

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS



Actividad de enzimas y expresión de genes en plantas de lechuga relacionados a la tolerancia a *bremia lactucae* con la aplicación de nanoquitosán-yodo

Por:

LENICA MERCEDES LÓPEZ LÓPEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Mayo, 2025.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Actividad de enzimas y expresión de genes en plantas de lechuga relacionados a la tolerancia a *Bremia lactucae* con la aplicación de nanoquitosán-yodo

Por:

LENICA MERCEDES LÓPEZ LÓPEZ

TESIS

Que se somete la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:

M.C. Carlos Alberto García Agustince
Presidente

Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Vocal

Dra. Susana González Morales

Dra. Hortensia Ortega Ortiz
Vocal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Mayo, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Actividad de enzimas y expresión de genes en plantas de lechuga relacionados
a la tolerancia a *Bremia lactucae* con la aplicación de nanoquitosán-yodo

Por:

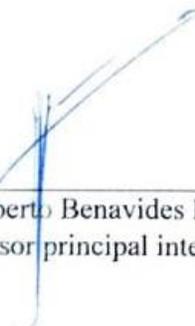
LENICA MERCEDES LÓPEZ LÓPEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el comité de asesoría:



Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor principal interno



Dra. Hortensia Ortega Ortiz
Asesor principal externo



Dra. Susana González Morales
Coasesor



M.C. Carlos Alberto García Agustince
Coasesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Mayo, 2025

Derechos de autor y declaración de no plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos: Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor. Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Autor principal



Lenica Mercedes López López

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por permitirme seguir, sobre todo guiarme en los momentos más difíciles y darme la fortaleza para salir adelante.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, que me ha dado la oportunidad de pertenecer en esta casa de estudios, por brindarme las herramientas necesarias, y adquirir nuevos conocimientos para desarrollarme profesionalmente.

Al **CONAHCYT** por el apoyo económico a través del proyecto de Ciencia Básica A1-S-20923 para la realización de este trabajo de tesis.

A la **Dra. Susana Gonzáles Morales**, por su dedicación, paciencia, y por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, y sobre todo por transmitirme sus conocimientos para culminar este proyecto.

A mis padres **Dionicio López Hernández y Leopoldina López López**, por su apoyo incondicional, por estar en los momentos más difíciles de mi vida, ellos que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas.

DEDICATORIA

A mis padres: **Dionicio y Leopoldina** a quienes admiro y son mi ejemplo a seguir, a ellos les debo a cada uno de mis éxitos logrados, que me han facilitado el camino sin importar lo difícil que fuese. Gracias a sus cuidados, y consejos me han permitido permanecer fuerte.

A mis hermanos, **Rosy, Luis, Laura, Clara, Nereyda, Catalina**, que son parte fundamental en la culminación de mi carrera, por su apoyo incondicional, siempre dispuestos, ellos que han sido mis consejeros de vida, gracias a sus experiencias vividas me han forjado como una persona de bien.

A mis sobrinos: **Alisson, Sofía, Dilan, Jade**, que me alegran los días, y experimentar un amor bonito y sincero.

A mis cuñados **Martha y Fredy** por ofrecerme una amistad sincera, leal, y que me han motivado a culminar mi etapa académica siempre de la mejor manera.

A mis amigas;

Shadey que me ha ofrecido una amistad sincera, por permitirme formar parte de su vida, y recibiendo un apoyo constante, que me han ayudado a seguir cada día.

Mónica y Yaquin por permitirme aprender más de la vida a su lado, y por los momentos inolvidables,

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general	3
1.1.1	Objetivos específicos.....	3
1.2	Hipótesis.....	3
II.	REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1	Cultivo de lechuga y producción en México.....	4
2.1.1	Importancia económica	5
2.1.2	Consumo de lechuga	5
2.1.3	Características del cultivo	6
2.2	Estrés en plantas	6
2.2.1	Estrés abiótico	7
2.2.2	Estrés biótico.....	8
2.3	Plagas y enfermedades que presenta la lechuga.....	9
2.3.1	Plagas	9
2.3.2	Enfermedades.....	10
2.4	<i>Bremia lactucae</i>	11
2.4.1	Síntomas	11
2.4.2	Importancia económica	11
2.4.3	Alternativas para su control.....	12
2.5	Uso de bioestimulantes.....	12
2.6	Respuesta de defensa en las plantas	13
2.6.1	Resistencia sistémica adquirida (SAR)	14
2.6.2	Resistencia sistémica inducida (ISR)	15
2.6.3	Diferencias entre ISR y SAR.....	16
2.7	Quitosán y nanoquitosán	17
2.8	Yodo.....	18
2.9	Complejo de nanoquitosán-yodo.....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1	Síntesis de NPsCs y de los complejos NPsCs-I	21
3.2	Desarrollo del cultivo	22
3.3	Preparación del inóculo.....	22

3.4 Aplicación de los tratamientos	23
3.5 Diseño experimental.....	23
3.6 Variables evaluadas relacionadas con la tolerancia al estrés por patógenos en hojas	24
3.6.1 Recolección de muestras	24
3.6.2 Extracción de enzimas.....	24
3.6.3 Actividad quitinasa.....	24
3.6.4 Actividad glucanasa	25
3.6.5 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL).....	25
3.6.6 Proteínas totales.....	26
3.7 Análisis de expresión de genes por RT-qPCR	26
3.7.1 Toma de muestra	26
3.7.2 Extracción de ARN por el método de trizol	26
3.7.3 Tratamiento con DNasa.....	27
3.7.4 Cuantificación de ARN	27
3.7.5 Calidad de ARN	28
3.7.6 Síntesis de c-DNA.....	29
3.7.7 Preparación de primers.....	29
3.7.8 Prueba de concentración de primers qPCR	30
3.8 Análisis estadístico.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 Actividad enzimática y proteínas	31
4.1.1 Actividad quitinasa.....	31
4.1.2 Actividad glucanasa	32
4.1.3 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL).....	33
4.1.4 Proteínas totales.....	35
4.2 Análisis de expresión de genes por RT-qPCR	36
4.2.1 Rendimiento de ARN.....	36
4.2.2 Calidad de ARN	37
4.2.3 Expresión del gen PR1	37
4.2.4 Expresión del gen LOX.....	39
V. CONCLUSIÓN	42
VI. LITERATURA CITADA.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos aplicados al cultivo de lechuga inoculado con <i>Bremia lactucae</i> ...	23
Cuadro 2. Ecuaciones para determinar el contenido de ARN en muestra.....	28
Cuadro 3. Preparación de muestras.	28
Cuadro 4. Secuencia de primers utilizados.	29
Cuadro 5. Rendimiento de ARN en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales estados productores de lechuga (en toneladas).	4
Figura 2. Análisis de la actividad enzimática quitinasa en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).....	31
Figura 3. Análisis de la actividad enzimática glucanasa en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).	32
Figura 4. Análisis de la actividad enzimática de PAL en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).	34
Figura 5. Análisis de proteínas totales en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).	35
Figura 6. Análisis electroforético de muestras de ARN, de hojas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).....	37
Figura 7. Análisis de expresión del gen PR1 en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).	38
Figura 8. Análisis de expresión del gen LOX en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I)	39

RESUMEN

El hongo *Bremia lactucae* es conocido por provocar la enfermedad de mildú en el cultivo de la lechuga, el cual ha provocado pérdidas considerables de cultivos en el país. La mayoría de las soluciones disponibles para combatirlo son productos químicos que presentan altos niveles de toxicidad, lo que puede ser perjudicial tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Este trabajo investiga la actividad de enzimas y la expresión de genes en plantas de lechuga, enfocándose en la tolerancia a *B. lactucae* mediante la aplicación de complejos de nanoquitosán-yodo. El objetivo principal es evaluar cómo el nanoquitosán-yodo influye en la respuesta de defensa de la lechuga ante la infección de *B. lactucae*. En este experimento se evaluaron 9 tratamientos, un testigo absoluto, y un testigo infectado. Dichos tratamientos consistieron en complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I); yoduro de potasio (KI) y yodato de potasio (KIO_3) en concentraciones de 5 mg L^{-1} y 25 mg L^{-1} . Se realizaron cinco aplicaciones foliares de los tratamientos durante el ciclo del cultivo, la primera al momento del trasplante y las siguientes cada quince días. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en la actividad de enzimas como la glucanasa, quitinasa y fenilalanina amonio liasa (PAL), en comparación con el testigo absoluto. Sin embargo, la expresión del gen LOX mostró una sobreexpresión significativa en el tratamiento T5 (complejo de NPsCS-I con 5 mg L^{-1} KI), y en el tratamiento T9 (complejo de NPsCS-I con 5 mg L^{-1} KIO_3), mostrando un aumento significativo de 11.19 y de 41.38 veces más respecto al testigo absoluto (T0). Así mismo, para la expresión del gen PR1, el tratamiento T5 (complejo de NPsCS-I con 5 mg L^{-1} KI), y en el tratamiento T6 (complejo de NPsCS-I con 25 mg L^{-1} KI), mostró una sobreexpresión significativa de 6 y de 6.3 veces más que el testigo absoluto (T0). Estos hallazgos sugieren que los complejos de nanoquitosán-yodo pueden ser una herramienta eficaz para mejorar la resistencia de la lechuga a *B. lactucae*, con posibles aplicaciones en la agricultura. Se recomienda explorar otras aplicaciones de los complejos de nanoquitosán-yodo en distintos cultivos para aumentar la resistencia a enfermedades.

Palabras clave: actividad enzimática, *Bremia lactucae*, complejos nanoquitosán yodados, expresión génica, lechuga, tolerancia al estrés.

ABSTRACT

Bremia lactucae is known to cause downy mildew in lettuce crops, leading to significant yield losses in the country. Most available solutions to combat this pathogen are chemical products with high toxicity levels, posing risks to human health and the environment. This study investigates the activity of enzymes and gene expression in lettuce plants, focusing on tolerance to *B. lactucae* through applying of nanochitosan-iodine complexes. The main objective is to evaluate how chitosan-iodine influences the defense response of lettuce against *B. lactucae* infection. Nine treatments were evaluated, including an absolute control and an infected control. These treatments consisted of NPsCS-I (chitosan-iodine nanocomplexes); KI (potassium iodine) and KIO₃ (potassium iodate) at concentrations of 5 mg L⁻¹ and 25 mg L⁻¹. Five foliar applications of the treatments were conducted throughout the crop cycle, starting at transplanting and every fifteen days thereafter. Results indicated no significant differences in enzyme activity, such as glucanase, chitinase, and phenylalanine ammonia-lyase (PAL), compared to the absolute control. However, the expression of the LOX gene showed significant overexpression in treatment T5 (NPsCS-I complex with 5 mg L⁻¹ KI) and treatment T9 (NPsCS-I complex with 5 mg L⁻¹ KIO₃), with increases of 11.19 and 41.38 times, respectively, compared to the absolute control (T0). Additionally, for the expression of the PR1 gene, treatment T5 (NPsCS-I complex with 5 mg L⁻¹ KI) and treatment T6 (NPsCS-I complex with 25 mg L⁻¹ KI) exhibited significant overexpression of 6 and 6.3 times more than the absolute control (T0). These findings suggest that chitosan-iodine nanocomplexes may be an effective tool for enhancing lettuce resistance to *B. lactucae*, with potential applications in agriculture. Further exploration of chitosan-iodine nanocomplexes in various crops is recommended to increase disease resistance.

Key words: enzyme activity, *Bremia lactucae*, iodinated nanochitosan complexes, gene expression, lettuce, stress tolerance.

I. INTRODUCCIÓN

La lechuga es una de las hortalizas preferidas y ampliamente consumidas en todo el mundo, siendo China el principal productor, con una participación superior al 50 % de la producción global (Infoagro, 2025). Dentro de esta clasificación podemos encontrar a México, posicionándose en el noveno lugar, con una participación de 1.8% y una tasa media anual de crecimiento de 4.2%, en el año 2021 se tuvo una producción de 509 mil 84 toneladas (SADER, 2023). Sin embargo, la producción de lechuga enfrenta un desafío significativo debido a la presencia de factores tanto abióticos como bióticos que afectan negativamente la cantidad y la calidad de la cosecha.

El estrés en plantas se clasifica en abiótico y biótico, el primero es causado por factores ambientales no vivos como la deficiencia de agua, calor extremo y frío, salinidad, intensidad lumínica extrema, y desbalance nutricional. El estrés biótico se origina por la interacción de las plantas con organismos vivos, como patógenos, insectos, plagas, enfermedades y malezas que pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Nawaz *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

En el cultivo de lechuga se destaca el mildú (*Bremia lactucae*), que es una enfermedad muy perjudicial para el cultivo, identificable por las manchas amarillas en la parte superior de las hojas, y una esporulación blanca y vellosa en la parte inferior, lo que puede resultar en una disminución significativa en el rendimiento y la calidad del cultivo (Parra *et al.*, 2020). Aunque el control de esta enfermedad puede ser muy desafiante en condiciones favorables para su propagación, existen varias estrategias preventivas que pueden mitigar sus efectos, como la ventilación adecuada en semilleros, la gestión eficiente del riego y el abonado, uso de variedades resistentes y la aplicación de fungicidas (Syngenta, 2022).

Por otro lado, sabemos que las plantas se enfrentan a una variedad de microorganismos patógenos que amenazan su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, las plantas cuentan con un sistema inmunológico especializado que les permite protegerse contra microorganismos dañinos (Nishad *et al.*, 2020). Este sistema utiliza dos estrategias de defensa relacionados; inmunidad basada en patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y la inmunidad mediada por efectores (ETI), así mismo, los PAMPs y los ETI son reconocidos por la planta

y activan la respuesta de inmunidad, que puede incluir la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) (Jones & Dangl, 2006; Boller & Felix, 2009).

El uso de bioestimulantes ha demostrado tener un potencial, promoviendo una agricultura sostenible, minimizando el impacto ambiental, sobre todo ejerciendo un impacto positivo en el cultivo de hortalizas y floricultura promoviendo la tolerancia de los cultivos frente al estrés biótico y abiótico y mejorando la calidad general de los cultivos (Bulgari *et al.*, 2014; Rehim *et al.*, 2021; Bashir *et al.*, 2021). Así mismo, el quitosano es clasificado como un bioestimulante, un biopolímero natural derivado de la quitina, que es el componente principal en la estructura de los hongos, insectos y crustáceos (Pichyangkura & Chadchawan, 2015). Por ello, la aplicación del quitosano en la agricultura promueve la actividad fotosintética de las plantas, resistencia a condiciones adversas y una mayor activación de genes de defensa (Shahrajabian *et al.*, 2021). Cabe mencionar, que estas cualidades únicas del quitosano se pueden potenciar aún más al usarlos en forma de nanopartículas, incluso es más estable y más reactivo (Chandra *et al.*, 2015). Además, ejerce una notable actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias patógenas (Kong *et al.*, 2010; Maluin & Hussein, 2020).

