

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



NANO Y MICRO ENCAPSULADOS DE EXTRACTOS VEGETALES PARA
CONTROL Y ACTIVACIÓN DE RESISTENCIA INDUCIDA CONTRA *Fusarium*
oxysporum f. sp. *lycopersici* EN TOMATE

Tesis

Que presenta MARCO ANTONIO TUCUCH PÉREZ
como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Junio, 2021

NANO Y MICRO ENCAPSULADOS DE EXTRACTOS VEGETALES PARA
CONTROL Y ACTIVACIÓN DE RESISTENCIA INDUCIDA CONTRA *Fusarium*
oxysporum f. sp. *lycopersici* EN TOMATE

Tesis

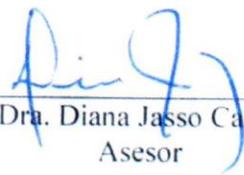
Elaborada por MARCO ANTONIO TUCUCH PÉREZ como requisito parcial para
obtener el grado de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo
Asesor Principal



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor



Dra. Diana Jasso Cantú
Asesor



Dr. Roberto Arredondo Valdés
Asesor



Dr. Elan Iñaky Laredo Alcalá
Asesor



Dr. Jorge Romero García
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme realizar y concluir exitosamente una etapa más en mi vida.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo por su apoyo y tiempo prestado en la realización de este trabajo.

A la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes por el apoyo y tiempo brindado durante mi estancia en el programa de doctorado.

A la Dra. Diana Jasso Cantú por su apoyo y tiempo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Roberto Arredondo Valdez por su valioso apoyo durante la realización de este trabajo al permitir el uso de su laboratorio.

Al Dr. Elan Iñaky Laredo Alcalá por sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Romero García por su apoyo y por permitir el uso de las instalaciones de su laboratorio para la realización del presente trabajo.

A la QFB. Carmen Natividad Alvarado Canche por su apoyo y consejos para la obtención de los resultados satisfactorios obtenidos en el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por ser parte de mi vida y de mi formación.

A los profesores del Departamento de Parasitología por haberme transmitido sus conocimientos, y por ser parte de mi formación profesional.

A todas las personas que me acompañaron y me apoyaron durante mi estancia en el posgrado, por su apoyo y palabras de aliento para seguir adelante.

DEDICATORIA

A mis padres Fulgencio Martin Tucuch Cauich y Marta Magdalena Pérez Mendoza por ser el ejemplo más grande que tengo en la vida y que con sus enseñanzas, y consejos siempre me han guiado y apoyado en todos mis propósitos.

A ustedes dos por darme todo su cariño, amor y comprensión, y por estar siempre conmigo cuando los necesito, y por qué siempre me apoyan en todas las decisiones en mi vida.

A mis hermanos Martin y Adriana, que siempre están a mi lado incondicionalmente apoyándome y ayudándome, y por haber estado siempre juntos en tantos momentos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	4
HIPÓTESIS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Importancia del Cultivo de Tomate.....	5
Cultivo de Tomate en el Mundo y en México.....	5
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	5
Sintomatología de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	6
Importancia de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en el cultivo de tomate	7
Medidas de Control de Enfermedades en el Cultivo del Tomate	7
Control químico.....	7
Control biológico.....	8
Inducción de resistencia (IR).....	8
Inmunidad en Plantas	9
Inmunidad activada por patrones (PTI).....	9
Inmunidad activada por efectores (ETI).....	9
Resistencia sistémica adquirida (RSA)	10
Enzimas de defensa en plantas	12
Extractos Vegetales.....	16
Extractos vegetales como fungicidas	17
Extractos vegetales como inductores de resistencia.....	19
<i>Lippia graveolens</i> Kunth.....	20
Clasificación taxonómica	20
Descripción botánica	20
Composición fitoquímica	21
Propiedades antifúngicas.....	21

<i>Viscum album</i> L.	21
Clasificación taxonómica	21
Descripción botánica	22
Composición fitoquímica	22
Propiedades antimicrobianas y como inductor de resistencia	22
Nanotecnología y su Aplicación en Agricultura	23
Nano y Microencapsulados (NPs) de extractos vegetales para protección de cultivos	24
Biopolímeros	24
Quitósán	25
Alginato	26
Técnicas de producción de NPs y encapsulación de compuesto fitoquímicos.....	27
Nanoprecipitación	27
Secado por aspersión	27
Pre gelificación iónotrópica	27
Coacervación	28
Extrusión	28
Factores limitantes en el proceso de encapsulación	28
Beneficios de NPs de extractos vegetales en la agricultura	29
Aplicación de NPs para control de fitopatógenos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Etapa 1.....	31
Aislamiento e Identificación Morfológica y Molecular de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	31
Aislamiento e identificación morfológica	31
Identificación molecular	32
Extracción de ADN.....	32
PCR con primers específicos para <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	32
Producción de extractos vegetales.....	33
Obtención de material vegetal	33
Preparación de los extractos vegetales.....	33
Identificación cualitativa de fitoquímicos presentes en extractos vegetales	33
Detección de compuestos fitoquímicos presentes en extractos vegetales por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.....	34

Detección de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante (DPPH)....	34
Etapa 2.....	35
Efectividad Biológica de Extractos de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album in vitro</i>	35
Actividad antifúngica de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album</i> por el método de medio envenenado	35
Análisis estadístico	35
Producción y Caracterización de NPs por el Método de Pregelación Ionotrópica	36
Tamaño y dispersión dinámica de luz	36
Potencial Zeta	36
Estabilidad química de polímero (pH)	36
Peso	36
Etapa 3.....	37
Pruebas de Efectividad Biológica Bajo Condiciones de Invernadero.....	37
Pruebas de patogenicidad en plántulas de tomate	37
Establecimiento del experimento en invernadero.....	37
Inoculación de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	37
Aplicación de los tratamientos	37
Manejo agronómico.....	38
Variables evaluadas	38
Incidencia y severidad	38
Altura de planta (cm) y longitud de raíz (cm)	38
Diámetro de tallo (mm) y clorofila en hojas (Unidades SPAD).....	39
Peso seco de biomasa aérea (g) y peso seco de raíz (g).....	39
Número de flores, frutos cuajados y peso de frutos.....	39
Diámetro ecuatorial de frutos y diámetro polar de frutos.....	39
Análisis estadístico	39
Etapa 4.....	39
Cuantificación de Enzimas Asociadas a Mecanismos de Defensa en Plantas de Tomate	39
Aplicación de los tratamientos	39
Extracción de enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), peroxidasa (POD) y superóxido dismutasa (SOD).....	40
Determinación de la actividad PAL	40

Determinación de la actividad POD	40
Determinación de la actividad SOD	40
Análisis estadístico	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Etapa 1.....	41
Aislamiento e Identificación Morfológica y Molecular de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	41
Identificación morfológica de <i>F. oxysporum</i>	41
Identificación molecular de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	42
Identificación cualitativa de fitoquímicos presentes en extractos vegetales	43
Detección de compuestos fitoquímicos presentes en extractos vegetales por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.....	44
Detección de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante (DPPH)....	46
Etapa 2.....	47
Efectividad Biológica de Extractos de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album in vitro</i>	47
Actividad antifúngica de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album</i> por el método de medio envenenado	47
Concentración inhibitoria al 50 % (CI ₅₀) de los extractos de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album</i>	50
Producción y Caracterización de NPs por el Método de PreGelación Ionotrópica	51
Tamaño y dispersión dinámica de luz	51
Potencial Zeta	51
Estabilidad química de polímeros (pH) y peso.....	52
Etapa 3.....	53
Pruebas de Efectividad Biológica Bajo Condiciones de Invernadero.....	53
Incidencia y severidad	53
Altura de planta y longitud de raíz	53
Diámetro de tallo y clorofila en hojas	56
Peso seco de biomasa aérea y peso seco de raíz.....	58
Número de flores, frutos cuajados y peso de frutos	60
Diámetro ecuatorial de frutos y diámetro polar de frutos.....	63
Etapa 4.....	65
Cuantificación de enzimas asociadas a mecanismos de defensa en plantas de tomate....	65

Determinación de la actividad de fenilalanina amonio liasa	65
Determinación de la actividad de peroxidasa (POD)	67
Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	69
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72
ANEXOS	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Familias de Proteínas Relacionadas con la Patogénesis	12
Cuadro 2. Compuestos fitoquímicos identificados en extractos etanólicos de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album</i> por métodos cualitativos.	44
Cuadro 3. Compuestos fitoquímicos detectados en el extracto de <i>L. Graveolens</i> y <i>V. album</i> por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.	45
Cuadro 4. Fenoles y flavonoides totales, y actividad antioxidante (DPPH) de extractos etanólicos de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album</i>	47
Cuadro 5. Concentración inhibitoria al 50 % y al 90 % (CI ₅₀ y CI ₉₀) de extractos etanólicos de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album</i> sobre <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	50
Cuadro 6. Valores obtenidos de tamaño, concentración, potencial Z, pH y peso de NPs con extractos vegetales y sin extracto vegetal.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las estrategias defensivas PTI y ETI utilizadas por plantas contra fitopatógenos.	10
Figura 2. Representación esquemática de RSA y su mecanismo de respuesta.....	11
Figura 3. Biosíntesis de lignina generalizada, que indica el papel de las enzimas PAL y POD.....	15
Figura 4. Biosíntesis de cumarinas a partir del ácido cinámico.....	16
Figura 5. Biosíntesis de chalconas, estilbenos y flavanonas.....	17
Figura 6. Principales compuestos fitoquímicos de plantas	18
Figura 7. Representación de NPs cargados con principio activo en forma simplificada	24
Figura 8. Desacetilación de la quitina a quitosán	25
Figura 9. Estructura química del alginato de sodio.....	26
Figura 10. Desarrollo micelial, macroconidas, microconidas y clamidiosporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> a los 7 días de crecimiento	42
Figura 11. Detección de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> con primers específicos FO1 y FO2 por PCR.....	42
Figura 12. Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos de <i>L. graveolens</i> y <i>V. album</i> sobre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> por el método de medio envenenado.....	48
Figura 13. Análisis de tamaño promedio de partícula utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) de NPs cargados con extractos vegetales y NPs sin extractos vegetales.....	52
Figura 14. Altura de plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.....	54
Figura 15. Longitud de raíz de plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	55
Figura 16. Diámetro de tallo de plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	56
Figura 17. Clorofila en hojas de plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	57
Figura 18. Peso seco de biomasa aérea de plantas tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	58
Figura 19. Peso seco de raíz de plantas tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	59

Figura 20. Número de flores de plantas tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	61
Figura 21. Frutos cuajados de plantas tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	61
Figura 22. Peso de frutos de plantas tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	62
Figura 23. Diámetro ecuatorial de frutos de plantas tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	63
Figura 24. Diámetro polar de frutos de plantas tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.	64
Figura 25. Actividad de PAL en plantas de tomate a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h después de la aspersión.....	66
Figura 26. Actividad de POD en plantas de tomate a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h después de la aspersión.....	67
Figura 27. Actividad de SOD en plantas de tomate a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h después de la aspersión.....	70

RESUMEN

NANO Y MICRO ENCAPSULADOS DE EXTRACTOS VEGETALES PARA CONTROL Y ACTIVACIÓN DE RESISTENCIA INDUCIDA CONTRA *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* EN TOMATE

POR

MARCO ANTONIO TUCUCH PÉREZ

DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
CALZADA ANTONIO NARRO NO. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA

JUNIO 2021

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO –ASESOR–

El cultivo del tomate es uno de los más importantes a nivel mundial y nacional. Sin embargo, su producción es afectada por el marchitamiento vascular causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Para controlarlo se utilizan productos químicos, lo que trae consigo resistencia hacia los ingredientes activos por parte de los microorganismos; debido a esto se buscan alternativas como los extractos vegetales los cuales para mejorar su efectividad se formulan en nano y microencapsulados (NPs) con biopolímeros. En el presente trabajo se identificaron fitoquímicos en extractos de *Lippia graveolens* y *Viscum album*, se determinó la actividad antifúngica de estos por el método de medio envenenado, se produjeron NPs cargados con los extractos vegetales, y se estudió su efectividad biológica sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* así como su capacidad para inducir la activación de enzimas asociadas a mecanismos de defensa en plantas de tomate. Se identificaron fitoquímicos de familias como los taninos, alcaloides, saponinas, azúcares reductores, purinas, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, catequinas y ácidos metoxicinámicos; en cuanto a la actividad antifúngica ambos extractos presentaron inhibición del 100 % a 200 mg/L; con relación a la

concentración inhibitoria al 50 % (CI₅₀) *L. graveolens* presentó 64.68 mg/L y *V. album* 71.61 mg/L; finalmente se observó la capacidad de mejorar el desarrollo morfométrico en las plantas por parte de los NPs de extractos vegetales, así como la capacidad de aumentar la actividad de enzimas asociadas mecanismos de defensa en las plantas como fenilalanina amonio liasa (PAL), peroxidasa (POD) y superóxido dismutasa (SOD), en distintos tiempos.

ABSTRACT

NANO AND MICRO ENCAPSULATES OF PLANT EXTRACTS TO CONTROL AND ACTIVATION OF INDUCED RESISTANCE AGAINST *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* IN TOMATO

BY

MARCO ANTONIO TUCUCH PÉREZ

DOCTOR

DOCTOR OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
CALZADA ANTONIO NARRO NO. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA

JUNE 2021

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO –ADVISOR–

The tomato crop is one of the most important worldwide and national. Nevertheless, its production is affected by vascular wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Chemical products are used to control it, which provoke resistance to active ingredients by phytopathogenic microorganisms; due to this, have been proposed alternatives as plant extracts, which to improve their effectiveness are formulated in Nano and Micro encapsulates (NPs) with biopolymers. In the present work, phytochemicals were identified in extracts of *Lippia graveolens* and *Viscum album*, their antifungal activity was determined by the poisoned medium method, NPs loaded with plant extracts were produced, and their biological effectiveness was studied on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* as well as its ability to induce the activation of enzymes associated with defense mechanisms in tomato plants. Phytochemicals from families such as tannins, alkaloids, saponins, reducing sugars, purines, flavonoids, hydroxycinnamic acids, stilbenes, catechins, and methoxycinnamic acids were

identified; regarding antifungal activity, both extracts showed 100% inhibition at 200 mg / L; in relation to the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) *L. graveolens* presented 64.68 mg / L and *V. album* 71.61 mg / L; Finally, the ability to improve morphometric development in plants by NPs from plant extracts was observed, as well as the ability to increase the activity of enzymes associated with defense mechanisms in plants such as phenylalanine ammonium lyase (PAL), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD), at different times.

INTRODUCCIÓN

El tomate es una de las principales hortalizas cultivadas a nivel mundial y nacional por sus características nutricionales, así como sus propiedades organolépticas. Debido a lo anterior, es uno de los de mayor importancia económica, produciéndose en varios países registrando una superficie cultivada de 5,030,545 ha (FAOSTAT, 2020). Sin embargo, se ve afectado por problemas fitosanitarios tales como plagas, enfermedades y maleza. En el contexto de las enfermedades ocasionadas por virus, bacterias, nematodos y hongos; los hongos fitopatógenos representan uno de los principales desafíos en la producción de este cultivo.

Una de las principales enfermedades fúngicas es el marchitamiento vascular, ocasionado por el hongo fitopatógeno, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; la cual es considerada una de las más devastadoras en regiones donde se cultiva el tomate, ya que si no se tiene control de esta puede llegar a causar pérdidas de hasta el 80 % de la producción, afectando de esta manera la economía de los productores. En la actualidad esta problemática se trata de manejar mediante la aplicación de fungicidas de síntesis química; sin embargo, la aplicación de estos productos a largo plazo trae consigo efectos negativos como problemas medioambientales y de salud humana, además de ser agente mutagénico de las plantas e incrementar el grado de resistencia de los patógenos hacia los ingredientes activos (Lucas *et al.*, 2015; Villa-Martínez *et al.*, 2015), por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar alternativas ecológicas para el control de dicha enfermedad.

Una de las alternativas que han tomado relevancia en los últimos años, es el uso de los extractos vegetales; los cuales han demostrado su eficacia para el control de enfermedades debido a los compuestos fitoquímicos que poseen, y a sus diferentes modos de acción, los cuales pueden atacar a los fitopatógenos de manera directa al entrar en contacto con ellos formando complejos con enzimas microbianas inhibiendo sus funciones, mediante la inhibición del transporte de electrones a través de las membranas, interviniendo especies reactivas de oxígeno (ROs) intracelulares procedentes de las mitocondrias las cuales producen hifas fúngicas, formando complejos con esteroides permitiendo mayor permeabilidad de la membrana o por la capacidad de inhibir la síntesis de ácidos nucleicos inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa, además de

afectar la proteína FtsZ durante la división celular (Candiracci *et al.*, 2012; Lanzotti *et al.*, 2012; Mendez *et al.*, 2012; Cushnie *et al.*, 2014; Warris y Ballou, 2019); o de manera indirecta mediante la activación de defensas de la planta por la inducción de resistencia (IR), proceso en el cual moléculas llamadas elicitores estimulan cambios en el metabolismo, dicha respuesta empieza de manera local con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) o a daños (PMADs), los cuales son reconocidos en receptores de la membrana citoplasmática llamados Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRPs), formados por una Repetición Extracelular Rica en Leucina (LRR) y un dominio de quinasa intracelular (KD), de esta manera los RRP interactuarán con las proteínas Brasinoesteroide Insensible 1–Asociadas a Quinasas 1 (BAK1), activando la Inmunidad Activada por Patrones (PTI) la cual trae consigo el flujo de iones para la despolarización de la membrana plasmática, producción de (ROs) y la activación de las proteínas Quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Todas estas señales inducen una respuesta transcripcional masiva en genes relacionados con la defensa; la activación de estos genes implica la producción y acumulación de Proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PRPs) como peroxidasas, quitinasas, glucanasas, defensinas, etc.; fitoalexinas como sesquiterpenos, furanoterpenos, isocumarinas, resveratrol, pinosilvyn, piceatannol y bibenzil; ligninas en pared celular y fitohormonas como el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) (Pretali *et al.*, 2016; Khoa *et al.*, 2017). Una vez iniciada la respuesta local PTI, se activan las defensas sistémicas que son la Respuesta Hipersensible (RH), Respuesta Sistémica Inducida (RSI) y la Respuesta Sistémica Adquirida (RSA) (Tsuda & Katagiri, 2010; Burketova *et al.*, 2015). Los extractos vegetales se presentan como una solución para contrarrestar los problemas ocasionados por los productos de síntesis química frente a enfermedades en la agricultura, este efecto puede ser potenciado mediante el uso de la nanotecnología desarrollando formulaciones de Nano y Microencapsulados (NPs) a base de biopolímeros, los cuales encapsulan y protegen los ingredientes activos de los factores ambientales permitiendo la aplicación de dosis más pequeñas, reducción de las pérdidas de los compuestos encapsulados y liberación regulada del ingrediente activo; además el uso de biopolímeros como el quitosán y alginato, presentan efectos positivos en las plantas como la inducción de resistencia, promoción de crecimiento e inducción de la

división celular en los meristemas apicales así como la elongación de células de la raíz (Armendáriz-Barragán *et al.*, 2016).

Se tienen reportes del uso de NPs cargados con hormonas en el manejo de enfermedades las cuales mejoraron el desarrollo general de plantas de frijol (Pereira *et al.*, 2017); así como NPs a base de quitosán aplicados en plántulas de *Pennisetum glaucum* y *Camellia sinensis* los cuales aumentaron la producción de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa, tales como la fenilalanina amonio liasa, peroxidasa y súperóxido dismutasa (Chandra *et al.*, 2015; Siddaiah *et al.*, 2018).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antifúngica y la producción de enzimas relacionadas con mecanismos de defensa del extracto de *L. graveolens* en mezcla con extracto de *V. album*, nano y microencapsulados, y sin encapsular; sobre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar los fitoquímicos presentes en extractos de *L. graveolens* y *V. album*.
- Determinar la actividad antifúngica de los extractos vegetales sobre *F. oxysporum in vitro*.
- Producir nano y microencapsulados de extracto de *L. graveolens* mezclado con extracto de *V. album*.
- Determinar la efectividad biológica de las formulaciones sobre *F. oxysporum* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero y su efecto en el desarrollo de las plantas de tomate en invernadero.
- Cuantificar enzimas relacionadas con mecanismos de defensa en plantas de tomate por la mezcla de los extractos vegetales encapsulados y sin encapsular.

HIPÓTESIS

Los NPs de extractos de *L. graveolens* y *V. album*, presentarán actividad antifúngica sobre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, estimularán la producción de enzimas involucradas con los mecanismos de defensa de plantas de tomate, además de mejorar el desarrollo en las características morfométricas de las plantas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del Cultivo de Tomate

El centro de origen del tomate se encuentra en América del Sur, en la región de los Andes; sin embargo, su domesticación se llevó a cabo en México, es una planta de porte erecto o semi erecto, arbustivo y cultivo de tipo anual. Las variedades existentes pueden presentar crecimiento determinado o indeterminado. El fruto del cultivo de tomate es una baya ovalada, redonda o periforme; y su tamaño va desde el tamaño de una cereza, hasta frutos de 750 g (SAGARPA, 2010). Los procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo de la planta de tomate dependen de las condiciones del clima, del suelo y de las características genéticas de la variedad (Estrada *et al.*, 2006).

Cultivo de Tomate en el Mundo y en México

El tomate es una de las hortalizas más producidas por su alto nivel nutricional, además de ser la base gran variedad de platillos en diferentes regiones del mundo, su importancia se logra observar con el aumento de la superficie sembrada en el mundo, siendo esta de 4,429,564 ha en el año 2010, y aumentando a 5,030,545 ha para el año 2019; siendo los principales países China, India, Turquía, Estados Unidos de América, Egipto, Italia, Irán, España y México (FAOSTAT, 2020). En cuanto a nivel nacional, la producción total del cultivo de tomate según el SIAP (2020) alcanzó 3,441,639.37 Ton, siendo los estados de Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Zacatecas y Jalisco los principales productores; el aumento en la producción, así como las mejoras en los canales de comercialización ha permitido al país, ocupar el primer lugar como exportador de esta hortaliza con 2.17 millones de toneladas, siendo el principal mercado los Estados Unidos de América (SAGARPA, 2019).

F. oxysporum f.sp. lycopersici

De los hongos filamentosos asociados a los diferentes cultivos, el género *Fusarium* es uno de los más importantes, debido a los daños que este ocasiona en las plantas, este género fue descrito por primera vez en 1809 por Link (Leslie *et al.*, 2001). Desde entonces su ubicación taxonómica ha ido cambiando reportándose actualmente la siguiente clasificación (SENASICA, 2019):

Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Subclase: Hypocreomycetidae
Orden: Hypocreales
Familia: Nectriaceae
Género: *Fusarium*
Especie: *Fusarium oxysporum*

La forma especial asignada a cada especie del género *Fusarium* se caracteriza por ser cepas morfológicamente indistinguibles; sin embargo, las diferencia su capacidad de hospedar y colonizar hospederos específicos (Deighton *et al.*, 1962). Dentro del género *Fusarium* se han descrito más de 70 formas especiales (Armstrong y Armstrong, 1981).

La marchitez del tomate causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, es una enfermedad altamente destructiva en variedades susceptibles y específicas para el cultivo de tomate. El patógeno es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive en el cultivo, en los restos de plantas infectadas que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas, sobre todo en las regiones templadas frías (Agrios, 1995).

Sintomatología de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

La enfermedad conocida como marchitamiento vascular del tomate por lo general es más agresiva cuando las condiciones ambientales se presentan con temperaturas y humedad elevadas, y los suelos son arenosos; el daño que ocasiona el patógeno se presenta principalmente cuando las plantas se encuentran en etapa de floración y fructificación (Ramírez, 1998). La sintomatología por lo general comienza a nivel de la raíz de la planta y avanza hacia el tallo, dentro del cual, en un corte transversal, es posible observar un anillo necrótico de color café que se extiende hacia arriba conforme la enfermedad avanza. Debido al taponamiento de raíces y haces vasculares, los síntomas empiezan a hacerse visibles con un amarillamiento en un solo lado de las hojas y ramas más viejas de la planta, permaneciendo las hojas muertas adheridas a las ramas. Una vez que raíces y tallos son invadidos, una pudrición negra se manifiesta en las raíces jóvenes laterales, lo que favorece el marchitamiento (SENASICA, 2019).

Importancia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate

La enfermedad causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, es una de las más devastadoras en regiones donde se cultiva tomate; dicha enfermedad afecta directamente el sistema vascular de la planta, evitando el paso de nutrientes y agua, ocasionando el marchitamiento y muerte de las plantas (Marlatt *et al.*, 1996). Se ha estimado que, si la enfermedad no es controlada, puede llegar a ocasionar pérdidas en la producción de más del 80 %; su distribución ha sido reportada en al menos 32 países, y se han identificado tres razas (Amaral *et al.*, 2008; González *et al.*, 2012; Hernández- Martínez, *et al.*, 2014).

Medidas de Control de Enfermedades en el Cultivo del Tomate

Control químico

El control químico se puede definir como el uso de sustancias de síntesis química con acción biocida, capaces de eliminar patógenos que afectan a los cultivos. Este tipo de productos ha sido el más empleado por muchos años; sin embargo, se ha detectado que puede generar dependencia, además de ocasionar resistencia por parte de los microorganismos hacia los ingredientes activos, disminuyendo en gran medida la efectividad de estos (Bautista-Baños, 2004; Jaramillo, 2007). Además de lo anterior mencionado, estos productos tienen un impacto ambiental negativo, debido al efecto que presentan sobre organismos benéficos, la atmósfera, el suelo y cuerpos de agua (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuellar, 2002).

La residualidad que tienen los fungicidas químicos en alimentos es otra objeción al uso de estos productos, ya que se tiene evidencia de su capacidad como agentes cancerígenos y mutagénicos sobre la salud humana; la preocupación por sus posibles efectos nocivos adquiere especial importancia si tenemos en cuenta que la fruta suele ser consumida en fresco. Debido al grave problema que representan los residuos de productos químicos para la salud humana, los diferentes países y en especial los más desarrollados han establecido una serie de límites máximos de residuos (LMR) bastante restrictivos (Viñas *et al.*, 2006).

Control biológico

El control biológico se define como el uso de organismos vivos para control de plagas, enfermedades y maleza, utilizando los organismos como tal o compuestos que se sintetizan dentro de su metabolismo; este tipo de control presenta ciertas ventajas como la especificidad en su actuación, respeto al medio ambiente, además de menor desarrollo de resistencia de los patógenos a los ingredientes activos (Fernández y Juncosa, 2002). En el crecimiento de la agricultura orgánica, las investigaciones se enfocan en la búsqueda de nuevos compuestos para el control de enfermedades, cuya actividad y seguridad ambiental sea adecuada (Igbinsosa *et al.*, 2009).

Inducción de resistencia (IR)

La IR se ha convertido en el foco de estudio en los centros de investigación tanto del sector público como privado, debido a la necesidad de contar con diferentes enfoques para el control de las enfermedades de las plantas; en este sentido el mecanismo de defensa de las plantas es una opción interesante, porque permite reducir el daño por fitopatógenos, además la IR se ubica en el contexto de ser aplicado en la agricultura orgánica (Cipollini y Heil, 2010; Walters *et al.*, 2013).

En la naturaleza, las plantas están en contacto con microorganismos patógenos, y generalmente están sanas debido a los mecanismos de defensa; uno de estos mecanismos es la defensa pasiva que son barreras estructurales que pone la planta tales como ceras, cutículas y paredes celulares; y la otra es la defensa activa o inducida también llamada IR. Este tipo de resistencia implica cambios en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes (Laredo-Alcalá *et al.*, 2017). La IR es la estimulación de las defensas naturales de las plantas con elicitores que simulan el ataque de fitopatógenos y ponen a las plantas en estado de alerta; cuando las plantas reconocen un patógeno, la velocidad de las defensas a menudo determina si las plantas resistirán una infección (Burketova *et al.*, 2015; Llorens *et al.*, 2017). Teóricamente, las plantas poseen genes para responder a la agresión de patógenos, se ha demostrado que una compleja red de señales hormonales controla las respuestas de las plantas frente al ataque de patógenos (Laredo-Alcalá *et al.*, 2017).

Inmunidad en Plantas

Inmunidad activada por patrones (PTI)

Las plantas han desarrollado un sistema inmunológico eficaz contra el ataque de fitopatógenos. La activación de las defensas de las plantas comienza con el reconocimiento de moléculas denominadas PMAPs o mediante DMAPs; estas señales son reconocidas por receptores ubicados en la membrana citoplasmática llamados receptores RRP, formados por una LRR y un KD, los RRP interactúan con la proteína BAK1 para activar el sistema de defensa local PTI (Figura 1); el PTI activa una gran cantidad de señales como los flujos de iones para la despolarización de la membrana plasmática, la producción de ROs y la activación de las MAPK (Burketova *et al.*, 2015; Jones y Dangl, 2006) . Estas señales inducen una respuesta transcripcional masiva en genes relacionados con la defensa; la activación de estos genes implica la producción y acumulación de PRPs, fitoalexinas, lignina en la pared celular y ROs que son tóxicas para patógenos (Tsuda y Katagiri, 2010; Burketova *et al.*, 2015).

Inmunidad activada por efectores (ETI)

Los patógenos evolucionan continuamente, lo que puede corroborar a través de otra estrategia de defensa vegetal local conocida como ETI (Figura 1). En esta estrategia, los patógenos desarrollaron proteínas conocidas como efectores, las cuales son transferidas a la célula de la planta, evadiendo la defensa local PTI, ocasionando la producción de receptores llamados Receptores de Unión a Nucleótidos (NBRs), que reconocen moléculas llamadas efectores; con la ETI generalmente ocurre lisis en las células cercanas a un patógeno llamada RH; se puede considerar a la ETI como evidencia de coevolución dinámica entre microorganismos y plantas (Tsuda & Katagiri, 2010; Dodds & Rathjen, 2010;Díaz, 2012).

