

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN  
EL PATOSISTEMA *Fusarium oxysporum-Solanum lycopersicum* BAJO  
CONDICIONES CONTROLADAS

Tesis

Que presenta ANA MARÍA GONZÁLEZ MERINO

como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**Saltillo, Coahuila**

**Diciembre 2020**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN  
EL PATOSISTEMA *Fusarium oxysporum-Solanum lycopersicum* BAJO  
CONDICIONES CONTROLADAS

Tesis

Que presenta ANA MARÍA GONZÁLEZ MERINO como requisito parcial para  
obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA  
AGRÍCOLA

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Agustín'.

Dr. Agustín Hernández Juárez  
Director (UAAAN)

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Rebeca'.

Dra. Rebeca Betancourt Galindo  
Director externo

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2020

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN  
EL PATOSISTEMA *Fusarium oxysporum-Solanum lycopersicum* BAJO  
CONDICIONES CONTROLADAS

Tesis

Elaborada por ANA MARÍA GONZÁLEZ MERINO como requisito parcial para  
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la  
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría

Dr. Agustín Hernández Juárez  
Asesor principal

Dra. Rebeca Betancourt Galindo  
Asesor

Dr. Luis Alonso Valdez Aguilar  
Asesor

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes  
Asesor

Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2020

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría en Parasitología Agrícola.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), por abrirme las puertas y darme la oportunidad de formarme como profesionista.

A mi asesor principal: Dr. Agustín Hernández Juárez, por su apoyo técnico, económico, paciencia y tiempo, en la elaboración del proyecto.

A mi asesora principal externo: Dra. Rebeca Betancourt Galindo, por su apoyo técnico y aportación de materiales, para realizar el proyecto de investigación.

A mis coasesores, el Dr. Luis Alonso Valdez Aguilar y la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes, por su apoyo en la revisión de documentos y aportación de comentarios para mejorar la calidad del artículo y tesis.

A mi amiga, Mónica Lorena Limón Corona, por su aportación en la identificación molecular del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

A mi hermano adoptado, José Ángel Gutiérrez, quien me apoyo con mano de obra en la colocación del experimento.

A mis padres y hermanos, por estar siempre motivándome y apoyándome en el transcurso de mi existencia.

A mis compañeros (Omar, Carolina) y amigos, por su amor y amistad que alegran cada momento de mi vida.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi Padres, Eleuterio González Tejeda, quien admiro, respeto y amo con todas las fuerzas de mi corazón y por heredarme su amor al campo, a Juliana Merino Martínez, por darme la vida y amor incondicional.

A mi hermosa sobrina, Arellys Saharai González Carrera, quien me ha dado el privilegio y honor, de ser tía por primera vez.

A mis hermanos: Ancelmo, Lourdes, Marco Antonio, Eleuterio, Francisco, Omar, Marisol, Margarita, Javier, Octavio y Juliana, a quienes amo y agradezco me hayan dejado ser la segunda hermana.

## Índice general

Lista de cuadros.....	VII
Lista de figuras.....	VIII
Resumen .....	IX
Abstract.....	X
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Objetivo general</b> .....	3
Objetivos específicos.....	3
<b>Hipótesis</b> .....	3
<b>Revisión de literatura</b> .....	3
Taxonomía.....	3
Descripción botánica .....	4
Importancia de la producción de tomate.....	5
Principales microorganismos fitopatógenos en tomate .....	5
Marchitez vascular del tomate <i>Fusarium oxysporum</i> .....	6
Taxonomía, patología y ecología de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	6
Nanotecnología .....	9
Las nanopartículas en el ambiente y sociedad.....	9
Nanopartículas en la agricultura .....	10
Efecto microbiano de las nanopartículas de ZnO .....	12
Interacción entre nanopartículas y plantas .....	13
<b>Materiales y métodos</b> .....	15
<b>Conclusión</b> .....	31
<b>Referencias</b> .....	32

## Lista de cuadros

Cuadro 1. Escala para evaluar la severidad por <i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. radicis-lycopersici</i> en tomate.....	28
Cuadro 2. Medias del porcentaje de inhibición, porcentaje de inhibición de esporulación, $\pm$ desviación estándar de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio PDA a diferentes concentraciones de NPs-ZnO y ZnO a 8 días de evaluación.....	32
Cuadro 3. Concentración inhibitoria del crecimiento micelial y de inhibición de esporulación y límites fiduciales de NPs-ZnO y ZnO aplicados a <i>Fusarium oxysporum</i> en medio PDA a 8 días de evaluación.....	33
Cuadro 4. Medias de altura de planta, incidencia y severidad del daño por <i>F. oxysporum</i> $\pm$ desviación estándar a diferentes concentraciones de NPs-ZnO y ZnO a 75 días después de la primera inoculación.....	36

## Lista de figuras

Figura 1. Actividad antifúngica de NPs-ZnO sobre <i>Fusarium oxysporum in vitro</i> : a) 0 ppm, b) 3000 ppm, c) 2000 ppm, d) 1600 ppm, e) 1200 ppm, f) 800 ppm, g) 400 ppm, h) 200 ppm, i) 100 ppm.....	30
Figura 2. Actividad antifúngica de ZnO sobre <i>Fusarium oxysporum in vitro</i> : a) 0 ppm, b) 3000 ppm, c) 2000 ppm, d) 1600 ppm, e) 1200 ppm, f) 800 ppm, g) 400 ppm, h) 200 ppm, i) 100 a ppm.....	31
Figura 3. Plantas de tomate <i>S. lycopersicum</i> , a) inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> , b) testigo absoluto sin inoculación del fitopatógeno. ....	34
Figura 4. Control de <i>Fusarium oxysporum</i> con NPs-ZnO y ZnO en plantas de tomate <i>S. lycopersicum</i> . a) NPs ZnO a 3000 ppm, b) NPs ZnO a 1500 ppm, c) NPs ZnO a 100 ppm, d) ZnO a 3000 ppm, e) ZnO a 1500 ppm, f) ZnO a 100 ppm.....	35

## Resumen

Se evaluó la actividad antifúngica del Óxido de Zinc (ZnO) y nanopartículas de ZnO (NPs-ZnO) sobre el control de *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Nectriaceae) bajo condiciones controladas de laboratorio e invernadero. Para la evaluación se prepararon medios envenenados y se colocó un explante en el centro del medio sólido. El arreglo experimental fue completamente al azar con 18 tratamientos, incluido el testigo, asignando 4 repeticiones para cada uno. Se evaluaron el crecimiento micelial y la concentración de conidios. Posteriormente se eligieron tres concentraciones (3000, 1500 y 100 ppm) de NPs-ZnO y ZnO para su evaluación bajo invernadero en plantas de tomate de la variedad Floradade, se realizó la inoculación con una suspensión de esporas de  $1 \times 10^7$  de *F. oxysporum* cuando la planta presento el tercer par de hojas verdaderas, posteriormente se realizó la aplicación de las diferentes concentraciones NPs-ZnO y ZnO, en dicho experimento se tomaron en cuenta la incidencia y severidad y altura de planta para determinar el efecto de los tratamientos sobre *F. oxysporum*. *In vitro* los mejores tratamientos en la inhibición micelial fueron las concentraciones altas de NPs ZnO de 1600 a 3000 ppm con 81 a 83%, en la esporulación del hongo también fueron las que inhibieron de 82.57 a 83.85%. En invernadero los tratamientos que alcanzaron mayor altura de planta fueron las NPs-ZnO de 1500 a 3000 ppm, con un rango de 166.0 a 175.40 cm, con una severidad en la escala de 0.40 a 0.80 y una incidencia de 20 a 40%. Las NPs de ZnO tienen una potencial aplicación como agente antifúngico y pueden utilizarse para controlar la propagación de *F. oxysporum* en tomate, además de mejorar el efecto promotor relacionado con la actividad que tiene el ZnO como precursor en la síntesis de auxinas, biosíntesis de citoquininas y giberelinas; así como la inducción de mayor actividad de enzimas antioxidantes útiles en la respuesta al ataque de patógenos.

Palabras clave: Enfermedad, nanopartículas, tomate, toxicidad.

## Abstract

The antifungal activity of Zinc Oxide (ZnO) and ZnO nanoparticles (NPs-ZnO) was evaluated on the control of *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Nectriaceae) under controlled laboratory and greenhouse conditions. For evaluation, poisoned media was prepared and an explant was placed in the center of the solid medium. The experimental arrangement was completely randomized with 18 treatments, including the control, assigning 4 repetitions for each one. Mycelial growth and conidia concentration were evaluated. Subsequently, three concentrations (3000, 1500 and 100 ppm) of NPs-ZnO and ZnO were chosen for their evaluation under greenhouse in tomato plants of the Floradade variety, inoculation with a  $1 \times 10^7$  spore suspension of *F. oxysporum* when the plant presented the third pair of true leaves, later the application of the different concentrations NPs-ZnO and ZnO was carried out, in this experiment the incidence and severity and height of the plant were taken into account to determine the effect of the treatments on *F. oxysporum*. In vitro the best treatments in mycelial inhibition were the high concentrations of NPs ZnO from 1600 to 3000 ppm with 81 to 83%, in the sporulation of the fungus they were also those that inhibited from 82.57 to 83.85%. In the greenhouse, the treatments that reached the highest plant height were the ZnO NPs of 1500 to 3000 ppm, with a range of 166.0 to 175.40 cm, with a severity on the scale of 0.40 to 0.80 and an incidence of 20 to 40%. ZnO NPs have a potential application as an antifungal agent and can be used to control the spread of *F. oxysporum* in tomato, in addition to improving the promoter effect related to the activity of ZnO as a precursor in the synthesis of auxins, biosynthesis of cytokinins and gibberellins; as well as the induction of higher activity of antioxidant enzymes useful in the response to the attack of pathogens.

Keywords: Disease, nanoparticles, tomato, toxicity.

## Introducción

El tomate *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) es la hortaliza de mayor importancia a nivel mundial. China es el productor y consumidor más importante de tomate, mientras que Estados Unidos es el principal importador y México el principal exportador de esta hortaliza (FIRA 2019). México resalta con una de producción de 3, 780,950 ton., y un valor de la producción de \$ 31, 150,517(MXN) (SIAP 2020), además, cuyo cultivo, cosecha y comercialización genera 72 mil empleos directos y aproximadamente 10.7 millones de empleos indirectos. La producción de este cultivo se ve afectada por una gran cantidad de microorganismos fitopatógenos que afectan su rendimiento, tales como: bacterias, hongos, virus, entre otros. Uno de los principales hongos que más afecta al cultivo, son del género *Fusarium* Link (Nectriaceae) que causan pérdidas entre 21 y 47% en cultivos en exposición libre y bajo cubierta (Fernanda et al., 2020, Mejía y Hernández, 2001). *Fusarium oxysporum* Schltdl. es el agente causal de la enfermedad del marchitamiento de tomate, los principales síntomas de la enfermedad incluyen; clorosis, marchitamiento progresivo de hojas, decoloración del tejido vascular, retraso del crecimiento, hasta llegar a ocasionar la muerte de la planta (Aydi Ben Abdallah et al., 2016; Aydi Ben Abdallah et al., 2019).

