

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Potencial Antimicrobial de Nanopartículas Metálicas en Microorganismos
Fitopatógenos y su Potencial como Promotores de Crecimiento en Plantas

Por:

ITANDEHUI JUANITA ERENDIRA ESPARZA ARREDONDO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Potencial Antimicrobial de Nanopartículas Metálicas en Microorganismos
Fitopatógenos y su Potencial como Promotores de Crecimiento en Plantas

Por:

ITANDEHUI JUANITA ERENDIRA ESPARZA ARREDONDO

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor Principal


Dra. Ileana Vera Reyes

Coasesor


Dra. Norma Angélica Ruiz Torres

Coasesor


Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación
División de Agronomía
Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre 2016

RESUMEN

La nanotecnología ha tomado gran importancia en la agricultura debido a su aplicación en nanofertilizantes y pesticidas de nueva generación, como promotores crecimiento, mejoramiento de nutrientes y el uso antimicrobiano. En esta investigación se presenta el estudio de los efectos de diferentes nanopartículas (NPs) metálicas (ZnO, ZnO + Ag 1.5%, ZnO + 2.5%, CuO, Fe₂O₃); como antagonistas de hongos y bacterias fitopatógenas, de igual forma se presenta un estudio en *Cucumis sativus* para evaluar el efecto de las nanopartículas de CuO (NPsCuO) como promotoras de crecimiento.

Las NPsCuO aplicadas a una concentración de 1000 mg L⁻¹, demostraron un efecto antifúngico al inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani* en 95 %. Por otro lado, las NPs Fe₂O₃ no mostraron actividad antifúngica contra ninguna de los dos de hongos. La mejor inhibición del crecimiento en *Clavibacter michiganensis* se observó con NPsZnO, los resultados mostraron un 95% de inhibición a 1000 mg L⁻¹. Por otro lado, las NPsCuO mostraron un efecto inhibidor del 74% en la misma concentración (1000 mg L⁻¹).

El estudio con *Cucumis sativus* los datos no mostraron un cambio estadístico significativo; sin embargo, el vigor de las semillas se vio afectado de manera positiva con un 1 mg L⁻¹ y se encontraron cambios estadísticamente significativos en longitud de la raíz, en la longitud de plúmula. De acuerdo a los resultados obtenidos, los productos a base de NPs ZnO y CuO para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Alternaria* y *Fusarium*.

Palabras clave: Nanotecnología, hongos fitopatógenos, nanopartículas, antagonismo, hongos y bacterias fitopatógenas, actividad enzimática.

Correo electrónico: itandehui.esparza@gmail.com

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a tres personas muy importantes en mi familia que fueron muy importantes en mi vida y aun en su ausencia sigue su legado, **Francisco Rivera Jaime, Candelaria Rivera Moncada, Homero Rivera Moncada** quienes fueron mis héroes y no solo me enseñaron el valor del estudio y el trabajo duro; si no el de la vida misma.

A mis padres:

Les dedico todos mis logros porque sin su formación, motivación y apoyo, quizá nunca hubiera aprendido la importancia de seguir adelante ante las adversidades de la vida y saber que los sueños pueden volverse realidad.

A mi hermana

Quiero que sepas que eres una persona admirable, una gran hermana mayor. Aprecio cada momento y consejo que me has dado a lo largo de la vida.

A **cada uno de mis amigos** por su paciencia, apoyo y esfuerzo a lo largo de este gran camino de aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS

A mi **Alma Terra Mater**, que me dio la oportunidad de estudiar y brindarme las herramientas durante mi formación como profesionista.

Departamento de movilidad académica de la UAAAN Y UABC, por abrirme las puertas a una formación profesional más completo.

Al **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)**, por abrirme las puertas para este trabajo y trabajar en diferentes proyectos de investigación durante mi estancia.

Al **Proyecto Fronteras de la Ciencia 268**, por el apoyo hacia este proyecto que nos abrió las puertas e impulso a la obtención de conocimiento y expansión de nuestras fronteras profesionales.

Al **Dr. Gabriel Gallegos** morales agradezco todo su apoyo, enseñanzas y por ayudarme a crear y formar las habilidades necesarias para el área de la investigación.

A la **Dra. Ileana Vera Reyes**, Muchas gracias por brindarme su confianza, orientación y tiempo. Por aceptarme en sus proyectos pero sobre todo por su incondicional apoyo, paciencia y consejos.

Al **Dr. Ricardo Hugo. Lira** Saldivar gracias por aceptarme en su equipo de trabajo, por su confianza, apoyo y ser parte de mi formación profesional.

A la **Dr. Norma Angélica Ruíz Torres** por su disponibilidad y amabilidad en la revisión del presente trabajo.

A los diferentes investigadores **Biol. Miguel A. Carranza, Biol. Sofía Comparan, Biol. Teresa de León, Dra. Diana Jasso, Dr. Antonio, Dr. Bulmaro Méndez**, y a cada uno de mis maestros y de las personas que me permitieron colaborar con ellos en diferentes proyectos de investigación, muchas gracias por abrirme las puertas complementando mi formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVO GENERAL	12
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	12
REVISIÓN DE LITERATURA	13
4.1 La nanotecnología.....	13
4.1.1 Tipos de nanopartículas.....	14
4.2 Aplicaciones de nanopartículas.....	14
4.3 Nanopartículas como promotoras de crecimiento.....	15
4.4 Nanopartículas como agentes antimicrobiales.....	16
4.5 Características de <i>Alternaria solani</i>	17
4.6 Características de <i>Fusarium oxysporum</i>	18
4.7 Características de <i>Clavibacter michiganensis</i>	18
4.8 Modo de acción de las nanopartículas.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Área de trabajo.....	20
5.2. Actividad antimicrobial	20
5.2.1 Actividad antifúngica	20
5.2.1.1 Aislamiento y purificación de cepas <i>Alternaria solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	20
5.2.1.2 Evaluación de efecto antifúngico de nanopartículas <i>in vitro</i>	21
5.2.1.3 Establecimiento del ensayo en medio envenenado.....	21
5.2.2 Actividad antibacteriana.....	22
5.2.3 Multiplicación de cepas bacterianas.....	22
5.2.4 Inóculo para cultivo.....	23
5.2.5 Determinación de la concentración celular.....	23
5.3 Fisiología de semillas	24
5.3.1 Metodología para evaluación de germinación.....	24
5.3.2 Curva de imbibición.....	24
5.4 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno	25
5.4.1 Cuantificación de proteínas.....	26
5.4.2 Determinación de peroxidasas.....	26
5.4.3 Determinación de prolina.....	27

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1 Actividad antimicrobial	28
6.1.1 Actividad antifúngica	28
6.1.1.1 <i>Alternaria solani</i>	28
6.1.1.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	30
6.1.2. Actividad antibacteriana	31
6.2 Efecto de las nanopartículas en la fisiología de semillas.....	33
6.3 Detección de producción de especies reactivas de oxígeno	35
7. CONCLUSIONES	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39
9 .ANEXOS	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nanopartículas metálicas utilizadas <i>in vitro</i> contra los hongos fitopatógenos.....	22
Cuadro 2. Tratamientos de NPs en king's agar B (KB) para <i>Clavibacter michiganensis</i>	23
Cuadro 3 .Porcentaje de inhibición de <i>Alternaria solani</i> los diferentes tratamientos y concentraciones de nanopartículas metálicas.....	29
Cuadro 4 .Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> con los diferentes tratamientos y concentraciones de nanopartículas metálicas.....	30
Cuadro 5 .Porcentaje de inhibición de <i>Clavibacter michiganensis</i>	32
Cuadro 6. Comparación de medias para variables evaluadas en el ensayo de germinación, a diferentes niveles de nanopartículas NPsCu y CuSO ₄ , en semillas de <i>Cucumis sativus</i>	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala nanométrica.....	13
Figura 2. Cinética de crecimiento de <i>C. michiganensis</i> en medio King's Agar B.....	24
Figura 3. Cuantificación de proteína obtención de la ecuación de la curva.....	26
Figura 4. Efecto de las nanopartículas metálicas en el crecimiento de <i>Alternaria solani</i>	27
Figura 5. Efecto de las nanopartículas metálicas en el crecimiento de <i>Fusarium oxysporu</i>	29
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>Clavibacter michiganensis</i>	33
Figura 7. Determinación del contenido de prolina en <i>Cucumis sativus</i>	36
Figura 8 . Determinación del guayacol peroxidasas (GPOD) en <i>Cucumis sativus</i>	37

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una tecnología emergente que se dedica al estudio, obtención y manipulación de materiales, sustancias y dispositivos a escala de una mil millonésima parte de un metro barriendo las barreras entre la física, la química y la biología. (Srilatha, 2011). La nanotecnología tiene la capacidad de trabajar en los niveles atómicos, moleculares e incluso sub-moleculares con el fin de crear estructuras materiales, dispositivos con nuevas propiedades y funciones (Jha et al., 2011). Por lo cual, la nanotecnología tiene gran potencial de aplicación en la agricultura a través del mejoramiento de la eficiencia de los nutrientes a través de fertilizantes, el desarrollo de pesticidas de nueva generación, así como la comprensión de los mecanismos de las interacciones huésped-parásito a nivel molecular, la búsqueda de compuestos para la conservación y envasado de alimentos, el fortalecimiento de las fibras naturales, etc. (Mukhopadhyay, 2014). Además el desarrollo de nanopartículas (NPs) ha llegado con el espectro amplio para producir agentes antimicrobianos (Yah y Simate et al., 2015).

Una de las aplicaciones potenciales de las NPs metálicas es para elaborar nanoplaguicidas; ya que elementos como ZnO, Cu, Ag, etc., son antagonistas de organismos fitopatógenos (Saharan et al., 2015). Por otro lado, además del potencial antimicrobial se ha reportado que las NPs tiene efecto como promotoras del crecimiento en diferentes especies de plantas (Martínez-Rodríguez et al., 2015).

Por estas razones en la agricultura moderna sustentable la nanotecnología promete aportar soluciones usando nanopartículas (NPs) para controlar microorganismos patogénicos, con menor impacto ecológico (Resham et al., 2015). Ya que estas pueden ser utilizadas producir nanofertilizantes, nanoplaguicidas y nanoherbicidas los cuales requerirían bajas cantidades de agroinsumos implicando un menor impacto ambiental (Lira-Saldivar et al., 2016). Por lo citado anteriormente, podemos destacar la actual importancia que está tomando día a día la nanotecnología dentro de la agricultura. Sin embargo, se

requiere implementar trabajos de investigación en esta área para conocer a profundidad los alcances que puede llegar a tener este campo de estudio.

