

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EVALUACIÓN *in vitro* DE NANOPARTÍCULAS CON METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *Bacillus amyloliquefaciens* SOBRE HONGOS  
FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA

Tesis

Que presenta ANTONIO OROZCO PLANCARTE

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Julio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EVALUACIÓN *in vitro* DE NANOPARTÍCULAS CON METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *Bacillus amyloliquefaciens* SOBRE HONGOS  
FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA

Tesis

Que presenta ANTONIO OROZCO PLANCARTE

como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Dr. Ernesto Cerna Chávez  
Director UAAAN

Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez  
Director Externo

Saltillo, Coahuila

Julio 2022

EVALUACIÓN *in vitro* DE NANOPARTÍCULAS CON METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *Bacillus amyloliquefaciens* SOBRE HONGOS  
FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA

Tesis

Elaborada por ANTONIO OROZCO PLANCARTE como requisito parcial para  
obtener el grado de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola con la  
supervisión y aprobación del comité de asesoría



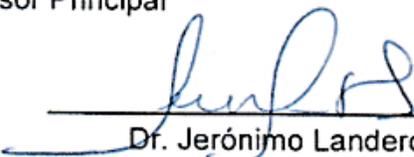
---

Dr. Ernesto Cerna Chávez  
Asesor Principal



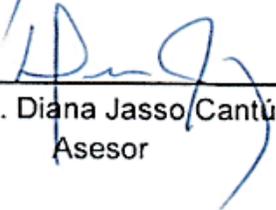
---

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes  
Asesor



---

Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Asesor



---

Dra. Diana Jasso Cantú  
Asesor



---

Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez  
Asesor



---

Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

## **Agradecimientos**

A Dios, por fortalecerme emocionalmente, por poner en mi camino a aquellas personas que me han brindado su apoyo y compañía durante todo mi desarrollo profesional.

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo económico a través de la beca durante el postgrado.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro a través del Departamento de Parasitología Agrícola, por la formación académica, la experiencia y el apoyo otorgado en mi formación como Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola.

A la empresa CULTA S.A. de C.V., por el apoyo y el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez, por la amistad que me brindó durante todo este tiempo, por la confianza que ha depositado en mí para participar en sus proyectos de investigación, inculcándome nuevos retos y conocimientos para ser un buen profesional.

A la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes, por todo el apoyo que me ha brindado para ser una mejor persona ética y profesional, además de su asesoramiento y facilidades para la realización de la presente tesis.

Al Dr. Jerónimo Landeros Flores, por el apoyo, comprensión, disposición y confianza durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Diana Jasso Cantú, por todo el apoyo incondicional y conocimientos compartidos durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez, por la contribución, apoyo y amable disponibilidad en el desarrollo y culminación de este proyecto.

A mis padres, Antonio Orozco Crescencio (*t*) y Angélica Plancarte Estrada, por su tiempo, cariño y consejos para ser una mejor persona.

## **Dedicatoria**

El presente trabajo está dedicado especialmente a mi esposa Orlanda Antonio del Ángel por apoyarme en los momentos de alegría, situaciones difíciles y tristes que la vida me ha puesto a prueba, a mis hijas: Yoletzy Orozco Antonio, Andrea Orozco Antonio y Ximena Orozco Antonio por ser mi mayor motivación.

¡Gracias por estar conmigo en todo momento!

## Carta de aceptación de artículos



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**“Estudio en la Duda. Acción en la Fe”**  
Secretaría de Investigación, Posgrado y Vinculación  
Dirección de Difusión y Divulgación Científica y Tecnológica

### DICTAMEN

**Ecosistemas y Recursos Agropecuarios**

[era@ujat.mx](mailto:era@ujat.mx)

Teléfono/fax 01.993.3 58 15 00 Ext. 5041

Villahermosa, Tabasco, a 21 de enero de 2022

Manuscrito--- **Efecto inhibitorio de nanotubos de carbono con metabolitos de Bacillus amyloliquefaciens sobre hongos fitopatógenos**

Registro --- **3155 ERA**

Autores --- **Antonio Orozco Plancarte, Ernesto Cerna Chávez, Yisa María Ochoa Fuentes, Jerónimo Landeros Flores, Diana Jasso Cantu, Iliana Ernestina Medina Ramírez, Víctor Olalde Portugal**

Dictamen --- **Aceptada con correcciones**

*Comentarios---* Los revisores indican que la investigación es novedosa, pero también coinciden en indicar que se requieren realizar cambios para que pueda publicar. Dentro de las principales observaciones se encuentran los siguientes: La introducción se lee muy saturada por tener solamente dos párrafos extremadamente largos, se sugiere organizarla mejor y hablar la generalidad de la nanotecnología antes de entrar en el tema. El apartado de resultados y discusión debe de presentarse de forma ordenada, por ejemplo, en la parte de los PCR, se recomienda poner los gels con el tamaño de banda de cada patógeno analizado. En los enfrentamientos realizados sería bueno presentar figuras, además de indicar el tiempo en que se logró la inhibición declarada con y sin los nanotubos. Aunque se demuestra claramente que se necesitan menos dosis de los nanotubos y los metabolitos de la bacteria que de la bacteria sola no queda claro el costo de estos nanotubos y la accesibilidad para los productores, lo cual es importante declarar para la aplicación de la investigación. Otras observaciones se encuentran en los manuscritos adjuntos, en la versión corregida marcar en color los cambios realizados y anexar carta donde se respondan las observaciones de los revisores.

En espera de la versión corregida en un plazo de dos semanas, me despido con saludos.

Dr. Efraín de la Cruz Lázaro  
Editor

Archive Move Delete Spam X

[ERA] Decisión del editor/a Yahoo/Inbox

**DL** Dr Efraín de la Cruz Lázaro editor + Add 1

To: Antonio Orozco Plancarte, Ernesto Cerna Chávez, Yisa María Ochoa Fuentes, Jeronimo Landeros Flores, Diana Jasso Cantú and 2 more...

Antonio Orozco Plancarte, Ernesto Cerna Chávez, Yisa María Ochoa Fuentes, Jeronimo Landeros Flores, Diana Jasso Cantú, Iliana Ernestina Medina Ramírez, Víctor Olalde Portugal:

Hemos tomado una decisión sobre su envío a Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, "EFECTO INHIBITORIO DE NANOTUBOS DE CARBONO CON METABOLITOS DE Bacillus amyloliquefaciens SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS".

Nuestra decisión es: **Aceptado**

Dr. Efraín de la Cruz Lázaro Editor Ecosistemas y Recursos Agropecuarios

Ecosistemas y Recursos Agropecuarios <http://era.ujat.mx>

B-3155 ace... .docx 1.42 KB

Reply, Reply All or Forward

Send



Recibi  
11 Feb 2022  
Dianita  
11:14 AM  
1/2

Texcoco, Estado de México, 19 de abril de 2022  
Núm. Ref.: 3140-22

**Dr. Ernesto Cerna-Chávez**  
Universidad Autónoma  
Agraria Antonio Narro  
Presente

Por este medio le agradezco y acuso de recibido su manuscrito científico intitulado: “**Efectividad de extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* con nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno sobre hongos fitopatógenos**” cuyos autores (as) son: **Antonio Orozco-Plancarte, Ernesto Cerna-Chávez, Yisa María Ochoa-Fuente, Jerónimo Landeros-Flores, Diana Jasso de Rodríguez y Anselmo Hernández-Pérez**, que fue propuesto para su posible publicación a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Le notificamos que el texto inicial del manuscrito, autores(as) principal y los coautores(as), autor(a) para correspondencia no podrán alterarse y quedarán como se envía en esta versión.

Asimismo, me permito informarle que su contribución será enviada a revisión técnica por los árbitros que se designen en la REMEXCA, en caso de ser aceptado se le notificará sobre las observaciones correspondientes.

Agradezco su colaboración y le envío un cordial saludo.

Atentamente

JSAPlhPWpRZ6tXw+VhUyyg==EN0Xfy6BnNRYwviTqOd3FD5IFPo=

**Dra. Dora Ma. Sangerman-Jarquín**  
Editora en Jefa de la Revista  
Mexicana de Ciencias Agrícolas

ccp\* archivo  
DMSJigap

Carretera Los Reyes- Texcoco, km 13.5. Coatlinehán, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56250  
E-mail: revista\_atm@yahoo.com.mx. Tel. 55 38 71 87 00 Ext. 85353

[Remexca] Acuse de recibo del envío

Yahoo/Inbox



**Dra. Dora M. Sangerman-Jarquin** <cienciasagricolas@inifap.gob.mx>  
To: Yisa María Ochoa Fuentes

Wed, Mar 30 at 12:40 PM

Yisa María Ochoa Fuentes:

Gracias por enviar el manuscrito "Efectividad de extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* con nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno sobre hongos fitopatógenos." a Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Con el sistema de gestión de publicaciones en línea que utilizamos podrá seguir el progreso a través del proceso editorial tras iniciar sesión en el sitio web de la publicación:

URL del manuscrito: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/authorDashboard/submission/3140>

Nombre de usuario/a: yochoafuentes

Si tiene alguna duda puede ponerse en contacto conmigo. Gracias por elegir esta editorial para mostrar su trabajo.

Dra. Dora M. Sangerman-Jarquin

**Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**

<https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/>



Reply, Reply All or Forward

Send



*Handwritten signature and date:*  
30/03/2022

*Handwritten receipt:*  
Recibi  
Vanita  
Olivero  
30/Marzo/2022.

## Introducción

En el año 2021, México ocupó el duodécimo lugar a nivel mundial en la producción de alimentos, undécimo lugar en producción mundial de cultivos con 265.1 millones de toneladas producidas anualmente y una derrama económica de 1 billón 241 mil 676 millones de pesos (SIAP, 2022). Tan solo en el sector agrícola ocupa el primer lugar en exportación de aguacate, jitomate, calabaza, mango y espárrago; segundo lugar en producción de pimientos, nuez y limón; tercer exportador de berries, brócoli, col, coliflor, pepino y lechuga; cuarto y quinto exportador de cebolla y café (SIAP, 2022).

Sin embargo, los cultivos se ven afectados por factores bióticos y abióticos, entre los factores bióticos las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, ocasionan daños graves en las plantas y sus frutos. Por lo que, enfermedades como la “Tristeza o marchitamiento” causada por los hongos *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, colonizan el tejido vascular de las plantas provocando un marchitamiento masivo, necrosis y clorosis de las partes aéreas (Ma *et al.*, 2013), el género *Fusarium* ocasiona daños en cultivos como: chile, tomate, papa, apio, fresa, entre otros (González *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013; Kenneth *et al.*, 2017; García *et al.*, 2018; Mariscal *et al.*, 2017).

Otra enfermedad es la “caspa negra o cancro en tallo de la papa”, es inducida por *Rhizoctonia solani* causando daños cuantitativos y cualitativos en los cultivos de papa en todo el mundo (Tsrer, 2010). Es uno de los hongos fitopatógenos con más presencia en el cultivo del chile (Gallegos *et al.*, 2022) y puede infectar a plantas de diferentes especies con importancia económica (Gour, 2012) en las que produce lesiones oscuras en raíces y semillas, pudrición de tallos y de las partes de la planta que están en contacto con el suelo (Pérez *et al.*, 2017).

Por otra parte, el “moho negro” causado por el hongo *Alternaria alternata* es la principal enfermedad de los frutos maduros de tomate (Coromoto y Reyes, 2018). Los síntomas varían desde pequeñas lesiones superficiales de color café claro hasta lesiones necróticas hundidas y en condiciones de alta humedad, produce una capa negra de conidios sobre el tejido infectado (Lawrence *et al.*, 2013). La especie *A. solani* causa la enfermedad conocida como “Tizón temprano” afectando principalmente a solanáceas entre ellas el tomate y la papa (Duarte *et al.*, 2013).

*Colletotrichum acutatum* es una de las especies más frecuentes del género *Colletotrichum* sp. y causa la enfermedad conocida como antracnosis en numerosas plantas hospedantes en todo el mundo (Farr y Rossman, 2021). El aguacate es una fruta de mayor importancia económica en México y se ve gravemente afectada por la enfermedad en plantas y frutos debido a la infección por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* (Campos *et al.*, 2016).

Actualmente, en el manejo de esta problemática, se hace uso del control químico aplicando de manera indiscriminada fungicidas sintéticos (Barocio, 2016), con las desventajas de que generan resistencia en fitopatógenos, eliminan microorganismos benéficos, contaminan el medio ambiente y perjudican la salud humana (Ramírez *et al.*, 2015).

Por lo que es necesario el desarrollo de alternativas más amigables con el medio ambiente, algunas de estas es el uso de extractos de plantas, microorganismos benéficos como es el caso de bacterias: *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* (Rodríguez *et al.*, 2013; Castañeda y Consuelo, 2016), especies de hongos del género *Trichoderma* sp. (Landeró *et al.*, 2015; Youssef *et al.*, 2016), controlando a diferentes patógenos de importancia agronómica. Así mismo, el uso de principios activos botánicos: D-limoneno,  $\beta$ -citronelol y eucaliptol (Cerna *et al.*, 2019; Barroso *et al.*, 2021) como también metabolitos secundarios: Iturinas, fengicinas y surfactinas de *Bacillus* sp. (Kim *et al.*, 2010).

Recientemente se ha desarrollado investigación para producir alimentos con niveles bajos de residuos de pesticidas, la nanotecnología surge como una herramienta novedosa, eficientando los productos agrícolas, mediante la incorporación de nanopartículas y nanomateriales como acarreadores de fertilizantes y plaguicidas con orientación al control de plagas y enfermedades (Lateef *et al.*, 2016).

Patil *et al.*, (2012), mencionaron que las nanopartículas son utilizadas para mejorar la eficiencia de los plaguicidas al aplicar menores concentraciones de formulados a base de nanopartículas de plata. En cuanto al desarrollo con fungicidas Sarlak *et al.* (2014), realizaron nanoencapsulados de Mancozeb y Zineb en nanotubos de carbono-sol-material híbrido PCA, para el control del hongo *Alternaria alternata*. Changanáquí *et al.* (2019), sintetizaron y caracterizaron nano compuestos  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ , probando su efecto contra bacterias de importancia médica.

## Justificación

Existe escasa información el uso de nanopartículas en el control de enfermedades fitopatógenas, a la fecha no hay estudios científicos sobre la utilización de metabolitos de *Bacillus amyloliquefaciens* con nanopartículas para el control de hongos fitopatógenos.

## Hipótesis

El uso de nanopartículas con metabolitos secundarios de *B. amyloliquefaciens* tendrán efecto inhibitorio superior al 60% sobre hongos fitopatógenos.

## Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de nanotubos de carbono de pared múltiple, nanopartículas de óxido de silicio y grafeno mezclados con metabolitos secundarios de *B. amyloliquefaciens* sobre hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*.

## Objetivos específicos

1. Aislar e identificar los fitopatógenos: *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum* y *A. alternata* de plantas y frutos.
2. Obtener metabolitos secundarios de *B. amyloliquefaciens* por fermentación en medios de cultivo líquido.
3. Funcionalizar nanotubos de carbono de pared múltiple y mezclar con metabolitos de *B. amyloliquefaciens*.
4. Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de nanotubos de carbono, nanopartículas de óxido de silicio y grafeno, funcionalizados y mezclados con metabolitos de *B. amyloliquefaciens* sobre el desarrollo micelial y formación de estructuras reproductivas de *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum* y *A. alternata*.

## Revisión de literatura

### Generalidades de los hongos fitopatógenos de importancia agrícola

#### Marchitez del chile (*Fusarium solani*)

Es una enfermedad causada por los hongos *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, siendo el género *Fusarium* uno de los fitopatógenos más importantes asociados al marchitamiento y a la reducción del rendimiento de chile habanero *Capsicum chinense* (Mejía *et al.*, 2016). Los hongos *Fusarium* spp. y *F. oxysporum* son asociados con mayor frecuencia a marchitez en un 100% de muestras de *Capsicum annum* L. de diferentes tipos de chile como serrano y jalapeño (Albañil *et al.*, 2015). Se han identificado a *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. equiseti* afectando al cultivo y reduciendo significativamente el rendimiento reportado pérdidas en producción de chile chilaca, reduciendo el rendimiento del cultivo en un 50% (Velarde *et al.*, 2018).

Las hifas del hongo penetran la raíz, colonizando el tejido vascular y a su vez, provocando un marchitamiento masivo, necrosis y clorosis de las partes aéreas de la planta (Ma *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2019). Además, el género *Fusarium* ocasiona daños en cultivos de tomate, papa, apio, fresa, entre otros (González *et al.*, 2012; Kenneth *et al.*, 2017; García *et al.*, 2018; Mariscal *et al.*, 2017).

En México, se ha reportado a *F. solani* como agente causal de marchitez y necrosis en raíz y tallo de chile chilaca en Queréndaro, Michoacán (Reyes *et al.*, 2019), marchitez en plantas de chile poblano en Puebla (Rivera *et al.*, 2018), Así mismo, se asocia a *F. oxysporum* a la marchitez en plantas de pimiento en invernaderos en Sinaloa (Velarde *et al.*, 2018).

