

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



PRODUCCIÓN Y NANOENCAPSULACIÓN DE FITOHORMONAS E  
INDUCTORES DE RESISTENCIA DE *Botryodiplodia theobromae* PARA EL  
CONTROL DE *Fusarium oxysporum* EN TOMATE.

Tesis

Que presenta MARÍA DEL CARMEN NELY ANDRADE AYALA  
Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Julio 2019

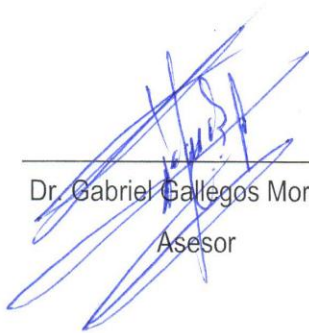
PRODUCCIÓN Y NANOENCAPSULACION DE FITOHORMONAS E  
INDUCTORES DE RESISTENCIA DE *Botryodiplodia theobromae* PARA EL  
CONTROL DE *Fusarium oxysporum* EN TOMATE.

Tesis

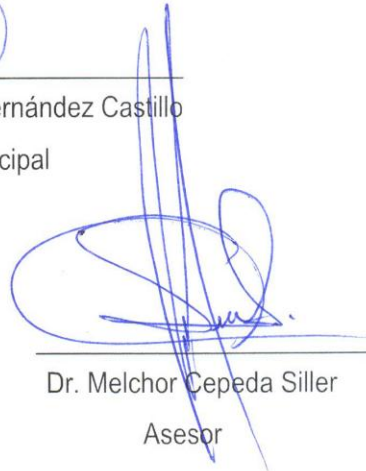
Elaborada por MARÍA DEL CARMEN NELY ANDRADE AYALA como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del comité de asesoría.



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo  
Asesor Principal



Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Asesor



Dr. Melchor Cepeda Siller  
Asesor



Dr. Antonio Sergei Ledezma  
Asesor



Dr. Elan Iñaky Laredo Alcalá  
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente  
Subdirector de Postgrado UAAAN

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias Dios, por permitirme cumplir una meta más en la vida. ¡Que no te falten ni la bondad ni la fidelidad! Átalas a tu cuello, escríbelas en las tablillas de tu corazón (Proverbios 3:3).

Aunque estas líneas no puedan compensar todo lo que cada una de las personas que participaron en esta tesis y en esta etapa de mi vida, espero que al menos sirvan para expresar mi más sincero agradecimiento.

A mi Director de tesis, Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo por guiarme en este largo proyecto, dedicar su tiempo y sobre todo haberme dado la oportunidad de disfrutar de un periodo de aprendizaje.

Al Dr. Elan Iñaky Laredo Alcalá, por guiarme en este trabajo, por sus enriquecedoras aportaciones en el transcurso de la tesis, por creer en mí por su tiempo y por sus consejos que me han hecho crecer como persona.

Al Dr. Antonio Sergei Ledezma, por su valiosa colaboración su tiempo y apoyo durante el desarrollo de este trabajo, por darme la libertad de conocer y descubrir nuevos conocimientos.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por su apoyo y por haber sido parte de los profesores que me formaron durante mi estancia en el posgrado.

Al Dr. Melchor Cepeda Siller, por su apoyo en la realización de este trabajo y también por ser uno de los profesores que me formo durante mi estancia en el posgrado.

Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

A la UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO (UAAAN), por ser parte de mi vida de mi formación y superación.

Al CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA (CIQA), a Naty y al personal del laboratorio de microbiología del departamento de Materiales Avanzados, por su apoyo y por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

A la empresa GreenCorp Biorganiks de México S.A. de C.V. por todo su apoyo al permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones y recursos.

A mi Amiga Carmen Jiménez, por ser una gran compañera y amiga por su apoyo incondicional...! por siempre ser mi confidente, por apoyarme en todo momento y por todas las experiencias que vivimos juntas en nuestra formación en el posgrado.

Al señor Clemente Rodríguez, la señora Consuelo a Chelito y su familia por todo su apoyo y confianza... Dios los Bendiga siempre!

## **DEDICATORIA**

**A mis padres**

**JESUS Y ADELIA**

Por confiar en mí por todo su amor, cariño y comprensión por apoyarme para cumplir una meta más en la vida y darme siempre la libertad para lograr mis sueños.

**A mis hermanos**

**Omar, Julio y Julieta**

No hay otro amor como el amor a un hermano.

**A mi sobrino y cuñada**

**Darío y Lizeth**

Eres un rayo de sol, que llegó para demostrarme que se puede ser feliz con las cosas más sencillas. Gracias por la felicidad DARÍO y Gracias a ti Liz.

Dios, cada vez que me caí, cada vez que me sentí atrapada, siempre me mostraste la luz que me guiara a la salida. Un "gracias" no basta para mostrarte mi gratitud. Gracias por ser mi padre y no abandonarme.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
Objetivos específicos.....	3
HIPOTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Origen del Cultivo de Tomate e Importancia.....	4
Cultivo de Tomate en México.....	4
<i>Fusarium oxysporum</i> .....	5
Clasificación de <i>F. oxysporum</i> .....	5
Importancia de <i>F. oxysporum</i> en el cultivo de tomate.....	6
Sintomatología de <i>F. oxysporum</i> .....	6
Medidas de Control empleadas para el control de <i>F. oxysporum</i> en el Cultivo de Tomate. ....	7
Control químico.....	7
Control biológico.....	8
<i>Botryodiplodia theobromae</i> .....	8
Clasificación taxonómica <i>Botryodiplodia theobromae</i> .....	9
Fitohormonas de origen natural. ....	10
Ácido indolacético. ....	11
Ácido jasmónico.....	11

Nanotecnología.....	12
Nanotecnología en la agricultura. ....	13
Polímeros biodegradables.....	14
Alginato.....	14
Quitosano.....	15
Nanoencapsulación.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Proceso de Fermentación de <i>B. theobromae</i> Para la Producción de Fitohormonas.....	17
Obtención de la cepa de <i>B. theobromae</i> . ....	17
Producción de fitohormonas mediante fermentación líquida.....	17
Identificación de las fitohormonas. ....	17
Cuantificación de las fitohormonas.....	17
Medición de ácido indolacético producido por la cepa de <i>B. theobromae</i> . ....	18
Producción de nanopartículas por gelación iónica.....	18
Caracterización de las Nanopartículas .....	19
Tamaño y dispersión dinámica de la luz.....	19
Potencial Zeta.....	19
Estabilidad química de los polímeros (pH).....	19
Peso .....	19
Estudio de la eficiencia de encapsulación.....	20
Evaluación de la Actividad Biológica de Np's contra <i>F. oxysporum</i> .....	20
Establecimiento del experimento .....	20
Material vegetativo .....	20
Diseño experimental.....	20
Inoculación y trasplante .....	21
Aplicación de tratamientos.....	21
Variables evaluadas.....	22
Incidencia y Severidad.....	22
Altura de planta.....	22
Diámetro de tallo.....	23

Clorofila en hojas y numero de hojas.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Hormonas Identificadas Procedentes de Fermentación Liquida de <i>B. throbromae</i> ..	24
Cuantificación de ácido indolacético producido por la cepa de <i>B. theobromae</i> .....	24
Caracterización de Nanoparticulas.....	25
Tamaño y dispersión dinámica de luz de Np' (DLS) .....	25
Potencial Zeta.....	26
Estabilidad química de los polímeros (pH) .....	27
Eficiencia de encapsulación.....	27
Efectividad Biológica de Nano encapsulados contra <i>F. oxysporum</i> en Plantas de	
Tomate.....	27
Incidencia y Severidad.....	27
Altura de planta.....	28
Diámetro de tallo.....	29
Numero de hojas.....	31
Clorofila en hojas.....	32
CONCLUSIÓN.....	33
REFERENCIAS.....	31
Anexos.....	40