En la agricultura convencional los fungicidas químicos son la principal herramienta para el control de hongos fitopatógenos. El uso continuo y excesivo de estos productos ha traído como consecuencia el desarrollo de resistencia a los fungicidas utilizados (Alcedo et al., 2018). Los productos químicos ingresan al organismo humano quedándose en él, produciendo enfermedades como cáncer, daños permanentes en niños que nacen con daños genéticos con deterioros, daños ambientales como la esterilización del suelo y la desertización de grandes regiones (Rivero, 2018).

Actualmente se ha incrementado la búsqueda de alternativas de control, como el uso de biofungicidas y la nanotecnología en la agricultura; cuyas aplicaciones

incluyen fertilizantes para aumentar el crecimiento y rendimiento de las plantas, pesticidas para el manejo de plagas y enfermedades, y sensores para monitorear la calidad del suelo y la salud de las plantas (Servin *et al.*, 2015).

Las nanopartículas (NPs) son materiales entre 1 y 100 nm y existen como metaloides, óxidos metálicos, no metales y nanomateriales de carbono, etc., cuyo pequeño tamaño, gran superficie y alta reactividad han permitido su uso en el control de enfermedades y como nanofertilizantes (Elmer y White 2018).

Actualmente existen trabajos en donde reportan que una de las aplicaciones de las NPs metálicas es como antimicrobianos; ya que elementos como ZnO, Cu, Ag y Fe son antagonistas de una diversidad de microorganismos, donde se incluyen hongos y bacterias fitopatógenos (Saharan *et al.*, 2015).

Las NPs-ZnO en diferentes cultivos de interés económico se les ha reportado que presentan propiedades como promotores de crecimiento, bactericidas y fungicidas (Esparza 2015; Méndez *et al.*, 2016), en este último, se ha señalado que reducen la presencia de enfermedades por su actividad antifúngica contra *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatu*, *Fusarium culmorum* y *F. oxysporum* (Rajiv *et al.*, 2013).

En base a la revisión de literatura, existe poca información *in vitro* sobre la efectividad de las NPs-ZnO como fungicidas, por lo que en este trabajo se planteó evaluar su efecto *in vitro* sobre *F. oxysporum* y en plantas de tomate bajo condiciones controladas.

## Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de NPs-ZnO en el patosistema *Fusarium oxysporum*-*Solanum lycopersicum* bajo condiciones controladas

## Objetivos específicos

Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de NPs-ZnO para el control de *Fusarium oxysporum* bajo condiciones controladas de laboratorio.

Evaluar la actividad antifúngica de NPs-ZnO para el control de *Fusarium oxysporum* en tomate *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de invernadero.

## Hipótesis

La aplicación de las NPs-ZnO en *Fusarium oxysporum* *in vitro* y en el cultivo de *Solanum lycopersicum*, controlara un 80% de en comparación con el ZnO.

## Revisión de literatura

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas. En una primera clasificación taxonómica, Linnaeus en 1753 denominó al tomate cultivado *Solanum lycopersicum*; posteriormente, en 1754, Miller le asigna el género *lycopersicon* y la especie *esculentum*, clasificación comúnmente aceptada hasta que trabajos recientes (Peralta *et al.*, 2006) propiciaron que se volviera a renombrar como *Solanum lycopersicum* L.

## Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *lycopersicum*

Fuente: Semillaria 2015

### **Descripción botánica**

Plantas herbáceas anuales o perennes, autógamas, de porte erecto y hasta más de 1.5 m de altura, vellosas e inermes.

El sistema radicular del tomate está constituido por la raíz principal, las raíces secundarias y las raíces adventicias. La raíz principal es profunda y alcanza 1.5 metros de profundidad, la mayor parte se encuentra en los primeros 50 centímetros INTA, (2014).

El tallo primero es herbáceo, aunque tiende a lignificarse en las ramas viejas; es frágil, redondo y erecto, semileñoso, con pelos glandulares que le confieren el olor característico Monardes, (2009).

Las hojas son compuestas, alternas, imparipinadas, con los folíolos dentados o lisos y con pelos glandulares Monardes, (2009).

Las inflorescencias son racimos en cimas de flores con cinco pétalos, cinco sépalos largos lanceolados y cinco estambres en columnas que rodean el estilo; el cáliz es persistente.

Las flores no se abren simultáneamente, de modo que siempre hay botones, flores y frutos en el mismo gajo o ramilla. La antesis (apertura de flor), por lo común ocurre en las primeras horas del día y 24 horas después se inicia la salida del polen, y este aparece en el lado interno de las anteras y cae directamente sobre la superficie de los estigmas (Infoagro Systems S.L. 2016).

La semilla es plana y ovalada con dimensiones aproximadas de 3x2x1 mm. Si se almacena por periodos prolongados se recomienda hacerlo a una humedad de 5.5 %. Una semilla de calidad deberá tener al menos el 95 % de germinación (González *et al.*, 2008).

### **Importancia de la producción de tomate**

México es el principal proveedor a nivel mundial de tomate con una participación en el mercado internacional de 25.11% del valor de las exportaciones mundiales. A pesar de que durante el periodo 2003-2016 se experimentó una reducción en la superficie sembrada, presentó un crecimiento acumulado en la producción (54.25%) y en las exportaciones en fresco (77.87%), convirtiéndolo en uno de los cultivos con mayor incremento en productividad SIAP, (2017). Las entidades federativas que presentan los mayores aumentos en producción en el 2020 son: Michoacán con 23,797 t (12.6%), Durango con 19,398 t (60.8%), Coahuila 11,120 t (10.2%) y Baja California 9,616 t (10.4%), respecto del año anterior. En contra parte, Jalisco, Nayarit, Sonora y San Luis Potosí, reportan disminuciones significativas con: 40,126 t (29.2%), 24,909 t (98.5%), 22,194 t (53.7%) y 14,501 t (4.4%), respectivamente (SIAP, 2020). La adaptación de estas regiones a la producción de hortalizas ha sido significativa con el apoyo de tecnificación en los cultivos, considerando el uso de estructuras de protección para las plantas, como es el caso de invernaderos y malla sombra. No obstante, las plagas y enfermedades son un factor biótico primordial que merma significativamente la producción (Martínez *et al.*, 2016).

### **Principales microorganismos fitopatógenos en tomate**

Uno de los problemas que más afecta la producción de tomate en México es el control de plagas y enfermedades. No solo por aumentar los costos del cultivo, sino que también ocurre cierta resistencia a los productos químicos por parte de los microorganismos cuando estos eran controlados aceptablemente con los mismos productos años atrás (Serrato, 2015). El cultivo de tomate se encuentra afectado por la presencia de diversos microorganismos patógenos, los cuales

son la principal causa de las enfermedades, dentro de los cuales se destaca la presencia de hongos (Ascencio *et al.*, 2008).

### **Marchitez vascular del tomate *Fusarium oxysporum***

El tomate es una es atacado por numerosas enfermedades, entre las cuales, está la marchitez vascular, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El marchitamiento vascular del tomate por *Fusarium* fue descrito por Masse en 1885 en las Islas de Wight y Guersney. El patógeno, por ser habitante del suelo, es difícil de manejar. Una vez que el suelo se infesta puede permanecer con el patógeno por tiempo indefinido. Debido al cultivo sucesivo de tomate en el mismo lugar, la población del hongo aumenta y, por ende, la incidencia de la enfermedad (Vásquez *et al.*, 2017).

### **Taxonomía, patología y ecología de *Fusarium oxysporum***

Es la especie de *Fusarium* más dispersa y puede recuperarse de la mayoría de los suelos: árticos (Kommedahl *et al.*, 1988), tropicales o desérticos (Joffe *et al.*, 1977; Mandeel *et al.*, 1995) y cultivados o no (McMullen *et al.*, 1983; McMullen *et al.*, 1984). También puede ser dispersado por insectos (Gillespie *et al.*, 1993) y recuperado de algas marinas (Granchinho *et al.*, 2002). *F. oxysporum* también es sin duda la especie más importante económicamente del género, dados sus numerosos hospedadores y el nivel de pérdida que puede resultar cuando infecta una planta.

La morfología de las colonias en PDA varía ampliamente. El micelio puede ser floco (consiste en o está cubierto con mechones lanosos), escaso o abundante y su color varía de blanco a violeta pálido. En algunos aislamientos se producen abundantes macroconidios de color naranja pálido o violeta pálido en una masa central de esporas. Algunos aislamientos pueden producir abundantemente esclerocios pequeños de color marrón pálido, azul a negro azulado o violeta. *F. oxysporum* generalmente produce un pigmento violeta pálido a violeta oscuro o magenta oscuro en el agar, pero algunos aislamientos no producen ningún pigmento. Algunos aislados de *F. oxysporum* mutan fácilmente a la forma

pionnotal a una colonia micelial plana "húmeda" con un aspecto amarillo a naranja cuando se cultivan en PDA (Leslie *et al.*, 2006).

Las características morfológicas críticas de *F. oxysporum* incluyen la producción de microconidios en cabezas falsas en fialidas cortas formadas en las hifas, la producción de clamidosporas y la forma de los macroconidios y microconidios. El número y la morfología de las macroconidias y microconidias formadas pueden alterarse drásticamente por mutaciones aparentemente de un solo gen (Ohara *et al.*, 2004).

Macroconidios (Leslie *et al.*, 2006)

Sporodochia: la mayoría de los aislamientos producen abundante esporodochia naranja pálido; sin embargo, en algunos aislados, la esporodochia puede ser escasa o inexistente.

- Morfología general: De longitud corta a media, recta a ligeramente curvada, relativamente esbelta y de paredes delgadas.
- Morfología de las células apicales: ahusadas y curvas, a veces con un ligero gancho.
- Morfología de las células basales: Pie en forma de punta.
- Número de septos: generalmente 3 septos.
- Abundancia: escasa en algunas cepas, pero generalmente abundante en esporodochios y, ocasionalmente, en hifas que crecen en la superficie del agar.

Microconidios (Leslie *et al.*, 2006)

Forma / tabicación: Ovalada, elíptica o en forma de riñón y normalmente 0-tabificada.

- Presentación de micelio aéreo: Cabezas falsas.
- Células conidiógenas: Monofialides cortos.
- Abundancia: Abundante en el micelio aéreo.

Clamidosporas (Leslie *et al.*, 2006)

- Abundancia / Velocidad de formación: Formado abundante y rápidamente (2-4 semanas con CLA) por la mayoría de los aislamientos, pero algunos aislamientos forman clamidosporas lentamente si es que las forman.
- Ubicación: generalmente formados individualmente o en pares, pero también pueden encontrarse en grupos o en cadenas cortas. Puede ser terminal o intercalar en hifas aéreas, sumergidas o superficiales.
- Aspecto: Paredes lisas o rugosas.