En este trabajo se propuso estudiar el efecto de las nanopartículas como antagonistas de hongos y bacteria agronómica por las pérdidas ocasionadas a cultivos hortícolas, los microorganismos fitopatógenos estudiados fueron *Alternaria solani* que causa la enfermedad conocida como tizón temprano en diversos cultivos (Ravikumar et al., 2013), *Fusarium oxysporum* un hongo productor marchitamiento vascular de la planta (González, 2006) y *Clavibacter michiganensis* bacteria causante de la enfermedad conocida como chancro la cual ocasionar importantes pérdidas en cultivos de solanáceas y es considerada como la principal bacteriosis a nivel mundial en cultivo de tomate (Infoagro 2016). Se sabe que la aplicación de NPs pueden ofrecen efecto promotor de crecimiento por eso en este trabajo evaluamos el efecto de la aplicación de estas en semillas de *Cucumis sativus*.

2. HIPÓTESIS

H1: Las nanopartículas metálicas de CuO, ZnO, Fe₂O₃ en condiciones *in vitro* mostrarán efecto antagonista contra microorganismos fitopatógenos.

H2: Las aplicación de nanopartículas de CuO mejorarán parámetros relacionados con el índice de vigor de la semillas de *Cucumis sativus*.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobial de NPs de ZnO, ZnO + Ag, CuO, Fe₂O₃ y el efecto promotor de crecimiento de las nanopartículas de CuO en semillas *Cucumis sativus*.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el antagonismo de NPs metálicas NPsZnO, NPsZnO + Ag, NPsCuO y NPsFe₂O₃ en hongos y bacterias fitopatógenos.
2. Determinar la concentración óptima antimicrobial de las NPs metálicas utilizadas para cada microorganismo evaluado.
3. Evaluar el efecto de nanopartículas de CuO en la germinación de semillas de *Cucumis sativus*.
4. Analizar la producción de estrés oxidativo ocasionado por las nanopartículas, mediante la cuantificación de la activación enzimática antioxidante y la producción de prolina en las plántulas germinadas de las semillas tratadas con las NPs.

REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 La nanotecnología

En 1959 el físico Richard Feynman declaró que las leyes de la física permitían la manipulación y el control de la posición de átomos y moléculas de manera individual, similar a los bloques de construcción de tipo Lego, y que esta posibilidad abría la puerta a un nuevo mundo “infinitamente pequeño” denominado más tarde nanomundo o nanociencia (Staff, 2015).

La nanociencia la podemos definir como el estudio de los fenómenos y manipulación de materiales atómicos a escalas moleculares donde las propiedades difieren de las observadas en mayores escalas. La nanotecnología en los últimos años ha tenido un gran desarrollo a nivel mundial debido a las propiedades de la materia a escala nanométrica (Figura. 1). En la actualidad se cree que la nanotecnología es parte de la revolución tecnológica, ya que ofrece una oportunidad de desarrollo en la medida en que es asimilada, recreada y difundida para la sociedad. Distinguiéndose de otras tecnologías por el control a escala nanométrica que ha sido capaz de modificar de forma activa e intencionalmente moléculas y estructuras dentro de rangos de 0.2 a 100 nm. Por lo tanto al hablar de nanotecnología nos estamos refiriendo al diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de forma, tamaño en la escala nanométrica (Williams et al., 2005; Contreras, 2016).

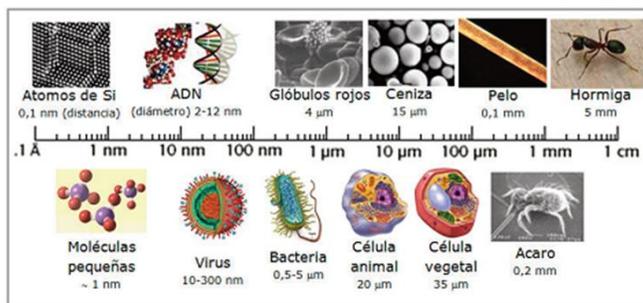


Figura 1. Escala nanométrica (Tomada de Staff, 2015).

4.1.1 Tipos de nanopartículas

En la naturaleza existen muchos ejemplos de estructuras con dimensión nanométrica, como son las moléculas esenciales del cuerpo humano (ADN, proteínas, fosfolípidos, lípidos, células, etc.), los componentes de los alimentos, virus, etc., aunque sólo desde este último cuarto de siglo ha sido posible, de manera deliberada, modificar las moléculas y estructuras dentro de este rango de tamaño. Las nanopartículas pueden ser de origen biológico, mineral o medio ambiental. Del mismo modo encontramos de origen antropogénico las cuales se pueden generar de manera involuntaria producidas por procesos industriales (Ejemplo: combustiones de diésel o carbón), y otras producidas de manera deliberada a través de las llamadas nanotecnologías (Ejemplo: Aquellas en que son modificadas sus propiedades ópticas de algunos materiales) (Staff, 2015).

Investigaciones recientes muestran que los nanomateriales basados en carbón y metales pudieran ser componentes de bienes de consumo y productos agrícolas. Los informes indican que los nanomateriales tanto los basados en carbón como los metálicos afectan a plantas y microorganismos en diferentes formas tanto en niveles fisiológicos, bioquímicos, nutricionales y genéticos (Zuverza-Mena et al., 2016).

4.2 Aplicaciones de nanopartículas

Las implicaciones éticas y sociales de la nanotecnología abarcan muchas áreas clave asociados con el desarrollo, tales como la seguridad, el medio ambiente, la alimentación y la agricultura. Entre las diversas áreas de aplicación encontramos como desarrollo de películas para celdas solares, almacenamiento de energía, nano generadores, la catálisis de combustible, y de tratamiento de agua (Khan, 2014). En la agricultura se ha utilizado para aumentar la productividad agrícola, la seguridad alimentaria y el crecimiento económico de las industrias (Handford et al., 2014; Shapira et al., 2015).

La nanotecnología tiene muchas aplicaciones en todas las etapas de producción, transformación, almacenamiento, envasado y transporte de productos agrícolas. Algunos ejemplos de estas aplicaciones es el manejo del suelo, en la cual se incluyen nanofertilizantes, aglutinantes, agentes de retención de agua, y monitores de nutrientes (Mousavi y Rezaei, 2011). En las plantas, se han encontrado métodos de nanotecnología para administrar ADN a las células vegetales, mejorar la absorción de nutrientes, detectar patógenos, regular las hormonas, etc. En la cría de animales, las nanocápsulas se han ideado para suministrar vacunas y mejorar la adsorción de los nutrientes. En post-cosecha se han reportado la producción de nanocompuestos como seda, la utilización de empaques inteligentes entre muchos otros (Mlalila et al., 2016).

4.3 Nanopartículas como promotoras de crecimiento

Es necesario el conocimiento de las interacciones entre los nanomateriales con el medio ambiente, para poder utilizarlos en la agricultura de manera segura (Khodakovskaya et al., 2011). Las interacciones de NPs con la materia orgánica natural tienen que ser considerados, ya que se ha reportado que las NPs tienen la capacidad de interactuar con las paredes celulares, alterar membranas biológicas, organelos celulares y otras moléculas (Navarro et al., 2008).

Se ha encontrado que las NPs metálicas pueden incrementar la eficiencia energética de los centros de reacción en la fotosíntesis, esto se asocia con el incremento en acumulación en biomasa (Gubbins, 2011). Estudios recientes han reportado que la aplicación de diversas NPs tiene efectos en germinación, crecimiento, incremento en clorofila, número de hojas, longitud de brotes y raíces. Sin embargo los efectos de estos nanomateriales van a depender de la etapa del cultivo así como del tipo de NPs utilizadas (Lin y Xing, 2007; Raliya y Tarafdar et al., 2013; Méndez-Argüello et al., 2016).

Finalmente algunos estudios demuestran que el uso de nanofertilizantes causa un aumento en la eficiencia de uso de nutrientes, reduce la toxicidad del suelo,

reduce al mínimo los posibles efectos negativos asociados con la dosificación excesiva y reduce la frecuencia de la aplicación. Por lo tanto, la nanotecnología tiene un alto potencial para lograr una agricultura sostenible, especialmente en los países en desarrollo (Naderi y Danesh-Shahraki, 2013).

4.4 Nanopartículas como agentes antimicrobiales

Se ha mostrado que el uso y manejo de plaguicidas (sustancias químicas o biológicas que previenen y eliminan plagas, insectos, hongos y malas hierbas) tiene una estrecha relación con el grado de conocimiento y responsabilidad en los procedimientos de aplicación, de la cual se genera el riesgo de intoxicación de los seres vivos y el deterioro del ambiente (Espinoza y Fabian, 2014). Los plaguicidas se pueden clasificar conforme a su toxicidad (por ejemplo extremadamente peligrosos, moderadamente peligrosos y ligeramente peligrosos), su vida media (permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes.), de acuerdo a su estructura química (organoclorados, organofosforados, carbamatos y los piretroides) (Ramírez et al., 2001).

Actualmente las investigaciones se dirigen hacia el empleo de nanopartículas, debido a que han demostrado ser un agente prometedor antimicrobiano para el control de enfermedades en humanos y plantas, siendo un factor importante su tamaño debido a que entre menor tamaño mayor es su efecto antimicrobiano, por lo cual podría ser utilizado para enfrentarnos a diversas enfermedades resistentes a los pesticidas comerciales (Yamamoto, 2001; Betancourt et al., 2014).

En algunas investigaciones se señala el uso de insecticidas botánicos asociados a la nanotecnología ya que ofrece un potencial considerable para aumentar la productividad agrícola, por lo tanto se puede reducir el impacto sobre el medio ambiente y la salud humana (De Oliveira et al., 2014).

Algunos autores se han enfocado en el estudio antibacterial y antifúngico de NPs metálicas debido al potencial para ser utilizados como productos para prevenir y

controlar el deterioro por microorganismos fitopatógenos (Palanikumar et al., 2014; Esparza Rivera et al., 2015;). Varios autores señalan el poder antimicrobial de las nanopartículas de CuO, Fe₂O₃ y ZnO al dañar la pared celular del microorganismo (Ren et al., 2008; Jin et al., 2009; Azam et al., 2012). La ventaja de usar algunas de estas NPS como lo son las NPsZnO, es que no afecta la fertilidad del suelo en comparación con los agentes antifúngicos tradicionales (Ruparelia et al., 2008). Las NPs metálicas, que han resultado más promisorias como agente bactericida son las NPs Ag debido a que la capacidad microbicida de la Ag que es conocida desde hace siglos. Una de las características que hace más atractivo la aplicación de las NPs es la baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos (Cao et al., 2013).

Dentro del campo de la agricultura, las NPs se pueden usar para controlar varios patógenos de plantas de manera más segura en comparación con fungicidas sintéticos (Park et al., 2006). Hasta ahora, la investigación es limitada por lo que es necesaria la investigación con diferentes microorganismos y nanomateriales.