#### Caspa negra o cancro en tallo de la papa (*Rhizoctonia solani*)

Esta enfermedad es inducida por *Rhizoctonia solani* causa daños tanto cuantitativos como cualitativos a los cultivos de papa afectando las partes de la planta y principalmente el rendimiento de tubérculos (Betancourth *et al.*, 2021).

Es uno de los hongos fitopatógenos de mayor incidencia en el cultivo del chile (Gallegos *et al.*, 2022), aunque también puede infectar a un extenso grupo de plantas de diferentes especies de importancia económica (Gour, 2012) en las que produce lesiones oscuras en raíces y semillas, pudrición de tallos y de las partes de la planta que están en contacto con el suelo (Pérez *et al.*, 2017).

Puede causar la muerte prematura de las plantas y ocasionar pérdidas en la producción entre 10% y 60%, esta enfermedad puede ser devastadora cuando las condiciones climáticas son favorables para el patógeno. A pesar de que se han intentado diferentes métodos de control (químicos y culturales) ninguno ha tenido éxito (Montero *et al.*, 2013).

### **Moho negro (*Alternaria alternata*)**

Esta enfermedad es ocasionada por *Alternaria alternata* produce daños severos en frutos de tomate en postcosecha, los frutos infectados presentan síntomas que varían desde pequeñas lesiones superficiales de color café claro, hasta lesiones necróticas hundidas (Coromoto y Reyes, 2018), en brócoli causa daños importantes afectando tallos y flores presentando manchas necróticas circulares de color café oscuro, esta enfermedad es asociada a la “Pudrición del florete de brócoli” (Fraire *et al.*, 2010).

Para el género *Alternaria* en general, la patogenicidad está determinada por la producción de toxinas que le confieren al fitopatógeno superar las defensas de vegetal, provocando muerte celular y lograr la colonización de los tejidos (Lawrence *et al.*, 2013). Algunas especies del género, como es el caso de *A. solani* causa la enfermedad conocida como “Tizón temprano” afecta principalmente a solanáceas entre ellas el tomate y la papa (Duarte *et al.*, 2013), siendo una de las más importantes en el cultivo de tomate a nivel mundial (Ricardo *et al.*, 2013).

Esta enfermedad ataca todos los órganos aéreos de la planta, provocando la defoliación total o parcial y reduce considerablemente el rendimiento en cultivos hortícolas (Flores *et al.*, 2013).

### **Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*)**

El hongo *Colletotrichum acutatum* es uno de las más frecuentes especies del género y causa enfermedades comúnmente conocidas como antracnosis en numerosas plantas hospedantes en todo el mundo (Farr y Rossman, 2021). El aguacate es una fruta de mayor importancia económica y se ve gravemente afectada por esta enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* en el estado de Morelos, México (Campos *et al.*, 2016).

Presenta lesiones características: manchas pardo-negras en el exocarpio y podredumbre blanda en el mesocarpio, en las hojas se manifiesta como manchas de color café con un halo clorótico y puede provocar defoliación si la incidencia es alta, en las flores aparece como tizón y provoca la caída o aborto de fruto, en las ramas se observan manchas circulares color café o púrpura que rápidamente se necrosan (Campos *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la antracnosis causa graves daños en la producción de aguacate, siendo la enfermedad de postcosecha más importante en muchas regiones y en todos los países productores (Dann *et al.*, 2013). Esta enfermedad es de mayor importancia ya que ocasiona pérdidas económicas considerables y afecta la calidad de frutos de aguacate generando mermas en la producción (Trinidad *et al.*, 2017).

### **Manejo de hongos fitopatógenos**

Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos afectan diversos cultivos, ocasionan daños severos en las áreas de producción por lo que se traduce en pérdidas económicas considerables (Pedraza *et al.*, 2019), incrementan la demanda de frutas, verduras y derivados, se eleva el precio y reducen la vida de anaquel en postcosecha ocasionando pérdidas hasta de un 100% (Landeró *et al.*, 2016).

Actualmente, el manejo de las enfermedades fúngicas que más se ha utilizado es el control químico, usando diferentes fungicidas sintéticos e integrados en prácticas culturales son los que han dado mejores resultados (Barocio, 2016) sin embargo, han ocasionado daños severos a organismos de control biológico, generando problemas de resistencia de patógenos debido a las múltiples aplicaciones (Lamichhane *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2017), contaminan el medio ambiente y por consecuencia daños a la salud humana (Ramírez *et al.*, 2015; Mahmood *et al.*, 2016).

La necesidad de manejar esta problemática, nos ha conducido a la búsqueda de alternativas de manejo, que sean de bajo costo, menor impacto, sin que dañen el cultivo y el medio ambiente para el control de enfermedades; algunas de estas estrategias son: el uso de extractos vegetales, microorganismos antagónicos y metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas.

### **Extractos vegetales**

Son sustancias de origen vegetal, elaboradas con solventes orgánicos, son biodegradables, no perjudican la salud humana y el medio ambiente. Los tipos de extractos están relacionados al solvente usado para su elaboración los más comunes son: etanólicos, hexánicos, cetónicos, metanólicos, oleosos y acuosos (Nava *et al.*, 2010; Centurión *et al.*, 2013).

Como evidencia de control de hongos fitopatógenos con estas sustancias, varios investigadores han realizado extractos de diferentes plantas y los han probado; por lo que, Ochoa *et al.* (2012) reportaron la actividad antifúngica *in vitro* de varios extractos: pirul (*Shinus molle*), chirimoya (*Annona cherimola*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y tabaquillo (*Nicotiana glauca*) sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*, evidenciando efectos de control desde 30% hasta 89%, respectivamente.

Puñelas *et al.*, 2017 reportaron que extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de *Larrea tridentata* inhibieron el crecimiento micelial y reducen la presencia de síntomas de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate en invernadero.

Mientras que Jasso de Rodríguez *et al.* (2019) reportaron que los extractos etanólicos de *Juglans mollis* (4 000 mg L), *J. microcarpa* (5 000 mg L) y *Cayra ovata* (5 000 mg L) reducen la incidencia y severidad de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate.

### **Uso de microorganismos antagonicos**

Los microorganismos que se utilizan con frecuencia para el control de hongos fitopatógenos son hongos y bacterias. Varios estudios científicos han demostrado que los hongos del género *Trichoderma* sp. muestran efectos antagonicos contra fitopatógenos (López *et al.*, 2017).

Landero *et al.* (2015) mencionó que la especie *T. harzianum* inhibe el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo de papaya (*Carica papaya*), esta especie promueve el crecimiento de las plantas y ejerce control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* (Guedez *et al.*, 2012; Youssef *et al.*, 2016). Por su parte, Toghueo *et al.* (2016) reportó que la especie *T. atroviride* inhibe el patógeno *F. solani* y promueve el crecimiento en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

En el caso de las bacterias, se han utilizado las bacterias del género *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. con propiedades inhibitorias en pruebas de confrontación frente a los patógenos *R. solani* y *F. oxysporum* (Rodríguez *et al.*, 2013). Rodríguez *et al.* (2017) evidenció que *Bacillus* sp. logró restringir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 78%, respectivamente.

Hernández *et al.* (2010) reportaron que la cepa *Bacillus subtilis* tiene efecto biocontrolador ya que reduce la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir la actividad infectiva de *R. solani* y *Fusarium* sp. en plantas de tomate. Además, las cepas *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. cereus* poseen efecto de control sobre *Fusarium* sp. (Castañeda y Consuelo, 2016).

## Usos de metabolitos secundarios con acción antifúngica

Los metabolitos secundarios son compuestos sintetizados por el metabolismo de diferentes organismos como las plantas, hongos y bacterias. Barroso *et al.* (2021) mencionan que los principios activos botánicos (PABs) son una alternativa para el control de hongos fitopatógenos debido a la actividad antifúngica que poseen, en su estudio evaluaron de manera *in vitro* tres compuestos botánicos: D-limoneno,  $\beta$ -citronelol y eucaliptol sobre *Colletotrichum acutatum* y reportaron que  $\beta$ -citronelol mostró inhibición de crecimiento micelial de 29 a 89%.

Los compuestos antes mencionados son monoterpenos y se encuentran de forma natural en aceites esenciales de plantas (Sharma *et al.*, 2016). Cerna *et al.* (2019) señalaron que  $\beta$ -citronelol presentó efecto inhibitorio micelial de hongos fitopatógenos como *F. oxysporum* y *R. solani*.

Por otra parte, las bacterias del género *Bacillus* sp., tienen particular interés por la producción de metabolitos secundarios, con propiedades antifúngicas sobre los hongos del género *Fusarium* y *Rhizoctonia*, oomycetos del género *Pythium* y *Phytophthora* (Yesid y Sánchez, 2012).

Habe *et al.* (2017) indicaron que *B. subtilis* produce lipopéptidos (surfactinas e iturina A), considerados como compuestos antifúngicos sobre *R. solani* (Rezuanul *et al.*, 2012). Por su parte, Kim *et al.* (2010) mencionan que *Bacillus* es capaz de producir tres familias de lipopéptidos como Iturinas, fengicinas y surfactinas.

Así mismo, Zouari *et al.* (2016) reportaron la presencia de las tres familias de lipopéptidos presentes en extractos de *B. amyloliquefaciens*. Soares *et al.* (2015) señalaron porcentajes de inhibición de 62.7% en *A. tenuissima*, 55.9% en *A. alternata*, 41.3% en *F. oxysporum* y 57.4% en *C. gloeosporioides*, usando cepas de *B. amyloliquefaciens*.

## **Nanotecnología**

La nanotecnología se define como la tecnología que aborda nuevos materiales, sistemas y procesos que funcionan a escala de 1-100 nanómetros (nm), también estudia la manipulación de materiales y la creación de estructuras y sistemas a escala de átomos y moléculas (Lugo *et al.*, 2010).

## **Nanopartículas**

Son nanomateriales ubicados en escala nanométrica, algunos ejemplos son nanoesferas y nanohilos o nanoalambres de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) con diámetros de 50 nm a 100 nm y longitudes de 10  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  (Pukird *et al.*, 2017), nanotubos de carbono de pared simple y múltiple (SWCNT y MWCNT) (Andrade *et al.*, 2012), nanopartículas metálicas: cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn), plata (Ag), titanio (Ti) entre otros (Adhikari *et al.*, 2016; Aouada y De Moura, 2015; Prabhu y Poulouse, 2012). Nanopartículas orgánicas como: micelas, vesículas, liposomas, dendrímeros y cápsulas (Perni *et al.*, 2015).

## **Importancia de la nanotecnología en la agricultura**

La aplicación de la nanotecnología en el sector agroalimentario es uno de los campos de más rápido crecimiento en la nano-investigación, lo que implica producir alimentos en cantidad y de calidad (Lira *et al.*, 2018).

En el enfoque de producir alimentos libres de residuos de pesticidas o con niveles por debajo de los permitidos, la nanotecnología se orienta como un avance tecnológico y científico ya que puede modificar sectores de la agricultura facilitando herramientas novedosas para la detección molecular de estrés biótico y abiótico, así como la detección de fitopatógenos y el mejoramiento en la capacidad de las plantas para absorber el agua, nutrientes y los pesticidas (Khot *et al.*, 2012; Nuruzzaman *et al.*, 2016).

Las nanopartículas poseen propiedades: mayor reactividad química, son más bioactivas que las partículas más grandes, por su tamaño, tienen mejor acceso a cualquier cuerpo, células, tejidos y órganos. Gracias a estas propiedades ofrecen

un área de oportunidad en el desarrollo de nuevas tecnologías para la aplicación en diferentes áreas de la industria y agricultura, mientras que los nanomateriales ofrecen innovación a los productos alimenticios, agroquímicos y fertilizantes haciéndolos más eficaces (Lugo *et al.*, 2010).

Convencionalmente las nanopartículas se sintetizan por métodos químicos, usando productos químicos como agentes reductores que más tarde se convierten en diversos riesgos biológicos debido a su alto grado de toxicidad general, sembrando la grave preocupación para desarrollar procesos más amigables con el medio ambiente (Ahmed *et al.*, 2016).

Por lo tanto, hay enfoques biológicos que resultan prometedores por ejemplo la síntesis de nanopartículas mediante métodos verdes utilizando moléculas biológicas derivadas de los vegetales en forma de extractos que han mostrado superioridad en la síntesis de nanopartículas que los métodos químicos y biológicos. Algunas de las plantas que han sido utilizadas en la síntesis de nanopartículas de plata se describen a continuación: *Cocous nucifera* (22 nm), *Portulaca oleracea* (60 nm), *Musa paradisiaca* (20 nm), *Moringa oleífera* (57 nm), *Allium sativum* (4-22 nm), *Aloe vera* (50-350 nm), *Citrus cinensis* (10-35 nm), *Carica papaya* (25-50 nm) y *Vitis vinífera* (30-40 nm) (Ahmed *et al.*, 2016).

### **Usos de las nanopartículas en el control de patógenos**

En el contexto de usar nanopartículas como una alternativa para el control de plagas y enfermedades, Patil *et al.*, (2012), mencionan que las nanopartículas son utilizadas para mejorar la eficiencia de los plaguicidas al aplicar menores concentraciones de formulados a base de nanopartículas de plata. Changanáquí *et al.* (2019), sintetizaron y caracterizaron nanocompuestos  $Fe_3O_4/Ag$  probando su efecto contra bacterias de importancia médica. Otro ejemplo clave es el uso de nanotubos de carbono para el transporte de fármacos ya que cumplen con las características de poseer tamaño nanométrico, su composición química, superficie de funcionalización y dispersión, favorecen la actividad antibacteriana (Andrade *et al.*, 2012).

Las nanopartículas metálicas consideradas como las más prometedoras ya que contienen notables propiedades antibacterianas debido a su gran relación de superficie a volumen lo que es de interés para los investigadores por la razón de la creciente resistencia microbiana contra iones metálicos, antibióticos y el desarrollo de cepas resistentes (Ahmed *et al.*, 2016).

En cuanto al desarrollo con funguicidas Sarlak *et al.* (2014), realizaron nanoencapsulados de Mancozeb y Zineb en nanotubos de carbono-sol-material híbrido PCA, probando su efecto sobre el hongo *Alternaria alternata*. Koka *et al.* (2019) mencionaron que las nanopartículas de MgO a 0.5 mg mL<sup>-1</sup> lograron una zona de inhibición de 16.33 mm en placa Petri aproximadamente 18.14% de inhibición en *A. alternata* y 14.33 mm o 15.92% en *R. solani*.

Pariona *et al.* (2018) indicaron que las nanopartículas de cobre (NPs-Cu) presentaron un 87 y 90% de inhibición de crecimiento de micelio de *F. solani*. Correa *et al.* (2018) señalaron un 100% de inhibición micelial en los hongos: *A. alternata*, *C. gloeosporoides*, *C. fragariae* y *Rhizopus stolonifer* usando nanopartículas de quitosano y aceite esencial de tomillo (NPs-TEO-Np 3 y 5%).

## Referencias

- Adhikari, T., Kundu, S. and Rao, A. 2016. Zinc delivery to plants through seed coating with nano-zinc oxide particles. *Journal of Plant Nutrition*. 39(1): 136-146.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications a green expertise. *Journal of Advanced Research*. 7(1): 17-28.
- Albañil, J.J.A., Mariscal, A.L.A., Martínez, M.T.O., Anaya, L.J.L., Cisneros, L.H.C. y Pérez, R.H.A. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 11: 2191-2197. Disponible en línea: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/Agricolas/article/view/4044/3378>
- Andrade, C.M.L., López, L.L.I. y Sáenz, G.A. 2012. Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas*. 43(3): 9-18.
- Aouada, F. and De Moura, M. 2015. Nanotechnology applied in agriculture: Controlled release of agrochemicals. En Rai, M., Ribeiro, C., Mattoso, L., Duran, N. (Eds.) *Nanotechnologies in Food and Agriculture* (pp. 103-118). United Estate: Springer International Publishing.
- Barocio, J. A. 2016. Campaña contra plagas reglamentadas del aguacatero. Comité Estatal de Sanidad Vegetal Jalisco. Informe de avances mensuales diciembre 2016. 4-23.
- Barroso, A. A. C., Ochoa, F. Y. M., Cerna, C. E., Tucuch, P. M. A., Olalde, P. V. y Robles, Y. L. 2021. Manejo *in vitro* de antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en aguacate mediante el uso de principios activos botánicos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8(2): e3038. doi:10.19136/era.a8n2.3038

- Betancourth, C.A., Sañudo, B.A., Flórez, C.A. y Salazar, C.E. 2021. Manejo de la costra negra de la papa (*Rhizoctonia solani*) con el establecimiento de abonos verdes. Información tecnológica, 32(2): 165-174.
- Campos, M. A., Velázquez, del V. M. G., Flores, M. H. E., Suarez, R. R., Ramírez, T. J. A. and Hernández, L. A. N. 2016. Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. Crop Protection. 89: 101-104 doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.001
- Castañeda, A.E. y Consuelo, S.L. 2016. Evaluacion del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp. primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Nova. 13(26): 53-65.
- Centurión, B.S.A., Aquino, J.A.S. and Bozzano, S.G. 2013. Extractos vegetales para el control alternativo del damping-off causado por *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate. Investigación Agraria. 15(1): 23-29.
- Cerna, C.E., Alejandro, R.G., Ochoa, F.Y.M., Aguirre, U.L., Landeros, F.J. y Hernández, B.O. 2019. Evaluación *in vitro* de principios activos de origen botánico para el control de hongos fitopatógenos. Scientia Fungorum 49: e1245. doi: 10.33885/sf.2019.49.1245.
- Changanaquí, B.K., Alvarado, I.D. y Alarcón, C.H. 2019. Síntesis y caracterización de nanocompuestos Fe<sub>3</sub> O<sub>4</sub> /Ag: su efecto contra *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*. Revista Colombiana Química. 48(2): 33-39. doi: https://dx.doi.org/10.15446/
- Coromoto, A. Y. y Reyes, I. 2018. Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Bioagro. 1(30): 59-66.
- Correa, P.Z.C., Bautista, B.S., Hernández, L.M. and Marquina, V.M.A. 2018. Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens. Revista Mexicana de Fitopatología. 3(36): 457-467.

