo el valor de R (pureza), para calcular la concentración de ARN extraído se usaron las siguientes formulas:

$$\mu\text{g/mL} = (A_{260}) (100) (50) \quad \mu\text{g totales} = (\mu\text{g/mL}) (0.05)$$

La determinación de la calidad del ARN obtenido de la extracción se realizó mediante electroforesis desnaturalizante, para lo cual se elaboró un gel de agarosa al 1.3% con Agua-MOPS-Formaldehído, las muestras se prepararon colocando en un tubo de 0.6 ml, 2 µg de muestra de ARN y completando el volumen a 5 µL con agua DEPC, después se le adicionaron 5 µL de buffer de carga y se dejó incubar por 10 min a 60°C e inmediatamente después se colocaron a 4°C para enfriarse. Una vez que el gel estaba solidificado, se sumergió en la cámara de electroforesis y se agregó solución MOPS 1X a la cámara hasta la marca, las muestras se agregaron en el gel, colocando cada una de ellas dentro de los pocillos. Se dejó correr la electroforesis a 70 volts por 80 minutos, después se sacó el gel de la cámara y se colocó en el transiluminador para ver las bandas, se tomó la foto del gel y se analizó.

La síntesis de c-DNA se realizó iniciando con un pre tratamiento al ARN usando el kit DNase I (Sigma-Aldrich), posterior a esto se sintetizo el cDNA con el kit SensiFAST<sup>™</sup> (BIOLINE), el mix fue preparado en hielo y las soluciones a utilizar se mezclaron en vortex y se centrifugaron en micro centrífuga antes de iniciar el protocolo, las muestras se prepararon usando 2 µg de muestra, 4 µL de buffer reacción 5X y 1 µL de

transcriptasa reversa, el volumen se completó a 20  $\mu\text{L}$  con agua libre de DNAsas y RNAsas y la mezcla resultante se homogenizó por pipeteo y se colocó en el termociclador bajo las condiciones especificadas en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones específicas en el termociclador para la síntesis de c-DNA.

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min)
25 $^{\circ}\text{C}$	10
42 $^{\circ}\text{C}$	15
48 $^{\circ}\text{C}$	15
85 $^{\circ}\text{C}$	5
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

Terminado el programa en el termociclador, las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el congelador hasta su uso.

Los iniciadores corresponden a un gen endógeno (Actina1) y el gen problema PR1 los cuáles fueron diseñados en el software AMPLIFIX, OLIGOANALIZER Y PRIMERS BLAST (Tabla 3). La preparación de los iniciadores consistió en centrifugar cada par de iniciadores a máxima velocidad por 15 min, posteriormente se hidrataron con agua DEPC según las especificaciones de la ficha técnica de cada uno, asegurándose de que el liofilizado se solubilizara correctamente, en seguida se realizó la preparación de las soluciones de trabajo, para lo cual se etiquetaron microtubos de 0.6 mL para cada iniciador, luego se calculó el volumen requerido para preparar la solución de trabajo a una concentración de 15 pmol usando la siguiente formula:

$$C1C2=V1V2$$

Dónde:

C1=Solución Stock (100pmol)

V1= Volumen requerido

$$V1= \frac{(15 \text{ pmol})(50\mu\text{L})}{100 \text{ pmol}}$$

C2=Solución de trabajo (15pmol)

V2= Volumen deseado (50 $\mu\text{L}$ )

$$V1= 7.5 \mu\text{L}$$

De acuerdo con la formula se tomaron 7.5  $\mu\text{L}$  de la solución madre del primer y se mezclaron con 42.5  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, se homogenizó por pipeteo y las soluciones Stock y de trabajo se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**Tabla 3.** Características de los iniciadores utilizados en la cuantificación del gen PR1.

Nombre del iniciador	Actinal	PR1
Secuencia Forward	CCCAGGCACACAGGTGTTAT	AAGTAGTCTGGCGCAACTCA
Secuencia Reverse	CAGGAGCAACTCGAAGCTCA	GTCCGATCCAGTTGCCTACA
Temperatura de anillamiento	60°C	60°C
Producto de amplificación	150 pb	108 pb

Pb: Pares de bases.

Una vez seleccionada la temperatura de anillamiento adecuada para cada par de iniciadores se procedió a realizar las pruebas de concentración de iniciadores para qPCR, estos ensayos se realizaron partiendo de una concentración equimolar de 100 nM, de acuerdo con los resultados obtenidos se probaron concentraciones equimolares menores o el ajuste en la concentración del iniciador forward o reverse, posteriormente se seleccionaron aquellas concentraciones donde hubo buen producto de amplificación y sin la formación de estructuras inespecíficas.

El proceso de validación de genes tuvo como finalidad probar que los productos de PCR a medir (gen housekeeping y gen problema) amplifican con la misma eficiencia, para conocer la eficiencia de amplificación se realizaron amplificaciones con diferentes cantidades de cDNA (diluciones seriales a partir de un stock).

Primero se prepararon los estándares de cDNA, se rotularon 5 microtubos para cada concentración y se agregaron 32  $\mu\text{L}$  de agua y 8  $\mu\text{L}$  de cDNA para el iniciador estándar, se homogenizo y de esta mezcla se tomaron 8  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 32  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, se homogenizo y se tomaron 8  $\mu\text{L}$  para formar el siguiente estándar, este proceso se repitió hasta formar los 5 estándares. Después se preparó el coctel mix, sin agregar el cDNA, considerando 2 puntos para cada estándar y 2 controles negativos (NTC) para cada gen. Cada cóctel mix se preparó como se especifica en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Características para la preparación del cóctel mix correspondiente a cada gen.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad ACT1 (1 muestra)</b>	<b>Cantidad PR1 (1 muestra)</b>
SYBER <sup>®</sup> Select Master Mix	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Iniciador 5'-3' (15 pmol)	0.10 $\mu$ L	0.03 $\mu$ L
Iniciador 3'-5' (15 pmol)	0.08 $\mu$ L	0.05 $\mu$ L
Agua grado biología molecular	8.82 $\mu$ L	8.92 $\mu$ L
Total	19 $\mu$ L	19 $\mu$ L
Se aforó a 20 $\mu$ L, agregando 1 $\mu$ L de muestra (cDNA), 1 $\mu$ L de estándar o 1 $\mu$ L de agua grado biología molecular (NTC)		

Los reactivos en el tubo se mezclan por pipeteo, en cinco microtubos de 100  $\mu$ L de la tira de reacción rápida se agregaron 19  $\mu$ L del coctel mix para ACT1 y 19  $\mu$ L para PR1 (2 reacciones), a estos mismos tubos se les adicionó 1  $\mu$ L de c-DNA de cada estándar respectivamente, se homogenizo usando la micropipeta, y el sobrante del coctel se usó para formar los NTC. Finalmente se corrió la qPCR con las condiciones seleccionadas para cada gen. Los resultados obtenidos fueron analizados y con ellos se determinó el método de cuantificación a utilizar.

Las reacciones de PCR en tiempo real se analizaron con el equipo Applied Biosystems StepOne<sup>™</sup> versión 2.3 para este ensayo el método de cuantificación usado fue  $\Delta\Delta C_t$  midiendo la intensidad de fluorescencia del marcador Sybr Green. Se preparó el coctel mix para cada uno de los genes de acuerdo a la misma metodología de la validación de genes con la diferencia de que para este apartado se añadieron las muestras de c-DNA correspondientes a los diferentes tratamientos, una vez preparada la tira de microtubos de reacción rápida fue colocada en la placa y se corrió la qPCR en el termociclador con el programa especificado en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones del programa en el termociclador para la qPCR.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Hot Start	95°	10 min
	40 Ciclos:	
PCR	95°	15 s
	Temperatura del iniciador	60 s
	95°	15 s
Melting	60°	1 min
	95°	15 s

**Diseño estadístico**

Para la primera etapa, en la prueba *in vitro* la unidad experimental fue una caja petri, se utilizaron 8 unidades experimentales por cada tratamiento. En el caso de la prueba de fitotoxicidad la unidad experimental fue un vaso de poliestireno de 1 L, se contó con 10 unidades experimentales por tratamiento. Para el desarrollo del experimento se usó un diseño completamente al azar. Para detectar la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos se realizó un ANOVA, adicionalmente se efectuó una prueba de separación de medias de LSD Fisher ( $p \leq 0.05$ ). Todos los análisis estadísticos se trabajaron en el software estadístico InfoStat v2018l.

Para la segunda etapa la unidad experimental fue una planta en una maceta. Para las variables agronómicas (altura de la planta, diámetro de tallo, número de hojas, número de frutos, rendimiento, PFA, PFR, PSA y PSR) se midieron 20 unidades experimentales por cada tratamiento. En el caso de las variables bioquímicas y de calidad de fruto se consideraron cinco repeticiones por tratamiento. Para el desarrollo del experimento se usó un diseño completamente al azar. Para detectar la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos se realizó un ANOVA, adicionalmente se efectuó una prueba de separación de medias de LSD Fisher ( $p \leq 0.05$ ). Todos los análisis estadísticos se trabajaron en el software estadístico InfoStat v2018l.