Los síntomas más notables de *F. oxysporum* ocurren al inicio de la floración, poco después de la formación de los primeros frutos (Beckman, 1987; Mendoza, 1993; Ramírez, 1998). Inician con un amarillamiento en las hojas más viejas, extendiéndose a toda la planta y ocasionando una clorosis que a veces se presenta en las hojas de un sólo lado de la planta, y en ocasiones sólo en la mitad de éstas (Cárdenas, 2000). Las hojas afectadas se marchitan y mueren, aunque pueden permanecer adheridas al tallo. Si se realiza un corte transversal del tallo, se observa una necrosis vascular de color café en forma de anillo, la cual se extiende hacia la parte apical de la planta de acuerdo con la severidad de la enfermedad, marchitando y matando a las plántulas o plantas adultas (Sánchez, 1998). Las plantas más viejas pueden marchitarse y morir repentinamente; sin embargo, comúnmente muestran achaparramiento, epinastia, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitez de las hojas y tallo jóvenes, defoliación, necrosis marginal de hojas y finalmente la muerte de la planta (Sánchez, 1998). Cuando las raíces y los tallos son colonizados, los síntomas se muestran como una pudrición necrótica, particularmente sobre las raíces laterales más pequeñas; lo cual acelera el marchitamiento del follaje. Después que la planta muere, el hongo fructifica sobre la superficie del tallo bajo condiciones de ambiente húmedo (Angulo, 1996; Valdez, 1999).

En la región de Sinaloa, las variedades Walter y Floradade resistentes a R1 y R2 eran ampliamente cultivadas, y fue a partir de 1980 en que dichas variedades empezaron a tener problemas con marchitamiento por *Fusarium* (Fasio *et al.*, 2003).

## **Nanotecnología**

El prefijo nano, que distingue todo lo relacionado con esta nueva disciplina, proviene del nanómetro (nm), que es la unidad de longitud equivalente a la milmillonésima parte del metro ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) (López, 2012). La nanotecnología es una ciencia innovadora que atrae a investigadores y científicos de diferentes disciplinas, incluyendo físicos, químicos, ingenieros y biólogos de todo el mundo (Kulzer, 2004). Con aplicaciones en el campo agrícola, industrial, medicina etc., las cuales por su tamaño pueden modificar moléculas biológicas, para proporcionarles funciones muy diferentes a las que tienen por naturaleza (Paul *et al.*, 2003).

### **Las nanopartículas en el ambiente y sociedad**

El aumento del uso de NPs-ZnO en productos de consumo puede aumentar su liberación al medio ambiente. Para evaluar el impacto de la exposición a estas nanopartículas (NPs) en la salud humana es necesario detectar y monitorear nanomateriales en el aire, el agua y el suelo, lo cual requiere de varios tipos de sensores (Handy *et al.*, 2008).

En la agricultura, la mayoría de los agroquímicos aplicados a los cultivos se pierden y no llegan al sitio de destino debido a varios factores, incluyendo lixiviación, hidrólisis, fotólisis y degradación microbiana (Sabir *et al.*, 2014). Las NPs y las nanocapsulas proporcionan un medio eficaz para distribuir pesticidas y fertilizantes de forma controlada con alta especificidad del sitio reduciendo así daños colaterales. El desarrollo de nanosensores puede ayudar a determinar la cantidad requerida de insumos agrícolas tales como fertilizantes y pesticidas. Por otra parte, las plantas pueden absorber rápidamente los nanofertilizantes. Los fertilizantes nanocapsulados de liberación lenta pueden ahorrar y minimizar la contaminación ambiental (Sabir *et al.*, 2014), lo que ayudaría a evitar los problemas de contaminación existentes. Sin embargo, se requiere mayor investigación al respecto.

En la sociedad, el tamaño de las NPs despierta sospechas de sus posibles riesgos a la salud humana; ya que partículas de tamaño semejante, que son subproducto de procesos productivos como el humo de la combustión de los motores o el asbesto pueden provocar cáncer (Foladori *et al.*, 2012). La toxicidad de un metal en los organismos vivos está influenciada por su solubilidad en agua, la unión específica a un sitio biológico y su morfología. Por lo que, éstos están definidos por cambios en la funcionalidad o morfológicos en el cuerpo humano debido a la ingesta, inhalación y absorción o introducción a través de un agente biológico (Hossain, 2015).

Una creciente necesidad de nanotecnología en diversas industrias puede provocar una enorme dispersión ambiental de nanopartículas en los próximos años. Se plantea una preocupación por la interacción de las nanopartículas con la flora y la fauna debido a una carga cada vez mayor en el medio ambiente. En los últimos años, varios investigadores han demostrado el impacto de las nanopartículas en el crecimiento de las plantas y su acumulación en la fuente de alimento (Rastogi *et al.*, 2017).

### **Nanopartículas en la agricultura**

En los últimos años se han desarrollado nanopartículas para su uso en la agricultura como nanopesticidas y nanofertilizantes (que incluyen el uso de nanopartículas como nanoportadores de pesticidas, fertilizantes (Fraceto *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Se han utilizado nanopartículas de quitosano para encapsular herbicida, aumentando la eficiencia del herbicida significativamente (Maruyama *et al.*, 2016). Las NPs de silicio mesoporosas como NPs metaloides también se han utilizado para suministrar ADN, proteínas y otros productos químicos en las plantas (Torney *et al.*, 2007; Martin-Ortigosa *et al.*, 2014). El uso en la agricultura incluye nanopartículas, como nanozeolitas (bloques de construcción básicos de silicato  $[\text{SiO}_4]$  - y aluminatos  $[\text{AlO}_4]$  - tetraedros), así como los hidrogeles (que consisten en diferentes polímeros como quitosano y alginato), que ayudan en la mejora de la calidad del suelo y nanosensores (para monitorear la salud de las plantas y el suelo (Fraceto *et al.*, 2016). Se menciona

que las nanopartículas de sílice no son tóxicas para las plantas (Slomberg y Schoenfisch, 2012), pero algunos autores observaron efecto tóxico debido a la disminución del pH del agua destilada después de la adición de NPs. Tripathi y col. (2015) han declarado que las nanopartículas de sílice pueden aliviar la fitotoxicidad del cromo (VI) en plántulas de *Pisum sativum* L. (Fabaceae) (Tripathi *et al.*, 2015). Varios estudios sobre el impacto de las NPs de metales y óxidos metálicos en las plantas han mostrado un impacto tóxico en las plantas, mientras que pocos estudios también indicaron su papel beneficioso en la forma de mejorar los parámetros de crecimiento y la productividad de las plantas (Castiglione *et al.*, 2011; Clément *et al.*, 2013; Dimkpa *et al.*, 2013; Jaberzadeh *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Rafique *et al.*, 2014; Raliya *et al.*, 2015; Okupnik y Pflugmacher, 2016; Cvjetko *et al.*, 2017; Tripathi *et al.*, 2017).

Las NPs metálicas de ZnO, ya sean puras o mezcladas con plata (Ag), están siendo estudiadas globalmente por su potencial agrícola como promotores de crecimiento, nanofertilizantes y antimicrobiales (Méndez *et al.*, 2016).

Las NPs-ZnO y ZnO, afectaron la germinación de las plantas y tuvieron efectos negativos sobre el alargamiento de las raíces (Lin y Xing, 2007, 2008). También se observó que NP-ZnO reduce la eficiencia fotosintética y la actividad antioxidante, mientras que induce la producción de ROS en la planta de trigo (Tripathi *et al.*, 2017). También se observó fragmentación del ADN debido a la toxicidad de NPs-ZnO en *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) (Ghosh *et al.*, 2016). Se observó que el tratamiento de NPs-ZnO a una concentración de 1000 ppm promueve la germinación de las semillas y el vigor de las plántulas, y a su vez mostró un establecimiento temprano en el suelo que se manifiesta por una floración temprana y un mayor contenido de clorofila en las hojas, pero se observó que la concentración más alta de NPs-ZnO a 2000 ppm presenta efecto negativo y tóxico sobre el crecimiento y rendimiento del maní (Prasad *et al.*, 2012).

Jo *et al.* (2009) probaron varias formas de iones de plata y nanopartículas para examinar la actividad antifúngica en dos hongos patógenos de plantas, *Bipolaris*

*sorokiniana* (Sorokin) Shoemaker (Pleosporaceae) y *Magnaporthe grisea* Saccardo (Pyriculariaceae). Ensayos en placa de Petri *in vitro* indicaron que los iones de plata y las nanopartículas tenían efecto significativo en la formación de colonias de estos dos patógenos, mientras que las concentraciones efectivas de los compuestos de plata que inhiben la formación de colonias en un 50% fueron más altas para *B. sorokiniana* que para *M. grisea*. El efecto inhibitorio sobre la formación de colonias disminuyó significativamente después de que los cationes de plata fueron neutralizados con iones de cloruro. Los ensayos de inoculación en la cámara de crecimiento confirmaron además que tanto la plata iónica como la plata en nanopartículas reducen significativamente estas dos enfermedades fúngicas en césped inglés *Lolium perenne* L. (Poaceae). En particular, los iones de plata y las nanopartículas redujeron eficazmente la gravedad de la enfermedad con una aplicación de 3 h antes de la inoculación de esporas, pero su eficacia disminuyó significativamente cuando se aplicaron 24 h después de la inoculación. En planta, la eficacia de los iones de plata y las nanopartículas es mucho mayor con la aplicación preventiva, que puede promover el contacto directo de la plata con las esporas y los tubos germinativos e inhibir su viabilidad.

### **Efecto microbiano de las nanopartículas de ZnO**

Las NPs-ZnO tienen una potencial aplicación como agentes bacteriostáticos y antifúngicos y pueden utilizarse para controlar la propagación y la infección de diversos patógenos (Raska y Laware, 2014).

Al-Dhabaan *et al.* (2017) evaluaron las NPs-ZnO y nanocompuestos de quitosano, óxido de zinc y cobre (CS-Zn-Cu NC) contra tres hongos patógenos de plantas, incluidos *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl (Pleosporaceae), *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (Agonomycetaceae) y *Botrytis cinerea* Persoon (Sclerotiniaceae). La aplicación *in vitro* mostró que las CS-Zn-CuNC a 90  $\mu\text{g ml}^{-1}$  tienen la mayor actividad antifúngica, inhibiendo el crecimiento de *B. cinerea* con una inhibición de 1.7 cm en comparación con las otras concentraciones y con las otras nanopartículas. Las NPs-ZnO a 90  $\mu\text{g ml}^{-1}$  inhibieron significativamente el crecimiento de *R. solani*, con una inhibición de 1.6 cm en comparación con

concentraciones de 30 y 60  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Mientras que las nanopartículas de Cu a 90  $\mu\text{g ml}^{-1}$  inhibieron el crecimiento de *A. alternata* en 1.4 cm.

