

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



APLICACIÓN DE NANOPARTICULAS DE COBRE Y SILICATO DE POTASIO  
PARA INDUCIR TOLERANCIA A *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* EN  
TOMATE

**Tesis**

Que Presenta CLAUDIA FRANCELY CUMPLIDO NAJERA  
Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

APLICACIÓN DE NPS DE COBRE Y SILICIO PARA INDUCIR TOLERANCIA A  
*CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* EN PLANTAS DE TOMATE

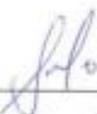
**Tesis**

Elaborada por CLAUDIA FRANCELY CUMPLIDO NAJERA como requisito  
parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN  
HORTICULTURA con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Antonio Juárez Maldonado

Asesor Principal



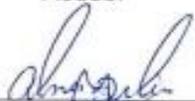
Dra. Susana González Morales

Asesor



Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor



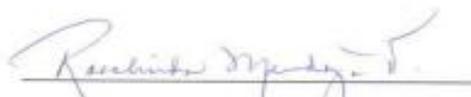
Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Asesor



Dr. Gregorio Cadenas Pliego

Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Subdirectora de Postgrado UAAAN

## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado de la MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA por todo lo que me aportaron sus profesores, programas y asignaturas.

Al Dr. Antonio Juárez Maldonado por apoyarme para poder continuar estudiando, motivarme y dirigirme de la mejor manera, hoy que veo que pude obtener un grado académico más, agradezco cada una de sus palabras y enseñanzas, gracias por la paciencia y comprensión.

A mis Co- Directores de tesis porque de una u otra forma contribuyeron a la realización de mi investigación, por su apoyo y dirección gracias.

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

## **DEDICATORIAS**

A mi familia por apoyarme a cumplir mis metas, por estar para apoyarme cuando sentí que no podría, LOS AMO.

A mi esposo por ser parte de esto, permitirme y apoyarme a seguir creciendo puesto que sabe que esto me hace feliz.

A MI PADRE, que sé que donde quiera que ahora se encuentre está feliz, primeramente porque yo lo soy, y además porque siempre quiso que continuara estudiando, sé que está orgulloso, tanto como yo lo estoy cada que te menciono papá, TE AMO.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	xi
TOMATE ( <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.).....	4
PATÓGENOS EN EL CULTIVO DE TOMATE ( <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> . L).....	4
USO DEL SILICIO EN LA AGRICULTURA.....	5
EL COBRE EN LA AGRICULTURA.....	6
APLICACIÓN DE NPS EN LOS CULTIVOS.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	8
DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.....	11
ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS.....	14
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
PRIMERA ETAPA.....	21
SEGUNDA ETAPA.....	36
SEVERIDAD DE <i>CLAVIBACTER MICHIGANENSIS</i> (CMM) Y CRECIMIENTO DEL CULTIVO.....	36
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN HOJAS.....	40
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRUTOS.....	40
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS.....	51

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Variables agronómicas.....	23
<b>Tabla 2.</b> Actividad enzimática en las hojas de las plantas de tomate.....	26
<b>Tabla 3.</b> Actividad enzimática en los frutos de las plantas de tomate.....	29
<b>Tabla 4.</b> Contenido de antioxidantes no enzimáticos en hojas de tomate.....	31
<b>Tabla 5.</b> Contenido de antioxidantes no enzimáticos en frutos de tomate.....	32
<b>Tabla 6.</b> Capacidad antioxidante ABTS y DPPH en frutos y hojas de plantas de tomate .....	34
<b>Tabla 7.</b> Enzimas en hoja.....	36
<b>Tabla 8.</b> Enzimas en fruto.....	44
<b>Tabla 9.</b> Antioxidantes no enzimáticos en hoja.....	47
<b>Tabla 10.</b> Antioxidantes no enzimáticos en fruto .....	49

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Severidad de daño en plantas de tomate inoculadas con Cmm.....39
- Figura 2.** Rendimiento en plantas de tomate inoculadas con Cmm.....39

Resumen

APLICACIÓN DE NANOPARTICULAS DE COBRE Y SILICATO DE POTASIO  
PARA INDUCIR TOLERANCIA A *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* EN  
TOMATE

POR

CLAUDIA FRANCELY CUMPLIDO NAJERA

MAESTRIA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ANTONIO JUÁREZ MALDONADO –ASESOR–

Saltillo, Coahuila

Julio del 2018

El daño por *Clavibacter michiganensis* en las plantas de tomate es de gran importancia económica en todo el mundo debido a las importantes pérdidas que se generan en el cultivo. Los avances en nanotecnología proporcionan alternativas que se pueden aplicar en el control de patógenos. Las NPs de Cu y el silicio actualmente tienen un uso extendido para el control de patógenos de plantas. Se espera que el uso combinado de ambos tenga un efecto sinérgico en la tolerancia de las plantas contra los patógenos. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la aplicación de nanopartículas de cobre y silicato de potasio sobre la tolerancia a *C.michiganensis* en tomate. Se determinó la incidencia y severidad de las bacterias en el rendimiento de la cosecha de tomate. Se determinaron los niveles de actividad de las enzimas de defensa y los compuestos antioxidantes en las hojas y frutos de tomate para comprender los cambios a nivel bioquímico provocados por las bacterias y por los tratamientos. Los resultados mostraron que la aplicación de nanopartículas de cobre y silicato de potasio fue efectiva para reducir la severidad de *C. michiganensis*. Además, la pérdida de rendimiento debido a la bacteria se redujo en 16.1%. Los análisis bioquímicos mostraron que la aplicación de nanopartículas de cobre y silicato de potasio modificó positivamente la actividad de las enzimas SOD, PAL, GPX y APX, así como la concentración de glutatión reducido y fenoles totales en las hojas. La actividad de las enzimas PAL y GPX, así como los contenidos de licopeno y  $\beta$ -caroteno, incrementaron en los frutos. La aplicación conjunta de NPs de Cu y silicato de potasio cambió los niveles de compuestos enzimáticos y compuestos no enzimáticos que son clave en la defensa de las plantas de tomate, aumentando la tolerancia a *C. michiganensis*.

**Palabras clave:** Estrés biótico, ROS, Antioxidantes.

ABSTRACT

APPLICATION OF COPPER NANOPARTICLES AND POTASSIUM SILICATE TO  
INDUCE TOLERANCE TO CLAVIBACTER MICHIGANENSIS IN TOMATO

BY

CLAUDIA FRANCELY CUMPLIDO NAJERA

MASTER'S IN SCIENCE IN HORTICULTURE  
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ANTONIO JUÁREZ MALDONADO -SESSOR-

Saltillo, Coahuila

July 2018

The damage by *Clavibacter michiganensis* in the tomato plants is of great economic importance worldwide due to the significant losses it generates in the crop. The advances in nanotechnology provide alternatives that can be applied in the control of pathogens. Nano-copper and silicon currently have a widespread use for the control of plant pathogens. The combined use of both is expected to have a synergistic effect on the tolerance of plants against pathogens. The objective of the present investigation was to determine the effect of the application of copper nanoparticles and potassium silicate on tolerance to *C. michiganensis* in tomato.

The presence, severity, and the impact of the bacteria on the yield of the tomato crop were determined. Levels of activity of defense enzymes were determined as well as antioxidant compounds in the leaves and fruits of tomato to understand the changes at the biochemical level caused by the bacteria and by the treatments. The results showed that the application of copper nanoparticles and potassium silicate was effective in reducing the severity of *C. michiganensis*. Also, the loss of yield due to the bacteria was reduced in 16.1%. The biochemical analyzes showed that the application of copper nanoparticles and potassium silicate positively modified the activity of the enzymes SOD, PAL, GPX, and APX, as well as the concentration of reduced glutathione and total phenols in the leaves. The activity of the PAL and GPX enzymes, as well as the contents of lycopene and  $\beta$ -carotene, were elevated in the fruits. The joint application of copper nanoparticles and potassium silicate changed the levels of enzymatic and non-enzymatic compounds that are key in defense of tomato plants, increasing the tolerance to *C. michiganensis*.

Keywords: Biotic stress, ROS, Antioxidants.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los cultivos más expuestos a la diversidad de plagas y enfermedades es el tomate, esto por la constante siembra del cultivo, pues representa gran importancia tanto alimentaria como económica a nivel mundial; para China, India, y Estados Unidos ésta es la principal hortaliza (FAOSTAT., 2013).

Uno de los problemas más frecuentes que limitan la producción de tomate es *Clavibacter michiganensis*, por lo que se considera una bacteria de importancia económica, los daños de *C. michiganensis* se ven a los 5 ó 7 días en los cultivos, presentando necrosis marginal en las hojas, además *C. michiganensis* al penetrar a través de estomas, o hidátodos, (Chalupowicz *et al.*, 2017) en hojas y en frutos de tomate deja pequeñas malformaciones y manchas que influyen en la producción.

Existe una desmedida ventaja entre la evolución y adaptación de las plantas, y el ciclo de vida de los patógenos que atacan a las mismas (Miller *et al.*, 2017), dicha desventaja obliga a los productores a considerar nuevas alternativas que estimulen en las plantas la producción de compuestos de defensa; aunque de manera natural las plantas producen enzimas y metabolitos secundarios que ayudan a tolerar factores de estrés biótico y abiótico (McShan *et al.*, 2014).

La bioestimulación en plantas, es una área de oportunidad a los productores, la bioestimulación con elementos no esenciales, incluye la aplicación de Al, Co, Na, Se y Si, estos elementos brindan beneficios en los cultivos bajo diferentes circunstancias, siendo una de ellas el estrés generado por ataque de patógenos (Jardin., 2015).

El silicio actúa en la síntesis de hormonas como las citoquininas (Markovich *et al.*, 2017), estas hormonas se asocian al crecimiento de los cultivos y a las respuestas fisiológicas y moleculares relacionadas a la defensa contra patógenos (Miller *et al.*, 2017), otro beneficio que se consigue con las aplicaciones de silicio es la asimilación de otros nutrientes necesarios en la nutrición de los cultivos,

fortaleciendo a los mismos ante la presencia de plagas y enfermedades (Gengmao *et al.*, 2015), además de la participación como estimulador del sistema antioxidante, característica que se le atribuye a las NPs de Cu de igual forma, estimulando la generación de biocompuestos, como carotenoides, clorofila, fenoles, vitamina C, entre otros (Singh y Rattanpal., 2014).

Particularmente las NPs de Cu, poseen propiedades antimicrobianas, y actúan como elicitador del complejo antioxidante enzimático de defensa de las plantas (Juárez-Maldonado *et al.*, 2016). Las NPs de Cu aumentan la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD, CAT, GPX, y APX que detoxifican especies reactivas de oxígeno (Gill y Tuteja, 2010). Además, se ha reportado en tomate que incrementan el rendimiento así como el contenido de compuestos antioxidantes en fruto (Juárez-Maldonado *et al.*, 2016). Mientras que en las hojas de las plantas de tomate incrementaron la actividad enzimática de APX, CAT, SOD, GPX y PAL (Hernández-Hernández *et al.*, 2018).

Por lo anterior esta investigación tiene como objetivo determinar la incidencia y severidad de daño de *Clavibacter michiganensis* con la aplicación de silicio y NPs de Cu además de cambios agronómicos y en compuestos antioxidantes en plantas de tomate.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar los cambios en el contenido de antioxidantes y compuestos de defensa.
- Determinar el efecto de la aplicación de Si y NPs de Cu sobre el contenido de antioxidantes en los frutos y rendimiento de tomate infestado con *C. michiganensis*.
- Evaluar la severidad de daño por *C. michiganensis*. En plantas de tomate tratadas con Silicio y NPs de Cu.

### **Hipótesis**

La aplicación de Silicio y NPs de Cu en plantas de tomate, aumenta la concentración de enzimas y compuestos antioxidantes induciendo tolerancia a *C. michiganensis*.

## REVISION DE LITERATURA

### **TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

En México la hortaliza de mayor importancia económica es el tomate, forma parte de la canasta básica y diversos estudios asocian el contenido de licopeno del fruto, con la prevención de muchas enfermedades en humanos. Aunque es un cultivo de igual forma muy susceptible al ataque de patógenos, de tal forma que muchos de ellos al no controlarse eficazmente pueden terminar con hectáreas completas del cultivo o influir en la calidad del mismo (Notario-Medellín y Sosa-Morales, 2012).

Los tomates son ricos en vitaminas A y C,  $\beta$ -caroteno, licopeno y otros antioxidantes, estos engloban un grupo de sustancias de diversas estructuras químicas y que cumplen con variadas funciones. Captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios, o por otros mecanismos en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios. Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno singulete. El ser humano está protegido del estrés oxidativo gracias a la acción de estas sustancias antioxidantes que poseen diferentes funciones (Zapata *et al.*, 2007).

### **PATÓGENOS EN EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*. L)**

*Clavibacter michiganensis* es una bacteria que penetra a través de los estomas y los hidátodos causando daños severos en el cultivo, entre los que se observa una necrosis marginal en las hojas, causando grandes pérdidas (Chalupowicz *et al.*, 2017). El control de esta bacteria es de gran importancia, y aunque existen productos químicos para el control de este patógeno, la eficiencia es baja, además de los riesgos que presentan para la salud (Nandi *et al.*, 2018), por lo que es necesario proponer nuevas alternativas que sean eficientes.

Otra enfermedad de las principales registradas en el cultivo de tomate es la antracnosis, que se debe al hongo *Colletotrichum sp.* El cual afecta durante la fase de postcosecha provocando pérdidas que disminuyen la calidad y cantidad de cosecha, al afectar directamente al fruto. Los productores hacen uso de numerables químicos de control, dejando de lado los daños ambientales y en la salud por el uso irracional de los mismos (Weerahewa y Dilshan, 2015).

Otras plagas importantes son *Bermisia tabaci*, conocida comúnmente como mosquita blanca, *Frankliniella occidentalis* conocidos comúnmente como trips que entre otros daños físicos que pueden provocar sobre el fruto, son vectores de virus y es donde más recae la importancia de control, la paratrioza cuyo nombre científico es *Bactericera cockerelli*.

Por otra parte un hongo de mucha importancia por los daños que puede llegar a causar es *Fusarium sp.* Ya que apenas se presentan las condiciones de humedad y temperatura adecuadas es casi un hecho que si no se ha previsto atacara al cultivo drásticamente (Cih – Dzul *et al*, 2011).

## **USO DEL SILICIO EN LA AGRICULTURA**

El silicio es el segundo elemento más abundante sobre la litosfera, además existe la suposición de que si está presente en tal cantidad, en tiempos remotos debió jugar algún importante papel sobre los organismos vivos incluyendo muchas de las funciones propias en las plantas (Aguirre *et al*, 2007).

En condiciones de campo el silicio puede ayudar en el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos al aumentar la disponibilidad de elementos como el P, Ca, Mg, K, y B, además en cultivos como el trigo y arroz pudo comprobarse que este elemento al estar presente en cantidades altas, ayuda a impedir la pérdida de agua porque disminuye significativamente la transpiración en condiciones de baja humedad esto debido a la formación de una capa de silicio, por otra parte este elemento se asocia con los constituyentes de la pared celular que provoca una disminución en la degradación enzimática que ayuda a las plantas a ser menos susceptibles al ataque de patógenos (Borda *et al*, 2007).

En la búsqueda de alternativas de control para las plagas y enfermedades en diversos cultivos que no sea el uso de químicos, sino aplicaciones de productos de control que no impacten negativamente en la economía ni en la sostenibilidad ambiental, actualmente se estudia el efecto del silicio, y numerosos estudios demuestran que es eficaz en el control de varios hongos que propician enfermedades en las plantas, incluyendo la pudrición por *Phytophthora*, antracnosis, tizón y marchitamiento por *Fusarium sp.* Por lo tanto el uso de silicio en los cultivos puede usarse como una estrategia para el control de plagas y enfermedades y así reducir el uso de fungicidas y productos químicos que pongan en riesgo la salud y otras amenazas ambientales (Weerahewa y Dilshan, 2015).

### **EL COBRE EN LA AGRICULTURA**

El cobre es un elemento esencial que se requiere aplicar en cantidades pequeñas puesto que es un micronutriente, los cultivos lo requieren para muchas de sus funciones básicas y buen desarrollo pero en pequeñas cantidades, entre las funciones en las que participa están la fotosíntesis, la germinación de semillas crecimiento de los cultivos y otras funciones estructurales y anatómicas propias de las plantas, y cuando este elemento se aplica por encima de los requerimientos pueden generarse especies reactivas de oxígeno (ROS) que son capaces de activar el sistema enzimático de defensa a fin de eliminar las ROS generadas (Adrees *et al.*, 2015).

La falta de suministro de cobre en los cultivos puede afectar la síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos en las plantas así como también la escasa fotosíntesis impactando en la disminución en el rendimiento por una reducción en la fertilidad del polen y por lo tanto en la fructificación, afectando el llenado de frutos (Lehmann y Rillig., 2015).

### **APLICACIÓN DE NPs EN LOS CULTIVOS**

El uso de partículas que van desde 1 a 100 nanómetros de tamaño cada vez es más común, para la obtención de diversos fines y en muchas disciplinas, en la

agricultura ha podido comprobarse que el efecto de la aplicación de un material a escala nanométrica en las plantas reacciona muy diferente a como lo haría un material aplicado en su forma micro o normal, además de dar efectos muy positivos aplicando a muy bajas dosis, se conoce que interactúan con el transporte de proteínas a la membrana y que por su diminuto tamaño son capaces de penetrar en la membrana celular. Las plantas requieren de diversos minerales y también de aplicaciones de metales como Fe, Zn, Mn y Cu para desarrollar reacciones redox y con ello la activación de enzimas proteínas y cofactores etc.