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos empleados para determinar la efectividad biológica contra <i>F. oxysporum</i> bajo concentraciones controladas.....	21
Cuadro 2. Valores obtenidos del tamaño de partícula, potencial Z y DLS, de Np's formadas por ALG/QS, ALG/QS/AIA, ALG/QS/AJ y ALG/QS/CALDO. ....	25
Cuadro 3. Efectos de los diferentes tratamientos en plantas de tomate a los 45 días después de la primera aplicación. ....	29



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de quitosano y alginato de sodio. ....	15
Figura 2. Detección de fitohormonas ácido jasmónico y ácido indolacético presentes en el caldo con respecto al estándar. ....	24
Figura 3. Análisis de tamaño de partícula utilizando las técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS). Las muestras fueron analizadas por triplicado. (A. Np`s sin carga, B. Np`s cargadas AIA, C. Np`s cargadas con caldo microbiano, D. Np`s cargadas con AJ). ....	26
Figura 4. Altura de plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> , tratadas con hormonas nano encapsuladas y sin encapsular.....	29
Figura 5. Diámetro de tallo de las plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> , tratadas con hormonas nano encapsuladas y sin encapsular.....	30
Figura 6. Numero de hojas de las plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> , tratadas con hormonas nano encapsuladas y sin encapsular. ....	31
Figura 7. Clorofila en hojas de las plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> , tratadas con hormonas nano encapsuladas y sin encapsular. ....	32

## RESUMEN

PRODUCCIÓN Y NANOENCAPSULACION DE FITOHORMONAS E  
INDUCTORES DE RESISTENCIA DE *Botryodiplodia theobromae* PARA EL  
CONTROL DE *Fusarium oxysporum* EN TOMATE.

Por

MARÍA DEL CARMEN NELY ANDRADE AYALA

MAESTRO EN CIENCIA EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA  
JULIO 2019

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO –ASESOR-

**Palabras Clave:** *Fusarium oxysporum*, Fitohormonas, Nanoencapsulacion, Biopolímeros, *Botryodiplodia theobromae*.

*F. oxysporum* es un hongo Fitopatógeno que ocasiona pérdidas en la producción de tomate, para controlarlo se emplean productos químicos, los que afectan el medio ambiente y causan problemas de resistencia. Se ha encontrado que el uso de microorganismos y su metabolismo ayudan a minimizar el uso de productos químicos, tal es el caso de *Botryodiplodia*

*theobromae* el cual ha demostrado que es capaz de producir fitohormonas mediante su metabolismo las cuales se ha comprobado que incrementan los mecanismo de defensa y resistencia de las plantas, sin embargo estas fitohormonas se pierden rápidamente al ponerse en contacto con factores ambientales como son luz solar, humedad y temperatura; por esta razón es que se han buscado alternativas para su aplicación. Una de estas alternativas es la encapsulación mediante el uso de materiales biopoliméricos que tengan la capacidad de recubrir y mantener estable la fitohormona y al mismo tiempo permitir aumentar la efectividad del producto. En el siguiente trabajo se evaluó la capacidad productora de fitohormonas procedentes del caldo microbiano (CALDO) por fermentación líquida de *Botryodiplodia theobromae*, así como la encapsulación y aplicación en plantas de tomate. Se evaluó la eficiencia de encapsulación (EE) de las fitohormonas procedentes del caldo microbiano en nanoparticulas (Np's) de alginato/quitosan (ALG/QS): se caracterizaron las Np's y se evaluó su efectividad biológica en plantas de tomate. Los resultados demostraron que se tuvo una EE de 90 %, así como diversos tamaños de partícula. En relación a la actividad biológica en plantas de tomate se observó que las Np's cargadas con caldo microbiano otorgaron mayor altura y mayor número de hojas en relación al testigo absoluto, en cuanto a las Np's de AIA reactivo indujeron mayor producción de clorofila a las plantas. Los sistemas desarrollados mostraron un buen potencial, proporcionando una mayor estabilidad y eficiencia de esta hormona vegetal en aplicaciones agrícolas.

## ABSTRACT

PRODUCTION AND NANOENCAPSULATION OF PHYTOHORMONES AND RESISTANCE INDUCERS FROM *Botryodiplodia theobromae* FOR THE CONTROL OF *Fusarium oxysporum* IN TOMATO.

By

MARÍA DEL CARMEN NELY ANDRADE AYALA

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA  
JULIO 2019

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO –ADVISOR–

**Keywords:** *Fusarium oxysporum*, Phytohormones, Nanoencapsulation, Biopolymers, *Botryodiplodia theobromae*.

*F. oxysporum* is a phytopathogenic fungus that causes losses in tomato production, to control it are used chemicals, which affect the environment and cause resistance problems. It has been found that the use of microorganisms

and their metabolism help to minimize the use of chemical products, such is the case of *Botryodiplodia theobromae* which has shown that it is capable of producing phytohormones through its metabolism which has been proven to increase the mechanism of defense and resistance of the plants, however these phytohormones are lost quickly when coming into contact with environmental factors such as sunlight, humidity and temperature; for this reason, alternatives have been sought for its application. One of these alternatives is encapsulation through the use of biopolymer materials that have the ability to coat and keep the phytohormone stable and at the same time allow increasing the effectiveness of the product. In the following work, the production capacity of phytohormones from the microbial broth (CALDO) was evaluated by liquid fermentation of *Botryodiplodia theobromae*, as well as the encapsulation and application in tomato plants. The encapsulation efficiency (EE) of the phytohormones from the microbial broth in nanoparticles (Np's) of alginate / chitosan (ALG / QS) was evaluated: the Np's were characterized and their biological effectiveness was evaluated in tomato plants. The results showed that there was an EE of 90%, as well as different particle sizes. In relation to the biological activity in tomato plants, it was observed that the Np's loaded with microbial broth granted greater height and greater number of leaves in relation to the absolute control, as for the Np's of reactive IAA induced greater production of chlorophyll at the plants. The developed systems showed good potential, providing greater stability and efficiency of this plant hormone in agricultural applications.

## INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las principales hortalizas cultivadas tanto a nivel mundial como a nivel nacional, con una producción nacional de hasta 2, 875, 164 Toneladas (SIAP, 2018). Es una hortaliza que se cultiva en más de 100 países para consumo fresco e industrial; el 76% de la producción, se concentra en China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, España, Brasil y México (FAOSTAT, 2018). Este cultivo es atacado por numerosas enfermedades fungosas, entre las cuales se encuentra la marchites vascular provocada por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. (Vásquez y Castaño 2017), este patógeno es responsable de pérdidas en rendimientos de hasta un 90%, viéndose afectada también la calidad del producto (González *et al.*, 2012).

El control químico es el más utilizado para disminuir las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad sin embargo, su uso inadecuado ha ocasionado problemas ambientales y de inducción de resistencia en el hongo. El uso de variedades resistentes reduce la incidencia de la enfermedad; no obstante la emergencia de nuevas razas del hongo y de nuevos biotipos dentro de las razas, supera su resistencia, llevando a la búsqueda de nuevas estrategias (Horinouchi *et al.* 2011). Para reducir este problema, existe la necesidad de buscar y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos, animales y el medio ambiente (Naeini *et al.*, 2010). Debido a las problemáticas señaladas anteriormente, se han buscado alternativas que ayuden a minimizar el daño que ocasiona el uso indebido de estos productos. Estudios realizados por Castillo (2004) han demostrado que existen microorganismos capaces de producir fitohormonas como parte de su metabolismo, como son las producidas por el hongo *Botryodiplodia theobromae* (Andolfi *et al.*, 2014). Dentro de estas fitohormonas se encuentra el ácido jasmónico y ácido indolacético los cuales al ser aplicados exógenamente pueden ser eficientes para incrementar el crecimiento y desarrollo de las plantas así como incrementar los mecanismo de defensa y resistencia de las

(Rohwer & Erwin, 2010). La desventaja de las fitohormonas es que pueden perder su eficiencia debido a factores ambientales como la degradación oxidativa, humedad, luz UV, temperatura y lixiviación de compuestos por lluvias (Armendáriz *et al.*, 2016; Bakry *et al.*, 2016). Debido a esta problemática, resulta conveniente explorar e investigar nuevas tecnologías con el fin de desarrollar alternativas en cuanto a la aplicación de fitohormonas; una de estas es el uso de la nanotecnología (Agrawal & Rathore, 2014; Lugo *et al.*, 2010, Kah *et al.*, 2014, Campos *et al.*, 2014), que eficientiza la aplicación de dosis al aplicar cantidad correcta de nutrientes y pesticidas, puede disminuir la cantidad de ingrediente activo, así como garantizar menos impacto del medio ambiente (Nuruzzaman, *et al.*, 2016).