- Dann, E. K., Ploetz, R. C., Coates, L. M. and Pegg, K. G. Foliar fruit and soilborne diseases. In: Schaffer B., Wolstenhole B. N., Whiley A. W. (Eds.), The avocado: Botany, Production and Uses, second ed. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK, 2013. P. 380-422.
- Duarte, Y., Pino, O., Infante, D., Sánchez, Y., Travieso, M.C. y Martínez, B. 2013. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. Revista Protección Vegetal. 28(1): 54-59.
- Farr, D.F. y Rossman, A.Y. 2021. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved September 14, 2021, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Flores, C.M.A., Martínez, D.M.T., Nieto, Á.D., Rodríguez, P.J.E., Colinas, L.M.T. y Martínez, S.J. 2013. Reducción en la germinación *in vitro* de conidios de *Alternaria alternata* aislada de Eruca sativa con jugo de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 180-190.
- Fraire, C.M.L., Nieto, Á.D., Cárdenas, S.E., Gutiérrez, A.G., Bujanos, M.R. y Vaquera, H.H. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología 28(1): 25-33.
- Gallegos, M.G., Espinoza, A.C.A., Figueroa, R.J., Méndez, A.R., Rodríguez, G.R., Salas, G.A.L. y Peña, R.F.M. 2022. Compatibilidad de especies de *Trichoderma* en la producción y biocontrol de marchitez del chile. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 9(2): e3066.
- García, Á.C.J., Valenzuela, T.G.A., Florencio, A.J.G., Ruiz, G.I., Moreno, V.M., Hernández, M.B., López, B.J.A., Bravo, P.D., Pineda, R.J.M., Quezada, S.A. and Ávila, Q.G. 2018. Organisms associated with damage to post-harvest potato tubers. Revista Mexicana de Fitopatología. 36(2): 308-320. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1801-1

- González, I., Yailen, A. y Peteira, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Tomate. Revista Protección Vegetal. 27(1): 1-7. Disponible en: [https://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522012000100001&lng=es&nrm=iso](https://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522012000100001&lng=es&nrm=iso)
- Gour, R. 2012. Isolation and characterization of Actinomycetes against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. Advance Journal Pharmaceutical. 1(2):31-30.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. y Olivar, R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 32(1):44-49.
- Habe, H., Toshiaki, T. and Tomohiro, I. 2017. Screening of a *Bacillus subtilis* Strain producing multiple types of cyclic lipopeptides and evaluation of their surface-tension-lowering activities. Journal of Oleo Science. 66(7): 785-790.
- Hernández, S. M., Hernández, C. F. D., Lira, S. R. H. y Gallegos, M. G. 2010. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. con Microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su Efecto en Crecimiento y Rendimiento de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Agraria Nueva Epoca. Nos. 1, 2, 3(7): 17-25.
- Jasso, R.D., Gaytán, S.N.A., Rodríguez, G.R., Hernández, C.F.D., Díaz, J.L., Villarreal Q.J.A., Flores, L.M.L., Carrillo, L.D.A. and Peña, R.F.M. 2019. Antifungal activity of *Juglans* spp. and *Carya* sp. ethanol extracts against *Fusarium oxysporum* on tomato under greenhouse conditions. Industrial Crops and Products. 138(2019): 111442. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.06.005>

- Kenneth, R., Ramírez, C.J.A., Castro, O. and Blanco, M.M. 2017. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 42(1): 115-126. ISSN:0377-9424
- Khot, L., Sankaran, S., Maja, J., Ehsani, R. and Schuster, E. 2012. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Protection*. 35(2012): 64-70.
- Kim, P.I., Ryu, J., Kim, Y.H. and Chi, Y.T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Microbiol Biotechnol*. 20(1): 138–145.
- Koka, J.A., Wani, A.H. and Bhat, M.Y. 2019. Evaluation of antifungal activity of Magnesium oxide (MgO) and Iron oxide (FeO) nanoparticles on rot causing fungi. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 9(2-s):173-178.
- Lamichhane, J.R., Dachbrodt, S.S., Kudsk, P. and Messéan, A. 2016. Toward a Reduced Reliance on Conventional Pesticides in European Agriculture. *Plant Disease*. 100(1):10-24.
- Landero, V.N., Lara, V.F.M., Andrade, H.P., Aguilar, P.L.A. y Aguado, R.G.J. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(5): 1189-1198.
- Landero, V.N., Nieto, A.D., Téliz, O.D., Alatorre, R.R., Ortíz, G.C.F. and Orozco, S.M. 2015. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control*. 91:88-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.002>
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Peever, T.L. and Pryor, B.M. 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species group concepts. *Micologia*. 105(3): 530-546.

- Lateef, A., Nazir, R., Jamil, N., Alam, S., Shah, R., Khan, M. N., and Saleem, M. 2016. Synthesis and characterization of zeolite based nano-composite: An environment friendly slow release fertilizer. *Microporous and Mesoporous Materials*, 232, 174–183. doi:10.1016/j.micromeso.2016.06.0
- Lira, S. R. H., Méndez, A. B., De los Santos, V. G. y Vera, R. I. 2018. Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*. 28(2): 9-24. doi: 10.15174/au.2018.1575
- López, F. U.C., Brito, V.H., López, M.D., José Manuel Salaya, D.J.M. and Gómez, M.E. 2017. Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales Cacaotal como un agente antagonico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20 (2017): 91-100.
- Lugo, M.E., García, G.C. y Ruelas, A.R.D. 2010. Nanotecnología y nanoencapsulación de plaguicidas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*. 6(1):63-67. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46112896009>
- Ma, L.J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F. and Kazan, K. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annual review of microbiology*. 67(1): 399-416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650
- Mahmood, I., Imadi, S.R., Shazadi, K., Gul, A. and Rehman, K.R. 2016. Effect of pesticides on environment. En: Hakeem, K., Akhtar, M. and Abdulan, S. editors *Plant Soil and Microbes*. New York; Springer: p: 253-269.
- Mariscal, A.L.A., Rivera, Y.A., Dávalos, G.P.A. and Dávila, M.D. 2017. Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*. 51: 673-681. ISSN 2521-9766

- Mejía, B.M.A., Reyes, R.A., Cristóbal A.J., Tun S.J.M., Borges, G.L.C. and Pacheco, A.J.R. 2016. *Bacillus* spp. in the Control of Wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. Revista Mexicana de Fitopatología. 34:208-222. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1603-1
- Montero, T.V., Guerrero, A.B.Z., Anaya, L.J.L., Martínez, M.T.O., Guevara, O.L., y González, C.M.M. 2013. Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 4(7): 1043-1054.
- Nava, P.E., Gastélum, H.P., Camacho, B.J.R., Valdez, T.B., Bernal, R.C.R. y Herrera, F.R. 2010. Utilización de extractos de plantas para el control del gorgojo pardo *Acanthoscelides obtectus* (Say) en frijol almacenado. Ra Ximhai. 6(1): 37-43.
- Nuruzzaman, M., Rahman, M., Liu, Y. and Naidu, R. 2016. Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 64(7): 1447-1483.
- Ochoa, Y. M., Cerna, E., Landeros, J., Hernández, S. y Delgado, J.C. 2012. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. Fyton 81: 69-73.
- Pariona, N., Hermida, M.L.A., Martínez, E.A.I., Sánchez, R.D., Carrión, G., López, L.D., Rosas, S.G., Rodríguez, H.B. y Duran, B.Z. 2018. Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. Revista ECI Perú. 2(15): 109-116.
- Patil, C., Borase, H., Patil, S., Salunkhe, R. and Salunke, B. 2012. Larvicidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Pergularia daemia* plant latex against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* and nontarget fish *Poecilia reticulata*. Parasitology Research. 111(2): 555-562.

- Pedraza, L.A., López, C.E. y Uribe, V.D. 2019. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*. 25(1): 112-125.
- Pérez, A.C.E., Carrillo, R.J.C., Chávez, S.J.L., Perales, S.C., Enríquez, V.R. y Villegas, A.Y. 2017. Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del chile en Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(2): 281-293.
- Perni, S., Thenault, V., Abdo, P., Margulis, K., Magdassi, S. and Prokopovich, P. 2015. Antimicrobial activity of bone cements embedded with organic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 10(1): 6317-6329.
- Prabhu, S. and Poulouse, E.K. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2(1): 1-10.
- Pukird, S., Chamninok, P., Samran, S., Kasian, P., Noipa, K., and Chow, L. 2017. Synthesis and characterization of SiO<sub>2</sub> nanowires prepared from rice husk ash. *Journal of Metals, Materials and Minerals*. 19(2): 33-37.
- Puñelas, R.O., Arellano, G.M., Verdugo, F.A.A., Chaparro, E.L.A., Hernández, R.S.E., Martínez, C.J.L. y Vargas, A.I.C. 2017. Extractos de *Larrea tridentata* como una estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35(3): 360-376.
- Ramírez, C., Zorith, S., Castro, L., Arauz, L. F., Uribe, L. L. y Uribel, L. 2015. Efecto de cuatro rizobacterias promotoras de crecimiento sobre la pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile dulce (*Capsicum annuum*). *Agronomía Costarricense*. 39(3): 87-100.

- Reyes, T.A., Rodríguez, A.G., Santillán, M.R., Díaz, C.M. y Fernández, P.S.P. 2019. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán. Revista Mexicana de Fitopatología. 37 (No. Esp. 1): 43-47. Doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-1
- Rezuanul, I.Md., Tae, J.Y., Se, L.Y. and Hyun, S.C. 2012. Insolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. Mycobiology. 1(40): 59-65. doi: 10.5941/MYCO.2012.40.1.059
- Ricardo, P.N.S., Polanco, A.Á.G., Reyes, G.S. y Noris, N.P. 2013. Comportamiento del tizón temprano del tomate (*Alternaria solani*) en las condiciones del municipio de Holguín, Cuba. Fitosanidad. 17 (2): 75-81.
- Rivera, J.M.N., Zavaleta, M.H.A., Rebollar, A.A., Aguilar, R.V.H., García, De los S.G., Vaquera, H.H. and Silva, R.H.V. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of “Poblano” pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. Mycological Progress. 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>
- Rodríguez, G.C.A., Buitrago, J.E., Betancurt, A.D. y Cardenas, L.R. 2017. Actividad antagonista de *Bacillus* sp. frente a *Fusarium oxysporum*: un aporte a la agricultura sostenible. Revista Nova. 3(Colombia): 9-19.
- Rodríguez, M. K.A., Monreal, V. C.T., Huerta, D. J., Soria, C. J.C. y Jarquín, G. R. 2013. Aporte de microorganismos benéficos por la incorporación al suelo de residuos deshidratados de col (*Brassica oleracea var capitata*) y su efecto en el pH. Revista Mexicana de Fitopatología 31(1): 29-44.
- Sarlak, N., Taherifar, A. and Salehi, F. 2014. Synthesis of nanopesticides by encapsulating pesticide nanoparticles using functionalized carbon nanotubes and application of new nanocomposite for plant disease treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62: 4833–4838. [dx.doi.org/10.1021/jf404720d](https://doi.org/10.1021/jf404720d)

- Sharma. Y., Khan, L.A. and Manzoor, N. 2016. Anti-Candida activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *Journal of Mycologie Médicale*. 26(3): 244-254.
- SIAP, 2022. Panorama agroalimentario 2021, consultado: 12 de mayo de 2022, disponible en: [https://nube.siap.gob.mx/gobmex\\_publicaciones\\_siap/](https://nube.siap.gob.mx/gobmex_publicaciones_siap/)
- Soares, M. A., Li, H. Y., Bergen, M., Da Silva, J. M., Kowalski, K. P. and White, J. F. 2015. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix* L.). *Plant and Soil*, 405(1-2): 107–123. doi:10.1007/s11104-015-2638-7
- Toghueo, R., Eke, P., Zabalgoceazcoa, Í., de Aldana, B., Nana, L. and Boyom, F. 2016. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*. 96:8-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.008>
- Trinidad, A.E., Ascencio, V.F.J., Ulloa, J.A., Ramírez, R.J.C., Ragazzo, S.J.A., Calderon, S.M. y Bautista, R.P.U. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. Causante de antracnosis en aguacate Nayarit México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 19(1): 3953-3964.
- Tsrer, L. 2010. Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia solani* on Potato. *Journal Phytopathol*. 158: 649-658. doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01671.x
- Velarde, F.S., Garzón, T.J.A., Hernández, V.S, López, O.C.A. and Retes, M.J.E. 2018. Occurrence of *Fusarium oxysporum* causing wilt on pepper in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 40: 238-247. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1420693>

- Yesid, A. y Sanchez, L. M.Sc. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Nova Ciencias Biomedicas. 18(10):135-250.
- Youssef, S., Tartoura, K. and Abdelraouf, G. 2016. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. Biological Control. 100:79-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.001>
- Zhan, S., Fu, Y., Mersha, Z. and Pernezny, K. 2017. Assesment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean. Crop Protection. 98(1): 8-15.
- Zouari, I., Jlaiel, L., Tounsi, S. and Trigui, M. 2016. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. Biological Control. 1(100): 54-62.

## Artículos

Nanotubos de carbono funcionalizados sobre fitopatógenos

### **Efecto inhibitorio de nanotubos de carbono con extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre hongos fitopatógenos**

#### **Inhibitory effect of carbon nanotubes with metabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* on pathogenic fungi**

**Antonio Orozco Plancarte<sup>1</sup>, Ernesto Cerna Chávez<sup>1\*</sup>, Yisa María Ochoa Fuentes<sup>1</sup>, Jerónimo Landeros Flores<sup>1</sup>, Diana Jasso de Rodríguez <sup>1</sup>, Iliana Ernestina Medina Ramirez<sup>2</sup>, Víctor Olalde Portugal<sup>3</sup>**

**RESUMEN.** Las enfermedades inducidas por hongos fitopatógenos generan pérdidas económicas considerables y daños severos a los cultivos agrícolas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de nanotubos de carbono con extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre el desarrollo micelial de *Rhizoctonia solani* (*Rs*), *Fusarium solani* (*Fs*), *Colletotrichum acutatum* (*Ca*) y *Alternaria alternata* (*Aa*). Se analizaron los datos mediante análisis Probit, ANOVA en un diseño completamente al azar de cinco tratamientos con 20 repeticiones y prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los extractos de *B. amyloliquefaciens* a dosis altas, inhibieron el 100% del crecimiento micelial pero al usar nanotubos de carbono con extractos a dosis bajas, se logró un efecto inhibitorio similar de *Rs*, *Fs*, *Ca* y *Aa* (100, 90, 90 y 60%) respectivamente. El uso de nanotubos de carbono con extractos de *B. amyloliquefaciens* son una alternativa eficiente en el control *in vitro* de hongos fitopatógenos.

**Palabras clave:** *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium solani*, control *in vitro*, *Rhizoctonia solani*.

#### **ABSTRACT.**

Diseases induced by phytopathogenic fungi generate considerable economic losses and severe damage to agricultural crops. The objective of this research was to evaluate the inhibitory effect *in vitro* of carbon nanotubes with extracts of *Bacillus amyloliquefaciens* on the mycelial development of *Rhizoctonia solani* (*Rs*), *Fusarium solani* (*Fs*), *Colletotrichum acutatum* (*Ca*) and *Alternaria alternata* (*Aa*). Data were analyzed using Probit, ANOVA analysis in a completely randomized

design of five treatments with 20 repetitions and Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). *B. amyloliquefaciens* extracts at high doses, inhibited 100% of mycelial growth but by using carbon nanotubes with extracts at low doses, a similar inhibitory effect of Rs, Fs, Ca and Aa (100, 90, 90 and 60%) respectively. The use of carbon nanotubes with extracts of *B. amyloliquefaciens* are an efficient alternative in the in vitro control of phytopathogenic fungi.

**Key words:** *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium solani*, in vitro control, *Rhizoctonia solani*.

## INTRODUCCIÓN

En el manejo de las enfermedades fitopatógenas, la nanotecnología ha tomado gran importancia, mediante el uso de nanopartículas y nanomateriales, por poseer la propiedad de penetrar distintas membranas biológicas (Rojas *et al.* 2020). El uso de nanopartículas tiene como objetivo reducir las cantidades de plaguicidas y mejorar la eficiencia con nanopartículas de plata (Ghosh *et al.* 2012) así mismo el uso de nanocompuestos  $Fe_3O_4/Ag$  con efectos antibacterianos (Changanaquí *et al.* 2019), otro ejemplo clave del uso de nanotubos de carbono es para el transporte de fármacos que favorecen la actividad antibacteriana (Andrade *et al.* 2012).