La disposición de los metales antes mencionados puede diferir mucho por lo que las plantas han desarrollado mecanismos para la absorción y asimilación de estos, uno de ellos es la absorción a través de las raíces (Juárez-Maldonado *et al.*, 2016).

La generación de enzimas y compuestos antioxidantes se hace presente de igual forma como protección a la propia planta para evitar la muerte de la misma (Fu *et al.*, 2014).

El cobre a escala nanométrica, es decir NPs de Cu, tiene propiedades antimicrobianas que podrían beneficiar, provocando la inducción de tolerancia a algún patógeno, y radicales que aumentan la actividad enzimática como se mencionó anteriormente, teniendo así cultivos de mayor valor nutracéutico (Juárez-Maldonado *et al.*, 2016). Además que al aplicar cobre de esta manera, actúa como una forma quelatada, evitando el desperdicio y asegurando así la función del mismo evitando la disminución en la actividad de muchas enzimas y crecimiento reproductivo de las plantas (Kirkby y Römheld, 2007).

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Este estudio se realizó en un invernadero ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, México (25 ° 21'5 "de latitud norte y 101 ° 1'47" de longitud oeste, Elevación 1.742 msnm. El estudio consta de dos etapas que se describen a continuación. Las NPs de Cu utilizadas en este estudio fueron sintetizadas en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) utilizando la metodología de Cadenas-Pliego *et al.* (2013).

El silicio que se aplicó fue en forma de silicato de potasio.

Etapa 1. En esta etapa el objetivo fue determinar el intervalo de concentraciones de NPs de Cu y silicio para obtener los mejores tratamientos en cuanto a variables agronómicas, bioquímicas, y en la disminución de la severidad de daño por *Clavibacter michiganensis*, y de esa forma obtener los mejores resultados para su posterior aplicación en la segunda etapa.

Etapa 2. Aplicación de los tratamientos con mejores resultados en la primer etapa para las variables evaluadas, inoculación de las plantas con *Clavibacter michiganensis*, evaluación de la concentración de enzimas y componentes antioxidantes, así como la severidad de daño por *Clavibacter michiganensis*.

Para la primera etapa se desarrolló un experimento con plantas de tomate tipo saladete y con hábito de crecimiento indeterminado, usando como semilla la variedad "persistente". Las plantas se colocaron en bolsas de polietileno negras de 10 L de capacidad, con una mezcla de sustrato perlita-peat moss en proporción 1:1 (v/v). Las plantas fueron manejadas a un solo tallo, aplicando las labores culturales correspondientes. Para la nutrición del cultivo se utilizó la solución nutritiva Steiner (Steiner, 1961), manejada en diferentes concentraciones de acuerdo a la etapa fenológica.

Teniendo los siguientes tratamientos:

Los tratamientos consistieron en la aplicación de Si (0, 184 y 460 mg L<sup>-1</sup>), NPs de Cu (0, 50 y 250 mg L<sup>-1</sup>) y las combinaciones de estos, siendo un total de nueve tratamientos: 1) Testigo absoluto (T0); 2) 50 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu; 3) 250 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu; 4) 184 mg L<sup>-1</sup> Si; 5) 184 mg L<sup>-1</sup> Si + 50 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu; 6) 184 mg L<sup>-1</sup> Si + 50 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu; 7) 460 mg L<sup>-1</sup> Si; 8) 460 mg L<sup>-1</sup> Si + 50 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu; 9) 460 mg L<sup>-1</sup> Si + 250 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu. Las aplicaciones fueron por vía foliar, y en intervalos de 14 días iniciando al momento de la floración 4 semanas después del trasplante. Se utilizó silicato de potasio (K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) como fuente de silicio. Mientras que las nanopartículas de Cu (NPs de Cu) usadas fueron de tamaño promedio de 42 nm y forma esférica.

En la segunda etapa se desarrolló el experimento utilizando una variedad de tomate de crecimiento indeterminado "El Cid F1" (Harris Moran, Davis, CA, EE. UU.) De tipo saladette. El trasplante se realizó en bolsas negras de polietileno de 10 l de capacidad. El cultivo se estableció en condiciones de invernadero, con temperaturas promedio de 35°C - 20°C para el día y la noche, humedad relativa del 60% y radiación fotosintéticamente activa de 1400 μmol m<sup>-2</sup> bajo las mismas condiciones que en la etapa uno, a excepción de la inoculación con *Clavibacter michiganensis* que se llevó a cabo en esta segunda etapa de la siguiente forma:

La bacteria *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis* (Cmm) se obtuvo de la colección del Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Horticultura. La bacteria se incrementó en placas de Petri con medio de cultivo NBY (caldo nutritivo 0.8%, extracto de levadura 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.025%, agar 1.5%). Las placas de petri se incubaron a 29°C durante 48 h, después de lo cual se recogió el crecimiento bacteriano.

Las plantas correspondientes a los tratamientos con Cmm se inocularon a los 28 días después del trasplante (DDT). Se preparó una solución de 1X10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de Cmm. Se realizaron heridas en las hojas de las plantas de tomate simulando una infección natural y se sumergieron

en 30 mL de solución bacteriana durante 5 minutos, y el resto se roció en el follaje.

Aproximadamente un mes después del trasplante, se realizó la inoculación con *Clavibacter michiganensis*, y la aplicación de tratamientos igual que en la primera etapa fue cada 15 días después del trasplante, siendo los siguientes tratamientos en esta etapa:

Las NPs de Cu se aplicaron en dosis baja y dosis alta, con un total de seis tratamientos:

1) 50 mg de L<sup>-1</sup> NPs de Cu + 184 mg de L<sup>-1</sup> Si; 2) 50 mg de L<sup>-1</sup> NPs de Cu+ 460 mg de L<sup>-1</sup> Si ; 3) 250 mg de L<sup>-1</sup> NPs de Cu+ 184 mg de L<sup>-1</sup> Si ; 4) 250 mg L<sup>-1</sup> Cu NPs + 460 mg L<sup>-1</sup> Si, estos cuatro tratamientos inoculados con Cmm, 5) Un tratamiento inoculado con Cmm y sin aplicación de Si o NPs de Cu(Cmm) y 6) Un Testigo absoluto o control (T0). Cinco aplicaciones en total se hicieron por vía foliar. Como fuente de Silicio se aplicó silicato de potasio (K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>). Mientras que las NPs de Cu utilizados fueron de tamaño promedio de 42 nm y de forma esférica y se sintetizaron según la metodología de (Cadenas-Pliego et al., 2013), siendo las mismas que en la primera etapa.

Determinaciones en la primera y segunda etapa:

Para determinar los efectos de los tratamientos en las plantas de tomate se evaluaron las variables relacionadas al vigor, estas fueron altura de planta, número de racimos, diámetro de tallo, biomasa fresca de planta (suma de hojas y tallo), y peso de frutos por planta.

Para la evaluación de los cambios antioxidantes en las plantas se determinaron compuestos enzimáticos y no enzimáticos, así como otros compuestos de interés como actividad enzimática de PAL y contenido de proteínas en hojas y frutos.

El muestreo en hojas y frutos se llevó a cabo a los 93 días después del trasplante, para esto las hojas se cortaron e introdujeron a nitrógeno líquido para su traslado y almacenamiento en ultracongelador a una temperatura de -80°C. Los frutos se cosecharon considerando el fruto más grande del primer racimo, buscando que

fueran uniformes y sin daños físicos. Estos se colocaron en hielo para su traslado a un congelador a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Determinaciones enzimáticas**

*Extracto Enzimático: (EE)*. Se colocaron 200 mg de tejido vegetal previamente liofilizado y macerado en mortero de mano, se adicionaron 20 mg de polivinil pirrolidona y 1.5 mL de buffer de fosfatos pH 7-7.2 (0.1 M), se sónico por 5 minutos, y a continuación se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en una microcentrífuga. El sobrenadante fue recolectado y filtrado con filtros para jeringa de membrana de PVDF de 0.45 micras de poro (Ramos *et al.*, 2010). Finalmente se diluyó a una proporción 1:20 con buffer de fosfatos. Con este extracto enzimático se determinó: catalasa, superóxido dismutasa, fenilalanina amonio liasa, glutatión peroxidasa, ascorbato peroxidasa, proteínas y glutatión reducido.

*Catalasa (CAT)*: La actividad enzimática de catalasa se cuantificó midiendo 2 tiempos de reacción, tiempo 0 (T0) y tiempo 1 (T1) por el método espectrofotométrico (Cansev *et al.*, 2011). El blanco de calibración: 0.1 mL del EE, 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 y 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5 %.

Para el T0 se mezcló 0.1 mL de EE, 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM e inmediatamente 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5 %.

En el T1 se mezcló 0.1 mL de EE y 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM, después de un minuto de reacción se agregaron 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5 %. La reacción se realizó a  $20^{\circ}\text{C}$  bajo agitación constante, el consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se leyó a 270 nm en el espectro de UV-VIS, usando una celdilla de cuarzo. La diferencia de las absorbancias obtenidas fue interpolada en la ecuación de la curva de calibración realizada con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los estándares se encontraban en un rango de 20 a 200 mM. El resultado obtenido se sustituyó en la siguiente fórmula para reportarlo como actividad específica.

$$CAT \left( \frac{UI}{mg} \right) = \frac{\left( \left( \frac{UI}{mL} \text{ de cada muestra} \right) \times \frac{1.5 mL}{0.1 mL} \right) \times FD}{Concentración de proteínas \left( \frac{mg}{mL} \right)}$$

Donde:

FD= Factor de dilución. UI = Actividad enzimática (1  $\mu\text{mol}$  de sustrato convertido  $\times \text{min}^{-1}$ ).

*Superóxido Dismutasa (SOD)*: Se determinó con el Kit de Cayman Superoxide Dismutase Assay (CAYMAN, 2017). En una microplaca, se agregó en cada celdilla lo siguiente: 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 200  $\mu\text{L}$  del Radical Detector, 20  $\mu\text{L}$  de Xantina Oxidasa, se agitó suavemente durante cinco segundos y se cubrió la microplaca se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, enseguida se determinó la absorbancia en el Lector de Microplacas (Modelo ELx808 <sup>TM</sup>) a 450 nm. Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con SOD, los estándares se encontraban en un rango de 0.0 a 0.050 U/ mL de actividad SOD, el resultado obtenidos se sustituyó en la siguiente formula.

$$SOD \left( \frac{UI}{mg} \right) = \frac{\left( \left( \frac{UI}{mL} \text{ de cada muestra} \right) \times \frac{0.23 mL}{0.01 mL} \right) \times FD}{Concentración de proteínas \left( \frac{mg}{mL} \right)}$$

Donde:

FD= Factor de dilución. UI = Actividad enzimática (1  $\mu\text{mol}$  de sustrato convertido  $\times \text{min}^{-1}$ ).

*Fenilalanina amonio liasa (PAL)*: Siguiendo lo descrito por Sykłowska-Baranek (2012), con modificaciones. En un tubo de ensayo se colocaron 0.1 mL de EE, 0.9 mL de L-fenilalanina ( $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ) a 6 mM. Se incubo a 40  $^\circ\text{C}$  por 30 minutos, la reacción se detuvo agregando 0.25 mL de HCl al 5 N. Se colocaron en baño de hielo y se les agregó 5 mL de agua destilada. Para la cuantificación se calibro con un blanco de buffer de fosfatos pH 7 y se determinó absorbancia a 290 nm

en un espectrofotómetro UV-VIS con una celdilla de cuarzo. Las lecturas de las diferentes muestras fueron interpoladas en la ecuación obtenida de la curva de calibración con ácido transcinámico ( $0.01-0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Los resultados se sustituyen en la siguiente formula.

$$PAL \left( \frac{UI}{mg} \right) = \frac{\left( \left( \frac{UI}{mL} \text{ de cada muestra} \right) \times \frac{6.25 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}} \right) \times FD}{\text{Concentración de proteínas} \left( \frac{mg}{mL} \right)}$$

Donde:

FD= Factor de dilución. UI = Actividad enzimática ( $1 \mu\text{mol}$  de sustrato convertido  $\times \text{min}^{-1}$ ).

*Glutación peroxidasa (GPX)*: Se determinó bajo la metodología con modificación de Xue *et al.*, (2001), usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato. Se mezcló en un tubo de ensayo  $0.2 \text{ mL}$  de EE,  $0.4 \text{ mL}$  de Glutación Reducido (GSH) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ ) a  $0.1 \text{ mM}$ ,  $0.2 \text{ mL}$  de  $\text{KNaHPO}_4$  a  $0.067 \text{ M}$ ; enseguida se precalentó la muestra en un baño de agua a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. Para iniciar la reacción se agregaron  $0.2 \text{ mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $1.3 \text{ mM}$ , 10 minutos después esta se detuvo agregando  $1 \text{ mL}$  de ácido tricloro acético ( $\text{C}_2\text{HO}_2\text{Cl}_3$ ) al  $1 \%$ . Se colocaron los tubos en baño de hielo durante 30 minutos. Posteriormente se colocó la mezcla en un tubo para centrifuga y se centrifugó a  $3\ 000 \text{ rpm}$  durante 10 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se tomaron  $0.48 \text{ mL}$  del sobrenadante, se mezcló con  $2.2 \text{ mL}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a  $0.32 \text{ M}$  y  $0.32 \text{ mL}$  del colorante DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)) al  $1 \text{ mM}$ . Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a  $412 \text{ nm}$  con una celdilla de cuarzo, y estas fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con GSH, esta curva se realizó con estándares a concentraciones de  $0.02$  a  $1 \text{ mM}$ . El resultado obtenidos se sustituyó en la siguiente formula.

$$GPX \left( \frac{UI}{mg} \right) = \frac{\left( \left( \frac{UI}{mL} \text{ de cada muestra} \right) \times \frac{3 \text{ mL}}{0.048 \text{ mL}} \right) \times FD}{\text{Concentración de proteínas} \left( \frac{mg}{mL} \right)}$$

Donde:

FD= Factor de dilución. UI = Actividad enzimática (1  $\mu\text{mol}$  de sustrato convertido  $\times \text{min}^{-1}$ ).

*Ascorbato peroxidasa (APX)*: La medición se realizó en dos tiempos T0 (Tiempo inicial) y T1 (Tiempo un minuto de reacción) de acuerdo a Nakano y Asada (1987). Para el T0 se colocó en tubo de 2 mL 0.1 mL de EE, 0.5 mL de ascorbato a 40 ppm, 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 Mm e inmediatamente 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5 % para detener la reacción; en el tiempo T1 se realizó todo lo anterior con la diferencia de que los 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5 % se agregaron 1 minuto después de haber agregado el mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se leyó la absorbancia a 266 nm con celdilla de cuarzo, las absorbancias fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con ácido ascórbico con estándares a concentraciones de 0 a 1 ppm. Los valores obtenidos se sustituyen en la siguiente formula.

$$APX \left( \frac{UI}{mg} \right) = \frac{\left( \left( \frac{UI}{mL} \text{ de cada muestra} \right) \times \frac{2 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}} \right) \times FD}{\text{Concentración de proteínas} \left( \frac{mg}{mL} \right)}$$

Donde:

FD= Factor de dilución. UI = Actividad enzimática (1  $\mu\text{mol}$  de sustrato convertido  $\times \text{min}^{-1}$ ).

### **Antioxidantes no enzimáticos**

*Proteínas*: Se determinó bajo la metodología descrita por Bradford (1976), se agregó en una celdilla de microplaca 5  $\mu\text{L}$  de EE y 250  $\mu\text{l}$  de reactivo Bradford (para preparar este reactivo se disolvieron 100 mg de Azul Brillante de Coomassie G250 ( $\text{C}_{47}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$ ) en 50 mL de etanol (98 %), posteriormente se agregaron 100 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %), enseguida se aforó a 1 L con agua destilada, se filtró dos veces con papel filtro N° 11 y se guardó en un frasco ambar

a 4° C hasta su uso) se mezcló ligeramente, se incubo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se determinó la absorbancia en el Lector de Microplacas (Modelo ELx808™) a 630 nm. Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con Albúmina Sérica Bovina (ABS), con estándares de 10 a 1000 ppm de ABS.

Los datos se expresaron en mg g<sup>-1</sup> con la siguiente formula:

$$Cx = \frac{Cs * FD * V}{M}$$

Dónde:

Cx = Concentración en mg g<sup>-1</sup>; Cs = Concentración obtenida en la ecuación de la recta (ppm); FD = Factor de dilución; V = Volumen utilizado en la dilución de la muestra; M = Masa total utilizada en la extracción.

*Glutación Reducido (GSH):* Fue cuantificado según la metodología espectrofotométrica establecida por Xue et al. (2001), mediante la reacción con DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)). En un tubo de ensayo se colocaron 0.48 mL de EE, se mezcló con 2.2 mL de fosfato dibásico de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a 0.32 M y 0.32 mL del colorante DTNB al 1 mM. Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm con una celdilla de cuarzo, y estas fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con GSH, esta curva se realizó con estándares a una concentración de 0.02 a 1 mM. Los valores obtenidos se reportan en mM de GSH/ mL /min

*Contenido de clorofilas:* Se tomó tejido de hoja en fresco, estimando el contenido por el método propuesto por Arnen (1949) modificado por Munira *et al.*, 2015:

Se pesó un gramo de hoja fresco, se homogeneizo en mortero y se agregaron 5 mL de acetona al 90%, para estabilizar y proteger las clorofilas, se agregó una pizca de carbonato de magnesio, de la mezcla homogeneizada se tomaron 2 mL y se puso en un tubo de 2 mL , los tubos se centrifugaron a 10000 rpm a 4°C durante 5 minutos, se extrae el sobrenadante y se realizan lecturas en el

espectrofotómetro a 663 nanómetros para clorofila a, y 645 para clorofila b, introduciendo primeramente un blanco para calibrar el espectrofotómetro con solamente acetona al 90%.