Kriti *et al.* (2020) investigaron la actividad antimicótica de NPs-ZnO sobre formadores de esporas oscuras, *B. sorokiniana* y *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire (Pleosporaceae). En este estudio se observó que las NPs ZnO son eficaces para interferir con el metabolismo de dichos hongos fitopatógenos a una concentración de 20 ppm fueron eficaz para inhibir la germinación de esporas en *B. sorokiniana* y en 10 ppm efectivas para *A. brassicicola*. Y a 100 ppm de NPs-ZnO inhibe significativamente el crecimiento micelial de ambos patógenos.

Actualmente se tienen más investigaciones, en donde se evalúan diferentes NPs sobre el efecto de microorganismos fitopatógenos. Las NPs-Ag, debido a su actividad fungicida, se han probado contra pocos hongos patógenos de plantas y se encontró que su impacto es significativo en la eliminación de los hongos (Jo *et al.*, 2009). Pero su uso en la agricultura aún es cuestionable ya que se sabe que los AgNP liberan iones de plata con su edad, además, pueden afectar la acumulación de biomasa en el suelo (Johansson *et al.*, 1998; Liu y Hurt, 2010).

### **Interacción entre nanopartículas y plantas**

Las nanopartículas pueden interferir con el metabolismo de las plantas de varias formas, por ejemplo, proporcionando micronutrientes (Liu y Lal, 2015), regulando los genes (Nair y Chung, 2014), o interfiriendo con diferentes procesos oxidativos en las plantas que resultan en un estallido oxidativo (Hossain *et al.*, 2015).

Sin embargo, con base en investigaciones científicas previas, es evidente que la mayoría de las nanopartículas metálicas en alta concentración son tóxicas para las plantas. Las nanopartículas cuando están presentes en concentraciones muy altas dañan la pared celular de la planta y la membrana plasmática, penetrando así e interactuando con los diferentes procesos de la planta (Mazumdar y Ahmed, 2011; Mirzajani *et al.*, 2013). Se observó que los AgNP de 25 nm a alta concentración rompen la pared celular y dañan las vacuolas de las células de la

raíz de *Oryza sativa*, provocando así un efecto tóxico (Mazumdar y Ahmed, 2011). Mirzajani y col. (2013) observaron que el AgNP no pudo penetrar las células de la raíz de *O. sativa* cuando estaba presente en una concentración baja (hasta 30 µg / mL), mientras que la concentración más alta pudo destruir la estructura celular y causar el efecto tóxico. Los autores también informaron que 30 µg / mL acelera el crecimiento de la raíz, mientras que 60 µg / mL restringen la capacidad de crecimiento de la raíz. Las observaciones indican que la penetración de AgNP es necesaria para causar un efecto tóxico, mientras que cuando está presente en los alrededores, puede tener un impacto positivo en las plantas. Krishnaraj y col. (2012) observaron un efecto leve o nulo del AgNP sintetizado biológicamente en *Bacopa monnieri*.

Las nanopartículas de cobre (Cu NP) se utilizan ampliamente como un agente antimicrobiano, (Kasana et al., 2017). Debido a su propiedad oxidativa, se supone que las nanopartículas de óxido de cobre (CuO NP) tienen un efecto tóxico mayor que el Cu NP. Se observó que CuO NP tiene un impacto positivo en *Elodea densa* (alga acuática) y estimula la fotosíntesis a baja concentración (<0.25 mg / L), pero el escenario de impacto cambia completamente con dosis más altas y a una concentración de 1 mg / L una clara supresión en la fotosíntesis fue observada (Nekrasova et al., 2011). Se informó que la morfología de la raíz se ve afectada negativamente con Cu y NPs-CuO, con una inhibición casi completa con una dosis alta de NP (Lee et al., 2008; Adhikari et al., 2012; Perreault et al., 2014; Shaw et al., 2014; Song et al., 2016; Adams et al., 2017).

Para tener alguna acción o efecto, las NPs deberían de ingresar a la célula de alguna forma. Al respecto, existe la posibilidad de que algunas NPs no solo interactúen con la superficie de la membrana, sino que también podrían penetrar al interior de ciertos organismos (Gómez et al., 2013). Para su absorción y translocación, las nanopartículas deben atravesar varias barreras químicas y fisiológicas. Cuando las nanopartículas interactúan con la planta, la pared celular es la primera barrera que debe cruzar. Las paredes de las células vegetales son una estructura compuesta de celulosa que permite la entrada de partículas

pequeñas y restringe las más grandes, por lo que nanopartículas más pequeñas pueden atravesar esta capa de una manera comparativamente fácil, con respecto a las nanopartículas más grandes. El límite de exclusión de tamaño para la pared celular de la planta está entre 5 y 20 nm (Dietz y Herth, 2011). Se ha informado que algunas de las nanopartículas inducen la formación de poros más grandes en la pared celular, lo que facilita aún más la entrada de nanopartículas grandes (Navarro *et al.*, 2008; Kurepa *et al.*, 2010). Desde la pared celular, las nanopartículas pueden moverse a través del endocitosis (Etxeberria *et al.*, 2006), además, a través del transporte simplástico, pueden viajar a diferentes tejidos vegetales (Ma *et al.*, 2010). Recientemente, Wong *et al.* (2016) propusieron un modelo matemático que indica que el mecanismo de intercambio de lípidos para el transporte de nanopartículas dentro de las células vegetales, donde indicó que el tamaño, la magnitud y los potenciales zeta son clave para determinar el transporte de nanopartículas dentro de la planta.

## **Materiales y métodos**

### **Ubicación del experimento**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Entomología Molecular y Alternativas de Control de Plagas e invernadero del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

### **Nanopartículas de Óxido de Zinc (NPs-ZnO) y Óxido de Zinc (ZnO)**

Las NPs-ZnO fueron sintetizadas en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), en Saltillo Coahuila. Se sintetizaron a través de precipitación controlada de acuerdo a la guía de Betancourt *et al.* (2010), mediante el método de hidrólisis química, bajo la siguiente metodología: en un matraz bola provisto de tres bocas se colocaron 13.7 g de  $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$  y 600 mL de etanol. Esta solución se agitó constantemente a una temperatura de 75°C en reflujo durante 2 h. Después se adicionó una solución acuosa de 0.22 M de NaOH y 100 mL más

de H<sub>2</sub>O para completar la mezcla de reacción. Se continuó con agitación constante durante 24 h. Posteriormente las NPs-ZnO obtenidas inmersas en etanol fueron centrifugadas a 15,000 rpm durante 5 min para su recuperación. El precipitado fue lavado 2 veces con etanol y secado en una estufa a 60°C por 24 h. Las NPs-ZnO secas fueron trituradas en un mortero de ágata para obtener un polvo fino con un tamaño de partícula primaria de 23.44 nm y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. El ZnO en polvo, se obtuvo comercialmente en Sanely Comercializadora.

**Aislamiento y purificación de *Fusarium oxysporum*.** Para la obtención de las cepas del hongo, se recolectó tejido vegetal enfermo por *F. oxysporum* en el cultivo de tomate, para su aislamiento se seccionó el tejido con un bisturí, el cual se desinfectó con un triple lavado con hipoclorito al 3%, agua destilada estéril (dH<sub>2</sub>O), alcohol al 70% y dH<sub>2</sub>O y posteriormente fue sembrado en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (Bioxon®) y se incubó a 27 ± 2 °C en una cámara de crecimiento (Binder®) y a partir de su crecimiento las cepas fueron purificadas por punta de hifa.

**Identificación morfológica y molecular.** La identificación morfológica se realizó mediante montas de estructuras del micelio y sus respectivos conidios en porta y cubreobjetos, con una solución de lactofenol y azul de algodón. Su observación se llevó a cabo a 40 y 100X en microscopio compuesto y para la identificación a nivel género se apoyó de las claves taxonómicas para géneros de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1998) y a nivel especie con las claves de Leslie *et al.* (2006).

La identificación molecular se realizó mediante la extracción de ADN del hongo, mediante el protocolo de CTAB (Lee et al., 1990). Se resuspendió en 1 × Tris-EDTA y se almacenó a -20 ° C. La región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosómico nuclear (nrDNA) se amplificó utilizando los cebadores de PCR ITS4 e ITS5 (Clear 2000). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl que contenía 1 × tampón de PCR (Tris-Cl 100 mM, pH 8.0, KCl 500 mM y Nonidet P40 al 0.8%, Helena Biosciences, Reino Unido),

polimerasa Taq de 1 U (Bioline, Reino Unido), 0.2 mM cada dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.35 μM de cada cebador y 20 ng de ADN genómico.

Posteriormente se llevó a cabo el método de PCR, con las siguientes condiciones: la desnaturalización inicial durante 1 min a 95 ° C fue seguida de 25 ciclos de 94 ° C durante 1 min, 52 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 1 min con una extensión final de 7 min a 72 ° C. Los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones siguiendo el procedimiento estándar (Wollenweber *et al.*, 1935), utilizando un secuenciador de ADN automático ABI Prism 377 y un kit de reacción ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). utilizando los oligonucleótidos específicos para *F. oxysporum*, FOF1: (5'-ACATACCACTTGTTCCTCG-3') y FOR1: (5'-CGCCAATCAATTTGAGGAACG-3') (Mishra *et al.* 2003).

### **Laboratorio (Evaluación *in vitro*)**

**Medio de cultivo envenado con NPs-ZnO.** Se preparó medio de cultivo PDA adicionado con 5g/L de extracto de malta. Se colocó en una olla de presión (Presto Modelo 79291, capacidad 21 L) por 15 minutos a 15 libras a una temperatura de 121°C para su esterilización. Las NPs-ZnO y ZnO se prepararon en tubos de vidrio con 10 mL de agua desionizada y se agregaron las concentraciones correspondientes de nanopartículas y ZnO. Las NPs-ZnO fueron dispersadas por sonicación en tres ciclos de 15 min. Finalizada la esterilización, se dejó enfriar el medio de cultivo, el cual se completó con la solución de NPs previamente sonicada, se agitó por un lapso de 15-20 minutos para lograr homogenizar la solución con el medio y por ultimo cada tratamiento fue vaciado en cajas Petri (90 x 15 mm), sobre los cuales se colocó en el centro un explante de 5 mm de *F. oxysporum*. Las cajas de Petri, se incubaron a una temperatura de 27 ± 2 °C por 8 días en una cámara de crecimiento (Binder®).

**Diseño experimental.** Se evaluó el efecto *in vitro* de *Fusarium oxysporum* por las NPs-ZnO y ZnO en 8 concentraciones (3000, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100 ppm) y un testigo absoluto (PDA=0 ppm) con 4 repeticiones cada una, considerada una caja Petri como una repetición.