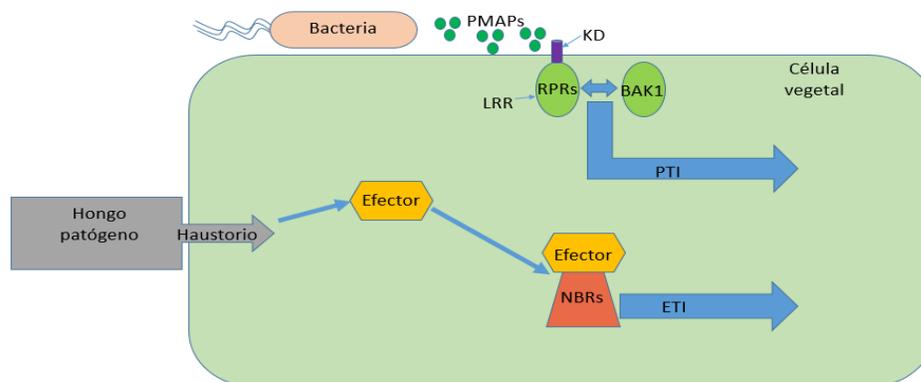


Figura 1. Representación esquemática de las estrategias defensivas PTI y ETI utilizadas por plantas contra fitopatógenos.

Resistencia sistémica adquirida (RSA)

La resistencia activada en las plantas depende de factores bióticos y abióticos conocidos como elicitores. (Burketova *et al.*, 2015; Mahesh *et al.*, 2017). Las fitohormonas son sustancias químicas que regulan las respuestas en las plantas, generalmente se producen y transportan en pequeñas cantidades, de una parte, a otra de las plantas; algunas fitohormonas son el ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides (BR), etileno, auxinas, giberelinas, AS y AJ. En cuanto a la IR las fitohormonas más relevantes son el AS y AJ, estas fitohormonas están involucradas en la respuesta inmune de las plantas contra los patógenos (Javid *et al.*, 2011; Burketova *et al.*, 2015).

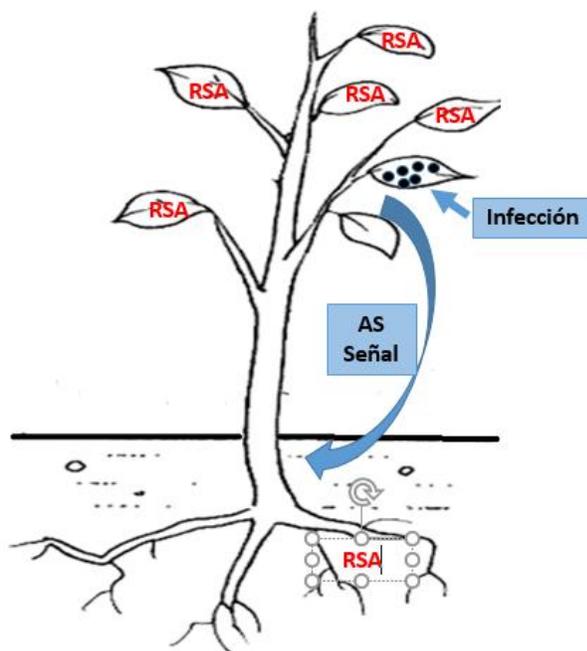


Figura 2. Representación esquemática de RSA y su mecanismo de respuesta

La RSA es un tipo de IR de amplio espectro activado local y sistemáticamente por patógenos necrotizantes (Figura 2), confiere resistencia a una variedad masiva de patógenos; una vez que se activa la RSA puede permanecer activa días o semanas, esta característica la hace atractiva para la agricultura. La RSA se puede activar con compuestos sintéticos o naturales (Laredo-Alcalá *et al.*, 2017; Llorens *et al.*, 2017). Los estudios han demostrado que la RSA depende de la acumulación de AS, componentes de la vía de AS como el derivado metilado del AS, diterpenoide deshidroabiético, radicales libres de óxido nítrico (NO), ROs, así como la activación de la Proteína 1 No Expresadora de Patogénesis (NPR1) (Gao *et al.*, 2015). La vía del AS comienza con la síntesis de AS durante los mecanismos locales de defensa PTI o ETI, a través del ácido corísmico, que es un metabolito obtenido de la ruta del ácido shikímico; una vez presente el AS interactúa con la NPR1 provocando cambios estructurales y translocándose al núcleo celular, activando la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PRs), por lo que NPR1 y el AS actúan como coactivadores de PRs (Pieterse *et al.*, 2012; Llorens *et al.*, 2017). Una vez activados los PRs inicia la producción de PRPs (Cuadro 1), las cuales se acumulan en el citoplasma y las vacuolas, y muchas de ellas tienen actividad antimicrobiana; existen 14 familias de PRPs, y cada una presenta

actividad distinta como quitinasas, glucanasas, ribonucleasas, peroxidasas, defensinas y tioninas (Pieterse *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2015; Herrera *et al.*, 2018). El término PRPs se convirtió en un término colectivo para todas las proteínas inducidas por microbios y sus homólogos en la medida en que enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), peroxidasa (POD) y poli fenol oxidasa, están presentes de manera constitutiva y solo aumentan durante la infección (Van Loon *et al.*, 2006).

Enzimas de defensa en plantas

La producción de enzimas relacionadas con la defensa es una de los principales mecanismos bioquímicos que presentan las plantas, para contrarrestar el efecto de microorganismos patógenos. Dichas enzimas se producen por la acción de elicitores con capacidad de estimular las estrategias de defensa locales PTI o ETI, además de los mecanismos de defensa sistémicos RH, RSA y la RSI, a partir de compuestos como el AS, AJ o ROs; los cuales a nivel molecular inducen la activación de genes capaces de codificar proteínas que actúan como factores de defensa o como enzimas esenciales en la biosíntesis de compuestos de defensa; esta respuesta puede generarse en el sitio de la infección o sistémicamente en otros órganos (Blanco-Labra y Mancilla, 2002; Rodríguez *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Familias de Proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PRPs)

PR	Familia
PRPs-1	Cisteínas
PRPs-2	β -1,3-glucanasas
PRPs-3	Quitinasas I,II,III, IV, V, VI y VII
PRPs-4	Quitinasas I y II
PRPs-5	Taumatinas
PRPs-6	Inhibidores de la proteinasas
PRPs-7	Endoproteinasas

PRPs-8	Quitinasas III
PRPs-9	Peroxidasas
PRPs-10	Ribonucleasas
PRPs-11	Quitinasas I
PRPs-12	Defensinas
PRPs-13	Tioninas
PRPs-14	Proteína de transferencia de lípidos

Las β -1,3-glucanasas son enzimas que forman parte de las PRPs las cuales actúan como factores de defensa. Un gran número de microorganismos fitopatógenos poseen en su estructura celular polisacáridos como los β -glucanos los cuales juegan un rol importante en la patogénesis de estos hacia las plantas; en este sentido en los vegetales las β -1,3-glucanasas, provocan lisis y degradación de la pared celular ocasionando la fuga de su contenido; este efecto se produce por hidrólisis en el extremo no reductor del glucano, lo que provoca la formación de oligosacáridos y glucosa (Edison *et al.*, 2018; Confortin *et al.*, 2019). Otras PRPs que tiene la capacidad de actuar como factores de defensa son las quitinasas, las cuales son enzimas que degradan la quitina en oligómeros (endoquitinasas), o en dímeros y monómeros (exocitinasas) (Confortin *et al.*, 2019).

En el caso de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de compuestos de defensa, las enzimas como PAL y POD, son producidas como parte de la defensa bioquímica de las plantas; a diferencia de las enzimas que actúan sobre los microorganismos fitopatógenos directamente, estas son parte de rutas metabólicas que sintetizan productos conocidos como compuestos fenólicos o fenilpropanoides, químicamente estos compuestos son un grupo en los cuales están presentes moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como la lignina. La actividad de estas enzimas ha sido descrita en la ruta metabólica del ácido shikimico, el cual mediante reacciones metabólicas se convierte en el ácido corismico, este ácido por una reacción de transposición catalizada por la enzima enolpiruvato transferasa, se transforma en el ácido pferenico; posteriormente este ácido mediante una reacción de descarboxilación mediada por una enzima descarboxilasa, elimina el grupo hidroxilo y sustituye el oxígeno cetónico por un

grupo amino resultando la L- fenilalanina; a continuación la L-Fenilalanina es desaminada por la enzima PAL, lo que da como resultado el ácido cinámico, el cual en presencia de NADPH genera ácido 4-cumárico que al ser oxidado y posteriormente metilado produce ácido felúrico el cual se vuelve a oxidar y a metilar para generar el ácido sináptico. Los tres ácidos son reducidos a alcohol cumarílico, coniférico y Sinapílico, respectivamente mediante reacciones catalizadas por el NADPH y la coenzima A (Gordo, 2018). El último paso es la oxidación de los alcoholes cinámicos o monolignoles en la pared celular esto ocurre mediante la acción de la enzima POD la cual emplea ROs como el H_2O_2 , para realizar la reacción de oxidación que da lugar a la formación de radicales 4-O-Fenoxilo que polimerizan espontáneamente, a dímeros y oligómeros, y posteriormente a un polímero de lignina (Figura 3); la incorporación de este compuesto en la pared celular puede ayudar a fortalecerla y hacerla más resistente a la degradación por enzimas secretadas por organismos fitopatógenos, ayudando de esta manera en la defensa sistémica contra patógenos de plantas (Gordo, 2018; Martínez, 2014; Ulloa, 2018). De este modo las enzimas antioxidantes como POD contrarrestan y regulan el estallido de la oxidación por ROs y al mismo tiempo intervienen en la formación de defensas estructurales (Alcantar-Acosta *et al.*, 2018).

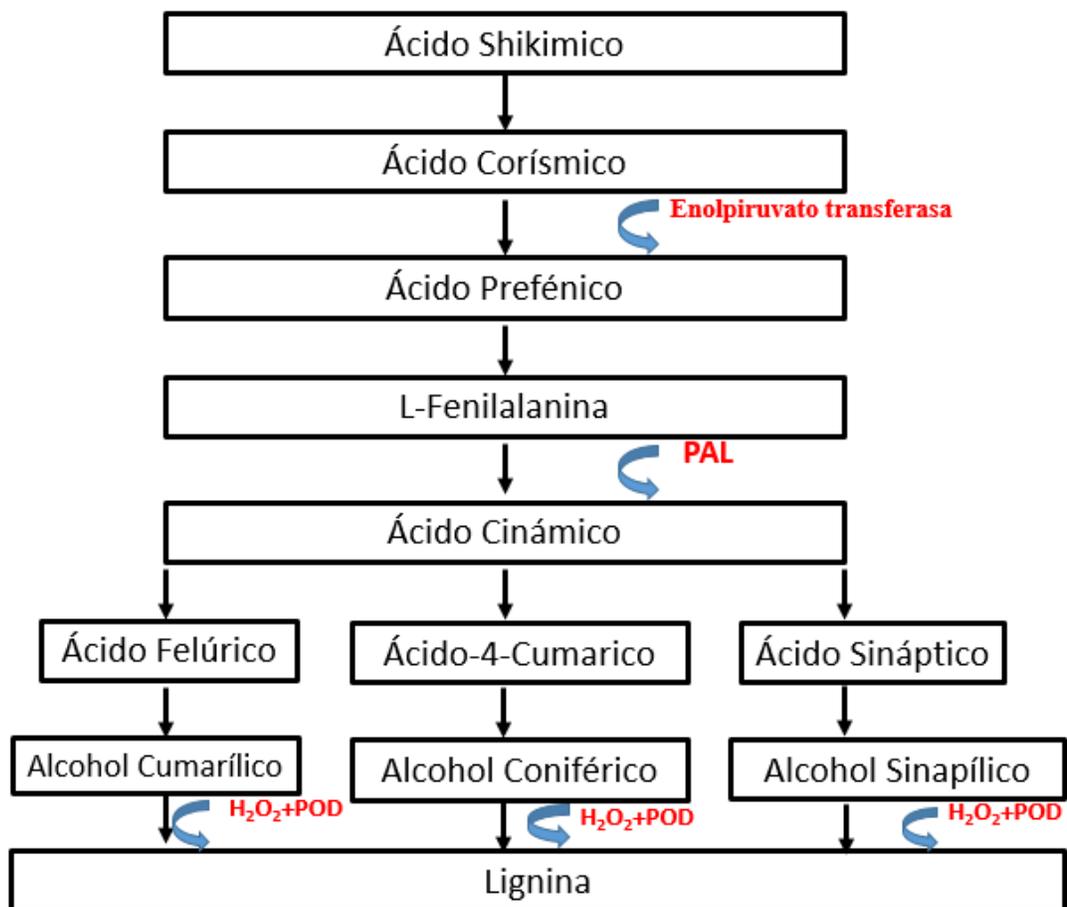


Figura 3. Biosíntesis de lignina generalizada, que indica el papel de las enzimas PAL y POD.

La biosíntesis de compuestos como la lignina no es el único producto resultante de la ruta de los fenilpropanoides mediada por enzimas involucradas en la resistencia, ya que también mediante esta ruta se generan compuestos fenólicos como, cumarinas, chalconas, estilbenos y flavonas (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almaráz, 2007). En el caso de las cumarinas estas se generan a partir del ácido cinámico el cual es producido por la desaminación de la L-fenilalanina mediada por PAL, el cual es oxidado a ácido 2 y 4-cumarico, posteriormente este sufre una isomerización catalizada por la enzima ácido-2-cumarico isomerasa, obteniendo las cumarinas. Sin embargo, si la ruta es por medio del ácido 4-cumarico no ocurre una isomerización, sino una hidroxilación lo que genera el ácido 2,4 dihidroxicinámico, esto mediante una lactonización para obtener

Umbeliferona, esta se convierte en esculetina la cual es esterificada para dar paso a la escopoletina, y por O-glicosidación generarse la escopolina (Figura 4) (Gordo, 2018).

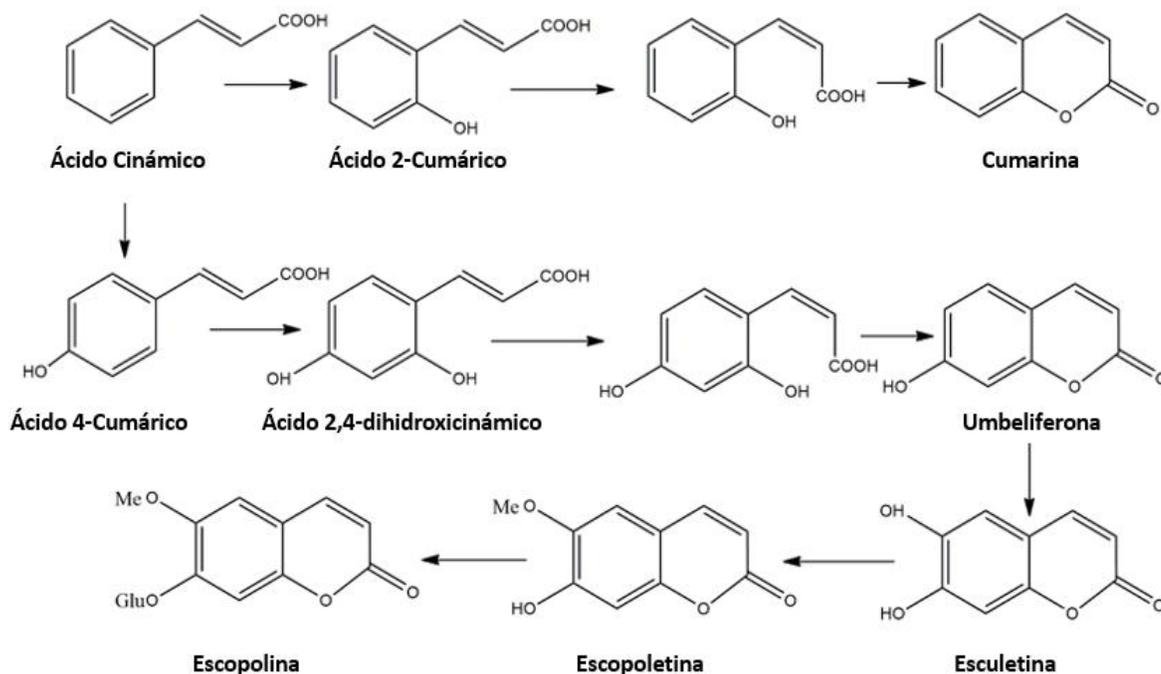


Figura 4. Biosíntesis de cumarinas a partir del ácido cinámico (Gordo, 2018).

Los compuestos fenólicos provenientes de los fenilpropanoides se caracterizan por ser un grupo muy grande, en estos también se encuentran las chalconas las cuales se originan por acoplamiento del 4-hidroxicinamoil-CoA, lo que forma un intermediario el cual al sufrir una reacción tipo Claisen por la chalcona sintasa, origina las chalconas. En esta misma ruta metabólica se pueden generar los estilbenos que son fitoalexinas, estos se forman mediante una reacción aldólica del intermediario proveniente del acoplamiento del 4-hidroxicinamoil-CoA catalizada por la estilbeno sintasa; y las flavonas las cuales se sintetizan a partir de las chalconas por reacciones de ataque nucleofílicos de los hidroxilos al sistema α y β insaturado de las chalconas (Figura 5) (Gordo, 2018).

Extractos Vegetales

Los extractos vegetales son mezclas compuestas de químicos con propiedades biológicas, estos se presentan como una alternativa a los productos de síntesis química

en la agricultura para el manejo de problemas fitosanitarios como plagas y enfermedades, ya que contienen compuestos biodegradables e inocuos (Hernández-Castillo *et al.*, 2011). Dichos extractos por lo general se obtienen a partir de órganos vegetales secos mediante filtración y evaporación utilizando diversos solventes (Wang *et al.* 2004).

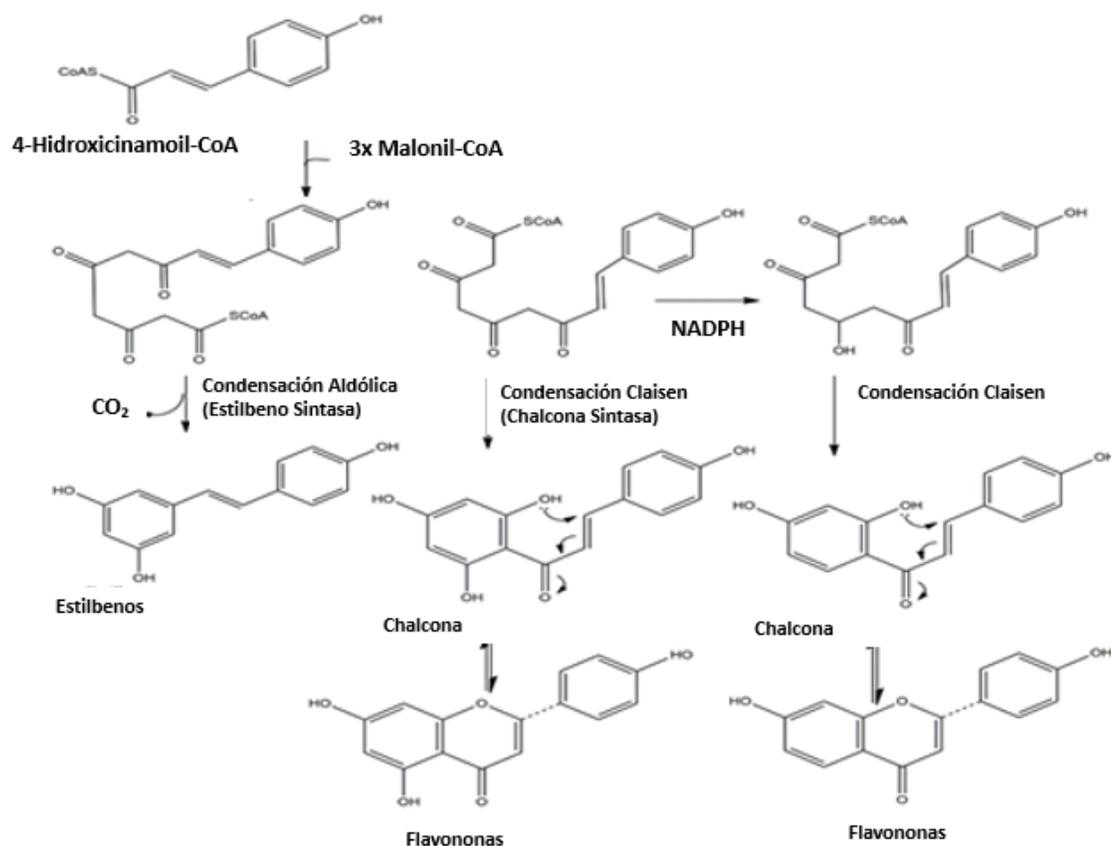


Figura 5. Biosíntesis de chalconas, estilbenos y flavanonas (Gordo, 2018)

Extractos vegetales como fungicidas

En el metabolismo de las plantas se generan reacciones bioquímicas que derivan en productos llamados metabolitos secundarios, las plantas tienen una capacidad ilimitada para sintetizar estos metabolitos (Figura 6). En las plantas, algunos de los metabolitos secundarios más importantes son los terpenos, terpenoides y aromáticos debido a sus efectos sobre los microorganismos, principalmente fenoles o sus derivados sustituidos con oxígeno. Algunos compuestos de estas clases son fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos, cumarinas y alcaloides. Estos

fitoquímicos con mecanismos de acción variables, como el formar complejos con enzimas y proteínas microbianas para inhibir sus funciones, inhibir el transporte de electrones a través de las membranas, y como alterar iones importantes como el hierro y el cobre (Castillo *et al.*, 2010; Mendez *et al.*, 2012). El uso de extractos vegetales con propiedades antifúngica surge como alternativa para el manejo de enfermedades en plantas; diversos estudios han demostrado su efectividad para controlar patógenos de plantas en laboratorio, invernadero y campo.

Se considera que la mayoría de los compuestos obtenidos de las plantas son biodegradables e inoos, por lo tanto, resulta conveniente investigar y explorar el potencial de empleo de los extractos vegetales para el control de enfermedades en cultivos; por esta razón, los extractos vegetales con propiedades antifúngicas se presentan como alternativa al uso de funguicidas sintéticos para el manejo de enfermedades fúngicas (Ujváry, 2002).

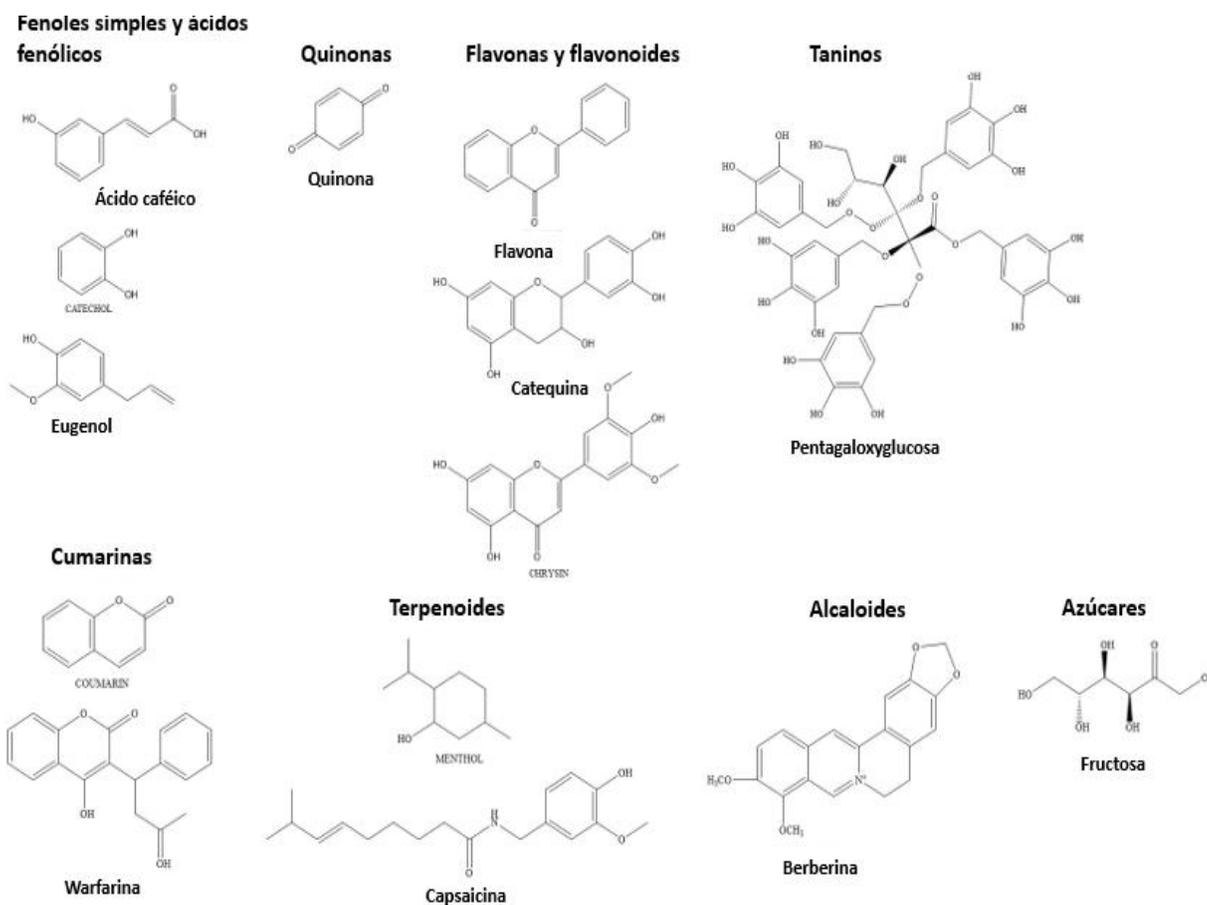


Figura 6. Principales compuestos fitoquímicos de plantas

Extractos vegetales como inductores de resistencia

Los compuestos fitoquímicos presentes en los extractos vegetales otorgan a estos diversas propiedades, siendo la capacidad de inducir resistencia de las plantas hacia enfermedades una de las más estudiadas. Actualmente no se ha dilucidado por completo el modo de acción de los extractos vegetales para inducir resistencia en plantas, siendo probablemente la mezcla de diversos compuestos lo que desencadena las respuestas en el sistema de defensa de las plantas (Burketova *et al.*, 2015; Khoa *et al.*, 2017). Sin embargo, diversas investigaciones señalan que las vitaminas son metabolitos producidos en plantas, involucradas en la IR, se ha propuesto que las vitaminas B como la tiamina y la riboflavina inducen resistencia en las plantas, se sugiere que la tiamina afecta el flujo de iones CA^+ a través de la membrana plasmática, estos iones juegan un papel fundamental en la RH porque regulan la actividad de la proteína Quinasa C, aumentando las ROs (Ahn *et al.*, 2005); mientras, la riboflavina estimula la producción de H_2O_2 , la formación de depósitos de lignina y la expresión del gen 13-LOX que codifica la producción de lipoxigenasa, la cual juega un papel esencial en la biosíntesis de AJ a través de la vía octadecanoica (Taheri y Tarighi, 2010).

Dentro de los compuestos fitoquímicos producidos en el metabolismo de las plantas, los compuestos fenólicos son importantes, debido a su actividad biológica, uno de los más relevantes es el AS, que induce la activación de genes PRs para codificar PRPs, la RH y desencadena la RSA (Liu *et al.*, 2019). Los flavonoides, otros compuestos fenólicos importantes, se sintetizan en todos los organismos de las plantas, su capacidad para inducir resistencias está relacionada con su capacidad para estimular la colonización de las raíces por rizo bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), desencadenando el mecanismo de RSI en la defensa de las plantas, también han reportado la acumulación de flavonoides para inhibir el transporte de auxinas aumentando la resistencia a los fitopatógenos (Dao *et al.*, 2011; Mierziak *et al.*, 2014).

También se ha reportado que los polímeros de carbohidratos como los polisacáridos u oligosacáridos son inductores en la defensa de las plantas; dichos compuestos están presentes en las paredes celulares, por lo que forman parte de los extractos vegetales; en general, los carbohidratos activan la vía PTI interactuando con las RRs, estos contienen

un ectodominio de unión a ligando, que a su vez contiene una lisina, una lectina, factor de crecimiento epidérmico y LRR que permiten reconocer ligandos, jugando un papel esencial en la interacción con carbohidratos para activar las defensas (Zheng *et al.*, 2020). Algunos carbohidratos con actividad inductora son los β -glucanos, oligogalacturónidos y carragenanos; dentro de las respuestas inducidas se encuentran el influjo de calcio, el estallido de ROs, la deposición de callosa, la acumulación de AS, expresión de genes relacionados con la defensa, activación de enzimas de defensa y la producción de fitoalexinas (Zheng *et al.*, 2020).

***Lippia graveolens* Kunth**

Clasificación taxonómica

L. graveolens es una planta arbustiva originaria del norte de América, en la actualidad es una especie de importancia económica debido a la gran variedad de usos que se le da; taxonómicamente pertenece a la familia Verbenaceae, y es conocida comúnmente como orégano, su clasificación taxonómica según el Sistema Integrado de Información Taxonómica es la siguiente (ITIS, 2020):

Reino: Plantae

Division: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Lippia*

Especie: *Lippia graveolens*

Descripción botánica

L. graveolens forma arbustos pequeños de 45 cm hasta 1.80 m de alto, los tallos presentan tonalidades rojizas y se ramifican en su parte superior, y por lo general tienden a deshojarse en la parte inferior. Las hojas son ovales opuestas y anchas, de 2 a 5 cm de largo, con bordes enteros o ligeramente dentados con el haz denso y piloso, envés glandular, ápice obtuso o redondeado, base redondeada a subcordada; el número de peciolos varía de 5-10 cm de largo. Las flores se presentan muy pequeñas, de color blanco de inflorescencias terminales ramificadas; y los frutos son pequeños y encerrados en el cáliz (Villacencio-Gutiérrez *et al.*, 2010).