El contenido total de clorofila se expresará en mg/g y será determinado usando las siguientes formulas:

$$\text{Clorofila } a = 25.38 * A663 + 3.64 * A645$$

$$\text{Clorofila } b = 30.38 * A645 - 6.58 * A663$$

$$\text{Clorofila total} = 18.8 * A663 + 34.02 * A645$$

*Compuestos Fenólicos Totales:* Se realizó según la metodología propuesta por Yu y Dahlgren (2000). Para iniciar con la extracción se colocaron 200 mg de tejido liofilizado en un tubo de 2 mL, se le agregó 1 mL de solución agua: acetona (1:1), se agito en vórtex por 30 segundos y se sónico por 5 minutos. A continuación se centrifugó a 12500 rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante (extracto) el cual se almacenó a 4 °C hasta su uso. La cuantificación se realizó según Nsor-Atindana *et al.*, (2012), para lo cual se tomaron 50 µL del extracto y se colocaron en un tubo de ensayo, se adicionaron 200 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (FCR), 500 µL de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20% y 5 mL de agua destilada, se agitó en vórtex durante 30 segundos y enseguida se colocaron las muestras en baño maría a 45°C por 30 minutos. Se determinó absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 750 nm con una celdilla de plástico, como blanco se usó una mezcla con todos los reactivo arriba mencionados, cambiando los 50 µL del extracto por 50 µL de una solución agua:acetona (1:1). Las absorbancia fueron interpoladas en la ecuación obtenida de la curva de calibración con ácido gálico (1-12.5 ppm), los resultados fueron expresados en miligramos Equivalentes de Ácido Gálico por 100 gramos de peso seco (mg EAG 100 g<sup>-1</sup> PS).

*Flavonoides totales:* Se realizó por el método Dowd, adaptado por Arvouet-Grand *et al.*, (1994). En un tubo de ensayo se colocaron 0.1 g de tejido liofilizado, enseguida se le agregó 10 mL de metanol, se homogenizó y filtró la mezcla con papel filtro Whatman N°1. Se colocaron 2 mL del filtrado en un tubo de ensayo limpio, se agregó una solución de tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) al 2% en metanol y se dejó reposar durante 20 minutos en obscuridad. Posteriormente con una celdilla de cuarzo se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. El contenido total de flavonoides fue determinado usando una curva de calibración con quercetina (0 - 50 ppm) en metanol, los resultados fueron expresados en miligramos Equivalentes de Quercetina por 100 gramos de peso seco (mg EQ 100 g<sup>-1</sup> PS).

*Vitamina C:* El contenido de vitamina C se determinará por el método de titulación con 2,6 diclorofenolindofenol (Padayatt *et al.*, 2001). Se pesaron 10 g de peso fresco de fruto, se macera en mortero con 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 2% (v/v) y se homogeneiza macerando hasta que la cascara quede totalmente transparente, después se filtra la mezcla homogénea a través de una gasa absorbente estéril sobre un matraz de aforación.

Aforar a 100 mL con agua destilada, tomar una alícuota de 10 mL del filtrado y titular con 2-6 diclorofenolindofenol hasta obtener una coloración rosácea persistente.

Cuantificación:

$$\text{Vit. C} = (\text{mL utilizado de 2 - 6 diclorofenolindofenol} * 0.088 \\ * \text{volumen total} * 100) (\text{volumen alícuota} * \text{peso de muestra})$$

*Acidez titulable:* Se tomó parte de un fruto fresco y se maceró de manera homogénea. Se tomaron 10 mL del macerado en un matraz y se añadió 3 gotas de fenolftaleína. Posteriormente se tituló con NaOH (0.1N) hasta obtener una coloración rosácea.

Para la cuantificación de la acidez titulable se aplicará la siguiente formula:

$$\% \text{ acidez} = (V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * \text{meq ácido cítrico} * 100) / V_{\text{muestra}}$$

Donde:

$V_{\text{NaOH}}$  = volumen gastado de NaOH para titular.

$N_{\text{NaOH}}$  = normalidad del NaOH.

meq ácido cítrico = 0.064

$V_{\text{muestra}}$  = 10 mL

La acidez titulable se expresara como % de ácido cítrico

*Lycopeno y  $\beta$ -carotenos*: se determinaron de acuerdo con Nagata y Yamashita (1992), para ello se utilizaron 0.1 g de tomate liofilizado los cuales se mezclaron con 20 mL de una solución de hexano:acetona (3:2). Del sobrenadante se tomó una alícuota y se midió a 453, 505, 645 y 663 nm (espectrofotómetro modelo 6715 UV/Visible, Jenway, Techne Inc. EUA). El contenido de licopeno y  $\beta$ -caroteno se estimó utilizando las ecuaciones:

*Lycopeno (mL/100g)*

$$= -0.0458 x A_{663} + 0.204 x A_{645} + 0.372 x A_{505} - 0.0806 x A_{453}$$

*$\beta$  - caroteno (mL/100g)* =  $0.216 x A_{663} - 1.22 x A_{645} - 0.304 x A_{505} + 0.452 x A_{453}$ .

Los resultados se expresan en mg/100g de peso fresco (PF).

### **CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

*DPPH*: Se determinó capacidad antioxidante por DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico). Para hacer la determinación por DPPH se utilizó la metodología propuesta por Brand-Williams *et al.*, (1995) Guil-Guerrero y Reboloso-Fuentes (2009), se colocaron

en un pocillo de microplaca 6  $\mu\text{L}$  de EE y 234  $\mu\text{L}$  de DPPH ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ ) a 0.1 mM, se agito cuidadosamente y en obscuridad se incubó por 30 minutos, enseguida se determinó la absorbancia del lector de Microplacas (Modelo ELx808™) a 540 nm. Se colocaron 240  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos sobre el pocillo para usarlo como blanco.

*ABTS*: se realizó por el método espectrofotométrico de Re *et al.*, (1999) y Kuskoski *et al.*, (2004), estos métodos se basan en la decoloración del catión radical ABTS, el cual se obtuvo mezclando en partes iguales ABTS a 7 mM y persulfato potásico ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) a 2.45 mM, la mezcla se dejó reposar en obscuridad, a temperatura ambiente (25 °C) durante 16 horas antes de ser utilizada. En un tubo de 2 mL se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de EE, 980  $\mu\text{L}$  del radical ABTS (con absorbancia de  $0.7 \pm 0.01$  a 754 nm, se realizaron diluciones con etanol al 20% para ajustar la absorbancia), se agitó en Vortex durante 5 segundos y se dejó reposar durante 7 min en oscuridad. Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 754 nm con una celdilla de cuarzo, como blanco se usó buffer de fosfatos pH 7. Las absorbancias fueron interpoladas en las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración realizada con TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) ( $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ) y ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) con estándares a una concentración de 0.1 a 5 mM y 0.01 a 0.5 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente, ambas reactivos se diluyeron en buffer de fosfatos pH 7.

Las determinaciones fueron las mismas en ambas etapas, a excepción de que en la segunda etapa adicionalmente se determinó la incidencia y severidad de *Clavibacter michiganensis* en el tomate utilizando la Escala de Diener (2005) para medir severidad: 5 Planta muerta; 4 Las hojas viejas muertas, las jóvenes crecimiento detenido; 3 Las hojas viejas cloróticas, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 3 Hojas viejas tienen clorosis vascular, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 1 Los peciolos de las hojas con crecimiento detenido; 0 No hay síntomas visibles.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La primera etapa fue establecida en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3X3, donde el primer factor fueron tres niveles de silicio (0, 184 y 460 mg L<sup>-1</sup>) y el segundo factor fueron tres niveles de NPs de Cu (0, 50 y 250 mg L<sup>-1</sup>) se tuvo un total de 9 tratamientos y 18 repeticiones.

Para la segunda etapa los tratamientos fueron dispuestos bajo un arreglo de bloques completos al azar y la aplicación de 6 tratamientos y 15 repeticiones por tratamiento, para ambas etapas se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de LSD Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### PRIMERA ETAPA

Los resultados mostraron que la aplicación de silicio no modificó las variables agronómicas evaluadas, mientras que las NPs de Cu solamente presentaron efecto significativo en el peso de frutos por planta (Tabla 1). Se observó una tendencia negativa en el peso de frutos por planta con la aplicación de NPs de Cu, donde la dosis más alta ( $250 \text{ mg L}^{-1}$  NPs de Cu) generó una disminución de 10% en comparación con el testigo.

Las interacciones entre la aplicación de Si y NPs de Cu presentaron diferencias estadísticas en todas las variables evaluadas (Tabla 1). Los resultados mostraron que la altura de la planta se afectó negativamente por los tratamientos de  $250 \text{ mg L}^{-1}$  de NPs Cu seguido de  $184 \text{ mg L}^{-1}$  de silicio, disminuyendo hasta en un 5% en comparación al testigo absoluto.

El número de racimos fue mayor en el tratamiento de  $184 \text{ mg L}^{-1}$  Si +  $50 \text{ mg L}^{-1}$  NPs Cu, aunque no fue diferente al Testigo absoluto. Solamente superó al tratamiento de  $460 \text{ mg L}^{-1}$  Si +  $50 \text{ mg L}^{-1}$  NPs Cu (Tabla 1).

El diámetro de tallo se incrementó en comparación al testigo absoluto en todas las combinaciones de Si + NPs Cu (6-9% aproximadamente), así como en las dosis altas de ambos tratamientos ( $250 \text{ mg L}^{-1}$  NPs Cu, y  $460 \text{ mg L}^{-1}$  Si respectivamente) (Tabla 1).

La biomasa fresca de la planta fue mayor en el testigo absoluto, y disminuyó un 23% con el tratamiento de  $184 \text{ mg L}^{-1}$  Si +  $50 \text{ mg L}^{-1}$  NPs Cu que presentó el valor más bajo. Adicionalmente los tratamientos  $250 \text{ mg L}^{-1}$  NPs Cu,  $184 \text{ mg L}^{-1}$  Si, y la combinación de  $460 \text{ mg L}^{-1}$  Si +  $250 \text{ mg L}^{-1}$  NPs Cu, también disminuyeron la biomasa fresca de la planta en 20%, 17% y 18% respectivamente (Tabla 1).

En el peso de frutos por planta el mejor tratamiento fue  $184 \text{ mg L}^{-1}$  Si +  $50 \text{ mg L}^{-1}$  NPs Cu, sin embargo no fue diferente estadísticamente del testigo absoluto. Mientras que solamente se observó una disminución de 19% en el tratamiento de  $460 \text{ Si mg L}^{-1}$  +  $250 \text{ mg L}^{-1}$  NPs Cu en comparación con el testigo absoluto.

La aplicación de cobre en alta concentración afecta el crecimiento de los cultivos, dicho elemento genera ROS directamente en los tejidos a través de la reacción de Fenton, inhibiendo principalmente el crecimiento de la raíces (Hong *et al.*, 2015), se limita el alcance de nutrientes y por ende el crecimiento de las plantas. La aplicación de NPs de Cu, no indujo cambios significativos sobre la altura, excepto el tratamiento con 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu, que reduce la altura en las plantas, por lo que se cree que las NPs de Cu ejercen un ligero estrés. Las NPs de Cu pueden actuar como señalizadores de generación de ROS sin llegar al estrés oxidativo, puesto que no se afectan la cantidad de racimos ni el peso de los frutos e incluso el crecimiento de las plantas a menor concentración. Por otra parte el silicio es un elemento que ayuda a la biodisponibilidad de nutrientes (Gengmao *et al.*, 2015), por lo que puede compensar los limitantes, observando que la combinación de NPs de Cu más silicio potencializa los efectos benéficos.

Juárez-Maldonado *et al.*, (2016), aplicaron NPs de Cu en sustrato y observaron un aumento en la altura de plantas de tomate, comprobando que en concentraciones pequeñas y a escala nanométrica, se estimula el crecimiento de los cultivos.

**Tabla 1.** Variables Agronómicas

Factores	Tratamientos	Altura (cm)	Racimos	D. Tallo (mm)	Peso de frutos por planta (g)	PF Planta (g)
Si	0	127.02a	5.02ab	11.68a	1886.17a	1261.96a
	184	127.87a	5.06a	12.03a	1825.63a	1176.19a
	460	127.19a	4.81b	12.08a	1729.54a	1264.06a
NPs Cu	0	127.96a	4.94a	11.70a	1887.09a	1289.95a
	50	127.63a	4.96a	12.02a	1856.70ab	1226.39a
	250	126.48a	4.98a	12.07a	1697.55b	1185.82a
Si* NPs Cu	0-0	130.67a	5.00ab	11.22b	1936.66ab	1387.71a
	0-50	125.94a	5.00ab	11.88a	1826.33abc	1292.79a
		bc		b		bc
	0-250	124.44c	5.06ab	11.95a	1895.52ab	1105.21c
	184-0	125.33b	4.94ab	11.87a	1890.64ab	1152.95b
		c		b		cd
	184-50	129.61a	5.17a	12.01a	1954.52a	1062.32d
	184-250	128.67a	5.06ab	12.22a	1631.73bc	1313.31a
bc		bc				
460-0	127.89a	4.89ab	12.02a	1833.98abc	1329.19a	
460-50	127.33a	4.72b	12.16a	1789.24abc	1324.07a	
	bc				b	
460-250	126.33a	4.83ab	12.06a	1564.40c	1138.93b	
		bc				cd

Medias por columna con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). D. Tallo: Diámetro del tallo. PF Planta: Peso fresco de planta.

La aplicación de silicio modificó la actividad enzimática de GPX y APX en las hojas de las plantas de tomate (Tabla 2). Con la dosis de 460 mg L<sup>-1</sup> de silicio se

incrementó la actividad enzimática de GPX en 3.3 veces, mientras que la APX incrementó 2.1 veces en comparación al testigo.

Dorneles *et al.*, (2017) reconocen al silicio como un importante precursor de compuestos fenólicos, entre los que destaca la lignina, dicho aumento puede influir en el incremento de la actividad de GPX y APX en hojas, puesto que estas y otras enzimas peroxidasas usan este compuesto como sustrato para su actividad (Al-aghaby *et al.*, 2005) y se concentra en hojas principalmente. Los resultados de esta investigación son consistentes con los reportes que mencionan que la aplicación foliar de silicio incrementa la actividad de enzimas antioxidantes peroxidasas en arroz (Li *et al.*, 2017) y en el cultivo de Cebada (Liang *et al.*, 2003).

La aplicación de NPs de Cu modificó la actividad de las enzimas CAT y GPX (Tabla 2). A una concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu incrementó la actividad de CAT en un 70%, y la actividad de GPX en 100% en comparación al testigo.

Hernández- Hernández *et al.*, (2018) atribuyen el incremento de actividad en estas enzimas a la activación de mecanismos de defensa mediante la señalización de estrés por NPs de Cu.

En cuanto a las interacciones de Si y NPs de Cu, se presentaron diferencias entre tratamientos en la actividad de CAT, GPX, APX y PAL (Tabla 2). En CAT se observó que los tratamientos que incluyeron 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu generaron la mayor actividad de esta enzima, sin embargo, no fueron estadísticamente diferentes al testigo absoluto. Zhu *et al.*, (2004) al aplicar silicio observaron un aumento en la actividad de APX y GPX coincidiendo con los resultados de este trabajo, el silicio y las NPs de Cu, se ven implicados en respuestas fisiológicas y metabólicas de la planta principalmente de defensa, aumentando la concentración de las enzimas mencionadas por ser las principales enzimas encargadas de eliminar radicales o moléculas extrañas o dañinas a su estructura celular.

En la actividad de GPX el tratamiento de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si + 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu generó el mejor resultado, superando al testigo absoluto hasta 8.5 veces (Tabla 2). Además, el tratamiento de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si también generó un efecto positivo en la actividad de GPX, ya que superó al testigo absoluto por 2.6 veces. Se sabe que la aplicación de silicio aumenta la disponibilidad de silicio endógeno, y estimula la actividad de enzimas peroxidasas (Jiao-Jing *et al.*, 2009) como se demostró en este trabajo donde se observó un aumento en la actividad de GPX.

La actividad de APX se afectó positivamente también por el tratamiento de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si + 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu, superando al testigo absoluto por 5.8 veces (Tabla 2). También el tratamiento de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si + 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu incrementó la actividad de APX en 4.8 veces en comparación al testigo absoluto.

En cuanto a la PAL, solamente el tratamiento de 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu incrementó en 1.78 veces la actividad de esta enzima en comparación al testigo absoluto, el resto de los tratamientos no presentaron cambios (Tabla 2).

La combinación de dosis altas de silicio con NPs de Cu a baja concentración (460+50 mg L<sup>-1</sup> de silicio y NPs de Cu respectivamente), aumentan la actividad de la enzima PAL, esto como posible respuesta a la presencia de NPs de Cu extrañas y estimulantes del sistema de defensa como lo reportado por Choudhary *et al.*, (2017) en maíz, bajo estrés biótico.

Los resultados demuestran que la aplicación de 250 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu incrementan la actividad de CAT, independientemente de si se combinan o no con silicio. Además, la actividad de GPX y APX se ve afectada positivamente por la aplicación de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si + 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu. Mientras que la actividad de PAL solamente se incrementa con la aplicación de 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu.