### **Evaluación de crecimiento micelial y concentración de conidios**

La evaluación consistió en medir el crecimiento micelial, en dos ejes (horizontal y vertical) del fitopatógeno, cada 24 horas, hasta el llenado del testigo (8 días), utilizando como apoyo un calibrador (vernier) con compuesto digital (Titan®). Para el conteo de conidios se recolectó el micelio de las cajas en agua destilada dH<sub>2</sub>O estéril, se agito la suspensión para homogenizar la concentración de conidios, posteriormente se tomaron 10 uL y se colocaron en la cámara de Neubauer (Marienfeld Germany), siguiendo los pasos y formulas de la guía proporcionada por Celeromics (Total de células contadas/ Número de cuadros x 10,000). Con los datos obtenidos en la evaluación se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la formula descrita por Orbera *et al.* (2009), tomando como 100% el crecimiento micelial del testigo (0 ppm).

$$PICR = (R1 - R2/R1) X 100$$

Donde:

**PICR:** es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

**R1:** representa el valor promedio del radio del crecimiento del hongo (testigo)

**R2:** Es el valor promedio del radio de la colonia inhibida (tratamiento).

### **Invernadero (Evaluación *in vivo*)**

**Material vegetativo.** Se utilizaron plántulas de tomate *S. lycopersicum* tipo bola variedad Floradade (Fax de Occidente S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México). Esta variedad se sembró en charolas de germinación de poliestireno expandido de 200 cavidades en sustrato a base de turba ácida-perlita en relación 3:1 y el trasplante se llevó a cabo 4 semanas después de la siembra en contenedores con capacidad para 8 L, en condiciones de 25 °C ±2 y a una humedad relativa de 60 a 75%.

**Inoculación y aplicación de tratamientos.** Cuando las plántulas presentaron el tercer par de hojas verdaderas se realizó la primera inoculación de *F. oxysporum* con una suspensión de 1x10<sup>7</sup> conidios, y para observar claramente la manifestación de la enfermedad se inoculó el patógeno nuevamente a los 15 y

30 días después de la primera inoculación. Las diferentes concentraciones de NPs-ZnO y ZnO se asperjaron al follaje con un rociador manual de capacidad para 1900 mL (<sup>RL</sup>Flo Master) al siguiente día de cada inoculación de *F. oxysporum*.

**Diseño experimental.** Se evaluó el efecto *in vivo* de *F. oxysporum* por las NPs-ZnO y ZnO en 3 concentraciones elegidas con base en la evaluación *in vitro* (3000, 1500, 100 ppm) y se agregaron un testigo absoluto (sin inoculación con esporas de *F. oxysporum*=TA) y un testigo inoculado con suspensión de esporas (=T0) con 5 repeticiones cada una, considerada una planta como una repetición.

**Evaluación.** Se determinó la altura (cm) de la planta con apoyo de un flexómetro Gripper (Truper), esto al registro de la evaluación del daño por *F. oxysporum*. La evaluación de la severidad del daño por *F. oxysporum* se realizó a los 75 días después de la primera inoculación del patógeno, cuando las plantas del testigo (T0) presentaron síntomas característicos, causados por el patógeno, mediante la escala sintomatológica de Apodaca *et al.* (2004) y Clavijo-Castro (2014) (Cuadro 1) y se calculó la incidencia con la formula siguiente:  $I = (IA/N) * 100$

Dónde: I= Incidencia, es la medida del porcentaje de individuos afectados (IA) y que muestran síntomas de la enfermedad (%) en una población (N).

Cuadro 1. Escala para evaluar la severidad por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en tomate.

Clase	Intensidad de la enfermedad
0	Sin síntomas visibles a la enfermedad.
1	Puntos necróticos en hipocótilo.
2	Hojas marchitas, oscurecimiento en la base del hipocótilo o disminución en el crecimiento de la planta.
3	Marchitez, lesión necróticas 1-5 cm y disminución en el crecimiento de la planta.

- 4 Lesión necrótica 6-10 cm, defoliación y disminución en el crecimiento.
  - 5 Muerte de la planta.
- 

**Manejo agronómico del cultivo.** La parte nutricional del cultivo fue cubierta con el fertilizante foliar Ferti plus+ 2L/ha (AGROformuladora DELTA® S.A. DE C.V.) aplicado al sustrato en 4 ocasiones durante el desarrollo del cultivo. Se realizó una aplicación del insecticida Imidacloprid Confidel 350SC, 1L/ha (AGROformuladora DELTA® S.A. DE C.V.) para el manejo de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae).

**Recuperación del fitopatógeno.** Al finalizar la toma de datos de resultados, se seccionó tejido sano y con síntomas de la enfermedad para la determinar la presencia del fitopatógeno. El tejido vegetal enfermo se aisló, sembró y purificó como previamente fue descrito.

**Análisis de resultados.** Con el porcentaje de inhibición micelial y concentración de conidios se realizó un análisis Probit de máxima verosimilitud y se determinó los valores de la concentración inhibitoria ( $CI_{50}$  y  $CI_{90}$ ) y sus límites fiduciales al 95% de confiabilidad. Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la inhibición micelial, inhibición de esporulación, incidencia, severidad y altura en los diferentes tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANVA) y comparación de medias de los tratamientos con una prueba de rango múltiple de Tukey ( $P < 0.05$ ). Los datos de inhibición micelial, inhibición de esporulación e incidencia expresados en porcentaje fueron transformados por raíz cuadrada de arcoseno para su análisis. Para todos los análisis se utilizó el software SAS/STAT (SAS Institute, 2002).

## Resultados y discusión

En la inhibición del crecimiento micelial, se encontraron diferencias significativas, cuyo tratamiento con mayor efecto sobre *F. oxysporum*, fueron las NPs ZnO a 1600 y 3000 ppm con un 83.3 y 81.05% de inhibición. El ZnO con mayor efecto fueron las concentraciones de 1600, 2000 y 3000 ppm con 76.6, 76 y 78.63% de inhibición. En los tratamientos con dosis bajas, las NPs-ZnO a 400, 200 y 100 ppm junto con el ZnO a 400 ppm inhibieron de un 30.78 a 47.28% del crecimiento micelial. Sin embargo, en las concentraciones bajas de ZnO (200 y 100 ppm) no mostraron ninguna diferencia significativa en comparación al testigo (Cuadro 2, Figs. 1 y 2).

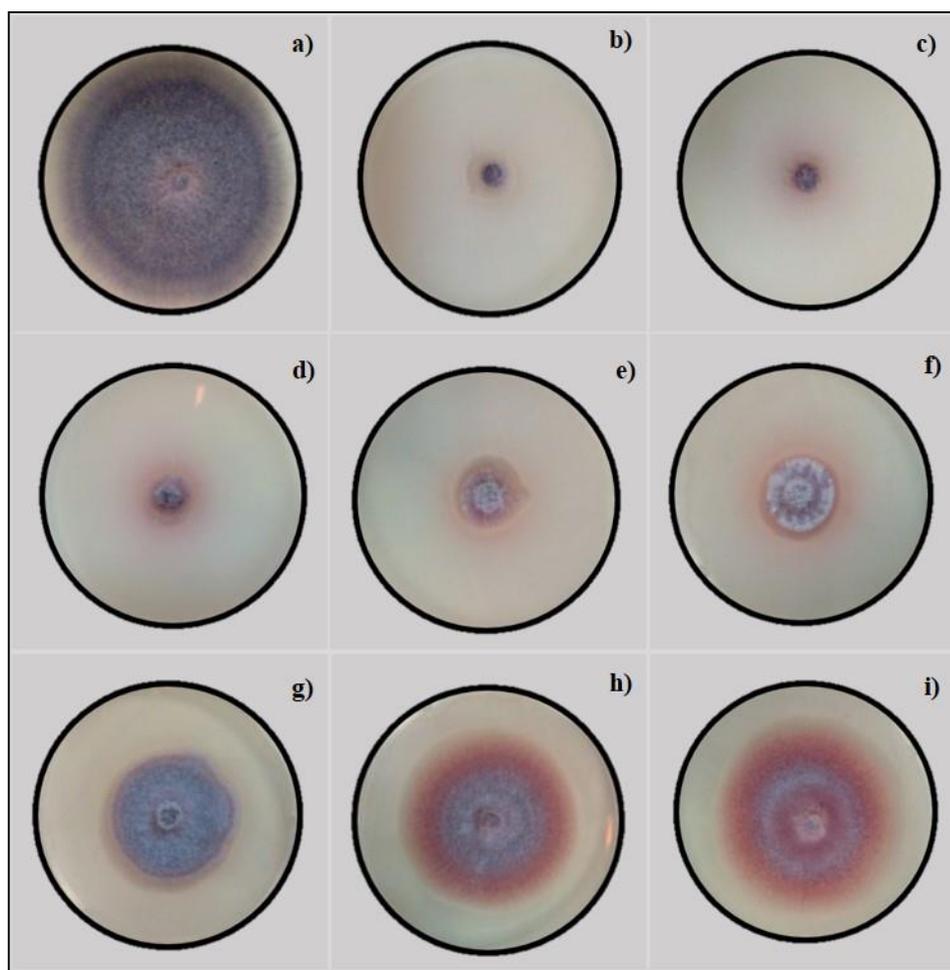


Figura 1. \_Actividad antifúngica de NPs-ZnO sobre *Fusarium oxysporum in vitro*: a) 0 ppm, b) 3000 ppm, c) 2000 ppm, d) 1600

ppm, e) 1200 ppm, f) 800 ppm, g) 400 ppm, h) 200 ppm, i) 100 ppm.

En el conteo de conidios, los tratamientos con mayor efecto de inhibición con un porcentaje superior al 80% son las NPs-ZnO de 1600 y 3000 ppm, y en los tratamientos de ZnO con mayor efecto son de 1200 a 3000 ppm con una inhibición de 65.59 a 69.87%, mientras que las concentraciones bajas de NPs ZnO (200, 400 y 800 ppm) junto con el ZnO a 800 ppm presentaron un porcentaje de inhibición entre un 55.73 a 59.73% de la esporulación. La concentración más baja de NPs ZnO y ZnO de 100 ppm inhibieron un 41.71 y 28.08% (Cuadro 2).