Para la cuantificación de la expresión relativa de genes (QR) se emplearon cuatro repeticiones por tratamiento, cada repetición consistió en la mezcla del ARN de 2 plantas diferentes. Se calculó en el software Applied Biosystems StepOne™ versión 2.3 Este software normaliza los datos de QR, a partir de estos datos se calcula una media geométrica que representa la cuantificación relativa del gen de estudio. El error estándar

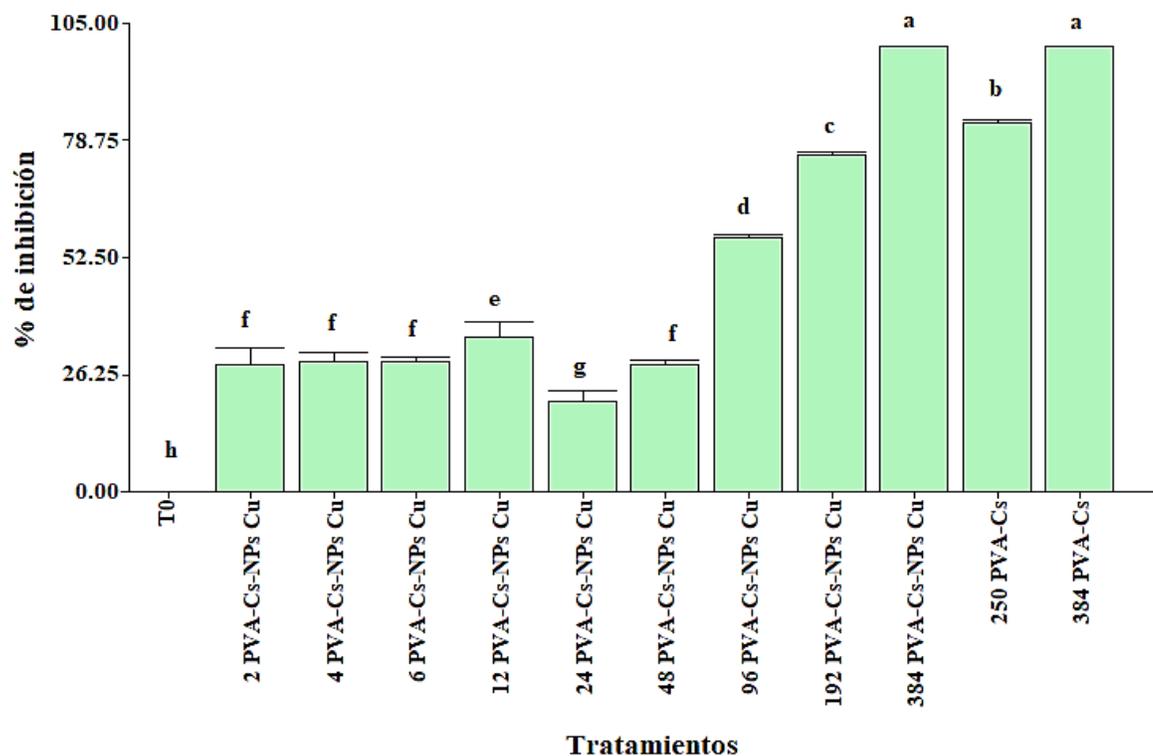
se calculó a partir de la desviación estándar y el coeficiente de variación del gen de referencia y estudio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Primera Etapa

#### Prueba de inhibición *in vitro*

Los resultados de la inhibición del crecimiento micelar de *Fusarium oxysporum* (FOL) se presentan en la Figura 2. El crecimiento *in vitro* de FOL fue inhibido efectivamente por las concentraciones de 96, 192 y 384 mg L<sup>-1</sup> PVA-Cs-NPs Cu, así como el complejo PVA-Cs a 250, 384 mg L<sup>-1</sup>. Siendo la concentración de 384 mg PVA-Cs-NPs Cu y 384 mg PVA-Cs donde se registró la tasa máxima de inhibición (100%) del crecimiento de FOL en comparación al testigo, seguido de la concentración de 250 mg L<sup>-1</sup> del complejo Cs-PVA con un porcentaje de inhibición del 83% respectivamente. El quitosano a granel puede tener una baja solubilidad y escasa actividad antifúngica (Saharan *et al.*, 2015). El quitosán en solución acida posee un grupo amino (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) que puede interaccionar con la membrana celular del hongo que tiene carga negativa y como resultado provocar el deterioro de las proteínas (El Hadrami *et al.*, 2010). El alcohol polivinílico (PVA), es un polímero sintético soluble en agua totalmente biocompatible se usa ampliamente con otros polímeros, biopolímeros para compensar las ventajas y desventajas de los materiales, de esa forma mejorar las propiedades de la mezcla resultante, mezclas de PVA-Cs que se han usado para probar la inhibición del crecimiento bacteriano (Durá Romero, 2019; Yang *et al.*, 2016, 2018). PVA-Ct (10% p/p) mostraron un efecto sobre la actividad microbiana de *Staphylococcus aureus* reduciéndola un 85% respecto al control (Yang *et al.*, 2018). Saharan *et al.* (2013) evaluaron NPs Ct y NPs Cu-Ct sobre el crecimiento micelial de *A. alternata* y *M. phaseolina* encontrando NPs Ct inhibía el desarrollo micelar en un 82.2% (*A. alternata*) y 87.6% (*M. phaseolina*) respecto al control, por su parte NPs Cu-Ct fue estadísticamente igual que NPs Ct inhibiendo el crecimiento de *A. alternata*, pero con el patógeno *M. phaseolina*, NPs Ct fue superior a NPs Cu-Ct y el control, el potencial zeta puede ser un importante parámetro en la estabilidad de las partículas en medios acuosos, además de una mayor afinidad a una unión con la membrana fúngica esto por la mayor densidad de carga superficial (Du *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición del crecimiento in vitro de FOL por el complejo PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs. Medias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (LSD Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

### Prueba de fitotoxicidad

Los resultados de la prueba de fitotoxicidad se presentan en la Tabla 6. No se presentó daño por toxicidad en las plántulas de tomate, al contrario se promovió el desarrollo de éstas (Figura 3), esto concuerda con Hernández *et al.* (2017) quienes evaluaron NPs Cu en hidrogeles de quitosán teniendo efectos significativos en el crecimiento, aumentando el número de hojas y peso fresco de raíz. Los tratamientos PVA-Cs-NPs Cu  $96 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $192 \text{ mg L}^{-1}$  y  $384 \text{ mg L}^{-1}$  fueron los que presentaron un mayor incremento en altura del 16%, 18% y 20% respectivamente en relación al T0. Para el número de hojas se presentaron diferencias significativas siendo los tratamiento PVA-Cs-NPs Cu  $192 \text{ mg L}^{-1}$  y  $384 \text{ mg L}^{-1}$  los que estuvieron entre los que más incrementaron esta variable siendo 6.45% y 12.90% mayores que T0. Para el caso del tratamiento PVA-Cs  $250 \text{ mg L}^{-1}$  estuvo entre los valores más altos incremento el número de hojas y el diámetro de tallo en un 9.67% y 23% respectivamente en relación al T0. Los tratamientos PVA-Cs-NPs Cu  $192 \text{ mg L}^{-1}$  y  $384 \text{ mg L}^{-1}$  fueron lo que representaron los más altos valores del diámetro

de tallo incrementándolo en un 23.56% y 26.84% respectivamente en comparación con el T0. Se evaluaron NPs TiO<sub>2</sub> en maíz, estas tuvieron un efecto negativo inhibiendo el crecimiento en un 10%, así como redujo el poro de la pared celular de las raíces de 6.6 nm a 3nm (Asli & Neumann, 2009). NPs Cu y NPs Ag inhibieron el crecimiento de la raíz, mostrando una toxicidad en calabacín (*Cucurbita pepo*) (Stampoulis *et al.*, 2009). NPs Ag tuvieron efectos genotóxicos en las células de la raíz en *Allium cepa* (Kumari *et al.*, 2009). NPs TiO<sub>2</sub> fueron evaluadas en el desarrollo en espinacas, mejorando el crecimiento, la capacidad de fotosíntesis y fijación de nitrógeno en hojas y raíz (Sharma, 2019). NPs Al no demostraron ningún efecto toxico al ser evaluadas en *Phaseolus vulgaris* (Doshi *et al.*, 2008). NPs Zn mejoraron el crecimiento y producción de biomasa en plántulas de tomate aplicando directo al follaje (Panwar, 2012). Evaluaron NPs ZnO en cacahuate estas promovieron la germinación, así como incrementaron la elongación de tallo y raíz (Prasad *et al.*, 2012), por su parte Zhao *et al.* (2013) obtuvieron un incremento en la longitud de plantas y biomasa seca en la raíz en pepino.

**Tabla 6.** Variables agronómicas evaluadas en la prueba de fitotoxicidad.

Tratamiento	Altura (cm)	NH	DT (mm)
T0	40.85 ef	9.30 c	3.65 d
PVA-Cs-NPs Cu 2 mg L <sup>-1</sup>	40.95 def	8.60 d	3.97 c
PVA-Cs-NPs Cu 4 mg L <sup>-1</sup>	44.22 bcd	9.33 c	3.93 cd
PVA-Cs-NPs Cu 6 mg L <sup>-1</sup>	44.73 bc	9.60 bc	4.01 c
PVA-Cs-NPs Cu 12 mg L <sup>-1</sup>	43.90 cde	9.70 bc	3.80 cd
PVA-Cs-NPs Cu 24 mg L <sup>-1</sup>	41.05 def	9.30 c	3.90 cd
PVA-Cs-NPs Cu 48 mg L <sup>-1</sup>	44.35 bc	9.40 c	4.01 c
PVA-Cs-NPs Cu 96 mg L <sup>-1</sup>	47.45 ab	9.80 bc	4.10 bc
PVA-Cs-NPs Cu 192 mg L <sup>-1</sup>	48.20 a	9.90 abc	4.51 a
PVA-Cs-NPs Cu 384 mg L <sup>-1</sup>	49.15 a	10.50 a	4.63 a
PVA-Cs 250 mg L <sup>-1</sup>	43.10 cde	10.20 ab	4.49 a
PVA-Cs 384 mg L <sup>-1</sup>	39.70 f	9.67 bc	4.34 ab

Medias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (LSD Fisher,  $p \leq 0.05$ ). T0: Testigo; PVA-Cs-NPs Cu: Complejo polivinil alcohol-quitosán-nanopartículas de cobre; PVA-Cs: Complejo polivinil alcohol-quitosán; NH: Número de hojas; DT: Diámetro de tallo.