Al-Aghabary *et al.*, (2005) aplicaron silicio vía foliar en el cultivo de tomate y aumentó la actividad de SOD, CAT y APX. Lo que indica que el silicio también funciona como bioestimulante de la actividad enzimática.

La actividad de las principales enzimas antioxidantes y PAL incrementa al aplicar 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu, principalmente esa fue la tendencia en todas las enzimas en hojas, lo que confirma que el uso de NPs de Cu a esa concentración estimula el sistema de defensa por la generación de ROS, que se eliminan con aplicación conjunta de silicio, haciendo uso de la concentración adecuada no cesa la actividad de ninguna enzima puesto que no se llega al estrés oxidativo.

**Tabla 2.** Actividad enzimática en las hojas de las plantas de tomate.

Factores	Tratamientos	CAT	SOD	GPX	APX	PAL
Si	0	153.85a	4.80a	0.54b	49.41b	1.53a
	184	118.45a	5.66a	0.71b	104.86ab	0.96a
	460	190.19a	5.34a	2.33a	154.57a	1.14a
NPs Cu	0	134.94b	5.44a	0.95b	76.99a	0.93a
	50	231.87a	5.15a	1.94a	113.91a	1.73a
	250	95.68b	5.21a	0.69b	117.93a	0.98a
Si* NPs Cu	0-0	165.93ab	4.96a	0.48c	26.76c	0.96b
	0-50	217.20a	4.61a	0.54c	44.82c	2.67a
	0-250	78.41b	4.83a	0.60c	76.66bc	0.97b
	184-0	81.85b	5.81a	0.64c	80.45abc	0.90b
	184-50	214.67a	5.61a	0.69c	121.23abc	0.98b
	184-250	58.83b	5.56a	0.80c	121.23abc	1.00b
	460-0	157.04ab	5.54a	1.73b	123.77abc	0.93b
	460-50	263.75a	5.23a	4.59a	184.03a	1.55ab
	460-250	149.79ab	5.25a	0.67c	155.90ab	0.95b

Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a LSD Fisher ( $p \leq 0.05$ ). CAT: Catalasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). SOD: Superoxido Dismutasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). PAL: Fenilalanina Amonio Liasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). GPX: Glutación Peroxidasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). APX: Ascorbato Peroxidasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>).

En la actividad enzimática evaluada en los frutos se observaron cambios en CAT, GPX y PAL por la aplicación de silicio (Tabla 3). La aplicación de silicio disminuyó la actividad de CAT hasta en 56% en comparación al Testigo. Por el contrario, en GPX y PAL la aplicación de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si incrementó la actividad enzimática en 331% y 27% respectivamente para cada enzima. Parte de estos resultados coinciden con lo expuesto en la investigación de Trujillo-Reyes *et al.*, (2014) donde en hojas de lechuga aumenta la actividad de CAT al aplicar NPs de Cu.

Con la aplicación de NPs de Cu se modificó la actividad enzimática de CAT, GPX, APX y PAL en los frutos de tomate (Tabla 3). La actividad de CAT se incrementó con la dosis de 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu en un 145%. Por su parte la dosis de 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu incrementó la actividad de GPX y PAL en 100% y 17% respectivamente. Mientras que la actividad de APX disminuyó en 28% en comparación al Testigo con la dosis de 250 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu. De acuerdo a otra investigación, la CAT se vio aumentada en todos los tratamientos con estrés salino en frutos de tomate (Murshed *et al.*, 2014), confirmando nuevamente el aumento de actividad de CAT al estimular a las plantas con elicitores abióticos.

La actividad de la enzima PAL generalmente aumenta para sintetizar compuestos fenólicos a fin de generar materia seca o resistencia estructural (Hajiboland *et al.*, 2017), en este caso no se observó cambios en el crecimiento, pero si en otros antioxidantes, por lo que el estrés generado por las NPs de Cu, si es posible compensarlo aplicando silicio y la generación de biocompuestos se potencializa.

En base a las interacciones se observó que todas las enzimas presentaron diferencias estadísticas, los tratamientos que incluyeron 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu presentaron mayor actividad enzimática de CAT superando al Testigo en todos los casos (Tabla 3). El tratamiento de 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu superó al Testigo absoluto por encima del doble.

Juárez-Maldonado *et al.*, (2016), observaron un comportamiento similar a estos resultados, aplicando NPs de Cu al sustrato donde aumento la actividad de la enzima CAT.

En la actividad de GPX dos tratamientos presentaron mayor actividad con respecto al testigo absoluto, el tratamiento de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si + 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu fue 8.5 veces mayor mientras que 460 mg L<sup>-1</sup> de Si indujeron un incremento de 2.2 veces.

La actividad de PAL también se incrementó significativamente con la aplicación de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si + 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu, superando al Testigo absoluto por 52%. También se observó que las dosis bajas de Si y NPs de Cu aplicadas por separado o en conjunto incrementaron la actividad de PAL en un rango de 33-40%. Mientras que el tratamiento de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si también incrementó la actividad de PAL en 33%.

En la actividad de SOD el tratamiento de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si + 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu generó la mayor actividad enzimática, sin embargo no fue estadísticamente diferente al testigo absoluto. En APX tampoco se observaron diferencias respecto al Testigo absoluto, sin embargo el tratamiento de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si indujo la mayor actividad de esta enzima.

Los resultados indican que la aplicación de NPs de Cu en la dosis más alta incrementa la actividad de CAT en los frutos de tomate. Un aumento en CAT fue observado en plantas de lechuga con aplicación de NPs de Cu, y caso contrario observaron al aplicar Cu a granel en el mismo cultivo, dicho efecto se atribuye a la generación de ROS que induce el Cu a escala manométrica, y que se absorbe más eficientemente por la planta (Hong *et al.*, 2015)

Mientras que la aplicación de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si + 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu incrementa la actividad tanto de GPX como de PAL. Se observa que a mayor cantidad de silicio, la actividad de estas enzimas incrementa, Hajiboland *et al.*, (2017) atribuyen el aumento en PAL a la necesidad de eliminar ROS, que en este caso pueden ser generadas por las NPs de Cu, para sintetizar compuestos

fenólicos particularmente lignina a fin de ejercer defensa sistémica y que la GPX tenga sustrato para actuar.

la concentración del antioxidante GSH aumenta respecto al testigo (Tabla 5), lo cual puede influenciar en la respuesta en la actividad de la enzima APX que elimina  $H_2O_2$  y para ello ocupa GSH como sustrato para poder actuar (Sofo *et al.*, 2015) por lo que la actividad de la enzima es significativamente mayor (Tabla 3).

**Tabla 3.** Actividad enzimática en los frutos de las plantas de tomate.

Factores	Tratamientos	CAT	SOD	GPX	APX	PAL
Si	0	447.77a	3.34a	0.54b	175.67a	0.84b
	184	196.01b	3.04a	0.71b	190.91a	0.99ab
	460	291.89b	3.66a	2.33a	166.37a	1.07a
NPs Cu	0	220.19b	3.26a	0.95b	236.27a	0.94b
	50	175.03b	3.15a	1.95a	226.54b	1.10a
	250	540.45a	3.63a	0.69b	170.13ab	0.85b
Si* NPs Cu	0-0	234.82cd	3.98ab	0.48c	192.32ab	0.77cd
	0-50	319.38bc	2.41b	0.54c	126.16b	1.06ab
	0-250	789.11a	3.63ab	0.60c	208.52ab	0.70d
	184-0	99.55de	2.58b	0.64c	350.56a	1.03ab
	184-50	64.88e	8.87ab	0.69c	104.82b	1.08ab
	184-250	223.60b	2.66b	0.80c	117.34b	0.87bcd
	460-0	326.20bc	3.23ab	1.73b	165.94b	1.03ab
	460-50	140.83de	3.17ab	4.59a	148.64b	1.17a
460-250	408.65b	4.59a	0.67c	184.54b	0.99abc	

Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a LSD Fisher ( $p \leq 0.05$ ). CAT: Catalasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). SOD: Superoxido Dismutasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). PAL: Fenilalanina Amonio Liasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). GPX: Glutación Peroxidasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). APX: Ascorbato Peroxidasa expresada en Unidades proteínas totales<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>).

La aplicación de silicio modificó significativamente el contenido de clorofilas, sin embargo, no presentó ningún efecto en GSH, fenoles y flavonoides de las hojas de tomate (Tabla 4). Las dos dosis de silicio empleadas incrementaron las clorofilas A, B y totales hasta en 53%, 75% y 64% respectivamente. Algunos

autores atribuyen cambios en la concentración de clorofilas al silicio por participar en la dinámica de los estomas y a pigmentos accesorios como los carotenoides en dinámicas fotoquímicas, que influyen en la fotosíntesis de las plantas (Hegazi y El-Shraiy., 2017). La necesidad de disipar y transformar energía genera un aumento en su concentración.

El contenido de clorofilas A, B y totales, aumenta conforme la concentración de Si y NPs de Cu crece, esto puede ser una respuesta a estrés principalmente por incremento de NPs de Cu, pues las clorofilas actúan como señalizadores a la presencia de ROS (Rico *et al.*, 2015).

Por su parte, la aplicación de NPs de Cu solamente incrementó el contenido de fenoles totales en las hojas de tomate, mientras que en el contenido de clorofilas, GSH y flavonoides no presentó ningún efecto (Tabla 4). El contenido de fenoles totales se incrementó únicamente con la dosis de 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu en un 17% en comparación al testigo.

En su investigación Sharma y Uttam (2017) aplicaron NPs de CuO y no observaron cambios positivos en el contenido de clorofilas, argumentando que es porque existe una cantidad excesiva de ROS que desencadena en toxicidad y muerte de las plantas, mientras que en esta investigación se confirma que las concentraciones aplicadas de NPs de Cu no inducen estrés oxidativo y solo se estimula el sistema antioxidante, y las ROS generadas, son barridas tal vez por acción del silicio.

Las interacciones demostraron que la aplicación conjunta de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si+250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu incrementan el contenido de clorofilas A, B y totales en 69%, 121% y 94% respectivamente. Sin embargo, también la aplicación de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si sola o en combinación con NPs de Cu incrementó el contenido de clorofilas a, b y total hasta en 68%, 111% y 150% respectivamente (Tabla 4). Además la combinación de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si+250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu generó el mayor contenido de fenoles totales, superando al Testigo absoluto por 24%.

También la aplicación de 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu fue superior al Testigo absoluto por un 17%. En el contenido de GSH y flavonoides también se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos, sin embargo, no hubo diferencias en comparación al Testigo absoluto.

**Tabla 4.** Contenido de Antioxidantes no enzimáticos en hojas de tomate.

Factores	Tratamientos	PROT	CHL A	CHL B	CHL TOTAL	GSH	FENOLES-H	FLAVONOIDES-H
Si	0	44.00a	1.89b	1.75b	3.63b	5.28a	1859.07a	2827.33a
	184	42.67ab	2.89a	3.07a	5.95a	5.09a	1900.33a	2944.60a
	460	40.53b	2.69a	2.75a	5.44a	4.81a	1814.93a	2923.47a
NPs Cu	0	42.47a	2.43a	2.35a	4.77a	4.92a	1735.07b	2834.87a
	50	41.40a	2.43a	2.55a	5.01a	5.21a	1804.93b	2941.53a
	250	43.33a	2.60a	2.66a	5.24a	5.04a	2034.33a	2919.00a
Si* NPs Cu	0-0	43.20ab	1.74c	1.50c	3.22c	4.72ab	1701.00c	2930.20abcd
	0-50	43.00ab	1.92c	2.06bc	3.98bc	5.13ab	1843.40abc	2668.60cd
	0-250	45.80a	2.00bc	1.70c	3.68c	5.98a	2032.80ab	2883.20abcd
	184-0	42.80ab	2.92a	3.16ab	8.06a	5.39ab	1705.80c	2948.80abc
	184-50	44.80ab	2.90ab	3.08ab	6.02ab	4.85ab	1878.80abc	3136.00a
	184-250	40.40bc	2.86ab	2.96ab	5.78ab	5.03ab	2116.40a	2749.00bcd
	460-0	41.40c	2.64abc	2.40abc	5.04abc	4.66ab	1798.40bc	2625.60d
	460-50	36.40c	2.48abc	2.52abc	5.02abc	5.65a	1692.60c	3020.00ab
460-250	43.80ab	2.94a	3.32a	6.26a	4.11b	1953.80abc	3124.80a	

Medias por columna con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). PROT: Proteínas en mg/g., CHLA: Clorofila A (mg/g)., CHLB: Clorofila B (mg/g)., CHL TOTAL: Clorofila total (mg/g)., GSH: Glutación reducido en mM de GSH/ mL /min., FENOLES-H: Fenoles en hoja en mg EQ de Ácido gálico \*100g de PS., FLAVONOIDES-H: Flavonoides en hoja en mg EQ de quercetina /100g de PS.

El contenido de algunos compuestos antioxidantes del fruto fue modificado por la aplicación de silicio ya sea de forma positiva o negativa (Tabla 5). El contenido de GSH se incrementó con ambas dosis de silicio, superando al testigo hasta en 26%, mientras que el contenido de flavonoides se incrementó un 19% con la dosis de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si. En el caso de vitamina C, el contenido fue disminuido con ambas dosis de silicio hasta en un 25%, mientras que el contenido de  $\beta$ -caroteno se disminuyó un 37% en comparación al testigo con la dosis de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si.

La aplicación de NPs de Cu incrementó el contenido de proteínas así como el contenido de fenoles en 9% y 17% respectivamente (Tabla 5). Por el contrario, la aplicación de NPs de Cu disminuyó el contenido de GSH y  $\beta$ -caroteno en el fruto con las dos dosis empleadas, siendo menor al Testigo hasta en 24% y 29% respectivamente. El contenido de vitamina C, flavonoides y licopeno no se vio afectado con la aplicación de NPs de Cu.

La combinación de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si+250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu incrementó el contenido de proteínas en el fruto significativamente, superando al testigo absoluto por un 15% (Tabla 5). El contenido de GSH se incrementó mayormente con la aplicación de 460 y 184 mg L<sup>-1</sup> de Si en 43% y 37% respectivamente en comparación al testigo absoluto, mientras que ninguna combinación de silicio y NPs de Cu fue diferente a este. En el contenido de vitamina C ningún tratamiento superó al testigo absoluto, observándose que todos los tratamientos que incluyeron silicio solo o en combinación con NPs de Cu disminuyeron el contenido de este compuesto. El contenido de fenoles también se incrementó con la combinación de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si+250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu superando al testigo absoluto por 24%. También la aplicación de solo 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu incrementó el contenido de fenoles en 19%. El contenido de flavonoides se incrementó significativamente con todos los tratamientos que incluyeron 184 mg L<sup>-1</sup> de Si, sin embargo, la combinación de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si+50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu generó el mejor resultado siendo 151% mayor al testigo absoluto. En el contenido de licopeno solamente el tratamiento con 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu presentó un incremento significativo de 100% en comparación al testigo absoluto. En el contenido de  $\beta$ -caroteno también se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos, sin embargo ninguno superó al testigo absoluto.

Zhu *et al.*, (2004) en condiciones de estrés salino en pepino, observaron un aumento en el contenido de proteínas, la aplicación de NPs de Cu genera una situación de estrés que impacta primeramente en el contenido proteico, siendo menor cuando se genera una situación de estrés permanente que conduce a la muerte celular.

El GSH aumentó con la aplicación de silicio, las enzimas APX, GPX y CAT aumentan de igual forma en presencia de este elemento, dicha acción se debe a la relación del GSH como cofactor o agente reductor en el ciclo de esas enzimas, siendo consistente con los resultados de Jiao-Jing *et al.*,(2009) en hojas de pepino al aplicar silicio .

Se encontró mayor cantidad de vitamina C en el tratamiento testigo, lo cual resulta lógico puesto que los elicitores aplicados retardan la senescencia de la planta y aunque visualmente los frutos fueron iguales, los frutos del tratamiento testigo estaban mayormente maduros, dicha característica puede deberse a la participación del silicio en la síntesis de citoquininas, cuando más cantidad este presente de esta hormona más se retrasa la senescencia (Markovich *et al.*, 2017), además del efecto del silicio y las NPs de Cu como precursores de antioxidantes (Savvas y Ntatsi., 2015) que retrasan la senescencia de los frutos, caso contrario al tratamiento testigo donde los frutos maduraron más rápidamente. Se observó un aumento en la cantidad de licopeno, este tipo de biocompuestos podemos ingerirlo solo a través de frutos que lo contengan como el tomate, pues el cuerpo humano no tiene el sistema para producirlo y el consumo de este antioxidante previene y ayuda a combatir enfermedades que se presentan mayormente en edad adulta (Hernández-Hernández *et al.*, 2018), dicho aumento se observa en el tratamiento con 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu, podría ser efecto de un ligero estrés ocasionado por las NPs de Cu, que induce en el sistema de defensa la producción de antioxidantes como este.