4.5 Características de *Alternaria solani*

Es un hongo fitopatógeno que actúa como agente causal del tizón o marchitez temprana del tomate (Urrutia et al., 2001). Este hongo pertenece al filo ascomicota; sus síntomas en hojas son característicos de la enfermedad consisten en manchas circulares de hasta medio centímetro de diámetro, pardas con anillos concéntricos semejantes a un blanco de tiro; solitarias o en gran número sobre las hojas. Las áreas afectadas se tornan amarillas, luego pardas y las hojas cuelgan. Este manchado comienza por las hojas más viejas y luego prospera de forma ascendente. Finalmente la planta entera puede desfoliarse y morir (SINAVIMO, 2016).

4.6 Características de *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum es un hongo fitopatógeno responsable de marchitez y pudrición basal las cuales son enfermedades ampliamente distribuidas a nivel mundial en diversos cultivos como el tomate, cebolla y ajo (Delgado-Ortiz et al., 2016; Martínez et al., 2016). La presencia de *Fusarium oxysporum* se puede detectar a través de algunos síntomas como es el amarillamiento en hojas basales seguidas finalmente de un marchitamiento. También se pueden percibir necrosis vascular en raíces principales y la base de los tallos (González, 2006).

4.7 Características de *Clavibacter michiganensis*

Clavibacter michiganensis es un microorganismo patógeno económicamente devastador ya que infringe daño considerable a lo largo de las principales regiones productoras de tomate. *C. michiganensis* es una bacteria Gram positiva perteneciente a los actinomicetos, causa la marchitez bacteriana y cancro del tomate debido a la propagación de la infección a través del xilema. La propagación se puede dar a consecuencia de trasplantes infectados, estacas espalderas, herramientas, y / o el suelo. A nivel mundial, los nuevos brotes pueden ir acompañadas de la introducción de semillas contaminadas (Gartemann et al., 2003; Tancos et al., 2013).

4.8 Modo de acción de las nanopartículas

Investigaciones reportan que las nanopartículas metálicas poseen tres mecanismos de acción principales: (a) generación de ROS; (b) liberación de iones y (c) acumulación de las NPs en la membrana celular (Alvarado et al., 2014). De acuerdo a esto, varios estudios han indicado que algunas NPs se pueden adherir a la membrana celular, alterando la permeabilidad celular y funciones respiratorias de la célula. Es posible que algunas NPs no sólo interactúen con la superficie de la

membrana, sino que también penetren al interior de ciertos organismos (Gómez, 2013), lo cual ocasiona la alteración de su permeabilidad, provocando cambios irreversibles (Appelgren et al., 2002). Incluso también algunos tipo de nanopartículas puede generar radicales libres que son extremadamente reactivos y presentan gran actividad citotóxica (Prabhu y Poulouse, 2012). Las NPs en su trayecto van liberando iones logrando alterando el citoplasma. Los iones se pueden enlazar con algunos grupos de biomoléculas por mecanismos que pueden darse de manera simultánea (Sahoo et al., 2007).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de trabajo

El presente trabajo se llevó a cabo en las cámaras bioclimáticas del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) y en los laboratorios del Departamento de Plásticos en la Agricultura del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) en la ciudad de Saltillo Coahuila, México. Durante el periodo Enero- Septiembre 2016.

5.2. Actividad antimicrobial

5.2.1 Actividad antifúngica

5.2.1.1 Aislamiento y purificación de cepas *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*

Las cepas de *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*, fueron adquiridas de la colección del departamento de parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Se multiplicaron a través de explantes en Agar Papa Dextrosa (PDA modificado) extracto de malta y extracto de levadura con el fin de obtener el material necesario para el establecimiento del bioensayo. Posteriormente se llevó a cabo el método de purificación por punta de hifa para la obtención de cultivos monopólicos logrando reducir la mayor cantidad de variables que pudieran afectar nuestro experimento. Finalmente se reprodujeron los cultivos puros.

5.2.1.2 Evaluación de efecto antifúngico de nanopartículas *in vitro*

Para evaluar la actividad antifúngica de nanopartículas metálicas en diferentes hongos fitopatógenos se utilizó la metodología descrita por Corrales Flores (2014). En este estudio se manejaron las siguientes concentraciones de nanopartículas: 0, 250, 500, y 1000 mg L⁻¹. Se preparó medio PDA (Agar Papa Dextrosa) adicionado con extracto de malta y extracto de levadura, se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Al mismo tiempo se prepararon una solución de las nanopartículas en 10 ml de agua destilada estéril, la cantidad tomada de esta solución madre de nanopartículas dependió de la concentración deseada. Las nanopartículas se dispersaron por sonicación en tres ciclos de 15 min. Finalizada la esterilización del medio PDA se dejó enfriar, y se completó con la solución de NPs previamente sonicados, se agitó un breve momento para lograr la homogenización de la solución con el medio y por último se vació en las cajas Petri.

5.2.1.3 Establecimiento del ensayo en medio envenenado

Para el establecimiento del ensayo, los hongos se inocularon a través de explante en los medios, y se incubaron a 27 °C de 7 a 11 días, dependiendo de la especie utilizada. Los parámetros evaluados fueron el diámetro de crecimiento, el cual se midió con ayuda de un vernier, para poder calcular el porcentaje de inhibición con la fórmula descrita por Orberá et al. (2009):

$$PICR = \left(R1 - \frac{R2}{R1} \right) \times 100$$

Dónde:

PICR= Es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

R1= Representa el valor promedio del radio de crecimiento del hongo.

R2= Es el valor promedio del radio de la colonia inhibida.

Para concluir se realizó un análisis de varianza y comparación de medias a través la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), en un diseño experimental completamente al azar.

Cuadro 1. Nanopartículas metálicas utilizadas *in vitro* contra los hongos fitopatógenos.

Tratamiento	<i>Alternaria solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
1	Control	Control
2	ZnO 100%	ZnO 100%
3	ZnO+ Ag 1.5%	ZnO+ Ag 1.5%
4	ZnO+ Ag 2.5%	ZnO+ Ag 2.5%
5	CuO	CuO
6	Fe ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃

5.2.2 Actividad antibacteriana

5.2.3 Multiplicación de cepas bacterianas

Se utilizó la cepa de *Clavibacter michiganensis*, la cual se obtuvo de la colección del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). La bacteria se sembró por estría en medio de cultivo King de B (KB) y se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 24 horas.

Se utilizó medio King's B (KB) sólido y líquido, el cual se preparó con 20g/L de proteasa peptona, 1.5 g/L de K₂HPO₄·3H₂O, 1.5 g/L de MgSO₄·7H₂O y 15 ml de glicerol. Para gelificar se utilizó 15 g/L de agar bacteriológico. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Para preparar los medios con nanopartículas, estas fueron pesadas de acuerdo a la concentración deseada, posteriormente se dispersaron en medio KB mediante sonicación en tres ciclos de 15 minutos.

5.2.4 Inóculo para cultivo

A partir de las células crecidas en medios sólidos, se tomaron tres colonias grandes y se resuspendieron en un tubo de vidrio con 3 ml con medio KB, se incubaron en agitación 110 rpm a una temperatura de 37°C por 24 horas. Posteriormente, se adicionó 1 ml de este cultivo a un matraz con medio de cultivo preparado previamente, el cual sirvió de inóculo para los ensayos. El inóculo se incubó durante 24 horas, hasta alcanzar una Densidad Óptica de (DO_{600}) de aproximadamente 1 unidad absorbancia. Para inocular los matraces de 250 ml que se utilizaron para el ensayo se tomaron 2 ml del inóculo para cada repetición de las diferentes concentraciones (0, 100, 250, 500, 700, 1000 mg L⁻¹). Los medios de cultivo inoculados se incubaron a 37°C a 100 rpm. En el Cuadro 2 se muestran los tratamientos utilizados.

Cuadro. 2. Tratamientos de NPs en king's agar B (KB) para *Clavibacter michiganensis*.

Tratamiento	<i>Clavibacter michiganensis</i> .
1	Control
2	ZnO
3	CuO

5.2.5 Determinación de la concentración celular

Se tomó una muestra de 1 ml en condiciones de esterilidad cada 2 horas. A cada muestra se le determinó la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10uv). Los ensayos se realizaron por triplicado en forma independiente. Cabe resaltar que se llevó a cabo un ensayo previo, el cual consistió en la construcción de una cinética de crecimiento para conocer las etapas de

crecimiento de organismos fitopatógenos (Figura. 2). Finalmente se calculó porcentaje de inhibición de crecimiento.

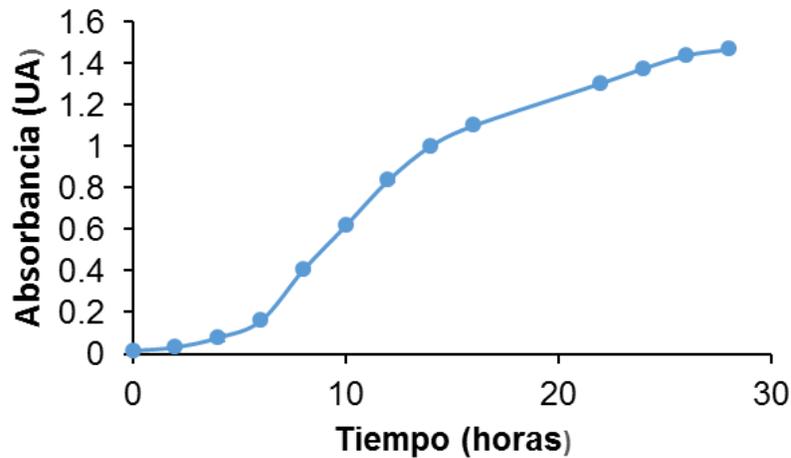


Figura 2. Cinética de crecimiento de *C. michiganensis* en medio King's B

5.3 Fisiología de semillas

5.3.1 Metodología para evaluación de germinación

5.3.2 Curva de imbibición

Se colocaron 100 semillas de *Cucumis sativus* en cajas Petri con papel filtro y 15 mililitros de agua. El ensayo se realizó con tres repeticiones, se registró el peso cada hora con el fin de encontrar el punto de estabilización de la curva es decir cuando la semilla deja de absorber el agua. Esta nos permitió determinar el número máximo de horas que se debería tratar la semilla con la solución de nanopartículas. Para este estudio se utilizaron las NPsCuO de 25 nm de tamaño, las cuales se adquirieron con la empresa Skyspring Nanomaterials, como control en tamaño de micropartículas (MPs) se ocupó sulfato de cobre Cu_2SO_4 .