**Figura 3.** Crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate durante la prueba de fitotoxicidad.

Con los resultados de la primera etapa se decidió elegir la concentración de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  en los complejos de PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs debido a que ninguna concentración mostro un efecto toxico en las plantas, se revisó en la literatura y se encontraron ensayos donde se demostró complejos de quitosán (0.5, 1.0, 1.5% p/v)-extracto *Pseudomonas fluorescens* tenían efecto de control en el crecimiento micelial y germinación de conidios de *Alternaria alternata*, sin embargo en el ensayo con plantas no mostraron diferencias estadísticas (Rodríguez-Romero *et al.*, 2019) y Saharan *et al.* (2015) quienes evaluaron una solución de NPs Cu-quitosán al 0.12% (p/v) directo al suelo contra *F. oxysporum* encontraron resultados favorables reduciendo la severidad de la marchitez vascular, basados en estos hallazgos decidimos incrementar la concentración a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  en la aplicación foliar.

## Segunda Etapa

### Variables agronómicas en plantas de tomate

El efecto de los complejos en las variables agronómicas es presentado en la Tabla 7. Los resultados obtenidos para altura, diámetro de tallo y número de hojas no presentaron diferencias estadísticas significativas para los tratamientos PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs

en comparación a T0. Las variables de rendimiento, peso promedio de fruto (PPF), número de frutos promedio por planta (NFP), peso fresco aéreo (PFA), peso seco aéreo (PSA) y peso fresco de la raíz (PFR) presentaron diferencias estadísticas significativas. Para el caso del rendimiento y NFP el tratamiento con la aplicación de PVA-Cs-NPs Cu fue 60.68% y 35.99% mayor en comparación al T0. En la variable PPF los dos tratamientos fueron superiores al testigo incrementando en un 18.20% (PVA-Cs-NPs Cu) y un 8.39% (PVA-Cs). Esto coincide con Juárez-Maldonado *et al.*, (2016) que reportan que las NPs Cu a una concentración de 0.06 mg L<sup>-1</sup> incrementaron en un 22.84% el número de frutos en plantas de tomate. Por su parte Pinedo-Guerrero *et al.* (2017) reportaron que la aplicación de hidrogeles de PVA-Cs con 0.2 mg NPs Cu en chile jalapeño incrementaron el rendimiento y el número de frutos por planta en un 8.27% y 9.32% respectivamente en comparación al control. Para las variables PFA y PSA la aplicación de PVA-Cs-NPs Cu incrementó en un 26.99% y 29.48% respectivamente en comparación al testigo absoluto. Esto concuerda con Saharan *et al.* (2015) que reportaron un incremento en la longitud de plántulas, peso fresco y peso seco en semillas de tomate tratadas con NPs Cu-Cs. Para la variable PFR el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu fue estadísticamente superior al testigo absoluto con un incremento aproximado del 80.87%, Adhikari *et al.* (2012) reportaron el efecto de la aplicación de NPs de CuO (600 mg L<sup>-1</sup>) en una concentración a 100 ppm y 60 ppm donde incrementó el crecimiento de la raíz en soya y garbanzo en un 34.4% y un 22% en comparación al control. Shah and Belozerova (2009) aplicaron NPs Cu a una concentración de 0.066% (p/p) en semillas de lechuga, mostrando así una influencia significativa sobre longitud del brote y la longitud de la raíz. Nge *et al.* (2006) probaron el potencial bioestimulante del quitosán en orquídeas aplicándolo en forma foliar estimulando el crecimiento radicular y la renovación en la producción de flores. Pestovsky y Martínez-Antonio (2017); Rajput *et al.* (2018), mencionan que el Cu es un micronutriente que en las plantas participa en procesos fisiológicos esenciales para su crecimiento, las NPs permiten una mejora en la funcionalidad del metal a partir del cual están compuestas debido a su superficie altamente reactiva.

Con respecto a las plantas inoculadas con FOL, en las variables altura, DT, NH, rendimiento, PFA y PSA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas

con respecto al testigo patógeno. Para la variable número de frutos por planta, el testigo patógeno (FOL) superó a los tratamientos PVA-Cs+FOL y PVA-Cs-NPs Cu+FOL (Tabla 4). En la variable NFP la comparación entre los complejos muestra diferencias estadísticas, PVA-Cs+FOL superó al tratamiento PVA-Cs-NPs Cu+FOL 24.02% respectivamente pero no así a FOL. La variable PPF presentó diferencias estadísticas para los dos tratamientos aplicados PVA-Cs-NPs Cu+FOL y PVA-Cs+FOL incrementando estas variables en un 29.53% y 15.29% respectivamente en comparación a FOL. El Cu puede afectar el desarrollo de las plantas, se ha demostrado que puede activar enzimas claves en el ciclo de Calvin y así mejorar la actividad fotosintética, esto puede verse reflejado en un incremento en el tamaño de los frutos (Pradhan *et al.*, 2015). La variable PFR presentó diferencias estadísticas, el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu+FOL mostró los mejores valores por encima del testigo patógeno (FOL) incrementando en un 104.41%. En un ensayo para determinar el efecto de NPs Cu sobre el desarrollo en garbanzo y soya se encontró que la concentración de 500 ppm de Cu impedía el crecimiento de la raíz, al aumentar la concentración de NPs Cu la elongación de las raíces se inhibió gravemente en comparación a la del control (Adhikari *et al.*, 2012). En algunas especies vegetales la exposición de NPs Cu puede generar toxicidad, esto siempre dependerá de las concentraciones y la forma en la que son aplicadas.

**Tabla 7.** Efecto del complejo PVA-Cs-NPs Cu e inoculación de FOL en el crecimiento y desarrollo en plantas de tomate.

Tratamientos	Altura (cm)	DT (mm)	NH	Rend (g planta <sup>-1</sup> )	PPF (g)	NFP	PFA (g)	PSA (g)	PFR (g)
T0	132.29a	17.02a	22.17a	2573.3b	58.62d	43.90c	2384b	371.7b	98.4bc
PVA-Cs-NPs Cu	134.78a	16.79a	22.93a	4134.95a	69.29a	59.70 <sup>a</sup>	3028a	481.4a	175.8a
PVA-Cs	119.71ab	15.04a	20.93a	2690.9b	63.5bc	42.35e	2299b	388.3b	150.4ab
FOL	111.3abc	10.69b	17.02b	2769.66b	52.18e	53.08b	955.75c	211.77c	81.5c
PVA-Cs-NPs Cu+FOL	94.57c	8.83b	16.43b	2360.48b	67.59ab	34.92f	858.5c	143.59c	166.6a
PVA-Cs+FOL	102.02bc	9.11b	17.55b	2605.59b	60.16cd	43.31d	897c	185.56c	141.60ab

Medias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (LSD Fisher,  $p \leq 0.05$ ). T0: Testigo; PVA-Cs-NPs Cu: 500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán- NPs Cu; PVA-Cs: 500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán; FOL: Testigo patógeno; PVA-Cs-NPs Cu+FOL: Patógeno+500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán-NPs Cu; PVA-Cs+FOL: Patógeno+500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán. DT: Diámetro de tallo; NH: Número de hojas; Rend: Rendimiento; PPF: Peso promedio de fruto; NFP: Número

de frutos promedio por planta; PFA: Peso fresco aéreo; PSA: Peso seco aéreo; PFR: Peso fresco de la raíz.

#### Variables de calidad de fruto en plantas de tomate

El efecto del complejo sobre las variables en calidad del fruto es presentado en la Tabla 8. La variable de pH no mostró diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo absoluto. Para la variable SST el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu es estadísticamente igual al T0, en la comparación entre tratamientos PVA-Cs-NPs Cu incrementó 5.58% más el contenido de SST que PVA-Cs. En cuanto a la firmeza en fruto el tratamiento PVA-Cs es estadísticamente igual a T0, en cuanto la comparación entre tratamientos PVA-Cs aumentó la firmeza en un 23.77% en comparación a PVA-Cs-NPs Cu. En el contenido de acidez titulable se presentaron diferencias estadísticas siendo el mejor tratamiento PVA-Cs, con 6.38% y 11.11% más en comparación al T0 y PVA-Cs-NPs Cu. Para la variable vitamina C los tratamientos evaluados mostraron menor contenido que el T0. En cuanto al contenido de licopeno el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu resulto ser estadísticamente igual al T0, en cuanto a la comparación entre tratamientos PVA-Cs-NPs Cu incremento 10.12% más el contenido de licopeno con respecto a PVA-Cs. Para el contenido de fenoles totales se presentaron diferencias siendo el mejor tratamiento PVA-Cs teniendo un aumento del 17.11% y 6.68% en comparación a T0 y PVA-Cs-NPs Cu respectivamente.

La calidad del jugo en tomate está relacionada con menor acidez y mayor contenido de sacarosa y licopeno estos relacionados con la calidad organoléptica del fruto (San Martín-Hernández *et al.*, 2012). El licopeno posee una actividad antioxidante debido a su larga cadena de dobles enlaces conjugados, en los humanos se puede proveer hasta el 85% el aporte diario de este carotenoide, por la ingesta de tomate (Levy & Sharoni, 2004). Hernández-Hernández *et al.* (2018) evaluaron la calidad de fruto aplicando hidrogeles de PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs directo al sustrato, encontrando diferencias estadísticas en el contenido de licopeno siendo el tratamiento hidrogeles de PVA-Cs-NPs Cu diferente al control incrementando el contenido en un 77.19% y comparando entre tratamientos un 63.43% más que los hidrogeles de PVA-Cs, además del contenido de fenoles totales donde ambos tratamientos fueron superiores al control. Por el contrario y en comparación a este ensayo los tratamientos si tuvieron un efecto en el

contenido de vitamina C, en cuanto al contenido de SST no tuvieron diferencias estadísticas significativas a diferencia de este ensayo donde la comparación entre tratamientos demostró un incremento. Pérez-Labrada *et al.* (2019) encontró que con la aplicación foliar de NPs Cu (250 mg L<sup>-1</sup>) se incrementó el contenido de vitamina C, licopeno y fenoles totales en comparación al control. Los resultados sugieren que la aplicación de PVA-Cs- NPs Cu y PVA-Cs tienen un efecto sobre el contenido de los parámetros que definen la calidad de fruto.