**Tabla 5.** Contenido de Antioxidantes no enzimáticos en frutos de tomate.

Factores	Tratamientos	PROT	GSH	VIT C	FENOLES	FLAVONOIDES	LIC	$\beta$ -CAR
Si	0	46.07a	7.53b	28.74a	18.59a	2.26b	0.04a	0.079a
	184	46.27a	9.26a	21.64b	19.00a	2.69a	0.03a	0.06ab
	460	48.00a	9.49a	22.11b	18.14a	2.48ab	0.04a	0.05b
NPs Cu	0	44.73b	9.97a	25.69a	17.35b	2.37a	0.03a	0.07a
	50	46.67ab	8.70b	22.00a	18.04b	2.52a	0.04a	0.05b
	250	48.93a	7.60c	24.81a	20.34a	2.54a	0.04a	0.05b
Si* NPs Cu	0-0	43.80bc	7.88cd	35.37a	17.01c	2.09c	0.03cde	0.08ab
	0-50	46.40abc	7.77cd	23.40bc	18.43abc	2.31bc	0.02e	0.06bcd
	0-250	48.00ab	6.96d	27.45a	20.32ab	2.38bc	0.06a	0.07bc
	184-0	42.60c	10.79a	19.88bc	17.05c	2.60ab	0.02e	0.09a
	184-50	45.80abc	8.08cd	23.40bc	18.78abc	5.81a	0.05abc	0.04d
	184-250	50.40a	8.90bc	21.64bc	21.16a	2.67ab	0.03bcde	0.04cd
	460-0	47.80ab	11.25a	21.82.bc	17.98bc	2.43abc	0.05abc	0.05cd
	460-50	47.80ab	10.25ab	19.18c	16.92c	2.43abc	0.05abc	0.05cd
	460-250	48.40ab	6.96d	2534.40bc	19.53abc	2.57ab	0.03de	0.04d

Medias por columna con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). PROT: Proteínas en mg/g., GSH: Glutatión reducido en Unidades, donde cada unidad es igual a mM de GSH/ mL /min., VIT C: Vitamina C en mg/g de Peso Fresco., FENOLES-H: Fenoles en hoja en mg EQ de Ácido gálico \*g de PS., FLAVONOIDES-H: Flavonoides en hoja en mg EQ de quercetina /g de PS., AC.TIT: Acidez Titulable en % de Ácido cítrico., LIC: Licopeno en mg/100g de Peso Fresco.,  $\beta$ -CAR:  $\beta$ - Caroteno en mL /100g.

La capacidad antioxidante en hojas y frutos de tomate presentó diferencias con la aplicación de silicio (Tabla 6). En las hojas se incrementó la actividad antioxidante ABTS con la dosis de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si, mientras que la actividad antioxidante DPPH se incrementó en mayor medida con la dosis de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si. En los frutos el testigo presentó la mayor capacidad antioxidante tanto ABTS como DPPH, afectándose negativamente con la aplicación de silicio.

Por su parte la aplicación de NPs de Cu no tuvo efecto sobre la capacidad antioxidante DPPH en las hojas de tomate, ni en la capacidad antioxidante ABTS de los frutos de tomate (Tabla 6). La capacidad antioxidante ABTS de las hojas se incrementó conforme aumentó la dosis de NPs de Cu, siendo la dosis de 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu la que generó el mejor

resultado. En el caso del fruto de tomate, la aplicación de 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu generó un efecto negativo en la capacidad antioxidante DPPH.

En la capacidad antioxidante ABTS evaluada en las hojas de tomate se observó que la dosis más alta de silicio (460 mg L<sup>-1</sup>), así como la combinación de 184 mg L<sup>-1</sup> de Si con ambas dosis de NPs de Cu generaron los mejores resultados (Tabla 6). Sin embargo, también la dosis más alta de NPs de Cu (250 mg L<sup>-1</sup>), así como la combinación de 460 mg L<sup>-1</sup> de Si más ambas dosis de NPs de Cu superaron al testigo absoluto. En el caso de la actividad antioxidante DPPH evaluada en los frutos, todas las combinaciones de silicio más NPs de Cu, así como la dosis más alta de silicio, disminuyeron esta variable en comparación al testigo absoluto. En la capacidad antioxidante DPPH de las hojas así como la ABTS en los frutos, no se presentaron diferencias de los tratamientos en comparación al testigo absoluto.

Los frutos de tomate muestran un aumento en la capacidad antioxidante cuando se aplican tratamientos en combinación Si +NPs de Cu, y una disminución con solamente silicio, las NPs de Cu inducen la generación de antioxidantes estimulando al sistema de defensa con un ligero estrés que es compensado por el Silicio, por lo que se observan mejores efectos en la aplicación conjunta.

En hojas de tomate la capacidad antioxidante mostro un aumento respecto al testigo al evaluarse con el radical ABTS más no con DPPH, Badanai *et al.*, (2015), atribuyen esa diferencia a los tiempos de reacción, se conjuntan diferentes grupos de antioxidantes, y cada uno de ellos tiene un tiempo de reacción y una estructura con grupos químicos diferentes que van a reaccionar de acuerdo al tiempo, con un radical u otro.

Zhai *et al.*, (2017) aplicaron nanopartículas de selenio, encontrando que la capacidad antioxidante ABTS, supero la capacidad DPPH coincidiendo con lo encontrado en esta investigación, por lo que se cree que las NPs estimulan la generación de antioxidantes que reaccionan directamente con el radical ABTS.

**Tabla 6.** Capacidad Antioxidante ABTS y DPPH en frutos y hojas de plantas de tomate.

Factores	Tratamientos	FRUTOS				HOJAS			
		ABTS-AA	ABTS-TROLOX	DPPH-AA	DPPH-TROLOX	ABTS-AA	ABTS-TROLOX	DPPH-AA	DPPH-TROLOX
Si	0	8.35a	40.40a	2.23a	113.85a	6.04b	38.09b	2.18b	113.80b
	184	6.91b	38.96b	1.97b	113.59b	6.44ab	38.49ab	2.39a	114.01a
	460	7.06ab	39.11ab	1.90b	113.52b	6.64a	38.69a	2.22ab	113.84ab
NPs Cu	0	7.35a	39.40a	2.13a	113.75a	5.97b	38.02b	2.30a	113.91a
	50	7.80a	38.85a	1.90b	113.52b	6.45ab	38.50ab	2.18a	113.79a
	250	7.17a	39.22a	2.06ab	113.68ab	6.69a	38.74a	2.32a	113.94a
Si* NPs Cu	0-0	7.37ab	39.42ab	2.47a	114.09a	5.40c	37.45c	2.31ab	113.92ab
	0-50	9.48a	41.53a	1.94bc	113.56bc	6.12abc	38.17abc	2.13b	113.75b
	0-250	8.20ab	40.42ab	2.27ab	113.89ab	6.59ab	38.64ab	2.10b	113.72b
	184-0	7.53ab	39.58ab	2.17ab	113.78ab	5.66bc	37.71bc	2.39ab	114.01ab
	184-50	6.82b	38.87b	1.77c	113.38c	6.79a	38.84a	2.20b	113.82b
	184-250	6.37b	38.42b	1.97bc	113.59bc	6.87a	38.92a	2.59a	114.21a
	460-0	7.14b	39.19b	1.76c	113.38c	6.86a	38.91a	2.19b	113.81b
	460-50	7.09b	39.14b	2.01bc	113.63bc	6.43ab	38.48ab	2.20b	113.82b
460-250	6.94b	38.99b	1.93bc	113.55bc	6.62ab	38.67ab	2.27b	113.89b	

Medias por columna con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). ABTS-AA: ABTS en unidades de Ácido Ascórbico., ABTS-TROLOX: ABTS en unidades Trolox., DPPH-AA: DPPH en Unidades de Ácido Ascórbico., DPPH-TROLOX: DPPH en unidades Trolox.

## Segunda etapa

### Severidad de *Clavibacter michiganensis* (Cmm) y crecimiento del cultivo

La gravedad de *C. michiganensis* disminuyó con todos los tratamientos aplicados en relación con el tratamiento con solo Cmm que presentó una severidad de 68.5% en comparación al tratamiento testigo absoluto (Figura 1). El tratamiento con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu + 460 mg L<sup>-1</sup> de Si fue el mejor, ya que generó la mayor disminución en la severidad de Cmm con un 28% menos. El resto de los tratamientos generaron una disminución de la gravedad alrededor de 16-20% en

comparación con el tratamiento de solo Cmm. El rendimiento fue afectado negativamente por Cmm, generando una disminución significativa en todos los tratamientos en comparación con el control (Figura 2). El tratamiento con solo Cmm generó la mayor disminución en el rendimiento con un 43% menos que el Testigo absoluto. Los tratamientos con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu + 184 mg L<sup>-1</sup> de Si y 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu + 460 mg L<sup>-1</sup> de Si generaron un rendimiento mayor que el tratamiento con solo Cmm, excediéndolo en aproximadamente 28%. Los tratamientos 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu + 184 mg L<sup>-1</sup> de Si y 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu + 460 mg L<sup>-1</sup> de Si, aunque mostraron un ligero aumento en comparación con el tratamiento con solo Cmm, no fueron estadísticamente diferentes.

*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, es una de las bacterias más destructivas del tomate en todo el mundo (Chalupowicz *et al.*, 2017; Nandi *et al.*, 2018). Este patógeno vascular generalmente invade y prolifera en el xilema a través de aberturas naturales o heridas, que causan síntomas de marchitez (Nandi *et al.*, 2018). Además, los patógenos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que a su vez genera estrés oxidativo en las plantas que causa daño a nivel molecular y genético, y en la síntesis de proteínas, y finalmente culmina en la muerte celular programada (Aybeke, 2017). La aplicación de silicio a las plantas de tomate ha inducido beneficios en la incidencia y severidad de patógenos como *Ralstonia* y *Fusarium* (Ghareeb *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). Esto es por diferentes mecanismos que en última instancia impiden la multiplicación del patógeno que a su vez mejora el desarrollo del cultivo. El silicio aplicado como ácido silícico induce barreras bioquímicas, y una vez polimerizado en sílice amorfo, genera barreras es decir una especie de doble cutícula que no permite que fácilmente entren patógenos (Cooke y Leishman, 2011; Dann y Le, 2017). Además, su acumulación en las paredes celulares, los espacios intracelulares y los tricomas de la hoja generan estructuras más firmes y rígidas (Carré-Missio *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015).

En el citoplasma, induce barreras bioquímicas tales como la activación de las vías metabólicas, como el ácido silícico (SA) y el ácido jasmónico (JA) (Bakhat y otros, 2018; Jang *et al.*, 2018; Ning *et al.*, 2014), aumenta la actividad de la

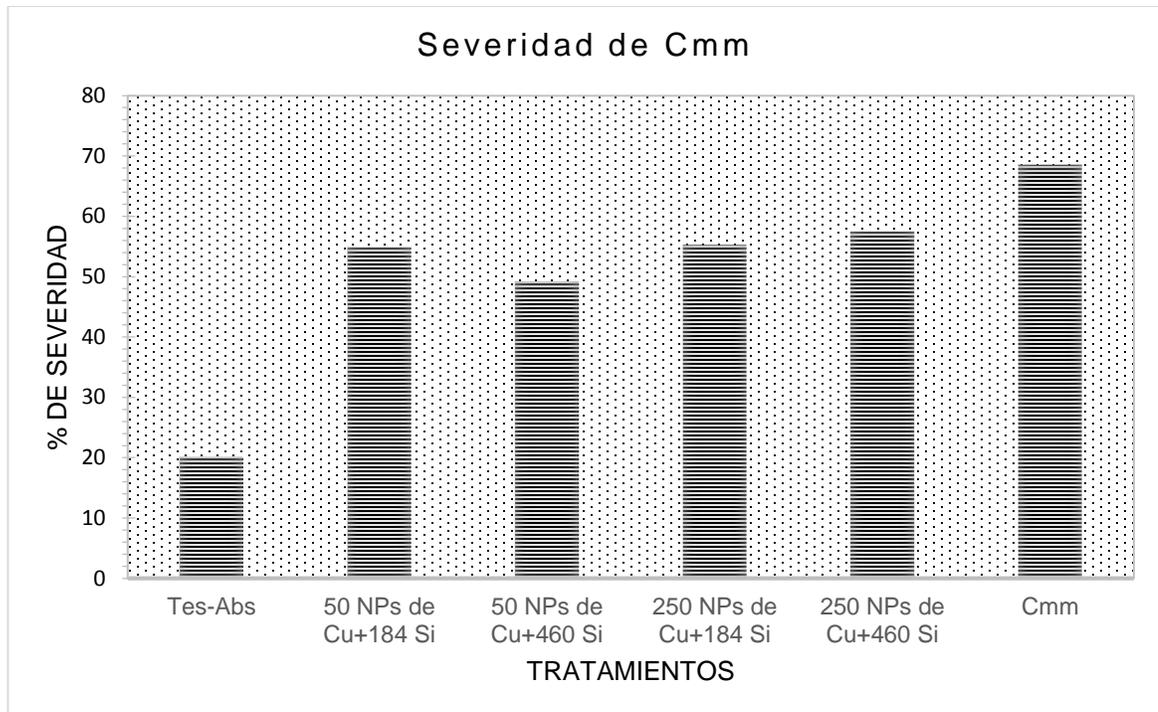
enzimas SOD y CAT (Cao *et al.*, 2017). Expresión de flavonoides y PAL (Rahman *et al.*, 2015). El silicio también participa en la sobreexpresión o represión de genes relacionados con la patogenicidad (Brunings *et al.*, 2009).

Se ha documentado que la aplicación de silicio puede estimular la adquisición de resistencia sistémica (SAR) mediante la regulación de genes implicados en la respuesta de hipersensibilidad y la vía de defensa impulsada por el ácido jasmónico que induce tolerancia a los patógenos (Manivannan y Ahn, 2017).

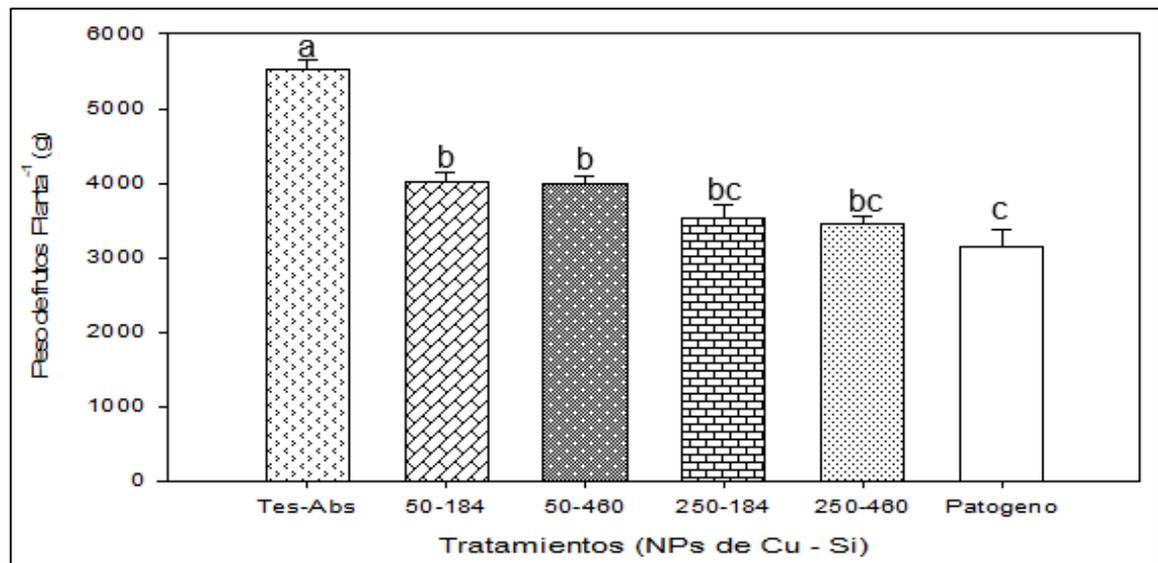
Por otro lado, el uso de NPs de Cu ha demostrado ser eficiente para el control de patógenos en las plantas, y su forma de acción es de varias maneras. Las NPs de Cu pueden activar sistemas de defensa antioxidante de las plantas a partir de la estimulación ROS, generando cambios en la actividad de las enzimas (Choudhary *et al.*, 2017; Zuverza-Mena *et al.*, 2017). Estas ROS pueden prevenir la entrada del patógeno en las plantas, pero también pueden estimular los genes de proteínas asociadas a la patogénesis, así como la estimulación del ácido salicílico, jasmónico y etileno, hormonas que participan como moléculas de señalización en reacciones de defensa, (Tripathi y otros, 2017). O a través de un efecto inhibitorio directo sobre el patógeno, un hecho que ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* (Sathiyabama y Manikandan, 2018).

El silicio se considera un mineral beneficioso ya que promueve el crecimiento, desarrollo, rendimiento y calidad de la fruta en los cultivos (Malhotra *et al.*, 2016). Mientras que las NPs de Cu funcionan como estimulantes del crecimiento en varios cultivos (Hernández-Hernández *et al.*, 2018; Juárez-Maldonado *et al.*, 2016).

Por lo tanto, se espera que la aplicación de silicio junto con las NPs de Cu pueda generar efectos beneficiosos sobre el crecimiento del tomate, y debido a la disminución en la severidad de la enfermedad observada, se genera un impacto favorable en el rendimiento del cultivo.