La nanotecnología proporciona materiales a nano escala, obteniendo nano partículas con mayor reactividad química y más bioactivas dentro de la planta, tienen mejor acceso a cualquier cuerpo pudiendo entrar a tejidos y órganos específicos, así como un mayor tiempo de durabilidad dentro de la planta al tiempo que mejora la absorción de nutrientes; obteniendo así mejor calidad y rendimiento de los productos agrícolas y al mismo tiempo reducir los impactos ambientales (Lugo *et al.*, 2010, Kah *et al.*, 2014, Campos *et al.*, 2014). Dentro de la nano tecnología se tiene la producción de nano partículas (Np's) la cual puede llevarse a cabo mediante el uso de un material que pueda encapsular y liberar de forma controlada el ingrediente activo. El uso de materiales poliméricos que tengan la capacidad de prolongar el tiempo de liberación puede aumentar la efectividad del producto (Saha y Ray, 2013; Bakry *et al.*, 2016). Existen diversos métodos para la producción de Np's entre los que destacan la nano precipitación, spray de secado, pre gelación iónica, coacervación y extrusión, siendo todas efectivas para la encapsulación de compuestos, pero difiriendo en costos y tiempos en cuanto a proceso de producción. El método de pre relación iónica resulta sumamente atractivo debido al uso de biopolímeros pueden adquirirse de forma natural (Nedovic *et al.*, 2011; Armendariz *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2016).

## OBJETIVO GENERAL

Obtener un producto micro y nanoencapsulado de fitohormonas utilizando un sistema de fermentación líquida producido por *Botryodiplodia theobromae* para el control de *F. oxysporum* en tomate.

## Objetivos específicos

- Producir fitohormonas procedentes de una fermentación líquida por *Botryodiplodia theobromae*
- Identificar y cuantificar las fitohormonas procedentes del caldo.
- Micro y nanoencapsulación de las fitohormonas procedentes del caldo microbiano, utilizando biopolímeros de fácil degradación.
- Evaluar la actividad biológica del producto micro y nano encapsulado contra *Fusarium oxysporum* en condiciones de invernadero.

## HIPÓTESIS

Se obtendrá al menos un producto micro o nano encapsulado, a partir de fitohormonas procedentes de un caldo microbiano de *Botryodiplodia theobromae* para el control de *F. oxysporum*.



## REVISION DE LITERATURA

### Origen del Cultivo de Tomate e Importancia

El origen del de tomate (*Solanum lycopersicum*) se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile. Probablemente desde allí fue llevado a Centroamérica y México donde se llevó a cabo su domesticación. La planta posee un porte erecto o semierecto, arbustivo, cultivo de tipo anual. Existen variedades de crecimiento limitado y otras de crecimiento ilimitado. El fruto es una baya ovalada, redonda o periforme. Su tamaño va desde pequeños frutos del tamaño de una cereza, hasta enormes frutos de 750 g. (SAGARPA, 2010). El tomate es una de las principales hortalizas cultivadas en el mundo por su alto valor económico. A nivel mundial el tomate es el cuarto vegetal más cultivado con una superficie de más de 3 millones de hectáreas, solo por detrás del arroz, trigo y soya (FAOSTAT, 2018).

### Cultivo de Tomate en México

El cultivo del tomate es el quinto en importancia por su contribución en el valor de la producción agrícola primaria en México. En el año 2016 participó con 4.6 por ciento del valor total, después del grano de maíz, la caña de azúcar, el aguacate y el chile verde. De acuerdo con el SIAP (2019), la producción de tomate rojo en México creció a una tasa promedio anual de 4.8 por ciento entre 2006 y 2016, para ubicarse en un volumen máximo histórico de 3.3 millones de toneladas (FIRA 2017).

La calidad del tomate producido en México ha mejorado notablemente, y esto se ha visto reflejado en el aumento de las exportaciones a otros países; entre los principales países a los que se exporta el tomate se encuentran Estados Unidos, Canadá y la Unión Europea (INEGI, 2017). El mayor productor de tomate en México es el estado de Sinaloa con una superficie sembrada de 15,307 hectáreas, a este le siguen los estados de San Luis, Michoacán, Jalisco y Zacatecas (SIAP, 2019). El tomate ocupa el primer lugar en exportación de

productos agrícolas, desde hace 20 años, sin embargo, entre los factores que inciden negativamente en la productividad del cultivo resaltan las enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus (Ramírez y Sainz, 2006). Dentro de los hongos que afectan al cultivo de tomate destacan los géneros de *Alternaria*, *Phytophthora infestans*, *Rizhoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.

### ***Fusarium oxysporum***

*F. oxysporum* es una de las especies que mayor daño económico ocasiona entre los patógenos de plantas, tiene la capacidad de atacar un gran número de plantas de importancia agrícola y ocasiona principalmente marchitamientos vasculares, seguidos de la muerte de su hospedero (Nelson, 1981). El hongo se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido y presenta tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas.

Las microconidias son esporas unicelulares, sin septas, hialinas, de elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas. Las macroconidias, son esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con varias células y de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y la célula basal atenuada. Las clamidosporas son esporas formadas a partir de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias y se caracterizan por poseer paredes bastante gruesas, lo que las hace resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de plantas hospedantes. Las clamidosporas se forman simples o en pares, son terminales o intercalares y son las principales responsables de la sobrevivencia del hongo en tejidos muertos de plantas hospedantes o en el suelo (Nelson, 1981).

### **Clasificación de *F. oxysporum***

La especie *F. oxysporum* pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hipocreales y Familia Nectriaceae. Entre los hongos filamentosos, el género *Fusarium* es uno de los más importantes, fue descrito por primera vez por Link en 1809 (Leslie *et al.*, 2001).

Las formas especiales son cepas morfológicamente indistinguibles que se caracterizan por su adaptación a diferentes hospedantes (Deighton *et al.*, 1962).

La nomenclatura utilizada para designar a las formas especiales, es un trinomio en latín, con el nombre de las especies, seguido de una referencia al huésped al que parasitan, lo que ha llevado a muchos investigadores a pensar que representan un grupo monofilético natural, datos recientes demuestran que dentro de algunas formas especiales de *F. oxysporum* existen aislamientos de orígenes independientes. Por lo tanto, la asociación de determinadas cepas con un hospedante no implica necesariamente una divergencia de carácter monofilético (Kistler, 2001).

### **Importancia de *F. oxysporum* en el cultivo de tomate**

*F. oxysporum* ocasiona, la enfermedad conocida como marchitez vascular y ha sido considerada como una de las enfermedades más devastadoras en todas las regiones donde se cultiva el tomate (Marlatt *et al.*, 1996), el hongo afecta directamente al sistema vascular de la planta, evitando el paso de nutrientes esenciales para un buen desarrollo del cultivo.

La marchitez vascular es una enfermedad que puede ocasionar pérdidas en la producción y el rendimiento del cultivo de tomate que van desde 60% hasta 100% (Hernández, *et al.*, 2014; González *et al.*, 2012).

### **Sintomatología de *F. oxysporum***

Los daños que ocasiona la marchitez vascular se presentan principalmente cuando se tiene estrés hídrico, principalmente en la etapa de floración y fructificación; el primer síntoma que se observaba sobre las plantas es el amarillamiento de las hojas más antiguas, extendiéndose a toda la planta, ocasionando una clorosis que en ocasiones se presenta un solo lado (Ramírez, 1998).