En los resultados en plantas inoculadas con FOL, en la variable pH no se presentaron diferencias significativas en comparación a FOL. En la variable SST el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu+FOL es estadísticamente igual al testigo patógeno (FOL), al comparar entre tratamientos el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu+FOL incremento el contenido en un 5.29% en comparación a PVA-Cs+FOL. En cuanto a la firmeza en fruto FOL fue el tratamiento presentó el valor más alto, en la comparación entre tratamientos, PVA-Cs-NPs Cu+FOL incremento la firmeza en un 19.37% con respecto a PVA-Cs+FOL. Para la variable acidez titulable FOL estuvo por encima de los dos tratamientos. Para el contenido de vitamina C se encontraron diferencias estadísticas siendo FOL el mejor tratamiento, para la comparación entre tratamientos PVA-Cs-NPs Cu+FOL incremento el contenido en un 7.77% con respecto a PVA-Cs+FOL. Para la variable licopeno el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu+FOL no tuvo diferencias con respecto a FOL, si comparamos entre tratamientos PVA-Cs-NPs Cu+FOL mostró un aumento del 15.26% con respecto a PVA-Cs+FOL. Para el contenido de fenoles totales se presentaron diferencias estadísticas el tratamiento PVA-Cs+FOL fue mayor en un 12.45% y 6.78% en comparación a PVA-Cs-NPs Cu+FOL y FOL respectivamente.

Se ha demostrado que el Cu genera una respuesta de estrés en las plantas y como resultado de la acumulación de éste en la pared celular empieza la producción de enzimas relacionadas con la vía fenilpropanoide que conduce a la síntesis de lignina, dando como resultado la lignificación de paredes celulares y así incrementando la firmeza en frutos (Kirkby & Römheld, 2008). A medida que los frutos maduran se van incrementando los contenidos de fructosa y glucosa, estos azúcares son los que más contribuyen al contenido de SST. Los cambios en el contenido de SST pueden ser debido a que después de la cosecha la relación entre glucosa/fructosa y ácidos orgánicos

en los tomates después de la cosecha (Klunklin & Savage, 2017). Los cambios en la glucólisis y el ciclo de Krebs pueden derivar en la acumulación de ácido cítrico esto debido a la disminución del ácido málico y fumárico (Oms-Oliu *et al.*, 2011). Pérez-Labrada *et al.* (2019) evaluaron la aplicación foliar NPs Cu (250 mg L<sup>-1</sup>) en plantas de tomate bajo un estrés salino dando como resultado que el tratamiento NPs de Cu incremento el contenido de fenoles totales, vitamina C y licopeno en comparación a la aplicación de 50mM NaCl. López-Vargas *et al.* (2018) evaluaron la aplicación foliar de distintas concentraciones de NPs Cu en plantas de tomate, dando como resultado un aumento en la firmeza (28.19%), vitamina C (121.97%) y fenoles totales (5.43%) con la aplicación de 250 mg L<sup>-1</sup> NPs Cu en comparación al control. El contenido de licopeno se vio incrementado por todas las concentraciones en comparación al control. La acidez titulable se vio afectada con la aplicación de 125 mg L<sup>-1</sup> NPs disminuyendo en comparación al control.

**Tabla 8.** Efecto del complejo PVA-Cs-NPs Cu e inoculación de FOL en la calidad del fruto de tomate.

Tratamientos	pH	SST (°brix)	Firmeza (Kg cm <sup>2</sup> )	Ac. Titulable (% ac. cítrico)	Vit. C (mg ac. ascórbico 100g PF <sup>-1</sup> )	Licopeno (mg 100g PF <sup>-1</sup> )	Fenoles totales (mg EQ ac. gálico 100g PS <sup>-1</sup> )
T0	4.66a	6.05a	3.56bc	0.47ab	15.31ab	11.83a	73.99ab
PVA-Cs-NPs Cu	4.71a	6.24a	2.44c	0.45abc	11.88b	12.62a	68.52b
PVA-Cs	4.64a	5.91ab	3.02bc	0.50a	12.50b	11.46ab	80.25a
FOL	4.46b	5.42bc	5.15a	0.42bc	17.51a	10.61ab	73.21ab
PVA-Cs-NPs Cu+FOL	4.46b	5.37bc	4.19ab	0.38c	14.70ab	9.44ab	69.52b
PVA-Cs+FOL	4.48b	5.10c	3.51bc	0.39c	13.64b	8.19b	78.18a

Medias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (LSD Fisher,  $p \leq 0.05$ ). T0: Testigo; PVA-Cs-NPs Cu: 500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán- NPs Cu; PVA-Cs: 500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán; FOL: Testigo patógeno; PVA-Cs-NPs Cu+FOL: Patógeno+500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán-NPs Cu; PVA-Cs+FOL: Patógeno+500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán. SST: Sólidos Solubles Totales; Ac. titulable. Acidez titulable.

### Actividad enzimática en hojas de tomate

El efecto de la aplicación de los complejos PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs sobre la actividad de enzimas defensivas en hojas de tomate se presenta en la Tabla 9. En la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa en el primer muestreo (trasplante) no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos. Para el segundo muestreo (40 ddt) se encontraron diferencias estadísticas siendo el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu el que mostró un incremento en la actividad en comparación a PVA-Cs (163.93%) y T0 (45.48%). En el tercer muestreo (80 ddt) T0 mostro la mayor actividad enzimática en comparación a los tratamientos.

En la actividad quitinasa, en el primer muestreo (trasplante) no se presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos. Para el segundo muestreo (40 ddt) se presentaron diferencias estadísticas siendo el tratamiento PVA-Cs-NPs Cu el que presento un incremento del 121.02% y 18.05% en comparación a PVA-Cs y T0 respectivamente. Para la evaluación en el tercer muestreo (80 ddt) T0 mostró la mayor actividad enzimática en comparación a los tratamientos.

González Peña *et al.* (2014) encontraron que la aplicación foliar de quitosán ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ) en plántulas de tomate influyó significativamente en el incremento en la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa en hoja. Rodríguez-Pedroso *et al.* (2006) trataron semillas de arroz con soluciones de quitosán en las concentraciones 100, 500 y  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  encontrando un incremento de las enzimas  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasas en las plántulas tratadas con las soluciones de quitosán en comparación al control. La  $\beta$ -1,3 glucanasa cataliza el rompimiento hidrolítico de uno de los principales componentes de la pared celular de hongos fitopatógenos siendo estos los enlaces  $\beta$ -1,3 glucosídico en los  $\beta$ -1,3 glucanos, la actividad de la quitinasa pueden ser inducida mediante estrés físico, químico, por heridas y quitooligosacáridos, esta enzima corta enlaces entre el  $C_1$  y  $C_4$  de dos N-acetilglucosaminas de la quitina que es un componente de la pared celular de algunos hongos fitopatógenos, estas enzimas se asocian a una posible participación en la respuesta a patógenos en plantas ( Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009). En la activación de defensas en las plantas se induce la producción de proteínas antimicrobianas como las quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, estas interacciones están mediadas por la resistencia sistémica adquirida (RSA) mediada por AS y la resistencia sistémica inducida (RSI)

mediada por AJ y ET, los estudios sugieren que las vías de señalización de AJ y ET trabajan juntas de manera cooperativa, mientras que la señalización de AS funciona independiente a estas (Samaniego-Gómez *et al.*, 2017).

En las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, la actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa en el primer (trasplante) y el segundo muestreo (40 ddt) presentó diferencias estadísticas con respecto al testigo patógeno (FOL) siendo FOL el que mostró el mayor incremento de la actividad enzimática. En el tercer muestreo (80 ddt) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

En la actividad de quitinasa en el primer muestreo (trasplante) se presentaron diferencias significativas siendo FOL el que más incremento la actividad. Para el segundo muestreo (40 ddt) el tratamiento PVA-Cs+FOL y FOL no presentaron diferencias estadísticas, con respecto a la comparación entre tratamientos PVA-Cs+FOL incremento la actividad en un 32.25% con respecto a PVA-Cs-NPs Cu+FOL. En el tercer muestreo (80 ddt) no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos.

González Peña *et al.*, (2014) evaluaron la imbibición de semillas de tomate en quitosán y la posterior aplicación foliar a las plántulas para evaluar la actividad enzimática de  $\beta$ -1,3 glucanasas encontrando que el incremento en las hojas asperjadas con quitosán fue superior que cuando se imbibieron las semillas siendo la concentración  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  la que influyó significativamente en el aumento de la actividad a las 96 horas. Con respecto a la eficacia del quitosán en la inducción de la defensa en la planta, en hojas de *Camellia sinensis* aumentó la capacidad de  $\beta$ -1,3-glucanasa en un 29.26%, así como el contenido de peroxidasa (PO) y polifenol oxidasa (PPO) (Chandra *et al.*, 2015). La presencia de  $\beta$ -1,3 glucanasa en las plantas significa un estado de activación de la respuesta de defensa en las plantas, debido a que esta cataliza la hidrólisis del  $\beta$ -1,3 glucano, uno de los principales componentes de la pared celular en los hongos fitopatógenos cita. Los resultados anteriormente presentados sugieren que la aplicación de quitosán puede activar el sistema de defensa en las plantas pero esto pudiera ser determinado por la especie, la concentración, la forma de aplicación del mismo.