**Figura 1.** Severidad de daño en Plantas de tomate inoculadas con Cmm.



**Figura 2.** Rendimiento en plantas de tomate inoculadas con Cmm.

### **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN HOJAS**

La actividad enzimática en las hojas de las plantas de tomate se modificó mediante la aplicación de los tratamientos, solo CAT no presentó diferencias entre los tratamientos (Tabla 7). En el Actividad SOD los dos tratamientos con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu +184 mg L<sup>-1</sup> Si o 460 mg L<sup>-1</sup> Si generaron una disminución significativa en comparación con el testigo absoluto. El resto de los tratamientos fueron estadísticamente iguales el uno al otro. En cuanto a la actividad de la enzima GPX, los dos tratamientos con Cu, 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu + 184 mg L<sup>-1</sup> Si o 460 mg L<sup>-1</sup> Si generaron un aumento en comparación con el testigo absoluto, siendo 161% y 191% respectivamente. Esta misma tendencia se observó en la actividad de APX, donde 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 184 mg L<sup>-1</sup> Si generó un aumento de 279% en comparación con el testigo absoluto, mientras que el tratamiento con 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 460 mg L<sup>-1</sup> Si indujo un aumento del 140%. En cuanto a la enzima PAL, el tratamiento con 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+184 mg L<sup>-1</sup> Si generó el mejor resultado, superando el testigo en un 200%.

### **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRUTOS**

En la actividad enzimática evaluada en frutos de tomate, los resultados mostraron que los tratamientos afectaron solo a las enzimas GPX y PAL, mientras que en CAT, SOD y APX no hubo diferencias entre tratamientos (Tabla 8). En la actividad de GPX, el mejor tratamiento fue con 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 184 mg L<sup>-1</sup> Si, seguido de tratamiento 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 460 mg L<sup>-1</sup> Si, generando aumentos de 273% y 127% respectivamente en comparación con el testigo absoluto. Por otro lado, la actividad de PAL se vio favorecida solo por el tratamiento con 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 184 mg L<sup>-1</sup> Si generando un aumento del 153% en comparación con el Testigo. El resto de los tratamientos fueron estadísticamente iguales.

El ataque de patógenos induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando estrés oxidativo en las plantas (Aybeke, 2017) y activando el sistema de defensa antioxidante (Kang *et al.*, 2014). La generación de ROS tiene un doble papel que depende de la duración, el sitio y concentración. Una baja

concentración actúa como una señal y genera una respuesta de estrés en plantas, como la activación del sistema de defensa antioxidante, mientras que una concentración más alta interrumpe la homeostasis celular que produce daño oxidativo a las proteínas, el ADN y lípidos (Shaw *et al.*, 2014).

En *Glycine max* inoculado con *Cercospora sojina* se observó un aumento de compuestos antioxidantes (Telles-Nascimento *et al.*, 2016). Otras respuestas que se han reportado es con la colonización de *Fusarium oxysporum* en las plantas de tomate, donde se observó que secretan proteínas efectoras que son factores de virulencia, lo que desencadena una serie de respuestas en las plantas (Houterman *et al.*, 2007) como el aumento de la actividad enzimática, específicamente en este caso CAT (Dorneles *et al.*, 2017).

Por lo tanto, un aumento en los compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos es esencial para reducir el daño causado por el estrés oxidativo. Por lo tanto, es posible esperar que si se induce una mayor capacidad antioxidante en las plantas, pueden tolerar en mayor medida el ataque de los diferentes patógenos.

Entre las enzimas antioxidantes se encuentran CAT, SOD, APX y GPX, aunque no enzimáticas compuestos antioxidantes incluyen glutatión, vitamina C, fenoles totales, flavonoides, entre otros. SOD actúa como la primera línea de defensa contra ROS (Dos Santos *et al.*, 2017) y CAT es una de las enzimas que protegen las células contra ROS ya que convierte el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  (Capaldi *et al.*, 2015; Imahori *et al.*, 2016), y su actividad depende de la concentración de  $H_2O_2$  (Dos Santos *et al.*, 2017). Por lo tanto, hay una correlación entre los componentes de los sistemas de eliminación de ROS como CAT y SOD (Wang *et al.*, 2005).

APX es una enzima que elimina  $H_2O_2$  usando ascorbato como donador de electrones para reducir el  $H_2O_2$  a agua, y es extremadamente sensible a las concentraciones de ascorbato (Ahmad *et al.*, 2014).

APX juega un papel central en el ciclo de ascorbato-glutatión, es por eso que la inducción de APX es una respuesta al estrés oxidativo causado en las plantas por el estrés biótico o abiótico (Imahori., 2014).

La GPX participa en la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Alharby *et al.*, 2016). La actividad de estas enzimas antioxidantes como SOD es de gran importancia en la defensa contra los patógenos (Hao *et al.*, 2011), ya que regulan la concentración de ROS en el células, evitando así posibles daños (Gill y Tuteja, 2010; Tie *et al.*, 2012).

La enzima PAL modula la L-fenilalanina para la fabricación de ácido transcinámico, que en a su vez forman fenilpropanoides (Hajiboland *et al.*, 2017), que causan la producción de metabolitos fenólicos (flavonoides, cumarinas, ésteres fenólicos y lignina) (Weaver y Herrmann, 1997). Esta enzima está directamente relacionada con la tolerancia a los patógenos, por lo que un aumento en su actividad brindará mayor tolerancia a estos (Wang *et al.*, 2017).

El silicio también puede funcionar como elicitador (Van Bockhaven *et al.*, 2013) y genera cambios en diferentes compuestos metabólicos, ya que este elemento está asociado con los componentes de la pared celular (Babalar *et al.*, 2016). Además, reduce los efectos causados por estrés biótico, y la susceptibilidad a plagas, hongos y bacterias (Meharg y Meharg, 2015). El silicio en las plantas induce barreras físicas, bioquímicas (Pozza *et al.*, 2015) y genómicas (Pavlovic *et al.*, 2013) contra los patógenos.

Se ha reportado además que la formación de depósitos de Si en la raíz y las hojas podría prevenir la incidencia de patógenos (Ma y Yamaji, 2008). Este mineral también puede inducir respuestas defensivas similares a la resistencia sistémica adquirida, aumentando la actividad enzimática antioxidante y constituyentes no enzimáticos (Hasanuzzaman *et al.*, 2018), como compuestos fenólicos, antocianinas, flavonas, lignina (Jafari *et al.*, 2015), fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogenia. Además, puede activar la expresión de genes relacionados con la defensa y se añaden a la transducción de marcadores de estrés como el ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Cai *et al.*, 2009).

Hay una serie de trabajos donde el efecto del silicio contra los patógenos en los cultivos ha sido evaluado. Fortunato *et al.* (2012) y Fortunato *et al.* (2014) mostró que el suministro de Si a las plantas de banano redujo la intensidad del marchitamiento por *Fusarium*. La aplicación de silicato de sodio y silicato de potasio en algodón desarrollado *in-vitro*, disminuyó la actividad de *Fusarium* respecto al testigo absoluto (Yassin *et al.*, 2016). Weerahewa y David (2015) produjeron un tamaño de fruta más grande en tomates infestados por antracnosis cuando se aplica silicato de sodio. Ouzounidou *et al.* (2016) informó mayor actividad antioxidante en el pepino cuando se aplica silicato de potasio. Dallagnol *et al.* (2015) informó que la aplicación de silicio en plantas de melón inoculadas con *Podospaera xanthii* generó una alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que aumentó la actividad de SOD como mecanismo de defensa. Se ha informado que la aplicación de silicio influye en la concentración de compuestos fenólicos (Hajiboland *et al.*, 2017) ya que el Si mejora la vía de fenilpropanoides (Fortunato *et al.*, 2014), que a su vez aumenta las defensas contra los patógenos.

Por otro lado, la aplicación de NPs de Cu también genera bioestimulación, específicamente de la capacidad antioxidante de las plantas (Hernández-Hernández *et al.*, 2018; Pinedo-Guerrero *et al.*, 2017). Las NPs de Cu pueden desencadenar la producción de ROS que da como resultado la activación de enzimas antioxidantes como mecanismo de desintoxicación (Zuverza-Mena *et al.*, 2017). Esta bioestimulación puede estar relacionada con los fenómenos de interacción superficial de las NPs (Bell *et al.*, 2014) causado por las características particulares de estos materiales y, en última instancia, los efectos de las NPs de Cu serán diferentes dependiendo de las características (tamaño, forma, etc.), cantidad y especies de plantas (Zuverza-Mena *et al.*, 2017).

La producción de enzimas antioxidantes en plantas de tomate mediante la aplicación de NPs de Cu (Hernández-Hernández *et al.*, 2018) puede inducir una mayor tolerancia al ataque de patógenos como *C. michiganensis*, ya que

regularán la generación de ROS, disminuyendo así el estrés oxidativo (Gill y Tuteja, 2010).

Como se observó en el presente estudio, aparentemente la aplicación de silicato de potasio en conjunto con NPs de Cu estimuló la actividad de las enzimas antioxidantes, que seguramente generó una mayor capacidad de las plantas de tomate para tolerar el estrés oxidativo causado por *C. michiganensis*. El resultado de esto fue una disminución en la severidad del patógeno, que a su vez tuvo una menor pérdida de rendimiento.

**Tabla 7.** Enzimas en hoja

TRATAMIENTOS (nCu+Si) (ppm)	CAT	SOD	PAL	GPX	APX
0+0	131.49a	13.90a	0.10b	0.23b	9.07b
250+184	149.67a	13.18ab	0.30a	0.60a	34.34a
250+460	70.89a	11.96ab	0.17b	0.67a	21.79ab
50+184	88.12a	9.32c	0.13b	0.17b	14.47b
50+460	95.72a	11.04bc	0.18ab	0.23b	19.08b
PATOGENO	111.24a	12.04ab	0.13b	0.31b	13.46b

Medias por columna con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). CAT: Catalasa en unidades/proteínas totales (mg/g) y cada unidad = mM consumidos de  $H_2O_2$ / mL /min., SOD: Superóxido Dismutasa U/ mL /proteínas totales (mg/g)., PAL: Fenilalanina amonio liasa en unidades, donde cada unidad = u/proteínas totales (mg/g) de ácido transcinámico/ mL /min., GPX: Glutatión peroxidasa en unidades, donde cada unidad = Mm de GSH/ mL /proteínas (mg/g), APX: Ascorbato peroxidasa, donde cada unidad =  $\mu$ mol EQ de Ácido Ascórbico oxidado/ mL /min.

**Tabla 8.** Enzimas en fruto

TRATAMIENTOS (nCu+Si) (ppm)	CAT	SOD	PAL	GPX	APX
0+0	108.31a	15.46a	0.19b	0.26cd	23.24a
250+184	291.57a	15.54a	0.48a	0.97a	30.20a
250+460	138.46a	14.94a	0.24b	0.59b	15.92a
50+184	178.36a	15.64a	0.27b	0.27cd	20.69a
50+460	214.36a	15.66a	0.19b	0.21d	20.37a
PATOGENO	114.12a	15.08a	0.30b	0.48bc	20.53a

Medias por columna con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). CAT: Catalasa en unidades/proteínas totales (mg/g) y cada unidad = mM consumidos de  $H_2O_2$ / mL /min., SOD: Superóxido Dismutasa U/ mL /proteínas totales (mg/g)., PAL: Fenilalanina amonio liasa en unidades, donde cada unidad = u/proteínas totales (mg/g) de ácido transcinámico/ mL /min., GPX: Glutatión peroxidasa en unidades, donde cada unidad = Mm de GSH/ mL /proteínas (mg/g), APX: Ascorbato peroxidasa, donde cada unidad =  $\mu$ mol EQ de Ácido Ascórbico oxidado/ mL /min.

El contenido de clorofila A fue modificado por la aplicación de los tratamientos, siendo el tratamiento con solo Cmm que presentó el contenido más alto, sin embargo, los tratamientos con NPs de Cu más Si fueron iguales al testigo absoluto (Tabla 9). En el contenido de glutatión, se observó que el tratamiento 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 460 mg L<sup>-1</sup> Si generó la mayor cantidad de este antioxidante, superando a el Testigo absoluto en un 152%. En el caso de los fenoles totales, se observó que con la excepción del tratamiento 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 460 mg L<sup>-1</sup> Si, todos los tratamientos excedieron el testigo absoluto en un rango de 45-74%. En cuanto al contenido de flavonoides, no se superó ningún tratamiento el testigo absoluto, solo se observó que los tratamientos 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu más ambas dosis de Si, y 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 460 mg L<sup>-1</sup> Si disminuyó este compuesto en un rango de 26 y 28%. En el contenido de β-caroteno aunque se observaron diferencias entre los tratamientos, no hubo diferencias respecto al testigo absoluto.

Los carotenoides son importantes por las acciones antioxidantes basadas en su capacidad para atrapar radicales peroxilo (Havaux, 2013; Latowski *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2015). El licopeno es uno de los principales carotenoides en las frutas de tomate y también es uno de los principales antioxidantes (Klunklin y Savage, 2017), y uno de los más eficientes neutralizadores de oxígeno singlete, entre los carotenoides naturales (Latowski *et al.*, 2014). En las plantas, la síntesis de licopeno generalmente se deriva del ácido mevalónico (MVA) y metileritritol vías de fosfato (MEP). Estas vías sintetizan isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP), que funcionan como precursores de la síntesis de carotenoides (Barrios *et al.*, 2017).

Los fenoles son compuestos antioxidantes que desencadenan la síntesis de una serie de metabolitos de la vía del ácido shikímico o a través de fenilpropanoides bajo condiciones del estrés abiótico (Ren y Sun, 2014; Swieca, 2016). Los flavonoides actúan como antioxidantes, la protección de plantas de estrés

oxidativo por la eliminación de  $H_2O_2$  y el oxígeno singlete generados bajo estrés biótico o abiótico (Hernández *et al.*, 2009, Hollman y Arts, 2000).

El silicio también puede funcionar como elicitador (Van Bockhaven *et al.*, 2013) y genera cambios en diferentes compuestos metabólicos, ya que este elemento está asociado con los componentes de la pared celular (Babalar *et al.*, 2016). Se ha informado que la aplicación de este elemento influye contenido de compuestos fenólicos (Hajiboland *et al.*, 2017). El silicio está asociado con la pared celular componentes y con las alteraciones del metabolismo polifenol (Babalar *et al.*, 2016), que mejora la permeabilidad al agua (Liang *et al.*, 2015) y aumenta las defensas contra los patógenos.

Fortunato *et al.* (2014) informaron que el Si mejora la ruta de los fenilpropanoides en plantas de banano bajo *Fusarium* sp. Estrés, por lo que existe una relación directa con el fenol producción. La enzima PAL modula la L-fenilalanina para el ácido transcinámico fabricación, que a su vez forman fenilpropanoides (Hajiboland *et al.*, 2017), que causan la producción de metabolitos fenólicos (flavonoides, cumarinas, ésteres fenólicos y lignina) (Weaver y Herrmann, 1997).

La aplicación de NPs de Cu estimula la producción de compuestos antioxidantes (Pinedo-Guerrero *et al.*, 2017) como respuesta al estrés oxidativo que genera (Shobha *et al.*, 2014).

**Tabla 9.** Antioxidantes no enzimáticos en hoja

TRATAMIENTO S (nCu+Si) (ppm)	GSH	CHL A	CHL B	CHL TOTAL	FENOLES -H	FLAVONOI DES-H	β- CAR- H
0+0	2.54 b	0.61ab	0.30 a	0.91a	4570.38b	5050.94a	0.12a b
250+184	6.39 a	0.74ab	0.36 a	1.09a	7967.24a	3828.74bc	0.15a b
250+460	4.04 b	0.59b	0.28 a	0.87a	6873.88a	3740.54c	0.08b
50+184	3.61 b	0.75ab	0.34 a	1.09a	6793.68a	4869.50ab	0.17a
50+460	4.01 b	0.59b	0.26 a	0.85a	4365.74b	3716.60c	0.14a b
PATOGENO	3.43 b	0.81a	0.35 a	1.16a	6623.52a	4927.46a	0.18a

Medias por columna con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). PROT: Proteínas en mg/g., GSH: Glutación reducido en Unidades, donde cada unidad es igual a mM de GSH/ mL /min. CHLA: Clorofila A (mg/g)., CHLB: Clorofila B (mg/g)., CHL TOTAL: Clorofila total (mg/g)., FENOLES-H: Fenoles en hoja en mg EQ de Ácido gálico \*100g de PS., FLAVONOIDES-H: Flavonoides en hoja en mg EQ de quercetina /100g de PS. β-CAR-H: β- Caroteno en hoja en mg/100g de PF.

En cuanto a los antioxidantes en los frutos de tomate, se observaron diferencias entre los tratamientos en glutatión, flavonoides, licopeno y β-caroteno, mientras que en fenoles totales y vitamina C todos los tratamientos fueron iguales entre sí (tabla 10). En Glutatión, todos los tratamientos aumentaron este compuesto, sin embargo, solo el tratamiento con Cmm y los dos los tratamientos con 460 mg L<sup>-1</sup> Si superaron estadísticamente al testigo absoluto. El tratamiento con solo Cmm presentó un 35% más de contenido de glutatión que el testigo absoluto, mientras que los tratamientos con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu + 460 mg L<sup>-1</sup> Si y 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 460 mg L<sup>-1</sup> Si fueron 31% y 28% más altos respectivamente. En el contenido de flavonoides, los dos tratamientos con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu independientemente de la dosis de silicio fueron los mejores, sin embargo, no fueron estadísticamente diferentes del Testigo absoluto. En el contenido de licopeno el tratamiento con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 460 mg L<sup>-1</sup> Si fue el mejor, superando el testigo absoluto por 78%.

Los tratamientos con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 184 mg L<sup>-1</sup> Si y 250 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 184 mg L<sup>-1</sup> Si también fueron mejores comparando respecto al testigo absoluto, en un 61% y 39% respectivamente. En el contenido de β-caroteno los tratamientos con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+460 mg L<sup>-1</sup> Si y 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 184 mg L<sup>-1</sup> Si fueron los que generaron el mayor contenido de este compuesto, superando el testigo absoluto en un 83% y 67% respectivamente. Consistentemente el tratamiento con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu+ 460 mg L<sup>-1</sup> Si generó efectos positivos en antioxidantes de frutas de tomate, especialmente en glutatión, flavonoides, licopeno y β-caroteno. Mientras que el tratamiento con solo Cmm generó efectos negativos, siendo el que presentó los valores más bajos en flavonoides, licopeno y β-caroteno.