Por otra parte, la producción de cultivos hortofrutícolas se ve afectada por varias enfermedades agrícolas, como aquellas inducidas por hongos, generando daños severos en los cultivos y ocasionando pérdidas económicas significativas. Por lo que, enfermedades como fusariosis, marchitez o secadera, causadas por *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, ocasionan daños en chile, tomate, papa, apio, fresa, entre otros (Mariscal *et al.* 2017, García *et al.* 2018). Otra enfermedad es la caspa negra y cancro en tallo de la papa causada por *Rhizoctonia solani* (Arcos y Zúñiga 2015), el patógeno causa daños cuantitativos y cualitativos en los cultivos de papa en todo el mundo, aunque también puede infectar a un extenso grupo de plantas de diferentes especies de importancia económica (Gour 2012).

El moho negro causado por *Alternaria alternata* afecta plantas y frutos de tomate (Coromoto y Reyes 2018). Algunas especies de *Alternaria* producen metabolitos secundarios (alternariol y las albertoxinas I, II y III) con propiedades tóxicas (Benavidez *et al.* 2013). Sin embargo, la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporoides* en frutos de aguacate (Campos *et al.*

2016), afecta numerosas plantas y frutos (Farr y Rossman 2021) siendo la enfermedad de postcosecha más importante en muchas regiones y en los países productores (Dann *et al.* 2013).

Actualmente se hace uso indiscriminado de fungicidas sintéticos para el control de estas enfermedades, ocasionando resistencia de fitopatógenos, contaminaciones al medio ambiente y en consecuencia daños a la salud humana (Dadaby y Tulk 2015). Por tanto, el uso de microorganismos benéficos del género *Bacillus spp.* (Pedraza *et al.* 2019), particularmente *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* producen lipopéptidos o metabolitos secundarios como: iturina, surfactina, fengicina y bacilomicina (Mora *et al.* 2011, Berić *et al.* 2012) con actividad fungicida sobre fitopatógenos comunes y con resistencia a fungicidas químicos (Cochrane y Vederas 2014).

En este sentido, en la presente investigación se consideraron aspectos para buscar una alternativa de manejo utilizando insumos de menor impacto ambiental, pero con alta efectividad, para integrarla a las prácticas del manejo de enfermedades fúngicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de nanotubos de carbono de pared múltiple suplementados con extractos de *B. amyloliquefaciens* sobre el desarrollo micelial de *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum* en condiciones *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismos utilizados.** Los hongos fitopatógenos *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*, fueron aislados, purificados e identificados en el laboratorio de Toxicología de la UAAAN, los cuales se cultivaron en medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA) (BD Bioxon®). La cepa de *B. amyloliquefaciens* fue proporcionada por la empresa Culta S.A. de C.V. con domicilio en Cd. Mante Tamaulipas, México, y preservada en medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) (TM Media®) para su posterior uso.

**Obtención de extractos de *B. amyloliquefaciens*.** Se preparó un litro de medio de cultivo líquido para la producción de iturinas (Mckeen *et al.* 1986); se ajustó el pH a 6.0 y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se inoculó con 1 mL de suspensión bacteriana  $1 \times 10^6$  UFC, dejando en incubación a 30 °C y en agitación constante (150 rpm) por tres días. Transcurrido el tiempo se realizó el extracto, removiendo las bacterias por centrifugación a 5 000 rpm por 20 min y filtración con filtros de 0.22

$\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Linktor® Syringe filters) obteniendo el extracto crudo de *B. amyloliquefaciens* (EBa) y se conservó a 4 °C protegida de la luz.

**Funcionalización de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT).** Se utilizaron MWCNT (Sigma-Aldrich®) con un diámetro externo de 50 a 60 nm y 95% de pureza. Para la funcionalización de los MWCNT se modificó la técnica usada por (Cabello *et al.* 2016), procediendo a dispersar 5 mg de MWCNT en 25 mL de ácido clorhídrico al 11%, la solución ácida se sonificó sumergiendo la sonda de ultrasonido (Branson® Sonifier 450) a 35% de potencia constante durante 20 min y una temperatura de 60 °C. Transcurrido el tiempo de sonificación se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min eliminando el sobrenadante por decantación y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, los MWCNT modificados se mezclaron en 25 mL de agua destilada estéril y otra muestra en 25 mL de extracto de *B. amyloliquefaciens*, las muestras fueron almacenadas a 4 °C para su conservación.

**Evaluación *in vitro* de MWCNT funcionalizados con extractos de *B. amyloliquefaciens* sobre hongos fitopatógenos.** Se seleccionó el hongo *F. solani* para determinar la ventana biológica de los bioensayos de inhibición donde se evaluaron tres tratamientos: Extracto de *B. amyloliquefaciens* (EBa), MWCNT modificados mezclados en agua destilada estéril (MWCNT + H<sub>2</sub>O), MWCNT modificados y mezclados con extracto de *B. amyloliquefaciens* (MWCNT + EBa) y Testigo (PDA sin tratamiento) con 10 repeticiones, se prepararon nueve dosis (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 8, 16, 32 y 40 mL L<sup>-1</sup> de medio de cultivo PDA) para cada tratamiento y una vez que se obtuvieron las dosis inhibitorias ( $D_i70$  y  $D_i90$ ), se realizó una prueba de efectividad biológica usando las dosis recomendadas para ( $D_i70$  y  $D_i90$ ) de cada tratamiento con 20 repeticiones sobre los fitopatógenos *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*. Se usó el método de medio de cultivo envenenado (Ochoa *et al.* 2012), posteriormente se colocaron explantes de 0.5 cm de diámetro al centro de la placa con cada fitopatógeno evaluado y se incubaron a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad hasta que el crecimiento de micelio del testigo (PDA sin tratamiento) alcanzó las medidas de la placa. El crecimiento micelial se midió cada 24 h con un vernier, los datos de crecimiento se usaron para calcular los porcentajes de inhibición mediante la siguiente fórmula:  $\text{PICR} = [(R1 - R2) / R1] \times 100$ , donde PICR= Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial, R1= crecimiento micelial del testigo, R2= crecimiento micelial del tratamiento.

**Análisis estadístico.** Se utilizaron los datos obtenidos de porcentaje de inhibición donde se calculó el promedio inhibitorio en cada dosis y para cada tratamiento utilizado, los cuales fueron graficados mediante el programa estadístico R Studio versión 4.0.0. Para la determinación de las dosis inhibitorias ( $D_i 70$  y  $D_i 90$ ) se calcularon por análisis Probit mediante el programa estadístico Statistical Analysis System versión 9.0 utilizando los datos de PICR obtenidos por medio de la fórmula. En las pruebas de efectividad biológica se realizó un análisis de varianza completamente al azar (ANOVA) y una comparación de medias por Tukey con un nivel de significancia ( $p \leq 0.05$ ) mediante el programa estadístico R Studio versión 4.0.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Evaluación *in vitro* de MWCNT funcionalizados con extractos de *B. amyloliquefaciens* sobre hongos fitopatógenos.** Se evaluaron nueve dosis por cada tratamiento sobre *F. solani* donde se observó efecto inhibitorio a partir de 2.5 a 40 mL L<sup>-1</sup> (Figura 1). El tratamiento de MWCNT+ EBa presentó el 100% de inhibición de *F. solani* desde la dosis de 8 mL L<sup>-1</sup>, seguido del tratamiento EBa que presentó inhibiciones de 57 y 90% de *F. solani* a las dosis de 32 y 40 mL L<sup>-1</sup>, respectivamente y el tratamiento que presentó menor inhibición fue MWCNT+ H<sub>2</sub>O (60%) a la dosis de 40 mL L<sup>-1</sup>, esto puede deberse al efecto sinérgico que se produce al combinarse los nanotubos funcionalizados con los metabolitos (Iturinas) presentes en el extracto de *B. amyloliquefaciens*, ya que fue cultivada en medio de cultivo específico. Con los datos obtenidos PICR se realizó la determinación de las dosis inhibitorias de los tratamientos evaluados (Tabla 1), muestran que el tratamiento MWCNT + EBa presentó las concentraciones más bajas para inhibir *F. solani* con  $D_i 70 = 5.94$  mL L<sup>-1</sup> y  $D_i 90 = 8.14$  mL L<sup>-1</sup>, lo cual muestra un alto efecto inhibitorio sobre este fitopatógeno al aplicar los nanotubos funcionalizados con el extracto. A continuación, el tratamiento EBa presentó concentraciones de  $D_i 70 = 35.46$  mL L<sup>-1</sup> y  $D_i 90 = 64.43$  mL L<sup>-1</sup>, y las dosis más altas requeridas para inhibir *F. solani* fueron de MWCNT + H<sub>2</sub>O, que presentó concentraciones de  $D_i 70 = 62.46$  mL L<sup>-1</sup> y  $D_i 90 = 186.58$  mL L<sup>-1</sup>, al comparar estas dosis difieren con las utilizadas por Mejía *et al.* (2016) donde para inhibir la germinación de conidios de *Fusarium* sp. en un 100% usaron la cantidad de 1 mL de extracto de *B. subtilis* disueltos en 1 mL de suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/mL (1:1 v/v), lo que correspondería a usar 125 mL de EBa por cada 125 mL de medio de cultivo PDA y obtener un volumen final de 250 mL de medio envenenado, sin embargo, en este estudio la cantidad máxima a utilizada de EBa fue de 64.43 mL L<sup>-1</sup> ( $D_i 70$ ), dosis que alcanzó el 100% de

inhibición micelial en los cuatro hongos fitopatógenos evaluados. Es importante señalar que a la fecha no se tienen reportes científicos sobre las dosis inhibitorias obtenidas de la inhibición micelial de nanotubos de carbono con extractos de *B. amyloliquefaciens*.

Mediante las pruebas de efectividad biológica se demostró que aplicando las dosis obtenidas por el análisis Probit sobre los diferentes hongos fitopatógenos (Figura 2), los tratamientos presentaron diferencias significativas Tukey ( $p \leq 0.05$ ): para el caso de *R. solani* y *F. solani*, los EBa (T1.1 y T1.2) correspondieron a las  $D_i$  (70 y 90) ambos tratamientos presentaron efecto inhibitorio de 100%, desde las primeras 24 h hasta 120 y 168 h ya que en este tiempo el crecimiento del testigo alcanza las medidas de la placa (Figura 3), mientras que en los hongos *C. acutatum* y *A. alternata* los T1.2 alcanzaron el 100% de inhibición a partir de 24 h hasta 168 y 216 h y en los T1.1 se obtuvieron valores de inhibición superiores a 90 y 80%, respectivamente. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Badía *et al.* (2011), quienes indicaron que *Fusarium* sp. es inhibido en 90.42% y *A. alternata* en 87.28% utilizando cepas de *Bacillus* spp. (LSB9 y LSB10). Rios *et al.* (2015) reportaron que *B. amyloliquefaciens* inhibió el desarrollo de *A. alternata* en 64%, además Leyva *et al.* (2017) señalaron que los metabolitos de *B. amyloliquefaciens* (CCIBP-A5) inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. cubense en 77.18%, También, Mizumoto *et al.* (2006) indicaron que al usar la iturina A obtenida por fermentación de *B. subtilis* se redujo la incidencia de *R. solani* en 76%. Por su parte, Ragazzo *et al.* (2011) reportaron efecto inhibitorio de la iturina A, detectada en halos de inhibición en confrontaciones de *B. subtilis* y *B. licheniformis* frente a *C. gloeosporoides* y *Colletotrichum* sp.

Los MWCNT + EBa (T2.1 y T2.2, de la Figura 2), que equivalen a las  $D_i$  (70 y 90): en *R. solani* el T2.2 presentó un valor de 100% de inhibición y el T2.1 superó el 90%. Se obtuvo un efecto similar en *C. acutatum*, donde el T2.2 inhibió el 90% y el T2.1 superó el 80%. Por otra parte, en *F. solani* ambos tratamientos lograron obtener los valores esperados de 70 y 90% de inhibición, solo en el caso de *A. alternata* los tratamientos evaluados T2.1 y T2.2, mostraron valores de 50 y 60% de inhibición, respectivamente. Hasta el momento el único estudio donde reportan el efecto antifúngico de MWCNT lo realizó Sarlak *et al.* (2014), reportando efectos inhibitorios sobre *A. alternata* ya que usaron MWCNT-g-PCA-EP (Material híbrido de nanotubos de carbono de pared múltiple con encapsulados de moléculas fungicidas de zineb) en condiciones *in vitro*. En otros estudios se ha demostrado el efecto inhibitorio que tienen las nanopartículas sobre los hongos fitopatógenos,

Pariona *et al.* (2018) señalaron que las nanopartículas de cobre (NPs-Cu) lograron un 87 y 90% de inhibición de crecimiento de micelio de *F. solani* con dosis de 0.75 y 1 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Correa *et al.* (2018) reportaron un 100% de inhibición micelial en los hongos: *A. alternata*, *C. gloeosporoides*, *C. fragariae* y *Rhizopus stolonifer* usando nanopartículas de quitosano y aceite esencial de tomillo (NPs-TEO-Np 3 y 5%).

Los extractos de *B. amyloliquefaciens* (EBa) mostraron efecto inhibitorio de 100% sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos evaluados, usando una dosis alta de 64.43 mL L<sup>-1</sup>, pero la ventaja de utilizar nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados y mezclados con el extracto (MWCNT + EBa) se demostró que se requieren dosis bajas ya que con 8.14 mL L<sup>-1</sup> se logró un efecto inhibitorio en los hongos *R. solani*, *F. solani*, *C. acutatum* y *A. alternata* de (100, 90, 90 y 60%) a partir de 24 h, respectivamente, ya que estos patógenos afectan a los cultivos en crecimiento y postcosecha, por lo que este tratamiento se puede considerar como una alternativa en el manejo de hongos fitopatógenos, con insumos de bajo costo y amigables con el medio ambiente.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen de forma especial al Ing. José Ricardo Pérez Vela por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación a través de la empresa Cultra S.A. de C.V. y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Antonio Orozco Plancarte (No. CVU: 605454) para la realización de sus estudios de Postgrado.

## LITERATURA CITADA

- Andrade CML, López LLI, Sáenz GA (2012) Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista Mexicana Ciencias Farmaceuticas* 43: 9-18.
- Arcos J, Zúñiga D (2015) Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. *Ecología Aplicada* 14: 95-101.
- Badía RMM, Hernández BT, Murrel LJA, Mahillon J, Perez HM (2011) Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) *Revista Brasileña de Agroecología* 6: 90-99.

- Beric T, Kojic M, Stankovic S, Topisirovic L, Degrassi G, Myers M, Fira D (2012) Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol Biotechnol* 50: 25-31.
- Benavidez RME, Patriarca A, Cabrera G, Fernández PVE (2013) Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate. *Revista Iberoamericana de Micología* 31: 119-124.
- Cabello ACJ, Sáenz GA, Pérez BC, Sandoval CJ, Ávila OC, Álvarez TC, López CGJ (2016) Modificación de nanotubos de carbono de pared múltiple utilizando energía de ultrasonido a diferentes potencias. *Afinidad LXXIV* 576: 285-290.
- Campos MA, Velázquez Del VMG, Flores MHE, Suarez RR, Ramírez TJA, Hernández LAN (2016) Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. *Crop Protection* 89: 101-104.
- Changanaquí BK, Alvarado ID, Alarcón CH (2019) Síntesis y caracterización de nanocompuestos Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ag: su efecto contra *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*. *Revista Colombiana Quimimica* 48: 33-39.
- Cochrane SA, Vederas JC (2014) Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. A gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews* 36: 4-31.
- Coromoto AY, Reyes I (2018) Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bioagro* 30: 59-66.
- Correa PZC, Bautista BS, Hernández LM, Marquina VMA (2018) Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 457-467.
- Dadaby K, Tulk P (2015) Agrochemicals and their impact on human health: An analysis of pesticide use and incidences of diseases in the region of Rincon de Santa Marta. Quebec, Canada: McGill University. Disponible en:

[https://www.mcgill.ca/pfss/files/pfss/agrochemicals\\_and\\_their\\_impact\\_on\\_human\\_health.pdf](https://www.mcgill.ca/pfss/files/pfss/agrochemicals_and_their_impact_on_human_health.pdf). Fecha de consulta: 13 de septiembre de 2021.

Dann EK, Ploetz RC, Coates LM, Pegg KG (2013) Foliar fruit and soilborne diseases. In: Schaffer B, Wolstenhole BN, Whiley AW (Eds) *The avocado: Botany, production and uses*. second ed. CABI. Wallingford, Oxfordshire, UK. pp. 380-422.

Farr DF, Rossman AY (2021) Fungal databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>. Fecha de consulta: 14 de septiembre de 2021.

García ÁCJ, Valenzuela TGA, Florencio AJG, Ruiz GI, Moreno VM, Hernández MB, López BJA, Bravo PD, Pineda RJM, Quezada G (2018) Organisms associated with damage to post-harvest potato tubers. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 308-320.