Otro síntoma característico es el color marrón oscuro de los vasos que se observaba al cortar transversalmente el tallo, esta necrosis se extiende hacia la

parte apical de la planta de acuerdo con la severidad de la enfermedad, marchitando y matando a la planta. Las plantas más viejas pueden marchitarse y morir repentinamente, sin embargo; muestran achaparramiento, epinastia, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitez en las hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis de hojas y finalmente la muerte de la planta (Sanchez, 1998).

Los síntomas que presentan las raíces y tallos cuando son colonizados por esta enfermedad se muestran como una pudrición necrótica, se localiza particularmente sobre las raíces laterales más pequeñas; esto acelera el marchitamiento del follaje. Cuando la planta muere, el hongo que se encuentra sobre la superficie del tallo fructifica cuando se encuentra un ambiente húmedo (Valdez, 1999).

### **Medidas de Control empleadas para el control de *Fusarium oxysporum* en el Cultivo de Tomate.**

#### **Control químico**

El control químico se define como el uso de sustancias químicas sintéticas, con acción biosida, las cuales tienen el objetivo de eliminar o inhibir los patógenos que afectan a cultivos. Debido a la facilidad de uso, el control químico ha sido por muchos años el más utilizado para el control de fitopatógenos sin embargo, el abuso y uso excesivo de estas sustancias ha ocasionado que los microorganismos desarrollen resistencia a los ingredientes activos, además de afectar el medio ambiente y la salud humana (Jaramillo, 2007).

El uso indebido de los agroquímicos afecta y tiene un impacto ambiental considerable, ya que puede dañar organismos beneficiosos para el cultivo; así como la atmósfera, el suelo y cuerpos de agua. Se estima que el bromuro de metilo, el cual es usado como fumigante de suelos en la agricultura, es responsable del 5-10% del adelgazamiento de la capa de ozono (Ramírez y Jacobo 2002); de igual forma los fungicidas químicos tienden a tener una residualidad en los alimentos, actualmente son cada vez mayores los

lineamientos de orden higiénico-sanitarias que se plantean, ya que los fungicidas se presentan como potenciales agentes cancerígenos cuando son aplicados a los cultivos.

### **Control biológico**

Se define como el uso de organismos vivos o compuestos que sintetizan estos para control de plagas como insectos, bacterias, hongos o malezas. Este tipo de control tiene ventajas como: la especificidad en su actuación, respeto al medio ambiente, menor afectación a la salud humana, además de que los patógenos tienden a desarrollar menor resistencia (Fernández y Juncosa, 2002). Dentro del marco de la agricultura orgánica los investigadores se han enfocado en la búsqueda de nuevos compuestos para el control de enfermedades cuya actividad sea segura y adecuada para el medio ambiente (Bautista *et al.*, 2004; Boyraz y Ozcan, 2006; Hernandez *et al.*, 2007 e Igbinosa *et al.*, 2009).

Dentro del control biológico, como una alternativa a los productos químicos para el control de hongos fitopatógenos, se encuentra el uso de microorganismos, los mecanismos que estos presentan tienen que ver con su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), los cuales afectan directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o propiciando que otros microorganismos benéficos actúen de mejor manera sobre las plantas (Bashan y Holguin, 1998). Dentro de los microorganismos que producen fitohormonas en su metabolismo se encuentra *Botryodiplodia theobromae* hongo capaz de producir fitohormonas en un sistema de fermentación líquida (Laredo *et al.*, 2017).

### ***Botryodiplodia theobromae***

*B. theobromae* es un hongo fitopatógeno cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas,

especialmente zonas tropicales y subtropicales que causa la putrefacción de una amplia gama de plantas y frutas (Goos *et al.*, 1961; Verma y Singh, 1969; Peterson, 1976; Gabr *et al.*, 1990, Yaguchi y Nakamura, 1992; Husain y *et al.*, 1993). Es un hongo pleomórfico y ubicuo, por lo cual ha tenido más de un sinónimo (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

**Clasificación taxonómica de *B. theobromae*** (Schoch *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2013)

Phylum: *Ascomycota*

Clase: *Dothideomycetes*

Orden: *Botryosphaeriales*

Familia: *Botryosphaeriaceae*

Presenta un estado sexual (teleomorfo) poco común en el género *Botryosphaeria rhodina*, sin embargo no existen descripciones recientes de su estado sexual, por lo cual se ha reportado que éste tiende a desaparecer (Phillips *et al.*, 2008).

Las colonias de *B. theobromae* cultivadas en medios ricos en glucosa-peptona o dextrosa-papa forman colonias abundantes de color verdinegro. Producen conidias de tamaño de 22-33µm de largo X 13-15 µ de ancho, con características longitudinales, sin embargo las cepas aisladas varían considerablemente en cuanto a las características de crecimiento y esporulación. Muchas de las cepas esporulan lentamente en los cultivos, y algunas producen pocas esporas aún en cultivos viejos. Algunas de las cepas forman picnidios simples, mientras que otras los forman en estromas (Goos *et al.*, 1961).

*B. theobromae* posee una gran capacidad para utilizar los carbohidratos como única fuente de carbono y energía, pues crece rápidamente en presencia de altas concentraciones de almidón y sacarosa. Esto unido a su gran capacidad

de penetración en tejidos vegetales, explica la rapidez con que es capaz de multiplicarse en los frutos y plantas (Wardlaw, 1932).

Actualmente *B. theobromae* es uno de los microorganismos más estudiados para la producción de fitohormonas; se ha comprobado que es capaz de producir fitohormonas de origen natural como ácido jasmónico y ácido indolacético dentro de su metabolismo (Andolfi *et al.*, 2014).

### **Fitohormonas de origen natural.**

Una hormona vegetal es un compuesto orgánico que se sintetiza en alguna parte de una planta y que se transloca a otra parte, en donde a concentraciones bajas causan una respuesta fisiológica. Se conocen alrededor de 400 reguladores de crecimiento vegetal; de estos se reporta que el 75 % son de origen microbiano y el resto se obtiene por vía química o son producidos por plantas (Gross y Parthier, 1994). De acuerdo con la estructura y función fisiológica, las hormonas han sido clasificadas en varios grupos que comprenden a las auxinas, citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA), brasinosteroides, poliaminas (Kamiya, 2010).

Las aplicaciones prácticas de las fitohormonas son diversas y su uso en la agricultura ha ido aumento. Debido a que existe un gran interés en desarrollar una agricultura sostenible que sustituya la utilización masiva de plaguicidas, fertilizantes y reguladores del crecimiento sintéticos por productos naturales, la síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica sostenible ya que la aplicación de caldos de fermentación que contengan estos productos reduce el impacto medioambiental y su obtención a escala industrial resulta económicamente atractiva. La eficacia de las fitohormonas de origen biológico se ha comprobado en diversos estudios en los que se ha demostrado que su aplicación produce un aumento en los rendimientos y en la calidad de las cosechas (Frankenberger y Arshad, 1995).

### **Ácido indolacético.**

Estas hormonas son un grupo de compuestos que estimulan la elongación de la planta. El ácido indolacético (AIA) es una auxina que realiza la acción directa sobre la elongación y es la forma predominante, sin embargo, existe evidencia reciente que sugiere la existencia de otras auxinas indolíticas naturales en las plantas. Su función principal radica en determinar el crecimiento de la planta y favorecer la maduración del fruto. Las auxinas se sintetizan principalmente en el tallo, en las yemas, las ramas jóvenes y en general, en los meristemas a partir del aminoácido triptófano. Ayudan a que los tallos débiles se desarrollen y que formen raíces adicionales de soporte para completar el sistema radicular (Salisbury, 1994; Sommers *et al.*, 2005).