Por otro lado, tenemos el yodo, un elemento no esencial para las plantas terrestres, sin embargo, pueden absorber y almacenarla a través de sus raíces en forma de yoduro (I^-) o yodato (IO_3^-) (Maekowiak, grossl 1999, zhu *et al.* 2003; Smolen *et al.*, 2011). Además, el yodo podría actuar como un inductor de tolerancia patógenos, activando los sistemas de defensa de la planta a través de señales redox o mediante cambios en la cutícula (Shaw *et al.*, 2007; Medrano-Macías *et al.*, 2016).

Por ello, en esta investigación se propone la aplicación de complejos de nanopartículas de quitosán yodados (NPsCs-I) y sales de yoduro y yodato en plantas de lechuga para evaluar como la aplicación foliar de los complejos puede mejorar la tolerancia de las plantas de lechuga a *Bremia lactucae*, analizando la actividad de enzimas y la expresión de genes relacionados con la defensa de las plantas.

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de tolerancia a *Bremia lactucae* en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo.

1.1.1 Objetivos específicos

1. Evaluar enzimas y metabolitos relacionados con la tolerancia a *Bremia lactucae* en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo.
2. Analizar el nivel de expresión génica diferencial relacionado con la tolerancia a *Bremia lactucae* en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo.

1.2 Hipótesis

Las plantas de lechuga tendrán un cambio favorable en la producción de metabolitos y enzimas y en la expresión de genes relacionados con la tolerancia a *Bremia lactucae* en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Cultivo de lechuga y producción en México

La lechuga (*Lactuca sativa*) es una de las hortalizas más importantes en la producción agrícola de México. La producción de lechuga en México ha mostrado un crecimiento sostenido en los últimos años, debido a su alta demanda tanto en el mercado interno como en el externo. Según la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), en 2021 se tuvo una producción de lechuga de 509 mil 84 toneladas (SADER, 2023). Habría que mencionar que en el 2022 Guanajuato alcanzó una producción de casi 146 mil toneladas ocupando el primer lugar, seguido de Zacatecas alcanzando una producción de más 117 mil toneladas, en el tercer lugar se posiciona Puebla, que son las entidades líderes (Infoagro, 2025).

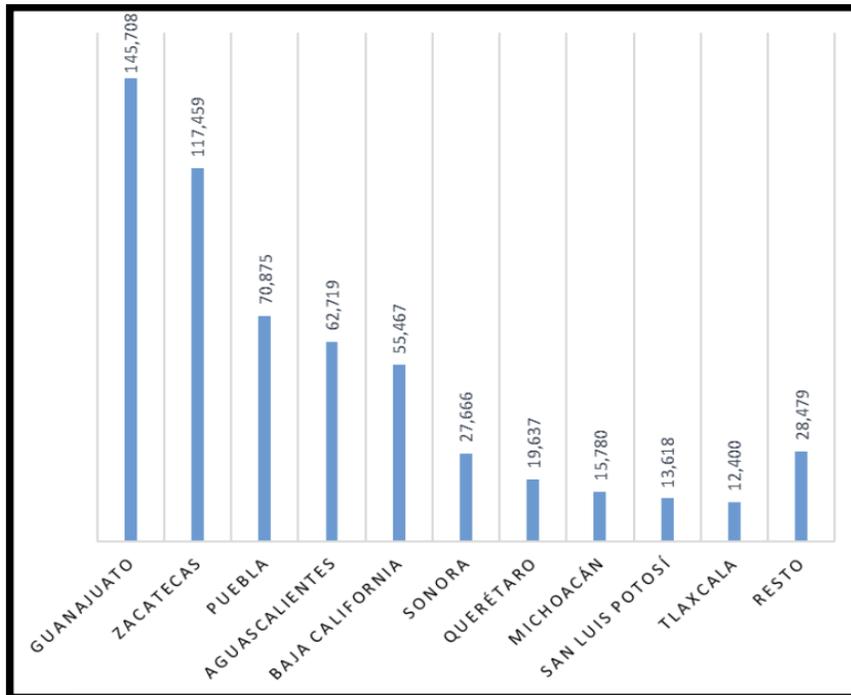


Figura 1. Principales estados productores de lechuga (en toneladas).

Fuente SIAP-SAGARPA, por (Infoagro,2025).

Así mismo, México se posicionó como el noveno productor de lechuga a nivel mundial, con una participación de 1.8 % y una tasa media anual de crecimiento de 4.2 % (SADER, 2023).

En México, la lechuga romana y la orejona son las variedades más cultivadas, presentando conjuntamente el 98% de la producción nacional, aunque también se cultivan otras variedades como la baby leaf y la escarola. Cabe mencionar que, gracias a la producción de lechuga en México, asegura su disponibilidad constante, con una mayor abundancia en épocas específicas de febrero a abril y de julio a agosto (SADER, 2021).

2.1.1 Importancia económica

La lechuga tiene una gran importancia económica en México, no solo por su volumen de producción, sino también por su valor comercial. Esta hortaliza es una fuente significativa de ingresos para los agricultores y contribuye al desarrollo económico de las regiones productoras. La exportación de lechuga fresca, principalmente a Estados Unidos y Canadá, genera divisas importantes al país. Según SIAP-SAGARPA, en 2022, el valor correspondiente a las exportaciones hacia Estados Unidos fue superior a 376 millones de dólares, Canadá es otro mercado clave, el cual aumentó sus recepciones en mil toneladas, en conjunto con Estados Unidos, produjeron 380.2 millones de dólares de los 381 millones de dólares que se obtienen en todo el proceso de exportación (Infoagro, 2025).

La producción de lechuga también tiene un impacto positivo en la generación de empleo, ya que requiere mano de obra intensiva en diversas etapas de su cultivo, desde la siembra hasta la cosecha y el empaquetado. (Pérez y Solórzano, 2021).

2.1.2 Consumo de lechuga

La lechuga es una hortaliza ampliamente cultivada y consumida popularmente en todo el mundo, dicha hortaliza es rica en agua (entre el 94 y el 95 %) y baja en calorías. También es una excelente fuente de vitaminas A, C, K, minerales y compuestos bioactivos como polifenoles, carotenoides y clorofila, con beneficios para la salud (Shi *et al.*, 2022). Así mismo, el consumo de lechuga se ha asociado con una disminución del riesgo de varias enfermedades crónicas (Yang *et al.*, 2021).

De igual manera, el consumo de lechuga en México ha aumentado en los últimos años, impulsado por una creciente conciencia sobre la importancia de una alimentación saludable y equilibrada. La lechuga es ampliamente utilizada en la gastronomía mexicana, tanto en ensaladas frescas como en platillos tradicionales. Su consumo es especialmente alto en las

zonas urbanas, donde existe una mayor disponibilidad de productos frescos y una mayor conciencia sobre la salud (SADER, 2020).

2.1.3 Características del cultivo

La lechuga (*Lactuca sativa L*) pertenece a la familia *Asteraceae* (compositae), un grupo exitoso y diverso de plantas con una distribución global (Funk *et al.* 2005; Still, 2007).

Es una planta autógena, forma una raíz pivotante profunda con raíces laterales en gran parte horizontales, más densamente cerca de la superficie del suelo para mejor absorción de agua y nutrientes. Las hojas se organizan en una roseta compacta y espiralada en torno al tallo, generalmente corto (Mou, 2008). Por lo general, esta planta tiene un sabor delicado y suave, regularmente es de un color verde intenso que gradualmente se aclara hacia la base y se oscurece hacia las puntas de las hojas (SADER, 2019).

El cultivo de lechuga se caracteriza por ser relativamente sencillo y de corto ciclo, lo que permite obtener varias cosechas al año. La lechuga se adapta bien a diferentes tipos de suelo, aunque prefiere suelos bien drenados, ricos en materia orgánica y con pH ligeramente ácido a neutro (6.0-7.0). Las temperaturas óptimas para el crecimiento de la lechuga oscilan entre 15°C y 20°C, y aunque puede tolerar ligeras heladas, las temperaturas extremas pueden afectar negativamente su desarrollo y calidad (SADER, 2021).

El manejo del agua es crucial en el cultivo de lechuga, ya que esta hortaliza tiene un alto contenido de agua. El riego debe ser uniforme y suficiente para mantener el suelo húmedo sin encharcarlo, lo cual puede prevenir enfermedades como la pudrición de raíces. Además, la lechuga es susceptible a diversas plagas y enfermedades, como el mildú (*Bremia lactucae*), que puede afectar gravemente los rendimientos si no se manejan adecuadamente (Guiller *et al.*, 2023).

2.2 Estrés en plantas

De acuerdo con diferentes estudios el estrés en plantas se refiere a cualquier factor externo que afecta negativamente el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas. Estos factores pueden alterar los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, provocando una respuesta adaptativa o de defensa. En términos generales, el estrés en plantas se clasifica

en dos categorías principales: estrés abiótico y estrés biótico (Nawaz *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

2.2.1 Estrés abiótico

El estrés abiótico es causado por factores ambientales no vivos. Algunos de los tipos más comunes de estrés abiótico incluyen:

Estrés hídrico: ocurre cuando las plantas experimentan una falta o exceso de agua, las plantas experimentan estrés por sequía cuando el entorno carece de agua, lo que hace que la transpiración supere la absorción de agua (Levitt, 1980; Luna-Flores *et al.*, 2012). Así mismo, el estrés hídrico deteriora la funcionalidad normal de la planta, provocando cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos para compensar las limitaciones del agua (Mitchell *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2020). Los principales efectos del estrés hídrico sobre el crecimiento de las plantas son; reducción de la altura y grosor del tallo, disminución del desarrollo radicular, reducción del área foliar y el peso foliar, y por último una disminución de la biomasa total de la planta.

Estrés térmico: este tipo de estrés incluye tanto por altas como por bajas temperaturas. Las temperaturas extremas pueden causar daños en las estructuras celulares y proteínas, afectando la función enzimática y el metabolismo de la planta. Las heladas y las olas de calor son un claro ejemplo de este tipo de estrés. Estos eventos extremos pueden interrumpir la homeostasis celular, llevando a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y desencadenando respuestas de defensa en la planta (Bokszczanin & Fragkostefanakis, 2013).

Estrés salino: la presencia de sales en el agua del suelo afecta el crecimiento de las plantas de dos maneras: primero, la sal reduce la capacidad de la planta para absorber agua, lo que lleva a una disminución en la tasa de crecimiento. Este efecto se conoce como déficit de agua por salinidad o efecto osmótico. En segundo lugar, la entrada de grandes cantidades de sal en la planta a través de la transpiración puede dañar las células de las hojas, lo que puede reducir aún más el crecimiento. (Greenway & Munns 1980; Parihar *et al.*, 2014). Así mismo, las altas concentraciones de sal en el suelo perjudican el crecimiento y desarrollo de las plantas, alterando procesos fundamentales como la germinación, crecimiento vegetativo y producción

de frutos (Ren *et al.*, 2005; Ledesma *et al.*, 2019). Este tipo de estrés es común en áreas de riego insuficiente o en suelos naturalmente salinos (Gupta & Huang, 2014).

Estrés lumínico: la habilidad de las plantas para percibir y responder a la calidad y cantidad de luz es crucial para su supervivencia especialmente en entornos desafiantes (Roeber *et al.*, 2021). Por ello, la exposición a niveles extremos de luz, tanto alta (fotoinhibición) como baja (sombra), ejercen impactos negativos en la actividad fotosintética, así como también obstaculizan el crecimiento de rendimiento de las plantas (Nishiyama & Murata 2014; Yang *et al.*, 2019).

Estrés nutricional: se refiere a las condiciones en las que las plantas no reciben los nutrientes necesarios para crecer y desarrollarse de manera óptima. Esto puede suceder debido a una insuficiencia o exceso de nutrientes esenciales como, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, y potasio; lo anterior puede afectar el crecimiento y la producción de biomasa, es así como el estrés nutricional puede ser causado por diversos factores, entre ellos, suelos pobres en nutrientes, fertilización inadecuada, presencia de elementos tóxicos en el suelo, cambios de pH en el suelo (Zhu *et al.*, 2017).

2.2.2 Estrés biótico

A diferencia del estrés abiótico, que se debe a factores ambientales como la sequía y el calor, el estrés biótico se produce cuando agentes patógenos o plagas privan a las plantas de sus nutrientes, lo que puede llevar a una disminución del vigor y en casos extremos, a la muerte de la planta. En el sector agrícola, el estrés biótico es una de las principales amenazas que pueden provocar pérdidas significativas antes y después de la recolección de los cultivos (Singla & Krattinger, 2016). Los tipos comunes de estrés biótico incluyen:

Patógenos: se refiere al estrés que se produce como resultado de la invasión de las plantas por otros organismos vivos, incluyendo bacterias, virus, hongos y nemátodos que pueden causar enfermedades en las plantas. Las infecciones por patógenos pueden resultar en síntomas como manchas foliares, pudrición de raíces y muerte regresiva (Berens *et al.*, 2017).

Insectos y plagas: los insectos herbívoros pueden causar daños directos al alimentarse de diferentes partes de la planta, así como daños indirectos al transmitir enfermedades. El ataque

de plagas puede reducir significativamente el rendimiento y la calidad de los cultivos. Estos insectos no solo consumen tejido vegetal, sino que también pueden actuar como vectores de patógenos, exacerbando los daños (Bruce, 2016; Jactel *et al.*, 2019).

Malezas: compiten con las plantas cultivadas por recursos como luz, agua y nutrientes. La competencia con malezas puede reducir el crecimiento y rendimiento de las plantas deseadas (Zimdahl, 2018). Por ello, los cultivos son más sensibles a la competencia con malezas durante sus etapas iniciales de crecimiento, esto puede aumentar su vulnerabilidad al ataque de plagas e infecciones por enfermedades. A medida que el cultivo madura, el problema de competencia disminuye, pero las malezas pueden seguir causando inconvenientes en especial en las labores de cosecha y cultivo (Intagri, 2017).

Las plantas han desarrollado una variedad de mecanismos para enfrentar y adaptarse a estos tipos de estrés, incluyendo cambios en la expresión génica, producción de metabolitos secundarios y activación de respuestas hormonales. La investigación en este campo es crucial para el desarrollo de cultivos más resistentes y sostenibles (Soliveres, 2011).

2.3 Plagas y enfermedades que presenta la lechuga

La lechuga (*Lactuca sativa*) es un cultivo valioso y ampliamente cultivado en diversas regiones del mundo. Sin embargo, su producción se ve amenazada por una variedad de plagas y enfermedades que pueden reducir significativamente el rendimiento y la calidad del cultivo. A continuación, se detallan algunas de las principales plagas y enfermedades que afectan a la lechuga (Giraldo Núñez, 2024).