Composición fitoquímica

Se han identificado diversas sustancias mediante análisis químicos en raíz y la parte aérea, alguno de los compuestos identificados son aceites esenciales, iridoides, flavonoides, naftoquinonas, flavonoides y compuestos fenólicos, entre otros (García-Bores *et al.*, 2017). *L. graveolens* presenta pequeñas glándulas donde se almacena una esencia color amarillo limón compuesta por un estearopteno y dos fenoles denominados carvacrol y timol, estos compuestos determinan su valor en el mercado, además de ser de gran interés en la industria farmacéutica, alimenticia, así como en la agricultura (Huerta, 2005).

Propiedades antifúngicas

Los extractos de plantas del semi desierto mexicano han sido descritos como una alternativa para el manejo y control de microorganismos fúngicos, debido a la cantidad de fitoquímicos presentes en estos. En este sentido diversos autores han realizado estudios con resultados destacados como los reportados por Jasso de Rodríguez *et al.* (2011) quienes observaron efecto antifúngico de extractos etanólicos y hexánicos de *L. graveolens* sobre *Rhizopus stolonifer* inhibiendo el 100% del crecimiento; del mismo modo Peschiutta *et al.* (2016) observaron inhibición de *Fusarium veticilloides* utilizando el aceite esencial de hojas de *L. graveolens*; Hernández *et al.* (2008) también reportaron actividad antifúngica del aceite esencial de *L. graveolens* sobre *Fusarium sporotrichum*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *F. moniliforme* y *Rhizoctonia solani*.

***Viscum album* L.**

Clasificación taxonómica

V. album también conocido como muérdago blanco o europeo, es una planta hemiparásita que se desarrolla en una gran cantidad de hospederos, actualmente *V. album* ha sido objeto de diversas investigaciones para manejo alternativo de células cancerígenas debido a la cantidad de compuestos fitoquímicos presentes; en relación a su calificación taxonómica el Sistema Integrado de Información Taxonómica acepta la siguiente (ITIS, 2020):

Reino: Plantae

Division: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida
Orden: Santalales
Familia: Santalaceae
Género: *Viscum*
Especie: *V. album*

Descripción botánica

V. album presenta tallos dicotómicos que pueden alcanzar hasta 1 m, divididos en varias ramas, cilíndricos y divididos por nudos. Las hojas presentan color amarillo verdoso con longitud de 2 a 8 cm por 0.80 a 2.5 cm de ancho; lanceoladas y de textura correa. Las flores son diminutas de 2 a 3 mm de diámetro, dioicas y de color amarillo verdoso. El fruto es una baya pequeña verde en estado inmadura, una vez madura se vuelve traslúcida de color blanco o amarillo (Smith y Glendhill, 1983).

Composición fitoquímica

La especie *V. album* presenta una gran cantidad de compuestos bioactivos incluyendo alcaloides, polisacáridos, ligninas, lectinas y viscotoxinas; además se han descrito gran variedad de carbohidratos incluyendo azúcares simples, así como polisacáridos; compuestos fenólicos como flavonoides, ácido caféico, ácido salicílico y siriginina; esteroides, incluyendo beta esterol, estigmasterol y triterpenos; gran cantidad de aminoácidos, así como amino vaso activos incluyendo tiramina, feniletilamina e histamina; y ácidos grasos como el linoleico, palmítico y ácido oleico (Luczkiewicz *et al.*, 2001; Pizzorno y Murray, 2020):

Propiedades antimicrobianas y como inductor de resistencia

Aunque tradicionalmente la especie *V. album* ha sido utilizada en el sector farmacológico para tratamiento de enfermedades como cáncer, problemas cardiovasculares y del sistema inmune (Pizzorno y Murray, 2020). En la actualidad ha ido en aumento su interés como producto antimicrobiano, debido a que los extractos de *V. album* han demostrado ser capaces de controlar microorganismos patógenos de humanos, en este sentido Ertürk *et al.* (2004) y Hussain *et al.* (2011) reportaron actividad antifúngica de extractos de *V. album* contra *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus flavus*; y Ertürk (2010) observó inhibición en el desarrollo de *C. albicans* y *Aspergillus niger* con extracto de *V. album*.

La especie *V. album* ha sido descrita como una especie que posee compuestos fitoquímicos capaces de inducir resistencia de las plantas a enfermedades, entre los que destacan poli fenoles, los cuales están fuertemente implicados en dicho mecanismo (Regnault-Roger, 2012). La inducción de resistencia que otorga *V. album* ha sido descrita en diversas investigaciones; Chandrashekhara *et al* (2010) reportaron un aumento en la producción de enzimas de resistencia en semillas de *Pennisetum glaucum* infectadas con el hongo *Sclerospora graminicola* al ser tratadas con extracto de *V. album*; por su parte Mosch *et al.* (1993) reportaron un aumento en el contenido total de fenoles y de la actividad enzimática al aplicar extracto de *V. album* en plantas de *Cotoneaster watereri* infectadas con *Erwinia amylovora*. El efecto elicitor que otorga el extracto de *V. album* incluso ha sido aprovechado por empresas para la formulación de productos a base de extracto de esta especie, para control de enfermedades tal y como se menciona en la patente US 10342237 B2 en la cual se describe la formulación de un producto a base de extracto de *V. album* para inducción de resistencia contra virus fitopatógenos (GreenCorp, 2019).

Nanotecnología y su Aplicación en Agricultura

A pesar de que los extractos vegetales se presentan como una alternativa para el control de plagas y enfermedades, y para contrarrestar el problema de resistencia y al medio ambiente que provocan los compuestos químicos, existe la necesidad de desarrollar formulaciones capaces de mejorar su estabilidad y efectividad en diferentes aplicaciones (De Oliveira *et al.* 2018). Una opción es el uso de la nanotecnología, la que es definida como la manipulación de materia en escala de 1 a 100 nm, e implica el desarrollo de materiales o dispositivos con ese tamaño (Agrawal y Rathore, 2014). La nanotecnología en la agricultura puede ser aplicada de varias maneras, siendo los nanocidas los más estudiados; estos incluyen, fungicidas e insecticidas naturales como extractos de plantas y aceites esenciales; aunque también se aplican tecnologías en fertilizantes, nanopartículas, envasado de alimentos, uso de residuos agrícolas, nano sensores y agricultura de precisión (Mukhopadhyay, 2014).

Nano y Microencapsulados (NPs) de extractos vegetales para protección de cultivos

El uso de polímeros para encapsulación de ingredientes activos surge como una técnica novedosa para la protección de cultivos; en esta técnica los ingredientes activos se disuelven, atrapan, y encapsulan o adhieren a los NPs (Roy *et al.* 2014); generalmente los encapsulados consisten en un núcleo o fase interna, y una pared o matriz polimérica que reviste dicho núcleo (Figura 7) (Bakry *et al.* 2016). Dicha matriz polimérica es esencial para determinar la estabilidad de los encapsulados. En la protección de cultivos, se busca el uso de polímeros biodegradables no tóxicos con el medio ambiente, capaces de degradarse por procesos químicos y descomposición microbiológica. Dentro de los materiales utilizados como polímeros naturales se encuentran polisacáridos como alginato, carragenanos, agar/agarosa, goma gellan, goma guar, goma arábica, almidón, celulosa, pectina, quitosán, incluidos sus derivados, polipéptidos como poli-L-lisina, o proteínas como gelatina o lípidos de suero como ceras u otros biopolímeros como la lignina (Vemmer y Patel 2013; Roy *et al.* 2014; Armendáriz-Barragán *et al.* 2016; Bakry *et al.* 2016).

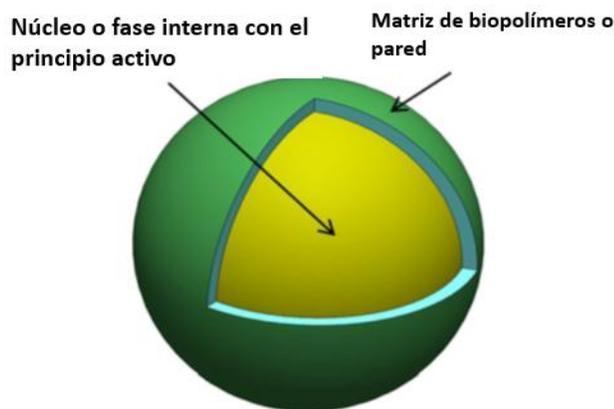


Figura 7. Representación de NPs cargados con principio activo en forma simplificada (Bakry *et al.* 2016).

Biopolímeros

Los polímeros son moléculas de gran tamaño formadas por otras de menor tamaño llamadas monómeros. Por su naturaleza los polímeros pueden ser clasificados en

sintéticos, si son obtenidos a partir de un proceso de síntesis química; o biopolímeros si provienen directamente del reino animal o vegetal. En relación a su uso en la encapsulación de compuestos se considera apto a un biopolímero si presenta características como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia mecánica, baja toxicidad, entre otras. Entre la gran diversidad de biopolímeros existentes, el quitosán y alginato, destacan por sus características, usos y potencial para la encapsulación de compuestos químicos (Neira-Carrillo *et al.*, 2013)

Quitosán

El quitosán es un compuesto formado por amino polisacáridos, después de la celulosa es el polímero más ampliamente distribuido en la naturaleza; inicialmente es obtenido en forma de quitina la cual está presente en el exoesqueleto de crustáceos, pero mediante una reacción de desacetilación se elimina el 50 % de los grupos acetilo obteniendo de esta manera el quitosán (Figura 8) (Velásquez, 2006).

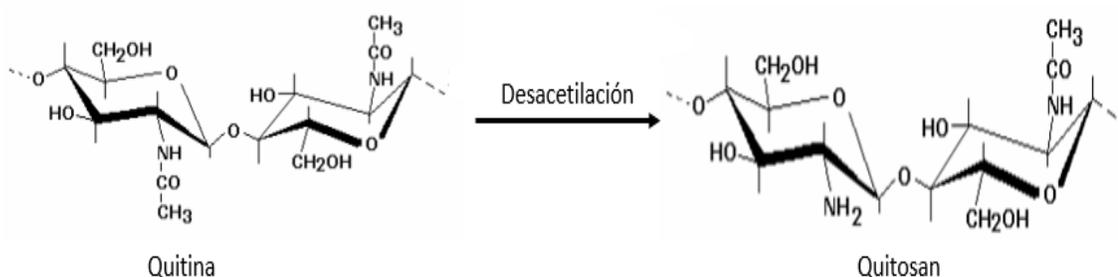


Figura 8. Desacetilación de la quitina a quitosán (Velásquez, 2006)

Debido a sus propiedades físicoquímicas y funcionales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad, se le ha podido adjudicar diversas aplicaciones en áreas como medicina, cosmética, alimentación, farmacia y agricultura (Hernández-Cocoletzi *et al.*, 2009; Macea *et al.*, 2015). En la agricultura, puede ser utilizado como recubrimiento para la protección de semillas en postcosecha, aplicándose como bactericida o fungicida para la protección de plantas, en sistemas liberadores de nutrientes y plaguicidas, además de ser empleado debido a su capacidad de inducir resistencia en plantas frente a microorganismos, a través de la activación de enzimas como catalasa y PAL (Velásquez, 2006; Nandeeshkumar *et al.* 2008).

Alginato

Es una sal copolimérica de ácido algínico que se encuentra formada por cadenas lineales de ácidos D-manurónico y ácido L-gulurónico, unidos por enlaces α y β glucosídicos (Figura 9) (Higuera *et al.*, 2002); esta sal es importante, ya que posee la capacidad de hidratarse formando hidrocoloides para obtener soluciones viscosas o geles (Neira-Carrillo *et al.*, 2013).

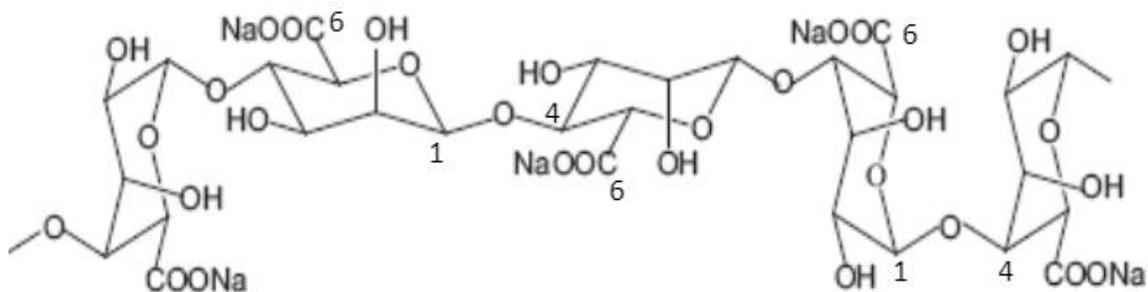


Figura 9. Estructura química del alginato de sodio (Neira-Carrillo *et al.*, 2013).

Una de las principales características de este compuesto es su naturaleza aniónica debido a la presencia en su estructura de grupos químicos cargados negativamente, lo cual le otorgan la capacidad de formar geles al entrar en contacto con cationes divalente como calcio, bario y estroncio; recientemente el alginato de sodio ha sido objeto de estudio en diversas áreas lo que ha permitido su aplicación en sistemas para liberación de fármacos, remoción de metales pesados, biomineralización de calcio, entre otras aplicaciones (Neira-Carrillo *et al.*, 2013).

En la agricultura, este compuesto ha tomado relevancia, debido a su biodegradabilidad y a que no presenta toxicidad. Además, diversas investigaciones han demostrado su capacidad para promover la germinación de semillas, elongación de raíces, aumento en el crecimiento de plántulas, aumento en el rendimiento en producción agrícola y en reducir el estrés abiótico de plantas. En relación con la IR, se ha comprobado que este compuesto, aplicado endógenamente promueve la producción de enzimas de defensa (Idrees *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2020).

Técnicas de producción de NPs y encapsulación de compuesto fitoquímicos

Se han utilizado numerosas técnicas para la producción de NPs y encapsulación de compuestos fitoquímicos; a continuación, se mencionan los procesos más comunes para encapsular, utilizando polímeros naturales los cuales permiten su aplicación en la agricultura.

Nanoprecipitación

La nanoprecipitación es una técnica sencilla, reproducible y económica adecuada para encapsular compuestos fitoquímicos hidrófilos e hidrófobos; en esta técnica, se presentan dos fases miscibles, una fase orgánica y una acuosa. La fase orgánica contiene la solución de polímero en un solvente orgánico y el compuesto fitoquímico a encapsular, y la fase acuosa contiene un solvente para polímeros; en esta técnica, se produce una desolvatación rápida del polímero cuando se añade la fase orgánica a la fase acuosa, induciendo la encapsulación directa de los compuestos (El Asbahani *et al.* 2015; Salatin *et al.* 2017).

Secado por aspersión

Es una de las técnicas más utilizadas para producir microencapsulados debido a su bajo costo, además de ser flexible y continua. Mediante esta técnica se pueden obtener partículas cuyo tamaño es de 10-40 μm aproximadamente, el proceso de secado por aspersión convierte un líquido en un polvo estable. Una mezcla líquida que contiene la solución de polímeros y los ingredientes activos se cargan en un secador por aspersión y se atomizan en una cámara de secado donde el aire caliente fluye continuamente, luego el solvente que es principalmente agua se evapora y se forma un polvo con microencapsulados (Nedovic *et al.* 2011; Jia *et al.* 2016).

Pre gelificación iónotropica

El principio de este método es la interacción electrostática entre un polímero y un poli electrolito con carga opuesta. Para formar los encapsulados, se mezcla una solución polimérica cargada con los compuestos activos, y luego se agrega gota a gota bajo agitación constante a un poli electrolito diferente, lo que provoca la reticulación formada por las partículas (Armendáriz-Barragan *et al.* 2016; Sagiri *et al.* 2016).

Coacervación

Es un método estándar para formar encapsulados; esta técnica implica la atracción electrostática entre dos polímeros y la formación de coacervados; se clasifica en coacervación simple, cuando se utiliza un solo polímero, o en coacervación compleja cuando se utilizan dos polímeros. El proceso consiste en la adición de uno o dos polielectrolitos en una solución denominada fase coacervada, en la cual los coacervados se depositan alrededor del compuesto a encapsular; la cubierta formada se puede reticular con un reticulante químico o enzimático para mejorar su robustez. Este proceso se ve afectado por el pH, la temperatura, la fuerza iónica, el peso molecular y la concentración (Vemmer & Patel 2013; Bakry *et al.* 2016; Jia *et al.* 2016).

Extrusión

Con este método se encapsula una solución de biopolímeros con el compuesto de interés. Los materiales de la matriz pasan a través de una boquilla a un entorno de gelificación a pequeña escala con una jeringa. Esta técnica puede encapsular una gran variedad de compuestos hidrófilos o hidrófobos. El tamaño de la boquilla regula el tamaño de las partículas en el pulverizador; los encapsulados se pueden incubar en una solución de reticulante para mejorar sus características (Jia *et al.* 2016; Sagiri *et al.* 2016; Shishir *et al.* 2018).

Factores limitantes en el proceso de encapsulación

Sin importar la técnica que se elija para la producción de NPs, al momento de realizar la encapsulación de compuestos bioactivos existen factores que se deben de tomar en consideración, ya que pueden modificar la estructura y eficiencia de los NPs; algunos de estos factores son:

- Tipo de polielectrolito, estos son polímeros que contienen grupos iónicos unidos por enlaces covalentes, lo cuales pueden ser naturales o sintéticos tal como el quitosán, la celulosa, el alginato, etc. Dependiendo del tipo de NPs que se desea formular es importante tener en cuenta las propiedades de los polielectrolitos, ya que estas pueden variar por factores como la naturaleza del monómero, el grupo iónico, el contraion, carga positiva o negativa dependiendo del grupo iónico conjugado y el grado de disociación (Andrews & Márquez, 2017).

- El pH, es un factor importante al momento de la producción de NPs; cuando el pH es mayor a su punto isoeléctrico las soluciones pueden adquirir carga negativa en contraparte, cuando es menor la carga puede ser positiva, en caso de que la carga sea igual a su punto isoeléctrico, la carga es neutra (Andrews & Márquez, 2017). De este modo el pH modifica la densidad de la carga lo que puede dar lugar a moléculas contraídas o expandidas en función de las fuerzas intramoleculares (Sandoval-Peraza *et al.*, 2017).
- La temperatura puede afectar las NPs, ya que, en la mayoría de las técnicas para producción de encapsulados, esta determina la eficiencia y degradación de los compuestos bioactivos así como la ruptura de las matrices poliméricas (Sandoval-Peraza *et al.*, 2017).
- La concentración del biopolímero es otro factor a considerar; se ha observado una relación entre la alta concentración del biopolímero y el aumento en la eficiencia de la encapsulación. Esto se debe a que mientras mayor sea la concentración aumentara la viscosidad además de reducir la porosidad de las NPs (Jyothi *et al.*, 2010).

Beneficios de NPs de extractos vegetales en la agricultura

Los productos naturales como los extractos vegetales han ganado interés en el manejo de enfermedades, debido a su bajo impacto ambiental. Aun así, diversas investigaciones reportan la mejora de estos productos cuando son aplicados en campo mediante NPs, estos beneficios son importantes, ya que incrementan el efecto de los compuestos sobre los microorganismos, otorgando mayor protección a la planta. En cuanto a esto, dentro de los beneficios del uso de formulaciones NPs de extractos vegetales, destaca la protección de los compuestos activos evitando la degradación de dichos compuestos por factores ambientales (Armendáriz-Barragán *et al.* 2016); otro beneficio presentado es la liberación del ingrediente activo en la planta de manera gradual y regulada, permitiendo un nivel constante del agente activo durante un periodo prolongado y con dosis más pequeñas (Vemmer y Patel 2013; Roy *et al.*, 2014); el problema de lixiviación también es común al aplicar extractos vegetales en campo, sin embargo, debido a las características físico-químicas de los NPs, se ve reducida (Santo-Pereira *et al.* 2017); un tema fundamental en la agricultura es el efecto de los plaguicidas en organismos no

objetivos, en este sentido los encapsulados han demostrado tener mayor eficiencia contra organismos para los cuales han sido diseñados y menor toxicidad contra organismos benéficos (Kah y Hofmann 2014); finalmente el uso de formulaciones con encapsulados permite la encapsulación de mezclas de compuestos así como la eliminación de olores desagradables (Armendáriz-Barragán *et al.* 2016).

Aplicación de NPs para control de fitopatógenos

Actualmente diversos trabajos enfocados en la protección vegetal se centran en el uso de extractos vegetales debido a la necesidad de cambiar el paradigma de agricultura intensiva e industrializada a una agricultura sustentable; en este contexto también se buscan alternativas para la aplicación de estos productos orgánicos, surgiendo los extractos vegetales nano y microencapsulados por mostrar ventajas y beneficios. Mohammadi *et al.* (2015) reportaron la formulación de nano encapsulados cargados con extracto de *Zataria multiflora*, el cual demostró alta actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*; de la misma manera Zhavveh *et al.* (2015) observaron buen control en el del hongo *Aspergillus flavus* con extracto nano encapsulado de *Cuminum cyminum*.

El uso de microencapsulados también ha sido documentado en diversas investigaciones para control de microorganismos fitopatógenos, tal como reportaron Wang *et al.* (2018), quienes utilizando microencapsulados de quitosán con extracto de clavo controlaron *Penicillium digitatum* en la naranja Novel. Si bien se logra tener control de los organismos fitopatógenos por acción directa de las formulaciones aplicadas; los extractos vegetales encapsulados han demostrado ser capaces de inducir resistencia contra enfermedades en plantas; mediante la activación de diversos mecanismos de acción como el extracto de hojas de café encapsulado que ha sido utilizados como inductor de resistencia en plantas, o como el extracto de ajo que ha demostrado inducir resistencia a fitopatógenos en diversos cultivos (Slusarenko *et al.* 2008; Correa *et al.* 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se dividió en 4 etapas, las cuales fueron; etapa 1, aislamiento e identificación morfológica y molecular de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y producción de extractos vegetales. Etapa 2, efectividad biológica de extractos vegetales *in vitro*, y producción y caracterización de NPs por el método de pre gelación ionotrópica. Etapa 3, pruebas de efectividad biológica bajo condiciones de invernadero. Y etapa 4, cuantificación de enzimas asociadas a mecanismos de defensa en plantas de tomate.

Etapa 1

Aislamiento e Identificación Morfológica y Molecular de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Aislamiento e identificación morfológica

Se realizaron muestreos en plantas de tomate Saladette variedad Río grande con síntomas de marchitamiento vascular, localizadas en el campo de cultivo del bajío de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se desinfectaron pequeños trozos de raíz con síntomas de la enfermedad con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante tres minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces, y se dejaron secar sobre papel secante estéril en una cámara de transferencia. Una vez secos se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), y se incubaron por tres días a 28 °C. Transcurridos los tres días se realizó la purificación de la cepa por el método de cultivo monosporico La identificación morfológica se realizó mediante la observación al microscopio de las diferentes estructuras del hongo, utilizando como referencia claves taxonómicas de Leslie & Summerell (2006).

Identificación molecular

Extracción de ADN

Se utilizó tejido micelial de siete días de crecimiento; el cual fue macerado en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido, posteriormente el material macerado se colocó en un tubo Ependorff de 1 ml y se agregó 1000 µL de buffer CTAB más 100 µL de NaCl 5M, y se agitó por vortex durante 30 s, para luego colocarse en incubación por 90 minutos a 95 °C; transcurrido el tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 1200 rpm por un minuto y se recuperaron 700 µL de sobrenadante los cuales fueron transferidos a un tubo estéril; se agregó una solución de cloro: alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló por inversión para posteriormente centrifugarse a 1200 rpm por 10 minutos; se tomaron 700 µL de la fase superior, y se transfirieron a un nuevo tubo estéril al cual se le agregó isopropanol frío y se mezcló por inversión, para ser puesto en incubación toda la noche a -20 °C. Transcurrido el tiempo de incubación la muestra se centrifugó a 1200 rpm por 15 minutos, y se decantó el sobrenadante manteniendo la pastilla formada en el fondo del tubo, la cual fue lavada agregando 1000 µL de etanol al 70 % para ser sometido a una última centrifugación de 1200 rpm por 5 minutos; finalmente se dejó secar la pastilla invirtiendo los tubos en papel secante estéril, y se resuspendió la pastilla en 100 µL de agua estéril libre de nucleasas. Se cuantificó el ADN para corroborar su integridad y la cantidad de este.

PCR con pimers específicos para *F. oxysporum f. sp. lycopersici*

Para la identificación molecular se emplearon los primers específicos FO1 (5'-ACATACCACTTGTTGCCTCG-3') y FO2 (5'-CGCCAATCAATTTGAGGAACG-3') (Nirmaladevi *et al.*, 2016). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador, la mezcla de amplificación consistió de 3 µL del ADN de la muestra, 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix (GoTaq® ADN polimerasa en 2X Buffer de reacción GoTaq® pH 8.5, 400 µg dNTPs, 3 mM MgCl₂, buffer de reacción), 2 µL de los primers y 7.5 µL de agua libre de nucleasas estéril. La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial a 94 ° C durante 4 min, seguida de 30 ciclos de 94 ° C durante 1 min, 58 ° C durante 1 min y 72 ° C durante 1.5 min, con una extensión final de 72 ° C durante 8 min. Finalmente, el producto de la PCR se cargó en un gel de agarosa al 1% que contenía bromuro de etidio, y se visualizó bajo luz UV.

Producción de extractos vegetales

Obtención de material vegetal

La colecta de *L. graveolens* se llevó a cabo en el Municipio de General Cepeda, Coahuila, México, las muestras se colocaron en bolsas plásticas y se trasladaron al Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; la especie *V. album* se colectó en el Municipio de Orizaba en el estado de Veracruz, México. Las muestras se lavaron con agua y se secaron, posteriormente se cortaron en piezas de un 1 cm, el siguiente paso consistió en colocarlas en estufa de secado a 60 °C hasta que presentaron peso constante. En ambas especies vegetales, fueron utilizados tallos y hojas los cuales fueron molidos y tamizados con poro de 0.2 mm para homogeneizar las partículas, una vez listas se almacenaron en frascos oscuros a temperatura ambiente (Castillo *et al.*, 2010).

Preparación de los extractos vegetales

Los extractos de plantas se prepararon siguiendo la metodología propuesta por Shami *et al.* (2013), utilizando etanol como solvente. El primero paso fue agregar 14 g de la planta ya pulverizada en 200 mL del solvente, y colocándose en agitación durante 72 h a 50 °C (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2015). Posteriormente, el extracto obtenido se filtró con papel filtro Wathman No. 1 para separar el polvo del extracto; el extracto se rotoevaporó a 150 rpm a 60 °C; se liofilizó, para finalmente almacenarse a -20 °C.

Identificación cualitativa de fitoquímicos presentes en extractos vegetales

La identificación de fitoquímicos se realizó utilizando técnicas cualitativas las cuales incluyeron la detección de: carbohidratos (prueba de Molish); azúcares reductores (pruebas de Fehling y Benedict); alcaloides (pruebas de Dragendorff y Sonneschain); flavonoides (prueba de Shinoda y prueba de NaOH); glucósidos cianogénicos (prueba de Grignard); saponinas (prueba de la espuma); esteroides y terpenos (prueba de Liberman-Burchard); taninos {FeCl₃, K₃ [Fe(CN)₆] y pruebas de gelatina; quinonas (prueba de Börntrager); purinas (pruebas de HCl); polisacáridos (prueba de Lugol); almidón soluble (pruebas de KOH y H₂SO₄); así como carotenoides (pruebas H₂SO₄ y FeCl₃) (Sahgal *et al.* 2009; Usman *et al.* 2009).

Detección de compuestos fitoquímicos presentes en extractos vegetales por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa

La identificación cuantitativa se realizó en un sistema de HPLC con muestreador automático, una bomba ternaria, un detector PDA y un espectrómetro de masas con trampa de iones de cromatógrafo de líquidos equipado con una fuente de iones por electro pulverización. Se inyectaron 5 μl de la muestra a 200 mg/L en una columna Denali C18, la temperatura del horno se mantuvo en 30 °C. Los eluyentes utilizados fueron ácido fórmico (0.2%, disolvente A y acetronitilo (disolvente B). El gradiente utilizado fue el siguiente: inicial, 3% B; 0-5 min, 9 % B lineal; 5-15 min, 16 % B lineal; 15-45 min, 50 % B lineal. Posteriormente la columna se lavó y se reacondicionó; el caudal se mantuvo a 0.2 ml/min y la elución se controló a 245, 280, 320 y 550 nm. Se inyectó todo el efluente (0.2 ml/min) en la fuente del espectrofotómetro de masas, sin dividirlo. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador, los parámetros de la fuente de iones fueron: voltaje de pulverización 5,0 kV, voltaje capilar 90 V y temperatura de 350 °C. Los datos se procesaron utilizando el software MS Workstation. (Ascacio-Valdés *et al.*, 2016).