El ácido indolacético (AIA) es una auxina natural presente en la mayoría de las plantas, por lo que su aplicación en la agricultura es muy frecuente. Frente a la actual utilización de auxinas obtenidas por síntesis química, la síntesis microbiológica de estas sustancias resulta de gran importancia ya que la aplicación de caldos de fermentación que contienen auxinas, puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica (Castillo *et al.*, 2005).

El ácido indolacético es la auxina más activa, se le considera con fórmula molecular  $C_{10}H_9NO_2$  y masa molecular 175.19 Da. El AIA estimula el crecimiento vegetal, observándose sobre el crecimiento de biomasa, altura de los tallos, crecimiento del vástago principal y reduce el crecimiento de ramas laterales (Koshiha, 1993).

### **Ácido jasmónico.**

Este ácido se aisló por primera vez en el año de 1971 a partir de sobrenadantes de cultivo del hongo *Lasiodiplodia theobromae* y fue identificado como un potente inhibidor del crecimiento y senescencia de las plantas (Aldridge *et al.*, 1971). A partir del año de 1980 se demostraron otros efectos del ácido jasmónico (AJ), como el incremento de rendimientos en el cultivo de fresa, soya



y caña de azúcar; estimulación de la formación de tubérculos (Koda *et al*, 1991); maduración de frutos en tomates y manzanas (Sembdner and Parthier, 1993) y un especial papel en los mecanismos de defensa de las plantas (Kitahara *et al*, 1991).

Las fitohormonas pueden degradarse fácilmente cuando se exponen a factores ambientales como la luz y la temperatura, dando como resultado una pérdida de actividad, en este contexto se han buscado alternativas que eviten la pérdida de ingrediente activo, la nanotecnología resulta ser una tecnología de gran ayuda en la agricultura ya que proporciona materiales a nanoescala los cuales mejoran la estabilidad y la actividad de agentes activos, mientras que al mismo tiempo reducen los impactos ambientales. (Campos *et al.*, Hofmann 2013).

La encapsulación de agroquímicos puede ayudar a mejorar sus propiedades fisicoquímicas y reducir problemas tales como la lixiviación y aumentar la biodisponibilidad y eficiencia del producto, al mismo tiempo reducir las concentraciones requeridas y hace a los productos más seguros a el medio ambiente. Los sistemas en los que se emplea quitosan como encapsulante tienen amplias aplicaciones en la protección de cultivos (Sarmiento *et.*, al).

### **Nanotecnología**

La nanotecnología juega un papel importante a nivel mundial en investigación, desarrollo científico e industrial. Se trata de una tecnología multidisciplinaria que incluye la física, la química, la biología, la ingeniería, la medicina, electrónica, la agricultura entre otras disciplinas (Prasad, *et al.*, 2014). El término nanotecnología se refiere a una amplia área de la actividad tecnológica enfocada en la ingeniería y la manipulación de objetos a nanoescala de hasta 100 nm, es considerada como una tecnología emergente; se orienta a la caracterización, elaboración y aplicación de materiales de dimensiones muy pequeñas en el rango de 1 a 100 nm (Yadollahi, *et al.*, 2009). Un ejemplo del uso de la nanotecnología en la industria son las nanoparticulas de alginato y quitosan (ALG/QS) y quitosan y tripolifosfato (QS/TPP) como portadores de

fármacos y productos agroquímicos pueden prolongar la durabilidad y acción del producto químico activo y mejorar su estabilidad (Tripathy *et al.*, 2012) (Sarmiento *et al.*, 2006).

### **Nanotecnología en la agricultura.**

Actualmente la agricultura enfrenta varios problemas entre los que destacan: bajo rendimiento de los cultivos, baja eficiencia en el uso de nutrientes, el cambio climático y la disminución de la superficie agrícola (Dubey y Mailapalli, 2016).

Las nanopartículas ofrecen grandes ventajas como encapsulantes de ingredientes activos, teniendo mayor capacidad de aplicación dirigida, conservación del medio ambiente (aplicación reducida), mayor biodisponibilidad para alcanzar plagas específicas, menor riesgo para seres humanos y medio ambiente (Beane, *et al.*, 2005; Petrelli, *et al.*, 2000; Van Balen, *et al.*, 2006).

De acuerdo a esto, se han buscado y desarrollado nuevos nano materiales basados en el uso de nano partículas metálicas, inorgánicas y poliméricas que pueden aumentar la productividad y aplicarse en nano sistemas inteligentes para la captura e inmovilización de nutrientes y su gradual liberación en el suelo (Kottegoda, *et al.*, 2011). Es precisamente el objetivo de la nanotecnología aplicada a la agricultura el formular productos con ingredientes activos de tamaño nanométrico, lo cual hace que sean más eficientes y de fácil disponibilidad, además de minimizar las pérdidas al aplicar el producto y reducir el impacto al medio ambiente mediante el uso de biopolímeros.

La nanotecnología ofrece grandes oportunidades para la obtención de productos y aplicaciones innovadoras en el sector agroalimentario. Estas aplicaciones se están estudiando y desarrollando e incluso utilizando en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos desde la agricultura, el procesamiento y el embalaje de alimentos (Berekaa 2015).

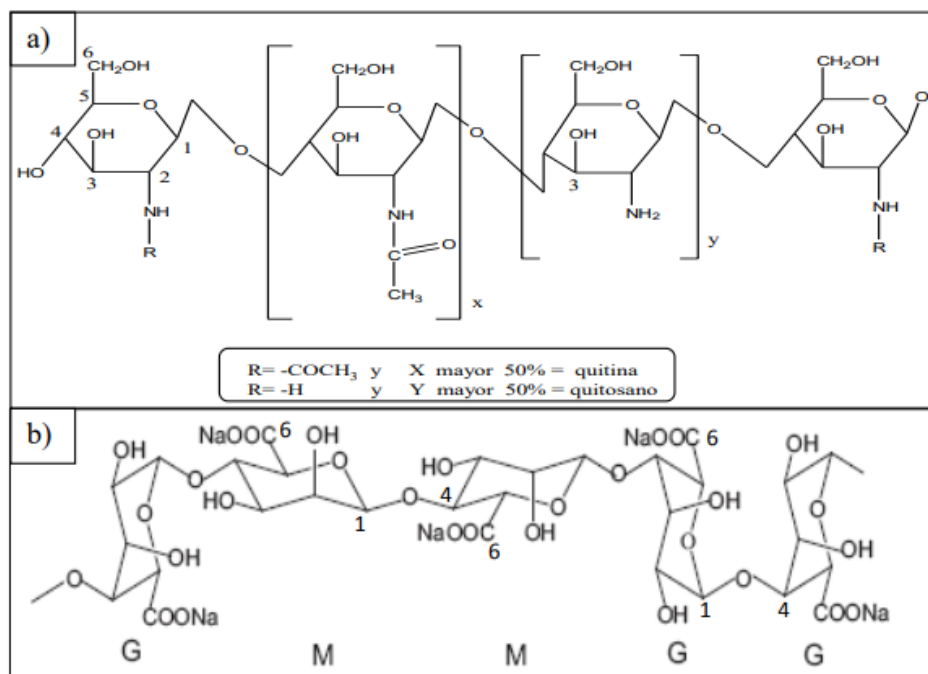
## **Polímeros biodegradables**

Los polímeros son macromoléculas formadas por cientos o miles de unidades básicas funcionales denominadas monómeros. Los polímeros pueden ser de naturaleza sintética, artificial y/o natural; los biopolímeros, provenientes directamente del reino animal o vegetal, presentan variadas propiedades y usos, destacándose en el sector farmacéutico, alimenticio, textil y agrícola (Cabané *et al.*, 2011).

Los biopolímeros pueden crear estructuras nuevas y sistemas de liberación por encapsulación para proteger y liberar ingredientes bioactivos o funcionales tales como lípidos, sabores, péptidos, proteínas, enzimas, fibra dietaria, minerales y vitaminas e incluso fármacos usados en la industria y sus diferentes áreas de aplicación (Takhistov *et al.* 2006, Salminen y Weiss 2014). Los biopolímeros como alginato y quitosano resultan ser encapsulantes no tóxicos.