2.3.1 Plagas

Pulgones (*Aphididae*): son insectos chupadores que se alimentan de la savia de las plantas, causando daño directo al debilitar las plantas y reducir su crecimiento. Además, los pulgones son vectores de varios virus que pueden causar enfermedades en la lechuga. Los daños causados por pulgones pueden llevar a la deformación de las hojas y una disminución en la calidad del cultivo (Blackman & Eastop, 2020).

Trips (*Thripidae*): son insectos pequeños que se alimentan del contenido celular de las hojas de la lechuga, causando manchas plateadas y deformaciones en las hojas. También son vectores de virus, como el virus del bronceado del tomate (TSWV), que pueden causar enfermedades graves en la lechuga (Reitz *et al.*, 2020).

Mosca Minadora (*Liriomyza spp.*): las larvas de la mosca minadora se alimentan del tejido interno de las hojas, creando túneles que afectan la fotosíntesis y la estética del producto. La presencia de estos túneles puede hacer que la lechuga sea invendible en el mercado fresco (Parrella, 2021).

2.3.2 Enfermedades

Mildiu (*Bremia lactucae*): es una de las enfermedades más devastadoras de la lechuga. Los síntomas incluyen manchas amarillas en la superficie superior de las hojas y una esporulación blanca y vellosa en la superficie inferior. Esta enfermedad puede causar una pérdida significativa de rendimiento y calidad del cultivo (Parra *et al.*, 2020).

Pudrición de la corona y de las raíces (*Sclerotinia sclerotiorum*): esta enfermedad fúngica afecta la base de la planta, causando pudrición de la corona y las raíces. Los síntomas incluyen marchitamiento y colapso de las plantas. La infección puede llevar a una pérdida completa del cultivo si no se controla adecuadamente (Bolton *et al.*, 2006).

Moho gris (*Botrytis cinerea*): esta enfermedad fúngica puede afectar a la lechuga durante el crecimiento, almacenamiento y transporte. Los síntomas incluyen manchas acuosas que se vuelven marrones y moho gris en las partes afectadas. Es especialmente problemática en condiciones húmedas y frías (Dean *et al.*, 2016).

Virus del mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*): este virus se transmite principalmente por pulgones y causa síntomas como mosaico, clorosis y deformación de las hojas. La infección por LMV puede reducir significativamente el rendimiento y la calidad de la lechuga (Ali & Kobayashi, 2014).

2.4 *Bremia lactucae*

Bremia lactucae es un patógeno fúngico causante del mildiu veloso en lechuga (*Lactuca sativa*). Esta enfermedad ha sido reconocida como una de las más destructivas para los cultivos de lechuga debido a su impacto en la calidad y rendimiento del producto. Es un oomiceto que afecta principalmente a la lechuga y otras especies del género *Lactuca*. El patógeno prospera en condiciones de alta humedad y temperaturas frescas, lo que facilita su propagación y crecimiento. La infección se inicia en las hojas inferiores y se propaga rápidamente a las partes superiores de la planta (Parra *et al.*, 2020).

2.4.1 Síntomas

Los síntomas del mildiu veloso incluyen manchas amarillas en la superficie superior de las hojas, que posteriormente se desarrollan en áreas necróticas. En la cara inferior de las hojas afectadas, se observa una esporulación blanca y vellosa, que es característica de la enfermedad. La presencia de estas estructuras fúngicas puede llevar al deterioro y la muerte prematura de las hojas. En condiciones severas, el mildiu puede reducir significativamente el rendimiento y la calidad del cultivo, haciendo que las hojas sean inadecuadas para la venta en mercados frescos (García *et al.*, 2019). En condiciones severas, el mildiu puede reducir significativamente el rendimiento y la calidad del cultivo, haciendo que las hojas sean inadecuadas para la venta en mercados frescos.

2.4.2 Importancia económica

La importancia económica de *Bremia lactucae* radica en su capacidad para causar pérdidas significativas en la producción de lechuga. Las infecciones pueden resultar en la reducción del rendimiento de los cultivos, aumento en los costos de manejo y control, y pérdida de calidad del producto. Esto tiene implicaciones directas en el mercado, afectando tanto a los productores como a los consumidores. Según un estudio reciente, las pérdidas económicas asociadas con el mildiu veloso pueden ser considerables, especialmente en regiones donde las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de la enfermedad (Elad & Pertot, 2020).

2.4.3 Alternativas para su control

El control de *Bremia lactucae* implica una combinación de estrategias de manejo integrado. Las alternativas para su control incluyen:

Uso de variedades resistentes: la selección y cultivo de variedades de lechuga resistentes al mildiu veloso es una de las estrategias más efectivas. Investigaciones recientes han identificado y desarrollado variedades con mayor resistencia a la enfermedad (Sharma *et al.*, 2021).

Aplicación de fungicidas: el uso de fungicidas específicos puede ayudar a controlar la propagación de la enfermedad. Sin embargo, la aplicación debe ser oportuna y se deben seguir las recomendaciones de dosificación para evitar el desarrollo de resistencia (Ormeño Villajos, 2023).

Prácticas de manejo agrícola: mejorar la ventilación y reducir la humedad en los cultivos puede disminuir la incidencia de la enfermedad. Además, la eliminación de restos de cultivos infectados y la rotación de cultivos son prácticas recomendadas para reducir la inoculación (García *et al.*, 2019).

Control biológico: la utilización de agentes de control biológico, como ciertos tipos de hongos antagonistas, ha mostrado potencial en el manejo del mildiu veloso (Yang *et al.*, 2022).

2.5 Uso de bioestimulantes

En las últimas tres décadas se han propuesto varias innovaciones tecnológicas para optimizar la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola, a través de una disminución significativa de agroquímicos sintéticos como pesticidas y fertilizantes. Una estrategia prometedora y respetuosa con el medio ambiente sería el uso de bioestimulantes (Rouphael & Colla, 2020). Dichos bioestimulantes vegetales, o bioestimulantes agrícolas, incluyen diversas sustancias y microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas (Calvo *et al.*, 2014).

Sus mecanismos de acción están estrechamente vinculados con los de incrementar la tolerancia al estrés abiótico, mejorar las características de calidad y ampliar la disponibilidad

de nutrientes (UE, 2019/1009; Mandal *et al.*, 2023). Por ende, los bioestimulantes ofrecen diversos beneficios para los cultivos, como minimizar el estrés, estimular el crecimiento, potenciar la absorción de nutrientes y aumentar la productividad. Además, ayudan a romper latencia, mejorar el desarrollo radicular, intensificar la actividad fotosintética y regular la floración, lo que conduce a un crecimiento y desarrollo más equilibrados y productivos (EBIC, 2018; Paradiković *et al.*, 2018).

Otro de los efectos positivos de los bioestimulantes es que pueden interactuar directamente con las cascadas de señalización de las plantas o actuar a través de la estimulación de bacterias endofíticas y no endofíticas, levaduras y hongos para producir moléculas beneficiosas para la planta (Brown & Saa, 2015).

La efectividad de los bioestimulantes se ve influenciada por una serie de factores, como la dosis aplicada, el método de aplicación, el momento de aplicación, y la composición específica de biomoléculas y microorganismos, lo que requiere una consideración cuidadosa para maximizar los beneficios (Baltazar *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que la aplicación de bioestimulantes en el cultivo de hortalizas y floricultura no solo aumenta el contenido de clorofila en las hojas, sino que también mejora la tolerancia de los cultivos frente al estrés biótico y abiótico, mejorando la calidad general de los cultivos. Además, su uso reduce la necesidad de fertilizantes, lo que contribuye a una agricultura más sostenible (Bulgari *et al.*, 2014; Rehim *et al.*, 2021; Bashir *et al.*, 2021).

Así mismo, Du Jardin (2015), propuso las principales categorías según su origen que actúan como bioestimulantes: ácidos húmicos y fúlvicos, hidrolizados de proteínas y otros compuestos que contienen nitrógeno, extractos de algas marinas y botánicos, biopolímeros como el quitosán, compuestos inorgánicos, hongos benéficos y bacterias benéficas.

2.6 Respuesta de defensa en las plantas

Durante su ciclo de vida, las plantas enfrentan una variedad de desafíos, como microorganismos patógenos que amenazan su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, las plantas cuentan con un sistema inmunológico innato altamente especializado que les permite protegerse contra estos microorganismos dañinos a través de dos estrategias de defensa

estrechamente relacionadas que se activan mediante la detección de patógenos (Nishad *et al.*, 2020). Estas estrategias involucran mecanismos de defensa innatos, divididos en inmunidad basada en patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y en inmunidad mediada por efectores (ETI). La inmunidad activada por PAMPs (PTI) reconoce componentes conservados de los patógenos, desencadenando respuestas defensivas como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), metabolitos secundarios y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Jones & Dangl, 2006; Boller & Felix, 2009). Sin embargo, algunos patógenos superan esta defensa mediante efectores que inhiben la respuesta inmune, activando así la ETI, una respuesta localizada y más robusta regulada por proteínas de resistencia (R) que desencadenan una respuesta hipersensible (Dodds & Rathjen, 2010). En resumen, los PAMPs y los ETI son reconocidos por la planta y activan la respuesta de inmunidad, que puede incluir la activación del SAR y el ISR. Estas respuestas son fundamentales para la defensa de la planta contra patógenos y estrés ambiental.

2.6.1 Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es un mecanismo de defensa en plantas que se activa después de un ataque patógeno, brindando protección prolongada y de amplio espectro contra diversos microorganismos. Este proceso comienza localmente, en el sitio de infección, y se extiende por toda la planta, lo que ha generado gran interés en su uso agrícola por su capacidad de reducir el uso de fungicidas (Fu & Dong, 2013).

El ácido salicílico (AS) es clave en la activación de la SAR. Su acumulación en la zona afectada desencadena una señal sistémica que induce la expresión de genes relacionados con la defensa, como los que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), las cuales protegen a la planta mediante la degradación de paredes celulares patógenas (Vlot *et al.*, 2009).

Una característica importante de la SAR es que permite a las plantas adquirir resistencia no sólo contra el patógeno original, sino contra una variedad de microorganismos, incluyendo hongos, bacterias y virus. Las proteínas PR, entre ellas quitinasas y glucanasas, juegan un papel central en esta defensa, inhibiendo el crecimiento de patógenos de forma directa (Durrant & Dong, 2004). Investigaciones recientes destacan la dependencia de estas

proteínas en la señalización del ácido salicílico, lo que refuerza la importancia de este compuesto en la defensa sistémica (Shine *et al.*, 2019).

Además, la SAR puede inducirse mediante factores no infecciosos, como el ácido salicílico o derivados de quitosano, lo que abre oportunidades para desarrollar agentes protectores que sean más sostenibles y reduzcan el uso de pesticidas (Stout, 2023). Los elicitores químicos o biológicos que inducen la SAR han mostrado ser eficaces para preparar las plantas frente a futuras infecciones, mejorando su resistencia sin comprometer su crecimiento (Peteira, 2020).

2.6.2 Resistencia sistémica inducida (ISR)

La resistencia sistémica inducida (ISR) es un mecanismo de defensa natural en plantas, activado en respuesta a la colonización por microorganismos beneficiosos no patogénicos, como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y hongos micorrízicos. A diferencia de la resistencia sistémica adquirida (SAR), que depende del ácido salicílico (AS) y es desencadenada por patógenos, la ISR es activada por factores bióticos no dañinos y regulada principalmente por el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET), proporcionando así una defensa de amplio espectro contra patógenos en diversas etapas del desarrollo vegetal (Pieterse *et al.*, 2014).

La ISR se activa cuando microorganismos como *Pseudomonas fluorescens* colonizan las raíces de las plantas. Estos microorganismos promueven cambios fisiológicos y moleculares que activan las defensas de la planta sin causar daño, permitiéndole resistir infecciones futuras (Van Loon *et al.*, 2008). A diferencia de la SAR, que depende de la acumulación de AS, la ISR "prepara" las células para responder de manera más rápida ante posibles ataques, activando las vías del AJ y ET, que modulan la expresión de genes defensivos relacionados con proteínas antimicrobianas y enzimas que refuerzan las paredes celulares (Van Wees *et al.*, 2008). La señalización de la ISR no causa un aumento directo en la concentración de estas hormonas en toda la planta, sino que optimiza la respuesta en caso de infección.

La ISR inicia en las raíces, extendiéndose de manera sistémica a toda la planta. Aunque la interacción con las rizobacterias ocurre principalmente en las raíces, los efectos protectores de la ISR se extienden a otras partes de la planta, como hojas y tallos, brindando una defensa

integral (Segarra *et al.*, 2009). En plantas que experimentan ISR, no se observa un incremento notable en la producción de ácido salicílico, pero sí en compuestos defensivos dependientes del AJ y ET, como quitinasas y glucanasas, que degradan las paredes celulares de patógenos fúngicos y contienen proteínas que inhiben la actividad enzimática de estos (Kloepper *et al.*, 2004). Así, cuando la planta enfrenta un ataque, su capacidad de defensa ya está reforzada, reduciendo la severidad de la infección.

Diversos factores influyen en la efectividad de la ISR, como la cepa de rizobacterias, el tipo de patógeno y el estado fisiológico de la planta. Las cepas de PGPR, como *Pseudomonas* y *Bacillus*, han mostrado ser efectivas para inducir ISR en cultivos como tomate, lechuga, maíz y soja (Beneduzi *et al.*, 2012). Además, las condiciones del suelo, como su riqueza en materia orgánica y microorganismos beneficiosos, mejoran la activación de la ISR, mientras que suelos degradados o contaminados pueden reducir su eficacia (Berendsen *et al.*, 2012).

Las aplicaciones de la ISR en la agricultura ofrecen un enfoque sostenible para mejorar la resistencia de los cultivos a patógenos, disminuyendo la dependencia de pesticidas químicos. La ISR ha demostrado ser efectiva en la reducción de enfermedades fúngicas y bacterianas en cultivos comerciales como arroz, maíz y tomate (Conrath, 2011). Las rizobacterias promotoras del crecimiento también se utilizan como bioestimulantes que no solo inducen la ISR, sino que además mejoran la absorción de nutrientes y favorecen un crecimiento más saludable.

La implementación de la ISR en prácticas agrícolas contribuye a una producción alimentaria sostenible, ofreciendo una protección natural y duradera contra patógenos y reduciendo el uso de fungicidas y otros productos agroquímicos. Se espera que futuras investigaciones continúen identificando cepas especializadas de rizobacterias para distintos cultivos y condiciones, permitiendo una adopción más amplia de este mecanismo en la agricultura moderna.