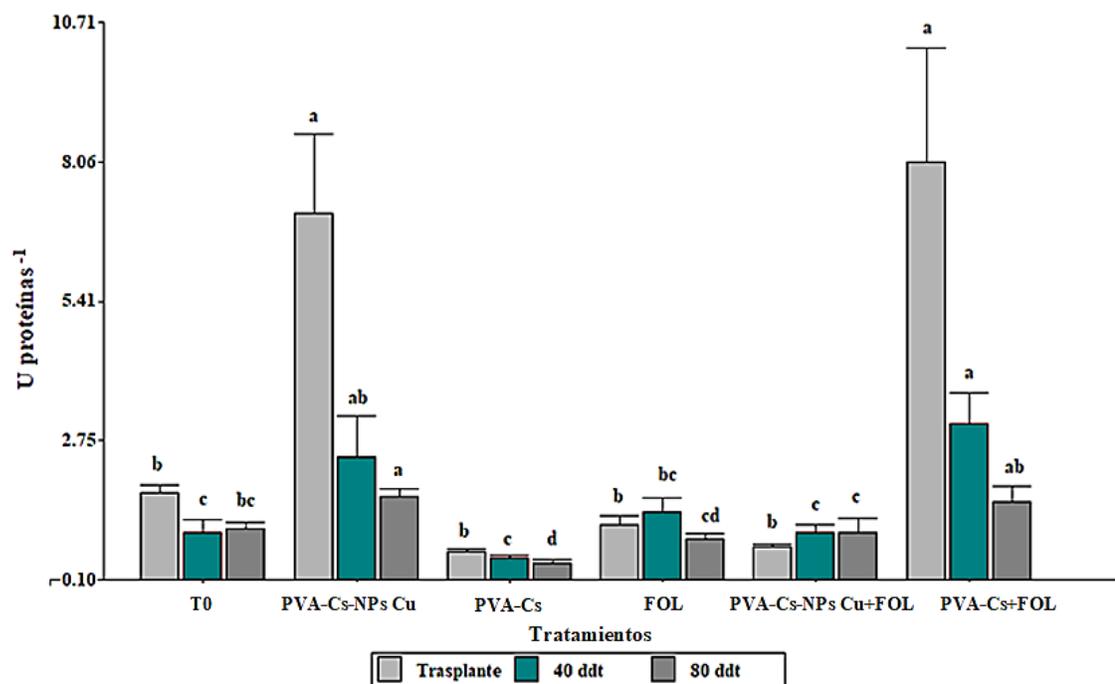
**Tabla 9.** Evolución de la actividad enzimática de hojas de tomate cultivado con el complejo PVA Ct-NPs Cu e inoculadas con FOL.

Tratamiento	$\beta$ -1,3 glucanasa			Quitinasas		
	trasplante	40 ddt	80 ddt	trasplante	40 ddt	80 ddt
T0	13.52b	13.28abc	25.77a	7.11b	6.59ab	12.26ab
PVA-Cs-NPs Cu	9.25b	19.32a	11.66b	7.0b	7.78a	6.28bc
PVA-Cs	7.46b	7.35c	6.73b	4.74b	3.52b	4.06c
FOL	34.21a	14.68ab	26.54a	15.02a	7.20a	14.25a
PVA-Cs-NPs	16.17b	10.73bc	27.32a	7.53b	5.89ab	17.03a
Cu+FOL						
PVA-Cs+FOL	13.78b	11.99bc	27.16a	7.91b	7.79a	14.53a

Medias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes, la prueba de medias se llevó a cabo en forma separada para cada fecha de muestreo (LSD Fisher,  $p \leq 0.05$ ). T0: Testigo; PVA-Cs-NPs Cu: 500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán- NPs Cu; PVA-Cs: 500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán; FOL: Testigo patógeno; PVA-Cs-NPs Cu+FOL: Patógeno+500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán-NPs Cu; PVA-Cs+FOL: Patógeno+500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán. ddt: días después del trasplante; Quitinasas se expresan como U mg g<sup>-1</sup> proteínas totales por peso fresco donde U es igual a la producción de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de glucosa por minuto;  $\beta$ -1,3 glucanasa se expresan como U mg g<sup>-1</sup> proteínas totales por peso fresco donde U es igual a la producción de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de glucosa por minuto.

En la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) en el primer muestreo (trasplante) se presentaron diferencias estadísticas significativas, PVA-Cs-NPs Cu mostró un incremento siendo 301.70% más que el T0 (Figura 4). A los 40 ddt se presentó la misma tendencia PVA-Cs-NPs Cu incrementó la actividad PAL por encima de T0 y PVA-Cs en un 141.58% y 369.23% respectivamente. La actividad a los 80 ddt se incrementó de igual forma con PVA-Cs-NPs Cu siendo superior a T0 y PVA-Cs en un 55.04% y 293.02% respectivamente. El primer muestreo fue al momento del trasplante y dos días posteriores a la primera aplicación, esto sugiere que la aplicación del complejo activa la enzima PAL en su máximo nivel. Hernández-Hernández *et al.* (2018) en un ensayo con plantas de tomate aplicaron hidrogeles de PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs encontrando que el tratamiento hidrogeles de PVA-Cs disminuía la actividad de la enzima PAL y el tratamiento de hidrogeles de PVA-Cs-NPs Cu incrementaba la actividad de PAL en fruto un 62.05% con respecto al control. González Peña *et al.* (2014) reportan que al asperjar quitosán (100 mg L<sup>-1</sup>) en plántulas de tomate a las 96 hrs se registró un pico de

actividad de PAL con respecto al testigo, la importancia de esta enzima radica en que es clave para la síntesis de fenilpropanoides, que está relacionado con la síntesis de lignina, compuestos fenólicos y el reforzamiento de las paredes celulares (Umezawa, 2010). Chandra *et al.*, (2015) evaluaron NPs Cs en *Camellia sinensis* con el fin de determinar un incremento en la actividad de enzimas de defensa encontrando que con la aplicación de NPs Cs se logró un aumento significativo en la acumulación de PO, PPO y PAL (4, 3.5 y 2 veces respectivamente) en comparación al testigo. Esto sugiere que el quitosán puede disminuir la actividad de PAL en plantas sanas de tomate, pero al ser combinado con NPs de Cu puede inducir la actividad. El quitosán y las NPs son conocidos como inductores potenciales para mejorar la respuesta de defensa en las plantas ya sea a un estrés biótico o abiótico y esto da como resultado una acumulación de metabolitos relacionados con la defensa esto debido a la expresión de genes relacionados con la tolerancia (El Hadrami *et al.*, 2010; Usman *et al.*, 2020).



**Figura 4.** Actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa en plantas de tomate con la aplicación de PVA-Cs-NPs Cu, PVA-Cs e inoculadas con FOL (Medias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes, la prueba de medias se llevó a cabo en forma separada para cada fecha de muestreo (LSD Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

El efecto de la aplicación de PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* sobre la actividad de PAL se muestra en la Figura 4. Al

trasplante se presentaron diferencias significativas siendo PVA-Cs+FOL el mejor tratamiento superior a FOL y PVA-Cs-NPs Cu+FOL incrementando la actividad en un 593.10% y 972% respectivamente siendo estos dos estadísticamente iguales. A los 40 ddt PVA-Cs+FOL tuvo la misma tendencia incrementando la actividad de PAL respecto a FOL y PVA-Cs-NPs Cu+FOL en un 120.71% y 205.94% respectivamente. La actividad a los 80 ddt siguiendo la misma tendencia que a los 40 ddt PVA-Cs+FOL incrementó los valores superando a FOL y PVA-Cs-NPs Cu+FOL en un 79.77% y 58.41% respectivamente.