### **Quitosano**

El quitosano es un biopolímero catiónico lineal (Figura 1) que se obtiene por la desacetilación parcial de la quitina mediante hidrólisis alcalina a altas temperaturas. Es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina, segundo biopolímero en abundancia después de la celulosa a nivel mundial, es un polisacárido estructural del exoesqueleto de los crustáceos, presente también en insectos, hongos, levaduras y moluscos. El quitosano posee un número variado de aplicaciones en diversas áreas, dada su alta biocompatibilidad y baja toxicidad (Mena *et al.*, 2013, Fernández *et al.*, 2012, Alburquerque *et al.*, 2010, Sáenz *et al.*, 2009, Neira *et al.*, 2008, Gómez *et al.*, 2006, Neira *et al.*, 2005). Algunas de las propiedades funcionales del quitosano, tales como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, capacidad hemostática, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante han promovido su utilización en varios campos distintos, como son agricultura, la industria y la medicina (Salazar y Valderrama 2013).



**Figura 1. Estructura química de a) quitosano y b) alginato de sodio. (Neira-Carrillo *et al.*, 2013).**

### Alginato

El alginato es un biopolímero formado por ácido D-mannurónico y ácido L-gulurónico unidos por enlace 1-4 (Figura 1). Es abundante en la naturaleza y se puede encontrar como componente estructural de las algas marinas pardas y como polisacárido estructural de bacterias (Draget, 2009). El alginato comercializado se extrae de algas pardas como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea antarctica* y *Sargassum spp.* (Lee, 2012).

La importancia de los alginatos viene dada por su capacidad para formar hidrocoloides, es decir la capacidad de hidratarse en agua caliente o fría dando lugar a soluciones muy viscosas, dispersiones o geles; son muy útiles como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadoras de películas. Una de las principales características del alginato es su naturaleza aniónica, es decir,

presenta numerosos grupos químicos cargados negativamente, los cuales le permiten formar geles en presencia de cationes divalentes como: calcio, bario y estroncio (Egaña 2013).

### **Nanoencapsulación**

Se define a la nanoencapsulación como la tecnología de empaquetamiento de nanopartículas de sólido, líquido o gas, también conocido como núcleo o activo, dentro de un material secundario, denominado matriz o cubierta, para formar nanocapsulas/nanopartículas. El núcleo tiene el ingrediente activo (medicamentos, perfumes, vitaminas agroquímicos etc.,).

Las aplicaciones más comunes de la nanoencapsulación son: alimentos (encapsulando aromatizantes, edulcorantes, lípidos, vitaminas y minerales), Farmacia (proteínas, antibióticos, fármacos, enzimas), textil (tintes, suavizantes de telas, retardantes de llama), pinturas (pigmentos, agentes antiincrustantes, agentes anticorrosivos), cuidado personal (ingredientes naturales, aceites esenciales, retinol) y agricultura (insecticidas (endosulfán), herbicidas (fenamifos), feromonas, fertilizantes, pesticidas, microbicidas) (Cano y Maspocho 2015). Las técnicas de micro-nanoencapsulación se pueden dividir en tres grupos: Procesos físicos: secado por aspersión, procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular, procesos fisicoquímicos: coacervación, liposomas y gelificación iónica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Proceso de Fermentación de *B. theobromae* Para la Producción de Fitohormonas.

#### Obtención de la cepa de *B. theobromae*.

La cepa de *B. theobromae* se obtuvo a partir de la colección microbiológica del laboratorio de Micología y Biotecnología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. La cepa se aisló a partir de frutos de cacao procedente de la zona sureste de México (Laredo et al. 2017). La conservación, incremento y desarrollo del microorganismo se realizó utilizando el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA).

#### Producción de fitohormonas mediante fermentación líquida.

La fermentación para obtener las fitohormonas AIA y AJ se realizó utilizando la metodología propuesta por Michelena (2001). Se usaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de medio Miersh (Sacarosa 50 g/L,  $\text{KNO}_3$  3 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L; KCl 0.1 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L;  $\text{MnSO}_4$  0.001 g/L;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 g/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.001 g/L y extracto de levadura 0.1 g/L modificado). Los matraces con el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión durante 15 min y se inocularon con tres porciones de micelio con medio de cultivo de 5 mm de diámetro de la cepa de *B. theobromae* y se incubaron en completa oscuridad por 15 días a temperatura constante de 28 °C sin agitación ni aireación (Eng et al., 1998).

#### Identificación de las Fitohormonas

La identificación de las fitohormonas presentes en el caldo de fermentación se realizó por medio de cromatografía en capa fina (TLC), para la fase estacionaria se utilizaron placas de aluminio con gel de sílice 60 F254 Dathe, (1981).

#### Cuantificación de las fitohormonas.

Para la curva de calibración se utilizó AIA grado reactivo de la casa comercial Sigma Aldrich. La determinación y cuantificación de AIA y A.J. de la fermentación de *B. theobromae* se realizó inicialmente con una concentración

química del caldo microbiano, utilizando el sobrenadante del caldo al cual se le agregó un volumen igual de acetato de etilo como solvente. Posteriormente la concentración del líquido se llevó a secado absoluto utilizando un liofilizador, una vez que se obtuvo el material seco se suspendió en metanol y se realizó la cuantificación mediante la técnica de micro placa propuesta por Anguiano (2017). Para la curva de calibración se colocaron en la fila de una micro placa 100  $\mu\text{L}$  de disolvente (metanol), posteriormente en la primera línea se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución stock a 100 ppm. Para obtener un primer punto de 50 ppm, se mezcló y se transfirió 100  $\mu\text{L}$  a la segunda línea (25 ppm). Este procedimiento se siguió hasta la línea 11 que es la concentración 0. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  del revelador Salkowski a cada pocillo, se incuban durante 30 minutos y se leen a 520 nm. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado (Anguiano, 2017).

#### **Medición de ácido indolacético producida por la cepa de *B. theobromae*.**

La concentración de AIA que se obtuvo por medio de la fermentación líquida de *B. theobromae* se cuantificó en micro placa agregando 100  $\mu\text{l}$  del caldo y se mezcló con 100  $\mu\text{l}$  del reactivo Salkowski, se incubaron durante 30 min y la lectura se llevó a cabo a 520 nm. Las concentraciones de auxina en los sobrenadantes se calcularon utilizando la ecuación de la curva de calibración con la  $R^2$  más alta.

#### **Producción de Nanopartículas por Gelación Inotrópica.**

Para la producción de las Np's se utilizó el método de pregelación ionotrópica propuesto por Sarmiento (2006); para esto se agregaron 3.75 mL de solución de  $\text{CaCl}_2$  a 59 ml de solución de alginato de sodio (0.037 % pH 4,9) con una bomba peristáltica (Ismatec, EW-78000-03) bajo agitación constante y vigorosa; posteriormente con la misma bomba peristáltica se añadieron 12.5 mL de solución de quitosano (0.07 %, pH 4.6) a la solución de  $\text{CaCl}_2$  y alginato de sodio, y se mantuvo de nuevo en agitación constante y vigorosa durante 90 min.

Este procedimiento se realizó con la presencia de la hormona (AG/QS/AIA), con el caldo microbiano (AG/QS/CALDO) y sin la presencia de la hormona (AG/QS).

### **Caracterización de las Nanopartículas**

Las Np's con y sin la presencia de la hormona se caracterizaron en términos de tamaño, distribución y potencial zeta. Para las mediciones, las muestras se diluyeron a una concentración adecuada para el análisis. Las diluciones se realizaron con agua destilada.

#### **Tamaño y dispersión dinámica de la luz**

La distribución de tamaños de las nano partículas se determinaron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (NanoSight NS 300, Malvern) . Las muestras se analizaron por triplicado a 25 ° C, con la luz dispersa detectada en un ángulo de 90 °.