Se prepararon las soluciones de NPs y MPs en las siguientes dosis: 0, 0.5, 1.0, 5.0, 10 y 50 mg L^{-1} , estas se sonicaron en tres lapsos de 15 min, posteriormente

se colocaron 150 semillas las cuales se embebieron en los tratamientos de diferentes concentraciones durante 22 horas.

Posteriormente se llevó a cabo la metodología citada por García y Ruiz (2016) las semillas germinan entre dos bases de papel anchor previamente humedecido con agua destilada, posteriormente las semillas se siembra en hilera a diferentes espacios dependiendo del tamaño de las semillas. Se respetan 6 cm del borde superior, dejando un espacio de 2-3 cm en los costados. Enseguida se cubren las semillas con otra hoja de papel anchor fue humedecido con agua destilada, y se enrolló en forma de “taco”, al finalizar los “tacos” fueron acomodados aleatoriamente dentro de una bandeja de plástico profunda (cada “taco” fue considerado como una unidad, la cual se rotuló para identificar al momento de la evaluación). Las semillas se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 °C, con fotoperiodo de 16 x 8 h. Al cuarto día se determinó el índice de vigor de la semilla. A los once días después de la aplicación de los tratamientos se evaluó el porcentaje de germinación, así como la longitud de radícula y plúmula. Los bioensayos realizados se hicieron apegados a los criterios de la International Seeds Testing Association (ISTA, 2016). Para cada bioensayo realizado se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos se analizaron mediante un ANOVA y se hizo la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Al terminar la evaluación en este estudio *in vivo* se obtuvo el material vegetal en paquetes de 100, 200 y 500 mg con el fin de poder realizar diferentes pruebas enzimáticas estas muestras se pusieron en nitrógeno líquido y se colocaron en congelación (-20 °C).

5.4 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno

Se realizó un extracto proteico de las plántulas normales del ensayo de germinación. De acuerdo a la metodología reportada por Elavarthi y Martin (2010), se tomaron 200 mg de muestras de tejido vegetal, el material se congeló en nitrógeno líquido, se trituró en un mortero con el 5 % de Polivinilpirrolidona (PVP); las muestras se homogenizaron en 500 μ l de solución amortiguadora de fosfatos

0.2 M, pH 7.0 adicionada con 0.1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). En seguida las muestras fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.4.1 Cuantificación de proteínas

Se llevó acabo la cuantificación de proteínas de acuerdo a la metodología reportada por Bradford (1976), utilizando el reactivo de Bradford de Sigma-Aldrich. Se empleó albumina de suero de bovino (BSA) como estándar y se siguió la metodología del proveedor. Se obtuvo la siguiente ecuación de la curva que se utilizó para cuantificar la cantidad de proteína de cada muestra:

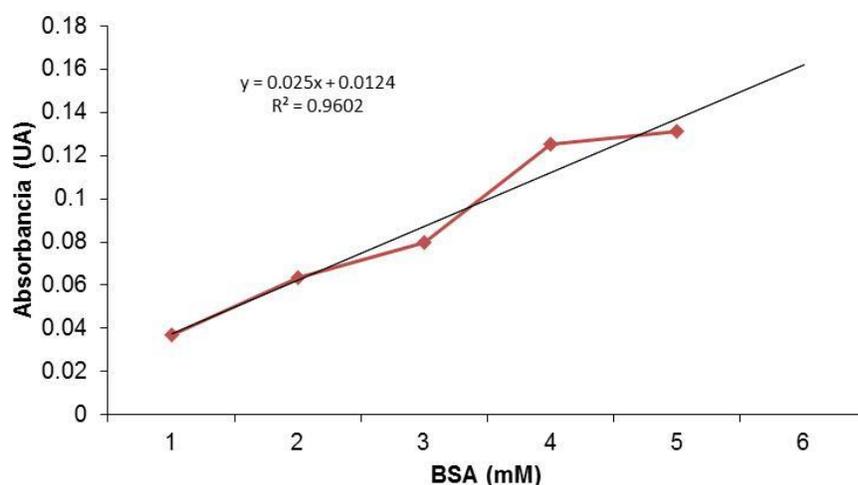


Figura 3. Cuantificación de proteína obtención de la ecuación de la curva.

5.4.2 Determinación de peroxidasas

La actividad de peroxidasas se realizó utilizando como sustrato guayacol, de acuerdo a la metodología reportada por Pütter (1974). El volumen de reacción fue de 2 ml, el cual contenía: 2.5 µl de extracto proteico proveniente de raíz o 20 µl en caso de analizar la parte aérea de la plántula, 300 µl de una solución de guayacol (100 mM), amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6 y 60 µl de una solución de H₂O₂

(100 mM), la reacción empezó cuando se agregó el H₂O₂. se leyó inmediatamente a 470 nm en espectrofotómetro (Genesys 10 UV) por 2 min cada 20 segundos.

5.4.3 Determinación de prolina

Se siguió la metodología reportada por Abrahám et al. (2010). Se tomaron 100 mg de tejido, los cuales se maceraron en mortero pre enfriado con nitrógeno líquido, agregando 500 µl de ácido sulfosalicílico, se homogenizo y agitó en centrifuga a 1400 rpm 5 min para eliminar restos celulares. Consecutivamente se tomaron 50 µl del extracto obtenido de cada muestra, añadiendo 150 µl de ácido sulfosalicílico, 200 µl de una solución de ninhidrina y 200 µl de ácido acético glacial. La mezcla de reacción se incubo a 96°C por una hora. Posterior a esto se le agregó 1 ml de tolueno, se homogenizo y al separarse las dos fases se tomó el sobrenadante y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Actividad antimicrobial

6.1.1 Actividad antifúngica

Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo para evaluar el potencial antifúngico de NPsZnO, NPsCuO, NPsFe₂O₃ y NPsZnO dopadas con plata al 1.5 y 2.5 % (p/p) contra las dos cepas de fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. solani*. La mayor inhibición del crecimiento se observó con las NPsCuO en ambas cepas. Las NPsCuO aplicadas a una concentración de 1000 mg L⁻¹, demostraron su efecto anti fúngico al inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* y *A. solani* en 95 %. Por otro lado, las NPsFe₂O₃ no mostraron actividad antifúngica contra ninguna de los dos hongos fitopatógenos a estas concentraciones, a pesar de que diversos autores han reportado su capacidad antimicrobial (Azam et al., 2012; Mouhamed et al., 2015).

6.1.1.1 *Alternaria solani*

La evaluación de crecimiento para *Alternaria solani* se realizó cuando esta cepa alcanzó el 100% de crecimiento micelial esto fue 7 días después de la siembra. En la Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos por los diferentes tratamientos de nanopartículas metálicas sobre el crecimiento del micelio. El incremento en la concentración de NPs se correlacionó con el efecto antagonista de las mismas, por lo que a la dosis más alta (1000 mg L⁻¹) se observó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Siendo las NPsCuO el tratamiento más efectivo al inhibir en un 95.4 ± 0.24 % el crecimiento micelial; seguido del tratamiento con ZnO + Ag 1.5% (93.02 ± 0.41 %), ZnO puro (90.61 ± 0.51 %) y por el ultimo las NPs dopadas con mayor contenido de plata (ZnO + Ag 2.5%), las cuales solo afectaron el crecimiento en un 72.35 ± 0.45%.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de *Alternaria solani* los diferentes tratamientos y concentraciones de nanopartículas metálicas*.

Concentración (mg L ⁻¹)	ZnO	ZnO + Ag 1.5%	ZnO + Ag2.5%	CuO	Fe ₂ O ₃
250	79.22 ± 0.31c	78.94± 3.76C	58.45± 1.72c	14.47 ± 0.36c	1.72±0.40a
500	89.27 ± 0.23b	89.05± 0.88b	64.45 ± 0.95b	90.16 ± 0.14b	1.41±0.13a
1000	90.61 ± 0.51a	93.02± 0.41a	72.35±0.45a	95.40 ± 0.24a	2.03±0.22a

*Análisis de comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) con una significancia a 0.01 probabilidad.

En la Figura 4 se observa el efecto de las dosis con los diferentes tratamientos de NPs sobre el crecimiento del *Alternaria solani* en las diferentes concentraciones; es importante destacar que en la dosis de NPs CuO a 250 mg L⁻¹ mostró poco efecto inhibitorio (Figura 4B), comparado con las otras NPs aplicadas. El tratamiento de NPs Fe₂O₃ no se tuvo efecto antagonista debido a que no mostró inhibición en el crecimiento micelial (Figura. 4E).

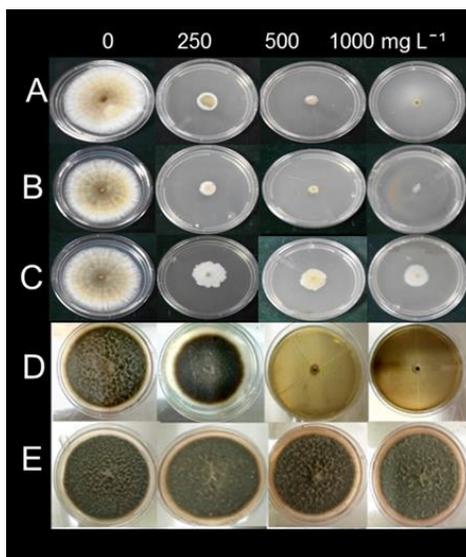


Figura 4. Efecto de las nanopartículas metálicas en el crecimiento de *Alternaria solani*. A) ZnO; B) ZnO + Ag 1.5%; C) ZnO + Ag 2.5%; D) CuO; E) Fe₂O₃.

6.1.1.2 *Fusarium oxysporum*

La evaluación de crecimiento para *Fusarium oxysporum* se realizó cuando el testigo alcanzó el 100% de crecimiento micelial a 11 días después de la siembra. En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos por los diferentes tratamientos de nanopartículas metálicas sobre el desarrollo del micelio.

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* con los diferentes tratamientos y concentraciones de nanopartículas metálicas*.

Concentración (mg L ⁻¹)	ZnO	ZnO + Ag 1.5%	ZnO + Ag 2.5%	CuO	Fe ₂ O ₃
250	64.20 ± 1.13b	69.92±0.90c	61.09± 1.53c	-13.24±0.27d	-37.04±0.88c
500	89.78± 0.16a	81.22 ± 0.27b	87.64± 0.29b	74.80±0.13b	-31.55±0.21b
1000	91.13 ± 0.16a	94.71± 0.12a	93.25± 0.34a	95.57±0.02a	-31.51±0.25b

*Análisis de comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) con una significancia a 0.01 niveles de probabilidad.