Ghosh S, Patil S, Ahire M, Kitture R, Kale S, Pardesi K, Cameotra S, Jayesh BJ, Dhavale DD, Jabgunde A, Chopade BA (2012) Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *International Journal of Nanomedicine* 7: 483–496.

Gour R (2012) Isolation and characterization of Actinomycetes against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. *Advance Journal Pharmaceutical* 1: 31-30.

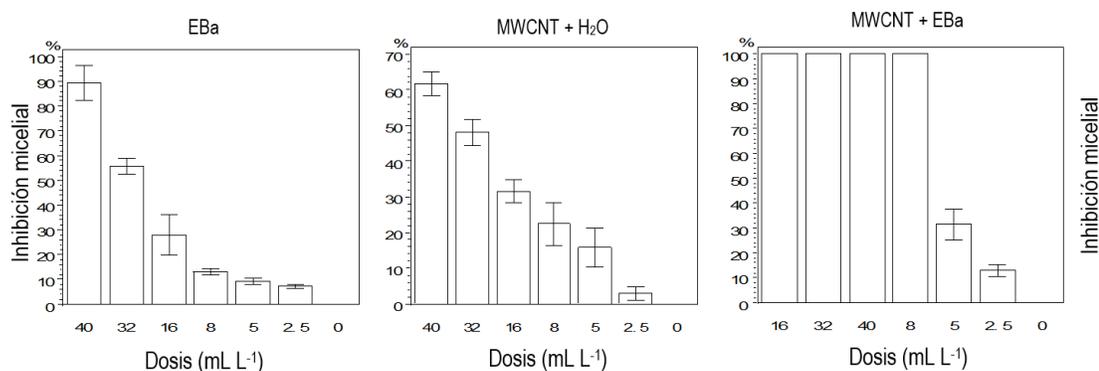
Leyva RL, Cruz MM, Acosta SM, Pichardo T, Bermúdez CI, Alvarado CY (2017) Antagonismo *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Biotecnología Vegetal* 17: 229 – 236.

Mariscal ALA, Rivera YA, Dávalos GPA, Dávila MD (2017) Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia* 51: 673-681.

Mckeen CD, Reilly CC, Pusey PL (1986) Production and partial characterization of antifungal substances to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Ecology and Epidemiology* 76: 136-139.

- Mejía BMA, Cristobal AJ, Tun SJM, Reyes RA (2016) Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia* 50: 1123-1135.
- Mizumoto S, Hirai M, Shoda M (2006) Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 869-875.
- Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E (2011) Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology* 14: 213-223.
- Ochoa YM, Cerna E, Landeros J, Hernández S, Delgado JC (2012) Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 81: 69-73.
- Pariona N, Hermida MLA, Martínez EAI, Sánchez RD, Carrión G, López LD, Rosas SG, Rodríguez HB, Duran BZ (2018) Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. *Revista ECI Perú* 15: 109-116.
- Pedraza LA, López CA, Uribe VD (2019) Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta biológica Colombiana* 25:112-125.
- Ragazzo SJA, Robles CA, Lomelí GL, Luna SG, Calderón SM (2011) Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antiobióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17: 5-11.
- Rios VC, Caro CJN, Berlanga RDI, Ruíz CMF, Ornelas PJJ, Salas MMA, Villalobos PE, Guerrero PVM (2015) Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 84-99.
- Rojas ANG, Regalado IPE, Dávila LMR, Llerena HRC, Rojas ALI (2020) Actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata contra bacterias fitopatógenas. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan* 8: 2-7.

Sarlak N, Taherifar A, Salehi F (2014) Synthesis of nanopesticides by encapsulating pesticide nanoparticles using functionalized carbon nanotubes and application of new nanocomposite for plant disease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 4833–4838.

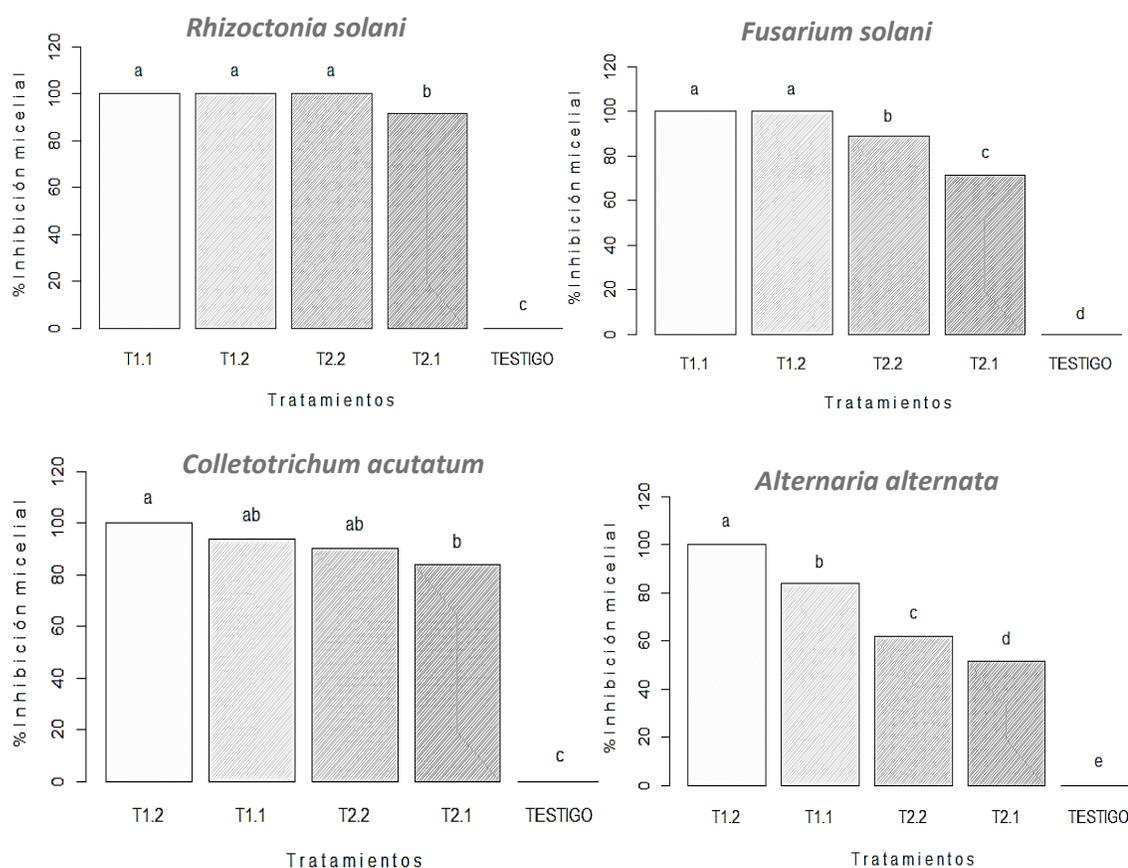


**Figura 1.** Efecto inhibitorio de nanotubos funcionalizados sobre *F. solani*. EBa= Extracto de *B. amilolyquefaciens*, MWCNT + H<sub>2</sub>O= Nanotubos de carbono funcionalizados y mezclados con agua, MWCNT + EBa= Nanotubos de carbono funcionalizados y mezclados con EBa.

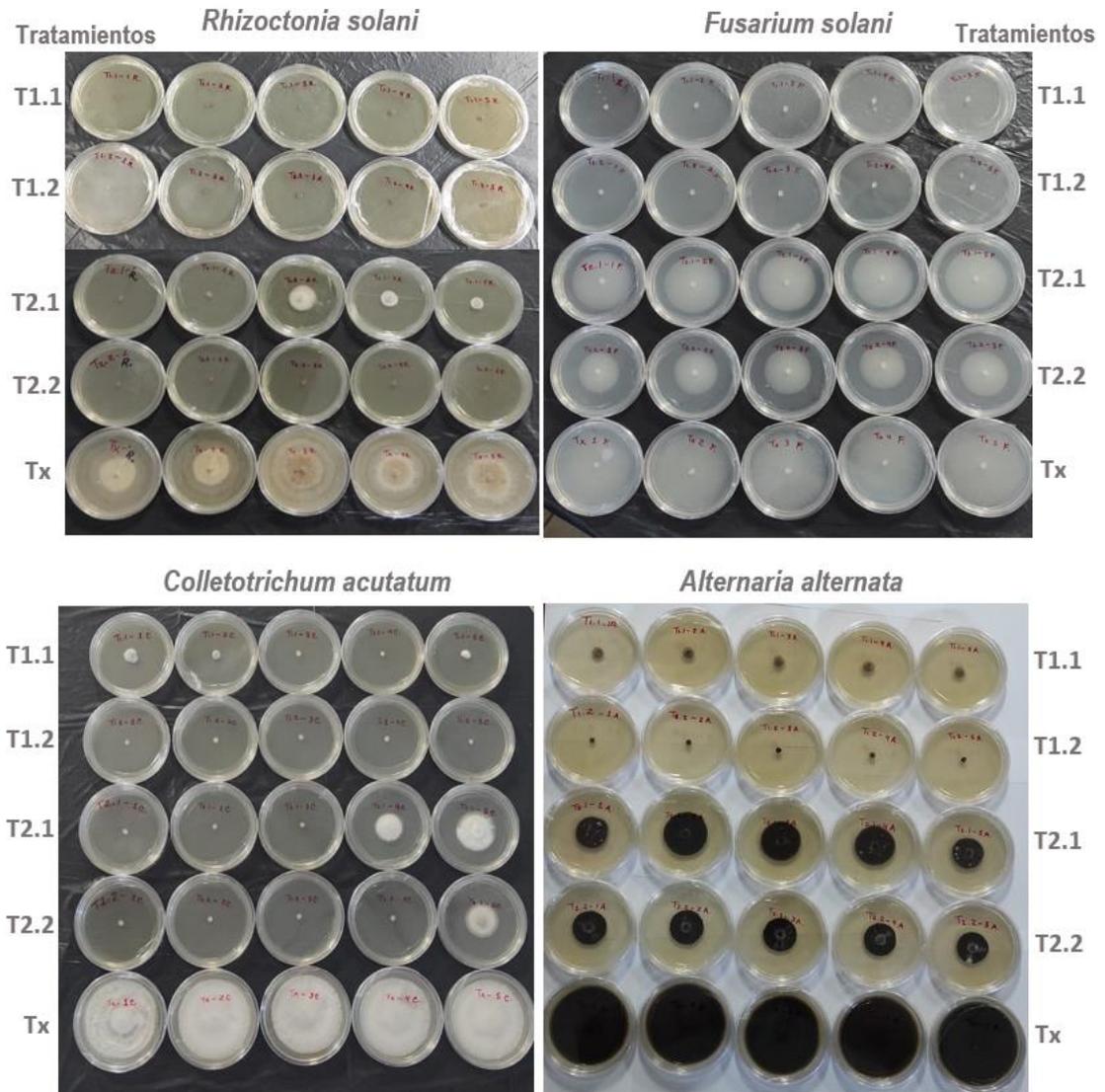
**Tabla 1.** Determinación de dosis inhibitorias de los tratamientos sobre *F. solani*.

Tratamiento	Dosis inhibitoria	Dosis probable (mL L <sup>-1</sup> )	Limite fiducial inferior 95%	Limite fiducial superior 95%
<b>MWCNT + EBa</b>	D <sub>i</sub> 70	5.94	5.37	6.73
	D <sub>i</sub> 90	8.14	7.13	9.84
<b>EBa</b>	D <sub>i</sub> 70	35.46	31.03	42.53
	D <sub>i</sub> 90	64.43	51.81	89.52
<b>MWCNT + H<sub>2</sub>O</b>	D <sub>i</sub> 70	62.46	51.21	79.65
	D <sub>i</sub> 90	186.58	137.83	272.97

EBa= Extracto de *B. amilolyquefaciens*, MWCNT + H<sub>2</sub>O= Nanotubos de carbono funcionalizados y mezclados con agua y MWCNT + EBa= Nanotubos de carbono funcionalizados y mezclados con EBa.



**Figura 2.** Efectividad biológica de dosis inhibitorias sobre hongos fitopatógenos. T1.1=  $D_i$  70 EBa, T1.2=  $D_i$  90 EBa, T2.1=  $D_i$  70 NTCMW + EBa, T2.2=  $D_i$  90 NTCMW + EBa. Medias con la misma letra en cada grafica son iguales y tratamientos con diferente letra son estadísticamente diferentes Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 3.** Efecto inhibitorio *in vitro* de dosis inhibitorias sobre hongos fitopatógenos. T1.1 y T1.2= D<sub>i</sub>70 y D<sub>i</sub>90 de EBa, T2.1 y T2.2= D<sub>i</sub>70 y D<sub>i</sub>90 de NTCMW + EBa y Tx= Testigo.

**Efectividad de extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* con nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno sobre hongos fitopatógenos.**

**Antonio Orozco Plancarte<sup>1</sup>, Ernesto Cerna Chávez<sup>1§</sup>, Yisa María Ochoa Fuentes<sup>1</sup>, Jerónimo Landeros Flores<sup>1</sup>, Diana Jasso de Rodríguez<sup>1</sup> y Anselmo Hernández Pérez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Calzada Antonio Narro No. 1923 col. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México. Tel. 8446735367 (antonioorozco25@outlook.es; yisa8a@yahoo.com; jlanflo@correo.edu.mx; dianajassocantu@yahoo.com.mx). <sup>2</sup>Campo Experimental Uruapan-INIFAP. Av. Latinoamericana 1101, Uruapan, Michoacán CP. 60150. México. Tel. 4431032688. (hernandez.anselmo@inifap.gob.mx).

<sup>§</sup>Autor para correspondencia: jabaly1@yahoo.com.

**Resumen**

El uso de las nanopartículas en la agricultura, abre la oportunidad de desarrollo de agroproductos con esta tecnología, orientados al control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno mezcladas con extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* (EcBa) sobre el desarrollo micelial y formación de estructuras reproductivas de *Fusarium solani* (Fs), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Colletotrichum acutatum* (Ca) y *Alternaria alternata* (Aa). El experimento se realizó en el Departamento de Parasitología de la UAAAN en Saltillo Coahuila; en el periodo de mayo-diciembre de 2021. Para la prueba de efectividad biológica, se utilizó la técnica de medio envenenado y se estableció bajo un diseño completamente al azar de dos dosis ( $D_{E70}$  y  $D_{E90}$ ) y un testigo absoluto con 20 repeticiones por cada tratamiento. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza y prueba de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ) y se calcularon las dosis efectivas mediante análisis Probit. El tratamiento que presentó mejor efecto inhibitorio fue NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa, ya que logró inhibir el crecimiento de micelio y disminuyó la producción de estructuras reproductivas (esporas y esclerocios) de 84% hasta 100% con dosis bajas en Fs, Rs, Ca y Aa, seguido de NPs Graf + EcBa, mientras que EcBa a mayor dosis obtuvo de 83.7 a 100%, respectivamente. El uso de nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno con EcBa son una alternativa eficiente en el control *in vitro* de hongos fitopatógenos.

**Palabras clave:** *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum* y *Alternaria alternata*.

## Abstract

The use of nanoparticles in agriculture opens the opportunity for the development of agroproducts with this technology, aimed at controlling diseases caused by phytopathogenic fungi. The objective of this study was to evaluate *in vitro* the inhibitory effect of silicon dioxide and graphene nanoparticles mixed with extracts of *Bacillus amyloliquefaciens* (EcBa) on the mycelial development and formation of reproductive structures of *Fusarium solani* (Fs), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Colletotrichum acutatum* (Ca) and *Alternaria alternata* (Aa). The experiment was conducted in the Department of Parasitology of the UAAAN in Saltillo Coahuila; in the period of May-December 2021. For the biological effectiveness test, the poisoned medium technique was used and established under a completely random design of two doses ( $D_{E70}$  and  $D_{E90}$ ) and an absolute control with 20 repetitions for each treatment. Data were analysed using analysis of variance and Tukey mean test ( $p \leq 0.05$ ) and effective doses were calculated using Probit analysis. The treatment that presented the best inhibitory effect was NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa, since it managed to inhibit the growth of mycelium and decreased the production of reproductive structures (spores and sclerotia) from 84% to 100% with low doses in Fs, Rs, Ca and Aa, followed by NPs Graf + EcBa, while EcBa at higher doses obtained from 83.7 to 100%, respectively. The use of silicon dioxide and graphene nanoparticles with EcBa are an efficient alternative in the *in vitro* control of phytopathogenic fungi.

**Keywords:** *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum* and *Alternaria alternata*.

## Introducción

Actualmente el uso de la nanotecnología ha cobrado gran importancia en la agricultura por sus múltiples aplicaciones, ampliando las posibilidades de desarrollo de agroproductos como nanofertilizantes, nanoherbicidas, nanopesticidas, que mejoren el rendimiento en los cultivos y protejan el medio ambiente (Lira et al., 2018). El silicio poroso nanoestructurado tiene importantes propiedades, ya que se puede modificar sus características ópticas, químicas y eléctricas para el desarrollo de sensores químicos y biológicos (Ríos et al., 2020). La eficiencia del silicio poroso ha sido probada para aplicaciones de medicamentos, ya que estas moléculas pueden ser introducidas en las nanopartículas de silicio funcionando como acarreadores de fármacos (Santos et al., 2014). El silicio en la agricultura tiene una función importante en la síntesis de lignina, le da estructura a la pared celular de las plantas y promueve la producción de fitoalexinas que intervienen en el control de los patógenos (Aguirre et al., 2007).