#### **Potencial zeta**

Los valores del potencial zeta (mV) se determinaron con análisis por triplicado, a 25 ° C, utilizando el equipo (ZETA- check, Colloid metrix).

#### **Estabilidad química de los polímeros (pH)**

Las mediciones de pH se usaron para evaluar la posible degradación de los componentes de las formulaciones, utilizando un potenciometro (ion meter 450, Corning) el cual se calibró previamente. Las muestras se evaluaron por triplicado, a 25 ° C.

#### **Peso**

Para la determinación del peso se centrifugaron las Np's al finalizar el proceso de encapsulación, posteriormente se liofilizaron para retirar el exceso de líquido y así lograr obtener las Np's secas, finalmente estas se pesaron en una balanza analítica.



### **Estudio de la eficiencia de encapsulación.**

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE) se centrifugo la solución con Np's a 10 °C y 14000 rpm por 15 min, posteriormente se tomó una muestra del sobrenadante y se liofilizo. Para determinar la concentración de la hormona en el sobrenadante; se realizó la lectura en un espectrofotómetro UV- vis a una longitud de onda de 520 nm, por triplicado. La eficiencia de encapsulación se evaluó mediante las formulas propuestas por Wohlfart *et al.* (2011):

$$EE\% = \frac{\text{Peso de AIA cargado en Np's}}{\text{Peso de AIA utilizado inicialmente}} \times 100$$

$$LC\% = \frac{\text{Peso de AIA en la formulación.}}{\text{Peso de AIA - NPs cargadas}} \times 100$$

### **Evaluación de la Actividad Biológica de Np's contra *F. oxysporum*.**

#### **Establecimiento del experimento**

El experimento se estableció en una cámara bioclimática ubicada dentro de la empresa Green Corps Biorganiks de México S.A. de C.V., al norte de la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, El experimento se realizó durante el ciclo otoño-invierno del 2018.

#### **Material vegetativo**

Se utilizaron plantas de tomate tipo Saladette variedad Rio Grande, estas fueron utilizadas 30 días después de la siembra y presentaban una altura de 10-15 cm al momento del trasplante.

#### **Diseño experimental**

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con nueve tratamientos y seis repeticiones. Los tratamientos utilizados fueron: nano partículas (Np's) sin cargar, nano partículas con fitohormonas AIA y A.J. de la

casa comercial de la casa Sigma Aldrich grado reactivo, nano partículas con el caldo microbiano, así como las fitohormonas y el caldo microbiano sin encapsular; además de un testigo absoluto y un testigo inoculado. En el Cuadro 1 se pueden apreciar los tratamientos utilizados en este experimento. Todos los datos de las variables evaluadas se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

**Cuadro 1. Tratamientos empleados para determinar la efectividad biológica contra *F. oxysporum* bajo concentraciones controladas.**

	<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración</b>
T1	Np's sin cargar	-
T2	Np's con AJ reactivo	140 mg/L
T3	Np's con AIA reactivo	140 mg/L
T4	Np's con caldo microbiano	125 mg/L
T5	ÁJ reactivo	250 mg/L
T6	ÁIA reactivo	250 mg/L
T7	Caldo Microbiano	125 mg/L
T8	Testigo Absoluto	-

### **Inoculación y trasplante**

Las plántulas de los tratamientos T1 al T7 y T9 fueron inoculados antes del trasplante. Para esto, se les realizó un corte transversal de la parte apical de las raíces y posteriormente se colocaron por dos minutos en una solución de esporas de *F. oxysporum* a una concentración de  $1 \times 10^8$ ; enseguida las plantas se colocaron en macetas previamente humedecidas.

### **Aplicación de tratamientos**

Los tratamientos se aplicaron con atomizadores de 500 ml. Se realizaron cuatro aplicaciones, la primera se realizó al momento del trasplante, y posteriormente

a los 15, 30 y 45 días después de la primera aplicación, estas se realizaron directamente sobre el follaje de las plantas.

## **Variables evaluadas**

### **Incidencia**

Se consideró que una planta presentaba la enfermedad cuando empezó a manifestar los síntomas y se le asignó una escala de la severidad. De esta forma la incidencia fue el porcentaje de plantas enfermas en cada tratamiento. Para esto se usó la siguiente formula:

$$\%I: \frac{\text{No. Plantas Enfermas}}{\text{No. Total de plantas}} (100)$$

### **Severidad**

Esta variable se comenzó a medir cuando aparecieron los primeros síntomas en las plantas como amarillamiento de las hojas más antiguas y plantas con retraso en el crecimiento, para esto se utilizó la escala propuesta por Marlatt et al. (1996) la cual se mide en un rango del 1 al 5, donde:

- 1= Sin síntomas
- 2= Clorosis ligera
- 3= Clorosis moderada y marchitamiento
- 4= Clorosis severa y marchitamiento
- 5= Muerte de la planta

### **Altura de planta**

Esta se mide cada 15 días usando una cinta métrica, para la medición se tomó en cuenta desde la superficie del sustrato hasta el punto de abscisión de la última hoja emergida.

**Diámetro de tallo**

Esta variable se mide utilizando un vernier digital cada 15 días, se tomó el tallo a un centímetro del sustrato y se procedió a ajustar el vernier al tallo y se tomó la lectura.

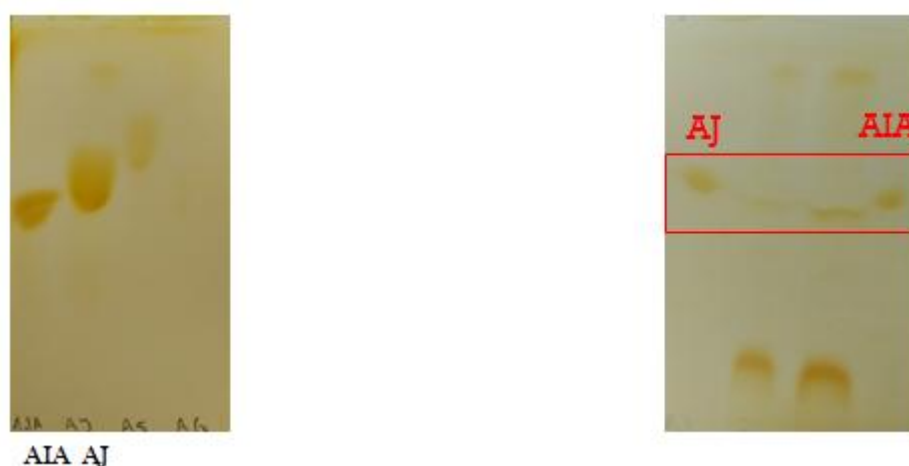
**Clorofila en hojas y número de hojas**

Se utilizó un medidor de clorofila SPAD 502 marca Minolta, para esto se seleccionó una hoja de la parte inferior y se procedió a tomar la medida de la clorofila. Para el número de hojas se llevó a cabo contando el número de hojas por planta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Hormonas Identificadas Procedentes de Fermentación Líquida de *B. theobromae*

Las hormonas presentes en el caldo de fermentación líquido que se identificaron fueron ácido jasmónico y ácido indolacético, las cuales se identificaron por medio de cromatografía en capa fina (TLC) (Figura 2), posteriormente se realizó la cuantificación para el caso de AIA.



**Figura 2. Detección de fitohormonas ácido jasmónico y ácido Indolacético presentes en el caldo con respecto al estándar.**

### Cuantificación de ácido indolacético producido por la cepa de *B. theobromae*.

La producción de hormonas a partir de *B. theobromae* se logró mediante la fermentación líquida, en un medio rico en concentración de hidratos de carbono. De acuerdo a la cuantificación de AIA obtenido por la cepa utilizada se determinó que esta produce en promedio una concentración final de 125 ppm. Investigaciones realizados han demostrado que la cepa de *B. theobromae* tiene la capacidad de producir hormonas entre ellas se encuentra el ácido indolacético y el ácido jasmónico, tal es el caso de Castillo *et al.* (2014) quienes

realizaron un trabajo similar con dos diferentes cepas de *B. theobromae* y se obtuvieron diferentes niveles de producción de la hormona de AIA.