2.6.3 Diferencias entre ISR y SAR

ISR y SAR son dos tipos de resistencia sistémica que comparten la característica de proporcionar una defensa de amplio espectro. Sin embargo, difieren en los siguientes aspectos:

Mecanismo de activación: la ISR se activa en respuesta a microorganismos beneficiosos, mientras que la SAR es desencadenada por patógenos y depende del reconocimiento de sus patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Vías de señalización: la ISR depende de las vías de ácido jasmónico y etileno, mientras que la SAR está regulada principalmente por el ácido salicílico (Fu & Dong, 2013). Respuesta a patógenos: la ISR induce una respuesta "preparada" o "priming," donde la planta no activa completamente sus defensas hasta que enfrenta una amenaza real, mientras que la SAR desencadena una respuesta más directa, a menudo caracterizada por la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).

2.7 Quitosán y nanoquitosán

El quitosán (poli β -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina, Cs) es la forma modificada de la quitina, un biopolímero abundante en la naturaleza, presente en la estructura de los hongos, insectos y crustáceos (Pichyangkura & Chadchawan, 2015). Exhibe propiedades funcionales, entre las que se encuentran su actividad antimicrobiana, capacidad aglutinante y acción antioxidante, lo que hace aplicables en diversas industrias, como la alimentaria, farmacéutica, textil, agrícola, de tratamiento de aguas y cosmética (Domard, 2011; Kim y Thomas, 2007; Kong *et al.*, 2010, López-Caballero *et al.*, 2005; Ramezani *et al.*, 2014). Además, este biopolímero es conocido por ser un material natural con excelentes propiedades fisicoquímicas, gentil con el medio ambiente y bioactivo (Abdeltwab *et al.*, 2019).

En la agricultura, la aplicación del quitosán ejerce un impacto positivo en las plantas, aumentando la actividad fotosintética, la resistencia a condiciones adversas como sequía, salinidad, temperaturas extremas, y una mayor activación de enzimas antioxidantes y genes de defensa (Shahrajabian *et al.*, 2021).

Su efectividad y comportamiento depende de factores como: masa molecular, grado de acetilación, célula huésped, presencia de nutrientes, composición química o nutricional de los sustratos y condiciones ambientales (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2021).

Habría que mencionar, que la administración exógena del quitosán mejora la conductancia estomática, incrementa el contenido de ácido abscísico (ABA) y disminuye la transpiración en las plantas sin alterar su altura, área foliar, altura de la raíz o biomasa, también optimiza la capacidad de retención de agua del suelo (Román-Doval *et al.*, 2023).

Estas cualidades únicas del biopolímero de quitosán se pueden potenciar aún más al usarlo en forma de nanopartículas, incluso es más estable y menos tóxico (Chandra *et al.*, 2015), debido a que exhiben dimensiones de 1 a 100 nanómetros, o en algunos casos hasta 800 nm (Divya & Jisha, 2018). En un estudio realizado por Chandra *et al.*, (2015), revelaron que la aplicación de nanopartículas de quitosán (CNP) en hojas de *Camellia sinensis* mostró una respuesta de defensa mejorada y la acumulación de enzimas de defensa. También es importante mencionar que las nanopartículas de quitosán ejercen una notable actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias patógenas (Kong *et al.*, 2010; Maluin & Hussein, 2020). Por ejemplo, hongos como *Pyricularia grisea*, *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*, y bacterias como gram positivas y gram negativas, y otras plagas de insectos como *Aphis gossypii*, *Callosobruchus chinensis* y *Callosobruchus maculatus* (Ingle *et al.*, 2022).

2.8 Yodo

El yodo es un elemento no esencial para las plantas terrestres, sin embargo, estudios han demostrado que pueden absorber y almacenar este elemento (Mackowiak y Grossl, 1999; Zhu *et al.*, 2003; Leija-Martínez *et al.*, 2016). Se ha comprobado que las plantas absorben preferentemente el yodo a través de sus raíces en forma de yoduro (I^-), en lugar de yodato (IO_3^-), aunque las dosis excesivas de esta forma de yodo pueden afectar negativamente la biomasa (Mackowiak y Grossl 1999; Zhu *et al.*, 2003; Smolen *et al.*, 2011). Por lo que han realizado numerosos estudios sobre la aplicación de yodo en diversas especies de plantas con el objetivo de biofortificar los cultivos. Los hallazgos reportados en la literatura son variables según la concentración aplicada, la forma química utilizada y el sistema de producción adoptado (Medrano-Macías *et al.*, 2016). Así mismo, la aplicación foliar de soluciones de agua es la forma más fácil de biofortificar cultivos con yodo. Este método es más eficiente cuando se aplica a vegetales de hoja (Lawson *et al.*, 2015; Duborská *et al.*, 2020).

Por otro lado, el yodo es un oligoelemento vital para la biosíntesis de las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), que son esenciales para el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) y de órganos como el hígado, los riñones, los músculos y el cerebro

(Lee, 2021; Sangerman-Jarquín *et al.*, 2023). A nivel mundial, se estima que 2 mil millones de personas sufren de deficiencia de yodo, con 50 millones mostrando síntomas clínicos (Biban & Lichiardopol., 2017). El requerimiento diario normal para la ingesta dietética es de 100-150 μg de yodo, pero esta demanda se incrementa en el embarazo a al menos 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Lazarus, 2015).

El yodo (en forma de yoduro) presenta una distribución extensa, pero muestra una gran variabilidad en su concentración y dispersión en el medio ambiente, pero es más pronunciada en áreas montañosas y llanuras (Zimmermann & Trumbo, 2013). La causa principal de la deficiencia de yodo son los bajos niveles de este elemento en los alimentos cultivados de suelos que están agotados de yodo, a menudo como resultado de la glaciación y la lixiviación de las inundaciones (Charlton & Skeaff, 2011). Así mismo, se han llevado a cabo múltiples estrategias para abordar la insuficiencia del consumo de yodo, la sal ha sido el vehículo alimenticio más común para la fortificación con yodo, pero algunos países optan por la yodación de alimentos individuales como el pan (Charlton & Skeaff, 2011). No obstante, a través de los años se ha demostrado que esta técnica por sí sola es insuficiente para asegurar el requerimiento total de yodo (De Benosit *et al.*, 2008; Velasco, 2019). De igual forma se ha demostrado que el yodo en la sal de mesa se volatiliza (Laillou *et al.*, 2015; Sangerman-Jarquín *et al.*, 2023). Por ello, es necesario impulsar técnicas como la biofortificación de los cultivos para garantizar una ingesta suficiente de yodo, ya sea como complemento o como alternativa a la yodatización de la sal de mesa (Sangerman-Jarquín *et al.*, 2023).

Por lo que es imprescindible ampliar el conocimiento sobre los beneficios del yodo en la reducción del estrés y su impacto en la salud, también se ha considerado la posibilidad de que el yodo sea un inductor de tolerancia a ciertos patógenos al activar o modificar los sistemas de defensa de la planta a través de señales redox o mediante cambios químicos en la cutícula (Shaw *et al.*, 2007; Medrano-Macías *et al.*, 2016).

2.9 Complejo de nanoquitosán-yodo

Los grupos amino catiónicos del quitosán forman complejos con aniones metálicos o pequeñas moléculas aniónicas con carga múltiple como sulfatos, citratos y fosfatos (Dambies *et al.*, 2001; Rampino *et al.*, 2013). De tal modo que el quitosán es un biopolímero

complejante de oligoelementos, en este caso el yodo, que puede ser utilizado para fabricar compuestos con múltiples ventajas, entre ellas una alta biodegradabilidad (Sangwan *et al.*, 2023; Sangerman-Jarquín *et al.*, 2023).

El quitosán es un polímero biodegradable de origen biológico que actúa como agente complejante de metales y metales traza. Además, desempeña una función de elicitador vegetal, estimulando el sistema de defensa de las plantas (Malerba y Cerana, 2016; Treviño-Ruiz *et al.*, 2024).

En el estudio realizado por Treviño-Ruiz *et al.*, (2024), se demostró que la aplicación foliar del complejo de nanopartículas de quitosán-yodo (NPsCs-I) en una concentración de 5 mg L⁻¹ de KIO₃ en condiciones de invernadero, mejoró significativamente el rendimiento del cultivo de lechuga. Además, la aplicación foliar de este complejo en diferentes formas químicas, así como de sales sin quitosán, aumentó la absorción de yodo en las hojas de la lechuga.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Síntesis de NPsCs y de los complejos NPsCs-I

Para la síntesis de las nanopartículas de Cs se utilizó el método de gelificación ionotrópica reportado por Manikandan y Sathiyabama (2016). La cual se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA). Se utilizó quitosán de la marca Marine Chemicals (Marine, Hydrocolloids, Kerala, India). Se disolvió el quitosán (peso molecular viscosimétrico de $200\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ y un grado de desacetilación del 84%) al 0.5% (p/v) con ácido acético al 1% (v/v). La formación de las NPsCs se realizó por la adición de tripolifosfato (TPP), el cual se disolvió en agua a una concentración de 0.5 % (p/v). Para preparar las NPsCs se agregaron 300 mL de Cs y 90 mL de TPP en una relación 10:3 (Cs:TPP) con un tiempo de reacción de 2 h y agitación continua a 51 g. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 10 196 g durante 15 minutos a una temperatura de 5°C. El precipitado se lavó dos veces con agua desionizada para eliminar las sustancias sin reaccionar, centrifugándose 2 veces a 31 752 g durante 15 min a temperatura de 5°C. Finalmente, el precipitado obtenido fue liofilizado.

Para preparar el complejo de nanopartículas con sales de yodo se realizó el procedimiento anterior agregando a la solución 240 mL de las sales de yoduro de potasio (KI) y yodato de potasio (KIO_3) a concentración de 0.1 M, respectivamente. Este procedimiento se realizó inmediatamente después de añadir el TPP.

Para preparar las dispersiones de los complejos de NPsCs-I a una concentración de $5\ \text{mg L}^{-1}$ y $25\ \text{mg L}^{-1}$ de I^- o IO_3^- se tomó 1 g del complejo. Posteriormente, se dispersaron en el ultrasonido durante 3 minutos a una amplitud del 50% por tres veces. Adicionalmente, se prepararon las soluciones de sales de KI y KIO_3 . El tamaño de las NPsCs fue de 140-440 nm y de los complejos NPsCs-I con KI de 60-200 nm y con KIO_3 de 80-400 nm, presentando todas las nanopartículas una forma esférica.

3.2 Desarrollo del cultivo

El experimento se estableció en un invernadero tipo capilla del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio durante los meses de febrero a mayo de 2022. La temperatura promedio fue de 28°C y 50 a 60 % de humedad relativa. Se utilizaron semillas de lechuga de la variedad Great Lakes. Las semillas fueron sembradas en charolas de germinación. A los 30 días fueron trasplantadas a macetas de 10 L, utilizando una mezcla de peatmoss y perlita en proporción 1:1 (v/v) como sustrato, además se adicionó un 10 % de vermiculita. La aportación de agua y fertilizantes se realizó mediante un sistema de riego por goteo. Se aplicó una solución nutritiva al riego, empezando con una dosis del 25% de solución Steiner (1961), la cual se incrementó hasta el 100% durante las diferentes etapas fenológicas del cultivo.

3.3 Preparación del inóculo

El inóculo de *Bremia lactucae* se preparó mediante el lavado con agua destilada de hojas de lechuga infectadas por el hongo. Mediante este lavado se recolectaron las esporas del hongo (Parra *et al.*, 2015; Yañez *et al.*, 2012). Para ello se tomó material contaminado (tres lechugas), se picó y sumergió en un balde con 4 L de agua destilada durante un lapso de 2 horas y posteriormente se realizó el conteo de esporas utilizando un microscopio óptico para determinar el número de esporas. Finalmente, al inóculo se agregaron cuatro gotas de Tween-20 por cada litro del preparado (Abdel-Maksoud y Farouk, 2017). En el caso de esta investigación el inóculo fue aplicado sobre las plantas con ayuda de un atomizador inmediatamente después del conteo de esporas.

La inoculación artificial con *B. lactucae* se realizó a los 20 DDT, inoculando las hojas con 4.15×10^7 esporas mL⁻¹ del hongo fitopatógeno siguiendo la metodología de Attia *et al.*, (1990). Se realizó una segunda inoculación con 3.2×10^7 esporas mL⁻¹ 15 días después de la primera inoculación para asegurar la infección en el cultivo.

3.4 Aplicación de los tratamientos

Durante el ciclo del cultivo se realizaron cinco aplicaciones de manera foliar de los tratamientos (Cuadro 1), siendo la primera aplicación al momento del trasplante y posteriormente cada 15 días.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados al cultivo de lechuga inoculado con *Bremia lactucae*.

TRATAMIENTO	
T0	Testigo absoluto (sin patógeno)
T1	Testigo infectado (con patógeno)
T2	NPsCS (con patógeno)
T3	Yoduro de potasio 5 mg L ⁻¹ (con patógeno)
T4	Yoduro de potasio 25 mg L ⁻¹ (con patógeno)
T5	Complejo de NPsCS-I con 5 mg L ⁻¹ KI (con patógeno)
T6	Complejo de NPsCS-I con 25 mg L ⁻¹ KI (con patógeno)
T7	Yodato de potasio 5 mg L ⁻¹ (con patógeno)
T8	Yodato de potasio 25 mg L ⁻¹ (con patógeno)
T9	Complejo de NPsCS-I con 5 mg L ⁻¹ KIO ₃ (con patógeno)
T10	Complejo de NPsCS-I con 25 mg L ⁻¹ KIO ₃ (con patógeno)

NPsCS-I.-complejos de nanoquitosán-yodo; KI.-yoduro de potasio y KIO₃.yodato de potasio.

3.5 Diseño experimental

El experimento se estableció en un diseño de bloques completos al azar. Cada bloque consistió en 9 tratamientos, un testigo absoluto y un testigo infectado. La unidad experimental constó de seis plantas y se tuvieron en total tres bloques.

3.6 Variables evaluadas relacionadas con la tolerancia al estrés por patógenos en hojas

3.6.1 Recolección de muestras

Se determinó la actividad de las enzimas quitinasa, β -1,3 glucanasa y fenilalanina amonio liasa (PAL), así como la incidencia y severidad del patógeno. Las determinaciones en el laboratorio se realizaron en hojas correspondientes a 3 muestreos. El primer muestreo se realizó a las 24 h después de la tercera aplicación de tratamientos, el segundo muestreo a las 24 h después de la cuarta aplicación y el tercer muestreo 24 h después de la quinta aplicación de tratamientos, el cual corresponde al final del ciclo del cultivo.