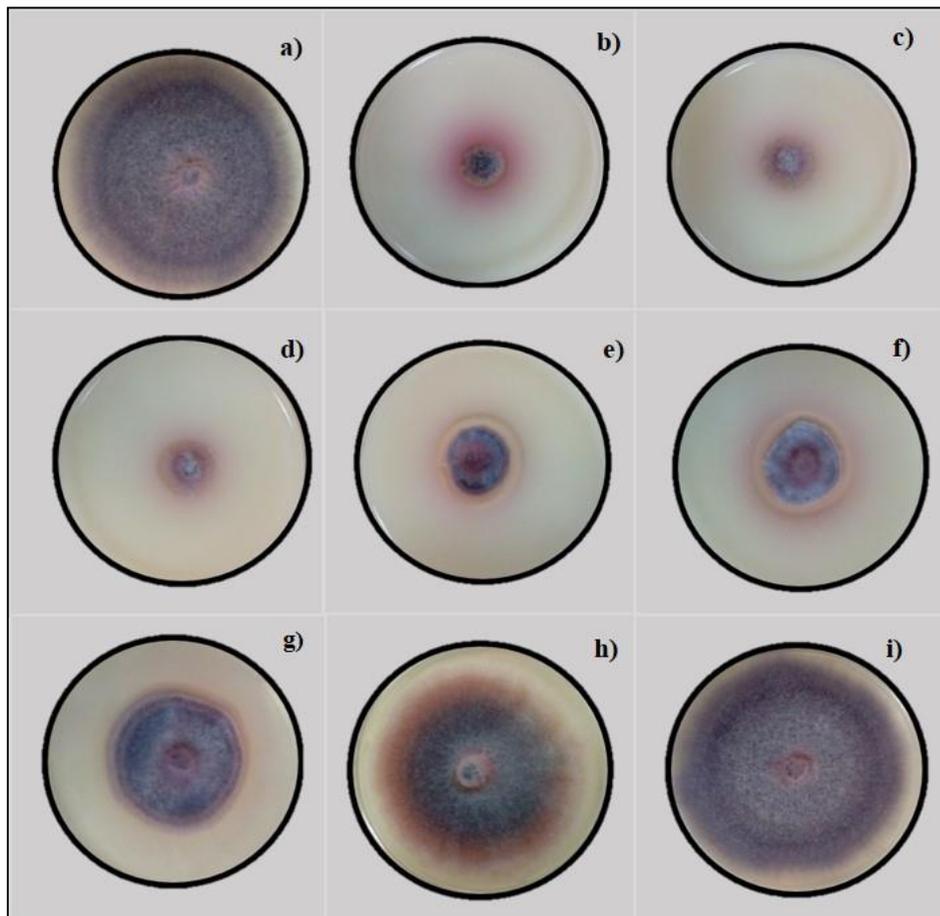


Figura 2. Actividad antifúngica de ZnO sobre *Fusarium oxysporum in vitro*: a) 0 ppm, b) 3000 ppm, c) 2000 ppm, d) 1600

ppm, e) 1200 ppm, f) 800 ppm, g) 400 ppm, h) 200 ppm, i) 100 a ppm.

Cuadro 2. Medias del porcentaje de inhibición, porcentaje de inhibición de esporulación,  $\pm$  desviación estándar de *Fusarium oxysporum* en medio PDA a diferentes concentraciones de ZnO y NPs-ZnO a 8 días de evaluación.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)	Inhibición de esporulación (%)
Testigo	0	0 $\pm$ 0j j	0 $\pm$ 0.00 h
ZnO	3000	78.63 $\pm$ 1.72 bcd	69.87 $\pm$ 1.92 c
ZnO	2000	76.00 $\pm$ 0.91 de	66.81 $\pm$ 1.21 c
ZnO	1600	76.60 $\pm$ 0.51 cd	68.06 $\pm$ 1.17 c
ZnO	1200	65.85 $\pm$ 2.73 f	65.59 $\pm$ 0.49 c
ZnO	800	62.63 $\pm$ 0.57 g	56.83 $\pm$ 2.79 d
ZnO	400	46.32 $\pm$ 1.36 h	48.38 $\pm$ 1.88 e
ZnO	200	0 $\pm$ 0.00 j	28.81 $\pm$ 3.17 g
ZnO	100	0 $\pm$ 0.00 j	28.08 $\pm$ 2.32 g
NPs ZnO	3000	81.05 $\pm$ 1.84 ab	83.85 $\pm$ 0.39 a
NPs ZnO	2000	79.35 $\pm$ 0.41 bc	76.38 $\pm$ 1.60 b
NPs ZnO	1600	83.30 $\pm$ 0.91 a	82.57 $\pm$ 1.49 a
NPs ZnO	1200	73.25 $\pm$ 1.12 e	75.56 $\pm$ 0.97 b
NPs ZnO	800	66.40 $\pm$ 1.98 f	59.72 $\pm$ 2.43 d
NPs ZnO	400	47.28 $\pm$ 0.74 h	57.42 $\pm$ 1.20 d
NPs ZnO	200	33.35 $\pm$ 0.83 i	55.73 $\pm$ 1.47 d
NPs ZnO	100	30.78 $\pm$ 1.09 i	41.71 $\pm$ 5.48 f
	CV	2.32	3.79
	R <sup>2</sup>	0.99	0.99
	GL	16,67	16,67
	F	2386.22***	417.49***
	Pr>F	<0.0001	<0.0001

CV=Coeficiente de Variación. Medias con la misma letra entre columna no son significativamente diferentes (Tukey; P<0.05). \*\*\* Indica significancia contraste valor F a P <0.001.

Para la inhibición del 50% del crecimiento de micelio se requiere una menor concentración de NPs-ZnO en comparación con el ZnO, que requiere casi del

doble para inhibir el mismo porcentaje de crecimiento (Cuadro 3). De igual forma, para la inhibición del 50% de esporas se requiere una concentración menor de NPs-ZnO, mientras que con el óxido de zinc se requiere casi del triple para inhibir el mismo porcentaje de crecimiento

Cuadro 3. Concentración inhibitoria del crecimiento micelial y de inhibición de esporulación y límites fiduciales de ZnO y NPs-ZnO aplicados a *Fusarium oxysporum* en medio PDA a 8 días de evaluación.

Tratamientos	Ppm					
	CI <sub>50</sub>	Límites fiduciales 95%		CI <sub>90</sub>	Límites fiduciales 95%	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
			Inhibición de micelio			
NPsZnO	364.40	286.54	446.37	5017	3537	8081
ZnO	776.04	465.94	1191	3329	1943	11401
			Inhibición de esporas			
NPsZnO	186.46	111.94	264.71	8327	4744	20327
ZnO	545.68	416.40	694.56	17072	9245	43671

Ppm=partes por millón, CI<sub>50</sub>= Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento, CI<sub>90</sub>= Concentración inhibitoria del 90% del crecimiento.

De la evaluación bajo invernadero, al final de las pruebas se recuperó el fitopatógeno de tejido sano y enfermo y fue re-aislado, coincidiendo nuevamente con la especie *F. oxysporum*.

Se observó que las NPs-ZnO a 1500 ppm presentaron significativamente el mayor crecimiento de planta con 175.4 cm, seguido por las NPs-ZnO a 3000 ppm con una altura de planta de 166 cm, este último sin diferencias significativas con el testigo absoluto que presentó 157.4 cm en altura de planta. El ZnO comparado con las NPs-ZnO presentaron significativamente menor crecimiento de 106 a 140 cm y con mucho menor crecimiento el testigo inoculado sin protección contra *F. oxysporum* con una altura de 73 cm en plantas que terminaron muertas (Cuadro 4).

En términos de daño por la enfermedad, se presentaron diferencias significativas, con una mayor incidencia las plantas correspondientes al testigo inoculado y

ZnO, mientras que las plantas con aplicación de NPs presentaron significativamente menor incidencia (Cuadro 4). En cuanto a la severidad hubo diferencias significativas entre los tratamientos, sin severidad en el testigo absoluto sin inoculación, seguida por las NPs-ZnO con menor severidad con 0.4-1.2 en la escala sintomatológica de daño por *F. oxysporum*, mientras que el ZnO presentó mayor severidad (2.0-4.8 en la escala) junto al testigo inoculado sin protección contra el patógeno con la severidad más alta (Figura 3 y 4).

En la presente investigación, respecto a las plantas inoculadas (T0), las plantas tratadas con ZnO presentaron un incremento en la altura en un 61%, el testigo absoluto (sin inoculación) 115% y los tratamientos con NPs ZnO hasta un 118%, incluso mayor altura que el testigo sin inocular (Figs. 3 y 4).

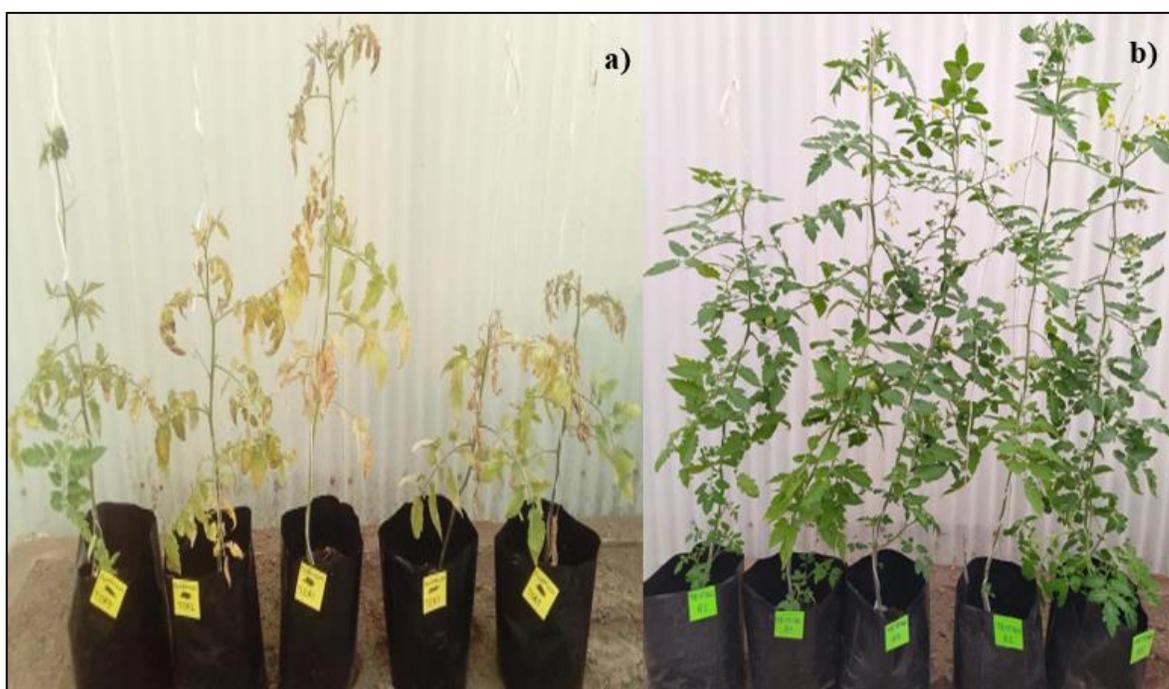


Figura 3. Plantas de tomate *S. lycopersicum*, a) inoculadas con *Fusarium oxysporum*, b) testigo absoluto sin inoculación del fitopatógeno.



Figura 4. Control de *Fusarium oxysporum* con NPs-ZnO y ZnO en plantas de tomate *S. lycopersicum*. a) NPs-ZnO a 3000 ppm, b) NPs-ZnO a 1500 ppm,

c) NPs-ZnO a 100 ppm, d) ZnO a 3000 ppm, e) ZnO a 1500 ppm, f) ZnO a 100 ppm.