Por otra parte, el óxido de grafeno es otro material derivado del carbón, el cual se presenta como una lámina de grafeno funcionalizada con diferentes grupos oxigenados, los grupos hidroxilo,

epoxi y carbonilo presentes en las estructuras del grafeno hacen que este sea muy hidrofílico (Lira et al., 2018). Esto puede originar la formación de enlaces por puentes de hidrógeno entre los grupos oxigenados y las moléculas de agua alterando sus propiedades electrónicas, mecánicas y estructurales (Ganesh et al., 2013). Mientras que Liu et al. (2011) reportaron que nanocompuestos de óxido de grafeno con nanopartículas de plata poseen efectos antibacterianos.

Los avances con nanopartículas, se pueden destacar los siguientes: uso de nanopartículas de plata para el control de larvas de *Aedes aegypti* (Patil et al., 2012), nanopartículas de cobre sobre el control de hongos fitopatógenos (Pariona et al., 2018), nanotubos de carbono funcionalizados con funguicidas químicos para el control de *Alternaria alternata* (Sarlak et al., 2014).

Por otro lado, los hongos fitopatógenos son un factor limitante en la producción de cultivos, ya que reducen significativamente el rendimiento causando daños a plantas y frutos, particularmente, *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, afectan plantas de tomate y chile (Vásquez y Castaño, 2017; Albañil et al., 2015). Se han reportado pérdidas de 21 a 47 % en cultivos a campo abierto y bajo cubiertas (Ramyabharathi et al., 2012; Enespa y Dwivedi, 2014). Mientras que *Rhizoctonia solani* ocasiona daños en tallos como en raíces en plantas de chile, provocando daños devastadores en condiciones óptimas (Montero et al., 2013) en el cultivo de papa afecta tallos, raíces y frutos (Arcos y Zúñiga, 2015).

Así mismo, entre los hongos que originan daños en postcosecha, se encuentra *Colletotrichum acutatum* afectando directamente frutos de aguacate (Barroso et al., 2021). Por otro lado, *Alternaria alternata* afecta frutos de tomate (Coromoto y Reyes, 2018) por lo que disminuyen la calidad de los frutos y generan pérdidas económicas considerables.

En cuanto al control de estos patógenos, es mediante el uso de funguicidas químicos, los cuales contaminan el medio ambiente, generan resistencia en patógenos (Ramírez et al., 2015) por lo que es necesario desarrollar estrategias eco amigables para el control de hongos fitopatógenos. Se ha reportado el uso de bacterias antagónicas *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, como alternativa eficiente en el control de hongos fitopatógenos. Hernández et al. (2010) reportaron que *B. subtilis* reduce la incidencia y severidad de la enfermedad producida por *R. solani* y *Fusarium* sp. en plantas de tomate. Habe et al. (2017) indicaron que *B. subtilis* produce lipopéptidos (surfactinas e iturina A), considerados como compuestos antifúngicos sobre *R. solani* (Rezuanul et al., 2012).

Sin embargo, existen escasos reportes científicos sobre el uso de nanopartículas de silicio y grafeno, con extractos de microorganismos benéficos en el control de enfermedades fitopatógenas. Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto inhibitorio de nanopartículas de silicio y grafeno mezclados con extractos de *B. amyloliquefaciens* sobre el desarrollo micelial

y formación de estructuras reproductivas de *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum* y *A. alternata in vitro*, buscando una alternativa de manejo de enfermedades fúngicas con insumos de menor impacto ambiental, pero con alta efectividad.

## **Materiales y métodos**

### **Ubicación del experimento**

La presente investigación se realizó en el Departamento de Parasitología Agrícola en el laboratorio de Toxicología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila.

### **Material biológico**

Los hongos fitopatógenos *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*, fueron aislados, purificados e identificados en el laboratorio de Toxicología de la UAAAN, los cuales se cultivaron en medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA) (BD Bioxon<sup>®</sup>) para su posterior uso.

### **Preparación de extractos de *B. amyloliquefaciens* enriquecidos con nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno**

Se utilizó la cepa de *B. amyloliquefaciens* previamente identificada en el laboratorio de Toxicología de la UAAAN, dicha cepa se cultivó en tubos inclinados con Agar Nutritivo (TM Media<sup>®</sup>) para su crecimiento. Posteriormente se preparó 500 mL de medio de cultivo líquido para la producción de iturinas por fermentación mediante el procedimiento descrito por Mckeen et al. (1986), se ajustó el pH a 6.0 y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 1 mL de suspensión bacteriana  $1 \times 10^6$  UFC, dejando en incubación a 30 °C y en agitación constante (150 rpm) por tres días. Transcurrido el tiempo se realizó el extracto, eliminando las bacterias por centrifugación a 5 000 rpm por 20 min y filtración con filtros de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro (Linktor<sup>®</sup> Syringe filters) obteniendo el extracto crudo de *B. amyloliquefaciens* (EcBa). Una vez obtenido el extracto se procedió a realizar los productos formulados con nanopartículas de dióxido de silicio (NPs SiO<sub>2</sub>) y grafeno (NPs Graf) previamente funcionalizadas y proporcionadas por la empresa Cultra S.A. de C.V. Para ello se mezclaron 2 g de nanopartículas por cada 100 mL de extracto bacteriano, la solución se sonificó sumergiendo la sonda de ultrasonido (Branson<sup>®</sup> Sonifier 450) a 35% de potencia constante durante 10 min a una temperatura de 60 °C para su mejor dispersión y se conservó a 4 °C protegida de la luz.

### **Evaluación *in vitro* de extractos de *B. amyloliquefaciens* enriquecidos con nanopartículas sobre el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos**

Se utilizó el hongo *F. solani* para determinar la ventana biológica correspondiente al bioensayo uno de inhibición micelial, donde se evaluaron cinco tratamientos: Extracto crudo de *B. amyloliquefaciens* (EcBa), NPs SiO<sub>2</sub> funcionalizadas y mezcladas en agua destilada estéril (NPs

SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O), NPs SiO<sub>2</sub> funcionalizadas y mezcladas con extracto crudo de *B. amyloliquefaciens* (NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa), NPs Graf funcionalizadas y mezcladas en agua destilada estéril (NPs Graf + H<sub>2</sub>O), NPs Graf funcionalizadas y mezcladas con extracto crudo de *B. amyloliquefaciens* (NPs Graf + EcBa) y Testigo (PDA sin tratamiento) con 10 repeticiones y se prepararon nueve dosis (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 8, 16, 32 y 40 mL L<sup>-1</sup> en medio de cultivo PDA) para cada tratamiento. Se utilizó el método de medio envenenado (Ochoa et al., 2012), posteriormente se colocaron explantes de 0.5 cm de diámetro al centro de la placa con cada fitopatógeno evaluado y se incubaron a 25±2 °C en oscuridad hasta que el crecimiento de micelio del testigo (PDA sin tratamiento) alcanzó las medidas de la placa. El crecimiento micelial se midió cada 24 h con un vernier, los datos de crecimiento se usaron para calcular los porcentajes de inhibición mediante la siguiente fórmula: (PICR= [(R1-R2)/R1] x 100), donde PICR= Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial, R1= crecimiento micelial del testigo, R2= crecimiento micelial del tratamiento.

Con los datos obtenidos de PICR se calcularon las dosis efectivas (D<sub>E30</sub>, D<sub>E50</sub>, D<sub>E70</sub> y D<sub>E90</sub>) mediante análisis Probit y se realizó una prueba de efectividad biológica (bioensayo dos) usando las dosis recomendadas para (D<sub>E70</sub> y D<sub>E90</sub>) de los tratamientos EcBa, NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa, NPs Graf + EcBa y Testigo (PDA sin tratamiento) con 20 repeticiones sobre los fitopatógenos *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*.

#### **Evaluación *in vitro* de extractos de *B. amyloliquefaciens* enriquecidos con nanopartículas sobre la producción de estructuras reproductivas de hongos fitopatógenos**

Se realizó un tercer bioensayo, donde se evaluaron las dosis efectivas (D<sub>E30</sub> y D<sub>E50</sub> y D<sub>E70</sub>) de los tratamientos EcBa, NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa, NPs Graf + EcBa y Testigo (PDA sin tratamiento) con tres repeticiones para cada uno de los hongos fitopatógenos, mediante medio envenenado (Ochoa et al., 2012). A los 10 días posteriores a la inoculación se realizó un conteo de esporas por mililitro por triplicado, donde se realizó un barrido de esporas al adicionar 5 mL de agua destilada estéril a la caja Petri. En los hongos *F. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*, las esporas colectadas se transfirieron en tubos de ensayo y se homogenizó en un vortex; se tomaron 20 µL de la suspensión y se colocaron sobre la cámara de Neubauer para cuantificar las esporas en un microscopio óptico a 40X (Nikon® Japan 449193) (Barroso et al., 2021). Para el caso de *R. solani*, se realizó un conteo de esclerocios producidos a los 10 días posteriores a la inoculación, donde la caja Petri se dividió en cuatro cuadrantes y se contabilizó bajo el microscopio estereoscópico (Olympus® SZ2-LGB) cada esclerocio producido en cada tratamiento y repetición, respectivamente.

### **Diseño experimental.**

En la inhibición micelial (bioensayo uno), se utilizó un diseño completamente al azar en cada tratamiento con seis dosis: EcBa (2.5, 5, 8, 16, 32 y 40 mL L<sup>-1</sup>) y en NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa, NPs Graf + EcBa, NPs SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O y NPs Graf + H<sub>2</sub>O (1, 2.5, 5, 8, 16, 32 mL L<sup>-1</sup>) más un testigo (0) PDA sin tratamiento como control absoluto, cada dosis tuvo 10 repeticiones, dando un total de 70 unidades experimentales por cada tratamiento evaluado sobre *F. solani*, respectivamente. En las pruebas de efectividad biológica (bioensayo dos), se usó un diseño completamente al azar de dos dosis efectivas: 1= D<sub>E</sub>70, 2= D<sub>E</sub>90 y un Testigo (0) con 20 réplicas, dando un total de 60 unidades experimentales por cada tratamiento evaluado (EcBa, NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa, NPs Graf + EcBa) y por cada hongo fitopatógeno (*F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*). En cuanto a la producción de estructuras reproductivas (bioensayo tres), se realizó en un diseño completamente al azar de tres dosis efectivas: 1= D<sub>E</sub>30, 2= D<sub>E</sub>50, 3= D<sub>E</sub>70 y más un Testigo (0) con 3 observaciones, dando un total de 12 unidades experimentales por cada tratamiento y hongo fitopatógeno evaluado.

### **Análisis de datos**

En la determinación de las dosis efectivas, se usaron los datos de PICR obtenidos por medio de la fórmula y se calcularon las dosis por análisis Probit mediante el programa estadístico Statistical Analysis System versión 9.0. También se utilizó un análisis de varianza y comparación de medias de la diferencia mínima significativa por Tukey ( $p \leq 0.05$ ) usando el mismo programa estadístico.

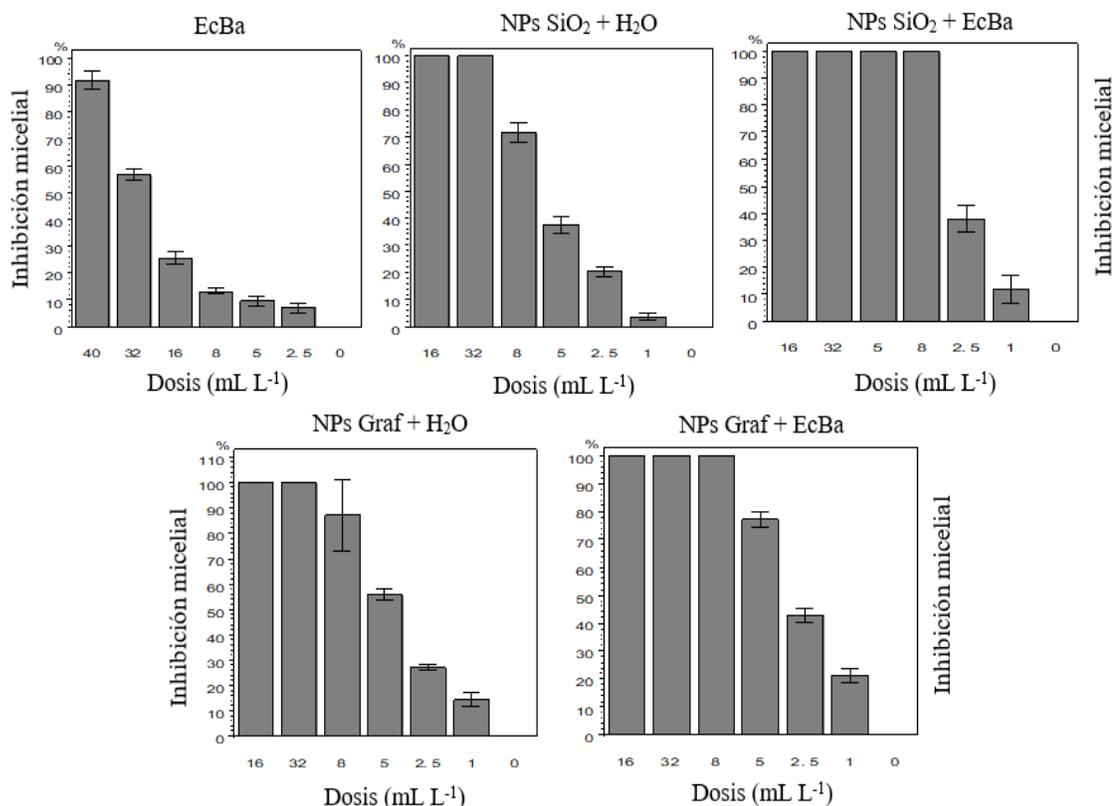
### **Resultados y discusión**

#### **Evaluación *in vitro* de extractos de *B. amyloliquefaciens* enriquecidos con nanopartículas sobre el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos**

Los tratamientos con nanopartículas mostraron efecto inhibitorio a partir de 1 a 40 mL L<sup>-1</sup> (Figura 1). NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa presentó el 100% de inhibición micelial de *F. solani* de 5 a 32 mL L<sup>-1</sup>, seguido de NPs Graf + EcBa que presentó inhibiciones de 100 y 77% a las dosis de 8 y 5 mL L<sup>-1</sup>, mientras que los tratamientos NPs SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O y NPs Graf + H<sub>2</sub>O mostraron efecto inhibitorio de 100% en las dosis 16 y 32 mL L<sup>-1</sup> con respecto al extracto bacteriano EcBa, que obtuvo un 91.71% usando la dosis más alta (40 mL L<sup>-1</sup>), mencionando que al mezclar las nanopartículas con el extracto de *B. amyloliquefaciens* se produce un efecto sinérgico, el cual potencializa los tratamientos NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa y NPs Graf + EcBa, ya que se observó una reducción en las dosis evaluadas (5 y 8 mL L<sup>-1</sup>) en comparación a 16 mL L<sup>-1</sup> de los tratamientos NPs SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O y NPs Graf + H<sub>2</sub>O y obteniendo el mismo porcentaje de inhibición micelial.

Estos resultados concuerdan con Yesid et al. (2012) donde reportan de 70 a 100% de inhibición micelial de *Fusarium* sp. mediante el método de excavación en placa Petri utilizando extracto de

*Bacillus subtilis*, también mencionan que uno de los metabolitos secundarios presentes en el extracto es la iturina A, lo cual le confiere dicho efecto inhibitorio ya que en este estudio se utilizó medio de cultivo específico para la producción de iturinas. Por su parte, Kim et al. (2010) mencionan que *Bacillus* es capaz de producir tres familias de lipopeptidos como Iturinas, fengicinas y surfactinas, así mismo, Zouari et al. (2016) reportaron la presencia de las tres familias de lipopeptidos presentes en extractos de *B. amylolyquefaciens*, por lo que es posible que en el extracto utilizado en este estudio estén presentes estos metabolitos.



**Figura 1. Efecto inhibitorio micelial de nanopartículas funcionalizadas sobre *F. solani*.** EcBa= Extracto crudo de *B. amylolyquefaciens*, NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa= Nanopartículas de dióxido de silicio funcionalizadas y mezcladas con EcBa, NPs SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O= Nanopartículas de dióxido de silicio funcionalizadas y suspendidas en agua destilada estéril, NPs Graf + EcBa= Nanopartículas de grafeno funcionalizadas y mezcladas con EcBa y NPs Graf + H<sub>2</sub>O= Nanopartículas de grafeno funcionalizadas y suspendidas en agua destilada estéril.

La finalidad de determinar las dosis inhibitorias fue para conocer la cantidad del tratamiento para inhibir un porcentaje de desarrollo del fitopatógeno, similar a lo reportado por Ochoa et al. (2012) en su estudio determinaron la dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>) mediante análisis Probit de los extractos

de canela y chirimoya para controlar a *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. culmorum*, por lo que en este estudio se utilizaron los datos obtenidos de PICR para calcular las dosis efectivas ( $D_E$ ) de los tratamientos (Tabla 1). Se observó que el tratamiento NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa mostró las concentraciones más bajas para controlar de manera *in vitro* a *F. solani* con  $D_{E30} = 1.75 \text{ mL L}^{-1}$ ,  $D_{E50} = 2.30 \text{ mL L}^{-1}$ ,  $D_{E70} = 3.01 \text{ mL L}^{-1}$  y  $D_{E90} = 4.46 \text{ mL L}^{-1}$ , un efecto similar presentó el tratamiento NPs Graf + EcBa, respectivamente.