En el tratamiento de NPsCuO, al igual que con la cepa anterior, se obtuvo un 95.4±0.24 % de inhibición de crecimiento micelial con la concentración de 1000ppm; presidida de las NPs dopadas con plata las cuales tuvieron un 94.71 ± 0.12 % (ZnO + Ag 1.5%) y 93.25 ± 0.34 (ZnO + Ag 2,5%) respectivamente, mostrando un efecto de la plata sobre el crecimiento del hongo. Los resultados muestran una disminución del efecto inhibitorio lineal cuando las concentraciones disminuyeron. En la Figura 5 se observa el efecto de la dosis con los diferentes tratamientos de NPs sobre el crecimiento del *F. oxysporum* en las diferentes concentraciones; es importante destacar que las NPsCuO a 250 mg L⁻¹ este tipo de NPs no tiene un efecto inhibitor en la cepa (Figura 5 D), esto puede ser debido a que muchos de estos metales son microorganismos para estas cepas fitopatógenas y pueden tolerar concentraciones elevadas de estos (Akhtar, 2015). En el tratamiento de NPsFe₂O₃ no se encontró un efecto antagonista debido a que no se mostró una inhibición en el crecimiento micelial.

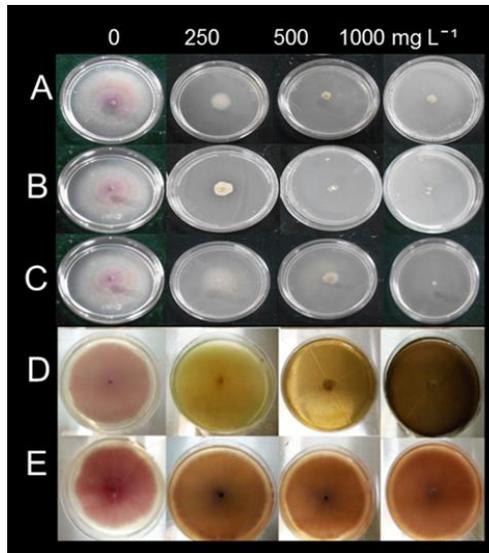


Figura 5. Efecto de las nanopartículas metálicas en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* A) ZnO; B) ZnO + Ag1.5%; C) ZnO + Ag 2.5%; D) CuO; E) Fe₂O₃

El efecto antagonista de NPsAg contra hongos fitopatógenos (*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor plumbeus*) ha sido reportado por Wani et al. (2012), ellos indican una reducción del crecimiento del micelio y de la producción de esporas, el cual se ha visto es dependiente del tiempo de incubación y la concentración de NPs, sin embargo en nuestro estudio, la concentración de plata en la NPs utilizada ZnO-Ag, no reveló un efecto antagonista asociado a la plata, con estos dos hongos utilizados *F. oxysporum* y *A. solani*, al obtener el mismo efecto que las NPsZnO sin el dopaje con plata. Diversos reportes señalan que la capacidad antifúngica de las NPs contra fitopatógenos, puede ser debida a la supresión de enzimas y toxinas usadas por el hongo patógeno para patogénesis (Bhainsa y D'Souza, 2006; Vahabi et al., 2011).

6.1.2. Actividad antibacteriana

Se evaluó la inhibición del crecimiento bacteriano de *C. michiganensis* (Cuadro 5) para evaluar el potencial antibacteriano de las NPsZnO y NPsCuO. La mayor inhibición del crecimiento se observó con NPsZnO, los resultados mostrando un 95% de inhibición a una concentración de 1000 mg L⁻¹. Por otro lado, las NPsCuO

mostraron un efecto inhibitor solo del 74% en la misma concentración (1000 mg L⁻¹). Nosotros demostramos que las NPsZnO tuvieron mayor actividad antibacterial comparada con las NPsCuO. Esto concuerda con lo reportado por Azam et al. (2012), en donde reportan que en bacterias Gram positivas como es nuestro caso (*C. michiganensis*), las NPsZnO tienen mayor poder bactericida que las NPsCuO y este último es más efectivo para bacterias gram negativas (Wang et al., 2010).

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de *Clavibacter michiganensis*.

Concentración		
(mg L ⁻¹)	* ZnO (%)	**CuO (%)
50	32.68±0.17	9.52±0.16
100	45.04±0.14	0.00±0.00
250	79.70±0.05	3.79±0.23
500	71.71±0.69	28.83±0.10
700	71.71±0.07	58.80±0.05
1000	95.55±0.03	74.91±0.05

Se realizó la comparación de medias de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$) y se obtuvo una significancia del *0.01 y **0.05 niveles de probabilidad.

Diversos estudios reportan la efectividad de NPsZnO y NPsCuO contra bacterias patógenas como *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, los resultados indicaron que ambas bacterias son susceptibles a estas NPs y que la efectividad depende en gran parte del tamaño, estabilidad y concentración en el medio de crecimiento (Jones et al., 2008; Wang, 2010; Muñoz Huerta, 2014). Se reporta que el crecimiento de la población bacteriana puede ser inhibida por interacciones específicas de las NPs, en general por el tamaño de la célula bacteriana, la cual está en el intervalo de micrómetros, se cree que las NPs son más pequeñas en

tamaño que los poros bacterianos, por lo que tendrán una capacidad de cruzar la membrana celular (Raghupathi et al., 2011).

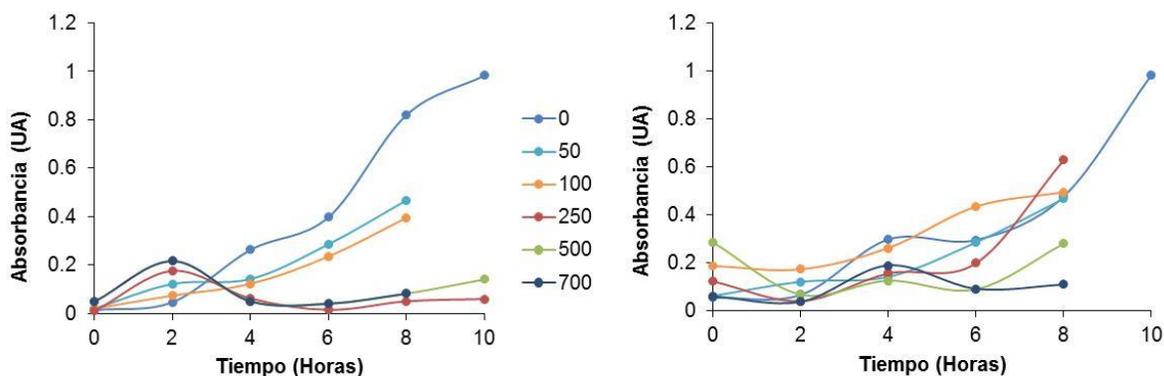


Figura 6. Cinética de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* con A) diferentes concentraciones de NPsZnO; B) diferentes concentraciones de NPsCuO.

En la Figura 6A se muestra el comportamiento antagonista de las NPs en el crecimiento del microorganismo, destacando la inhibición total de crecimiento de la cepa con la dosis más alta utilizada (1000 mg L⁻¹). Es notorio el efecto inmediato de las NPs, ya que después de 2 horas de contacto con las NPs, estas muestran el efecto antagonista. En la Figura 6B se muestra el comportamiento inhibitor de las NPsCuO en el crecimiento de *Clavibacter michiganensis*, se destaca que el efecto inhibitor empieza a partir de dosis de 700 mg L⁻¹.

6.2 Efecto de las nanopartículas en la fisiología de semillas

Se obtuvo el análisis de varianza de las semillas de *Cucumis sativus* expuestas a concentraciones diferentes de NPsCuO (Cuadro 6), se observó también el efecto de aplicación de cobre en tamaño de micropartícula, utilizando sulfato de cobre. Los datos no mostraron un cambio estadístico significativo; sin embargo, el vigor de la semillas se vio afectado de manera positiva con 1 mg L⁻¹, el vigor de la semilla nos indica el potencial que tienen las mismas para un establecimiento rápido y uniforme en el campo, incluso en condiciones desfavorables (González-Torres; 2008). En las variables donde se observaron cambios estadísticamente

significativos fueron en la longitud de la raíz la cual a 1 y 5 mg L⁻¹ fue 1.30 más larga (14.68±3.74 cm; 14.73±4.16 cm) comparada con el control (11.25 ±3.34 cm); en la longitud de plúmula a 0.5 mgL⁻¹ 1.04 veces (9.66±2.96 cm) más larga que el control (9.25 ±2.92 cm). Por otro lado, el cobre en tamaño micro partícula tuvo un efecto negativo, al disminuir el porcentaje de germinación hasta en un 22 % (78.66±2.87) y el porcentaje de vigor de la semilla en un 18 % (72±3.22), comparados con el control (96.66±0.75 y 85.33±2.65, respectivamente). Esto se vio reflejado en las demás variables cuantificadas en las que se observó una disminución de la longitud de plúmula correlacionado con el incremento en la concentración del CuSO₄ (Cuadro 6), además de observarse la mayor cantidad de semillas sin germinar en estos tratamientos. Esto difiere de lo reportado por Dimkpa et al. (2012), en donde reportan que trigo tratado con NPsCuO disminuyó el crecimiento de la raíz con cambios morfológicos asociados a fitotoxicidad, sin embargo esto va a depender de la especie de planta, el tipo de nanopartículas utilizadas así como el tamaño (Rizwan et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, diferentes investigaciones reportan los efectos positivos de la aplicación de NPs en la germinación de los cultivos, el crecimiento y el rendimiento. Sin embargo, es importante comparar el efecto de las NPs versus el mismo volumen de su equivalente en tamaño macro partícula, ya el éxito del uso de las NPs prevenir enfermedades, mejorar la nutrición y aumentar el rendimiento puede recaer entre la diferencia en volumen entre micro y nano.

Las aplicaciones de NPsCuO en los cultivos agrícolas están enfocadas a la disminución de enfermedades causadas por hongos. En recientes investigaciones realizadas con *Fusarium*, aplicaciones foliares de NPsCuO inhibieron el progreso de la enfermedad, los autores señalan que las NPs metálicas pueden estar inhibiendo al patógeno indirectamente mejorando el estado nutricional de la planta. Elmer y White (2016). En otro estudio similar reportaron que semillas de berenjenas tratadas previamente con NPsCuO, las cuales posteriormente fueron sembradas en un suelo contaminado con *Verticillium dahlie* tuvieron un mayor

rendimiento en producción, comparados con el material en tamaño micropartícula el cual no mostró efecto (Servin et al., 2015).

Cuadro 6. Comparación de medias para variables evaluadas en el ensayo de germinación, a diferentes niveles de nanopartículas NPsCuO y CuSO₄, en semillas de *Cucumis sativus*.