En cada muestreo, se colectaron muestras compuestas de dos individuos por unidad experimental y por tratamiento. Se utilizó nitrógeno líquido para congelar las muestras de hojas, posteriormente se almacenaron en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se liofilizaron en el Centro de Investigación de Química Aplicada bajo condiciones de presión y temperatura de 0.420 mBar y $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente, durante 48 horas. Las muestras fueron molidas y almacenadas para su posterior análisis en laboratorio.

3.6.2 Extracción de enzimas

Se procedió a la extracción con una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 mol L^{-1} y pH 5.2 para la determinación de las actividades β - 1,3 glucanasa y quitinasa. Se tomaron 100 mg de la muestra liofilizada y se añadieron 2 mL de buffer. Posteriormente se agitó en vortex por 5 segundos, se llevó a sonicación durante 5 min, se centrifugo a 12,500 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se extrajo con jeringas y se filtró con filtro pirinola de 45 micras de diámetro de poro.

3.6.3 Actividad quitinasa

Para esta determinación se adicionaron 500 μL solución amortiguadora de ácido cítrico 0.1 M y fosfato de sodio 0.1 M a pH 5.2 a 250 μL del extracto enzimático (dilución 1:1) y se le agregaron 250 μL de quitina coloidal 0.5%. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos. La reacción se detuvo al calentarla a ebullición por 5 minutos. Se determinó el incremento de azúcares reductores por la técnica de Miller (1959), agregando

1 mL de DNS, y se calentó durante 2 minutos, deteniendo la reacción con un baño de agua fría durante 5 minutos, posteriormente se agregaron 5 mL de agua destilada y se agito en vórtex por 30 segundos, se dejó reposar 5 minutos y se leyó en espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm. La actividad enzimática se expresó como la producción de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de glucosa por minuto (Rodríguez-Pedroso, *et al.*, 2006).

3.6.4 Actividad glucanasa

A 200 μL de sustrato laminarina de 1 mg mL^{-1} se le agregaron 100 μL de solución amortiguadoras de acetato de sodio 0.1 M a pH 5.2 y 100 μL de extracto enzimático, las muestras se incubaron a 40°C durante 30 minutos. La actividad enzimática se determinó por la medición del nivel de producción de azúcares reductores (Miller, 1959) agregando 1 mL de DNS, y se calentó durante 4 minutos, deteniendo la reacción con un baño de agua fría durante 5 minutos, posteriormente se agregaron 5 mL de agua destilada y se agito en vórtex por 30 segundos, se dejó reposar 5 minutos y se leyó en espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm. La actividad enzimática se expresó en términos de producción de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de glucosa por minuto (Rodríguez-Pedroso, *et al.*, 2006).

3.6.5 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)

El extracto enzimático para esta determinación se obtuvo añadiendo 1.5 mL de buffer de fosfatos 0.1 M y pH 7.2 a 100 mg de muestra liofilizada, se sonicó por 10 min, posteriormente se sometió a centrifugación a 12,000 rpm por 10 min a 4°C , el sobrenadante se recolectó y se filtró con membrana de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro (Ramos *et al.*, 2010).

La actividad de la enzima PAL se determinó siguiendo la metodología de Syklowska-Baranek *et al.*, (2015), con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo se colocaron 100 μL del extracto (dilución 1:1 con el buffer de fosfatos) 900 μL de L-fenilalanina a 6 mM. Se incubó a 40°C por 30 minutos, la reacción se detuvo agregando 250 μL de HCl al 5 N. Se colocaron en baño de hielo y se les agregaron 5 mL de agua destilada. Finalmente, se determinó la absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro UV-VIS con una celdilla de cuarzo. Las lecturas de las diferentes muestras fueron interpoladas en la ecuación obtenida de la curva de calibración con ácido transcinámico (100 ppm).

Los resultados se expresaron como Unidades (U), siguiendo la siguiente fórmula:

$$PAL = \frac{Vo \mu M \left(\frac{6.25 (mL)}{0.1 (mL)} \right) \left(\frac{1}{t} \right)}{Proteínas\ totales \frac{g}{kg}} = U$$

U que equivale a la producción de μM de ácido transcinámico por minuto por proteínas totales ($g\ kg^{-1}$), donde:

$$U = \frac{\mu M * min}{\frac{g}{kg}}$$

3.6.6 Proteínas totales

La cuantificación de proteínas se determinó mediante la técnica colorimétrica de Bradford (1976), se tomaron 0.1 mL del extracto enzimático y se agregó 1 mL del reactivo Bradford. Se dejó reposar durante 5 min y 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 mg mL^{-1}). Los resultados se expresaron como $g\ kg^{-1}$ de proteínas totales en peso seco.

3.7 Análisis de expresión de genes por RT-qPCR

3.7.1 Toma de muestra

Para el análisis de expresión de genes las muestras de hojas de lechuga se colocaron en bolsas de aluminio sumergiéndola inmediatamente en N_2 líquido, posteriormente se almacenaron a $-80^\circ C$ para su uso en el análisis de expresión génica.

3.7.2 Extracción de ARN por el método de trizol

Se pulverizaron las muestras con N_2 líquido, se pesaron 100 mg de la muestra pulverizada y se colocó en un tubo de 2 mL, inmediatamente se agregó 1 mL de TRI reagent (MCR, Cat: TR 118) y se homogenizó suavemente, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, después se agregó 200 μL de cloroformo y se agitó vigorosamente hasta obtener un aspecto lechoso, seguido se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se

centrifugo las muestras a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, como siguiente paso se adicionó 500 µL de isopropanol frío, seguidamente se mezcló suavemente y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, una vez finalizado el tiempo, se volvió a centrifugar las muestras a 12 rpm por 10 minutos a 4 °C, cumplido el tiempo se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ARN formada, como siguiente paso se lavó la pastilla de ARN con 500 µL de etanol frío (70%) haciendo ligeras inversiones del tubo, en consecutiva se removió el sobrenadante y la pastilla de ARN se dejó secar durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente, la pastilla de ARN se suspendió en 50 µL de agua FORMAZOL® disolviéndola a 60°C y la solución final se almacenó a 4°C.

3.7.3 Tratamiento con DNasa

Para obtener ARN es crucial eliminar el ADN en las muestras, para ello se realizó un tratamiento utilizando DNasa, en un tubo estéril se agregaron 8 µL de ARN, 1 µL de 10x reaction buffer, 1µL de DNasa, posteriormente se aplicó agitaciones suaves “tomando y regresando el volumen”, seguido se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se añadió 1 µL de solución stop para unir los iones de calcio y magnesio e inactivar la DNasa, después, las muestras fueron sometidas a una temperatura de 70 °C durante 10 minutos, como último paso se dejaron enfriar las muestras en un baño de hielo.

3.7.4 Cuantificación de ARN

Se cuantificó el ARN extraído por medio del espectrofotómetro. Inicialmente se preparó un blanco que consistió en 2 µL de FORMAZOL® y 198 µL de agua DEPC, en tanto que las muestras se prepararon usando 2 µL de ARN y 198 µL de agua DEPC, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm y se obtuvo el valor de R en el espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-VIS. Para calcular la concentración de ARN extraído se usaron las fórmulas siguientes:

Cuadro 2. Ecuaciones para determinar el contenido de ARN en muestra.

Absorbancia		R	$\mu\text{g/mL}$	μL totales (50 μL)
260	280	A_{260}/A_{280}	$A_{260} * 100 * 50$	$\mu\text{g/mL} * 0.05$

3.7.5 Calidad de ARN

Para medir la calidad del ARN se hace mediante una electroforesis desnaturalizante. Se necesitan tener los valores de cuantificación del ARN para realizar los cálculos de las muestras. Se prepara un gel de agarosa al 1.3 % de la siguiente manera: Se pesan 0.52 g de agarosa y se le agrega a un vaso de precipitado con 25 mL de agua DEPC, una vez que se disolvió la agarosa (mezcla transparente), se agregan 8 mL de MOPS y 7 mL de formaldehído, e inmediatamente se agrega la mezcla en el portagel junto con el peine (cuidando que no queden burbujas). Se deja solidificar (30 minutos).

En tubos de 0.6 mL se preparan las muestras como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Preparación de muestras.

Muestra	μL de muestra (2 ug)	μL de agua DEPC	μL de buffer loading (buffer de carga)
	No debe de pasar de 5 μL	Utilizar en caso que se requiera aforar la muestra a 5 μL	Siempre son 5 μL
	En total 5 μL		

Cuando se tenga cada muestra en su tubo, el agua y el buffer loading (buffer de carga) se incuban a 60 °C por 10 min, inmediatamente después se dejan a 4 °C para enfriarse.

La cámara se conecta a la fuente de poder, y se deja correr a 70 volts por 1 hora 20 minutos. Se saca el gel de la cámara con cuidado y se coloca en el transiluminador para ver las bandas. Se toma la foto y se guarda en la computadora del transiluminador y en una memoria USB.

3.7.6 Síntesis de c-DNA

Se utilizó el kit de síntesis de cDNA SensiFAST™ de Bioline (BIO-65053). En un tubo de 200 µL se colocaron 2 µg de ARN, 4 µL de 5X TransAmp Buffer, 1 µL de RT (Reverse Transcriptase) aforando a 20 µL con agua grado biología molecular. Se mezcló para homogeneizar. Finalmente se colocaron en termociclador (AXYGEN modelo MaxigGene II) bajo las siguientes condiciones: 25 °C por 10 min, 42°C por 15 min, 48 °C por 15 min, 85°C por 5 min y 4 °C de HOLD. El cDNA obtenido se guardó a -20 °C.

3.7.7 Preparación de primers

Los primers utilizados se describen en el Cuadro 4. Inicialmente se centrifugó el par de primers en microcentrífuga a máxima velocidad por 15 min, enseguida se añadió agua grado biología molecular de acuerdo a las especificaciones técnicas de cada primer obteniéndose la solución madre que se almacenó a -20°C.

Solución de trabajo: se preparó una solución de trabajo 15 pMol a partir de la solución madre de primers utilizando la fórmula $C_1C_2=V_1V_2$, donde:

C_1 = solución stock (100pMol)

V_1 = volumen requerido ¿?

C_2 = solución de trabajo (15pMol)

V_2 = volumen deseado (50µL)

Por lo tanto: $V_1 = (15 \text{ pMol}) (50\mu\text{L}) / 100 \text{ pMol} = 7.5 \mu\text{L}$

Por lo tanto, en un tubo de 500 µL se colocaron 7.5 µL de la solución madre del primer y 42.5 µL de agua DEPC y se homogenizo. La solución de trabajo se almacenó a -20°C.

Cuadro 4. Secuencia de primers utilizados.

Gen	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	°TA
LOX	GCAACTAAGCGTGCTTCACCCAAT	TGCCTCAAGAAGACCTCCACCATT	60 °C
PR1	ATGGGACAGTCGTGTGGCTAGTTT	TGTTACAGCATCTACACCGGTCA	60 °C
APT1 (endógeno)	CTGTACAAGAAGGAGAACGAGC	ACGAGCACATACAGTGGCTT	60 °C

3.7.8 Prueba de concentración de primers qPCR

Después de seleccionar la temperatura de anillamiento para el par de primers se realizó una prueba para determinar la concentración adecuada del primer para qPCR. Se inició probando una concentración de 100 nM esperando un buen producto de amplificación y nula formación de estructuras inespecíficas.

Se seleccionó el método de cuantificación de Doble Delta CT. Una vez preparada la reacción la tira de tubos de reacción rápida fue colocada en la placa y se corrió la qPCR con el siguiente programa en el termociclador: hot start 95°C por 10 min, 40 ciclos: 95°C por 15 s, temperatura iniciador 60 °C por 1 m, 95°C por 15 s, Melting 60°C por 1 min y 95°C por 15s.

3.8 Análisis estadístico

Se hizo una prueba de normalidad a los resultados del análisis de expresión de genes y actividad enzimática utilizando la prueba de Kolmogorob –Smirnov. Como los datos no eran normales se utilizó una alternativa no paramétrica, como el análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis. Lo anterior se llevó a cabo en el software Minitab versión 17.1.0.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Actividad enzimática y proteínas

4.1.1 Actividad quitinasa

La actividad enzimática de la quitinasa en las muestras sometidas a los distintos tratamientos no mostró resultados significativos cuando se compararon con el testigo absoluto (T0). Para evaluar estas diferencias, se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados obtenidos de esta prueba indicaron que no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados.

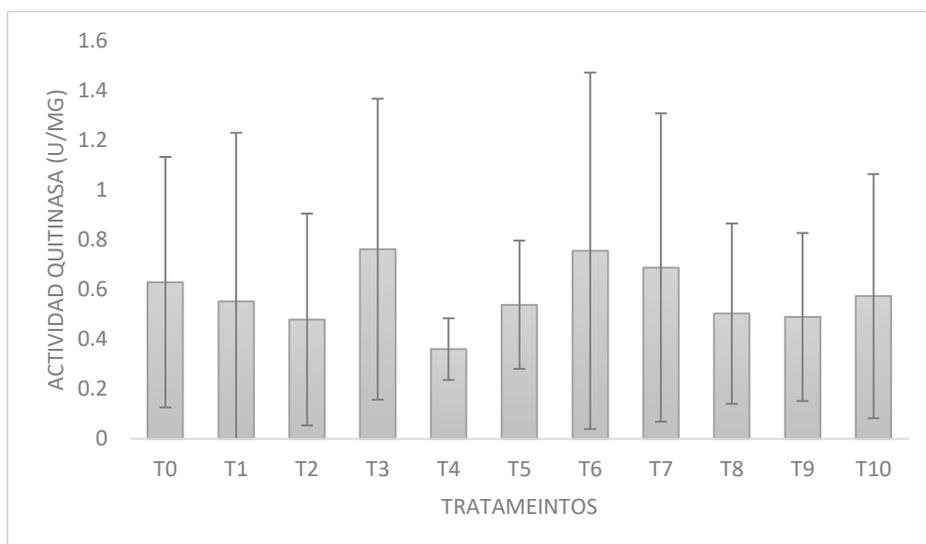


Figura 2. Análisis de la actividad enzimática quitinasa en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).

La producción de quitinasas en las plantas, las cuales se acumulan en el apoplasto o en las vacuolas, juega un papel importante en la defensa contra factores bióticos y abióticos, además de participar en varios procesos fisiológicos de la planta (Sahai y Minocha; 2011; Lucas-Bautista *et al.*, 2022).