Mientras que los tratamientos NPs SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O y NPs Graf + H<sub>2</sub>O mostraron una  $D_{E90}$  de 14.40 y 13.88 mL L<sup>-1</sup> consideradas como dosis intermedias en comparación con la dosis más alta en EcBa, que presentó una  $D_{E90} = 64.43 \text{ mL L}^{-1}$ . Estos resultados concuerdan con Yesid et al. (2012) reportaron el uso de 0.5 mL de extracto en placa Petri, lo que corresponde a usar 25 mL L<sup>-1</sup>, mientras que se observó notable diferencia al comparar las dosis de este estudio con las reportadas por Mejía et al. (2016) donde utilizaron una dosis 125 mL L<sup>-1</sup>, respectivamente. Es importante mencionar que no hay estudios científicos que aporten información sobre la determinación de dosis efectivas de extractos bacterianos con nanopartículas de silicio y grafeno en la inhibición micelial de hongos fitopatógenos.

**Tabla 1. Determinación de dosis efectivas de los tratamientos sobre *F. solani*.**

Tratamiento	Dosis efectiva	Dosis probable mL L <sup>-1</sup>	Limite fiducial inferior 95%	Limite fiducial superior 95%
NPs SiO <sub>2</sub> + EcBa	$D_{E30}$	1.75	1.51	1.98
	$D_{E50}$	2.30	2.03	2.59
	$D_{E70}$	3.01	2.67	3.46
	$D_{E90}$	4.46	3.84	5.44
NPs Graf + EcBa	$D_{E30}$	1.37	0.90	1.87
	$D_{E50}$	2.33	1.69	3.17
	$D_{E70}$	3.98	2.94	5.75
	$D_{E90}$	8.59	5.92	14.98
NPs SiO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	$D_{E30}$	3.58	3.36	3.79
	$D_{E50}$	5.36	5.08	5.65
	$D_{E70}$	8.03	7.57	8.56
	$D_{E90}$	14.40	13.21	15.88
NPs Graf + H <sub>2</sub> O	$D_{E30}$	1.46	0.93	2.05
	$D_{E50}$	2.80	1.98	3.90
	$D_{E70}$	5.40	3.88	8.03
	$D_{E90}$	13.88	9.15	25.49
EcBa	$D_{E30}$	15.51	13.16	17.58
	$D_{E50}$	23.45	20.94	26.39
	$D_{E70}$	35.46	31.03	42.53
	$D_{E90}$	64.43	51.81	89.52

EcBa= Extracto crudo de *B. amylolyquefaciens*, NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa= Nanopartículas de dióxido de silicio funcionalizadas y mezcladas con EcBa, NPs SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O= Nanopartículas de dióxido de silicio funcionalizadas y suspendidas en agua destilada estéril, NPs Graf + EcBa= Nanopartículas de grafeno funcionalizadas y mezcladas con EcBa y NPs Graf + H<sub>2</sub>O= Nanopartículas de grafeno funcionalizadas y suspendidas en agua destilada estéril.

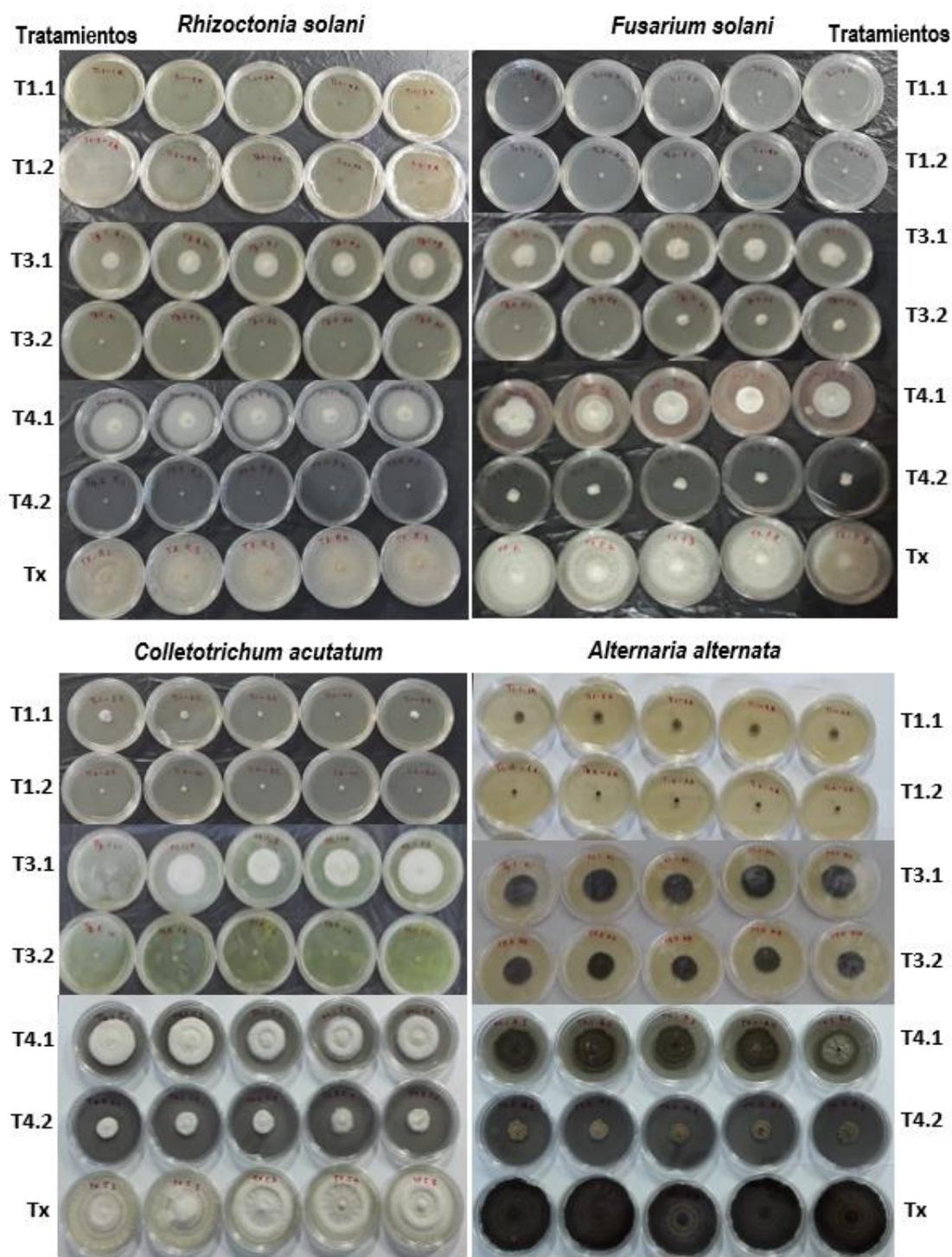
En las pruebas de efectividad biológica de las dosis efectivas en la Tabla 2, se muestran diferencias significativas, el tratamiento EcBa inhibió en un 100% a los cuatro hongos fitopatógenos con una D<sub>E90</sub> (64.43 mL L<sup>-1</sup>), el cual se observa en la Figura 2 (T1.2) el efecto inhibitorio prevaleció desde las primeras 24 h hasta 168 h respectivamente, estos resultados difieren con lo propuesto por Soares et al. (2015) donde reportan porcentajes de inhibición de 62.7% en *A. tenuissima*, 55.9% en *A. alternata*, 41.3% en *F. oxysporum* y 57.4% en *C. gloeosporioides*, usando cepas de *B. amylolyquefaciens*. Mientras que usando una D<sub>E90</sub> (4.46 mL L<sup>-1</sup>) de NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa inhibió 100, 95.06, 90.71 y 72.68% a los fitopatógenos *R. solani*, *C. acutatum*, *F. solani* y *A. alternata*. Un efecto similar se observó con el tratamiento NPs Graf + EcBa que presentó 100, 91.62, 79.21 y 73.40% a *R. solani*, *F. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*, bajo una D<sub>E90</sub> de 8.59 mL L<sup>-1</sup>.

Por lo anterior, se demuestra que al usar el extracto de *B. amylolyquefaciens* con nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno, las cantidades a utilizar son menores en comparación de solo usar el extracto bacteriano, logrando un efecto de control similar y eficiente como se muestra en la Figura 2, la D<sub>E90</sub> de los tratamientos T3.2 y T4.2 (NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa y NPs Graf + EcBa) con respecto al testigo (Tx). En otras investigaciones se ha demostrado la actividad antifúngica que presentan las nanopartículas sobre los hongos fitopatógenos, Koka et al. (2019) mencionan que las nanopartículas de MgO a 0.5 mg mL<sup>-1</sup> lograron una zona de inhibición de 16.33 mm en placa Petri aproximadamente 18.14% de inhibición en *A. alternata* y 14.33 mm o 15.92% en *R. solani*, si comparamos estas dosis con las utilizadas en este estudio donde se aplicó 89.2 mg L<sup>-1</sup> o 0.08 mg mL<sup>-1</sup> aproximadamente en D<sub>E90</sub> del tratamiento NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa, se observó que al usar dosis muy bajas de dióxido de silicio, se obtienen excelentes porcentajes de inhibición micelial. Por su parte, Pariona et al. (2018) indicaron que las nanopartículas de cobre (NPs-Cu) presentaron un 87 y 90% de inhibición de crecimiento de micelio de *F. solani* con dosis de 0.75 y 1 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Correa et al. (2018) señalaron un 100% de inhibición micelial en los hongos: *A. alternata*, *C. gloeosporoides*, *C. fragariae* y *Rhizopus stolonifer* usando nanopartículas de quitosano y aceite esencial de tomillo (NPs-TEO-Np 3 y 5%).

**Tabla 2. Prueba de efectividad biológica de las dosis efectivas de los tratamientos sobre el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos.**

Tratamiento	Dosis efectiva	Inhibición micelial (%)			
		<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>A. alternata</i>
<b>NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa</b>	D <sub>E</sub> 70	70.65 <sup>c</sup>	66.25 <sup>b</sup>	61.12 <sup>c</sup>	63.25 <sup>a</sup>
	D <sub>E</sub> 90	90.71 <sup>b</sup>	100.00 <sup>a</sup>	95.06 <sup>a</sup>	72.68 <sup>d</sup>
<b>NPs Graf + EcBa</b>	D <sub>E</sub> 70	70.46 <sup>c</sup>	19.65 <sup>c</sup>	44.71 <sup>d</sup>	50.40 <sup>f</sup>
	D <sub>E</sub> 90	91.62 <sup>b</sup>	100.00 <sup>a</sup>	73.40 <sup>b</sup>	79.21 <sup>c</sup>
<b>EcBa</b>	D <sub>E</sub> 70	100.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>a</sup>	93.87 <sup>a</sup>	83.75 <sup>b</sup>
	D <sub>E</sub> 90	100.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>a</sup>
<b>Testigo</b>	0	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>

Media con letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 2. Actividad *in vitro* de dosis inhibitorias sobre hongos fitopatogénos.** T1.1 y T1.2=  $D_{E70}$  y  $D_{E90}$  de EcBa, T3.1 y T3.2=  $D_{E70}$  y  $D_{E90}$  de NPs  $\text{SiO}_2$  + EcBa, T4.1 y T4.2=  $D_{E70}$  y  $D_{E90}$  de NPs Graf + EcBa y Tx= Testigo.

### **Evaluación *in vitro* de extractos de *B. amyloliquefaciens* enriquecidos con nanopartículas sobre la producción de estructuras reproductivas de hongos fitopatógenos**

Los resultados de la producción de estructuras reproductivas de los hongos fitopatógenos, muestran reducción significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Tabla 3). El tratamiento NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa presentó los valores más bajos en la producción de estructuras en *F. solani*, *R. solani* y *C. acutatum* bajo los efectos de las dosis efectivas (D<sub>E30</sub>, D<sub>E50</sub> y D<sub>E70</sub>) y se observó una inhibición de estructuras reproductivas de 96.89, 84.06, 92.45 y 89.28% en *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum*, *A. alternata*, respectivamente. Un efecto similar presentó NPs Graf + EcBa en la producción de estructuras y mostro valores de inhibición de 82.17, 75.93, 86.79 y 96.54% en *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum*, *A. alternata*, bajo la dosis más alta (D<sub>E70</sub>), seguido de EcBa, con respecto al testigo absoluto (0), que mostró los valores más altos en producción de estructuras y con 0% de inhibición, respectivamente.

Diversos compuestos antimicrobianos reducen la producción y germinación de esporas de hongos fitopatógenos, lo que resulta beneficioso ya que limitan su reproducción y diseminación. En un estudio realizado por Ley et al. (2018) señalaron un 88.15% de inhibición en la germinación de zoosporas de *Phytophthora capsici* usando *B. amyloliquefaciens*, por esta razón el extracto usado disminuyó significativamente la producción de las estructuras reproductivas de los hongos.

Por su parte, Wang et al. (2007) reportaron que la fengicina aislada de *B. subtilis* posee actividad antagónica sobre *F. graminearum* y Zouari et al. (2016) encontraron que la fengicina es producida por *B. amyloliquefaciens*. Barroso et al. (2021) reportaron que los compuestos de β-citronelol, eucaliptol y D- limoneno inhiben la esporulación de *C. acutatum* en 100, 82.27 y 63.13%, similares a los obtenidos en el tratamiento NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa bajo la D<sub>E30</sub>, 50 y 70 (84.90, 92.45 y 88.68%) y en el mismo patógeno.

### **Tabla 3. Producción e inhibición de estructuras reproductivas de hongos fitopatógenos bajo la influencia de nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno.**

Tratamiento	D <sub>E</sub>	<i>F. solani</i>		<i>R. solani</i>		<i>C. acutatum</i>		<i>A. alternata</i>	
		Es	In (%)	Escl	In (%)	Es	In (%)	Es	In (%)
NPs SiO <sub>2</sub> + EcBa	D <sub>E</sub> 30	1.49 <sup>c</sup>	78.29 <sup>bc</sup>	67.33 <sup>c</sup>	36.87 <sup>c</sup>	0.42 <sup>d</sup>	84.90 <sup>a</sup>	42.66 <sup>a</sup>	7.83 <sup>f</sup>
	D <sub>E</sub> 50	0.64 <sup>c</sup>	90.69 <sup>ab</sup>	20.00 <sup>e</sup>	81.25 <sup>a</sup>	0.21 <sup>d</sup>	92.45 <sup>a</sup>	13.92 <sup>cde</sup>	69.93 <sup>bc</sup>
	D <sub>E</sub> 70	0.21 <sup>c</sup>	96.89 <sup>a</sup>	17.00 <sup>e</sup>	84.06 <sup>a</sup>	0.32 <sup>d</sup>	88.68 <sup>a</sup>	4.96 <sup>f</sup>	89.28 <sup>a</sup>
NPs Graf + EcBa	D <sub>E</sub> 30	4.00 <sup>b</sup>	41.86 <sup>d</sup>	89.00 <sup>b</sup>	16.56 <sup>d</sup>	2.34 <sup>ab</sup>	16.98 <sup>d</sup>	28.16 <sup>b</sup>	39.17 <sup>e</sup>
	D <sub>E</sub> 50	0.90 <sup>c</sup>	86.82 <sup>abc</sup>	64.00 <sup>c</sup>	40.00 <sup>c</sup>	1.54 <sup>c</sup>	45.28 <sup>bc</sup>	18.72 <sup>c</sup>	59.56 <sup>d</sup>
	D <sub>E</sub> 70	1.22 <sup>c</sup>	82.17 <sup>bc</sup>	25.66 <sup>de</sup>	75.93 <sup>ab</sup>	0.37 <sup>d</sup>	86.79 <sup>a</sup>	1.60 <sup>f</sup>	96.54 <sup>a</sup>
EcBa	D <sub>E</sub> 30	3.30 <sup>b</sup>	51.93 <sup>d</sup>	88.33 <sup>b</sup>	17.18 <sup>d</sup>	1.76 <sup>bc</sup>	37.74 <sup>c</sup>	12.37 <sup>de</sup>	73.27 <sup>bc</sup>
	D <sub>E</sub> 50	1.54 <sup>c</sup>	77.52 <sup>c</sup>	60.00 <sup>c</sup>	43.75 <sup>c</sup>	1.17 <sup>c</sup>	58.49 <sup>b</sup>	16.85 <sup>cd</sup>	63.59 <sup>cd</sup>
D <sub>E</sub> 70	1.06 <sup>c</sup>	84.49 <sup>abc</sup>	33.66 <sup>d</sup>	68.44 <sup>b</sup>	0.48 <sup>d</sup>	83.02 <sup>a</sup>	10.88 <sup>a</sup>	76.49 <sup>b</sup>	
Testigo	0	6.88 <sup>a</sup>	0.00 <sup>e</sup>	106.66 <sup>a</sup>	0.00 <sup>e</sup>	2.82 <sup>a</sup>	0.00 <sup>e</sup>	46.29 <sup>a</sup>	0.00 <sup>e</sup>

Valores con letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ), Es= Esporas  $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , Escl= Esclerocios producidos en placa Petri y In (%) = Porcentaje de inhibición de esporas.