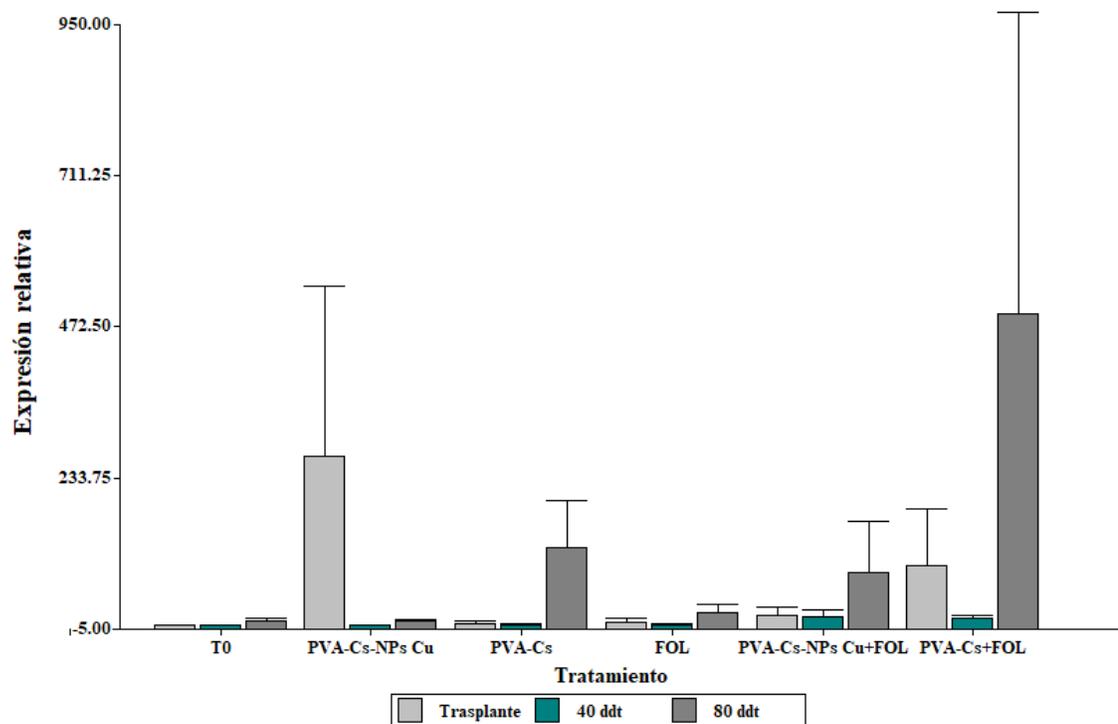
Algo similar reportaron Hernández-Hernández *et al.*, (2018) quienes aplicaron hidrogeles de PVA-Cs-NPs Cu e hidrogeles de PVA-Cs en condiciones de estrés salino y encontraron que al evaluar los contenidos de PAL en fruto la actividad disminuía con el tratamiento hidrogeles de PVA-Cs-NPs Cu bajo estrés salino, sin embargo, con el tratamiento hidrogeles de PVA-Cs incrementaba la actividad de PAL. Rodríguez-Pedroso *et al.*, (2006) encontraron que al aplicar quitosán en plantas de arroz inoculadas con y sin la inoculación de un patógeno, la actividad de PAL se incrementaba al combinar la inoculación del patógeno y la aplicación de quitosán ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), la actividad de PAL se incrementaba en comparación a las plantas que solo eran tratadas con la aplicación de quitosán, el testigo infectado y el testigo sin infectar. Esta enzima está directamente involucrada en la síntesis de ácido salicílico por la vía del ácido benzoico, se considera importante como una señal en la activación de la resistencia sistémica adquirida RSA frecuentemente observada en la interacción planta-patógeno (Días, 2012). Se ha reportado la presencia de quitina en la pared celular de algunos hongos fitopatógenos como es el caso de *Fusarium solani*, el quitosán al ser un derivado de la quitina podría generar la señal en las plantas similar al ataque por patógenos y potencializar la vía de señalización de respuesta de defensa (Paz-Lago *et al.*, 1999; A. T. Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009; Yalpani *et al.*, 1993).

#### Expresión del gen PR1

Los resultados obtenidos en la expresión del gen PR1 se muestran en la Figura 5. El gen PR1 mostro cambios en su expresión debido a la aplicación de los tratamientos. PVA-Cs-NPs Cu aumento la expresión del gen PR1 (268.3, 0.7 y 8 veces respectivamente en comparación con T0) al trasplante, 40 y 80 ddt, siendo este tratamiento el que también

incremento la actividad de PAL en hoja. PVA-Cs incremento la expresión del gen PR1 (3.9, 1.5 y 123.2 veces respectivamente) al trasplante, 40 y 80 ddt en comparación al T0. Esto sugiere que PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs podrían jugar un papel importante en la señalización de transducción que conduce a la activación de genes que codifican a la producción de proteínas PR, relacionadas con la vía de señalización del ácido salicílico y la RSA ligada a la respuesta al estrés (AbuQamar *et al.*, 2009). Por el contrario Hernández-Hernández *et al.*, (2018) quienes en un ensayo aplicaron hidrogeles de PVA-Cs-NPs Cu en plantas de tomate se encontraron que éstos reprimían la expresión del gen PR1 a los 20 y 23 ddt. Abriendo la pauta para determinar que la forma y la presentación en la que son aplicados los complejos PVA-Cs-NPs Cu podrían dar diferentes resultados en cuanto a la señalización en las plantas de tomate.

El efecto de la aplicación de PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* sobre la expresión del gen PR1 se muestra en la Figura 5. FOL (testigo patógeno) incremento la expresión del gen PR1 3.9, 1.5 y 20.3 veces más con respecto al T0 (trasplante, 40 ddt y 80 ddt respectivamente). El tratamiento PVA-Cs-NPs Cu+FOL aumento la expresión del gen PR1 16.4, 14.1 y 84.5 veces más en comparación a T0 (trasplante, 40 ddt y 80 ddt respectivamente). PVA-Cs+FOL mostro cambios en la expresión el gen PR1 (94.6, 11.9 y 492.5 veces más respectivamente) al trasplante, 40 y 80 ddt con respecto al T0, tomando en cuenta que este tratamiento fue el que mostró el mayor incremento en la actividad de PAL en hojas en las plantas inoculadas con *F. oxysporum*. FOL expresó el gen PR1, pero si se compara con PVA-Cs-NPs Cu+FOL y PVA-Cs+FOL estos indujeron un mayor incremento en las veces que se expresó el gen PR1. Hernández-Hernández *et al.*, (2018) aplicaron hidrogeles PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs en tomates bajo condiciones de estrés salino encontrando que los tratamientos suprimieron el gen PR1, pero incrementaban la expresión del gen JA relacionado con la vía octadecanoide de los jasmonatos y esta mediada por la resistencia sistémica inducida (RSI) relacionada con el estrés abiótico. Estos resultados arrojan que los complejos PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs pueden mediar tanto la expresión de genes PR1 y JA en plantas de tomate bajo estrés biótico o abiótico, que ayudaran a la planta a tolerar los efectos del estrés, ya sea por la vía del ácido salicílico (RSA) o la vía del ácido jasmónico (RSI).



**Figura 5.** Expresión relativa del gen PR1 en hojas de tomate tratadas con PVA-Cs-NPs Cu, PVA-Cs e inoculadas con FOL, al trasplante, 40 ddt y 80 ddt. Los datos representan la media geométrica  $\pm$  error estándar. El cálculo de las medias se llevó a cabo en forma separada por cada fecha de muestreo y para todos los tratamientos.

### Severidad e incidencia

Los resultados de la evaluación de severidad e incidencia en plantas de tomate inoculadas con FOL son presentados en la Tabla 10. No se presentaron diferencias estadísticas significativas para estas variables. Saharan & Pal (2016), describen dos mecanismos como las posibles interacciones que tienen el quitosán con el patógeno y su posible actividad antifúngica, uno lo denominan como directo que consiste en la interacción del quitosán con las superficies celulares del patógeno y quelación de metales esto conduce a una inactivación de la membrana plasmática a mayor permeabilidad y a la fuga de sustancias intercelulares del patógeno, para el caso específico de este ensayo los tratamientos usados no estuvieron en contacto directo con el patógeno pues el modo de aplicación fue foliar y el mecanismo de infección del patógeno es vía radicular, el segundo mecanismo lo denominan como indirecto en donde el quitosán actúa como un elicitador activando los mecanismos de defensa en la planta,

dando como resultado la acumulación de metabolitos secundarios y el refuerzo de la pared celular de la planta. El segundo mecanismo es el que podría explicar la interacción en este ensayo del quitosán-planta-patógeno activando el mecanismo de defensa de la planta, el tratamiento PVA-Cs+FOL presentó una disminución en la severidad del 3.16% en comparación del tratamiento PVA-Cs-NPs Cu+FOL. En la incidencia las plantas mostraron los síntomas característicos de la enfermedad como hojas cloróticas, reducción del crecimiento, folíolos pequeños y marchitez, el tratamiento PVA-Cs+FOL disminuyó la incidencia en un 3.15% en comparación al tratamiento PVA-Cs-NPs Cu+FOL. En cuando a la severidad se mostraron variaciones a lo largo de las aplicaciones, no se presentaron diferencias significativas en comparación al testigo.

**Tabla 10.** Incidencia y severidad de síntomas en plantas de tomate infectadas con FOL en la prueba *in vivo* (Escala Diener & Ausubel, 2005).

Tratamiento	Incidencia (%)	Severidad
FOL	96 a	46.00 a
PVA-Cs-NPs Cu+FOL	98 a	55.25 a
PVA-Cs+FOL	95 a	53.50 a

Medias con diferente letra por columna son estadísticamente diferentes (LSD Fisher,  $p \leq 0.05$ ). FOL: Testigo patógeno; PVA-Cs-NPs Cu+FOL: Patógeno + 500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán-NPs Cu; PVA-Cs+FOL: Patógeno + 500 mg L<sup>-1</sup> de PVA-quitosán.

Rodríguez-Romero *et al.* (2019) evaluaron el efecto de quitosán y extractos de *Pseudomonas fluorescens in vitro* e *in vivo* sobre *Alternaria alternata* en plantas de tomate, encontrando un efecto inhibitorio del crecimiento micelial en la prueba *in vitro* en todas las concentraciones usadas de Cs 0.5, 1.0, y 1.5% (p/v) respectivamente, por el contrario para la prueba *in vivo* donde no se presentaron diferencias estadísticas significativas en comparación con el testigo, mencionando que para lograr mayores niveles de efectividad del control de la enfermedad se debe combinar la aplicación de varios productos de control. El uso de dos o más productos de control puede exhibir varios o distintos mecanismos de control dando lugar a efectos variables.

## CONCLUSIONES

La inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum* con la aplicación del complejo PVA-Cs-NPs Cu mostró un efecto antifúngico, disminuyendo el desarrollo e inhibiendo el crecimiento micelar.

En plántulas de tomate la aplicación foliar de PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs no mostró ningún efecto de fitotoxicidad en el desarrollo de las plántulas. Al contrario, los complejos promovieron el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

El complejo PVA-Cs-NPs Cu promovió el incremento de parámetros relacionados con el vigor y el rendimiento de las plantas de tomate. En plantas inoculadas con *F. oxysporum*, la aplicación foliar del complejo PVA-Cs-NPs Cu incrementó el peso promedio de frutos y peso fresco de raíz. Sin embargo, las plantas inoculadas con *F. oxysporum* y con la aplicación de PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs no mostraron un efecto sobre la severidad e incidencia de la enfermedad.