Detección de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante (DPPH)

La detección de fenoles totales se realizó con ambos extractos; *V. album* y *L. graveolens*, estos se resuspendieron en etanol a concentración de 1000 mg/L; la metodología utilizada fue la propuesta por Zenil-Lugo *et al.* (2014) con ligeras modificaciones. Se tomaron 20 μL del extracto, blanco y curva de calibración (98, 195, 391, 781, 1563, 3125, mg/L, $r^2= 0.998$), y se mezclaron con 120 μL de Na_2CO_3 , 30 μL de Folin-Ciocalteu y 400 μL de agua. La reacción se llevó a cabo a 50 °C por 5 min y los valores se leyeron a 700 nm; el estándar utilizado fue ácido gálico.

El contenido de flavonoides totales se llevó a cabo por el método de cloruro de aluminio descrito por Chang *et al.* (2002). La absorbancia se hizo a 510 nm, el estándar utilizado fue quercitina. Se preparó una curva de calibración utilizando la solución de quercitina (195, 391, 781, 1563, 3125, 6250, 12500, 25000, 50000, 100000, mg/L, $r^2= 0.998$)

Finalmente, la actividad antioxidante se llevó a cabo por el método descrito por Martins *et al.* (2013), para esto se preparó una solución de 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH);

se tomaron 2950 μL de esta solución y se agregaron a 50 μL del extracto. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó por 30 min a temperatura de 37 °C, la lectura de absorbancia se hizo a 517 nm. La solución control consistió de 100 μL de agua destilada. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición, siguiendo la siguiente fórmula

$$\% \text{ de inhibición DPPH} = (1 - A_s/A_c) * 100$$

Donde, A_c y A_s son la absorbancia de control y la absorbancia de la solución, respectivamente.

Etapa 2

Efectividad Biológica de Extractos de *L. graveolens* y *V. album* *in vitro*

Actividad antifúngica de *L. graveolens* y *V. album* por el método de medio envenenado

Se determinó la actividad antifúngica por el método de medio envenenado propuesto por Jasso de Rodríguez *et al.* (2011); se utilizaron concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L y 600 mg/L, con ocho repeticiones por tratamiento. Primero se determinó la concentración y el volumen para cada extracto y se añadió a un matraz con la cantidad requerida de PDA estéril. Posteriormente se colocaron discos de 0.4 cm de diámetro con micelio activo del hongo de siete días de crecimiento; finalmente se incubaron a 28 ± 2 °C hasta que el testigo sin tratamiento lleno por completo con micelio la caja Petri. Se determinó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = (DC - DT/DC) * 100$$

Donde DC es el diámetro del tratamiento control, y DT es el diámetro de las diferentes concentraciones.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis Probit para determinar la concentración inhibitoria al 50 % de cada extracto; posteriormente con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza con las concentraciones inhibitorias utilizando pruebas de Tukey ($p < 0.05$).

Producción y Caracterización de NPs por el Método de Pregelación Ionotrópica

La producción de NPs se realizó por el método de pregelación ionotrópica propuesto por Sarmiento (2006). Se agregaron 3.75 mL de una solución de CaCl_2 en 59 mL de una solución de alginato de sodio (0.037 %, pH 4.9) utilizando una bomba peristáltica bajo agitación constante y vigorosa; posteriormente se agregaron 12.5 mL de una solución de quitosán (0.07 %, pH 4.6) a la solución de CaCl_2 y alginato de sodio, manteniendo la agitación constante y vigorosa por 90 min. Se produjeron dos tipos de encapsulados; los cargados a los cuales se añadió 175 μL de cada extracto vegetal a concentración de 117 mg/L, en la solución de quitosán; y los no cargados, en los cuales estuvieron ausentes los extractos vegetales.

Tamaño y dispersión dinámica de luz

El tamaño de las partículas se determinó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz. Las muestras se analizaron por triplicado a 25 °C, con luz dispersa detectada en un ángulo de 90 °.

Potencial Zeta

El potencial Zeta (mV) se determinó por triplicado con las muestras a 25 °C, utilizando el equipo ZETA-Check, Colloid Metrix).

Estabilidad química de polímero (pH)

El pH se determinó para evaluar la degradación de los componentes en la formulación, esta se determinó utilizando un potenciómetro Ion Meter450, Corning. Las muestras se evaluaron por triplicado, a 25 °C.

Peso

Para determinar el peso total de los NPs, estos se centrifugaron al finalizar el proceso de encapsulación, y posteriormente se sometieron a liofilización, para finalmente ser pesadas en una balanza analítica.

Etapa 3

Pruebas de Efectividad Biológica Bajo Condiciones de Invernadero

Pruebas de patogenicidad en plántulas de tomate

Previo al establecimiento del experimento en invernadero, se realizaron pruebas de patogenicidad con la cepa obtenida del aislamiento para observar su capacidad infectiva. Se inocularon plántulas de tomate Saladette variedad Río Grande con 10 cm de altura, para esto se extrajeron del sustrato donde germinaron y se lavó la tierra, posteriormente se les realizaron cortes en las raíces y se colocaron en una suspensión de esporas de la cepa a concentración de 1×10^6 durante 3 min, transcurrido el tiempo se sacaron y se volvieron a sembrar en el sustrato. Se colocaron en una cámara bioclimática con temperatura promedio de 28 ± 2 °C, humedad relativa de 90 %, y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas; durante 7 días.

Establecimiento del experimento en invernadero

El experimento se llevó a cabo en un invernadero ubicado en el campo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México; durante el ciclo otoño-invierno del 2020. La temperatura y humedad promedio se registró mediante un termómetro digital, con este se pudo determinar que la temperatura promedio durante el ensayo fue de 18 °C

Inoculación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Se utilizaron plantas de tomate Saladette variedad Río Grande, las cuales se trasplantaron en macetas de 4 kg; el sustrato utilizado consistió de una mezcla de tierra y peat moss previamente esterilizado en una relación 50/50; la cepa del hongo se cultivó en medio de cultivo PDA, y se incubó durante siete días a 28 C°, posteriormente se realizó un barrido de conidios, y se ajustó la concentración para obtener una solución a 1×10^6 conidios/mL. La inoculación de las plantas se realizó mediante un corte en la parte apical de las raíces, sumergiéndolas en la solución de conidios durante 3 min; transcurrido el tiempo se trasplantaron a las macetas.

Aplicación de los tratamientos

Los tratamientos utilizados fueron T1: Testigo Inoculado, T2: Químico (Benomil 1 g /L), T3: NPs de Extractos Vegetales (1 g/L), T4: Mezcla de Extractos sin Encapsular

(2000 mg/L- *L. graveolens* y 3000 mg/L - *V. album*) y T5: Testigo Absoluto. Los tratamientos se aplicaron por aspersión, y se realizaron tres aplicaciones; la primera fue durante el trasplante antes de colocar las plántulas en las macetas directamente en el hoyo donde se colocaron las plántulas, asperjando tres veces; las otras dos aplicaciones se realizaron a los 15 y 40 días después de la primera aplicación directamente en la base del tallo.

Manejo agronómico

El manejo agronómico se realizó mediante poda de tallos axilares con la finalidad de que la planta mantuviera un solo tallo principal; en tutorado cuando las plantas alcanzaron 20 cm de altura para permitir a las plantas un crecimiento vertical y evitar su caída por el peso del follaje y de los frutos; riego y fertilización cada dos días mediante fertirrigación utilizando solución nutritiva Steiner, y manejo de plagas y enfermedades mediante la aplicación de los productos orgánicos Entomax 5x2® y Best ultra F®.

Variables evaluadas

Incidencia y severidad

Se evaluó la incidencia de la enfermedad utilizando la fórmula:

$$\text{Incidencia} = (\text{No. de plantas enfermas}) / (\text{Total de plantas}) (100)$$

En el caso de severidad del follaje se utilizó la escala propuesta por Marlatt *et al.* (1996), la cual mide en un rango del 1 al 5, donde: 1= sin síntomas; 2= clorosis ligera; 3= clorosis moderada y marchitamiento; 4= clorosis severa y marchitamiento y 5= muerte de la planta.

Altura de planta (cm) y longitud de raíz (cm)

La altura de planta se midió cada 15 días utilizando una cinta métrica, se tomó en cuenta desde la superficie del sustrato hasta el punto de abscisión de la última hoja emergida; la longitud de raíz se midió al final del ensayo, lavando las raíces con agua corriente y midiendo con una cinta métrica desde el cuello del tallo hasta el extremo apical de las raíces.

Diámetro de tallo (mm) y clorofila en hojas (Unidades SPAD)

El diámetro se determinó cada 15 días utilizando un vernier digital (Bonachan, Caliper), se tomó en cuenta el tallo a un centímetro de altura del sustrato; la clorofila en hojas se midió utilizando un medidor de clorofila SPAD 502 Minolta, seleccionando tres hojas de la parte inferior y calculando el promedio.

Peso seco de biomasa aérea (g) y peso seco de raíz (g)

El peso seco de biomasa aérea (hojas y tallo) y de raíz se midió al final del ensayo, para esto se separó la parte aérea de las raíces, y se cortaron en trozos más pequeños, enseguida se colocaron en bolsas de papel y se metieron en una estufa de secado a 50 °C durante tres días; posteriormente las muestras fueron pesadas en una báscula digital.

Número de flores, frutos cuajados y peso de frutos

Se contaron los botones florales abiertos; frutos cuajados y el peso promedio de los frutos el cual se pesó con una báscula digital.

Diámetro ecuatorial de frutos y diámetro polar de frutos (mm)

El diámetro ecuatorial y polar de los frutos se determinó utilizando un vernier digital.

Análisis estadístico

Se estableció un diseño completamente al azar con siete tratamientos y seis repeticiones. Todos los datos de las variables evaluadas se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa computacional Statistical Analysis System, versión 9.0.

Etapa 4**Cuantificación de Enzimas Asociadas a Mecanismos de Defensa en Plantas de Tomate****Aplicación de los tratamientos**

El material vegetal utilizado consistió de plantas de tomate variedad Río Grande de 30 días de desarrollo, el sustrato fue una mezcla de tierra y peat moss, ambos previamente esterilizados en una relación 50/50. La aplicación de los tratamientos se realizó por aspersión foliar, hasta que las hojas quedaron mojadas a punto de rocío. Los tratamientos utilizados fueron: T1: NPs de Extractos Vegetales, T2: NPs sin cargar, T3: Mezcla de

Extractos sin Encapsular (2000 mg/L- *L. graveolens* y 3000 mg/L - *V. album*), T4: Testigo Absoluto. Los muestreos se realizaron a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h después de la aspersión con los diferentes tratamientos.

Extracción de enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), peroxidasa (POD) y superóxido dismutasa (SOD)

Se tomó 1 g del tejido vegetal, y se maceró en mortero de porcelana con nitrógeno líquido, posteriormente se procedió a la extracción con una solución amortiguadora de tetra borato de sodio 0.1 mol/L pH 8.8 en el caso de PAL (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2006), buffer de fosfatos 0.05 M pH 6 para POD (Yedidia *et al.*, 1999) y buffer de fosfatos 0.05 M pH 8.8 para SOD (Romero-Tejeda *et al.*, 2015). Finalmente, las muestras para las tres enzimas se centrifugaron a 10000 rpm a 4 °C, y se tomó el sobrenadante el cual fue almacenado a -20 °C.

Determinación de la actividad PAL

La actividad PAL se determinó utilizando 900 µL de L- Fenilalanina mg/L, se adicionó 100 µL del extracto enzimático y se incubó a 40 °C por 30 min; la reacción enzimática se detuvo con 250 µL de HCL 5 N; posteriormente las muestras se colocaron en hielo y se agregaron 5 mL de agua destilada estéril; los valores de absorbancia se determinaron a 290 nm (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2006).

Determinación de la actividad POD

Para la actividad POD se utilizó una mezcla de reacción con 20 µL del extracto enzimático, 50 µL de rojo fenol al 0.2 % y citrato de sodio 50 mM pH 4.2; posteriormente se dio inicio a la reacción con 10 µL de H₂O₂ y se detuvo transcurridos 3 min con 40 µL de NaOH 2 N; la lectura de absorbancia se realizó a 610 nm (Yedidia *et al.*, 1999).

Determinación de la actividad SOD

Para determinar la actividad SOD se preparó una mezcla de reacción, la cual contenía 27 mL de buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.8, 0.1 mM de EDTA pH 7.8, 1.5 mL de L-metionina (30 mg/mL), 1 mL de nitro blue tetrazolium (NBT) (1.41 mg/mL) y .075 mL de Triton X-100 al 0.1 %, posteriormente a esta mezcla de reacción se agregaron 400 µL del extracto enzimático y 30 µL de riboflavina (4.4 mg / mL); la mezcla se agitó y se

colocó en iluminación con una lámpara fluorescente de 20 watts por 7 min, y se realizó la lectura a absorbancia de 560 nm (Romero-Tejeda *et al.*, 2015).

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento, la comparación de medias se realizó a través de análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa computacional Statistical Analysis System, versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1

Aislamiento e Identificación Morfológica y Molecular de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Identificación morfológica de *F. oxysporum*

Las cepas de hongos obtenidas por aislamientos monosporicos fueron caracterizadas morfológicamente; macroscópicamente presentaron micelio abundante, colonias de color blanco que se tornaron a violeta después de siete días en medio de cultivo PDA. Las características microscópicas observadas fueron; microconidas abundantes ovaladas y sin septos; macroconidias con medidas promedio de 38.5 μm de largo y 3.72 μm de ancho, curvadas, con la parte apical cónica en forma de gancho, con tres septos; y

clamidiosporas intercaladas en las hifas con pared celular rugosa (Figura 10). Dichas descripciones corresponden a la especie *F. oxysporum* (Leslie y Summerell, 2006).

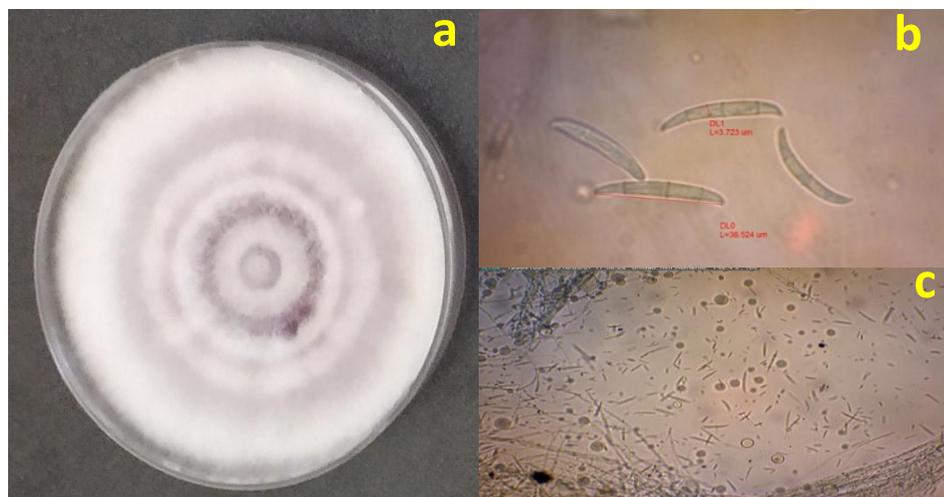


Figura 10. Desarrollo micelial (a), macroconidas (b), microconidas y clamidioesporas (c) de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a los 7 días de crecimiento.

Identificación molecular de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

La PCR obtenida con los primers específicos FO1/FO2 confirmó la especie *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obteniendo productos amplificados del ADN de 340 pb (Nirmaladevi *et al.*, 2016).

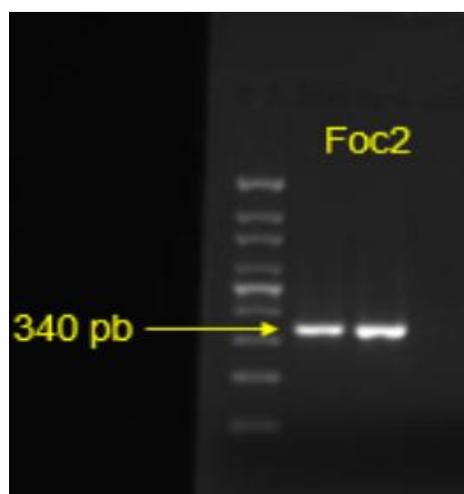


Figura 11. Detección de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con primers específicos FO1 y FO2 por PCR.

Identificación cualitativa de fitoquímicos presentes en extractos vegetales

De los extractos vegetales etanólicos, correspondientes a las especies *L. graveolens* y *V. album*; se logró identificar varios compuestos fitoquímicos pertenecientes a los polifenoles (Cuadro 1). En el caso de *L. graveolens* se detectaron la presencia de flavonoides específicamente flavonas y flavononas, en este sentido se menciona que *L. graveolens* posee la capacidad de producir flavonas y flavononas, siendo compuestos con alta actividad antifúngica y antioxidante (Güereca *et al.*, 2007); otros compuestos fitoquímicos de interés por su alta actividad antifúngica identificados son las saponinas (Apaza *et al.*, 2016). Estos compuestos han sido reportados en plantas de la familia Verbenaceae específicamente del género *Lippia* (Farias *et al.*, 2010). También se identificó la presencia de taninos, dichos compuestos igualmente otorgan actividad antimicrobiana al extracto de *L. graveolens* (Clarenc *et al.*, 2020). De las propiedades más interesantes de los taninos se encuentra su capacidad de combinarse con diversas sustancias para formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos esteroides, alcaloides y saponinas (Hernández-Castillo *et al.*, 2011). Otros compuestos identificados fueron las quinonas también reportadas por Maroyi (2019) quien identifico dichos compuestos en extractos de plantas del género *Lippia*.

En la especie *V. album* se lograron identificar compuestos como los alcaloides, flavonoides específicamente flavonas, azúcares reductores, saponinas triterpenoides, taninos derivados de ácido gálico y fenólicos, así como purinas (Cuadro 1). La especie *V. album* contiene alcaloides, los cuales tienen la capacidad de degradar células cancerígenas (Amer *et al.*, 2012); los flavonoides se han identificado de la parte aérea de la planta, dichos compuestos poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibiótica, entre otras (Jia-Kun *et al.*, 2019); las saponinas y taninos también se mencionan como parte de los compuestos fitoquímicos que se producen dentro del metabolismo de *V. album* (Ibegbulem y Chikezie, 2013). Una de las características que se ha explorado muy poco en esta especie vegetal es la capacidad de inducir resistencia en plantas hacia microorganismos fitopatógenos. Diversos estudios han demostrado que algunos compuestos polifenólicos presentan un rol importante en la producción de enzimas implicadas en el mecanismo de defensa de la planta como la peroxidasa y fenilalanina amonio liasa (Chandrashekhara *et al.*, 2010; Regnault-Roger, 2012).

Cuadro 2. Compuestos fitoquímicos identificados en extractos etanólicos de *L. graveolens* y *V. album* por métodos cualitativos.

Extracto	A		C				F				GC	AZ	S		T			Q			Cu	P	Ca		
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	S ₁	S ₂	T ₁	T ₂	T ₃	Q ₁	Q ₂	Q ₃													
<i>L. graveolens</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-					
<i>V. album</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-					

+ = Fitoquímico presente; - = Fitoquímico no presente; A = Alcaloides; C = Carbohidratos; F = Flavonoides; GC = Glucósidos cianogénicos; AZ = Azúcares reductores; S = Saponinas; T = Taninos; Q = Quinonas; Cu = Cumarinas; P = Purinas; Ca = Carotenoides; F₁ = Antocianinas; F₂ = Flavonas; F₃ = Flavononas; F₄ = Chalconas; S₁ = Triterpenoides; S₂ = Esteroidal; T₁ = Derivados de ácido gálico; T₂ = Derivados de catecoles; T₃ = Fenoles; Q₁ = Antroquinonas; Q₂ = Benzoquinonas; Q₃ = Antranas

Detección de compuestos fitoquímicos presentes en extractos vegetales por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa permitió la detección de varios compuestos en ambos extractos etanólicos. *L. graveolens* presentó compuestos de familias como los ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, flavonoides, catequinas y polifenoles; tales como ácido caféico 4-O-glucósido, resveratrol 3-O-glucósido, resveratrol 5-O-glucósido, kaempferol 3-O-glucosil-ramnosil-glucósido, sinensetina, (+) - Catequina 3-O-glucosa, arbutina, pinocembrín. Por otro lado, en el extracto de *V. album* se detectaron compuestos de las familias como ácidos hidroxicinámicos, catequinas, flavonoides y ácidos metoxicinámicos, dentro de los presentes compuestos se encuentran el ácido caféico 4-O-glucósido, (+) - catequina 3-O-glucosa, luteolina 7-O- (2-apiosil-6-malonil) -glucósido, ácido 5-feruloilquínico y ácido p-cumaroil tartárico (Cuadro 3).

Las plantas son capaces de producir gran cantidad de compuestos fitoquímicos como parte de su metabolismo, estos se producen a partir de vías metabólicas que se activan como respuesta a factores bióticos y abióticos. El ácido caféico y el resveratrol son polifenoles producidos en la pared celular de varios vegetales, ambos tienen actividad antioxidante, antiviral, antifúngica y antitumoral, y también están implicados en la defensa contra plagas y enfermedades debido a que reportan efecto inhibitor en el crecimiento de insectos, hongos, y bacterias (Espíndola *et al.*, 2019; Risuleo y La Mesa, 2019; Vestergaard y Ingmer, 2019); en este sentido, Trejo-Márquez *et al.* (2015)

reportaron la presencia de ambos compuestos en extracto etanólico de *L. graveolens*, además se ha reportado la presencia de ácido caféico en extracto de *Lippia citriodora* (Quirantes-Piné *et al.*, 2009;); por otro lado estudios cromatográficos por HPLC han detectado la presencia de ácido caféico en extractos metanólicos de *V. album* (Khatun *et al.*, 2016). La actividad antioxidante que permite la interacción de compuestos fitoquímicos con radicales libres, es uno de los atributos más significativos de los flavonoides porque se relaciona con la actividad antifúngica por la interacción de estos con especies de oxígeno reactivas de hongos (Warris y Ballou, 2019), el kaempferol y las sinensetinas son flavonoides reportados con actividad antifúngica posiblemente debido a su actividad antioxidante, además de lo mencionado anteriormente las catequinas también son compuestos con actividad antifúngica (Sitheeque *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2019; Husain *et al.*, 2020); el kaempferol y las catequinas se han identificado a través de estudios como compuestos comunes presentes en extractos de plantas producidos con varios disolventes de especies de la familia Verbenaceae que incluye el género *Lippia* (Güereca *et al.*, 2007; Funari *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2013; Cid-Pérez *et al.*, 2016), mientras que en extractos etanólicos de *V. album* se han podido detectar catequinas (Kang *et al.*, 2016; Trifunski *et al.*, 2017). Dentro de los metabolitos secundarios de las plantas, los polifenoles juegan un papel importante en la actividad antimicrobiana y antioxidante presente en los extractos vegetales, esta capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos ha sido documentada en varios estudios, permitiendo obtener compuestos naturales como alternativas para el control de enfermedades en plantas como la arbutina, pinocembrina, luteolina y ácido ferúlico (López-Lázaro, 2009; Rasul *et al.*, 2013; Jurica *et al.*, 2017; Kim y Park, 2019); los compuestos antes mencionados han sido reportados por diversos autores como compuestos presentes en extractos vegetales, en este sentido Arias *et al.* (2020) detectaron pinocembrina en aceite esencial de *Lippia organoides* y *L. graveolens*, mientras que en extractos acuosos de *V. album* se ha detectado la presencia de luteolina y ácido feruloilquínico (Trifunski *et al.*, 2017; Stefanucci *et al.*, 2020).

Cuadro 3. Compuestos fitoquímicos detectados en el extracto de *L. Graveolens* y *V. album* por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

Extracto	Compuesto	Tiempo de retención (Min)	Masa	Familia
----------	-----------	------------------------------	------	---------

<i>L. graveolens</i>	Ácido caféico 4-O-glucósido	4.094	340.9	Ácidos hidroxicinámicos
	Resveratrol 3-O-glucósido	13.881	391	Estilbenos
	Resveratrol 5-O-glucósido	18.291	389	Estilbenos
	Kaempferol 3-O-glucosil-ramonosil- glucósido	25.897	755	Flavonoles
	Sinensetina	26.243	371.1	Metoxiflavones
	(+)-Catequina 3-O-Glucosa	26.699	451.3	Catequinas
	Arbutina	41.333	270.9	Otros polifenoles
	Pinocembrina	50.559	254.9	Flavonones
<i>V. album</i>	Ácido caféico 4-O-glucósido	4.152	341	Ácidos hidroxicinámicos
	(+)-Catequina 3-O-glucosa	26.628	451.3	Catequinas
	Luteolina 7-O-glucósido	3.823	665	Flavones
	5- ácido ferúlico	55.776	367.2	Ácidos metoxicinámicos
	p-Coumaroil ácido tartarico	58.2	295.2	Ácidos hidroxicinámicos

Detección de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante (DPPH)

El extracto de *L. graveolens* presentó la mayor cantidad de fenoles totales con 254 mg/g y de 1210 mg/g de flavonoides totales, mientras que el extracto de *V. album* se encontró 53 mg/g de fenoles totales y 283 mg/g de flavonoides totales, observándose diferencias estadísticas para este factor; en tanto que para la actividad antioxidante, no se observaron diferencias significativas, se obtuvo mayor actividad con el extracto de *L. graveolens* con 96 % en relación al extracto de *V. album* que presento 94 % (Cuadro 4).

La cantidad de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante obtenida en esta investigación es mayor a la reportada en la literatura. En cuanto a la cantidad de fenoles totales en los extractos de *L. graveolens* se menciona que solo alcanza 4.54 mg/g, y una actividad antioxidante de 8.79 %; y en flavonoides totales una cantidad máxima de 200 mg/g (Martínez-Rocha *et al.*, 2008; Cortés-Chitala *et al.* 2021). También se presentan cantidades menores de fenoles totales y flavonoides totales en el extracto de *V. album* con 10.43 mg/g y 0.428 mg/g, respectivamente (Pietrzak *et al.*, 2017); y una actividad antioxidante de 95.36 % (ÖnayUçar *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos, tanto los fenoles como los flavonoides son sintetizados por todos los organismos vegetales y muestran alta actividad biológica al ser aplicados en diferentes organismos; en relación a las plantas se menciona la capacidad que tienen estos en activar la

resistencia hacia enfermedades, aumentando la producción de compuestos que actúan en los mecanismos de defensa contra el ataque de microorganismos fitopatógenos, debido a su actividad antioxidante, quelante de metal y anti radical (Regnault-Roger, 2012; Zenil-Lugo *et al.*, 2014; Franco-Bañuelos *et al.*, 2017).

Cuadro 4. Fenoles y flavonoides totales, y actividad antioxidante (DPPH) de extractos etanólicos de *L. graveolens* y *V. album*

Extracto	Fenoles totales * (mg/g)	Flavonoides totales (mg/g)	DPPH (%)
<i>V. album</i>	53±17b	283±85b	94±0.24a
<i>L. graveolens</i>	254±3a	1210±349a	96±0.39a

Datos son promedio de tres repeticiones, * = Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P <0.05).

Etapa 2

Efectividad Biológica de Extractos de *L. graveolens* y *V. album* *in vitro*

Actividad antifúngica de *L. graveolens* y *V. album* por el método de medio envenenado

Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica de los extractos de *L. graveolens* y *V. album* por el método de medio envenenado muestran que la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* comenzó a partir de 50 mg/L con 30.59 % y 17.65 % para *L. graveolens* y *V. album*, respectivamente (Figura 12); posteriormente se observó un aumento significativo en la inhibición del crecimiento con ambos extractos alcanzando 79.71 % a 100 mg/L para finalmente obtener el 100 % de inhibición a la concentración de 200 mg/L tanto con el extracto de *L. graveolens* como el de *V. album*.

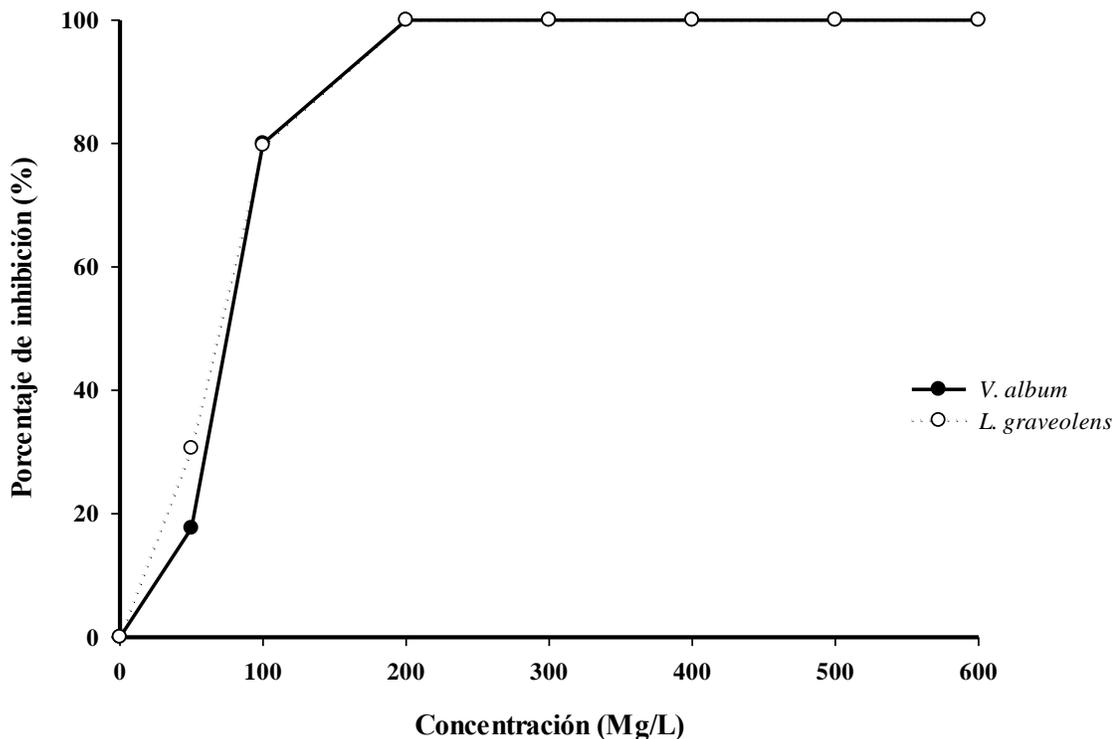


Figura 12. Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos de *L. graveolens* y *V. album* sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por el método de medio envenenado.