Los compuestos antioxidantes no enzimáticos y las enzimas antioxidantes son muy importantes para evitar el estrés oxidativo causado por patógenos como *C. michiganensis*. Entre ellos los principales compuestos de este tipo son vitamina C, glutatión, fenoles totales, flavonoides y carotenoides, entre otros.

En las plantas, la vitamina C tiene muchas funciones celulares principalmente relacionadas con su capacidad para abandonar electrones (Truffault *et al.*, 2014), y pueden actuar directamente como un antioxidante al atrapar ROS, prevenir o minimizar el daño oxidativo (Gill y Tuteja, 2010). Además, también puede regenerar los radicales glicoproteína y tocoferol y actuar como cofactor de muchas enzimas como APX (Muzolf-Panek *et al.*, 2017). Desempeña un papel importante en la fotosíntesis como un cofactor enzimático (incluida la síntesis de etileno, giberelinas, flavonoides y antocianinas) (Gest *et al.*, 2013).

Esto ha sido documentado en diferentes cultivos, en tomate el licopeno fue aumentado por la aplicación de NPs de Cu+ Chitosan, reportando 12% más que el Testigo absoluto (Juárez-Maldonado *et al.*, 2016).

La aplicación foliar de NPs de TiO<sub>2</sub> y ZnO (0-1000 mg kg<sup>-1</sup>) aumentaron el contenido de licopeno (80-113%) en frutos de tomate (Raliya *et al.*, 2015).

En el caso del glutatión, se ha observado que este compuesto aumenta en respuesta a condiciones de estrés biótico o abiótico (Kumar y Trivedi, 2016). En cuanto al contenido de fenoles en frutos de chile jalapeño mostraron un aumento en el contenido de fenoles totales (5,9%) cuando se aplicaron 2,0 mg de NPs de Cu+Chitosan-PVA (Pinedo-Guerrero *et al.*, 2017). Además, la aplicación foliar de nano-fertilizantes de Zn y B Aumentó el contenido de fenoles en frutos de granada (Davaranah *et al.*, 2016). En *A. Thaliana*, la concentración de antocianinas aumentó cuando las nanopartículas de CuO fueron aplicadas (Saito *et al.*, 2013). García-Gómez *et al.* (2017) informaron que la aplicación de NPs de ZnO al suelo (3, 20, y 225 mg kg<sup>-1</sup>) en cultivos de frijol y tomate estimularon la capacidad antioxidante de forma importante. La aplicación NPs de Cu puede generar cierto estrés en las plantas de tomate, produciendo un aumento en ROS que activa un mecanismo de defensa (Rizwan *et al.*, 2017); Shobha *et al.*, 2014), aumentando la producción de compuestos antioxidantes como Ascorbato, glutatión, carotenoides y flavonoides, entre otros (Seminario *et al.*, 2017).

La misma respuesta se observa en condiciones de estrés leve causado por varias NPs, sin embargo, cambia cuando se aplican altas dosis debido a una sobreproducción de ROS, lo que resulta en la disminución de antioxidantes (Rizwan *et al.*, 2017).

**Tabla 10.** Antioxidantes no enzimáticos en fruto

TRATAMIENTOS (nCu+Si) (ppm)	GSH	FENOLES	FLAVONOIDES	VIT C	LIC	β-CAR
0+0	2.66b	5283.70a	268.59ab	34.47a	0.18c	0.06bc
250+184	3.03ab=	6856.28a	265.13ab	40.03a	0.25ab	0.08ab
250+460	3.40a=	6465.08a	278.99ab	39.73a	0.24bc	0.08ab
50+184	3.30ab=	6028.92a	294.11a	39.00a	0.29ab	0.10a
50+460	3.48a=	5424.52a	301.67a	38.87a	0.32a	0.11a
PATOGENO	3.58a	6875.84a	250.01b	34.92a	0.18c	0.05c

Medias por columna con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). PROT: Proteínas en mg/g., GSH: Glutatión reducido en Unidades, donde cada unidad es igual a mM de GSH/ mL /min., FENOLES: Fenoles en hoja en mg EQ de Ácido gálico \*g de PS., FLAVONOIDES: Flavonoides en hoja en mg EQ de quercetina /g de PS., VIT C: Vitamina C en mg/100g de peso fresco., LIC: Licopeno en mg/100g de Peso Fresco., β-CAR: β- Caroteno en fruto en mg/100g de PF.

## CONCLUSIONES

La aplicación conjunta de NPs de Cu y silicato de potasio fue efectiva para reducir la severidad de *C. michiganensis* en todas las dosis probadas. Además, la pérdida de rendimiento debido a la bacteria se redujo, especialmente los tratamientos que incluyeron la baja dosis de NPs de Cu.

La aplicación de NPs de Cu y silicato de potasio estimuló la actividad de las enzimas SOD, PAL, GPX y APX, así como la concentración de glutatión reducido y fenoles totales en las hojas, lo que probablemente favoreció la tolerancia al estrés oxidativo causado por *C. michiganensis*. La aplicación conjunta de NPs de Cu y silicato de potasio estimuló los niveles de compuestos enzimáticos y no enzimáticos que son clave en la defensa de las plantas de tomate, aumentando la tolerancia a *C. michiganensis*.

## REFERENCIAS

- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., y Bharwana, S. A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8148-8162.
- Aguirre C, Chávez T, García P, Raya JC.2007. El silicio en los organismos vivos. *Interciencia.*; 32(8):504-509.
- Ahmad, P., Jamsheed, S., Hameed, A., Rasool, S., Sharma, I., Azooz, M. M., et al. (2014). "Drought stress induced oxidative damage and antioxidants in plants," in *Oxidative damage to plants: antioxidant networks and signaling (Elsevier Inc.)*, 345–367. doi:10.1016/B978-0-12-799963-0.00011-3.
- Al-aghabary, K., Zhu, Z., & Shi, Q. (2005). Influence of Silicon Supply on Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidative Enzyme Activities in Tomato Plants Under Salt Stress Antioxidative Enzyme Activities in Tomato. *Journal of Plant Nutrition*, 27(12), 37–41.
- Al-aghabary, K., Zhu, Z., & Shi, Q. (2005). Influence of Silicon Supply on Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidative Enzyme Activities in Tomato Plants Under Salt Stress Antioxidative Enzyme Activities in Tomato. *Journal of Plant Nutrition*, 27(12), 37–41.
- Alharby, H. F., Metwali, E. M. R., Fuller, M. P., and Aldhebiani, A. Y. (2016). The alteration of mRNA expression of SOD and GPX genes, and proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under stress of NaCl and/or ZnO nanoparticles. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 773–781. doi:10.1016/j.sjbs.2016.04.012.
- Arnen, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. *Pl. Physiol*, 24, 1-15.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49(6), 462-468.
- Aybeke, M. (2017). Fusarium infection causes genotoxic disorders and antioxidant-based damages in *Orobanche* spp. *Microbiol. Res.* 201, 46–51. doi:10.1016/j.micres.2017.05.001

- Babalar, M., Edrisi, B., and Naderi, R. (2016). Evaluation of the Mechanical Strength of Gerbera Flower Stem in Response to Silicon and Salicylic Acid Application. *J. Ornament. Plants* 6, 163–171.
- Babalar, M., Edrisi, B., and Naderi, R. (2016). Evaluation of the Mechanical Strength of Gerbera Flower Stem in Response to Silicon and Salicylic Acid Application. *J. Ornament. Plants* 6, 163–171.
- Badanai, J., Silva, C., Martins, D., Antunes, D., & Miguel, M. G. (2015). Ability of scavenging free radicals and preventing lipid peroxidation of some phenols and ascorbic acid.
- Bakhat, H. F., Bibi, N., Zia, Z., Abbas, S., Hammad, H. M., Fahad, S., et al. (2018). Silicon mitigates biotic stresses in crop plants: A review. *Crop Prot.* 104, 21–34. doi:10.1016/j.cropro.2017.10.008.
- Barrios, A. C., Medina-Velo, I. A., Zuverza-Mena, N., Dominguez, O. E., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2017). Nutritional quality assessment of tomato fruits after exposure to uncoated and citric acid coated cerium oxide nanoparticles, bulk cerium oxide, cerium acetate and citric acid. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 100–107. doi:10.1016/j.plaphy.2016.04.017.
- Bell, I. R., Ives, J. A., and Wayne, B. J. (2014). Nonlinear effects of nanoparticles: biological variability from hormetic doses, small particle sizes, and dynamic adaptive interactions. *Dose-Response* 12, dose-response.1. doi:10.2203/dose-response.13-025.Bell.
- Borda, O. A., Humberto, F., Gomez M.I., y Barón.F.H. (2007). Silicon as a beneficial element in forage oat ( *Avena sativa* L.): physiological responses of growth and management, 25(2), 273–279.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Brunings, A. M., Datnoff, L. E., Ma, J. F., Mitani, N., Nagamura, Y., Rathinasabapathi, B., et al. (2009). Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Ann. Appl. Biol.* 155, 161–170. doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00347.x.

- Cadenas-Pliego, G., M. Pérez-Alvarez, O. Ávila, R. Sierra-Ávila and I. M. Ortega-Ortiz, H. Betancourt-Galindo, R. Jiménez-Regalado, E. Barriga-Castro, E. Palacios-Mireles, 2013, Expediente: MX/a/2013/015221 Folio MX/E/2013/09476.
- Cai, K., Gao, D., Chen, J., and Luo, S. (2009). Probing the mechanisms of silicon-mediated pathogen resistance. *Plant Signal. Behav.* 4, 1–3. doi:10.4161/psb.4.1.7280.
- Cansev, A., Gulen, H., & Eris, A. (2011). The activities of catalase and ascorbate peroxidase in olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik) under low temperature stress. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(2), 113-120.
- Cao, B. li, Wang, L., Gao, S., Xia, J., and Xu, K. (2017). Silicon-mediated changes in radial hydraulic conductivity and cell wall stability are involved in silicon-induced drought resistance in tomato. *Protoplasma* 254, 2295–2304. doi:10.1007/s00709-017-1115-y.
- Capaldi, A. S. C., Diniz, S. A. L., Moretto, G. R., Antunes, A. R., and Zezzi, A. M. A. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta* 131, 693–705. doi:10.1016/j.talanta.2014.08.050.
- Carré-Missio, V., Rodrigues, F. A., Schurt, D. A., Resende, R. S., Souza, N. F. A., Rezende, D. C., et al. (2014). Effect of foliar-applied potassium silicate on coffee leaf infection by *Hemileia vastatrix*. *Ann. Appl. Biol.* 164, 396–403. doi:10.1111/aab.12109.
- CAYMAN. 2017. Superoxide Dismutase Assay Kit Item № 706002. Visto en <https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf>.
- Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K. H., & Manulis-Sasson, S. (2017). Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular plant pathology*, 18(3), 336-346 chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J. Japanese Soc. Food Sci. Technol.*
- Choudhary, R. C., Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., & Saharan, V. (2017). Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). *Scientific Reports*, 7(1), 9754. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-08571-0>
- Cooke, J., and Leishman, M. R. (2011). Is plant ecology more siliceous than we realise? *Trends Plant Sci.* 16, 61–68. doi:10.1016/j.tplants.2010.10.003.

- Dallagnol, L. J., Rodrigues, F. A., Pascholati, S. F., Fortunato, A. A., and Camargo, L. E. A. (2015). Comparison of root and foliar applications of potassium silicate in potentiating post-infection defences of melon against powdery mildew. *Plant Pathol.* 64, 1085–1093. doi:10.1111/ppa.12346.
- Dann, E. K., and Le, D. P. (2017). Effects of Silicon Amendment on Soilborne and Fruit Diseases of Avocado. *Plants* 6, 51. doi:10.3390/plants6040051.
- Davarpanah, S., Tehranifar, A., Davarynejad, G., Abadía, J., and Khorasani, R. (2016). Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani) fruit yield and quality. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 210, 57–64. doi:10.1016/j.scienta.2016.07.003.
- developmental stages. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 46, 144–161.
- Diener C.A. y Ausubel Frederick M., (2005). Resistance to *Fusarium oxysporum* 1 a dominant Arabidopsis disease-resistance gene is not race specific. *Genetics*. 171, 305-321.
- Dorneles, K. R., Dallagnol, L. J., Pazdiora, P. C., Rodrigues, F. A., & Deuner, S. (2017). Silicon potentiates biochemical defense responses of wheat against tan spot. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 97, 69–78. <http://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.01.001>
- Dos Santos, J. O., De Fária, M. E., Da Silva, D. M., De Oliveira Silveira, H. R., Campos, C. N., and Alves, J. D. (2017). Copper (Cu) stress affects carbon and antioxidant metabolism in *Coffea arabica* seedlings. *Aust. J. Crop Sci.* 11, 960–967. doi:10.21475/ajcs17.11.08.pne445.
- Dzul, I. R. C., Jaramillo-villanueva, J. L., Tornero-campante, M. A., Schwentesius-Rindermann, R. (2011). Characterization of tomato (*lycopersicum esculentum* mill.) cropping system in the state of jalisco, México, 14, 501–512. Aguirre C, Chávez T, García P, Raya JC.2007. El silicio en los organismos vivos. *Interciencia.*; 32(8):504-509.
- Ferreira, H. A., Nascimento, C. W. A. do, Datnoff, L. E., Nunes, G. H. de S., Preston, W., Souza, E. B. de, et al. (2015). Effects of silicon on resistance to bacterial fruit blotch and growth of melon. *Crop Prot.* 78, 277–283. doi:10.1016/j.cropro.2015.09.025.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations: Statistics Division (FAOSTAT), 2013. Production and Trade Data by Crop. Internet site: (Accessed April 21, 2015).
- Fortunato, A. A., da Silva, W. L., and Rodrigues, F. Á. (2014). Phenylpropanoid pathway is potentiated by silicon in the roots of banana plants during the

infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. 104, 597–603. 616 doi:10.1094/PHYTO-07-13-0203-R. 617 *Phytopathology*

- Fortunato, A. A., Rodrigues, F. Á., Baroni, J. C. P., Soares, G. C. B., Rodriguez, M. A. D., y Pereira, O. L. (2012). Silicon suppresses fusarium wilt development in banana plants. *J. Phytopathol.* 160, 674–679. doi:10.1111/jph.12005.
- Fu PP, Xia Q, Hwang H-M, Ray PC, Yu H. 2014. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J food drug Anal.*;22(1):64-75. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.005.
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., and Fernández, M. D. (2017). Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO<sub>4</sub> in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions. *Sci.Total Environ.* 589, 11–24. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.153.
- Gengmao, Z., Shihui, L., Xing, S., Yizhou, W. & Zipan, C. (2015). The role of silicon in physiology of the medicinal plant (*Lonicera japonica* L.) under salt stress. *Scientific Reports*, 5(12), 1–11. <http://doi.org/10.1038/srep12696>
- Gengmao, Z., Shihui, L., Xing, S., Yizhou, W. & Zipan, C. (2015). The role of silicon in physiology of the medicinal plant (*Lonicera japonica* L.) under salt stress. *Scientific Reports*, 5(12), 1–11. <http://doi.org/10.1038/srep12696>
- Gest, N., Gautier, H., and Stevens, R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: The rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.* 64, 33–53. doi:10.1093/jxb/ers297.
- Ghareeb, H., Bozsó, Z., Ott, P. G., Repenning, C., Stahl, F., and Wydra, K. (2011). Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 75, 83–89. doi:10.1016/j.pmpp.2010.11.004.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

- Hajiboland, R., Bahrami-Rad, S., and Poschenrieder, C. (2017a). Silicon modifies both a local response and a systemic response to mechanical stress in tobacco leaves. *Biol. Plant.* 61, 187–191. doi:10.1007/s10535-016-0633-3.
- Hajiboland, R., Moradtalab, N., Eshaghi, Z., and Feizy, J. (2017b). Effect of silicon
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., Khan, M. I. R., and Fujita, M. (2018). Silicon-mediated regulation of antioxidant defense and glyoxalase systems confers drought stress tolerance in *Brassica napus* L. *South African J. Bot.* 115, 50–57. doi:10.1016/j.sajb.2017.12.006.
- Havaux, M. (2013). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant J.* 79, 597–606. doi:10.1111/tpj.12386.
- Hegazi, A. M., & El-Shraiy, A. M. (2017). Stimulation of Photosynthetic Pigments, Anthocyanin, Antioxidant Enzymes in Salt Stressed Red Cabbage Plants by Ascorbic Acid and Potassium Silicate. *Middle East J.* 6(2), 553-568.
- Hernández, I., Alegre, L., Breusegem, F. Van, and Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends Plant Sci.* 14, 125–132. doi:10.1016/j.tplants.2008.12.003.
- Hernández-Hernández, H., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortiz, H., Hernández-Fuentes, A. D., and Juárez-Maldonado, A. (2017). Cu Nanoparticles in chitosan-PVA hydrogels as promoters of growth, productivity and fruit quality in tomato. *Emirates J. Food Agric.* 29, 573–580. doi:10.9755/ejfa.2016-08-1127.
- Hernández-Hernández, H., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., and Juárez-Maldonado, A. (2018). Effects of chitosan–PVA and Cu nanoparticles on the growth and antioxidant capacity of tomato under saline stress. *Molecules* 23. doi:10.3390/molecules23010178.
- Hollman, P. C. H., and Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081–1093. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G.
- Hong, J., Rico, C. M., Zhao, L., Adeleye, A. S., Keller, A. A., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(1), 177-185.