Tratamientos	Vigor	Germinación	PA	SSG	LP	LR
Concentración (mg L ⁻¹)	(%)	(%)	(%)	(%)	(cm)	(cm)
1 Testigo	85.33±2.65 a	96.66±0.75 a	2±0.54 a	1.33±0.51 a	9.26±2.92 ab	11.25±3.34 de
NPs CuO						
2 0.5	87.33±2.48 a	94.66±1.96 a	4±1.54 a	1.33±0.51 a	9.66±2.96 a	13.78±3.94 abc
3 1	89.33±2.42 a	96±0.63 a	3.33±0.75 a	0.66±0.40 a	9.24±2.65 ab	14.68±3.74 a
4 5	87.33±3.71 a	92±3.46 a	6.66±3.14 a	1.33±0.51 a	9±2.74 abc	14.73±4.16 a
5 10	86.00±1.64 a	90.66±1.50 a	6±1.87 a	3.33±0.40 a	9.49±2.86 ab	14.51±4.20 ab
6 50	88.00±1.78 a	92.66±2.31 a	6.66±2.42 a	0.66±0.40 a	8.53.00 bcd	11.05±3.30 e
CuSO ₄						
7 0.5	74.66±4.76 a	84±4.04 a	14±4.13 a	2±0.83 a	8.47±2.67 bcd	14.69±4.75 a
8 1	84.66±2.04 a	94±1.37 a	2.66±0.81 a	3.33±0.75 a	8.79±3.15 abc	13.68±4.78 abc
9 5	72±3.22 a	78.66±2.87 a	18.66±2.65 a	2.66±0.51 a	8.05±3.09 cd	12.72±4.90 cd
10 10	87.33±3.71 a	96±1.26 a	4±1.26 a	0±0	7.98±2.74 cd	13.92±4.49 abc
11 50	82±4.59 a	89.33±4.22 a	9.33±4.32 a	1.33±0.51 a	7.58±2.70 d	12.87±4.66 bcd
Media	84	91.33	7.03	1.63	8.74	13.43
Tukey (α=0.05)	24.61	19.63	19.22	4.11	1.12	1.64

*, **= Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad, respectivamente; FV = Fuentes de variación; GL= Grados de libertad; CV= Coeficiente de variación; Vigor = Plántulas normales al primer conteo; PA = Plántulas anormales; SSG = Semillas sin germinar; LP = Longitud de plúmula; LR = Longitud de radícula.

6.3 Detección de producción de especies reactivas de oxígeno

Algunos autores mencionan el efecto tóxico de las NPs sobre las plantas; las cuales influyen en genotoxicidad de cultivos, alteraciones en minerales y nutrientes, generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's), reduce la fotosíntesis, el intercambio de gases y muestran una reducción en crecimiento y biomasa. (Foltête et al., 2011; Wang et al., 2015). Se ha reportado que las NPs metálicas o de óxidos metálicos causan un estrés oxidativo en las plantas por la

producción de ERO's (Shaw et al., 2014; Atha et al., 2012; Wang et. al., 2011). Debido a que diversos metales alteran la concentración de algunas enzimas como peroxidasas, quitinasas y proteínas implicadas con la defensa al estrés en raíces y hojas (Apel y Hirt, 2004; Karimi et al., 2012), el potencial efecto fitotóxico de las NPs en plántulas se analizó a través de la actividad de enzimas antioxidantes como peroxidasas y por el contenido de prolina.

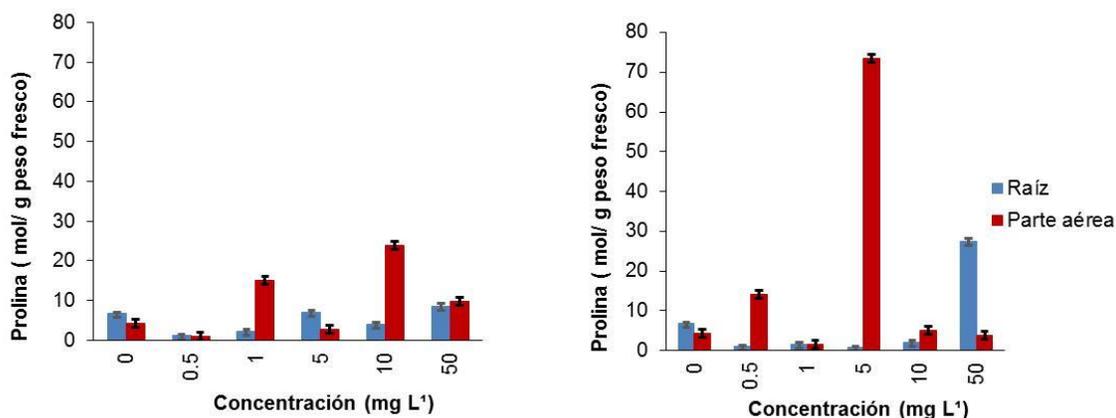


Figura 7. Determinación del contenido de prolina en *Cucumis sativus* con (A) diferentes concentraciones de NPsCuO ;(B) diferentes concentraciones de CuSO₄.

Las proteínas son blancos importantes en la célula, las reacciones con una gran variedad de radicales libres puede dar lugar a modificaciones oxidaciones de las mismas. Tales modificaciones pueden llevar a la pérdida de sus funciones enzimáticas, acumulación en inhibición de su degradación. Las proteínas pueden ser modificadas por carbonilación, debido a un ataque oxidativo (catalizado por un metal) a los aminoácidos prolina, arginina, lisina y treonina. Los productos de estas reacciones de carbonilación son principalmente prolina entre otros, siendo este aminoácido un marcador de estrés oxidativo, por tal motivo este fue cuantificado tanto en parte aérea como en raíces de las plántulas germinadas bajo el tratamiento con NPsCuO y CuSO₄.

En la Figura 7A, se muestra un incremento en el contenido de prolina 3 veces mayor en raíces tratadas con NPs con respecto al control, cabe destacar que el contenido de prolina fue altamente afectado en la parte aérea de las plántulas cuando estas fueron tratadas con CuSO_4 (Figura 7B) siendo estas semillas los que mostraron una disminución en las variables evaluadas.

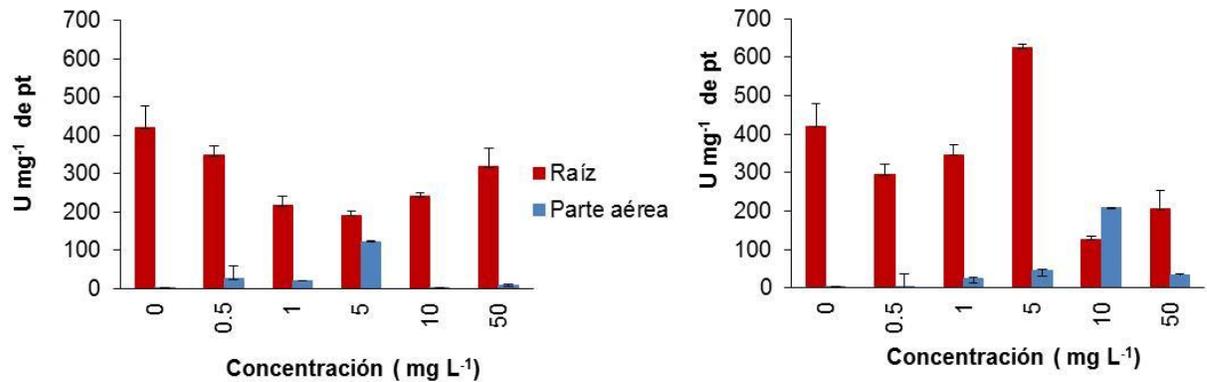


Figura 8-.Determinación del guayacol peroxidasa (GPOD) en *Cucumis sativus* con (A) diferentes concentraciones de NPs CuO ;(B) diferentes concentraciones de CuSO_4 .

Esto concuerda con nuestros resultados obtenidos en la determinación de peroxidasa (Figura 8), donde se observa un incremento en la actividad de peroxidasa en los tratamientos con CuSO_4 (Figura 8B). Esto nos indica que el Cu en micropartícula le causando un daño oxidativo a la célula que se refleja en la inhibición de variables relacionadas con crecimiento y germinación.

7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se puede promover la formulación de productos a base de NPsZnO y NPsCuO en concentraciones de 1000 mg L⁻¹ ya inhiben el desarrollo de los hongos *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*.

Las NPsZnO inhiben el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* a concentraciones de 1000 mg L⁻¹. En cuanto las NPsCuO muestran un efecto mínimo en las variables de crecimiento en *Clavibacter michiganensis*.

Existe un efecto de toxicidad en plantas por el empleo de NPs; sin embargo, esto dependerá del tipo de NPs, tamaño y especie que se está manejando. De este mismo modo las variaciones de carácter bioquímico tales como la acumulación de daño oxidativo están relacionadas a los cambios morfológicos ocurridos en las plántulas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ábrahám, E., Hourton-Cabassa, C., Erdei, L., and Szabados, L. 2010. Methods for determination of proline in plants. *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*. 317-331.
- Adhikari, T., Biswas, A. K. and Kundu, S. 2010. Nano-fertiliser -A New Dimension in agriculture. *Indian Journal of Fertilisers*. 6 (8), 22-24.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., and Ikram, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17-28.
- Akhtar, N., Ergen, S. C., and Ozkasap, O. 2015. Vehicle mobility and communication channel models for realistic and efficient highway vanet simulation. *IEEE Transactions on Vehicular Technology*, 64(1), 248-262.
- Alvarado, R., Solera, F., and Vega-Baudrit, J. R. 2014. Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de zinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(3): 134-148.
- Appelgren, P., Björnhagen, V., Bragderyd, K., Jonsson, C. E., and Ransjö, U. 2002. A Prospective Study of Infections in Burn Patients. *Burns*, 28(1), 39-46.
- Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *The Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Atha, D. H., Wang, H., Petersen, E. J., Cleveland, D., Holbrook, R. D., Jaruga, P., and Nelson, B. C. 2012. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environmental Science and Technology*, 46(3), 1819-1827.
- Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., Habib, S. S., and Memic, A. 2012. antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal Of Nanomedicine*, 7: 6003-6009.