El efecto antifúngico de *L. graveolens* ha sido reportado por Jasso de Rodríguez *et al.* (2011) con otras especies de hongos obteniendo efecto inhibitorio del 100 % sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Colletotrichum gloeosporoides* y *Rhizopus stolonifer* a una concentración de 500 mg/L, también se ha observado este mismo efecto sobre *R. solani* a concentración de 3000 mg/L con 60 % de inhibición (Hernández-Castillo *et al.*, 2011). En el caso del extracto etanólico de *V. album* se reporta que presenta actividad antifúngica contra *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* (Ertürk *et al.*, 2004; Ertürk 2010; Hussain *et al.*, 2011).

La actividad antimicrobiana de los extractos de *L. graveolens* y *V. album* puede ser atribuida a la presencia de compuestos poli fenólicos (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2011); como los taninos, los cuales pueden inhibir el transporte de electrones a través de la membrana y afectar iones importantes para la vida microbiana como el hierro y el cobre

(Mendez *et al.*, 2012); los estilbenos como el resveratrol que actúan sobre la hidrólisis ATP, inhiben la fosforilación oxidativa, inducen la fragmentación del ADN, y suprimen la expresión de la proteína *ftsZ*, que es una proteína clave en la división celular (Vestergaard y Ingmer, 2019); los flavonoides que son compuestos reconocidos por su actividad antioxidante y que pueden actuar inhibiendo la formación de hifas debido a que afectan especies reactivas de oxígeno de las mitocondrias del patógeno (Candiracci *et al.* 2012; Warris y Ballou 2019). Además, flavonoides como el kaempferol forman un complejo con la pared celular e inhiben el crecimiento de hongos (Tatsimo *et al.*, 2012), mientras que la luteolina está involucrada con la bomba de eflujo, la cual es un transporte en células fúngicas involucradas en la resistencia contra sustancias tóxicas, ya que desintoxica el cuerpo fúngico, por lo tanto, una inhibición de esta bomba induce la muerte celular en los hongos (Aboody *et al.*, 2020). La respiración es un proceso importante en el metabolismo de varios microbios a través del cual obtienen energía para la germinación y el crecimiento, siendo las mitocondrias el orgánulo fundamental en la respiración celular para la producción de energía, en este sentido la pinocembrina tiene un efecto sobre la respiración de las mitocondrias provocando la disminución de la producción de ATP, lo que induce una peroxidación lipídica la cual provoca cambios en la membrana y su disrupción (Peng *et al.*, 2012). El ácido caféico y el ácido feruloilquínico son ácidos hidroxicinámicos presentes en la pared celular de los vegetales de los cuales estudios han demostrado su capacidad para inhibir la expresión de genes involucrados en la producción de ergosterol, que es una proteína fundamental en la vida de los hongos, ya que participa en la reorganización del citoesqueleto, crecimiento, transducción de señales, y en el proceso infeccioso (Cantelli *et al.*, 2012). Finalmente, las catequinas y saponinas son compuestos con actividad antifúngica debido a su capacidad de dañar la membrana celular, provocando lisis de las hifas y formando complejo con esteroides, permitiendo una mayor permeabilidad de la membrana fúngica, provocando la salida del contenido celular (Hirasawa y Takada, 2004; Lanzotti *et al.*, 2012).

Concentración inhibitoria al 50 % (CI₅₀) de los extractos de *L. graveolens* y *V. album*

Se observaron diferencias estadísticas entre las CI₅₀ de los extractos (Cuadro 5), siendo el extracto de *L. graveolens* el que presentó la mejor CI₅₀ con 64.68 mg/L, seguido del extracto de *V. album* con 71.61 mg/L. La CI₅₀ indica cuanto se necesita de un compuesto químico para lograr inhibir un proceso biológico a la mitad, permitiendo obtener una medida de la potencia de una sustancia usada en investigación, esta medida es esencial porque una CI₅₀ baja indica que es un extracto con potencial para el control de microorganismos fitopatógenos (Aykul y Martínez-Hackert, 2016). En estudios con otras especies de hongos han reportado CI₅₀ superiores a la obtenida en este trabajo con el extracto de *L. graveolens* alcanzando concentración de 1930 mg/L sobre *R. solani* (Hernández-Castillo *et al.*, 2011); en el caso de *V. album* no existen reportes para control de microorganismos que causan enfermedades en plantas, ya que este extracto se ha utilizado principalmente en el tratamiento de enfermedades de humanos, y se ha observado CI₅₀ bajas para destruir células cancerígenas (Zhao *et al.*, 2012).

Las CI₅₀ obtenidas en este trabajo sobre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* con ambos extractos de plantas puede considerarse bajo, debido a la presencia de compuestos fitoquímicos de familias de los taninos, estilbenos, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, catequinas, ácidos metoxicinámicos, saponinas y alcaloides; estos compuestos polifenólicos presentes inhiben el desarrollo de microorganismos fitopatógenos, actuando sus grupos hidroxilo fenólicos sobre los extremos hidrófilos de la bicapa lipídica para aglomerar los lípidos de la membrana y provocar su ruptura, permitiendo la fuga de material citoplasmático (Yang y Zhang, 2019).

Cuadro 5. Concentración inhibitoria al 50 % y al 90 % (CI₅₀ y CI₉₀) de extractos etanólicos de *L. graveolens* y *V. album* sobre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Extracto	CI ₅₀ *	CI ₉₀
<i>L. graveolens</i>	64.68 ± 0.08a	117.17±0.08c
<i>V. album</i>	71.61 ± 0.39b	116.19±0.39d

Datos son promedio de tres repeticiones, * = Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P <0.05), ME=Medio envenenado.

Producción y Caracterización de NPs por el Método de PreGelación Ionotrópica

Tamaño y dispersión dinámica de luz

El tamaño de los NPs difirió cuando se cargaron con extractos vegetales en comparación a las no cargadas. El tamaño obtenido con los NPs con extractos vegetales fue de 195 nm y concentración de 4.85×10^{07} partículas/mL, y de 150 nm y concentración de 6.65×10^{07} partículas/mL para los NPs sin extractos vegetales (Figura 13). La variación en el tamaño sugiere que la adición de los compuestos fitoquímicos aumento el tamaño de los NPs en comparación a los NPs sin cargar. La concentración de quitosán, así como de alginato es un factor que puede determinar el tamaño de los NPs; esto puede ser debido a la interacción entre los biopolímeros y los compuestos fitoquímicos presentes en los extractos vegetales (Pisoschi *et al.*, 2018). En este sentido diversos autores describen tamaños diferentes en NPs con extractos vegetales, debido al uso de distintas concentraciones de biopolímeros; Mohammadi *et al.* (2015) produjeron NPs de extracto de *Z. multiflora* con tamaño de partícula de 125 – 175 nm; por su parte Donsi *et al.* (2011) mencionan que NPs de terpenos y D-limonene presentaron tamaño promedio de 75 – 175 nm, y no alcanzaron tamaños grandes como los reportados por Santo-Pereira *et al.* (2017) quienes obtuvieron partículas elaboradas a base de alginato y quitosán con tamaño de 450 nm.

Potencial Zeta

La caracterización de los NPs demostró que en promedio el potencial Zeta fue de -26 mV para los NPs con extractos vegetales y de -28 mV para los NPs sin extractos vegetales (Cuadro 6). El Potencial Zeta es importante, ya que se considera una potencia electroestática que se presenta entre las capas que se encuentran situadas en torno a una partícula, siendo el factor que evita la aglomeración de estas. Se consideran que los NPs son estables cuando presentan potencial Zeta de +30 mV y -30mV; el potencial Zeta negativo de los NPs puede ser debido a los grupos carboxilos del alginato los cuales se ionizan a pH de 4.9 (Sotelo-Boyás *et al.*, 2015; Santo-Pereira *et al.*, 2017). El potencial Zeta obtenido de los NPs cargadas con extractos vegetales es adecuado, debido a que se pretende que los NPs diseñadas para la aplicación en la agricultura, se dispersen buscando mayor movilidad al momento de trasladarse por el xilema o floema de la planta.

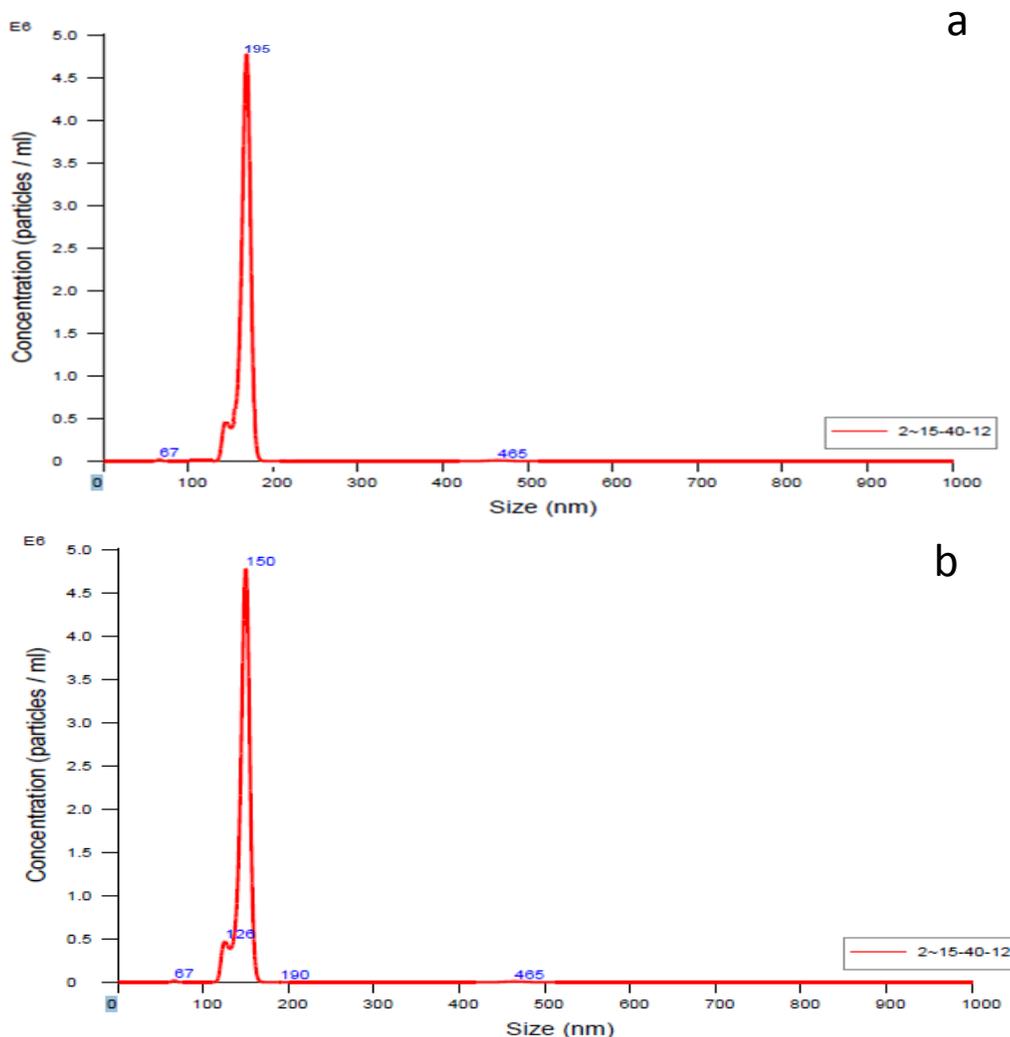


Figura 13. Análisis de tamaño promedio de partícula utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) de NPs cargados con extractos vegetales (a) y NPs sin extractos vegetales (b). Las muestras se analizaron por triplicado.

Estabilidad química de polímeros (pH) y peso

En relación a la estabilidad química de los polímeros evaluados en el presente trabajo, se observó que el pH final de los NPs con extractos vegetales fue de 6.6 y de 7.0 en los NPs sin extractos vegetales. El peso final presentado fue de 0.13 g y 0.09 g para NPs con extractos vegetales y NPs sin extractos vegetales, respectivamente (Cuadro 6).

El pH tiene alta relación con la capacidad de encapsulación y el tamaño final de las partículas, en este sentido se ha comprobado que el pH cercano a 4 disminuye la capacidad de encapsular compuestos; por el contrario, pH cercano a 7 o superiores

permite mayor estabilidad a los encapsulados, y mayor capacidad de encapsulación de compuestos al presentar una mejor interacción con los polímeros (Sandoval-Peraza *et al.*, 2017). Santo-Pereira *et al.* (2017) reportaron nano encapsulados a base de quitosán y alginato con valor de pH de 4.5.

Cuadro 6. Valores obtenidos de las diferentes variables evaluadas en las NPs con extractos vegetales y sin extracto vegetal.

	Tamaño (nm)	Concentración (Partículas/mL)	Potencial Z (mV)	pH	Peso (g)
NPs con extractos vegetales	195±1	4.85x10 ⁰⁷	-26±2	6.6±0.20	0.13±0.02
NPs sin extractos vegetales	150±6	6.65x10 ⁰⁷	- 28±5	7.0±0.46	0.09±0.07

Etapa 3

Pruebas de Efectividad Biológica Bajo Condiciones de Invernadero

Incidencia y severidad

Bajo las condiciones experimentales en la que se desarrolló la presente investigación, no se presentaron síntomas de marchitez por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* por lo que no fue posible determinar la incidencia y severidad de la enfermedad. Consideramos que la enfermedad fue inhibida por las condiciones de temperatura las cuales no fueron favorables para su desarrollo; la temperatura promedio registrada en el sitio experimental se registró en los 20 °C con límites inferiores de 18 °C, siendo que la temperatura considerada como óptima para la expresión de síntomas y signos del marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es de 26 – 28 °C (Hibar *et al.*, 2006). Consideramos que no fue causa inherente al fitopatógeno, dado que previo al establecimiento del experimento bajo condiciones de invernadero, se evaluó la patogenicidad de la cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bajo condiciones de laboratorio, observando marchitez inicial en las plantas a los siete días después de la inoculación, y la muerte total de estas a los 12 días después de la inoculación.

Altura de planta y longitud de raíz

Los tratamientos formulados con NPs de Extractos Vegetales y la Mezcla de Extractos sin Encapsular mostraron mayor altura con 51.00 y 50.00 cm, respectivamente, siendo

diferentes estadísticamente a la altura obtenida en los tratamientos correspondientes al Químico y al Testigo Inoculado (Figura 14).

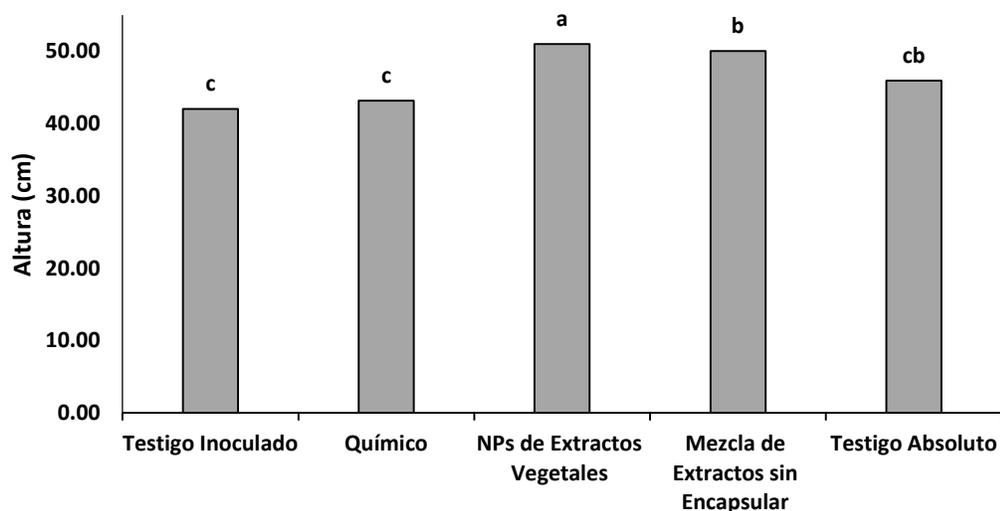


Figura 14. Altura de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

Los formulados de NPs de Extractos Vegetales otorgaron mayor longitud de raíz a las plantas, seguidas de las plantas correspondientes al Testigo Absoluto y a las tratadas con la Mezcla de Extractos sin Encapsular, con 38.92 cm, 36.75 y 36.50 cm, respectivamente; estadísticamente no se observaron diferencias entre estos tratamientos y el Testigo Inoculado, sin embargo, si se presentaron diferencias estadísticas entre los NPs de Extractos y el tratamiento Químico (Figura 15).

En la mayoría de los vegetales el estado de plántula se considera como la etapa más sensible a factores externos, ya que las membranas celulares mantienen mayor permeabilidad lo cual permite mayor absorción de nutrientes y otros compuestos (Yang *et al.*, 2020). En el presente trabajo los NPs se formularon a base de alginato, quitosán, CaCl_2 y los extractos vegetales, en este sentido diferentes autores reportan efecto positivo de estos compuestos en el desarrollo de las plantas.

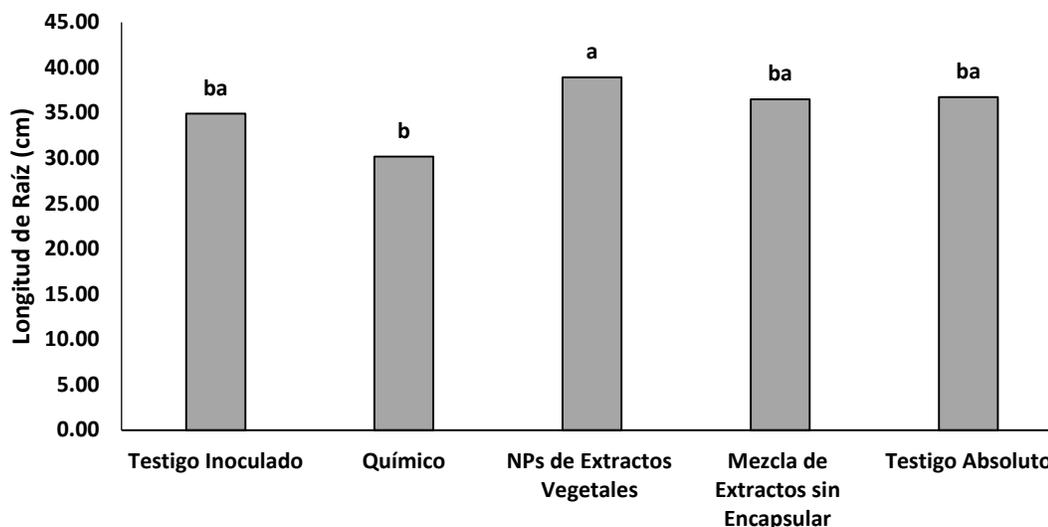


Figura 15. Longitud de raíz de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

La inducción en el aumento de altura y raíz de plántulas de tomate se ha señalado con nano encapsulados de quitosán (Saharan *et al.*, 2015), dicho efecto puede ser adjudicado a que el quitosán favorece la producción del ácido indolacético, promueve la división celular y activa los genes AX11 relacionados con la señalización de las auxinas; además de aumentar la disponibilidad y absorción de agua y nutrientes ajustando la presión osmótica celular, además los grupos funcionales amino e hidroxilo presentes en la molécula del quitosán forman complejos con iones de cobre, hierro y zinc actuando como agentes quelantes (Saharan y Pal, 2016; Katiyar *et al.*, 2014). Por su parte el alginato induce la división celular de la zona del meristemo y la elongación de células en la zona de elongación de la raíz, aplicaciones exógenas de alginato en plantas de trigo otorgaron mayor altura, así como longitud de raíz (Yang *et al.*, 2020). La altura de planta, también aumenta al ser tratadas con aplicaciones exógenas de CaCl_2 , ya que induce el aumento de la cantidad endógena de hormonas de crecimiento como el ácido indolacético y el ácido giberélico (Santo- Pereira *et al.*, 2017). El extracto de *L. graveolens* presenta flavonoides los cuales modulan la actividad de auxinas induciendo a la planta a tener mayor desarrollo (Mierziak *et al.*, 2014), en tanto que el extracto de *V. album* presenta compuestos fenólicos (Luczkiewicz *et al.*, 2001) los cuales estimulan el desarrollo de la raíz (Larqué-Saavedra y Martín-Mex, 2007). Dado lo anterior se puede deducir que el incremento observado tanto en la altura como en longitud de raíces de las

plantas de tomate puede ser debido a los compuestos de la formulación de NPs con extractos vegetales.

Diámetro de tallo y clorofila en hojas

El mayor diámetro de plantas se obtuvo con el tratamiento de Mezcla de Extractos sin Encapsular, seguido del tratamiento a base de NPs de Extractos Vegetales con 13.08 y 12.16 mm, respectivamente; no se observó diferencia estadística entre ellos, sin embargo, si se presentó diferencia significativa con los tratamientos de la Mezcla de Extractos sin Encapsular y el Testigo Absoluto, Testigo Inoculado y el Químico con 11.67, 10.76 y 10.56 mm (Figura 16); por lo que consideramos que puede existir un efecto biológico de los extractos en el desarrollo de las plantas.

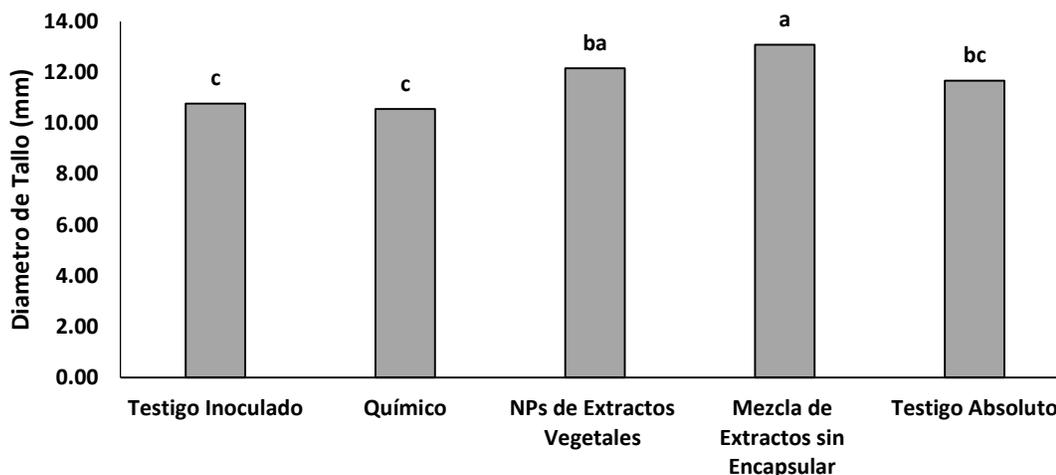


Figura 16. Diámetro de tallo de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

Las plantas con la mayor cantidad de clorofila se obtuvieron con el tratamiento de Mezcla de Extractos sin Encapsular con un valor de 75.71 Unidades SPAD, siendo estadísticamente igual a la cantidad de clorofila presente en las plantas tratadas con NPs de Extractos Vegetales, el Testigo Absoluto y el Químico con 71.89, 61.53, 56.38 Unidades SPAD; sin embargo, si se observó diferencia significativa entre la Mezcla de Extractos sin Encapsular y el Testigo Inoculado el cual tuvo valor de 54.21 Unidades SPAD (Figura 17), este aumento en la clorofila por parte de los tratamientos aplicados sugiere un efecto positivo en las plantas por parte de estos.

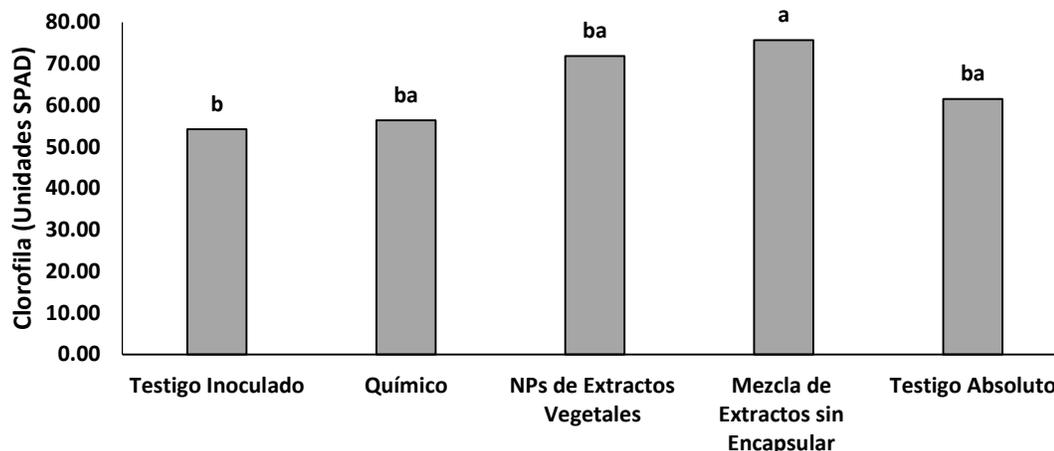


Figura 17. Clorofila en hojas de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

La presencia de compuestos como azúcares reductores en los extractos vegetales utilizados en el presente trabajo, podrían otorgarles un ahorro energético a las plantas al ser aplicados exógenamente incorporándolos directamente a la savia sin tener que sintetizarlos, lo que se vería reflejado en un mayor desarrollo además de la presencia de flavonoides; compuestos que están reportados como inductores del crecimiento en plantas (Luczkiewicz *et al.*, 2001; Mierziak *et al.*, 2014). En este sentido, el mayor diámetro de tallo y contenido de clorofila otorgado por la mezcla de extractos vegetales sin encapsular puede ser atribuido a la presencia de los compuestos antes mencionados, existiendo un efecto directo entre la mayor cantidad de clorofila y el aumento en el crecimiento y desarrollo de la planta (Mkindi *et al.*, 2020).

Estos efectos han sido reportados por Khan *et al.* (2020) en aplicaciones exógenas de extracto de moringa en plantas de trigo y por Draz *et al.* (2019) en aplicaciones de extracto de *Lantana cámara* en plantas de trigo, donde se obtuvo mayor producción de clorofila en hojas. Por parte las plantas tratadas con NPs cargados con extractos vegetales también presentaron buen desarrollo en el diámetro del tallo y cantidad de clorofila en hojas en relación a los demás tratamientos, en este sentido la mejora en comparación al Testigo Inoculado y el Químico se puede atribuir de nueva cuenta a los compuestos con lo que se formularon los NPs; la literatura menciona que el quitosán y sus derivados presentan alta cantidad de nitrógeno por lo que al ser aplicado en plantas, estas aumentan su consumo induciendo mayor cantidad de clorofila en hojas (Saharan y

Pal, 2016); en este mismo sentido Yang *et al.* (2020) obtuvieron un aumento de clorofila y carotenoides en hojas de trigo al ser tratadas con formulaciones de alginato de sodio; finalmente Santo-Pereira *et al.* (2017) observaron aumento en la cantidad de clorofila B en plantas de frijol al ser tratadas con nano encapsulados a base de CaCl_2 , alginato y quitosán, debido al aumento de los procesos bioquímicos presentes en el metabolismo de las plantas.

Peso seco de biomasa aérea y peso seco de raíz

Se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos, el mayor peso de biomasa aérea lo presentó la Mezcla de Extractos sin Encapsular con 44.40 g y el Testigo Absoluto con 43.37 g, ambos fueron estadísticamente iguales; estos tratamientos fueron similares en peso a los tratamientos NPs de Extractos Vegetales y al Testigo Inoculado que presentaron pesos de 38.88 y 37.36 g, respectivamente; y estadísticamente superiores al testigo químico el cual presentó peso de 31.93 g (Figura 18).

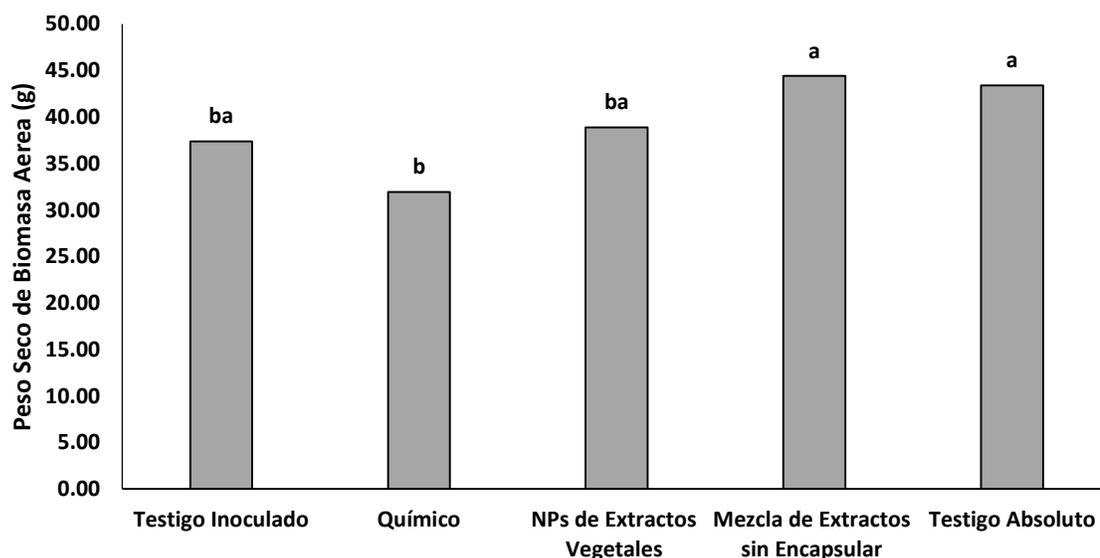


Figura 18. Peso seco de biomasa aérea de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

Por otra parte, para el peso seco de la raíz en los tratamientos estudiados, se presentaron diferencias significativas entre tratamientos; siendo el formulado de NPs de Extractos Vegetales el que presentó mayor peso con 92.97 g y le siguieron con menor peso los

tratamientos de la Mezcla de Extractos sin Encapsular, el Testigo Absoluto, el Testigo Inoculado y al final el Testigo Químico con 77.27, 48.92, 46.22 y 28.97 g, respectivamente (Figura 19).