En la calidad nutracéutica de frutos, el tratamiento PVA-Cs mejoró el contenido fenoles totales.

La aplicación foliar de PVA-Cs-NPs Cu incrementó la actividad de PAL con respecto al testigo, al igual que el complejo PVA-Cs en las plantas infectadas con FOL.

Los complejos PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs incrementaron la expresión del gen PR1 en plantas de tomate con y sin la inoculación de FOL.

El presente estudio sugiere que los complejos PVA-Cs-NPs Cu y PVA-Cs estimulan el crecimiento y desarrollo en las plantas, incrementan el contenido de enzimas defensivas, así como la sobreexpresión de un gen relacionado con la respuesta de defensa en las plantas.

## REFERENCIAS

- AbuQamar, S., Luo, H., Laluk, K., Mickelbart, M. V., & Mengiste, T. (2009). Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *The Plant Journal*, *58*(2), 347–360.
- Adhikari, T., Kundu, S., Biswas, A. K., Kundu, S., Tarafdar, J. C., & Rao, A. S. (2012). Effect of Copper Oxide Nano Particle on Seed Germination of Selected Crops. *Journal of Agricultural Science and Technology A Journal of Agricultural Science and Technology*, *2*(May 2014), 815–823. <https://www.researchgate.net/publication/262178472>
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology 5th Edition: Elsevier Academic Press. *Burlington, Ma. USA*, 79–103.
- Agropecuarias, C. (2014). *Mecanismos de Resistencia Sistémica en Plantas Mónica Yadira Dotor Robayo I , Marco Cabezas Gutiérrez I I*. 1–19.
- Aguilar-Tapia, A., & Zanella, R. (2017). Las nanopartículas bimetálicas y algunas de sus aplicaciones. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, *10*(19), 72–92.
- Asli, S., & Neumann, P. M. (2009). Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell & Environment*, *32*(5), 577–584.
- Betancourt-Galindo, R., Reyes-Rodríguez, P. Y., Puente-Urbina, B. A., Avila-Orta, C. A., Rodríguez-Fernández, O. S., Cadenas-Pliego, G., Lira-Saldivar, R. H., & García-Cerda, L. A. (2014). Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *Journal of Nanomaterials*, *2014*.
- Borboa Flores, J., Rueda Puente, E. O., Acedo Félix, E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo Juárez, O., & García Ortega, A. M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *32*(4), 319–326.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248—254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Camarena-Gutiérrez, G., & Torre-Almaráz, R. de la. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, *13*(2), 157–162.
- Champion, G. T. (2000). Bright and the field scale evaluations herbicides tolerant. *GM*

*Trials. AICC Newslwttter*, 7.

- Chandra, S., Chakraborty, N., Dasgupta, A., Sarkar, J., Panda, K., & Acharya, K. (2015). Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific Reports*, 5.
- Chemists, A. of O. A. (1990). *Official Methods of Analysis: Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement* (Vol. 15). Association of Official Analytical Chemists.
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212.
- De Granada, E. G., De Amezquita, M. C. O., Mendoza, G. R. B., & Zapata, H. A. V. (2001). Fusarium oxysporum el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7–25.
- Días, L. (2012). Systemic Acquired Resistance Induced By Salicylic Acid Resistência Sistêmica Adquirida. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol 10 No. 2 (257 - 267)*, 10(2), 257–267.
- Diener, A. C., & Ausubel, F. M. (2005). RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics*, 171(1), 305–321.
- Doshi, R., Braidia, W., Christodoulatos, C., Wazne, M., & O'Connor, G. (2008). Nano-aluminum: transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. *Environmental Research*, 106(3), 296–303.
- Du, W.-L., Niu, S.-S., Xu, Y.-L., Xu, Z.-R., & Fan, C.-L. (2009). Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 385–389.
- Durá Romero, M. (2019). *Incorporación de ácidos fenólicos en films activos de poli-vinil alcohol obtenidos por termoprocesado*.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8(4), 968–987. <https://doi.org/10.3390/md8040968>
- Etxeberria, E., Gonzalez, P., Baroja-Fernandez, E., & Romero, J. P. (2006). Fluid phase endocytic uptake of artificial nano-spheres and fluorescent quantum dots by sycamore cultured cells: evidence for the distribution of solutes to different intracellular compartments. *Plant Signaling & Behavior*, 1(4), 196–200.
- FIRA. (2016). Panorama Agroalimentario: Tomate rojo. *Panorama Alimentario*, 35. <https://doi.org/10.2113/JEEG11.3.197>

- Fish, W. W., Perkins-Veazie, P., & Collins, J. K. (2002). A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*(3), 309–317.
- García, M. S., & Ruíz, M. G. (2005). Las MAP cinasas: Elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *Revista de Educación Bioquímica*, *24*(1), 4–11.
- González Peña, D., Costales, D., & Falcón, A. B. (2014). Influencia de un polímero de quitosana en el crecimiento y la actividad de enzimas defensivas en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, *35*(1), 35–42.
- Gutiérrez Tlahque, J., Sáenz, S., Olovaldo, Y., Hernández Fuentes, A. D., Pinedo Espinoza, J. M., López Buenabad, G., & López Palestina, C. U. (2019). Influencia de los métodos de cocción sobre la actividad antioxidante y compuestos bioactivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Nova Scientia*, *11*(22), 53–68.
- Hernández-Hernández, H., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., & Juárez-Maldonado, A. (2018). Effects of chitosan–PVA and Cu nanoparticles on the growth and antioxidant capacity of tomato under saline stress. *Molecules*, *23*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010178>
- Hernández-Hernández, H., Juárez-Maldonado, A., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Sánchez-Aspeytia, D., & González-Morales, S. (2018). Chitosan-PVA and copper nanoparticles improve growth and overexpress the SOD and JA genes in tomato plants under salt stress. *Agronomy*, *8*(9), 175.
- Hernández, H. H., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortiz, H., Hernández-Fuentes, A. D., & Juárez-Maldonado, A. (2017). Cu Nanoparticles in chitosan-PVA hydrogels as promoters of growth, productivity and fruit quality in tomato. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *29*(8), 573–580. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-08-1127>
- Hernández Martínez, R., López Benítez, A., Borrego Escalante, F., Espinoza Velázquez, J., Sánchez Aspeytia, D., Maldonado Mendoza, I. E., & López Ochoa, L. A. (2014). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *5*(7), 1169–1178.
- Jaiswal, M., Chauhan, D., & Sankararamkrishnan, N. (2012). Copper chitosan nanocomposite: synthesis, characterization, and application in removal of organophosphorous pesticide from agricultural runoff. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(6), 2055–2062.
- Jaramillo Noreña, J. E., Rodríguez, V. P., Gil Vallejo, L. F., García Muñoz, M. C., Hío, J. C., Quevedo Garzón, D., Sánchez León, G. D., Aguilar Aguilar, P. A., Pinzón Perdomo, L. M., & Cuartas, Z. (2012). *Tecnología para el cultivo del tomate bajo condiciones protegidas*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria,

Bogotá (Colombia).

- Juárez Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Pérez-Labrada, F., cadenas-pliego, G., & Benavides-Mendoza, A. (2016). Cu Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological, production, and quality characteristics of tomato. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89, 183–189. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.023>
- Kirkby, E., & Römheld, V. (2008). Introducción. *Micronutrientes En La Fisiología de Las Plantas: Funciones, Absorción y Movilidad (Versión En Español)*, 6. [http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/3FA84D0333FEDEAA852579A0006BF733/\\$FILE/Micronutrientes en la Fisiología de las Plantas.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/3FA84D0333FEDEAA852579A0006BF733/$FILE/Micronutrientes%20en%20la%20Fisiología%20de%20las%20Plantas.pdf)
- Klunklin, W., & Savage, G. (2017). Effect on quality characteristics of tomatoes grown under well-watered and drought stress conditions. *Foods*, 6(8), 56.
- Kumari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 407(19), 5243–5246.
- Laredo Alcalá, E. I., Martínez Hernández, J. L., Iliná, A., Guillen Cisneros, L., & Hernández Castillo, F. D. (2017). Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(3), 673–683.
- Lee, W.-M., An, Y.-J., Yoon, H., & Kweon, H.-S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants Mung Bean (*Phaseolus radiatus*) and Wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 27, 1915–1921. <https://doi.org/10.1897/07-481.1>
- Levy, J., & Sharoni, Y. (2004). functions of tomato lycopene and its role in human health. In *HerbalGram*.
- Lin, D., & Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5580–5585.
- Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hudson, J. S., Reid, M. L., Ratnikova, T. A., Rao, A. M., Luo, H., & Ke, P. C. (2009). Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small*, 5(10), 1128–1132.
- Lira Saldivar, R. H., Méndez Argüello, B., Villarreal, S., & Vera Reyes, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*, 28(2), 9–24.
- López-Palestina, C. U., Aguirre-Mancilla, C. L., Ramirez-Pimentel, J. G., Raya-Pérez, J. C., Tlahque, J. G., Jiménez-Alvarado, R., Hernández-Fuentes, A. D., & Tulancingo,

H. (n.d.). CONTENIDO DE LICOPENO,  $\beta$ -CAROTENO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN ENCAPSULADOS DE JUGO DE TOMATE. *CUARTO CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROPECUARIA MEMORIA CIENTÍFICA PRIMERA EDICIÓN*, 43.