Los hongos patógenos de plantas tienen quitina en su pared celular. Por lo tanto, las quitinasas actúan sobre esta área para descomponer el hongo. Estas enzimas responden defensivamente al ataque de estos hongos, impidiendo la germinación de esporas, reduciendo la longitud de los tubos germinativos y degradando los extremos de las hifas (Ntui *et al.*, 2011; Lucas-

Bautista *et al.*, 2022). Por lo tanto, el quitosán y las NPs son conocidos como inductores potenciales para mejorar la defensa en las plantas ante el estrés, dando como resultado una acumulación de metabolitos relacionados con la defensa (Zhang & Liu, 2015; Usman *et al.*, 2020, Rivera-Jaramillo *et al.*, 2021), así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el aumento de la actividad de proteínas involucradas en la defensa (González-Peña *et al.*, 2014; Rivera-Jaramillo *et al.*, 2021). Así mismo, un estudio realizado por Rodríguez-Pedroso *et al.*, (2006) en plantas de arroz tratadas con quitosán mostró valores de actividad enzimática de 2-3 veces superiores a los de los testigos. Esto contrasta con los resultados obtenidos en el presente estudio, en el que la actividad enzimática de la quitinasa no presentó diferencias significativas con el testigo absoluto, al igual que la actividad de la glucanasa.

4.1.2 Actividad glucanasa

La actividad enzimática de la glucanasa en las muestras sometidas a distintos tratamientos no presentó diferencias significativas cuando se comparó con el testigo absoluto (T0). Para evaluar estas diferencias, se empleó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados de esta prueba indicaron que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados

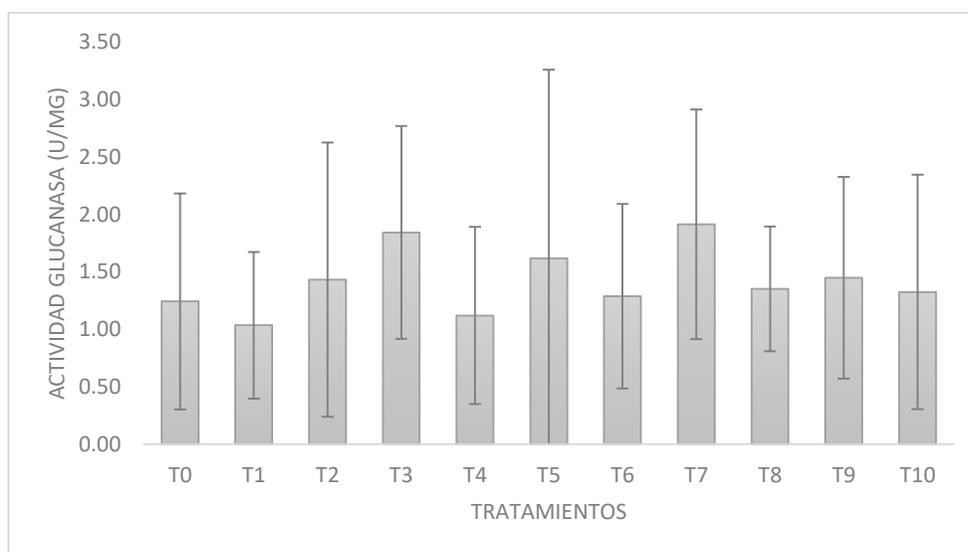


Figura 3. Análisis de la actividad enzimática glucanasa en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).

La inducción de resistencia en las plantas está asociada con enzimas de defensa como β -1,3-glucanasa, fenilalanina amonio-liasa (PAL), quitinasa, etc. La β -1,3-glucanasa y la quitina son polisacáridos principales en muchas paredes celulares de hongos. Las quitinasas (EC 3.2.1.14) y β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39) pueden atacar a los patógenos fúngicos en la pared celular, lo que sugiere que participan en la resistencia de las plantas contra los patógenos fúngicos (Appu *et al.*, 2021). Investigaciones en plantas como *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* y *Capsicum annuum* han demostrado que cuando son atacadas por patógenos como *Perenospora tabacina*, *Phytophthora infestans* y *Phytophthora capsici*, respectivamente, aumenta la actividad de las β -1,3-glucanasas y quitinasas (Egea *et al.*, 1996; Couoh *et al.*, 2009).

Las β -1,3-glucanasas protegen a las plantas de dos maneras: 1) Hidrólisis del enlace β -1,3/1,6-glucano presente en las paredes celulares de los patógenos, lo que los hace más vulnerables a la lisis y a otras respuestas de defensa de la planta, 2) Liberación de oligosacáridos de β -1,3/1,6-glucano a partir de las paredes del patógeno, que inducen una amplia gama de respuestas de defensa en la planta (Rose *et al.*, 2002; Couoh *et al.*, 2009).

4.1.3 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)

Los distintos tratamientos no mostraron diferencias significativas en la actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL), en comparación con el testigo absoluto (T0). Para evaluar estas diferencias, se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados obtenidos de esta prueba indicaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos aplicados.

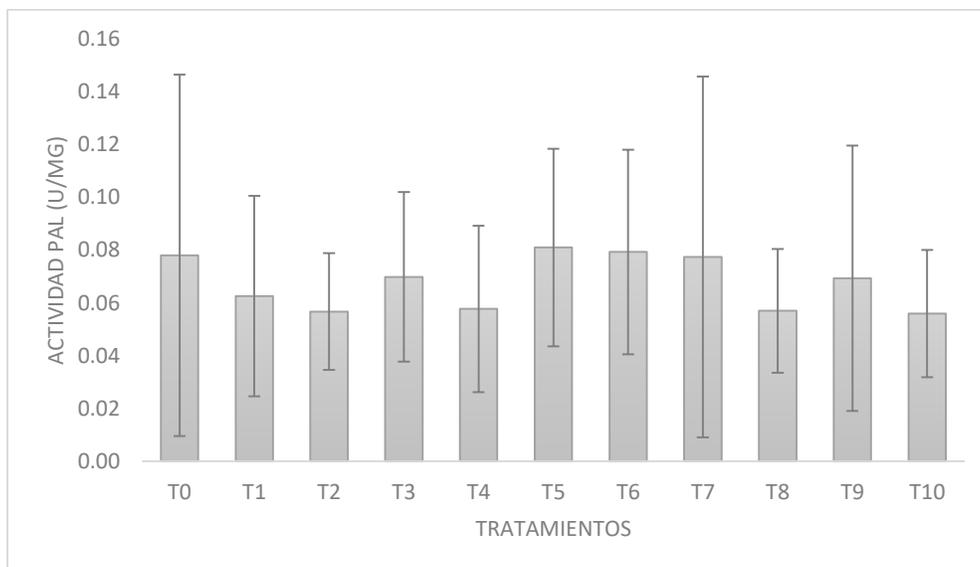


Figura 4. Análisis de la actividad enzimática de PAL en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPcCS-I).

La enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) EC. 4.3.1.25 catalizan la desaminación de L-fenilalanina para formar ácido trans-cinámico, el cual es un precursor en la biosíntesis de varios compuestos fenilpropanoides, como la lignina, AS, y fitoalexinas, que participan en la defensa de las plantas (Duan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019).

PAL ha sido objeto de numerosos estudios. Su actividad se incrementa durante el desarrollo y en respuesta a diversas señales ambientales, tales como ataques de patógenos, daños en los tejidos, radiación ultravioleta, exposición a metales pesados, temperaturas bajas y niveles reducidos de nutrientes como nitrógeno, fosfato o ciertos iones (Dixon y Paiva, 1995; Weisshaar y Jenkins, 1998; Zhang & Liu, 2015). Diversos estudios han demostrado que las nanopartículas de quitosán pueden inducir respuesta enzimática en plantas. Falcón et al, (2002) observaron que la aplicación de quitosán a las raíces de plántulas de tabaco aumentó la actividad de PAL, lo que proporcionó protección contra *Phytophthora nicotianae*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la falta de diferencias significativas sugiere que las nanopartículas de quitosán-yodo no tienen un impacto considerable en la actividad de las enzimas glucanasa, quitinasa y fenilalanina amonio liasa (PAL) bajo las condiciones experimentales utilizadas y en el momento del muestreo. Esto contrasta con estudios previos

que han demostrado la capacidad de las nanopartículas de quitosán para inducir respuestas enzimáticas en plantas. Por ejemplo, Divya *et al.* (2020) observaron que en las hojas de plantas de arroz tratadas con nanopartículas de quitosán (ChNP), los niveles de enzimas de defensa aumentaron rápidamente, alcanzando su punto máximo. En estas plantas, los niveles de β -1,3-glucanasa, fenilalanina amonio-liasa (PAL) y quitinasa fueron significativamente más altos en comparación con las plantas tratadas solo con quitosán. Así mismo, nuestros resultados no coinciden con estos hallazgos.

4.1.4 Proteínas totales

El análisis de los niveles de proteínas totales en las muestras sometidas a los distintos tratamientos no reveló diferencias significativas en comparación con el testigo absoluto (T0). De acuerdo a la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

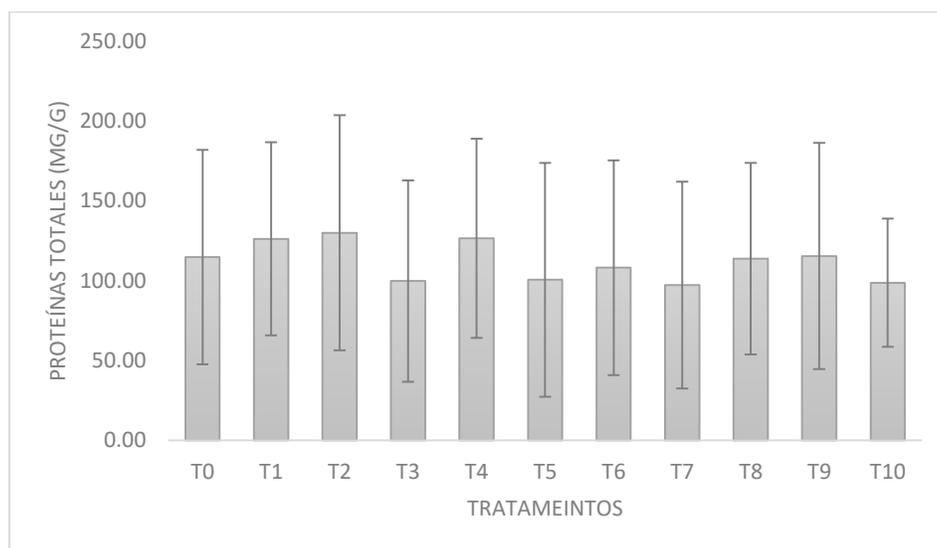


Figura 5. Análisis de proteínas totales en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).

En un estudio realizado por Ramírez-Rodríguez *et al.*, (2023), se observó que la aplicación foliar de nanopartículas de quitosán (NPsCS) tuvo un impacto positivo en las proteínas, alcanzándose la mayor concentración de proteínas con este tratamiento. Sin embargo, en este estudio, las nanopartículas de quitosán-yodo no mostraron un efecto significativo en el nivel

de proteínas totales, por ello, habría que mencionar que la eficacia de los tratamientos con quitosán en la resistencia a enfermedades podría variar dependiendo de factores tales como las propiedades del quitosán, el método de aplicación, la dosis y las condiciones ambientales.

4.2 Análisis de expresión de genes por RT-qPCR

4.2.1 Rendimiento de ARN

De acuerdo a los resultados obtenidos del rendimiento de ARN, el grado de pureza de las muestras presentó valores adecuados, con una relación pureza (R) de 1.520 a 1.269, con rendimientos de 110.25 a 46.583, esto se refiere a la cantidad total de ARN obtenido que se recuperó en las muestras (ug/totales), cabe mencionar que dichas muestras fueron factibles para el siguiente procedimiento en el cual se evaluó la calidad del ARN, mediante electroforesis.

Cuadro 5. Rendimiento de ARN en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).

Tratamiento	A ₂₆₀	A ₂₈₀	R	µg/mL	µg/totales
T0	0.285	0.200	1.423	1425	71.25
T1	0.186	0.145	1.282	932	46.583
T2	0.368	0.265	1.390	1840	92
T3	0.231	0.173	1.337	1157	57.833
T4	0.255	0.201	1.269	1273	63.667
T5	0.363	0.240	1.515	1815	90.75
T6	0.441	0.318	1.385	2205	110.25
T7	0.313	0.224	1.394	1563	78.167
T8	0.363	0.239	1.520	1813	90.667
T9	0.236	0.171	1.381	1178	58.917
T10	0.277	0.187	1.486	1387	69.333

4.2.2 Calidad de ARN

En base a los resultados obtenidos en el análisis electroforético realizado a las muestras de ARN, que fueron extraídas de las hojas de lechuga, la mayor parte de las bandas ofrece una buena visualización, por lo que la intensidad de las bandas de ARN es proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra, con base a eso podemos describir lo siguiente. En todas las réplicas de los tratamientos se logró observar bandas claras, el grado de intensidad de la banda tiene que ver con la cantidad de ARN presente (Fig. 6).

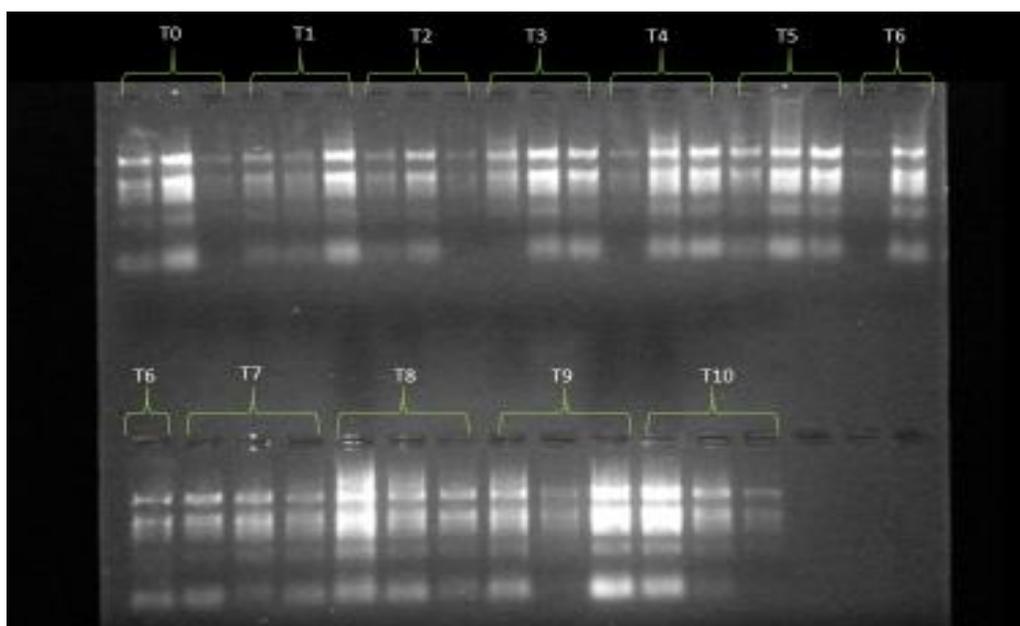


Figura 6. Análisis electroforético de muestras de ARN, de hojas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).