Cuadro 4. Medias de altura de planta, incidencia y severidad del daño *por F. oxysporum*  $\pm$  desviación estándar a diferentes concentraciones de NPs-ZnO y ZnO a 75 días después de la primera inoculación.

Tratamientos	Concentración (ppm)	Altura de planta (cm)	Incidencia (%)	Severidad <sup>1</sup>
Testigo absoluto=TA	0	157.4 $\pm$ 1 3.2	0.0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Testigo inoculado=T0	0	73.0 $\pm$ 6. 02	100.0 $\pm$ 0.0	5.0 $\pm$ 0.0
ZnO	3000	140.0 $\pm$ 2 4.3	100.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0
ZnO	1500	108.4 $\pm$ 1 5.2	100.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0
ZnO	100	105.6 $\pm$ 1 3.4	100.0 $\pm$ 0.0	4.8 $\pm$ 0.4 5
NPs-ZnO	3000	166.0 $\pm$ 1 8.1	40.0 $\pm$ 54.7	0.8 $\pm$ 1.1 0
NPs-ZnO	1500	175.4 $\pm$ 1 2.8	20.0 $\pm$ 44.7	0.4 $\pm$ 0.8 9
NPs-ZnO	100	136.6 $\pm$ 1 3.9	60.0 $\pm$ 54.7	1.2 $\pm$ 1.1 0
CV		11.62	48.65	32.19
R <sup>2</sup>		0.85	0.65	0.90
GL		7,39	7,39	7,39
F		25.50***	8.43***	42.82***
Pr>F		<0.0001	<0.0001	<0.0001

<sup>1</sup>Escala sintomatológica de Apodaca *et al.* (2004) y Clavijo-Castro (2014). CV=Coefficiente de Variación. Medias con la misma letra entre columna no son

significativamente diferentes (Tukey;  $P < 0.05$ ). \*\*\* Indica significancia contraste valor F a  $P < 0.001$ .

Las NPs-ZnO (23.44 nm) demostraron un control eficaz sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, y pueden ser una alternativa de manejo del fitopatógeno; tal como lo describen Esparza *et al.* (2017) en su evaluación de la actividad antifúngica de NPs-ZnO sobre *F. oxysporum*, quienes observaron una inhibición de 91.13% del crecimiento en una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Sin embargo, esta observación puede variar dependiendo del fitopatógeno a controlar, en este sentido, Esparza *et al.* (2015) observaron que las NPs-ZnO con un tamaño de 200 nm a 2000 ppm contra *Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporaceae) y *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn (Ceratobasidiaceae) solo inhibieron entre 14 y 16 % el crecimiento micelial.

Rajiv *et al.* (2013) sintetizaron nanopartículas de ZnO a partir de *Parthenium hysterophorus* L. (Asteraceae) en diferentes tamaños y exploraron su actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus niger* Tieghem (Aspergillaceae), demostrando que las NPs-ZnO son buenos agentes antifúngicos inhibiendo estos fitopatógenos con un tamaño de  $27 \pm 5$  nm, además de ser respetuosos del medio ambiente.

Dimkpa *et al.* (2013) ratificaron el efecto antifúngico de las NPs-ZnO sobre *Fusarium graminearum* Schwabe (Nectriaceae), reduciendo el crecimiento del fitopatógeno, además de complementarse con el agente de control biológico *Pseudomonas chlororaphis* O6, al no inhibir los metabolitos de la bacteria para inhibir el desarrollo de *F. graminearum*; abriendo la posibilidad de utilizarlas como formulaciones para complementar las estrategias existentes para mejorar la sanidad de los cultivos.

Recientemente, Pariona *et al.* (2020) estudiaron la actividad antifúngica *in vitro* del ZnO en tres formas de partículas, incluidas las NPs con un tamaño de  $18 \pm 2$  nm, para tres especies de hongos: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Colletotrichum gloeosporioides*

(Penz.) Penz & Sacc. (Glomerellaceae), encontrando resultados de control muy similares con 1mg/mL contra *F. oxysporum* con 54 y 53% de inhibición por ZnO y NPs-ZnO respectivamente. A la misma concentración en *F. solani* la inhibición fue de 65 y 55% y para *C. gloeosporioides* de 60 y 59% por ZnO y NPs-ZnO respectivamente.

En cuanto la esporulación del hongo, con el tratamiento con NPs-ZnO, se correlacionó su efecto con el crecimiento micelial, inhibiendo en mayor grado los conidios, en comparación al testigo y a los ocho tratamientos con ZnO, efecto que puede atribuirse a que las nanopartículas inducen un daño en la hifa del hongo y al mismo tiempo a los conidios, característica observada por Jo *et al.* (2009) y Lamsal *et al.* (2011) con NPs-Ag (plata), quienes indicaron que las NPs influyen en la formación de colonias de esporas, dañando y penetrando la membrana celular y en el progreso de la enfermedad de los hongos patógenos de las plantas.

Por otro lado, He *et al.* (2011) describen que las NPs-ZnO pueden exhibir diferentes actividades antifúngicas, por un lado, observaron en *Penicillium expansum* Link. (Aspergillaceae) en medio PDA con NPs-ZnO que produjo conidios, pero también inhibió su desarrollo y distorsionó los conidióforos, mientras que la biomasa de *Botrytis cinerea* Persoon (Sclerotiniaceae) desarrollo principalmente hifas, con aparentemente más resistencia a las NP de ZnO, conservando la fina estructura de los micelios, aunque si se deformó la superficie de las hifas de los hongos.

Wani y Shah (2012) informaron una tasa alta de inhibición en la germinación de esporas de los hongos *Alternaria alternate*, *F. oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Mucor plumbeus* a la exposición de NPs de ZnO y NPs de óxido de Magnesio (MgO) desde concentraciones (100 mg/L.)

El efecto de las NPs de ZnO en el crecimiento de las plantas, no está del todo distinguido, al respecto, Navarro *et al.* (2008) sugieren que los materiales de tamaño nanométrico con mayores áreas superficiales podrían absorber, traslocar y retener de manera más eficiente los nutrientes en las plantas. Servin *et al.*

(2015) mencionan que el aumento en el crecimiento y rendimiento de los cultivos, puede ser el resultado de la inhibición o control de algún fitopatógeno por las NPs ZnO.

En otros cultivos como el chile *Capsicum annuum* L. (Solanaceae), Méndez et al. (2015), evaluaron NPs ZnO dopadas con Ag al 2.5% en el crecimiento y producción de biomasa en plántulas, encontrando solo un incremento en la altura de 16.8% en comparación con las plantas control.

La mayoría de los estudios sobre NPs en fitopatología han examinado la actividad antifúngica directa contra el patógeno en cuestión (Wani y Shah 2012; Ocsoy et al. 2013; Saharan et al. 2015; Zabrieske et al. 2015; Strayer-Scherer et al. 2018).

En el presente estudio se demostró que la aplicación foliar de NPs ZnO inhibe el desarrollo de la enfermedad y afecta positivamente el crecimiento de la planta, presumiblemente a través de una mejor nutrición mineral y defensa del hospedero. El efecto del ZnO a nanoescala (25 nm) sobre el crecimiento y desarrollo de plantas fue comprobado por Prasad et al., (2012) en el cultivo de cacahuate *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae), observando que a 1000 ppm promovía la germinación de semillas, el vigor de las plantas, así como el aumento de crecimiento de tallos, raíces, la floración temprana y aumento de contenido de clorofila y rendimiento de vaina, aunque el aumento en la concentración (2000 ppm) presentó efectos adversos como toxicidad en el crecimiento y rendimiento.

Stampoulis et al. (2009) investigaron los efectos de cinco nanomateriales incluidas NPs de ZnO en *Cucurbita pepo* L. (Cucurbitaceae) en medio hidropónico a 1000 mg/L, encontrando que las NPs no afectaron la germinación, pero si presentó toxicidad sobre la longitud de raíz y biomasa.

En plantas de sandía *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai, Elmer et al. (2018) evaluaron la eficiencia de las NPs ZnO y CuO sobre *F. oxysporum* y observaron que las plantas tratadas con las nanopartículas presentaban rango de valores de clasificación de la enfermedad significativamente menores a las plantas controles que no fueron tratadas.

La capacidad de las NPs de óxido metálico a través de la aplicación foliar para proveer resistencia a enfermedades es un concepto relativamente nuevo e inexplorado. Se considera que el efecto promotor de crecimiento de las NPs-ZnO puede atribuirse a la actividad del óxido de zinc como precursor de la producción de auxinas que promueven división, elongación celular, tienen influencia en la reactividad del ácido indolacético, el cual funciona como fitoestimulante hormonal, asociadas a la biosíntesis de citoquininas y giberelinas; así como la inducción de mayor actividad de enzimas antioxidantes útiles en la respuesta al ataque de patógenos (Méndez-Argüello *et al.*, 2016).

Esta mejora en los procesos fisiológicos por acción de las NPs, las promueve como estimulantes minerales y posiblemente como inductores de resistencia (Lamsal *et al.* 2011) y no solo puede estar directamente relacionado con la presencia reducida de organismos patógenos, sino también con el valor nutricional potencial de las nanopartículas en sí mismas, especialmente para los micronutrientes esenciales necesarios para la defensa del hospedero (Servin *et al.* 2015).

### **Conclusión**

Las NPs de ZnO presentan actividad antifúngica e inhiben el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*.

La aplicación foliar de NPs de ZnO promueven el crecimiento de plantas de tomate, y disminuyen la incidencia y severidad de *F. oxysporum*.

Las NPs de ZnO tienen el potencial para utilizarse como productos para prevenir y controlar el deterioro de las plantas por microorganismos fitopatógenos.

## Referencias

- Abdallah RAB, Jabnoun-Khiareddine H, Nefzi A, Ayed F, Daami-Remadi M. (2019) Field suppression of *Fusarium* wilt and microbial population shifts in tomato rhizosphere following soil treatment with two selected endophytic bacteria. *Eurasian J. Soil Sci* 8: 208-220.
- Al-Dhabaan, F. A., Shoala, T., Ali, A. A., Alaa, M., & Abd-Elsalam, K. (2017). Chemically-produced copper, zinc nanoparticles and chitosan–bimetallic nanocomposites and their antifungal activity against three phytopathogenic fungi. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(5), 753-69.
- Angulo, M.J.H. 1996. Efecto de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en materiales silvestres de tomate. Tesis de Licenciatura en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 39 p.
- Apodaca-Sánchez MA, Zavaleta-Mejía E, Osada-Kawasoe S, García-Espinoza R (2004) Pudrición de la corona de chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *Rev. mex. fitopatol.* 22: 22-29.
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S. A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., & Gámez-Vázquez, A. J. (2008). Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 114-120.
- Barnett HL, Hunter BB. (1998) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minnesota, USA, APS Press.
- Beckman, C.H. 1987. *The Nature of the Wilt Diseases of Plants*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 80 p.
- Mendoza, Z.C. 1993. *Diagnóstico de Enfermedades Fungosas*. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, Edo. de México. 111 p.
- Betancourt GR, Berlanga DML, Puente UB, Rodríguez FO, Sanchez-Valdes S (2010) Surface modification of ZnO nanoparticles. *Mater. Sci. Forum.* 644:61-64.
- Cárdenas, V.J.O. 2000. Eficacia en el control químico de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* en los cultivos de tomate, chile y sandía. Tesis de Maestría de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 156 p.