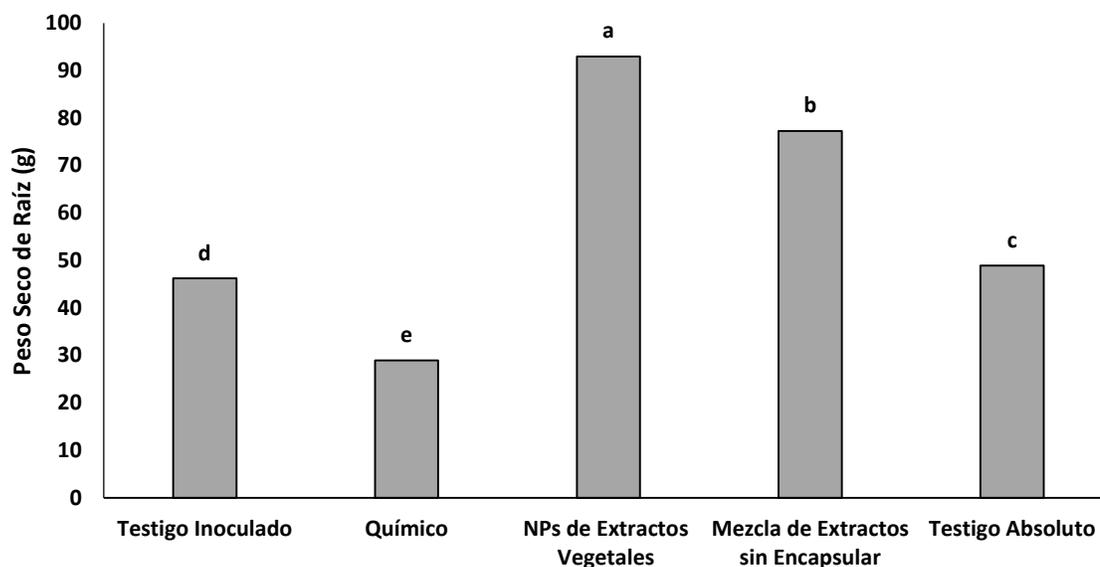


Figura 19. Peso seco de raíz de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

Una mayor cantidad de biomasa refleja mayor actividad fotosintética, para sintetizar mayor cantidad de carbohidratos transportados hacia las raíces de la planta, lo que permite una mejora en el desarrollo (Hadacek *et al.*, 2002). Compuestos identificados dentro del análisis fitoquímico de ambos extractos fueron los azúcares reductores los cuales han demostrado su capacidad de inducir la activación de varias proteínas como las ciclinas hormonas como las auxinas, además de inducir expresión de genes que permiten mayor crecimiento e incremento de biomasa (Fu *et al.* 2012; Lastdrager *et al.* 2014); los compuestos fenólicos presentes en los extractos vegetales también han sido relacionados con una mayor producción de biomasa debido a que modulan la actividad de hormonas como las auxinas que inducen mayor desarrollo (Mierziak *et al.*, 2014; Koo *et al.*, 2020). En este sentido Mkindi *et al.* (2020) reportaron mayor desarrollo en plantas de frijol al ser tratadas con extractos de *Tephrosia vogelii* y *Tithonia diversifolia*.

El desarrollo de las raíces es crítico para la planta, ya que son responsables de la absorción de nutrientes y agua, en este sentido nuestros resultados sugieren que el mayor

peso seco de raíz presentado por el formulado de NPs cargados con extractos vegetales de nueva cuenta se puede atribuir a los compuestos como el quitosán, alginato, CaCl_2 y los extractos presentes en la formulación de los NPs, los cuales en su conjunto pudieron haber potencializado su acción y mejorar el desarrollo radicular, debido a que los NPs aumentaron la actividad de células del meristemo de la raíz; por la activación de Proteínas Kinasas dependientes del calcio las cuales inducen mayor desarrollo radicular por el CaCl_2 contenido en los NPs; así como el efecto de los oligosacáridos del quitosán los cuales actúan sobre las plantas de manera similar a fitohormonas en la regulación de la morfogénesis, el crecimiento aéreo y en el desarrollo radicular (Saharan y Pal, 2016; Ribaudó *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020). El efecto positivo en el desarrollo radicular observado en este ensayo coincide con lo reportado por Santo- Pereira *et al.* (2017) quienes observaron un aumento en la radícula de plantas de frijol al ser tratadas con nano encapsulados a base de quitosán, alginato y CaCl_2 cargados con ácido giberélico; en este mismo sentido se ha reportado aumento en la formación de la raíz principal y laterales en plantas de frijol al ser tratadas con nano encapsulados de ácido glutámico y quitosán (Pereira *et al.*, 2017). Se sugiere que todos los fenómenos anteriormente mencionados son inducidos por los compuestos de la formulación utilizada en esta investigación y pueden verse potencializados por los compuestos fitoquímicos de los extractos de *L. graveolens* y *V. album* con los cuales se cargaron los NPs.

Número de flores, frutos cuajados y peso de frutos

Para variable número de flores no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, se observó que el tratamiento de NPs de Extractos Vegetales presentó más número de flores con 14.67, que el testigo inoculado y el testigo químico con 11.58 y 9.83, respectivamente (Figura 20).

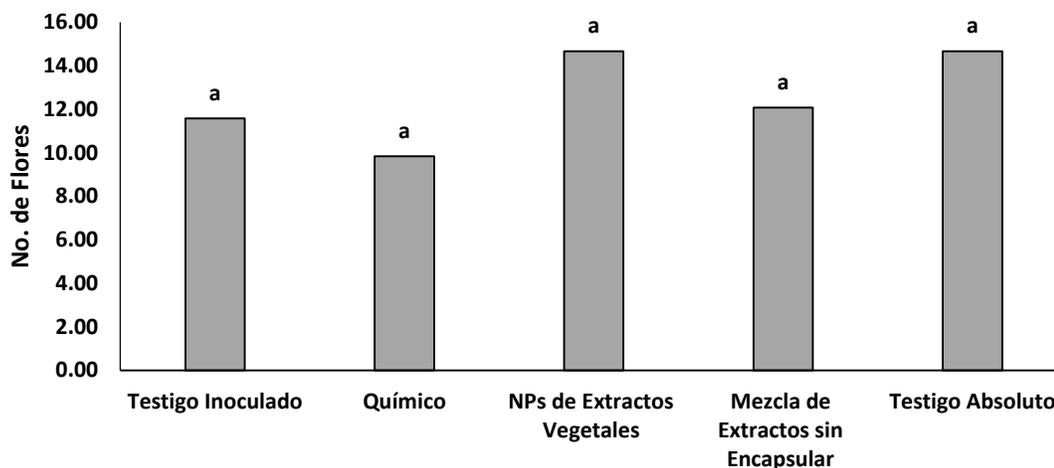


Figura 20. Número de flores de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

El mayor número de frutos cuajados se presentó con los NPs de Extractos Vegetales con un valor de 6.75, aunque no se presentó diferencias estadísticas entre este tratamiento y los tratamientos de la Mezcla de Extractos sin Encapsular y el Testigo Absoluto con valores de 5.42 y 4.67; sin embargo, si se observó diferencia estadística entre los NPs de Extractos Vegetales y el Testigo Inoculado, así como con el Químico que reportaron valores de 3.17 y 2.58, respectivamente (Figura 21).

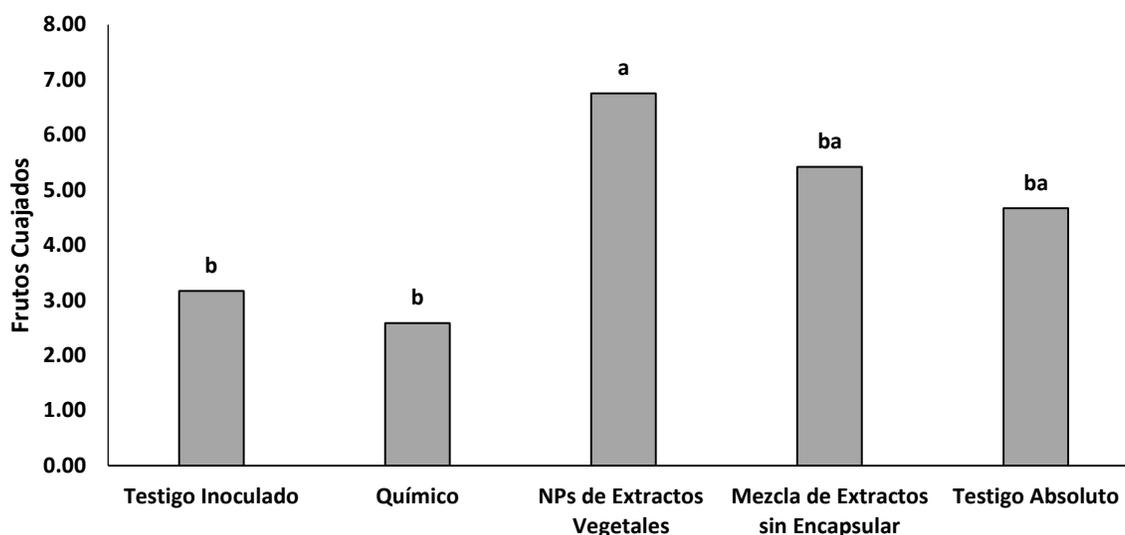


Figura 21. Frutos cuajados de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

En relación al peso de frutos, el mayor peso se obtuvo de los frutos correspondientes a las plantas tratadas con el formulado de NPs de Extractos Vegetales con 135.9 g, seguido de los tratamientos Testigo Absoluto y Mezcla de Extractos sin Encapsular con 87.20 g y 82.20 g, finalmente los tratamientos que otorgaron menor peso a los frutos fueron el Químico y Testigo Inoculado 39.55 g y 37.90 g, respectivamente (Figura 22), observándose diferencia estadística significativa entre todos los tratamientos.

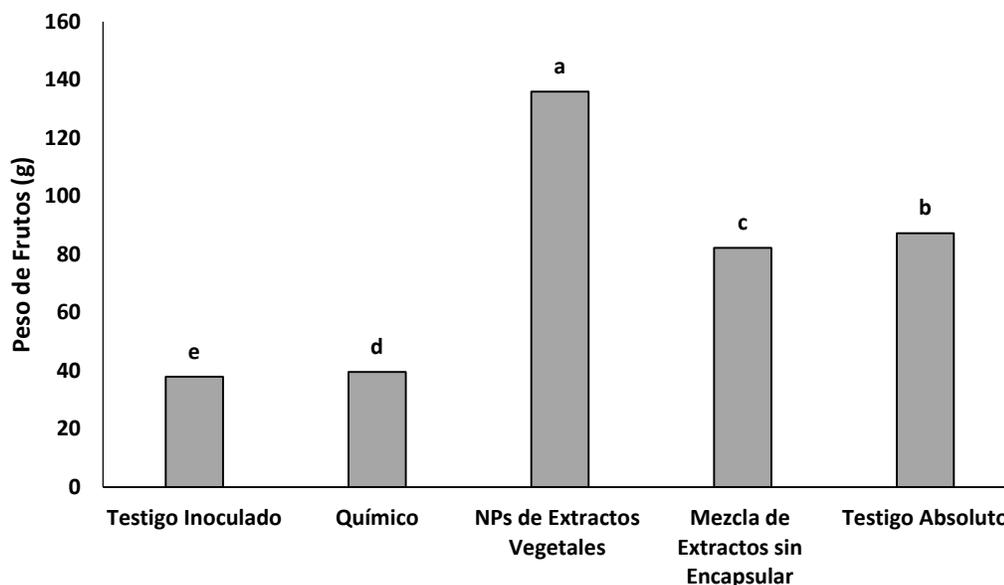


Figura 22. Peso de frutos de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

La floración, el número de frutos cuajados, así como el peso de los frutos son variables esenciales en los cultivos hortícolas, ya que determinarán el rendimiento de un cultivo. El quitosán induce la activación de hormonas relacionadas con el estrés en las plantas lo que podría inducir mayor floración; además la literatura menciona que el quitosán también puede actuar como antitranspirante, activar el sistema captador de ROs, mejorar la conductancia estomática y estimular el crecimiento de los vasos del xilema lo que trae consigo efectos positivos en el desarrollo y floración de las plantas. (López-Moya *et al.*, 2017; El Amerany *et al.*, 2020;).

Los azúcares son compuestos importantes en el metabolismo de las plantas, por lo que su presencia en extractos es de esperarse, dichos extractos al ser aplicados pueden mejorar el crecimiento de las plantas, así como la calidad de los frutos, ya que actúan

como fuente de energía y estimulan la asimilación de nitrógeno, además de los azúcares, los extractos vegetales también contienen nutrientes, aminoácidos, proteínas, péptidos o agentes quelantes; por lo que su aplicación puede mejorar el metabolismo del nitrógeno y carbono dando como resultado un aumento de la calidad en frutos (Zulfiqar *et al.* 2020); por su parte diversos compuestos fenólicos han sido probados como inductores de floración en diversas especies vegetales (Larqué-Saavedra y Martín-Mex, 2007). En este sentido se ha demostrado un aumento en la producción de plantas al ser tratadas con nano encapsulados de alginato/quitosán-ácido giberélico en plantas de tomate en las cuales aumentó la producción de flores y frutos (Santo-Pereira *et al.*, 2019). En relación al uso de extractos vegetales Khan *et al.* (2020) observaron mayor rendimiento y calidad en el cultivo de trigo al ser tratado con extracto de moringa; y también se ha reportado incremento en variables morfo métricas como el número de flores y frutos en plantas de *Vigna unguiculata* al ser tratadas con una mezcla de extractos de *Malva parviflora* y *Artemisia ludia* (Lashin *et al.*, 2013)

Diámetro ecuatorial de frutos y diámetro polar de frutos

El mayor diámetro ecuatorial en frutos se observó en plantas tratadas con los NPs de Extractos Vegetales con 22.56 mm, posteriormente le siguieron las plantas correspondientes al Testigo Absoluto con 21.20 mm y la Mezcla de Extractos sin Encapsular con 17.84 mm, no se observaron diferencias entre estos tratamientos; pero si entre estos y los formulados de NPs de Extractos Vegetales, y el Químico con 14.49 mm, así como con el Testigo Inoculado con 14.08 mm (Figura 23).

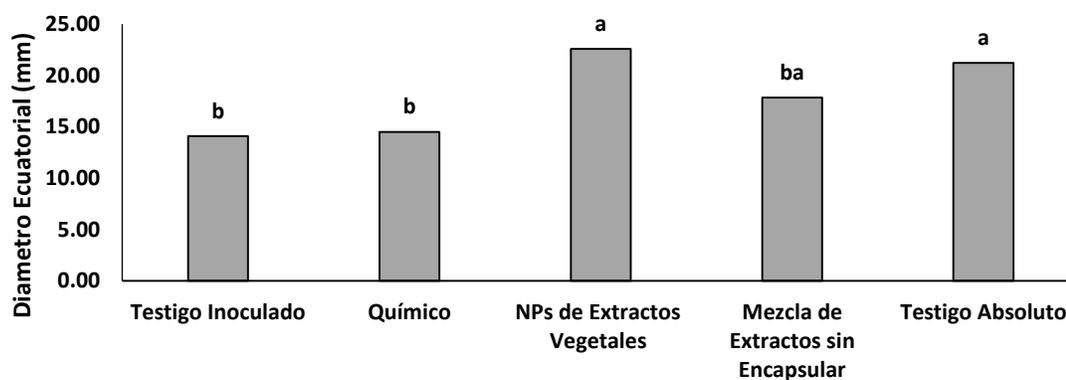


Figura 23. Diámetro ecuatorial de frutos de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

En relación con el diámetro polar de frutos el mayor diámetro se obtuvo en el tratamiento formulado con NPs de Extractos Vegetales, seguido del Testigo Absoluto y de la Mezcla de Extractos sin Encapsular con 36.43, 32.00 y 29.09 mm, no observándose diferencias estadísticas entre estos tratamientos; sin embargo, si se observó diferencias estadísticas significativas entre los NPs de Extractos Vegetales y el Testigo Absoluto con el Químico así como con el Testigo Inoculado que reportaron valores de 22.59 y 21.67 mm (Figura 24).

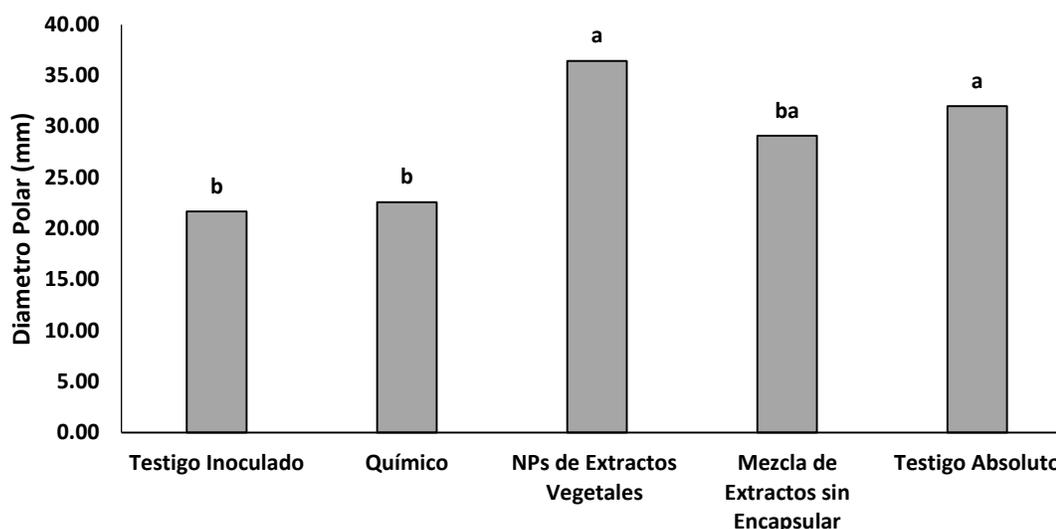


Figura 24. Diámetro polar de frutos de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. *sp. lycopersici* tratadas con NPs y extractos vegetales bajo condiciones de invernadero.

El tamaño de frutos en el cultivo de tomate es un factor importante a tomar en cuenta al momento de determinar la calidad y rendimiento en la producción, en este sentido mientras mayor sea el tamaño del fruto se considerará de mayor calidad. El uso de NPs formulados con quitosán, alginato, CaCl_2 y extractos vegetales en este trabajo logro un aumento en el tamaño de fruto por lo que de nueva cuenta se puede atribuir este crecimiento a los componentes de la formulación de los NPs, y a la serie de mejoras en el desarrollo de la planta que estos indujeron como el aumento en el crecimiento de los tallos el cual diversos estudios han descrito que influye en la producción y calidad de los frutos (González-Gómez *et al.*, 2017). Existen reportes del efecto positivo en la calidad de frutos de tomate al ser tratadas las plantas exógenamente con encapsulados de quitosán y de formulaciones a base alginato/quitosán – ácido giberélico (Sathiyabama *et*

al., 2014; Santo-Pereira *et al.*, 2019); así como de aumento en la producción y calidad de frutos de mango al ser tratados los árboles con nanopartículas de quitosán (Zagzog *et al.*, 2017).

Etapa 4

Cuantificación de enzimas asociadas a mecanismos de defensa en plantas de tomate

Determinación de la actividad de fenilalanina amonio liasa

La concentración de la enzima PAL en las plantas de tomate fue estadísticamente mayor entre los tratamientos de NPs de Extractos Vegetales, NPs sin Extractos Vegetales, Mezcla de Extractos sin Encapsular que, en el Testigo Absoluto, en cada tiempo de muestreo analizado (Figura 25). La concentración de PAL varió de 186.62 UAE en el Testigo Absoluto a 499.15 UAE con los NPs de Extractos Vegetales, esta tendencia se mantuvo hasta las 24 h después de la aplicación de los tratamientos, tiempo a partir del cual se observó un incremento en la concentración de PAL en el tratamiento de NPs de Extractos Vegetales alcanzando una concentración de 549.26 UAE, en tanto que los NPs sin Extractos Vegetales, Mezcla de Extractos sin Encapsular y el Testigo Absoluto disminuyeron la concentración; de modo que a las 48 h el ANVA muestra que la concentración de PAL por los NPs de Extractos Vegetales es estadísticamente mayor que los tratamientos NPs sin Extractos Vegetales y la Mezcla de Extractos sin Encapsular, mientras que el Testigo Absoluto fue el que presentó la concentración estadísticamente menor a todos los tratamientos.

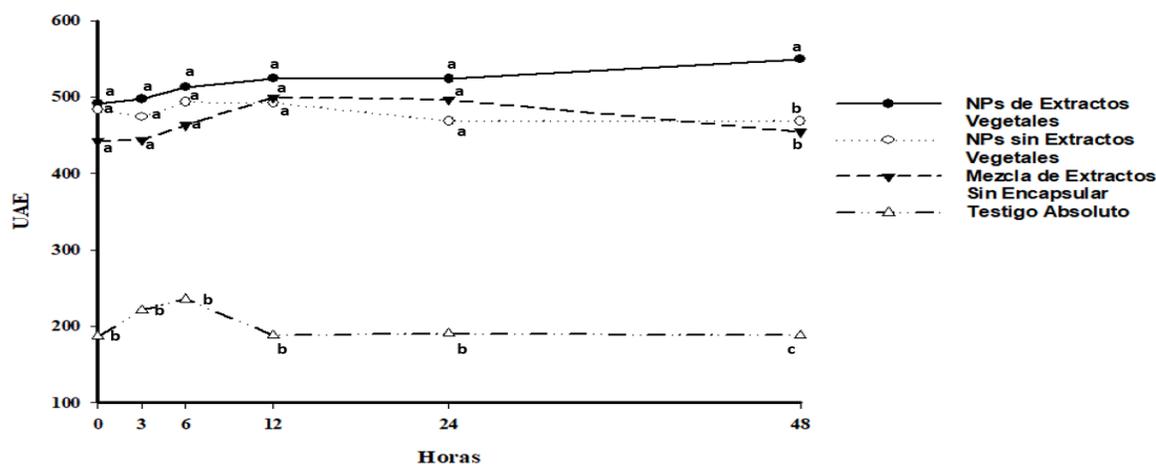


Figura 25. Actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de tomate a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h después de la aspersión.

La síntesis de PRPs es uno de los mecanismos más comunes en plantas al ser tratadas con elicitores para inducir resistencia (Yedidia *et al.*, 1999); la enzima PAL es importante debido a que elimina el amoniaco de la fenilalanina para formar ácido transcinámico el cual es el precursor de compuestos como fitoalexinas, cumarinas, ligninas y flavonoides, a través de la vía de los fenilpropanoides; dicha eliminación se da debido a la interacción entre su grupo prostético conocido como imidazolina de metileno y el sustrato de la fenilalanina, lo que incrementa la acidez de los protones en el β -carbón facilitando la desprotonación permitiendo la eliminación del amoniaco y liberando el ácido transcinámico (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2006; Davidson, 2010). EL aumento de la actividad por parte de PAL en plantas tratadas con NPs cargadas con extractos vegetales, puede ser atribuido al efecto de los compuestos como el quitosán, alginato, CaCl_2 y los extractos vegetales, con los cuales se formularon los NPs; en este sentido la literatura menciona al quitosán como un compuesto capaz de mejorar la síntesis de fitoalexinas, enzimas de defensa y PRPs. La activación de las proteínas PRPs-1, PRPs-2 y PRPs-5 y su patrón de expresión se han considerado durante mucho tiempo como marcadores importantes de RSA señalada a través de la vía del ácido salicílico (Siddaiah *et al.*, 2018); por su parte se tiene reportes de la capacidad del alginato de calcio y sus derivados para la activación de la enzima PAL al ser aplicado exógenamente (Aitouguinane *et al.*, 2020); así como la capacidad de extractos vegetales para activar este tipo de enzimas, debido a los compuestos obtenidos de los extractos, tales como flavonoides, carvacrol, entre otros (De Barros *et al.*, 2019). Existen reportes de la activación de PAL en diferentes tiempos por la aplicación de nanopartículas a base quitosán en plantas (Siddaiah *et al.*, 2018), Nadendla *et al.* (2018) al aplicar nanopartículas de quitosán cargadas con un elicitador microbiano sobre plantas de tomate observaron aumento en la producción de enzimas de defensa, entre ellas PAL obteniendo una respuesta similar a los resultados presentados en nuestro trabajo con NPs cargados con extractos vegetales. En el uso de extractos vegetales como inductores Chandrashekhara *et al.* (2010) reportan la aplicación del extracto de *V. album* sobre plántulas de *P. glaucum* como inductor de resistencia a través de la activación de

mecanismos de defensa para la activación de la enzima PAL. Los resultados del presente trabajo evidenciaron la capacidad de los NPs cargados con extractos *L. graveolens* y *V. album* de aumentar la actividad de la enzima PAL en plantas de tomate, la cual juega un rol importante en la RSA, permitiendo posicionarlos como una opción viable para inducir resistencia a enfermedades en plantas de tomate.

Determinación de la actividad de peroxidasa (POD)

La actividad de la enzima POD inició a partir de las 0 h con los tratamientos NPs de Extractos Vegetales y la Mezcla de Extractos sin Encapsular con 55.99 y 52.70 UAE, respectivamente, siendo ambos tratamientos estadísticamente superiores a los NPs sin Extractos Vegetales y al Testigo Absoluto; posteriormente se observó una tendencia a disminuir la concentración por parte de los tratamientos NPs de Extractos Vegetales y la Mezcla de Extractos sin Encapsular alcanzando su concentración más baja a las 48 h con 38.56 y 36.12 UAE, contrario al tratamiento NPs sin Extractos Vegetales el cual incrementó la concentración de POD alcanzando su mayor concentración a las 48 h con 56.79 UAE, por su parte el Testigo Absoluto no presentó incremento ni disminución significativa en la concentración conforme transcurrió el tiempo del ensayo. El ANVA indica que la concentración es estadísticamente superior a las 48 h entre el tratamiento NPs sin Extractos Vegetales y los demás tratamientos (Figura 26).

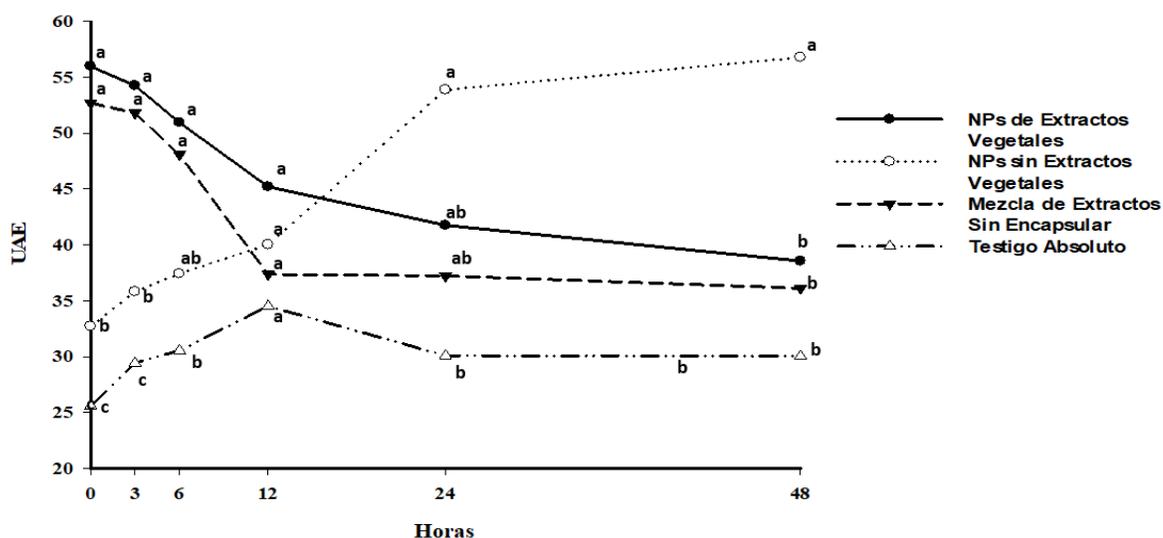


Figura 26. Actividad de peroxidasa (POD) en plantas de tomate a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h después de la aspersión.