- Betancourt, R. Reyes, P.Y., Puente, B., Ávila-Orta, C., Rodriguez, O., Cadenas, G., LiraSaldivar, H., Garcia-Cerda, L.A. 2014. Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *Journal of Nanomaterials*. Volume 2013, Article ID 980545, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/980545> (Consultado 03/11/2016).
- Bhainsa, K. C. and D'souza, S. F. 2006. extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 47(2), 160-164.
- Cao, H., Qiao, Y., Liu, X., Lu, T., Cui, T., Meng, F., Chu, P. K. 2013. Electron storage mediated dark antibacterial action of bound silver nanoparticles: smaller is not always better. *Acta Biomaterialia*, 9(2), 5100-5110.
- Carreón, L. S., and Fentanes, E. G. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: Un Reto Multidisciplinario. *Revista de Divulgación de Instituto de biotecnología de la UNAM*. <Http://www.ibt.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf>. (Consultado: 5/11/2016)
- Cheng, H. N., Klasson, K. T., Asakura, T., and Wu, Q. 2016. Nanotechnology in agriculture. In *Nanotechnology: Delivering on the Promise Volume 2* (pp. 233-242). American Chemical Society.
- Contreras, S., and César J. 2012. La Nanotecnología. *Revista de la Revista de la Sociedad Química del Perú*. 78 (3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000300001&lng=es&nrm=iso. (Consultado: 09/11/2016).
- Corrales Flores, J. 2014. Nanopartículas de cobre y de óxido de Zinc como antifúngico contra *Botrytis Cinérea In Vitro E In Vivo* en frutos de tomate durante pos cosecha. Tesis de licenciatura especializada en Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.14-17pp
- De Oliveira, J. L., Campos E. V. R., Bakshi, M., Abhilash, P. C.; Fraceto, L. F. 2014. Application of Nanotechnology for the Encapsulation of Botanical Insecticides for

Sustainable Agriculture: Prospects and Promises. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1550-1561.

Delgado-Ortiz, J. C., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna-Chávez, E., Beltrán-Beache, M., Rodríguez-Guerra, R., Aguirre-Uribe, L. A., Vázquez-Martínez, O. 2016. Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. *Revista Argentina de Microbiología*, 48 (3), 222-228.

Dimkpa, C. O., Mclean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W. P. and Anderson, A. J. 2012. CuO and ZnO Nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9), 1-15.

Esparza, Rivera E. 2015. Actividad antimicrobial de nanopartículas de cobre y óxido de zinc control hongos y bacterias fitopatógenas. Tesis de Licenciatura, especializado en Agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. 43 p.

Espinoza, Villacrés N. 2014. El uso de plaguicidas químicos en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), su relación con el medio ambiente y la salud. Tesis de maestría en ciencias especializada en Agroecológica y Ambiente. Universidad Técnica De Ambato. Ambato, Ecuador. Xii p.

Elavarthi, S., and Martin, B. 2010. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*, 273-280.

Elmer, W. H., and White, J. C. 2016. The use of metallic oxide nanoparticles to enhance growth of tomatoes and eggplants in disease infested soil or soilless medium. *Environmental Science: Nano*, 3(5), 1072-1079.

Foltête, A. S., Masfaraud, J. F., Bigorgne, E., Nahmani, J., Chaurand, P., Botta, C. and Cotelle, S. 2011. Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on vicia faba. *Environmental Pollution*, 159 (10), 2515-2522.

- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., and Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2), 179-191.
- García López J. I., Ruiz Torres N. A., Lira R., Vera I., Méndez B. 2016. En Lira y Méndez. *Agronotecnología: Nuevas fronteras de la revolución verde*. Saltillo, Coahuila, México. 244-253pp. CIQA.
- Gómez, G. L. 2013. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Revista de Investigación en Discapacidad*, 2(1), 18-22.
- González Torres, G., Mendoza Hernández, F. M., Covarrubias Prieto, J., Morán Vázquez, N., and Acosta Gallegos, J. A. 2008. Rendimiento y calidad de semilla de frijol en dos épocas de siembra en la región del bajío. *Agricultura Técnica en México*, 34(4), 421-430.
- González, P. 2006. *Enfermedades del Tomate*. Catedra de Fitopatología. Facultad Agronomía. Montevideo, Uruguay. Información disponible en línea: [Http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium.tom.htm](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium.tom.htm) (consultado 4/11/2016)
- Gubbins, E. J., Batty, L. C., and Lead, J. R. 2011. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution*, 159(6), 1551-1559.
- Handford, C. E., Dean, M., Henschion, M., Spence, M., Elliott, C. T., and Campbell, K. 2014. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: opportunities, benefits and risks. *Trends in Food Science and Technology*, 40(2), 226-241.
- Hernández Frutis, M. Ramirez Godina, F. D. A., Fernandez Luqueño, F. D. and Robledo Torres, V. D. 2015. Efecto de la aplicación de nanopartículas de titanio, hierro y zinc, en la micromorfología de raíz y tallo de girasol y frijol en invernadero. Tesis licenciatura especializada en Agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 37-65pp

- Infoagro. 2016. El chancro bacteriano del tomate. Información Técnica Agrícola. [Http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm). (Consultado: 05 de octubre 2016)
- International Seed Testing Association (ISTA). 2004. International Rules for Seed Testing. Zurich, Switzerland. 243 p
- Jha, Z., Behar, N., Sharma, S. N., Chandel, G., Sharma, D. K., and Pandey, M. P. 2011. Nanotechnology: Prospects of Agricultural Advancement. Nano Vision, 1(2), 88-100.
- Jin, T., Sun, D., Su, J. Y., Zhang, H. and Sue, H. J. 2009. Antimicrobial Efficacy of Zinc Oxide Quantum Dots against *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia Coli* O157: H7. Journal of Food Science, 74(1), M46-M52.
- Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., and Manna, A. C. 2008. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. Fems Microbiology Letters, 279(1), 71-76.
- Karimi, R. A. Khavari-Nejad, V. Niknam, F. Ghahremaninejad, and F. Najafi, "The effects of excess copper on antioxidative enzymes, lipid peroxidation, proline, chlorophyll, and concentration of Mn, Fe, and Cu in *Astragalus neo-mobayenii*". The Scientific World Journal. Vol. 2012. Article ID 615670, 6 pages. Doi:10.1100/2012/615670. (Consultado: 14/11/2016).
- Khan, A. S. 2014. Ethics and Nanotechnology. In Ethics in Science, Technology and Engineering, Doi:10.1109/ETHICS.2014.6893462.1-14pp.(Consultado 13/11/2016).
- Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Nedosekin, D. A., Dervishi, E., Biris, A. S., Shashkov, E. V., and Zharov, V. P. 2011. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108 (3), 1028-1033.
- Lin D. and Xing B. 2007. Phytotoxicity of Nanoparticles: Inhibition of Seed Germination and Root Growth. Environmental Pollution, 150: 243-250.

- Lira, R. and Méndez. B. 2016. Agronotecnología. Nueva Frontera De La Revolución Verde. CIQA. Saltillo, México.pp.11-277
- Martínez – Rodríguez L. 2015. Micromorfología de tallo y raíz de plantas de maíz y frijol tratadas con nanopartículas de titanio, hierro y zinc, bajo invernadero. Tesis de licenciatura especializada en Agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 40-65 p.
- Martínez, R. H., Benítez, A. L., Escalante, F. B., Velázquez, J. E., Aspeytia, D. S., Mendoza, I. E. M., Ochoa L. A. L. 2016. Razas De *Fusarium oxysporum* F. Sp. *Lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas. 5(7), 1169-1178.
- Méndez-Argüello, B., Vera-Reyes, I., Mendoza-Mendoza, E., García-Cerda, L. A., Puente-Urbina, B. A., and Lira Saldívar, R. H. 2016. Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annuum* por nanopartículas de óxido de zinc. Nova Scientia, 8(17), 140-156.
- Mlalila, N., Kadam, D. M., Swai, H., Hilonga, A. 2016. Transformation of food packaging from passive to innovative via nanotechnology: concepts and critiques. Journal of Food Science and Technology, 53(9), 3395-3407.
- Mohamed, Y. M., Azzam, A. M., Amin, B. H., and Safwat, N. A. 2015. Mycosynthesis of iron nanoparticles by *Alternaria alternata* and its antibacterial activity. African. Journal of Biotechnology, 14(14), 1234-1241.
- Mousavi, S. R. and Rezaei, M. 2011. Nanotechnology in agriculture and food production. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences, (10): 414-419.
- Mukhopadhyay, S, S. 2014. Nanotechnology in Agriculture: Prospects and Constraints. Journal of Nanotechnology, Science and Applications, 7: 63-71.
- Muñoz H. 2014. Síntesis, caracterización y evaluación de la Actividad microbiciada de nanomateriales de cobre. Tesis de Maestría en ciencias especializada en Toxicología. Universidad Autónoma de Aguas Calientes. Aguas Calientes, México.82-83 pp.

- Naderi, M. R. and Danesh-Shahraki, A. 2013. nanofertilizers and their roles in sustainable agriculture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(19): 2229-2232.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J and Sigg, L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*. 17(5), 372-386.
- Orberá, R. T. M., Serrat, D. M. J., González, G. Z. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 13: 95-100.
- Palanikumar, L., Ramasamy, S. N., and Balachandran, C. 2014. Size-dependent antimicrobial response of zinc oxide nanoparticles. *Nanobiotechnology, IET, Nanobiotechnology*. 8(2), 111-117.
- Park, H. J., Kim, S. H., Kim, H. J., and Choi, S. H. 2006. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *The Plant Pathology Journal*, 22(3), 295-302.
- Prabhu, S., and Poulouse, K.E. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(32).
- Raghupathi, K. R., Koodali, R. T., and Manna, A. C. 2011. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*, 27(7): 4020-4028.
- Raliya, R., and Tarafdar, J. C. 2013. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba l.*). *Agricultural Research*, 2(1), 48-57.
- Ramírez, J. A., and Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Labor*, 4(2), 67-75.

- Ravikumar, M. C. and Garampalli, R. H. 2013. Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 46(16), 1897-1903.
- Ren, L., Huang, X. L., Zhang, B., Sun L.P., Zhang, Q., Tan M., C. and Chow, G. M. 2008. Cisplatin loaded Au-Au₂S nanoparticles for potential cancer therapy. Cytotoxicity in Vitro Carcinogenicity, and Cellular uptake. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 85 (3). 787-796.
- Resham, S., Khalid, M., and Kazi, A. G. 2015. Nanobiotechnology in Agricultural Development. In Plantomics: The Omics of Plant Science. 683-698.
- Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M. F., Ok, and S., Adrees, M., Ibrahim, M.; Abbas, F. 2016. effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: a critical review. Journal of Hazardous Materials. 36 (A). 2-16
- Ruparelia, J, P., Chatterjee, A. K. Duttagrupta S.P. and Mukherji S. 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomaterialia, 4(3): 707-716.
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., and Biswas, P. 2015. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. International Journal of Biological Macromolecules, 75: 346-353.
- Sahoo, S. K., Parveen, S., and Panda, J. J. 2007. The present and future of nanotechnology in human health care. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3: 20-31.
- SAS Institute Inc., JMP®.Administrator's Guide to Anually Licensed Windows and Macintosh Versions. Versions 5. Cary, NC: SAS Inc., 2002.
- Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De La Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., and Dimkpa, C. 2015. A review of the use of engineered nanomaterials To Suppress Plant disease and enhance crop yield. Journal of Nanoparticle Research, 17(2), 1-21.