- López-Vargas, E. R., Ortega-Ortíz, H., Cadenas-Pliego, G., de Alba Romenus, K., Cabrera de la Fuente, M., Benavides-Mendoza, A., & Juárez-Maldonado, A. (2018). Foliar application of copper nanoparticles increases the fruit quality and the content of bioactive compounds in tomatoes. *Applied Sciences*, 8(7), 1020.
- López Enrique, Herrera Marco, L. M. (2017). Agrícola Nacional JITOMATE. *Planeación Agrícola Naional 2017-2030*, 2–20.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3053–3061. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>
- Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*, 12(18).
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Nge, K. L., Nwe, N., Chandkrachang, S., & Stevens, W. F. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science*, 170(6), 1185–1190.
- Oms-Oliu, G., Hertog, M., Van de Poel, B., Ampofo-Asiama, J., Geeraerd, A. H., & Nicolai, B. M. (2011). Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 62(1), 7–16.
- Padayatt, S. J., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, P. K., Song, J., Koh, W. S., & Levine, M. (2001). Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. *Handbook of Antioxidants*. CRC Press. Washington, DC, USA, 117–145.
- Padilla-Vaca, F., Mendoza-Macías, C. L., Franco, B., Anaya-Velázquez, F., Ponce-Noyola, P., & Flores-Martínez, A. (2018). El mundo micro en el mundo nano: importancia y desarrollo de nanomateriales para el combate de las enfermedades causadas por bacterias, protozoarios y hongos. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 11(21), 15–27.
- Palacio, M. N. M., López, G. E., Astudillo, Á. R. M., Masache, B. R. S., Castillo, Á. M. J., & Milián-García, Y. (2014). Caracterización morfológica y evaluación de resistencia a *Fusarium oxysporum* en especies silvestres del género *Solanum*

sección Lycopersicon. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 62–73.

- Panwar, J. (2012). Positive effect of zinc oxide nanoparticles on tomato plants: A step towards developing nano-fertilizers. *International Conference on Environmental Research and Technology (ICERT)*.
- Paz-Lago, D., Cabrera, G., Ramírez, M. A., Pombo, R., & Gutiérrez, A. (1999). *Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-Fusarium oxysporum fsp lycopersicii a nivel de bioensayo*.
- Pérez-de-Luque, A. (2017). Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture? *Frontiers in Environmental Science*, 5, 12.
- Pérez-Labrada, F., López-Vargas, E. R., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., & Juárez-Maldonado, A. (2019). Responses of tomato plants under saline stress to foliar application of copper nanoparticles. *Plants*, 8(6), 151.
- Pestovsky, Y. S., & Martínez-Antonio, A. (2017). The use of nanoparticles and nanoformulations in agriculture. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(12), 8699–8730. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.15041>
- Pinedo-Guerrero, Z. H., Delia Hernández-Fuentes, A., Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., Cadenas-Pliego, G., & Juárez-Maldonado, A. (2017). Cu nanoparticles in hydrogels of chitosan-PVA affects the characteristics of post-harvest and bioactive compounds of jalapeño pepper. *Molecules*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/molecules22060926>
- Pradhan, S., Patra, P., Mitra, S., Dey, K. K., Basu, S., Chandra, S., Palit, P., & Goswami, A. (2015). Copper nanoparticle (CuNP) nanochain arrays with a reduced toxicity response: A biophysical and biochemical outlook on *Vigna radiata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2606–2617.
- Prasad, R., Kumar, M., & Kumar, V. (2017). *Nanotechnology: an agricultural paradigm*. Springer.
- Prasad, T., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., Sreeprasad, T. S., Sajanlal, P. R., & Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6), 905–927.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339(16), 2693–2700.
- Quintili, M. (2012). Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. *Cuadernos Del Centro de Estudios En Diseño y Comunicación. Ensayos*, 42, 125–155.

- Rajput, V. D., Minkina, T., Suskova, S., Mandzhieva, S., Tsitsuashvili, V., Chaplign, V., & Fedorenko, A. (2018). Effects of Copper Nanoparticles (CuO NPs) on Crop Plants: a Mini Review. *BioNanoScience*, 8(1), 36–42. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0466-3>
- Ramos, S. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Castro, E. M., Ávila, F. W., & Carvalho, G. S. (2010). *Selenium Lettuce*. 2010(12), 584–588.
- Rejeb, I. Ben, Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458–475.
- Robles, F. K. C., & Cantú, A. M. (2017). Nanoplaguicidas, ¿un verdadero avance para la agricultura? *Revista Bio Ciencias*, 4(3), 164–178.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebato, M. A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L., & Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades Químico-Estructurales Y Actividad Biológica De La Quitosana. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307–317.
- Rodríguez-Pedroso, Aída Tania, Ramírez-Arrebato, M. Á., Cárdenas-Travieso, R. M., Falcón-Rodríguez, A., & Bautista-Baños, S. (2006). Efecto de la Quitosana en la Inducción de la Actividad de Enzimas Relacionadas con la Defensa y Protección de Plántulas de Arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 1–7.
- Rodríguez-Romero, V. M., Villanueva-Arce, R., Trejo-Raya, A. B., & Bautista-Baños, S. (2019). Quitosano y extractos de *Pseudomonas fluorescens* para el control de *Alternaria alternata* en jitomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(2).
- Rodríguez Guillén, A., Alcántar González, E. G., Ramos, M., Ramos, C., Zaseso, J., & Gálvis Spínola, A. (2006). *Injerto y composta para la producción intensiva de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en condiciones de suelo y cultivo sin suelo en invernadero*. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edafología.
- Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S. S., & Pal, A. (2013). Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>
- Saharan, V., & Pal, A. (2016). *Chitosan based nanomaterials in plant growth and protection*. Springer.
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., & Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346–353.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>

- Samaniego-Gómez, B., Reyes-Ramírez, A., Moreno-Valenzuela, O., & Tun-Suárez, J. (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Revista de Protección Vegetal*, 32(1), 10–22.
- San Martín-Hernández, C., Ordaz-Chaparro, V. M., Sánchez-García, P., Beryl Colinas-Leon, M. T., & Borges-Gómez, L. (2012). Calidad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido en hidroponía con diferentes granulometrías de tezontle. *Agrociencia*, 46(3), 243–254.
- Sathiyabama, M., & Parthasarathy, R. (2016). Biological preparation of chitosan nanoparticles and its in vitro antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. *Carbohydrate Polymers*, 151, 321–325.
- Schymura, S., Fricke, T., Hildebrand, H., & Franke, K. (2017). Elucidating the role of dissolution in CeO<sub>2</sub> nanoparticle plant uptake by smart radiolabeling. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(26), 7411–7414.
- Shah, V., & Belozerova, I. (2009). Influence of Metal Nanoparticles on the Soil Microbial Community and Germination of Lettuce Seeds. *Water, Air, and Soil Pollution*, 197, 143–148. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9797-6>
- Sharma, P. (2019). Nanotechnology: An alternative approach to improve seed quality. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 1492–1496.
- Shende, S., Ingle, A. P., Gade, A., & Rai, M. (2015). Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn.(Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 865–873.
- Sierra-Ávila, R., M., P., cadenas-pliego, G., Avila-Orta, C., Betancourt, R., Jiménez-Regalado, E., Jiménez-Barrera, R., & Martinez, G. (2014). Synthesis of Copper Nanoparticles Coated with Nitrogen Ligands. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/361791>
- Sierra-Ávila, R., Pérez-Alvarez, M., Valdez-Garza, J., Avila-Orta, C. A., Jiménez-Regalado, E. J., Mata-Padilla, J. M., Soto-Castruita, E., & Cadenas-Pliego, G. (2018). Synthesis and thermomechanical characterization of nylon 6/Cu nanocomposites produced by an ultrasound-assisted extrusion method. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2018.
- Stampoulis, D., Sinha, S. K., & White, J. C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology*, 43(24), 9473–9479.
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*, 15(2), 134–154.

<https://doi.org/10.1007/BF01347224>

- Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M. R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., Łojkowska, E., & Chinou, I. (2012). Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 48(5), 555–564. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9443-2>
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 31(1), 85–86.
- Umezawa, T. (2010). The cinnamate/monolignol pathway. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 1–17.
- USDA, U. S. (1991). Standards for Grades of Fresh Tomatoes. *USDA. USDA, Agr. Mktg. Serv., Mktg. Serv, Washington, DC.*
- Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S. A., Rehman, H. ur, Ashraf, I., & Sanauallah, M. (2020). Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. *Science of the Total Environment*, 721, 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>
- Viet, P. Van, Nguyen, H. T., Cao, T. M., & Hieu, L. Van. (2016). *Fusarium* antifungal activities of copper nanoparticles synthesized by a chemical reduction method. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205.
- Vincent, J. M. (1947). The esters of 4-hydroxybenzoic acid and related compounds. Part I. Methods for the study of their fungistatic properties. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 66(5), 149–155.
- Xing, K., Shen, X., Zhu, X., Ju, X., Miao, X., Tian, J., Feng, Z., Peng, X., Jiang, J., & Qin, S. (2016). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 830–836.
- Yalpani, N., León, J., Lawton, M. A., & Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology*, 103(2), 315–321.
- Yang, W., Fortunati, E., Bertoglio, F., Owczarek, J. S., Bruni, G., Kozanecki, M., Kenny, J. M., Torre, L., Visai, L., & Puglia, D. (2018). Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin

nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *181*, 275–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.084>

- Yang, W., Owczarek, J. S., Fortunati, E., Kozanecki, M., Mazzaglia, A., Balestra, G. M., Kenny, J. M., Torre, L., & Puglia, D. (2016). Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. *Industrial Crops and Products*, *94*, 800–811. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.061>
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., & Yoshida, S. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *20*(6), 1678–1692.
- Yu, Z., & Dahlgren, R. A. (2000). Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Journal of Chemical Ecology*, *26*(9), 2119–2140.
- Zhao, L., Sun, Y., Hernandez-Viezcas, J. A., Servin, A. D., Hong, J., Niu, G., Peralta-Videa, J. R., Duarte-Gardea, M., & Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Influence of CeO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: a life cycle study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(49), 11945–11951.
- Zhu, H., Han, J., Xiao, J. Q., & Jin, Y. (2008). Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring*, *10*(6), 713–717.