4.2.3 Expresión del gen PR1

La aplicación de complejos de nanoquitosán-yodo a las plantas de lechuga, así como la inoculación de *Bremia lactucae*, desencadenó una sobreexpresión del gen PR1. Por ello, en el análisis de la expresión de dicho gen, la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre tratamientos. El tratamiento T5 (Complejo de NPsCS-I con 5 mg L⁻¹ KI) mostró una expresión 6 veces más que el testigo absoluto T0 (testigo absoluto), al igual que el tratamiento T6 (Complejo de NPsCS-I con 25 mg L⁻¹ KI) mostró una expresión 6.3 veces más que el testigo absoluto (T0).

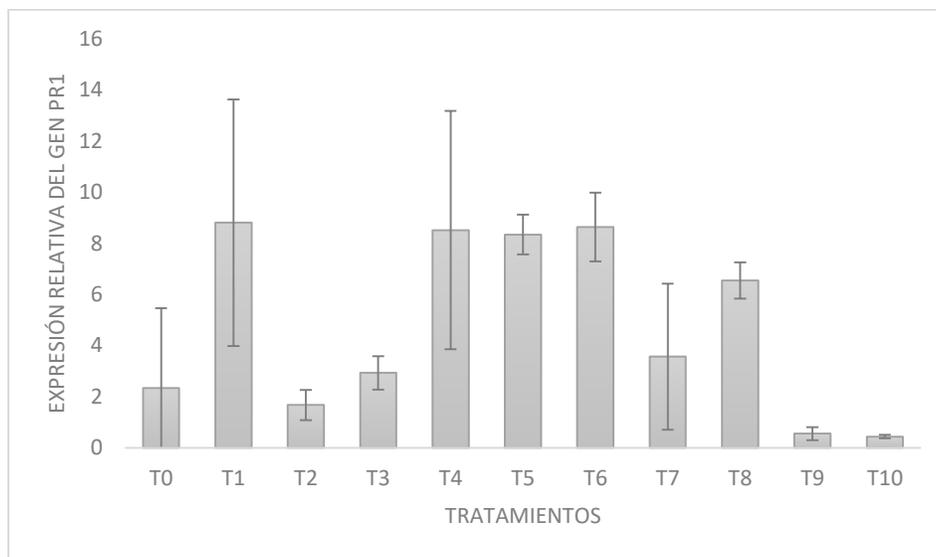


Figura 7. Análisis de expresión del gen PR1 en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).

La presencia de las proteínas PR se encuentran en todas las especies de plantas y funcionan como componentes centrales de la defensa innata inducible ante el estrés biótico y abiótico (van Loon *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2023). Por ello, la expresión génica de las proteínas PR juega un papel fundamental para la protección de las plantas contra enfermedades (Brederode *et al.* 1991; Jain & Khurana, 2018).

Las PR, definidas como proteínas codificadas por la planta huésped, pero inducidas específicamente en situaciones patológicas o relacionadas, no solo se acumulan localmente en la hoja infectada, sino que también se inducen sistémicamente, asociados con el desarrollo de resistencia sistémica adquirida (SAR) contra una mayor infección por hongos, bacterias y virus (Van Loon & Van Strien., 1999). La PR-1 es un grupo dominante de PRs inducidas por patógenos o SA (ácido salicílico), y se emplea comúnmente como marcador de la SAR.

En base a los resultados obtenidos, estos hallazgos sugieren que las nanopartículas de quitosán-yodo pueden inducir una respuesta de defensa en las plantas al estimular la expresión de genes relacionados con la patogénesis. De manera similar, en un estudio realizado en plantas de tomate inoculadas con patógenos y tratadas con nanopartículas de quitosano (CNPs), se observó un notable aumento en la expresión del gen PR1 (Pathogenesis-Related protein 1), lo cual sugiere que las nanopartículas de quitosano pueden inducir una respuesta de defensa en las plantas de tomate (Chun & Chandrasekaran, 2018).

Así mismo, se ha demostrado que el mejor papel establecido de SA es como una molécula de señalización en la respuesta inmune de la planta (Vlot *et al.* 2009). Estudios en diferentes especies de plantas han revelado que la infección por patógenos conduce a la acumulación de SA en hojas infectadas y no infectadas (Malamy *et al.* 1990 ; Métraux *et al.* 1990; An & Mou, 2011) y que esta acumulación de SA a menudo está asociada con un aumento en la expresión de genes PR y el desarrollo de SAR (An & Mou, 2011).

4.2.4 Expresión del gen LOX

La aplicación de complejos de nanoquitosán-yodo en plantas de lechuga, junto con la inoculación de *Bremia lactucae*, provocó una notable sobreexpresión del gen LOX. Por este motivo, en el análisis de la expresión de dicho gen, la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre los tratamientos. Así mismo, el tratamiento T5 (Complejo de NPsCS-I con 5 mg L⁻¹ KI) mostró un incremento significativo de 11.19 veces en comparación con T0 (testigo absoluto), mientras que T9 (Complejo de NPsCS-I con 5 mg L⁻¹ KIO₃) presentó un aumento de 41.38 veces respecto al testigo absoluto (T0).

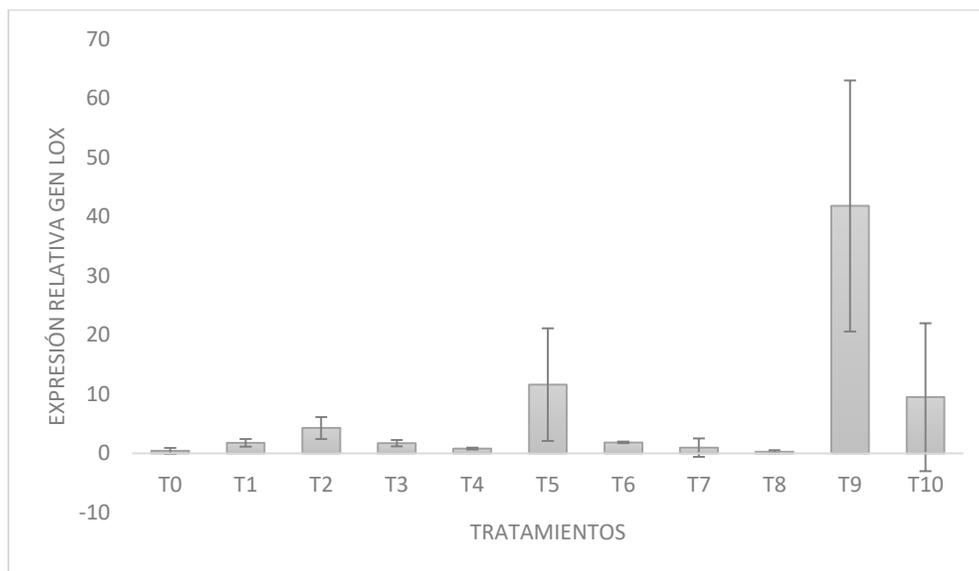


Figura 8. Análisis de expresión del gen LOX en plantas de lechuga tratadas con complejos de nanoquitosán-yodo (NPsCS-I).

Diversas enzimas juegan un papel clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Entre ellas, la familia de las lipooxigenasas (LOX), están ampliamente distribuidas en el reino animal y vegetal, lo que significa que dichas enzimas son cruciales en los sistemas biológicos (Liavonchanka y Feussner, 2006, Porta y Rocha-Sosa, 2002; Feng *et al.*, 2010). Las LOX están relacionados con diversas funciones importantes, como en la respuesta de la planta a heridas y a patógenos, en la contribución a la biosíntesis de ácido jasmónico (JA), en la germinación, y puede actuar como una proteína de almacenamiento y puede ayudar a degradar los cuerpos lipídicos almacenados (Porta & Rocha-Sosa, 2002). Dado que las plantas están expuestas a diversos factores ambientales como rayos UV, temperaturas extremas, insectos y ataques a patógenos. Estas situaciones estimulan la expresión del gen LOX en las plantas (Singh *et al.*, 2022). Varias moléculas de señalización llamadas oxipilinas son sintetizadas por la acción de las LOX, en particular, los compuestos volátiles C6 y los jasmonatos son las principales moléculas de señalización en las plantas y desempeñan un papel importante en su fisiología (Viswanath *et al.*, 2020). Conviene subrayar que el ácido jasmónico y sus derivados se denominan en general jasmonatos (JA). (Wang *et al.*, 2020).

Como se sabe, el ácido jasmónico (JA) es una biomolécula endógena en las plantas que exhibe funciones como, regulador del crecimiento, la maduración de la fruta, senescencia, tolerancia al estrés, el movimiento y el crecimiento reproductivo de las células vegetales (Rehman *et al.*, 2023). Como moléculas de señalización, los JA regulan la expresión de numerosos genes en respuesta a estreses abiótico como sal, sequía, metales pesados, toxicidad de micronutrientes, baja temperatura, entre otros, y promueven mecanismos de protección específicos (Ali & Baek, 2020).

En base a los resultados obtenidos, estos hallazgos sugieren que las nanopartículas de quitosán-yodo pueden inducir la sobreexpresión del gen LOX y el aumento en la actividad de la enzima podrían estar relacionados con la síntesis del ácido jasmónico, el cual juega un papel crucial en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico y biótico. Estos hallazgos son coherentes con los resultados de otros estudios. Vanda *et al.*, (2019) demostraron en cultivos de brotes de *Melissa officinalis* que el tratamiento con quitosán incrementa significativamente la actividad de la enzima lipooxigenasa (LOX) en todas las concentraciones probadas, en comparación con el grupo de control. Además, Li *et al.* (2012),

observaron que después de aplicar el tratamiento con quitosán, se produce una acumulación de productos derivados de las LOX en las plántulas de *Adelostemma Gracillimum* (Citado por Viswanath *et al.* (2020).

Asimismo, el AJ dirige las repuestas de la planta frente al estrés, estimulando el aparato de defensa de las plantas, que involucra principalmente fitohormonas y otros compuestos defensivos como las enzimas antioxidantes. Cabe mencionar que la AJ funciona de manera sinérgica y antagónica con ABA, ET, SA, y otras moléculas vegetales para adaptarse a limitaciones ambientales (Ghorbel *et al.*, 2021).

V. CONCLUSIÓN

Los resultados revelaron que, aunque no hubo diferencias significativas en la actividad de las enzimas analizadas (glucanasa, quitinasa, fenilalanina amonio liasa) respecto al testigo absoluto (T0), la expresión de los genes LOX y PR1 mostró resultados positivos en ciertos tratamientos.

- Específicamente, se observó un aumento significativo en la expresión del gen LOX en el tratamiento T5 (NPsCS-I con 5 mg L^{-1} KI) y en el tratamiento T9 (NPsCS-I con 5 mg L^{-1} KIO_3), con incrementos de 11.19 y 41.38 veces, respectivamente, en comparación con el testigo absoluto (T0).
- Asimismo, la expresión del gen PR1 fue significativamente mayor en el tratamiento T5 (NPsCS-I con 5 mg L^{-1} KI) y en el tratamiento T6 (NPsCS-I con 25 mg L^{-1} KI), con incrementos de 6 y 6.3 veces, respectivamente, en comparación al testigo absoluto (T0).

Además, podemos decir que la aplicación de nanoquitosán-yodo no sólo aumenta la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta, sino que también ofrece una estrategia potencial para la gestión de enfermedades en la agricultura. Por lo que se recomienda explorar otras aplicaciones de los complejos en diferentes cultivos para aumentar la resistencia a enfermedades y mejorar la sostenibilidad agrícola.

VI. LITERATURA CITADA

- Abdeltwab, W. M., Abdelaliam, Y. F., Metry, W. A., & Eldeghedy, M. (2019). Antimicrobial effect of chitosan and nano-chitosan against some pathogens and spoilage microorganisms. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 10(1), 8-15.
- Ali, A., & Kobayashi, M. (2014). Strategies to develop sustainable management of insect transmitted virus diseases. *Journal of General Plant Pathology*, 80(5), 375-384.
- Ali, M. S., & Baek, K. H. (2020). Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 621.
- An, C., & Mou, Z. (2011). Salicylic acid and its function in plant immunity F. *Journal of integrative plant biology*, 53(6), 412-428.
- Appu, M., Ramalingam, P., Sathiyarayanan, A., & Huang, J. (2021). An overview of plant defense-related enzymes responses to biotic stresses. *Plant Gene*, 27, 100302. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100302>
- Baltazar, M., Correia, S., Guinan, K. J., Sujeeth, N., Bragança, R., & Gonçalves, B. (2021). Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants: An Overview. *Biomolecules*, 11(8), 1096. <https://doi.org/10.3390/biom11081096>
- Bashir, M. A., Rehim, A., Raza, Q. U. A., Raza, H. M. A., Zhai, L., Liu, H., & Wang, H. (2021). Biostimulants as plant growth stimulators in modernized agriculture and environmental sustainability. *Technology in Agriculture*, 311.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1044-1051. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>

- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Berens, M. L., Berry, H. M., Mine, A., Argueso, C. T., & Tsuda, K. (2017). Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 401-425. DOI: [10.1146/annurev-phyto-080516-035544](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035544) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28645231/>
- Biban, B. G., & Lichiardopol, C. (2017). Iodine deficiency, still a global problem. *Current health sciences journal*, 43(2), 103.
- Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (2020). *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*. 2nd Edition. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-471-85191-2
- Bokszczanin, K. L., & Fragkostefanakis, S. (2013). Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Frontiers in Plant Science*, 4, 315. PMID: [PMC3750488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24883488/) DOI: [10.3389/fpls.2013.00315](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00315)
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Brown, P., & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 6, 671.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and soil*, 383, 3-41.
- Chandra, S., Chakraborty, N., Dasgupta, A., Sarkar, J., Panda, K., & Acharya, K. (2015).
- Charlton, K., & Skeaff, S. (2011). Iodine fortification. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 14(6), 618-624. <https://doi.org/10.1097/mco.0b013e32834b2b30>

- Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep15195>
- Chun, S., & Chandrasekaran, M. (2018). Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 948-954. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.167>
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16(10), 524-531. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004>
- Couoh, Y. L., Minero, Y., & Islas, I (2009). Evaluación de la actividad de β ,1-3 glucanasa en plántulas de capsicum chinense jacq., inducidas con homogenados celulares de phytophthora capsici. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. https://smbb.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_II/CII-44.pdf
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2016). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. PMID: [PMC6638784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26663878/) DOI: [10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x)
- Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental chemistry letters*, 16, 101-112.
- Divya, K., Thampi, M., Vijayan, S., Varghese, S., & Jisha. (2020). Induction of defense response in *Oryza sativa* L. against *Rhizoctonia solani* (Kuhn) by chitosan nanoparticles. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104525. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104525>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>

- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia horticultrae*, 196, 3-14.
- Duborská, E., Urík, M. y Šeda, M. (2020). La biofortificación de vegetales con yodo podría mejorar el estado de suplementación con yodo. *Agronomía*, 10 (10), 1574. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101574>
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 185-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Elad, Y., & Pertot, I. (2020). Climate change and plant diseases: A review of the effects and strategies for mitigation. *Plant Disease*, 104(8), 1646-1660. DOI:[10.1080/15427528.2014.865412](https://doi.org/10.1080/15427528.2014.865412)
- Feng, B., Dong, Z., Xu, Z., An, X., Qin, H., Wu, N., ... y Wang, T. (2010). Análisis molecular de los genes de la lipoxigenasa (LOX) en el trigo común e investigación filogenética de las proteínas LOX de plantas modelo y de cultivo. *Journal of Cereal Science*, 52 (3), 387-394.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 839-863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- García, M., Lema, C., & Moreno, P. (2019). Occurrence and management of *Bremia lactucae* in lettuce: An overview. *Journal of Phytopathology*, 167(3), 175-186.
- Ghorbel, M., Brini, F., Sharma, A., & Landi, M. (2021). Role of jasmonic acid in plants: the molecular point of view. *Plant Cell Reports*, 40, 1471-1494.
- Giraldo Núñez D.M. (2024). Estrategias biológicas para el manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de lechuga *Lactuca sativa* (Hidropónico). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

<https://repository.udca.edu.co/server/api/core/bitstreams/d63909fc-c7d0-4da8-be22-665333ceed33/content>

Guiller A. Ellomer, Cherry M. Agbon, Romil L. Alejandro, Richard Lloyd M. Natividad, and Alejandro A. Jalil, "The Influence of Different Mulching on the Productivity of Lettuce (*Lactuca sativa* L.)," *International Journal of Multidisciplinary Research and Publications (IJMRAP)*, Volume 5, Issue 11, pp. 144-150, 2023. <https://ijmrapp.com/wp-content/uploads/2023/05/IJMRAP-V5N11P70Y23.pdf>

Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, 2014, 1-18. DOI:10.1155/2014/701596 Corpus ID: 7579531. <https://www.semanticscholar.org/paper/Mechanism-of-Salinity-Tolerance-in-Plants%3A-and-Gupta-Huang/1df98c8a61ceecefbbad597b876a158f9b6fc64e>

Infoagro, R. (2025, enero 8). Producción y exportación de lechuga. *Revista InfoAgro México*. <https://mexico.infoagro.com/produccion-y-exportacion-de-lechuga/>

Ingle, P. U., Shende, S. S., Shingote, P. R., Mishra, S. S., Sarda, V., Wasule, D. L., ... & Gade, A. (2022). Chitosan nanoparticles (ChNPs): A versatile growth promoter in modern agricultural production. *Heliyon*, 8(11).

INTAGRI. 2017. Manejo de Malezas en la Agricultura Orgánica. Serie Agricultura Orgánica Núm. 16. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 5 p.

Jactel, H., Koricheva, J., & Castagneyrol, B. (2019). Responses of forest insect pests to climate change: Not so simple. *Current Opinion in Insect Science*, 35, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.07.010>

Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Molecular aspects of plant-pathogen interaction*, 265-281.

- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>
- Lazarus, J. H. (2015b). The importance of iodine in public health. *Environmental Geochemistry and Health*, 37(4), 605-618. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9681-4>
- Leija-Martínez, P., Benavides-Mendoza, A., Rocha-Estrada, A., & Medrano-Macías, J. R. (2016). Biofortificación con yodo en plantas para consumo humano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(8), 2025-2036.
- Lucas-Bautista, J. A., Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., & Hernández-López, M. (2022b). Quitinasas en plantas y posible uso como biomarcadores para el diseño de biosensores en la detección de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(4), 701-713. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2717>
- Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J. J. M., & Pinzón-López, L. L. (2012). Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias. *Terra Latinoamericana*, 30(4), 343-353.
- Maluin, F. N., & Hussein, M. Z. (2020). Chitosan-based agronanochemicals as a sustainable alternative in crop protection. *Molecules*, 25(7), 1611.
- Mandal, S., Anand, U., López-Bucio, J., Kumar, M., Lal, M. K., Tiwari, R. K., & Dey, A. (2023). Biostimulants and environmental stress mitigation in crops: A novel and emerging approach for agricultural sustainability under climate change. *Environmental Research*, 233, 116357.
- Medrano-Macías, J., Leija-Martínez, P., González-Morales, S., Juárez-Maldonado, A., & Benavides-Mendoza, A. (2016). Uso de yodo para biofortificar y promover el crecimiento y la tolerancia al estrés en cultivos. *Frontiers In Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01146>

- Mou, B. (2008). Lettuce. In *Vegetables I: Asteraceae, brassicaceae, chenopodiaceae, and cucurbitaceae* (pp. 75-116). New York, NY: Springer New York.
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Frontiers In Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01298>
- Ormeño Villajos S. (2023). *Introducción Sintética a las Enfermedades de las Plantas*. <https://oa.upm.es/75936/1/EnfPlantasOrmeno.pdf>
- Parađiković, N., Teklić, T., Zeljković, S., Lisjak, M., & Špoljarević, M. (2019). Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food and Energy Security*, 8(2), e00162.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research*, 22, 4056-4075.
- Parra L, Nortman K, Sah A, Truco MJ, Ochoa O, Michelmores R. (2020). Identification and mapping of new genes for resistance to downy mildew in lettuce. *Theor Appl Genet*. 2021 Feb;134(2):519-528. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33128618/>
- Parrella, M. P. (2021). The leafminer fly: A worldwide pest of agriculture. *Annual Review of Entomology*, 66, 61-79.
- Pérez Guadarrama, N. I., y Solórzano Salazar, A. (2021). Eficiencia En La Producción De Lechuga Hidropónica Caso Fresco Cultivos Hidropónicos. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/110856>
- Peteira Delgado-Oramas, Belkis. (2020). La resistencia inducida como alternativa para el manejo de plagas en las plantas de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 35(1), . http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522020000100001&lng=es&tlng=es.

- Pichyangkura, R., & Chadchawan, S. (2015c). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 49-65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489-521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant physiology*, 130(1), 15-21.
- Ramezani, Z., Zarei, M., & Raminnejad, N. (2014). Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coatings on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Food Control*, 51, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.015>
- Ramírez-Rodríguez, S. C., Ortega-Ortiz, H., González-Morales, S., & Preciado-Rangel, P. (2023). Nanopartículas de quitosán mejoran el rendimiento, actividad enzimática y compuestos bioactivos en frutos de tomate. *Terra Latinoamericana*, 41. <https://doi.org/10.28940/terra.v41i0.1686>
- Rehman, M., Saeed, M. S., Fan, X., Salam, A., Munir, R., Yasin, M. U., ... & Gan, Y. (2023). The multifaceted role of jasmonic acid in plant stress mitigation: An overview. *Plants*, 12(23), 3982.
- Reitz, S. R., Gao, Y., & Lei, Z. (2020). Thrips: Pests of concern to China and the United States. *Agricultural Sciences in China*, 19(4), 527-545. DOI:[10.1016/S1671-2927\(11\)600734](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)600734)https://www.researchgate.net/publication/251701852_Thrips_Pests_of_Concern_to_China_and_the_United_States

- Rivera-Jaramillo, Y. A., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., Sandoval-Rangel, A., & La Fuente, M. C. (2021). Complejo PVA-quitosán-nCu mejora el rendimiento y la respuesta de defensa en tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(6), 970-979. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i6.3012>
- Rodríguez Ledesma, N. D., Torres Sevillano, C. N., Chaman Medina, M. E., & Hidalgo Rodríguez, J. E. M. (2019). Efecto del estrés salino en el crecimiento y contenido relativo del agua en las variedades IR-43 y amazonas de *Oryza sativa* "arroz"(Poaceae). *Arnaldoa*, 26(3), 931-942.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Bautista-Baños, S., Ramírez-Arrebató, M. Á., Plascencia-Jatomea, M., & Hernández-Ferrer, L. (2021). Quitosano y sus derivados, polímeros naturales con potencial para controlar a *Pyricularia oryzae* (Cav.). *Cultivos Tropicales*, 42(4).
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebató, 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. *Redalyc.org*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224101>
- Roeber, V. M., Bajaj, I., Rohde, M., Schmölling, T., & Cortleven, A. (2021). Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants. *Plant, Cell & Environment*, 44(3), 645-664.
- Román-Doval, R., Torres-Arellanes, S. P., Tenorio-Barajas, A. Y., Gómez-Sánchez, A., & Valencia-Lazcano, A. A. (2023). Chitosan: Properties and its application in agriculture in context of molecular weight. *Polymers*, 15(13), 2867.
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 11, 40.
- Sangerman-Jarquín, D. M., Sariñana-Aldaco, O., Lara-Reimers, E. A., Ortega-Ortíz, H., Márquez-Guerrero, S. Y., & Preciado-Rangel, P. (2023). Influencia de la

biofortificación con complejos de quitosano-yodo en la calidad fitoquímica de los frutos de chile jalapeño. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 10(3).

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. SADER. (2019). Conozcamos un poco más sobre la lechuga. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/conozcamos-un-poco-mas-sobre-la-lechuga>

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. SADER. (2020). Importancia Nutricional de la Lechuga. https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/lechuga_tcm30-102416.pdf

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. SADER. (2021). Al alza, producción y exportación de lechuga mexicana. [gob.mx. https://www.gob.mx/agricultura/prensa/al-alza-produccion-y-exportacion-de-lechuga-mexicana?idiom=es](https://www.gob.mx/agricultura/prensa/al-alza-produccion-y-exportacion-de-lechuga-mexicana?idiom=es)

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. SADER. (2023). Guía Técnica para el Cultivo de Lechuga. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/fresca-como-la-lechuga>

Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I., & Pieterse, C. M. J. (2009). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology*, 11(1), 90-96. DOI: [10.1111/j.1438-8677.2008.00162.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00162.x)

Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N., Tzortzakis, N., & Petropoulos, S. A. (2021). Sustainable Agriculture Systems in Vegetable Production Using Chitin and Chitosan as Plant Biostimulants. *Biomolecules*, 11(6), 819. <https://doi.org/10.3390/biom11060819>

Sharma, H. S., Singh, R., & Kumar, R. (2021). Genetic resistance to *Bremia lactucae* in lettuce: Advances and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 12, 689368.

- Shi, M., Gu, J., Wu, H., Rauf, A., Emran, T. B., Khan, Z., ... & Suleria, H. A. (2022). Phytochemicals, nutrition, metabolism, bioavailability, and health benefits in lettuce—A comprehensive review. *Antioxidants*, 11(6), 1158.
- Singh, P., Arif, Y., Miszczuk, E., Bajguz, A., & Hayat, S. (2022). Specific roles of lipoxygenases in development and responses to stress in plants. *Plants*, 11(7), 979.
- Singla, J., & Krattinger, S. (2016). Biotic Stress Resistance Genes in Wheat. En Elsevier eBooks (pp. 388-392). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394437-5.00229-1>
- Smolen, S., Rozek, R., Ledwozyw-Smolen, I., & Strzetelski, P. (2011). Preliminary evaluation of the influence of soil fertilization and foliar nutrition with iodine on the efficiency of iodine biofortification and chemical composition of lettuce. *Journal of Elementology*, 16(4).
- Soliveres, S. (2011). Efectos del estrés abiótico y factores bióticos en las interacciones planta-planta: implicaciones para el funcionamiento y la restauración de los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas*, 20(2-3). Recuperado a partir de <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/655>
- Still, D. W. (2007). Lettuce. In *Vegetables* (pp. 127-140). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stout, M. (2023). Preface: Induced Resistance from Theory to Practice. *Journal of Chemical*
- Sun, Y., Wang, C., Chen, H. Y., & Ruan, H. (2020). Response of plants to water stress: a meta-analysis. *Frontiers in plant science*, 11, 978.
- SYNGENTA (17 de octubre, 2022) El mildiu de la lechuga: en qué consiste y tratamiento efectivo. <https://www.syngenta.es/blog/el-mildiu-de-la-lechuga-en-que-consiste-y-tratamiento-efectivo>.
- Treviño-Ruiz, K. S., Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., & González-Morales, S. (2024b). Aplicación de nanoquitosán-yodo en lechuga y su efecto en la

- biofortificación, crecimiento y rendimiento. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 11(2). <https://doi.org/10.19136/era.a11n2.3615>
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and molecular plant pathology*, 55(2), 85-97.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, (2008). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0239>
- Vanda, G. F., Shabani, L., & Razavizadeh, R. (2019c). Chitosan enhances rosmarinic acid production in shoot cultures of *Melissa officinalis* L. through the induction of methyl jasmonate. *Botanical Studies*, 60(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0274-x>
- VELASCO, E. S. (2019). Aplicación de compuestos yodados para la biofortificación de hortalizas.
- Viswanath, K. K., Varakumar, P., Pamuru, R. R., Basha, S. J., Mehta, S., & Rao, A. D. (2020). Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *Journal of Plant Biology*, 63, 83-95.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Wang, R., Wang, G., & Ning, Y. (2019b). PALs: Emerging Key Players in Broad-Spectrum Disease Resistance. *Trends In Plant Science*, 24(9), 785-787. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.012>
- Wang, Y., Mostafa, S., Zeng, W., & Jin, B. (2021). Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8568.

- Yang, B., Tang, J., Yu, Z., Khare, T., Srivastav, A., Datir, S., & Kumar, V. (2019). Light stress responses and prospects for engineering light stress tolerance in crop plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1489-1506.
- Yang, C., Wu, J., & Zheng, Y. (2022). Biological control of *Bremia lactucae* using fungal antagonists: Potential and limitations. *Biological Control*, 171, 104937.
- Yang, X., Gil, M. I., Yang, Q., & Tomás-Barberán, F. A. (2022). Bioactive compounds in lettuce: Highlighting the benefits to human health and impacts of preharvest and postharvest practices. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 21(1), 4-45.
- Zhang, H., Li, W., Mao, X., Jing, R. (2016). Effects of plant growth regulators on wheat production under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1432.
- Zhang, X., & Liu, C. J. (2015). Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Molecular plant*, 8(1), 17-27
- Zhu, Y., Wang, Y., Li, R., & Song, X. (2017). Nitrogen, phosphorus, and potassium co-limit the growth of two *Ulva* species. *Scientific Reports*, 7, 45845.
- Zimdahl, R. L. (2018). *Fundamentals of Weed Science*. Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/C2015-0-04331-3>
- Zimmermann, M., & Trumbo, P. R. (2013). Iodine. *Advances in Nutrition*, 4(2), 262-264.