- Houterman, P. M., Speijer, D., Dekker, H. L., De Koster, C. G., Cornelissen, B. J. C., and Rep, M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants: Short communication. *Mol. Plant Pathol.* 8, 215–221. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x.
- Huang, C. H., Roberts, P. D., and Datnoff, L. E. (2011). Silicon suppresses fusarium crown and root rot of tomato. *J. Phytopathol.* 159, 546–554. doi:10.1111/j.1439-6690434.2011.01803.x.
- Imahori, Y. (2014). “Role of ascorbate peroxidase in postharvest treatments of horticultural crops,” in *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling (Elsevier Inc.)*, 425–451. doi:10.1016/B978-0-12-799963-0.00014-9.
- Imahori, Y., Bai, J., and Baldwin, E. (2016). Antioxidative responses of ripe tomato fruit to postharvest chilling and heating treatments. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 198, 398–406. doi:10.1016/j.scienta.2015.12.006.
- Jafari, S. R., Arvin, S. M. J., and Kalantari, K. M. (2015). Response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings to exogenous silicon and salicylic acid under osmotic stress. *Acta Biol. Szeged.* 59, 25–33.
- Jang, S.-W., Kim, Y., Khan, A. L., Na, C.-I., and Lee, I.-J. (2018). Exogenous short-term silicon application regulates macro-nutrients, endogenous phytohormones, and protein expression in *Oryza sativa* L. *BMC Plant Biol.* 18, 4. doi:10.1186/s12870-017-1216-y.
- Jardin, P. (2015). Plant biostimulants : Definition , concept , main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Jiao-jing, L. I. U., Shao-hang, L. I. N., Pei-lei, X. U., Xiu-juan, W. &, Ji-gang, B. A. I. (2009). Effects of Exogenous Silicon on the Activities of Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Chilling-Stressed Cucumber Leaves. *Agricultural Sciences in China*, 8(9), 1075–1086. [http://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60315-6](http://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60315-6)
- Juárez-maldonado, A., Ortega-ortíz, H., Pérez-labrada, F., Cadenas-pliego, G., & Benavides-mendoza, A. (2016). Cu Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological , production , and quality characteristics of tomato. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89, 183–189. <http://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.023>
- Juárez-maldonado, A., Ortega-ortíz, H., Pérez-labrada, F., Cadenas-pliego, G., & Benavides-mendoza, A. (2016). Cu Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological , production , and quality

- characteristics of tomato. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89, 183–189. <http://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.023>
- Kang, G., Li, G., and Guo, T. (2014). Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta Physiol. Plant.* 36, 2287–2297. doi:10.1007/s11738-014-1603-z.
- Kirkby, E. Römheld, V. (2007). Micronutrientes En La Fisiología De Las Plantas : (Segunda Parte).
- Klunklin, W., and Savage, G. (2017). Effect on quality characteristics of tomatoes grown under well-watered and drought stress conditions. *Foods* 6, 56. doi:10.3390/foods6080056.
- Kumar, S., and Trivedi, P. K. (2016). “Heavy metal stress signaling in plants,” in *Plant Metal Interaction*. (Elsevier Inc.), 585–597. doi:10.1016/B978-0-12-803158-2.00025-4.
- Kuskoski, E. Marta, Asuero, Agustín G., García-Parilla, M. Carmen, Troncoso, Ana M., & Fett, Roseane. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology*, 24(4), 691–693. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612004000400036>
- Latowski, D., Szymanska, R., and Strzalka, K. (2014). “Carotenoids involved in antioxidant system of chloroplasts,” in *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling* (Elsevier Inc.), 289–319. doi:10.1016/B978-0-12-799963-0.00009-5.
- Lehmann, A., & Rillig, M. C. (2015). Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops—A meta-analysis. *Soil biology and biochemistry*, 81, 147–158.
- Li, L., Ai, S., Li, Y., Wang, Y., & Tang, M. (2017). Exogenous Silicon Mediates Alleviation of Cadmium Stress by Promoting Photosynthetic Activity and Activities of Antioxidative Enzymes in Rice. *Journal of Plant Growth Regulation*, 0(0), 1–10. <http://doi.org/10.1007/s00344-017-9758-7>
- Liang, Y., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W., & Ding, R. (2003). Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley ( *Hordeum vulgare* L .). *Journal of Plant Physiology*, 160, 1157–1164.
- Liang, Y., Nikolic, M., Bélanger, R., Gong, H., and Song, A. (2015). Silicon in agriculture: *from theory to practice*. Springer.

- Ma, J. F., and Yamaji, N. (2008). Functions and transport of silicon in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3049–3057. doi:10.1007/s00018-008-7580-x.
- Malhotra, C. C., Kapoor, R., and Ganjewala, D. (2016). Alleviation of abiotic and biotic stresses in plants by silicon supplementation. *Sci. Agric.* 13, 59–73. doi:10.15192/PSCP.SA.2016.13.2.5973.
- Manivannan, A., and Ahn, Y.-K. (2017). Silicon Regulates Potential Genes Involved in Major Physiological Processes in Plants to Combat Stress. *Front. Plant Sci.* 8, 1–13. doi:10.3389/fpls.2017.01346.
- Markovich, O., Steiner, E., Kouřil, Š., Tarkowski, P., Aharoni, A., & Elbaum, R. (2017). Silicon promotes cytokinin biosynthesis and delays senescence in Arabidopsis and Sorghum. *Plant, Cell & Environment*, 40(7), 1189–1196. <http://doi.org/10.1111/pce.12913>
- Markovich, O., Steiner, E., Kouřil, Š., Tarkowski, P., Aharoni, A., & Elbaum, R. (2017). Silicon promotes cytokinin biosynthesis and delays senescence in Arabidopsis and Sorghum. *Plant, Cell & Environment*, 40(7), 1189–1196. <http://doi.org/10.1111/pce.12913>
- McShan, D., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of food and drug analysis*, 22(1), 116-127.
- Meharg, C., and Meharg, A. A. (2015). Silicon, the silver bullet for mitigating biotic and abiotic stress, and improving grain quality, in rice? *Environ. Exp. Bot.* 120, 8–17. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.07.001.
- Miller, G. N. R., Alves, C. S. G., & Sluys, M. Van. (2017). Plant immunity : unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany*, 119, 681–687. <http://doi.org/10.1093/aob/mcw284>
- Munira, S., Hossain, M. M., Zakaria, M., Ahmed, J. U., & Islam, M. M. (2015). Evaluation of potato varieties against salinity stress in Bangladesh. *International Journal of Plant and Soil Science*, 6(2), 73-81.
- Murshed, R., Lopez-lauri, F., & Sallanon, H. (2014). Effect of salt stress on tomato fruit antioxidant systems depends on fruit development stage. *Physiol Mol Biol Plants*, 20(1), 15–29. <http://doi.org/10.1007/s12298-013-0209-z>
- Muzolf-Panek, M., Kleiber, T., and Kaczmarek, A. (2017). Effect of increasing manganese concentration in nutrient solution on the antioxidant activity, vitamin C, lycopene and polyphenol contents of tomato fruit. *Food Addit. Contam. Part A* 34, 379–389. doi:10.1080/19440049.2016.1277037.

- Nagata, M., and Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and cell physiology*, 28(1), 131-140.
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., and Yuan, Z.-C. (2018). *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Mol. Plant Pathol.* doi:10.1111/mpp.12678.
- Ning, D., Song, A., Fan, F., Li, Z., and Liang, Y. (2014). Effects of Slag-Based Silicon Fertilizer on Rice Growth and Brown-Spot Resistance. *PLoS One* 9, e102681. doi:10.1371/journal.pone.0102681.
- Notario-Medellin C.M., y Sosa-Morales M.E. (2012). El jitomate (*Solanum lycopersicum*): Aporte nutrimental, enfermedades postcosecha y tecnologías para su almacenamiento en fresco. 6-1. 40-53.
- Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K. J., Bangoura, M. L., & Lagnika, C. (2012). Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(7), 574.
- Ouzounidou, G., Giannakoula, A., Ilias, I., and Zamanidis, P. (2016). Alleviation of drought and salinity stresses on growth, physiology, biochemistry and quality of two *Cucumis sativus* L. cultivars by Si application. *Rev. Bras. Bot.* 39, 531–539. doi:10.1007/s40415-016-0274-y.
- Padayatt, S. J., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, P. K., Song, J., Koh, W. S., & Levine, M. (2001). Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. *Handbook of Antioxidants*. CADENZAS, E.; PACKER, I.(eds) 2nd edition. CRC press. Washington DC, USA, 117-145.
- Pavlovic, J., Samardzic, J., Maksimović, V., Timotijevic, G., Stevic, N., Laursen, K. H., et al. (2013). Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytol.* 198, 1096–1107. doi:10.1111/nph.12213.
- Pinedo-Guerrero, Z. H., Delia Hernández-Fuentes, A., Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., Cadenas-Pliego, G., and Juárez-Maldonado, A. (2017). Cu nanoparticles in hydrogels of chitosan-PVA affects the characteristics of post-harvest and bioactive compounds of jalapeño pepper. *Molecules* 22, 1–14. doi:10.3390/molecules22060926.

- Pozza, E. A., Pozza, A. A. A., and Botelho, D. M. dos S. (2015). Silicon in plant disease control. *Rev. Ceres* 62, 323–331. doi:10.1590/0034-737X201562030013.
- Rahman, A., Wallis, C. M., and Uddin, W. (2015). Silicon-Induced Systemic Defense Responses in Perennial Ryegrass Against Infection by *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology* 105, 748–757. doi:10.1094/PHYTO-12-14-0378-R.
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W.-N., and Biswas, P. (2015). Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *plant. Metallomics* 7, 1584–1594. doi:10.1039/c5mt00168d.
- Ramos, S.J., Faquin, V., Guilherme, L.R.G., Castro, E.M., Avila, F.W., Carvalho, G.S., Bastos, C.E.A., Oliveira, C. (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants feed with selenate and selenite. *Plant Soil Environment*. 12, 583-587.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Original Contribution*, 26(9-10), 1231–1237.
- Ren, S.-C., and Sun, J.-T. (2014). Changes in phenolic content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and antioxidant capacity of two buckwheat sprouts in relation to germination. *J. Funct. Foods* 7, 298–304. doi:10.1016/j.jff.2014.01.031.
- Rico, C. M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. In *Nanotechnology and Plant Sciences* (pp. 1-17). Springer International Publishing.
- Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., Adrees, M., Ibrahim, M., et al. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *J. Hazard. Mater.* 322, 2–16. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.05.061.
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., et al. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 1–14. doi:10.1016/j.plaphy.2013.02.001.
- Sathiyabama, M., and Manikandan, A. (2018). Application of copper-chitosan nanoparticles stimulate growth and induce resistance in finger millet (

Eleusine coracana Gaertn.) Plants against Blast Disease. *J. Agric. Food Chem.* 66, 1784–1790. doi:10.1021/acs.jafc.7b05921.

Savvas, D. &, & Ntatsi, G. (2015). Biostimulant activity of silicon in horticulture. *Sci.Hortic.* <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.010>

Seminario, A., Song, L., Zulet, A., Nguyen, H. T., González, E. M., and Larrainzar, E. (2017). Drought stress causes a reduction in the biosynthesis of ascorbic acid in soybean plants. *Front. Plant Sci.* 8, 1–10. doi:10.3389/fpls.2017.01042.

Sharma, S., & Uttam, K. N. (2017). Rapid analyses of stress of copper oxide nanoparticles on wheat plants at an early stage by laser induced fluorescence and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 92, 135–150. <http://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.06.004>

Shaw, A. K., Ghosh, S., Kalaji, H. M., Bosa, K., Brestic, M., Zivcak, M., et al. (2014). Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defense and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environ. Exp. Bot.* 102, 37–47. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.02.016.

Shobha, G., Moses, V., and Ananda, S. (2014). Biological synthesis of copper nanoparticles and its impact: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Invent.* 3, 2319–6718. Available at: [www.ijpsi.org](http://www.ijpsi.org).

Shobha, G., Moses, V., and Ananda, S. (2014). Biological synthesis of copper nanoparticles and its impact: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Invent.* 3, 2319–6718. Available a [www.ijpsi.org](http://www.ijpsi.org).

*Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 39, 925–928. doi:10.3136/nskkk1962.39.925.

Singh, G., & Rattanpal, H. S. (2014). Use of Nanotechnology in Horticulture. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 2(1), 2320–3730.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. (2015). Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. *Molecular Sciences*, 16, 13561–13578. <http://doi.org/10.3390/ijms160613561>

Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil* 15, 134–154. doi:10.1007/BF01347224.

supplementation on growth and metabolism of strawberry plants at three

- Swieca, M. (2016). Hydrogen peroxide treatment and the phenylpropanoid pathway precursors feeding improve phenolics and antioxidant capacity of quinoa sprouts via an induction of L-tyrosine and L-phenylalanine ammonia Lyases activities. *J. Chem.* ID 1936516, 7 pages. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2016/1936516.
- Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M. R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., ... & Chinou, I. (2012). Effect of L-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 555-564.
- Telles-Nascimento, K. J., Debona, D., Silveira, P. R., Silva, L. C., DaMatta, F. M., and Rodrigues, F. Á. (2016). Silicon-Induced changes in the antioxidant system reduce soybean resistance to frogeye leaf spot. *J. Phytopathol.* 164, 768–778. doi:10.1111/jph.12497.
- Tie, S. G., Tang, Z. J., Zhao, Y. M., and Li, W. (2012). Oxidative damage and antioxidant response caused by excess copper in leaves of maize. *African J. Biotechnol.* 11, 4378–4384. doi:10.5897/AJB11.3187.
- Tripathi, D. K., Shweta, Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., et al. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 2–12. doi:10.1016/j.plaphy.2016.07.030.
- Truffault, V., Gest, N., Garchery, C., Causse, M., Duboscq, R., Riqueau, G., et al. (2014). Variation in tomato fruit ascorbate levels and consequences of manipulation of ascorbate metabolism on drought stress tolerance. *Acta Hort.* 1048, 75–84. doi:10.17660/ActaHortic.2014.1048.8.
- Trujillo-Reyes, J., Majumdar, S., Botez, C. ., Peralta-Videa, J. y J.L, G.-T. (2014). Exposure studies of core-shell Fe / Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Cu / CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological. *Journal of Hazardous Materials*, 267, 255–263. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.067>
- Van Bockhaven, J., De Vleeschauwer, D., and Höfte, M. (2013). Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *J. Exp. Bot.* 64, 1281–1293. doi:10.1093/jxb/ers329.
- Van Bockhaven, J., De Vleeschauwer, D., and Höfte, M. (2013). Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *J. Exp. Bot.* 64, 1281–1293. doi:10.1093/jxb/ers329.

- Wang, P., Menzies, N. W., Lombi, E., Sekine, R., Blamey, F. P. C., Hernandez-Soriano, M. C., et al. (2015). Silver sulfide nanoparticles (AgS-NPs) are taken up by plants and are phytotoxic. *Nanotoxicology* 5390, 1–9. doi:10.3109/17435390.2014.999139.
- Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R., and Fuchigami, L. (2005). Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130, 167–173.
- Weaver, L. M., and Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci.* 2, 346–351. doi:10.1016/S1360-1385(97)84622-5.
- Weaver, L. M., and Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci.* 2, 346–351. doi:10.1016/S1360-1385(97)84622-5.
- Weerahewa, D. & David, D., (2015). Effect of silicon and potassium on tomato anthracnose and on the postharvest quality of tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka.* 43 (3), pp . 273–280. DOI: <http://doi.org/10.4038/jnsfsr.v43i3.7959>
- Xue, T., Hartikainen, H., & Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and soil*, 237(1), 55-61.
- Yassin, M. A., El-Samawaty, A. E.-R. M. A., Moslem, M. A., and Sayed, S. R. M. (2016). Evaluation of potassium and sodium silicates against fusarium spp . causing damping- off disease of cotton seedling. *Fresenius Environ. Bull.* 25, 1117–1124.
- Yu, Z., & Dahlgren, R. A. (2000). Evaluation of Methods for Measuring Polyphenols in Conifer Foliage. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9), 2119–2120.
- Yuan, H., Zhang, J., Nageswaran, D., and Li, L. (2015). Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Hortic. Res.* 2, 15036. doi:10.1038/hortres.2015.36.
- Zapata, L. M., Gerard, L., Davies, C., y Schwab, M. D. C. (2007). Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Ciencia, docencia y tecnología*, (35), 175-193.

- Zhai, X., Zhang, C., Zhao, G., Stoll, S., Ren, F., & Leng, X. (2017). Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 4. <http://doi.org/10.1186/s12951-016-0243-4>
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., & Yu, J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167, 527–533. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.020>
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., & Yu, J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167, 527–533. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.020>
- Zuverza-Mena, N., Martínez-Fernández, D., Du, W., Hernandez-Viezcas, J. A., Bonilla- Bird, N., López-Moreno, M. L., et al. (2017). Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A review. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 236–264. doi:10.1016/j.plaphy.2016.05.037.
- Zuverza-Mena, N., Martínez-Fernández, D., Du, W., Hernandez-Viezcas, J. A., Bonilla- Bird, N., López-Moreno, M. L., et al. (2017). Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A review. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 236–264. doi:10.1016/j.plaphy.2016.05.037.