- Cardona-Piedrahíta LF, Castaño-Zapata J. (2019) Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 43: 227-233.
- Clavijo CSD (2014) Búsqueda de resistencia a la pudrición causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum*. Palmira, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Thesis.
- Coromoto AY, Reyes I (2018) Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Bioagro 30:59-66.
- Dimkpa CO, McLean JE, Britt DW, Anderson AJ (2013) Antifungal activity of ZnO nanoparticles and their interactive effect with a biocontrol bacterium on growth antagonism of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. Biometals 26:913-924.
- Elmer W, De La Torre-Roche R, Pagano L, Majumdar S, Zuverza-Mena N, Dimkpa C, Gardea-Torresdey J, White JC. (2018) Effect of metalloids and metal oxide nanoparticles on *Fusarium* wilt of watermelon. Plant Dis. 102: 1394-1401.
- Esparza AIJE. (2016) Potencial antimicrobiano de nanopartículas metálicas en microorganismos fitopatógenos y su potencial como promotores de crecimiento en plantas. Buenavista, Saltillo, Colombia. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Thesis.
- Esparza-Rivera E, Lira-Saldivar RH, Hernández-Suárez M, Betancourt-Galindo R, García-Cerda LA, Puente-Urbina B. (2014) Actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre y óxido de zinc contra bacterias y hongos fitopatógenos. Conference 36 Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales. Saltillo, Coahuila, México.
- Fasio, J. A. C., Rodríguez, T. D. J. M., Estrada, R. S. G., Ortega, J. E. C., Zequera, I. M., & Barajas, A. J. S. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 21(2), 123-127.
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). (2019) Panorama Agroalimentario. Tomate Rojo. Internet Resource: <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2019/06/Panorama-Agroalimentario-Tomate-rojo-2019.pdf> (verified Dec 08, 2020).

- Gillespie, D. R., and J. G. Menzies. 1993. Fungus gnats vector *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Annals of Applied Biology* 123: 539-544. (*oxysporum*).
- González, J. I. M., Betelu, F., García, I. L., Gómara, E. D., Ibero, J. Z., & Ruiz, S. C. (2008). *Tomate de industria*. *Navarra agraria*, (166), 7-14.
- Granchinho, S. C. R., C. M. Franz, E. Polishchuk, W. R. Cullen, and K. J. Reimer. 2002. Transformation of arsenic (V) by the fungus *Fusarium oxysporum melonis* isolated from the alga *Fucus gardneri*. *Applied Organometallic Chemistry* 16: 721-726. (*oxysporum*).
- He L, Liu Y., Mustapha A, Lin, M. (2011) Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiol. Res.*166: 207-215.
- Infoagro Systems S.L. 2016. *El cultivo de tomate: Parte I*. (en línea). Madrid, España. s.p.
- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). 2014. *Manejo integrado de plagas. Cultivo de tomate: Guía MIP* (en línea). Managua, Nicaragua. 66 p.
- Jo YK, Kim BH, Jung G (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis.* 93:1037-1043.
- Joffe, A. Z., and J. Palti. 1977. Species of *Fusarium* found in uncultivated desert-type soils in Israel. *Phytoparasitica* 5: 119-122. (*avenaceum*, *equiseti*, *oxysporum*, *semitectum*, *solani*, *verticillioides*).
- Kommedahl, T., H. K. Abbas, P. M. Burnes, and C. J. Mirocha. 1988. Prevalence and toxigenicity of *Fusarium* spp. from soils of Norway near the Arctic Circle. *Mycologia* 80: 790-794. (*equiseti*, *merismoides*, *oxysporum*, *sambucinum*, *semitectum*, *solani*).
- Kriti, A., Ghatak, A., & Mandal, N. (2020). Antimycotic efficacy of Zinc nanoparticle on dark-spore forming Phytopathogenic fungi. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 750-754.
- Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim KS, Lee YS (2011) Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species in vitro and pepper anthracnose disease in field. *Mycobiology*. 39:194-199.
- Lee SB, Taylor JW (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*. New York, Academic Press, pp 282-314.

- Leslie JF, Summerell BA. (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing.
- Lin, D., & Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental science & technology*, 42(15), 5580-5585.
- Lin, D., and Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.* 150, 243–250.
- Mandeel, Q. A., J. A. Abbas, and A. M. Saeed. 1995. Survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain: II. Spectrum of species on five isolation media. *Sydowia* 47: 223-239. (oxysporum).
- Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*, 12(18).
- McMullen, M. P., and R. W. Stack. 1983. *Fusarium* species associated with grassland soils. *Canadian Journal of Botany* 61: 2530-2538. (dimerum, heterosporum, oxysporum, redolens, subglutinans).
- McMullen, M. P., and R. W. Stack. 1984. The effects of surface mining and reclamation on *Fusarium* populations of grassland soils. *Reclamation and Revegetation Research* 2: 253-266. (heterosporum, oxysporum, redolens, subglutinans, verticillioides).
- Mejía AJ, Hernández M. (2001) Evaluación de azoxystrobin en el control de la candelilla temprana (*Alternaria solani*) en el cultivo de tomate. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 18: 106-116.
- Méndez-Argüello B, Lira-Saldívar RH, Ruíz-Torres NA, Cárdenas-Flores A, Ponce-Zambrano R, Vera-Reyes I, Mendoza-Mendoza E, García-Cerda LA, De los Santos G. (2015) Influencia de nanopartículas de óxido de zinc puras y dopadas con plata en el crecimiento y producción de biomasa en plántulas de chile. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco, México.
- Méndez-Argüello B, Vera-Reyes I, Mendoza-Mendoza E, García-Cerda LA, Puente Urbina BA, Lira-Saldívar RH. (2016) Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annum* por nanopartículas de óxido de zinc. *Nova Scientia*. 8: 140-156.
- Mishra PK, Fox RT, Culham A (2003) Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiol Lett.* 218: 329-332.

- Monardes, H. 2009. Manual de cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill): Características botánicas. Origen (en línea). Chile. Universidad de Chile 13 p.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R (2008) Toxicity of silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ. Sci. Technol. 42: 8959-8964.
- Ocsoy I, Paret ML, Arslan OM, Kunwar S, Chen T, You M, Tan W (2013) Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. ACS Nano 7:8972-8980.
- Ohara, T., I. Inoue, F. Namiki, H. Kunoh, and T. Tsuge. 2004. REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Genetics 166: 113- 124. (oxysporum).
- Orberá RTM, Serrat DMJ, González GZ. (2009) Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. Fitosanidad. 13: 95-100.
- Pariona N, Paraguay-Delgado F, Basurto-Cereceda S, Morales-Mendoza JE, Hermida-Montero LA, Martinez-Enriquez AI. (2020) Shape-dependent antifungal activity of ZnO particles against phytopathogenic fungi. Appl. Nanosci. 10:435-443.
- Pariona, N., Paraguay-Delgado, F., Basurto-Cereceda, S., Morales-Mendoza, J. E., Hermida-Montero, L. A., & Mtz-Enriquez, A. I. (2020). Shape-dependent antifungal activity of ZnO particles against phytopathogenic fungi. Applied Nanoscience, 10(2), 435-443.
- Prasad TNVKV, Sudhakar P, Sreenivasulu Y, Latha P, Munaswamy V, Reddy KR, Sreeprasad TS, Sajanlal PR, Pradeep T. (2012) Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. J. Plant Nutr. 35: 905-927.
- Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., ... & Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. Journal of plant nutrition, 35(6), 905-927.
- Rajiv P, Rajeshwari S, Venckatesh R. (2013) Bio-Fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc. 112:384-387.

- Ramírez, V.J. 1998. Enfermedades de la raíz en tomate. pp. 29-49. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.
- Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S., & Brestic, M. (2017). Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Frontiers in chemistry*, 5, 78.
- Rivero JCA, Díaz GJA, López NJI. (2014) Agricultura orgánica vs agricultura moderna como factores en la salud pública. ¿Sustentabilidad? *Horizonte sanitario*. 4: 28-40.
- S.A.S. Institute. 2002. The SAS System for Windows, Release 9.0. SAS, Institute, Cary N. C. U.S.A.
- Saharan V, Sharma G, Yadav M, Choudhary MK, Sharma SS, Pal A, Raliya R, Biswas P. (2015) Synthesis and *in vitro* antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *Int. J. Biol. Macromol.* 75:346-353.
- Sánchez, C.M.A. 1998. Enfermedades causadas por hongos en tomate. pp. 17-28. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.
- Semillaria. 2015. Clasificación taxonómica de tomate (en línea). s.p. Consultado 08 agosto. 2020. Disponible en <http://semillaria.es/index.php/cultivos-ok/29-cultivos/94-taxonomia>.
- Servin A, Elmer W, Mukherjee A, De la Torre-Roche R, Hamdi H, White JC, Bindranan P, Dimkpa C. (2015) A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *J Nanopart Res* 17: 17-92.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2020) Anuario Estadístico de la Producción agrícola. Cierre de la producción agrícola. Internet Resource: <http://www.siap.gob.mx>.(verified Dec 01, 2020).
- Singh BK, Rakesh ES, Yadav VPS, Singh DK (2010) Adoption of commercial cut flower production technology in Meerut. *Indian Research Journal of Extension Education*. 10: 50-53.
- Stampoulis D, Sinha SK, White JC (2009) Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. *Environ. Sci. Technol.* 43: 9473-9479.
- Strayer-Scherer A, Liao YY, Young M, Ritchie L, Vallad GE, Santra S, Freeman JH, Clark D, Jones JB, Paret ML (2018) Advanced copper composites

against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* and tomato bacterial spot. *Phytopathology* 108:196-205.

Valdez, L.J.D. 1999. Determinación de la raza tres de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causante de la marchitez en tomate, en el Valle de Culiacán, Sinaloa. Tesis de Licenciatura, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México. 39 p.

Vásquez-Ramírez, L. M., & Castaño-Zapata, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*]. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363-374.

Wani AH, Shah MA (2012) A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. *J App Pharm Sci* 2:40-44.

Zabrieski Z, Morrell E, Hortin J, Dimkpa C, McLean J, Britt D, Anderson A (2015) Pesticidal activity of metal oxide nanoparticles on plant pathogenic isolates of *Pythium*. *Ecotoxicology* 24:1305-1314.