- Shapira, P., and Youtie, J. 2015. The economic contributions of nanotechnology to green and sustainable growth. In *Green Processes for Nanotechnology* (pp. 409-434). Springer International Publishing.
- SINAVIMO. 2016. Base de datos Fitosanitarios. Sistema Nacional Argentino De Vigilancia Y Monitoreo De Plagas. <http://www.Sinavimo.Gov.Ar/Plaga/Alternaria-solani>. (Consultado: 10 de noviembre 2016).
- Srilatha, B. 2011. Nanotechnology in agriculture. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*. 2:123.
- Staff, R. 2015. Nanotecnología, nanopartículas y toxicidad. *Enfermería del Trabajo*, 5(1), 21-27.
- Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., and Smart, C. D. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(22), 6948-6957.
- Urrutia, M. I., Nico, A. I., and Monaco, C. 2001. Efecto "*in vitro*" de dos fungicidas sobre la microflora antagonista al tizón del tomate. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetale*. 16 (3), 325-332.
- Vahabi, K., Mansoori, G. A.; Karimi, S. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma Reesei*. *Journal Insciences*. 1(1), 65-79.
- Volpe, D. A., Hamed, S. S., and Zhang, L. K. 2014. Use of different parameters and equations for calculation of variability in Ic_{50} determination. *The AAPS Journal*, 16: 172-180.
- Wang, H., Kou, X., Pei, Z., Xiao, J. Q., Shan, X.; Xing, B. 2011. Physiological effects of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium Perenne L.*) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology*. 5(1), 30-42.
- Wang, Z., Lee, Y. H., Wu, B., Horst, A., Kang, Y., Tang, Y. J., and Chen, D. R. 2010. Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere*. 80(5), 525-529.

- Wani, A. H., and Shah, M. A. 2012. A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(3), 4.
- Williams, D., Amman, M., Autrup, H., Bridges, J., Cassee, F., Donaldson, K., Marty, J. P. 2005. The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. The European Commission Health and Consumer Protection Directorate General by the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Brussels, Belgica. 9p.
- Yamamoto, O. 2001. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 3 (7), 643-646.
- Yah, C. S., and Simate, G. S. 2015. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23 (1), 1.
- Zuverza-Mena, N., Martínez-Fernández, D., Du, W., Hernandez-Viezcas, J. A., Bonilla-Bird, N., López-Moreno, M. L., and Gardea-Torresdey, J. L. 2016. Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses –A Review. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27289187>. (Consultado: 03/11/2016).

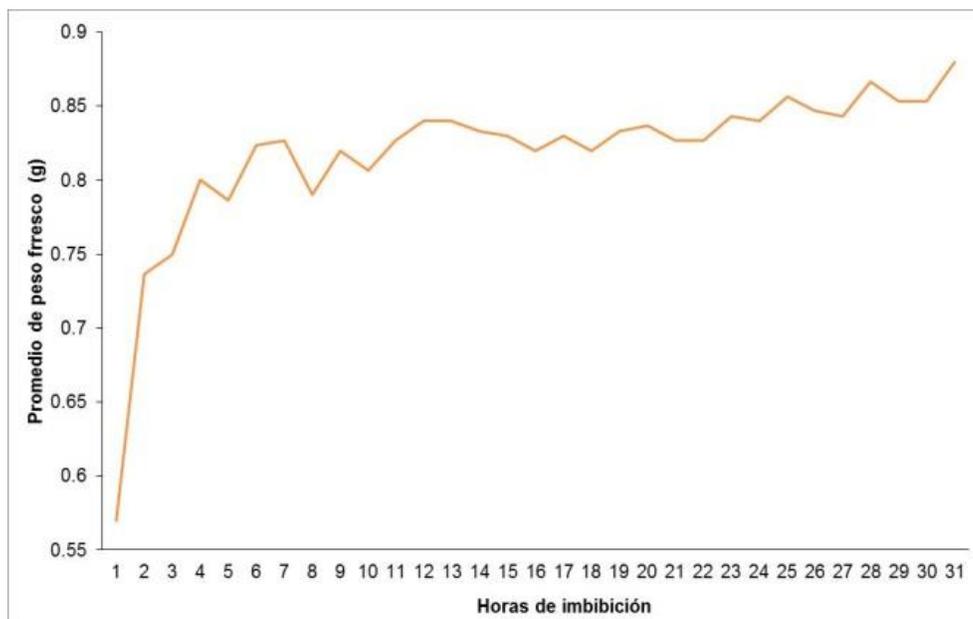
9 .ANEXOS

ANEXO1. Cuadrados medios del análisis de varianza para variables evaluadas en el ensayo de germinación, a diferentes niveles de nanopartículas NPs CuO y CuSO₄, en semillas de pepino.

FV	GL	Vigor (%)	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)	GL	LP (cm)	LR (cm)
Tratamientos	10	191.46	186.66	160.19	7.12	10	62.16 **	246.10 **
Error	55	161.26	102.54	98.32	4.50	1498	8.24	17.86
CV (%)		15.11	11.08	141.04	129.76		32.82	31.45

*, **= Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad, respectivamente; FV = Fuentes de variación; GL= Grados de libertad; CV= Coeficiente de variación; Vigor = Plántulas normales al primer conteo; PA = Plántulas anormales; SSG = Semillas sin germinar; LP = Longitud de plúmula

Anexo 2. Curva de imbibición de semillas de *Cucumis sativus*.



Anexo 3. Análisis de varianza (ANOVA) del crecimiento de *Alternaria solani* bajo el efecto de NPsZnO, NPsZnO+Ag 1.5%, NPsZnO+Ag 2.5%.

<i>Fv</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad>F</i>
Tratamiento	9	40794.538	4532.73	1682.268	<.0001
Error	110	296.386	2.69		
Total	119	41090.924			

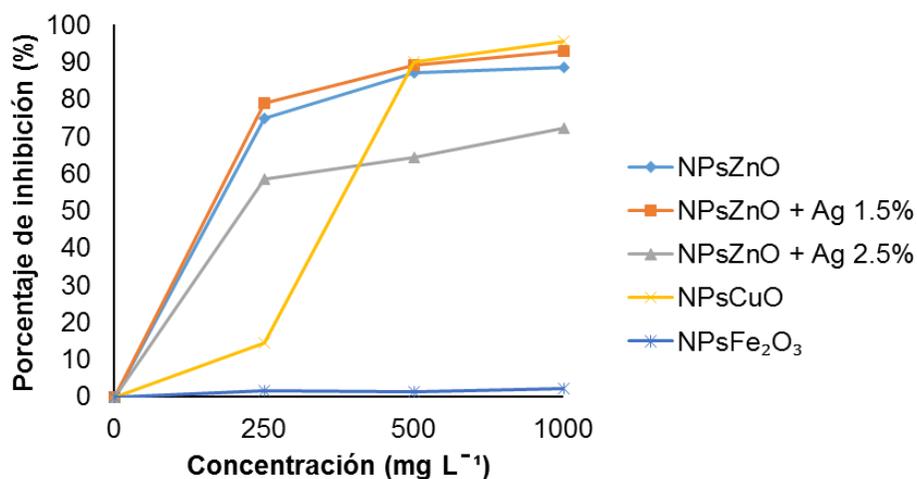
Anexo 4. Análisis de varianza (ANOVA) del crecimiento de *Alternaria solani* bajo el efecto de NPsCuO.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad>F</i>
Descripción de tratamiento	3	51.547	17182.6	26907.26	<.0001
Error	44	28.098	0.6		
Total	47	51575.93			

Anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) del crecimiento de *Alternaria solani* bajo el efecto de NPsFe₂O₃

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad>F</i>
Tratamiento	3	16.02	5.34	9.2759	<.0001
Error	44	25.33	0.5758		
Total	47	41.36			

Anexo 6. Grafica de porcentaje de inhibición de *Alternaria solani* por diferentes nanopartículas metálicas.



Anexo 7. Análisis de varianza (ANOVA) del crecimiento de *Fusarium oxysporum* bajo el efecto de NPsZnO, NPsZnO + Ag 1.5%, NPsZnO 2.5%.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad>F</i>
Tratamiento	9	41201.514	4577.95	1594.085	<.0001
Error	110	315.902	2.87		
Total	119	41517.416			

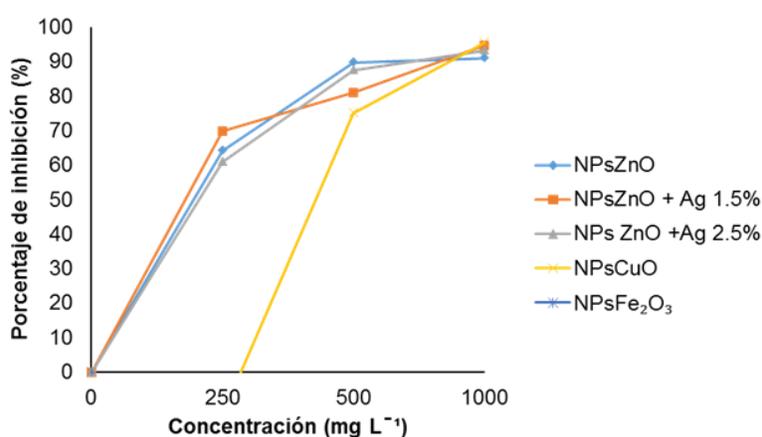
Anexo 8. Análisis de varianza (ANOVA) crecimiento de *Fusarium oxysporum* bajo el efecto de NPsCuO

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad>F</i>
Tratamiento	3	58336.15	19445.4	57924.93	<.0001
Error	44	14.771	0.3		
Total	47	58350.921			

Anexo 9. Análisis de varianza (ANOVA) crecimiento de *Fusarium oxysporum* bajo el efecto de NPsFe₂O₃

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad>F</i>
Tratamiento	3	308.38	102.796	64.2688	<.0001
Error	44	70.37	1.599		
Total	47	378.76			

Anexo 10. Grafica de porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* por diferentes nanopartículas metálicas.



Anexo 10. Análisis de varianza (ANOVA) del crecimiento de *Clavibacter michiganensis* bajo el efecto de NPsZnO.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad>F</i>
Tratamientos	6	0.63	0.10658867	3.28702825	0.01
Error	35	1.13	0.03242706		
Total	14	1.77			

Anexo 11. Análisis de varianza (ANOVA) del crecimiento de *Clavibacter michiganensis* bajo el efecto de NPsCuO.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad>F</i>
Tratamientos	0.5625206	6	0.093753	2.8451	0.02
Error	1.1533376	35	0.032953		
	1.7158582	41			