### Conclusiones

Los extractos de *B. amyloliquefaciens* con nanopartículas (NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa y NPs Graf + EcBa) fueron eficaces en el control *in vitro* de los hongos fitopatógenos evaluados, lograron inhibir el crecimiento de micelio y disminuyeron la producción de estructuras reproductivas (esporas y esclerocios) de 84% hasta 100%. La ventaja de usar nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno es por el efecto sinérgico que se produjo al combinarse con el extracto, reduciendo las dosis y aumentando el efecto inhibitorio en *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum* y *A. alternata*. Por lo que estos tratamientos pueden considerarse como alternativa en el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos y se recomienda que estos resultados sean evaluados en invernadero y campo abierto para sustentar su efectividad.

### Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Antonio Orozco Plancarte (No. CVU: 605454) para la realización de sus estudios de Postgrado y a la empresa Cultra S.A. de C.V. por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

**Literatura citada**

- Aguirre, C. C. T.; García, P. y Raya, J. C. 2007. El Silicio en los organismos vivos. *Interciencia*. 32(8): 504-509.
- Albañil, J. J. A.; Mariscal, A. L. A.; Martínez, M. T. O.; Anaya, L. J. L.; Cisneros, L. H. C. y Pérez, R. H. A. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 11(enero): 2191-2197.
- Arcos, J. y Zúñiga, D. 2015. Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. *Ecología Aplicada*. 2(14): 95-101.
- Barroso, A. A. C.; Ochoa, F. Y. M.; Cerna, C. E.; Tucuch, P. M. A.; Olalde, P. V. y Robles, Y. L. 2021. Manejo *in vitro* de antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en aguacate mediante el uso de principios activos botánicos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8(2): e3038. DOI:10.19136/era.a8n2.3038.
- Coromoto, A. Y. y Reyes, I. 2018. Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bioagro*. 1(30): 59-66.
- Correa, P. Z. C.; Bautista, B. S.; Hernández, L. M. y Marquina, V. M. A. 2018. Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 3(36): 457-467.
- Enespa, Dwivedi, S. K. 2014. Effectiveness of some Antagonistic fungi and botanicals against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infecting brinjal and tomato plants. *Asian Journal Plant Path*. 1(8): 18-25.
- Ganesh, B.; Isloor, A. and Ismail, A. 2013. Enhanced hydrophilicity and salt rejection study of graphene oxide-polysulfone mixed matrix membrane. *Desalination*. 313: 199-207. DOI:10.1016/j.desal.2012.11.037.
- Habe, H.; Toshiaki, T. and Tomohiro, I. 2017. Screening of a *Bacillus subtilis* Strain producing multiple types of cyclic lipopeptides and evaluation of their surface-tension-lowering activities. *Journal of Oleo Science*. 66(7): 785-790.
- Hernández, S. M.; Hernández, C. F. D.; Lira, S. R. H. y Gallegos, M. G. 2010. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. con Microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su Efecto en Crecimiento y Rendimiento de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Agraria Nueva Epoca*. Nos. 1, 2, 3(7): 17-25.
- Kim, P. I.; Ryu, J.; Kim, Y. H. and Chi, Y. T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol Biotechnol*. 20(1): 138-145.

- Koka, J. A.; Wani, A. H. and Bhat, M.Y. 2019. Evaluation of antifungal activity of Magnesium oxide (MgO) and Iron oxide (FeO) nanoparticles on rot causing fungi. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 9(2-s):173-178.
- Ley, L. N.; Márquez, Z. I.; Carrillo, F. J. A.; León, F. J.; Cruz, L. I.; García, E. R. S. and Allende, M. R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2):1-18. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-2.
- Liu, L.; Liu, J.; Wang, Y.; Yan, X. and Sun, D. 2011. Facile synthesis of monodispersed silver nanoparticles on graphene oxide sheets with enhanced antibacterial activity. *New Journal of Chemistry*. 35(7): 1418-1423.
- Lira, S. R. H.; Méndez, A. B.; De los Santos, V. G. y Vera, R. I. 2018. Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*, 28 (2): 9-24. DOI: 10.15174/au.2018.1575.
- Mckeen, C. D.; Reilly, C. C. and Pusey, P. L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Ecology and Epidemiology* 2(76): 136-139.
- Mejía, B. M. A.; Cristobal, A. J.; Tun, S. J. M. y Reyes, R. A. 2016. Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia*. 8(50): 1123-1135.
- Montero, T. V.; Guerrero, A. B. Z.; José Luis Anaya, L. J. L.; Martínez, M. T. O.; Guevara, O. L. y González, C. M. M. 2013. Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(4): 1043-1054.
- Ochoa, Y. M.; Cerna, C. E.; Landeros, F. J.; Hernández, C. S. y Delgado O. J. C. 2012. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium spp.* *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 81: 69-73. ISSN 0031 9457.
- Pariona, N.; Hermida, M. L. A; Martínez, E. A. I.; Sánchez, R. D.; Carrión, G.; López, L. D.; Rosas, S. G.; Rodríguez, H. B. y Duran, B. Z. 2018. Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. *Revista ECI Perú*. 2(15): 109-116.

- Patil, C.; Borase, H.; Patil, S.; Salunkhe, R. and Salunke, B. 2012. Larvicidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Pergularia daemia* plant latex against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* and nontarget fish *Poecillia reticulata*. *Parasitology Research*, 111(2): 555-562.
- Ramírez, C.; Zorith, S.; Castro, L.; Arauz, L. F.; Uribe, L. L. y Uribel, L. 2015. Efecto de cuatro rizobacterias promotoras de crecimiento sobre la pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile dulce (*Capsicum annuum*). *Agronomía Costarricense*. 39(3): 87-100.
- Rezuanul, I. Md.; Tae, J. Y.; Se, L. Y. and Hyun, S. C. 2012. Insolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology*. 1(40): 59-65. Doi: 10.5941/MYCO.2012.40.1.059.
- Ramyabharathi, S. A.; Meena, B. and Raguchander, T. 2012. Induction of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through h liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *Journal of Today's Biological Sciences: Research & Review*. India. 1(1):50-60.
- Ríos, E. A.; Vega, B. J. R.; Villegas, J. G. y Sánchez, J. A. 2020. Nanoestructuras de silicio en biomedicina y biotecnología. *Revista de Física Momento*. 60: 18-40. DOI:10.15446/mo.n60.78272.
- Santos, H. A.; Bimbo, L. M.; Peltonen, L. and Hirvonen, J. 2014. Inorganic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery and Imaging. *Targeted Drug Delivery: Concepts and Design*. 571–613. DOI:10.1007/978-3-319-11355-5\_18.
- Sarlak, N.; Taherifar, A. and Salehi, F. 2014. Synthesis of nanopesticides by encapsulating pesticide nanoparticles using functionalized carbon nanotubes and application of new nanocomposite for plant disease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(1): 4833-4838.
- Soares, M. A.; Li, H. Y.; Bergen, M.; Da Silva, J. M.; Kowalski, K. P. and White, J. F. 2015. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix* L.). *Plant and Soil*, 405(1-2): 107–123. DOI:10.1007/s11104-015-2638-7.
- Vásquez, R. L. M. y Castaño, Z. J. 2017. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen: una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*. 20 (2): 363-374.

- Wang, J.; Liu, J.; Chen, H. and Yao, J. 2007. Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 76: 889-894. DOI:10.1007/s00253-007-1054-1.
- Yesid, A. y Sanchez, L. MSc. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova Ciencias Biomedicas*. 18(10):135-250. ISSN: 1794-2470.
- Zouari, I.; Jlaiel, L.; Tounsi, S. and Trigui, M. 2016. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. *Biological Control*. 1(100): 54-62.

## Conclusión general

Se observó que los metabolitos de *B. amyloliquefasciens* mostraron valores inhibitorios eficientes, mientras que al mezclar las nanopartículas funcionalizadas con los metabolitos, se usaron menos dosis logrando valores inhibitorios similares.

Los tratamientos con nanopartículas fueron eficaces en el control *in vitro* de los hongos fitopatógenos logrando inhibir el crecimiento de micelio y disminuyeron la producción de estructuras reproductivas, siendo NPs SiO<sub>2</sub> + EcBa que mostró mejor efecto de control.

En los hongos *F. solani*, *R. solani* y *C. acutatum* todos los tratamientos mezclados con nanopartículas ejercieron efecto de control eficiente, sin embargo, para el control de *A. alternata* el tratamiento NPs Graf + EcBa presentó los valores más altos de inhibición micelial e inhibición de estructuras reproductivas.

Por lo que estos tratamientos pueden considerarse como alternativa en el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos y se recomienda que estos resultados sean evaluados en invernadero y campo abierto para sustentar su efectividad.

**Anexos**

Figura 1. Muestreo de plantas y frutos con síntomas de enfermedad.

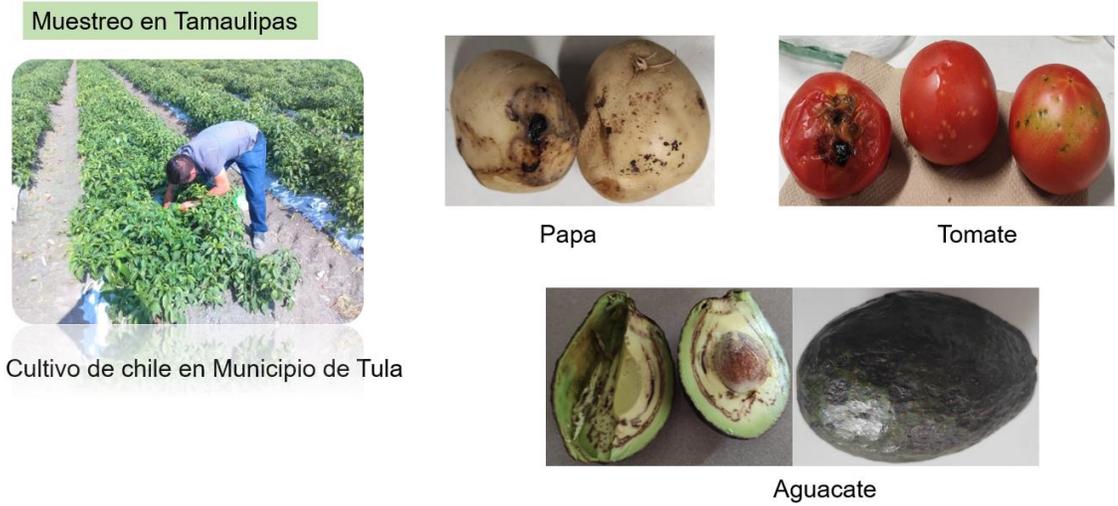
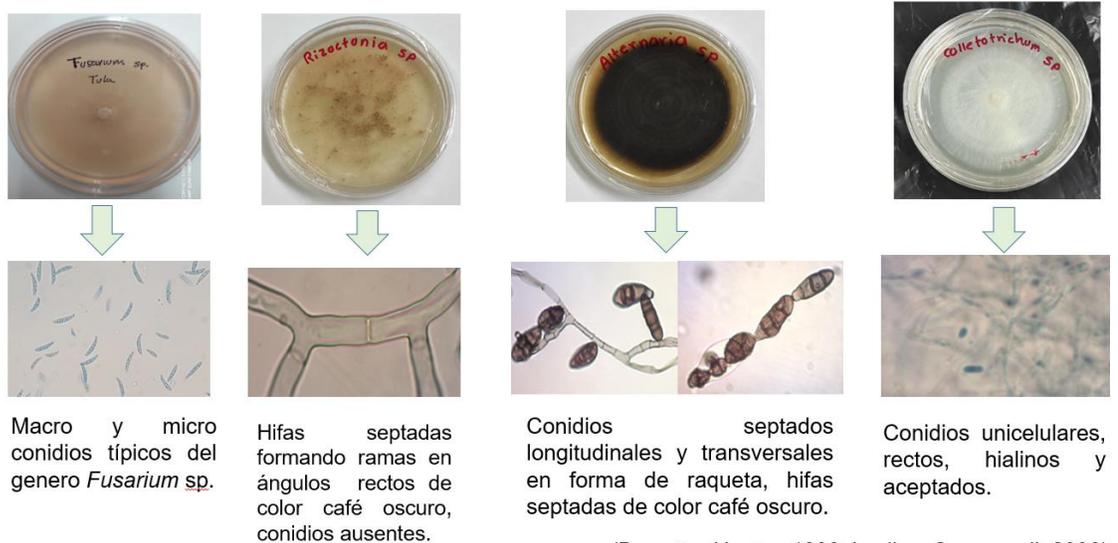


Figura 2. Identificación morfológica de hongos fitopatógenos.



(Barnett y Hunter, 1998; Leslie y Summerell, 2006).

Figura 3. Identificación molecular mediante la reacción en cadena de polimerasa ITS-PCR.

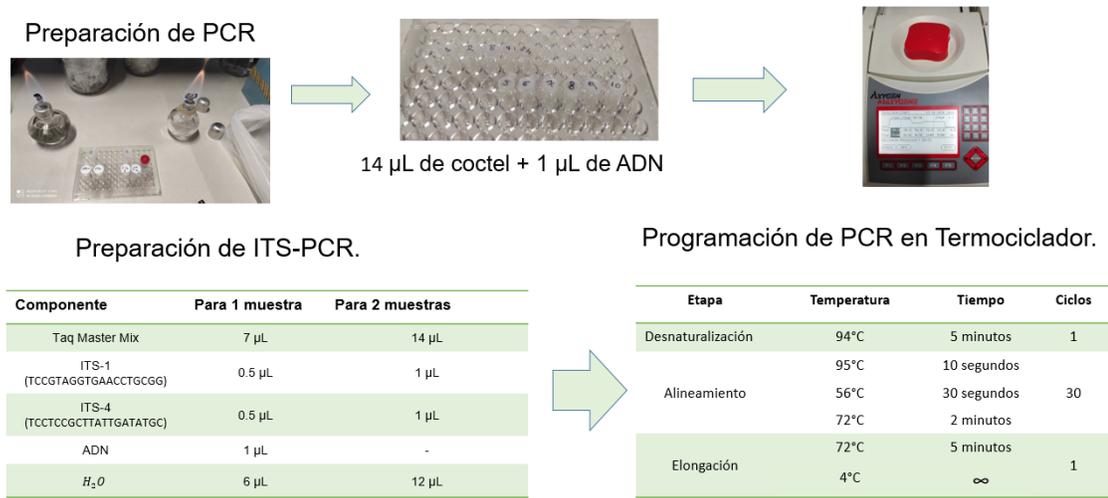


Figura 4. Visualización de bandas amplificadas de ADN-PCR en gel de agarosa al 2%.

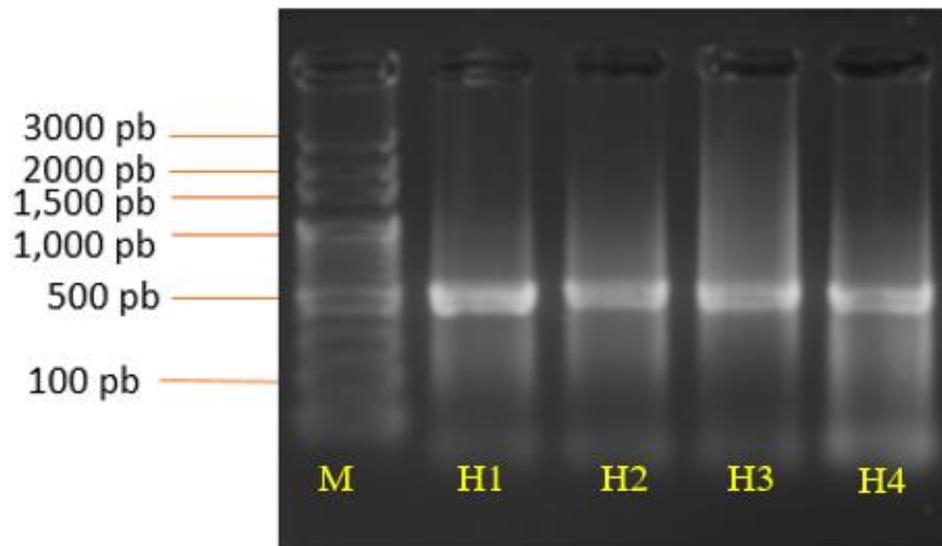


Tabla 1. Comparación molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA de las especies de hongos aisladas de plantas y frutos.

<b>Muestra</b>	<b>Especie identificada</b>	<b>Primers</b>	<b>No. de accesoión Gen Bank</b>	<b>Índice de similitud (%)</b>
<b>H1</b>	<i>Fusarium solani</i>		MF510823	99.43
<b>H2</b>	<i>Alternaria alternata</i>	ITS1-ITS4	AB470913	97.91
<b>H3</b>	<i>Rhizoctonia solani</i>		MN258593	100
<b>H4</b>	<i>Colletotrichium acutatum</i>		KX436091	94.72