La enzima POD se encuentra presente en las plantas realizando diversas actividades fisiológicas; en cuanto a defensa inducida, dicha enzima tiene como objetivo el refuerzo de barreras físicas de la pared celular que comprenden lignina, suberina, polisacáridos feruloilados y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina; mejora la producción de ROs como mediadores de señales y agentes antimicrobianos; y aumenta la producción de compuestos como las fitoalexinas (Pandey *et al.*, 2017). Nuestros resultados sugieren que la actividad enzimática de POD otorgada por los tratamientos, puede ser atribuida a los componentes con los cuales están formulados cada uno, en el caso de los NPs cargados con extractos vegetales, diversos estudios mencionan que compuestos como el quitosán posee una estructura de oligosacáridos presente en muchas paredes celulares de hongos y se sabe que desencadena respuestas de defensa de las plantas, incluida la producción de fitoalexinas y componentes estructurales, inhibidores de proteasa, y PRPs como quitinasas y POD; debido a que actúan en receptores específicos presentes en las células vegetales induciendo la activación del mecanismo de defensa de las plantas (Hidangmayum *et al.*, 2019). El alginato de sodio es un compuesto elicitador en plantas que estimula la formación de compuestos como la lignina mediante la polimerización de mono ligninoles por un mecanismo oxidativo con la consiguiente formación de radicales fenoxi a través de enzimas oxidativas como POD; así como reacciones de catalización para formación de O_2 mediante enzimas POD, que posteriormente dismuta a H_2O_2 , el cual actúa como una molécula de señal para inducir respuestas moleculares, bioquímicas y fisiológicas en las células vegetales, siendo el H_2O_2 capaz de iniciar la ruta octadecanoide que conduce a la biosíntesis de ácido jasmónico, compuestos relacionados con ácido jasmónico y otras oxilipinas que funcionan como inductores de la biosíntesis de metabolitos secundarios de plantas (Almagro *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2017). Por su parte los extractos vegetales también inducen resistencia mediante la activación de POD creando un ambiente tóxico dentro del citoplasma celular mediante la producción de ROs las cuales pueden inhibir directamente los patógenos, así como la formación de ligninas mediadas por POD (Goel & Paul, 2014).

Diversos estudios han demostrado la capacidad inductora de defensa en plantas, al ser tratadas con nanopartículas a base de biopolímeros como el quitosán y alginato, así como con extractos vegetales. Se ha reportado encapsulados a base de quitosán y

tiamina con capacidad de aumentar la producción de enzimas de defensa, entre ellas POD en el cultivo de garbanzo (Muthukrishnan *et al.*, 2019), también nanopartículas de alginato aplicadas en el cultivo de arroz para la activación de enzimas de defensa como PAL y POD durante varios días después de la aplicación de los tratamientos (Zhang *et al.*, 2015); finalmente en cuanto a extractos vegetales, Goel & Paul (2014) detectaron la activación de la enzima POD en plantas de tomate después de ser tratadas con extracto de *Azadirachta indica*. En lo que se refiere a la actividad POD detectada en nuestro trabajo, los resultados indican que la aplicación exógena por aspersión de NPs cargados con extractos vegetales, así como la mezcla de extracto de *L. graveolens* y *V. album* inducen la producción de la enzima de defensa POD, preparando a la planta ante una posible invasión de microorganismos fitopatógenos pudiendo ser a través de la ruta de fenilpropanoide en la cual primero se activa la enzima PAL y posteriormente la enzima POD (Pandey *et al.*, 2017).

Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La concentración de la enzima SOD fue baja a las 0 h en todos con todos los tratamientos, siendo la Mezcla de Extractos sin Encapsular la que reportó mayor concentración en este tiempo con 44.00 UAE, no observándose diferencias estadísticas entre los tratamientos; sin embargo, transcurridas 6 h se observó un incremento en la concentración de la enzima SOD en todos los tratamientos excepto el Testigo Absoluto, siendo en este tiempo la Mezcla de Extractos sin Encapsular la que presentó mayor concentración con 117.76 UAE, existiendo diferencias estadísticas entre este tratamiento y los NPs sin Extractos Vegetales así como el Testigo Absoluto; por su parte el tratamiento NPs de Extractos Vegetales alcanzó la mayor concentración de la enzima transcurridas las 12 h con 116.74 UAE, presentando diferencia estadística únicamente con el Testigo Absoluto. Finalmente, tanto el tratamiento NPs de Extractos Vegetales y la Mezcla de Extractos sin Encapsular presentaron una tendencia a disminuir la concentración de SOD hasta las 48 h; el Testigo Absoluto no presentó cambios significativos en la concentración durante ningún tiempo del estudio (Figura 27).

El equilibrio entre la producción de ROS y la actividad antioxidante es importante para mantener un sistema biológico saludable, debido a esto al igual que POD en las plantas,

la enzima SOD se caracteriza por su actividad antioxidante, ya que mitiga el daño celular causado por ROS, catalizando la dismutación de O_2^- en H_2O_2 y oxígeno O_2 los cuales activan cascadas de señalizaciones que conducen a la producción de compuestos como hormonas y metabolitos que permiten a la planta defenderse de microorganismos fitopatógenos (Pandey *et al.*, 2017; Dey *et al.*, 2019;). En relación a la capacidad inductora de enzimas de defensa, compuestos como el quitosán, alginato, así como extractos vegetales presentan actividad como elicitores capaces de incrementar los niveles de enzimas antioxidantes como SOD (Chandra *et al.*, 2015; Dey *et al.*, 2019).

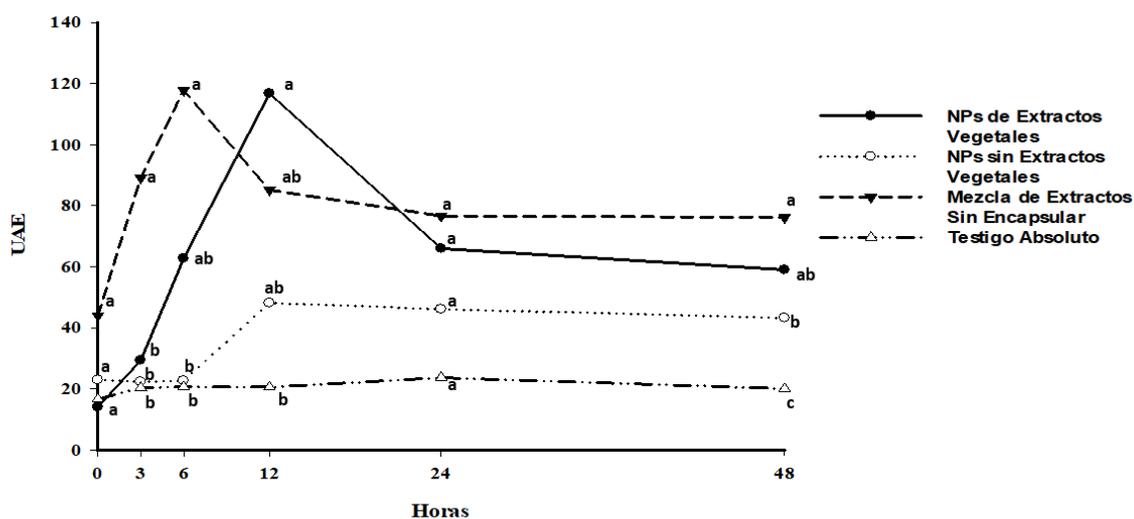


Figura 27. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en plantas de tomate a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h después de la aspersion.

En este sentido la literatura menciona a diversos autores que han obtenido resultados prometedores en relación con la inducción de resistencia en plantas mediante enzimas de defensa por NPs de extractos vegetales a base de quitosán y alginato; Chandra *et al.* (2015) reportaron aumento en la actividad de enzimas de defensa incluida SOD al aplicar nanopartículas de quitosán por aspersion en *Camellia sinensis*, por su parte Dey *et al.* (2019) observaron incremento en la actividad de SOD y diversas PRPs al aplicar nanopartículas a base de alginato en plantas de tomate; en cuanto al uso de extractos vegetales Seong *et al.* (2019) indicaron que la actividad de SOD aumentó al aplicar extracto de *Lavandula angustifolia* en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Nuestros resultados sugieren que la mayor actividad enzimática por parte de los NPs de extractos

vegetales, puede ser atribuida a la composición de la formulación de estos a base quitosán, alginato y extractos de *V. album* y *L. graveolens*.

CONCLUSIONES

- Los compuestos fitoquímicos determinados en los extractos de *L. graveolens* y de *V. album* pertenecen a las familias de los taninos, alcaloides, saponinas, azúcares reductores, purinas, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, catequinas y ácidos metoxicinámicos; en específico compuestos como el ácido caféico 4-O-glucósido, resveratrol 3-O-glucósido, resveratrol 5-O-glucósido, kaempferol 3-O-glucosil-ramonosil-glucósido, sinensetina, (+)-catequina-3-O-glucosa, arbutina, pinocembrina, luteolina 7-O-glucósido, 5- ácido ferúlico y p-coumaril ácido tartárico.
- Los extractos de *L. graveolens* y *V. album* presentaron actividad antifúngica al inhibir al 100 % el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a partir de 200 mg/L. Las CI_{50} obtenidas con los extractos de *L. graveolens* y *V. album* sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* fueron de 64.68 mg/L y 71.61 mg/L, respectivamente.
- El uso de biopolímeros como el alginato y quitosán permitió la producción de NPs de extractos vegetales con características estables.
- Debido a los factores ambientales, no fue posible determinar el porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero.
- La aplicación de los formulados de NPs de extractos vegetales otorgó beneficios en el desarrollo morfométrico de las plantas.
- La aplicación exógena de NPs cargados con extractos vegetales, así como de extractos vegetales en mezcla sin encapsular indujo la producción de enzimas

relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas como fenilalanina amonio liasa, peroxidasa y superóxido dismutasa.

REFERENCIAS

- Aboody, M. S. A., & Mickymaray, S. 2020. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics*, 9(2): 45
- Agrawal, S. & Rathore, P. 2014. Nanotechnology pros and cons to agriculture: a review. *International Journal of Current Microbiology and applied Science*, 3(3): 43-55.
- Agrios, G.N. 1995. *Fitopatología*. Uteha-Noriega: Editorial Limusa. 838pp.
- Ahn, I. P., Kim, S. & Lee, Y. H. 2005. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant physiology*, 138(3): 1505-1515.
- Aitouguinane, M., Bouissil, S., Mouhoub, A., Rchid, H., Fendri, I., Abdelkafi, S. & Delattre, C. 2020. Induction of Natural Defenses in Tomato Seedlings by Using Alginate and Oligoalginates Derivatives Extracted from Moroccan Brown Algae. *Marine drugs*, 18(10): 521.
- Alcantar-Acosta, S.M., Mora-Herrera, M.E., Azucena, R. C. & Jaime, M. C. 2018. Actividad enzimática de las peroxidases en *Gerbera x hybrida* con incidencia de *Trialeurodes vaporariorum* westwood, 1856 (hemiptera: aleyrodidae). *Entomología Mexicana*, 5: 401-407.
- Almagro, L., Gómez-Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros-Barceló, A. & Pedreno, M. A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of experimental botany*, 60(2): 377-390.
- Amaral, D.O.J., Magalhaes, M., Vilela, L. & Vanusa, M. 2008. Differential gene expression induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection in tomato. *Pesq Agrop Bras*, 43(8): 1017-1023.
- Amer, B., Juvik, O. J., Dupont, F., Francis, G. W. & Fossen, T. 2012. Novel aminoalkaloids from European mistletoe (*Viscum album* L.). *Phytochemistry letters*, 5(3): 677-681
- Andrews, H. E. & Márquez, E. G. 2017. Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos. Consulta 1 4 abril 2021. Disponible en: <https://207.249.117.54/jspui/bitstream/1023/565/1/Tecnologia%20de%20nanomicroencapsulacion%20de%20compuestos%20bioactivos.pdf>
- Apaza, R., Smeltekop, H., Flores, Y., Almanza, G. & Salcedo, L. 2016. Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd contra el fitopatógeno *Cercospora beticola* Sacc. *Revista de protección vegetal*, 31(1): 63-69.

- Armendáriz-Barragán, B., Zafar, N., Waisudin, B., Galindo-Rodríguez, S.A., Dounia, K. & Hatem, F. 2016. Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(8): 1165-1175
- Armstrong, G.M. & Armstrong, J.K. 1981. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En: Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R. (Eds.), *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. University Park: The Pennsylvania State University Press, pp. 391–399.
- Ascacio- Valdés, J. A., Aguilera- Carbó, A. F., Buenrostro, J. J., Prado- Barragán, A., Rodríguez- Herrera, R. & Aguilar, C. N. 2016. The complete biodegradation pathway of ellagitannins by *Aspergillus niger* in solid- state fermentation. *Journal of basic microbiology*, 56(4): 329-336.
- Aykul, S. & Martinez-Hackert, E. 2016. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical biochemistry*, 508: 97-103.
- Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A. & Liang, L. 2016. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 143-182.
- Bautista-Baños, S., M. Hernández & E. Bosquez. 2004. Growth inhibition of select fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22 (2): 178-186.
- Blanco-Labra, A. & Mancilla, C. A. 2002. Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta universitaria*, 12(3): 3-28.
- Burketova L., Trda L., Ott P. G. & Valentova O. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology advances*, 33(6): 994-1004
- Camarena-Gutiérrez, G. & De la Torre-Almaráz, R. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13(2): 157-162.
- Candiracci, M., Citterio, B. & Piatti, E. 2012. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food chemistry*, 131(2): 493-499.
- Cantelli, B. A. M., Bitencourt, T. A., Komoto, T. T., Belebony, R. O., Marins, M., & Fachin, A. L. 2017. Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of *Trichophyton rubrum*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96: 1389-1394.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., and Aguilar, C. N. 2010. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products*, 32(3): 324-328.
- Chandra, S., Chakraborty, N., Dasgupta, A., Sarkar, J., Panda, K. & Acharya, K. 2015. Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific reports*, 5(1): 1-14.

- Chandrashekhara, S., Niranjan-Raj G., Manjunath S., Deepak H. & Shekar S. 2010. Seed treatment with aqueous extract of *Viscum album* induces resistance to pearl millet downy mildew pathogen. *Journal of Plants Interactions*, 5(4): 283-291.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. & Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- Cipollini, D. & Heil, M. 2010. Costs and benefits of induced resistance to herbivores and pathogens in plants. *Plant Science Reviews*, 5: 1-25.
- Clarenc, A., R., Castellanos-Hernández, O. A., Rodríguez-Sahagún, A. & Acevedo-Hernández, G. J. 2020. Efecto del estrés salino sobre la morfología y fitoquímica de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) cultivado *in vitro*. *Biotecnia*, 22(3): 131-137.
- Confortin, T. C., Spannemberg, S. S., Toderó, I., Luft, L., Brun, T., Alves, E. A. & Mazutti, M. A. 2019. Microbial Enzymes as Control Agents of Diseases and Pests in Organic Agriculture. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 321-332.
- Correa, J.L.G, Mendonça, K.S., Rodrigues, L.R., Resende, M.L.V. & Alves, G.E. 2016. Spray drying of coffee leaf extract. *Coffee Science*, 11: 359–367.
- Cortés-Chitala, M. D. C., Flores-Martínez, H., Orozco-Ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo, Á., Estarrón-Espinosa, M. & López-Muraira, I. 2021. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. *Molecules*, 26(3): 702.
- Cushnie, T. T., Cushnie, B. & Lamb, A. J. 2014. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5): 377-386.
- Dao, T. T. H., Linthorst H. J. M. & Verpoorte R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10(3): 397
- Davidson, V.L. 2010. Protein-Derived Cofactors. En: Hung-Wen L. & Lew M. (Eds.) *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, pp. 675-710.
- De Barros, P. N., de Lima Costa, D., Santana, A. E. G. & Leal, G. A. 2019. Fractions of the *Lippia origanoides* extract induce the polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase enzymes in *Solanum lycopersicum*. *European journal of plant pathology*, 153(1): 79-88.
- De Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., Pereira, A.E., Nunes, L.E., Da Silva, C.C., Pasquoto, T. & Fraceto, L.F. 2018. Geraniol encapsulated in chitosan/gum arabic nanoparticles: A promising system for pest management in sustainable agriculture. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66 (21): 5325-5334
- Deighton, F. C., Stevenson, J. A. & Cummins, G. B. 1962. *Formae speciales* and the code. *Taxon*, 11(3): 70-71.

- Dey, P., Ramanujam, R., Venkatesan, G. & Nagarathnam, R. 2019. Sodium alginate potentiates antioxidant defense and PR proteins against early blight disease caused by *Alternaria solani* in *Solanum lycopersicum* Linn. PloS one, 14(9): e0223216.
- Díaz N. 2012. Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA, 10(2): 257-267.
- Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. Nature Reviews Genetics, 11(8): 539-548.
- Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M. & Ferrari, G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT Food Sci Technol, 44:1908–1914.
- Draz, I. S., Elkhwaga, A. A., Elzaawely, A. A., El-Zahaby, H. M. & Ismail, A. W. A. 2019. Application of plant extracts as inducers to challenge leaf rust of wheat. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 29(1): 1-8.
- Edison, L. K., Shiburaj, S. & Pradeep, N. S. 2018. Microbial beta glucanase in agriculture. In: Kumar P., Kumar-Patra J., Chandra P., editors. Advances in Microbial Biotechnology: Current Trends and Future Prospects. New Jersey, CRC Press. P. 53-72
- El Amerany, F., Meddich, A., Wahbi, S., Porzel, A., Taourirte, M., Rhazi, M. & Hause, B. 2020. Foliar Application of Chitosan Increases Tomato Growth and Influences Mycorrhization and Expression of Endochitinase-Encoding Genes. International journal of molecular sciences, 21(2): 535.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., El Moousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R. & Elaissari, A. 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. International Journal of Pharmaceutics, 483: 220-243.
- Ertürk, Ö. 2010. Antibacterial and antifungal effects of alcoholic extracts of 41 medicinal plants growing in Turkey. Czech Journal of Food Sciences, 28(1): 53-60.
- Ertürk, Ö., Kati, H., Yayli, N. & Demirbağ, Z. 2004. Antimicrobial activity of *Viscum album* L. subsp. abietis (Wiesb). Turkish Journal of Biology, 27(4): 255-258.
- Estrada, B.M., Brito M.N., de la Cruz L.E. & Gómez, V.A. 2006. Producción de jitomate en condiciones protegidas. pp. 36-37. In: Memorias del IX Congreso Nacional Agronómico. 26-27 de abril de 2006. Texcoco, México
- FAOSTAT. 2020. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Consultado 12 enero 2021. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Farias, M. R., Pértile, R., Correa, M. M., Almeida, M. T. R. D., Palermo, J. A. & Schenkel, E. P. 2010. Triterpenoid saponins from *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. Journal of the Brazilian Chemical Society, 21(5): 927-933.
- Fernández, C., y Juncosa, R. 2002. Biopesticidas: ¿ la agricultura del futuro. Phytoma, 141, 14-19.
- Franco-Bañuelos, A., Contreras-Martínez, C. S., Carranza-Téllez, J. & Carranza-Concha, J. 2017. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de uvas no nativas para vino cultivadas en zacatecas, México. Agrociencia, 51(6): 661-671.

- Fu, C., Sunkar, R., Zhou, C., Shen, H., Zhang, J., Matts, J., Wolf, J., Mann, D.G.J., Stewart, C.N., Tang, Y. & Wang, Z. 2012. Overexpression of miR156 in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production. *Plant Biotechnology Journal*, 10(4): 443–452.
- Gao, Q. M., Zhu, S., Kachroo, P. & Kachroo, A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in plant science*, 6: 228.
- García-Bores, A. M., Espinosa-González, A. M., Reyna-Campos, A., Cruz-Toscano, S., Benítez-Flores, J. C., Hernández-Delgado, C. T., & Avila-Acevedo, J. G. 2017. *Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167: 72-81.
- García-Pérez, E., Fernando-Francisco, C. Á., Gutiérrez-Urbe, J. A. & García-Lara, S. 2012. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(2): 339-353.
- Goel, N. & Paul, P. K. 2014. Neem Fruit Extract Induces Peroxidase and Lipoxygenase in Tomato. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 3(3).
- González-Gómez, H., Ramirez-Godina, F., Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., Robledo-Torres, V. & Cabrera-De la Fuente, M. 2017. Use of chitosan-PVA hydrogels with copper nanoparticles to improve the growth of grafted watermelon. *Molecules*, 22(7): 1031.
- González, I., Arias, Y. & Peteira, B. 2012. Aspectos Generales de la Interaccion *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1): 1-7.
- Gordo, D. A. M. 2018. Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1): 81-104.
- GreenCorp. 2020. Bioprotección. Consulta 1 julio 2021. Disponible en: <https://greencorp.mx/producto/biocontrol/>
- Güereca, M. C. G., Hernández, M. S., Kite, G. & Vázquez, M. M. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1): 43-49.
- Hadacek, F. & Kraus, G. F. 2002. Plant root carbohydrates affect growth behaviour of endophytic microfungi. *FEMS microbiology ecology*, 41(2), 161-170.
- Hernández, T., Canales, M., García, A. M., Duran, Á., Meráz, S., Dávila, P. & Ávila, J. G. 2008. Antifungal activity of the essential oils of two verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(4).
- Hernández-Castillo, F. D., Castillo-Reyes, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez -Herrera, R. & Aguilar, C. 2011. Plant Extracts from Mexican Native Species: An Alternative for Control of Plant Pathogens. En: Nokkoul R. (ed). RESEARCH IN ORGANIC FARMING. 1st ed. Croacia. Raumjit Nokkoul. Pp.139-156.

- Hernández-Cocoletzi, H., Águila-Almanza, E., Flores-Agustin, O., Viveros-Nava, E. L. & Ramos-Cassellis, E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3): 57-60.
- Hernández-Martínez, R., López-Benitez, A., Borrego-Escalante, F., Espinoza-Velásquez, J., Sánchez-Aspeytia, D., Maldonado-Mendoza, E. & López-Ochoa, L. 2014. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7): 1169-1178
- Herrera, M., Portillo, D., Pulido, M. A., Diaz-Tatis, P. A. & López-Carrascal, C. E. 2018. Estudio de la expresión de genes que codifican para putativas proteínas PR en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Acta Biológica Colombiana*, 23(3): 242-252.
- Hibar, K., Daami-Remadi, M., Jabnoun-Khiareddine, H. & El Mahjoub, M. 2006. Temperature effect on mycelial growth and on disease incidence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology Journal*, 5: 233-238.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D. & Hemantaranjan, A. 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and molecular biology of plants*, 25(2): 313-326.
- Higuera, D. L. A., Carmona, G. H. & Montesinos, E. R. 2002. Parámetros que afectan la conversión del ácido algínico en alginato de sodio. *Ciencias Marinas*, 28(1): 27-36.
- Hirasawa, M. & Takada, K. (2004). Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2): 225-229
- Huerta, C. 2005. Orégano mexicano oro vegetal. Consultado 20 enero 2021. Disponible en: <http://www.maph49.galeon.com/biodiv2/oregano.html>
- Hussain, M. A., Khan, M. Q., Hussain, N. & Habib, T. 2011. Antibacterial and antifungal potential of leaves and twigs of *Viscum album* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(23): 5545-5549.
- Ibegbulem, C. O. & Chikezie, P. C. 2013. Hypoglycemic properties of ethanolic extracts of *Gongronema latifolium*, *Aloe perryi*, *Viscum album* and *Allium sativum* administered to alloxan-induced diabetic albino rats (*Rattus norvegicus*). *Pharmacognosy Communications*, 3(2): 12.
- Idrees, M., Naeem, M., Alam, M., Aftab, T., Hashmi, N., Khan, M. M. A. & Varshney, L. 2011. Utilizing the γ -irradiated sodium alginate as a plant growth promoter for enhancing the growth, physiological activities, and alkaloids production in *Catharanthus roseus* L. *Agricultural Sciences in China*, 10(8): 1213-1221.
- Igbinosa, O. O.; E. O. Igbinosa & O. A. Aiyegoro. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3 (2): 58-62.
- ITIS. 2020. Integrated Taxonomic Information System. Consultado 25 enero 2021. Disponible en: <https://www.itis.gov/>

- Jaramillo, J. 2007. Buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas, Manual técnico. Consultado 24 enero 2021. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a1374s/a1374s00.htm>
- Jasso de Rodríguez, D. J., García, R. R., Castillo, F. H., González, C. A., Galindo, A. S., Quintanilla, J. V. & Zuccolotto, L. M. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34(1): 960-966.
- Jasso de Rodríguez, D., Trejo-González, F.A., Rodríguez-García, R., Díaz-Jimenez, M.L.V., Sáenz-Galindo, A., Hernández-Castillo, F.D., Villarreal-Quintanilla, J.A. y Peña-Ramos, F.M. 2015. Antifungal activity in vitro of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Industrial Crops and Products*, 75: 150-158.
- Javid, M. G., Sorooshzadeh, A., Moradi, F., Modarres-Sanavy, S. A. M., & Allahdadi, I. 2011. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6): 726-734.
- Jia, Z., Dumont, M.J. & Orsat, V. 2016. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15: 87-104.
- Jia-Kun, D. A. I., Duo, C. A. O., Cui-Hua, L. I., Jing, G. A. O., Meng-Qing, L. I., Na, F. A. N. & Meng-Yang, H. O. U. 2019. Three new bioactive flavonoid glycosides from *Viscum album*. *Chinese journal of natural medicines*, 17(7): 545-550.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S. & Srawan, G. Y. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, 27(3): 187-197.
- Kah, M. & Hofmann, T. 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environment International*, 63: 224-235.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., Singh, B. & Bhanu, A. N. 2014. A future perspective in crop protection: Chitosan and its oligosaccharides. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 1(1): 1-8.
- Khan, S., Basra, S.M.A., Nawaz, M., Hussain, I. & Foidl, N. 2020. Combined application of moringa leaf extract and chemical growth-promoters enhances the plant growth and productivity of wheat crop (*Triticum aestivum* L.). *South African Journal of Botany*, 129: 74-81.
- Khoa, N. D., Xạ, T. V. & Hào, L. T. 2017. Disease-reducing effects of aqueous leaf extract of *Kalanchoe pinnata* on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100: 57-66.
- Koo, Y. M., Heo, A. Y. & Choi, H. W. 2020. Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *The plant pathology journal*, 36(1): 1.

- Lanzotti, V., Romano, A., Lanzuise, S., Bonanomi, G. & Scala, F. 2012. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry*, 74: 133-139.
- Laredo-Alcalá, E. I., Martínez-Hernández, J. L., Iliná, A., Guillen-Cisneros, L. & Hernández-Castillo, F. D. 2017. Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(3): 673-683
- Larqué-Saavedra, A. & Martin-Mex, R. 2007. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. En: Hayat, S. & Ahmad, A. (Eds). *Salicylic acid: a plant hormone*. Dordrecht: Springer. Pp. 15-23
- Lashin, G. M., Azab, A. A., Hussien, A. A. & Anwar, A. E. 2013. Effects of plant extracts on growth, yield and protein content of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Bangladesh Journal of Botany*, 42(1): 99-104.
- Lastdrager, J., Hanson, J. & Smeekens S. 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of experimental botany*, 65(3): 799-807.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A. & Summerell, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(3): 107-117.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 1er Edicion. Oxford, UK. Blackwell Publishing.
- Liu, H., Kang, Y., Zhao, X., Liu, Y., Zhang X. & Zhang S. 2019. Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. *Journal of functional foods*, 53: 136-145
- Llorens, E., García-Agustín, P. & Lapeña L. 2017. Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Scientia Agricola*, 74(1): 90-100
- López-Moya, F., Escudero, N., Zavala-Gonzalez, E. A., Esteve-Bruna, D., Blázquez, M. A., Alabadí, D. & Lopez-Llorca, L. V. 2017. Induction of auxin biosynthesis and WOX5 repression mediate changes in root development in *Arabidopsis* exposed to chitosan. *Scientific reports*, 7(1): 1-14.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J. & Fraaije, B. A. 2015. Chapter Two-The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in applied microbiology*, 90: 29-92.
- Luczkiewicz, M., Wojciech-Cisowski, P. K., Ochockaz, R. & Piotrowski, A. 2001. Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *system*, 1(5): 6.
- Macea, R. B., De Hoyos, C. F., Montes, Y. G., Fuentes, E. M. & Ruiz, J. I. R. 2015. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polímeros*, 25(1): 58-69.
- Mahesh, H. M., Murali, M., Pal, M. A. C., Melvin, P. & Sharada, M. S. 2017. Salicylic acid seed priming instigates defense mechanism by inducing PR-Proteins in *Solanum melongena* L. upon infection with *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Physiology and Biochemistry*, 117: 12-23

- Marlatt, M. L. J., Correll, J. C.; Kaufman, P. & Cooper, P. E. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum*. f. sp. *lvcopersici* race 3 in the United States. *Plant Diseases*, 80(12):1336-1342.
- Maroyi, A. 2019. *Lippia scaberrima* Sond.(Verbenaceae): traditional uses, phytochemical and pharmacological properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(11): 3685-3690.
- Martínez, J. H. 2014. Análisis estructural y funcional de las peroxidasas implicadas en la biosíntesis de ligninas en mutantes de "Arabidopsis" (Doctoral dissertation, Universidad de Alcalá). Consulta 1 abril 2021. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/58911284.pdf>
- Martínez-Rocha, A., Puga, R., Hernández-Sandoval, L., Loarca-Piña, G. & Mendoza, S. (2008). Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant foods for human nutrition*, 63(1):1-5.
- Martins, S., Amorim, E. L., Sobrinho, T. J. P., Saraiva, A. M., Pisciotano, M. N., Aguilar, C. N. & Mussatto, S. I. 2013. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and Products*, 41: 306-311.
- Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F.D. & Aguilar, C.N. 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1): 445-450.
- Mierziak, J, Kostyn, K & Kulma, A. 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10): 16240-16265.
- Mkindi, A. G., Tembo, Y. L., Mbega, E. R., Smith, A. K., Farrell, I. W., Ndakidemi, P. A. & Belmain, S. R. 2020. Extracts of common pesticidal plants increase plant growth and yield in common bean plants. *Plants*, 9(2): 149.
- Mohammadi, A., Hashemi, M. & Hosseini, S.M. 2015. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28: 73-80.
- Mosch, J., Mende, A., Zeller, W., Rieck, M. & Ullrich, W. 1992. Plant extracts with a resistance induction effect against fire blight (*Erwinia amylovora*). *ISHS Acta Horticulturae*, 338 (1): 389-396.
- Mukhopadhyay, S.S. 2014. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Nanotechnology, Science and Applications*, 7: 63.
- Muthukrishnan, S., Murugan, I. & Selvaraj. 2019. M. Chitosan nanoparticles loaded with thiamine stimulate growth and enhances protection against wilt disease in Chickpea. *Carbohydrate Polymers*, (212): 169–177
- Nadendla, S. R., Rani, T. S., Vaikuntapu, P. R., Maddu, R. R. & Podile, A. R. 2018. HarpinPss encapsulation in chitosan nanoparticles for improved bioavailability and disease resistance in tomato. *Carbohydrate polymers*, 199: 11-19.

- Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K.K., Prakash, H.S., Niranjana, S.R. & Shekar, S.H. 2008. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72: 188-194.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. & Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1: 1806-1815.
- Neira-Carrillo, A., Muñoz, D. Y., Zazzali, P. A., Marini, Y. A., Vilches, S. V., & Palma, R. E. 2013. Encapsulación de biomoléculas usando polímeros naturales: “un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en medicina”. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2): 25-31.
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T. & Chandra, N. S. 2016. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific reports*, 6(1): 1-14.
- ÖnayUçar, E., Karagöz, A. & Arda, N. 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77(7-8): 556-560.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S. & Dwivedi, U. N. 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 6(1): 2161-1009.
- Peng, L., Yang, S., Cheng, Y. J., Chen, F., Pan, S. & Fan, G. 2012. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Science and Biotechnology*, 21(6): 1533-1539
- Pereira, A. E. S., Sandoval-Herrera, I. E., Zavala-Betancourt, S. A., Oliveira, H. C., Ledezma-Pérez, A. S., Romero, J. & Fraceto, L. F. 2017. γ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. *Carbohydrate polymers*, 157: 1862-1873.
- Pereira, A.E.S., Silva, P.M., Oliveira, J.L., Oliveira, H.C. & Fraceto, L.F. 2017. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150: 141-152.
- Peschiutta, M. L., Arena, J. S., Ramirez Sanchez, A., Gomez Torres, E., Pizzolitto, R. P., Merlo, C. & Zygadlo, J. A. 2016. Effectiveness of Mexican oregano essential oil from the Dominican Republic (*Lippia graveolens*) against maize pests (*Sitophilus zeamais* and *Fusarium verticillioides*). *Agriscientia*, 33(2): 89-97.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. & Van Wees, S. C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28: 489-521
- Pietrzak, W., Nowak, R., Gawlik-Dziki, U., Lemieszek, M. K. & Rzeski, W. 2017. LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolic compounds in mistletoe berry extracts from different host trees. *Molecules*, 22(4): 624.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143: 922-935.

- Pizzorno J. E. & Murray M. T. 2020. Textbook of Natural Medicine. 5ta edición. Churchill Livingstone.
- Pretali, L., Bernardo, L., Butterfield, T. S., Trevisan, M. & Lucini, L. 2016. Botanical and biological pesticides elicit a similar induced systemic response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. *Phytochemistry*, 130: 56-63
- 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.
- Ramírez-Legarreta, M. & Jacobo-Cuéllar, J. 2002. Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. *Revista mexicana de Fitopatología*, 20(2): 168-173.
- Regnault-Roger, C. 2012. Botanicals in pest management. *Integrated Pest Management*; Abrol, DP, Shankar, U., Eds, 119-132.
- Ribaudo, C. M., Curá, J. A. & Cantore, M. L. 2017. Activation of a calcium-dependent protein kinase involved in the *Azospirillum* growth promotion in rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2): 22.
- Rodríguez, A. T., Ramírez, M. A., Falcón, A. B., Guridi, F. & Cristo, E. 2004. Estimulación de algunas enzimas relacionadas con la defensa en plantas de arroz (*Oryza sativa*, L.) obtenidas de semillas tratadas con quitosán. *Cultivos tropicales*, 25(3), 111-115.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebato, M. Á., Cárdenas-Travieso, R. M., Falcón-Rodríguez, A. & Bautista-Baños, S. 2006. Efecto de la Quitosána en la Inducción de la Actividad de Enzimas Relacionadas con la Defensa y Protección de Plántulas de Arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1): 1-7.
- Romero-Tejeda, M., Martínez-Damián, M. T. & Rodríguez-Pérez, J. E. 2015. Effect of storage temperature on enzyme activity and antioxidant capacity in *Salvia officinalis* L. shoots. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(3): 199-213.
- Roy, A., Singh, S.K., Bajpai, J. & Bajpai, A.K. 2014. Controlled pesticide release from biodegradable polymers. *Central European Journal of Chemistry*, 12: 453-469
- SAGARPA. 2010. Monografía de Cultivos: Jitomate. Consultado 1 Julio 2017. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>
- SAGARPA.2019. Jitomate mexicano. Consulta 25 febrero 2021. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257077/Potencial-Jitomate.pdf>
- Sagiri, S.S., Anis, A. & Pal, K. 2016. Review on encapsulation of vegetable oils: strategies, preparation methods, and applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 55: 291-311.
- Saharan, V. & Pal, A. 2016. Biological Activities of Chitosan-Based Nanomaterials. In *Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection* (pp. 33-41). Springer, New Delhi.

- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M.K., Sharma, S.S., Pal, A., Raliya, R. & Biswas, P. 2015 Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75:346–353
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M.N., Ismail, S. & Mansor, S.M. 2009. Phytochemical and antimicrobial activity of *Swietenia mahagoni* crude methanolic seed extract. *Tropical Biomedicine*, 26(3): 274-279.
- Salatin, S., Barar, J., Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Kiafar, F. & Jelvehgari, M. 2017. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12: 1-14.
- Sandoval-Peraza, V. M., Cu-Cañetas, T., Peraza-Mercado, G. & Acereto-Escoffié, P. O. M. 2017. Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceutica. Consultado 10 abril 2021. Disponible en: <http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/viewFile/358/256>
- Santo-Pereira, A. D. E., Oliveira, H. C. & Fraceto, L. F. 2019. Polymeric nanoparticles as an alternative for application of gibberellic acid in sustainable agriculture: a field study. *Scientific reports*, 9(1): 1-10.
- Santo-Pereira, A. E., Silva, P. M., Oliveira, J. L., Oliveira, H. C. & Fraceto, L. F. 2017. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150: 141-152.
- Sarmento, B., Ferreira, D., Veiga, F. & Ribeiro, A. 2006. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate polymers*, 66(1): 1-7.
- Sathiyabama, M., Akila, G., Einstein-Charles, R. 2014. Chitosan-induced defence responses in tomato plants against early blight disease caused by *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Sorauer. *Arch. Phytopathol. Plant Protection*, 47: 1777–1787
- SENASICA. 2019. Protocolo de Diagnóstico *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 1, 2 y 3 y f. sp. *radicis* – *lycopersici*. Consulta 2 febrero 2021. Disponible en : <http://sinavef.senasica.gob.mx/CNRF/AreaDiagnostico/DocumentosReferencia/Documentos/ProtocolosFichas/Protocolos/HongosFitopatogenos/PD%20F.%20oxysporum%20Pub%20V1.pdf>
- Seong, E. S., Kim, S. K., Lee, J. W., Choi, S. H., Lee, J. G., Kim, N. Y. & Yu, C. Y. 2019. Effect of lavender hydrosol on antioxidant activity and growth in *Nicotiana benthamiana*. *Brazilian Journal of Botany*, 42(1): 23-28.
- Shami, A.M.M., Philip, K. & Muniady S. 2013. Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1): 360.

- Shishir, M.R.I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X. & Chen, W. 2018. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78: 34-60.
- SIAP. 2020. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consulta 10 enero 2021. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Siddaiah, C. N., Prasanth, K. V. H., Satyanarayana, N. R., Mudili, V., Gupta, V. K., Kalagatur, N. K. & Srivastava, R. K. 2018. Chitosan nanoparticles having higher degree of acetylation induce resistance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation. *Scientific reports*, 8(1): 1-14.
- Slusarenko, A.J., Patel, A. & Portz D. 2008. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. In: Collinge DV, Munk L, Cooke BM, editors. *Sustainable disease management in a European context*. Dordrecht, Springer. P. 313-322.
- Smith, P. L. & Gledhill, D. 1983. Anatomy of the endophyte of *Viscum album* L.(Loranthaceae). *Botanical journal of the Linnean Society*, 87(1): 29-53.
- Sotelo-Boyás, M. E., Valverde-Aguilar, G., Plascencia-Jatomea, M., Correa-Pacheco, Z. N., Jiménez-Aparicio, A., Solorza-Feria, J. & Bautista-Baños, S. (2015). Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. *in vitro* effect on *Pectobacterium carotovorum*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 14(3): 589-599.
- Taheri, P. & Tarighi, S. 2010. Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of plant physiology*, 167(3): 201-208.
- Tatsimo, S. J. N., de Dieu Tamokou, J., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J. & Tane, P. 2012. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research notes*, 5(1): 1-6
- Tsuda, K. & Katagiri, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current opinion in plant biology*, 13(4): 459-465
- Ujváry, I. 2002. Transforming natural products into natural pesticides-experiences and expectations. *Phytoparasitica*, 30: 439-441.
- Ulloa, A. G. 2018. Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidasas en plantas modelo (Doctoral dissertation, Universidade da Coruña). Consulta 1 abril 2021. Disponible en: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/21412/GarciaUlloa_Alba_TD_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Usman, H., Abdulrahman, F.I. & Usman, A. 2009. Qualitative phytochemical screening and *in vitro* antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficus thonningii* (Moraceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 6(3): 289-295.
- Van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135-162.

- Velásquez, C. L. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en química*, 1(2): 15-21.
- Vemmer, M. & Patel, A.V. 2013. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67: 380-389
- Villacencio -Gutierrez, E. E., Cano-Pineda, A. & Garcia-Cuevas, X. 2010. Metodología para determinar las existencias de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila [Folleto]. Saltillo, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M. & Martínez-Escudero, E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2): 194-205.
- Viñas, I., Teixidó, N., Abadías, M., Torres, R. & Usall, J. 2006. Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas. *Innovaciones fisiológicas y tecnológicas de la maduración postcosecha de frutas y hortalizas*. Ed. D. Valero y M. Serrano. Orihuela, Alicante, España, 263-373.
- Walters, D. R., Ratsep J. & Havis N. D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of experimental botany*, 64(5): 1263-1280
- Wang, W., Ben-Daniel, B.H. & Cohen, Y. 2004. Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology*, 94: 1042-1047.
- Wang, Y., Bian, W., Ren, X., Song, X. & He, S. 2018. Microencapsulation of clove essential oil improves its antifungal activity against *Penicillium digitatum* *in vitro* and green mould on Navel oranges. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93: 159-166.
- Warris, A. & Ballou, E. R. 2019. Oxidative responses and fungal infection biology. *Seminars in cell & developmental biology*, 89: 34-46.
- Yang, J., Shen, Z., Sun, Z., Wang, P. & Jiang, X. 2020. Growth Stimulation Activity of Alginate-Derived Oligosaccharides with Different Molecular Weights and Mannuronate/Guluronate Ratio on *Hordeum vulgare* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-10.
- Yang, Y., & Zhang, T. 2019. Antimicrobial activities of tea polyphenol on phytopathogens: A review. *Molecules*, 24(4): 816
- Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and environmental microbiology*, 65(3): 1061-1070.
- Zagzog, O.A., Gad, M.M. & Hafez, N.K. 2017. Effect of Nano-chitosan on Vegetative Growth, Fruiting and Resistance of Malformation of Mango. *Trends in Horticultural Research. Res.* (6): 673-681.
- Zenil-Lugo, N., Colinas-León, M., Bautista-Bañuelos, C., Vázquez-Rojas, T. R., Lozoya-Saldaña, H. & Martínez-Damián, M. 2014. Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con

- los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(6): 1029-1039.
- Zhang, S., Tang, W., Jiang, L., Hou, Y., Yang, F., Chen, W. & Li, X. 2015. Elicitor activity of algino-oligosaccharide and its potential application in protection of rice plant (*Oryza saliva* L.) against *Magnaporthe grisea*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(4): 646-652.
- Zhao, Y. L., Wang, X. Y., Sun, L. X., Fan, R. H., Bi, K. S. & Zhi, G. Y. 2012. Cytotoxic constituents of *Viscum coloratum*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 67(3-4): 129-134.
- Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S.T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T. & Tabatabaei, M. 2015. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 69: 251-256.
- Zheng, F., Chen, L., Zhang, P., Zhou, J., Lu, X. & Tian, W. 2020. Carbohydrate polymers exhibit great potential as effective elicitors in organic agriculture: A review. *Carbohydrate Polymers*, 230: 115-637.
- Zulfiqar, F., Casadesús, A., Brockman, H. & Munné-Bosch S. 2020. An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. *Plant Science*, 295: 110194.

ANEXOS

Anexo A.1. Altura de plantas (cm) de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	39.5	41.5	41.0	34.0	49.5	46.5
2.-Químico	41.5	41.5	41.0	40.0	47.5	47.5
3-.NPs de Extractos Vegetales	51.0	41.5	51.5	57.5	50.0	54.5
4-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	47.5	48.5	50	47.0	52.5	54.5
5.-Testigo absoluto	43.5	43.5	46.5	47.0	46.5	48.5

Anexo A.2. Análisis de varianza para altura de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	291.0500000	72.7625000	18.92	<.0001
Error	25	96.1250000	3.8450000		
Total	29	387.1750000			
C.V.	5.37%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo B.1. Longitud de raíz (cm) de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	34.5	31.5	38	40	37	28.5
2.-Químico	24	31	34.5	26.5	38.5	26.5
3.-NPs de Extractos Vegetales	43	43.5	35	41	37	34
4.-Mezcla de Extractos sin Encapsular	36.5	34.5	41	40	37	30
5.-Testigo absoluto	40.5	33.5	39.5	33	37.5	36.5

Anexo B.2. Análisis de varianza para Longitud de raíz (cm) de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de

invernadero.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	258.0500000	64.5125000	3.52	0.0206
Error	25	457.6250000	18.3050000		
Total	29	715.6750000			
C.V.	12.06				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo C.1. Diámetro de tallo (mm) de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	11.44	10.95	10.32	11.09	11.37	9.40
2.-Químico	11.34	10.05	10.04	10.75	11.16	10.05
3.-NPs de Extractos Vegetales	12.72	11.82	11.80	12.65	12.6	11.35
4.-Mezcla de Extractos sin Encapsular	13.22	13.35	13.53	12.19	12.40	13.78
5.-Testigo absoluto	13.54	12.14	11.37	10.35	10.99	11.66

Anexo C.2. Análisis de varianza para diámetro de tallo de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza						
FV	GL	SC	CM	F	P>F	
Tratamientos	4	25.64765000	6.41191250	11.01	<.0001	
Error	25	14.55505417	0.58220217			
Total	29	40.20270417				
C.V.	6.55					
Nivel de significancia	0.05					

Anexo D.1. Clorofila en hojas (Unidades SPAD) de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	55.40	54.40	62.40	53.20	38.43	61.40
2.-Químico	56.60	56.85	55.65	55.20	53.90	60.10
3-.NPs de Extractos Vegetales	89.20	54.6	61.25	68.65	59.10	98.55
4-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	90.6	93.20	64.20	58.60	59.40	88.25
5-.Testigo absoluto	67.15	56.80	58.05	54.25	76.75	56.20

Anexo D.2. Análisis de varianza para clorofila en hojas de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	2156.328353	539.082088	3.60	0.0189
Error	25	3744.298583	149.771943		
Total	29	5900.626937			
C.V.	19.13%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo E.1. Peso seco de biomasa aérea (g) de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	40.55	40.65	38.55	36.35	32.70	35.35
2.-Químico	38.75	24.05	27.85	35.15	38.05	27.70
3-.NPs de Extractos Vegetales	44.50	36.90	39.65	35.10	42.10	35.00
4-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	47.9	42.15	41.20	42.00	40.70	52.45
5-.Testigo absoluto	46.65	46.45	36.50	41.20	39.85	49.55

Anexo E.2. Análisis de varianza para peso seco de biomasa aérea de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	604.937833	151.234458	6.87	0.0007
Error	25	550.507917	22.020317		
Total	29	1155.445750			
C.V.	11.97%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo F.1. Peso seco de raíz (g) de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	46.22	46.22	46.22	46.22	46.22	46.22
2.-Químico	28.97	28.97	28.97	28.97	28.97	28.97
3.-NPs de Extractos Vegetales	92.97	92.97	92.97	92.97	92.97	92.97
4.-Mezcla de Extractos sin Encapsular	77.27	77.27	77.27	77.27	77.27	77.27
5.-Testigo absoluto	48.92	48.92	48.92	48.92	48.92	48.92

Anexo F.2. Peso seco de raíz de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	15926.43000	3981.60750	2.1916	<.0001
Error	25	0.00000	0.00000		
Total	29	15926.43000			
C.V.	57.24%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo G.1. Número de flores en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	9.5	12.5	14.5	8.5	11.5	13.0
2.-Químico	10.0	10.5	9.0	8.5	9.5	11.5
3-.NPs de Extractos Vegetales	11.0	10.0	24.5	15.0	15.5	12.0
4-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	9.0	11.0	13.5	10.0	16.0	13.0
5-.Testigo absoluto	9.0	11.0	21.0	16.0	16.5	14.5

Anexo G.2. Número de flores en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F

Tratamientos	4	104.9500000	26.2375000	2.22	0.0952
Error	25	294.9166667	11.7966667		
Total	29	399.8666667			
C.V.	27.33%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo H.1. Frutos cuajados de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	2.0	2.5	5.5	1.5	3.0	4.5
2.-Químico	2.0	4.0	4.5	0.5	2.5	2.0
3-.NPs de Extractos Vegetales	5.0	4.0	9.5	6.5	7.5	8.0
4-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	2.0	4.5	5.5	6.0	6.5	8.0
5-.Testigo absoluto	5.0	3.5	2.0	8.5	6.0	3.0

Anexo H.2. Frutos cuajados de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	19.3416667	3.8683333	0.66	0.6562

Error	24	140.4000000	5.8500000
Total	29	159.7416667	
C.V.	53.55%		
Nivel de significancia	0.05		

Anexo I.1. Peso de frutos (g) de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	37.9	37.9	37.9	37.9	37.9	37.9
2.-Químico	38.8	39.7	39.7	39.7	39.7	39.7
3-.NPs de Extractos Vegetales	135.9	135.9	135.9	135.9	135.9	135.9
4-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2
5-.Testigo absoluto	87.2	87.25	87.2	87.2	87.2	87.2

Anexo I.2. Peso de frutos de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	39184.60533	9796.15133	361704	<.0001
Error	25	0.67708	0.02708		

Total	29	39185.28242
C.V.	1.21%	
Nivel de significancia	0.05	

Anexo J.1. Diámetro ecuatorial (mm) de frutos de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	17.76	17.79	11.17	13.32	12.41	12.04
2.-Químico	17.83	12.39	19.31	12.31	12.71	12.36
3.-NPs de Extractos Vegetales	23.61	19.29	25.38	23.69	18.91	24.46
4.-Mezcla de Extractos sin Encapsular	19.62	22.95	21.91	13.56	19.83	9.18
5.-Testigo absoluto	20.91	26.38	24.41	19.39	15.65	20.42

Anexo J.2. Análisis de varianza para diámetro ecuatorial de frutos de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	124.6558967	24.9311793	1.04	0.4169
Error	24	575.0215200	23.9592300		

Total	29	699.6774167
C.V.	27.10%	
Nivel de significancia	0.05	

Anexo K.1 Diámetro polar (mm) de frutos de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
1.-Testigo inoculado	21.29	23.28	21.67	23.58	19.51	20.70
2-.Químico	34.71	18.39	21.07	24.55	18.43	18.39
3-.NPs de Extractos Vegetales	34.62	33.49	42.68	39.51	30.12	38.15
4-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	28.58	35.71	34.74	22.33	30.96	22.19
5-.Testigo absoluto	32.97	39.58	29.18	30.31	28.70	31.22

Anexo K.2. Análisis de varianza para diámetro polar de frutos de plantas tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al final del ensayo bajo condiciones de invernadero.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	112.816857	22.563371	0.39	0.8534
Error	24	1402.672040	58.444668		

Total	29	1515.488897
C.V.	26.96	
Nivel de significancia	0.05	

Anexo L.1. Actividad de PAL en plantas de tomate a las 0 y 3 h después de la aspersión.

Tratamiento	Horas después de la aspersión					
	0			3		
	Repeticiones					
	1	2	3	1	2	3
1-.NPs de Extractos Vegetales	483.80	495.06	495.33	483.80	495.06	495.33
2-.NPs sin cargar	501.46	465	484.26	469.73	477.86	473.33
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	483.46	352.40	490.66	491.86	404.80	434.33
4-.Testigo absoluto)	164.53	159.33	236.00	131.13	165.73	365.73

Anexo L.2. Actividad de PAL en plantas de tomate a las 6 y 12 h después de la aspersión.

Tratamiento	Horas después de la aspersión					
	6			12		
	Repeticiones					
	1	2	3	1	2	3
1-.NPs de Extractos Vegetales	513.06	543.26	482.66	535.13	515.80	521.93
2-.NPs sin cargar	493.73	504.53	480.93	525.73	487.66	462.33
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	512.86	455.40	421.80	535.00	492.26	470.20
4-.Testigo absoluto	164.40	231.06	310.06	134.93	144.60	285.40

Anexo L.3. Actividad de PAL en plantas de tomate a las 24 y 48 h después de la aspersión.

Tratamiento	Horas después de la aspersión					
	24			48		
	Repeticiones					
	1	2	3	1	2	3
1-.NPs de Extractos Vegetales	547.86	507.13	515.60	560.26	546.20	541.33

2-.NPs sin cargar	477.66	452.8	474.33	456.66	480.33	467.6
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	547.80	505.46	435.93	428.66	428.33	505.66
4-.Testigo absoluto	168.20	232.06	170.20	164.20	200.93	198.80

Anexo L.4. Análisis de varianza de actividad de PAL en plantas de tomate a las 0 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	187931.7795	62643.9265	30.30	0.0001
Error	8	16537.8672	2067.2334		
Total	11	204469.6467			
C.V.	11.34%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo L.5. Análisis de varianza de actividad de PAL en plantas de tomate a las 3 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	145756.9941	48585.6647	10.71	0.0036
Error	8	36297.6990	4537.2124		
Total	11	182054.6931			
C.V.	16.47				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo L.6. Análisis de varianza de actividad de PAL en plantas de tomate a las 6 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	149626.0016	49875.3339	23.48	0.0003
Error	8	16989.9755	2123.7469		

Total	11	166615.9771
C.V.	10.81 %	
Nivel de significancia	0.05	

Anexo L.7. Análisis de varianza de actividad de PAL en plantas de tomate a las 12 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	227555.6231	75851.8744	32.64	<.0001
Error	8	18589.2402	2323.6550		
Total	11	246144.8633			
C.V.	11.31				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo L.8. Análisis de varianza de actividad de PAL en plantas de tomate a las 24 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	215139.1949	71713.0650	55.67	<.0001
Error	8	10304.9278	1288.1160		
Total	11	225444.1227			
C.V.	8.55 %				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo L.4. Análisis de varianza de actividad de PAL en plantas de tomate a las 48 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	221802.1164	73934.0388	111.73	<.0001
Error	8	5293.8595	661.7324		

Total	11	227095.9759
C.V.	6.19 %	
Nivel de significancia	0.05	

Anexo M.1. Actividad de POD en plantas de tomate a las 0 y 3 h después de la aspersión.

Tratamiento	Horas después de la aspersión					
	0			3		
	Repeticiones					
	1	2	3	1	2	3
1-.NPs de Extractos Vegetales	59.65	61.35	46.96	55.45	55.63	51.71
2-.NPs sin cargar	34.85	39.00	24.26	37.33	36.05	34.06
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	44.85	59.00	54.26	53.33	52.05	50.06
4-.Testigo absoluto	26.05	27.65	22.95	31.85	28.6	27.78

Anexo M.2. Actividad de POD en plantas de tomate a las 6 y 12 h después de la aspersión.

Tratamiento	Horas después de la aspersión					
	6			12		
	Repeticiones					
	1	2	3	1	2	3
1-.NPs de Extractos Vegetales	46.20	58.46	48.21	18.76	68.63	48.21
2-.NPs sin cargar	39.00	39.00	34.26	33.65	40.33	46.13
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	49.00	45.00	50.26	35.65	40.33	36.13
4-.Testigo absoluto	38.16	22.7	30.75	62.51	33.63	7.41

Anexo M.3. Actividad de POD en plantas de tomate a las 24 y 48 h después de la aspersión.

Tratamiento	Horas después de la aspersión					
	24			48		
	Repeticiones					
	1	2	3	1	2	3

1-.NPs de Extractos Vegetales	33.65	41.80	49.85	49.45	35.43	30.80
2-.NPs sin cargar	49.98	54.05	57.63	49.68	50.65	70.03
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	39.98	34.05	37.63	39.68	30.65	38.03
4-.Testigo absoluto	25.06	42.28	22.9	33.6	41.4	15.08

Anexo M.4. Análisis de varianza de actividad de POD en plantas de tomate a las 0 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	2000.818692	666.939564	15.06	0.0012
Error	8	354.378200	44.297275		
Total	11	2355.196892			
C.V.	15.94 %				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo M.5. Análisis de varianza de actividad de POD en plantas de tomate a las 3 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	1322.253900	440.751300	117.84	<.0001
Error	8	29.923000	3.740375		
Total	11	1352.176900			
C.V.	4.51 %				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo M.6. Análisis de varianza de actividad de POD en plantas de tomate a las 6 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	808.211400	269.403800	9.13	0.0058
Error	8	236.107600	29.513450		
Total	11	1044.319000			
C.V.	13.01 %				

Nivel de 0.05
significancia

Anexo M.7. Análisis de varianza de actividad de POD en plantas de tomate a las 12 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	185.869158	61.956386	0.17	0.9118
Error	8	2867.544733	358.443092		
Total	11	3053.413892			
C.V.	48.19 %				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo M.8. Análisis de varianza de actividad de POD en plantas de tomate a las 24 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	899.744633	299.914878	5.94	0.0197
Error	8	403.950333	50.493792		
Total	11	1303.694967			
C.V.	17.44 %				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo M.9. Análisis de varianza de actividad de POD en plantas de tomate a las 48 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	1193.490133	397.830044	3.68	0.0623
Error	8	863.922733	107.990342		
Total	11	2057.412867			
C.V.	25.73 %				

Nivel de 0.05
significancia

Anexo N.1. Actividad de SOD en plantas de tomate a las 0 y 3 h después de la aspersión.

	Horas después de la aspersión					
	0			3		
	Repeticiones					
Tratamiento	1	2	3	1	2	3
1-.NPs de Extractos Vegetales	8.20	6.05	27.76	56.58	18.74	12.66
2-.NPs sin cargar	17.17	22.05	29.46	27.89	19.97	19.15
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	61.97	28.51	41.51	110.38	64.46	92.48
4-.Testigo absoluto	20.23	26.35	3.25	20.10	20.05	20.87

Anexo N.2. Actividad de SOD en plantas de tomate a las 6 y 12 h después de la aspersión.

	Horas después de la aspersión					
	6			12		
	Repeticiones					
Tratamiento	1	2	3	1	2	3
1-.NPs de Extractos Vegetales	20.64	75.15	92.38	74.43	99.61	176.17
2-.NPs sin cargar	26.05	10.25	31.79	35.28	42.02	67.15
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	143.64	87.38	122.25	87.94	74.41	93.07
4-.Testigo absoluto	20.58	20.92	20.53	20.41	20.94	20.41

Anexo N.3. Actividad de SOD en plantas de tomate a las 24 y 48 h después de la aspersión.

	Horas después de la aspersión					
	24			48		
	Repeticiones					
Tratamiento	1	2	3	1	2	3

1-.NPs de Extractos Vegetales	26.82	54.48	116.64	68.74	51.97	56.33
2-.NPs sin cargar	30.76	49.61	57.92	32.94	48.56	48.12
3-.Mezcla de Extractos sin Encapsular	71.43	98.89	59.53	78.46	73.35	76.64
4-.Testigo absoluto	20.43	20.38	30.15	20.28	30.79	9.05

Anexo N.4. Análisis de varianza de actividad de SOD en plantas de tomate a las 0 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	1665.215492	555.071831	3.64	0.0637
Error	8	1218.291600	152.286450		
Total	11	2883.507092			
C.V.	50.67 %				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo N.5. Análisis de varianza de actividad de SOD en plantas de tomate a las 3 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	9670.75702	3223.58567	11.46	0.0029
Error	8	2251.00980	281.37623		
Total	11	11921.76683			
C.V.	41.64				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo N.6. Análisis de varianza de actividad de SOD en plantas de tomate a las 6 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	18647.80080	6215.93360	10.66	0.0036
Error	8	4666.76887	583.34611		
Total	11	23314.56967			

C.V.	43.15
Nivel de significancia	0.05

Anexo N.7. Análisis de varianza de actividad de SOD en plantas de tomate a las 12 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	15931.82473	5310.60824	6.67	0.0144
Error	8	6365.75673	795.71959		
Total	11	22297.58147			
C.V.	41.69 %				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo N.8. Análisis de varianza de actividad de SOD en plantas de tomate a las 24 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	4905.24047	1635.08016	2.38	0.1455
Error	8	5497.80760	687.22595		
Total	11	10403.04807			
C.V.	49.38 %				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo N.) Análisis de varianza de actividad de SOD en plantas de tomate a las 48 h después de la aspersión.

Análisis de varianza					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	5124.544892	1708.181631	24.43	0.0002
Error	8	559.436733	69.929592		
Total	11	5683.981625			

C.V.	16.85 %
Nivel de significancia	0.05