### Caracterización de Nanopartículas

#### Tamaño y dispersión dinámica de luz de Np' (DLS)

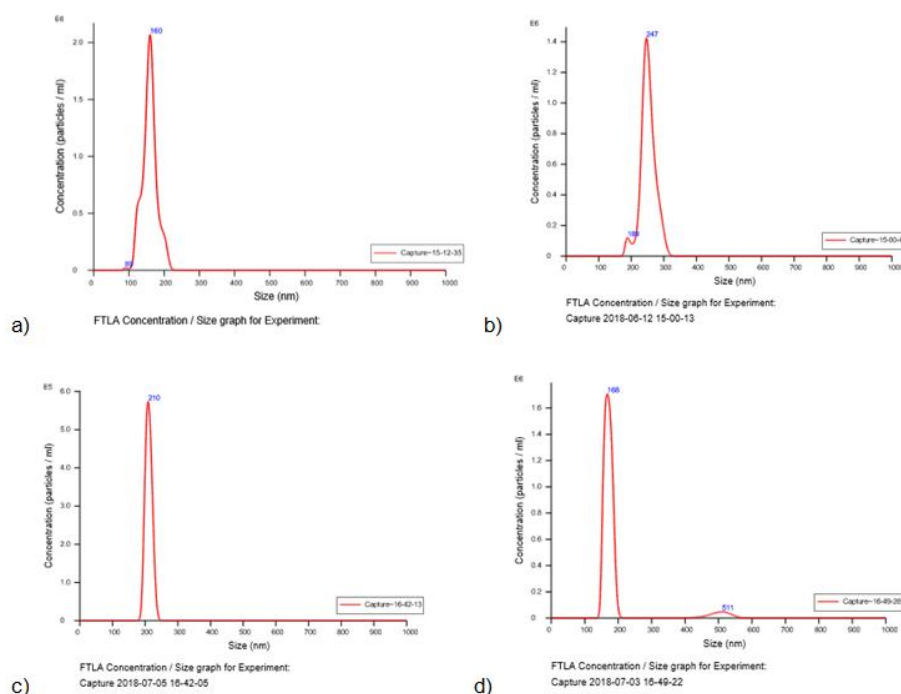
El tamaño de las Np's (Cuadro 2), ALG/QS presentó valores de  $123 \pm 23.5$  nm, para las NP's de ALG/QS/AIA de  $247 \pm 26.6$  nm y finalmente para las Np's de ALG/QS/CALDO los valores obtenidos fueron de  $220 \pm 10.10$  nm (Figura 3), lo que sugiere que posiblemente la adición de la hormona sintética, así como la adición del filtrado de caldo de fermentación no afectó la estructura de las Np's, sin embargo, si aumentó el tamaño en comparación con las Np's no cargadas. Esto se debe a la interacción que se dio entre los biopolímeros y las hormonas adicionadas (Choe *et al.*, 2005). Mediante el uso de la técnica de DLS se logró determinar los valores de tamaño y dispersión. El valor medio de las Np's es típico en este tipo de partículas (Grillo *et al.*, 2014; Vimal *et al.*, 2013). La literatura menciona diferentes tamaños de Np's de ALG/QS, utilizando la misma técnica. Un ejemplo es lo reportado por Azevedo *et al.* (2016), quienes obtuvieron Np's con tamaños de 100-120nm, mientras que Rampino *et al.* (2013), produjeron nano partículas de tamaño de 500 nm y 4000 nm las cuales muestran tamaños más grandes que los obtenidos en este trabajo. Esto pudo deberse a la interacción química que se produjo de los componentes que utilizaron.

**Cuadro 2. Valores obtenidos del tamaño de partícula, potencial Z y DLS, de Np's formadas por ALG/QS, ALG/QS/AIA, ALG/QS/AJ y ALG/QS/CALDO.**

	ALG/QS	ALG/QS/AIA	ALG/QS/AJ	ALG/QS/CALDO
Tamaño (nm)	$123 \pm 23.50$	$247 \pm 26.60$	$230 \pm 25.01$	$220 \pm 10.10$
Potencial zeta (mV)	$-31.10 \pm 0.57$	$-30.33 \pm 2.30$	$30.00 \pm 2.10$	$33.63 \pm 4.09$
pH	$3.50 \pm 0.26$	$3.13 \pm 0.20$	$3.10 \pm 2.51$	$3.10 \pm 0.26$
Peso (g)	$0.08 \pm 0.01$	$0.10 \pm 1.69$	$0.11 \pm 0.09$	$0.37 \pm 0.46$

±: Desviación estándar.

ALG/QS= Alginato/Quitosan  
 ALG/QS/AIA= Alginato/Quitosan/Acido Indolacético  
 ALG/QS/AJ= Alginato/Quitosan/ Acido Jasmonico  
 ALG/QS/CALDO= Alginato/Quitosan/Caldo microbiano



**Figura 3. Análisis de tamaño de partícula utilizando las técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS). Las muestras fueron analizadas por triplicado. (A. ALG/QS, B. ALG/QS/AIA, C. ALG/QS/CALDO, D. ALG/QS/AJ).**

### Potencial zeta

El estudio de caracterización de las Np's comprobó que en promedio los valores de potencial Zeta para las Np's de ALG/QS fue de -31.1 mV (Cuadro 2). El potencial zeta indica si las matriz tendrá una buena estabilidad coloidal, ya que las partículas con potenciales zeta por encima de +30 mV o por debajo de -30 mV generalmente se consideran estables (Silvia *et al* 2011). Las cargas se relacionan con los componentes que fueron utilizados en la producción de las Np's. Se tienen reportes de que el potencial Zeta negativo de las Np's de ALG/QS es debido a los grupos carboxilo del alginato de sodio, los cuales se encuentran ionizados a pH 4,9 (Costa *et al*, 2015). Las cargas que se

esperaban en este trabajo fueron las resultantes ya que al tener carga negativa muestran mayor estabilidad.

### **Estabilidad química de los polímeros (pH)**

En relación a la estabilidad química de los polímeros evaluados en este trabajo el pH final de las Np's ALG/QS, ALG/QS/AIA, ALG/QS/AJ y ALG/QS/CALDO fue de 3.50, 2.13, 3.10 y 3.10 respectivamente (Cuadro 2), siendo estos valores similares entre ellos y sin ningún cambio significativo, lo que indica la ausencia de hidrólisis de los sistemas utilizados.

### **Eficiencia de encapsulación**

La capacidad de las Np's de alginato/quitosán para encapsular la hormona de AIA así como el caldo de fermentación se evaluó a través de la determinación de la eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (LC). La eficiencia de encapsulación de AIA en las Np's fue del 90 %, lo que demuestra que hubo una buena reacción entre los biopolímeros utilizados para la producción de las NP's. En relación a esto, Zhang et al. (2010), obtuvieron una EE entre 58 y 80% y Azevedo et al. (2014) obtuvieron un 55% con respecto a EE, los cuales son resultados menores a los obtenidos en la presente investigación. Los altos niveles de eficiencia de encapsulación en biopolímeros con sustancias bioactivas y el menor tamaño de las Np's obtenidas en este trabajo puede ser debido a la interacción que se presenta entre los iones de  $Ca_2^+$  de las moléculas de alginato de sodio y quitosan (Melo et al., 2013).

## **Efectividad Biológica de Nanoencapsulados contra *F. oxysporum* en Plantas de Tomate**

### **Incidencia y Severidad**

En relación a la severidad e incidencia en planta, en este trabajo no se pudieron evaluar utilizando las formulas y escalas planteadas, ya que no se presentaron los síntomas característicos del daño causado por *F. oxysporum*. Esto pudo ser debido a que la temperatura promedio registrada durante el bioensayo fue de



20 °C; siendo inferior a la reportada por Cook y Baker (1983) quienes reportan que la temperatura óptima para el desarrollo de *F. oxysporum* debe ser 28 °C.

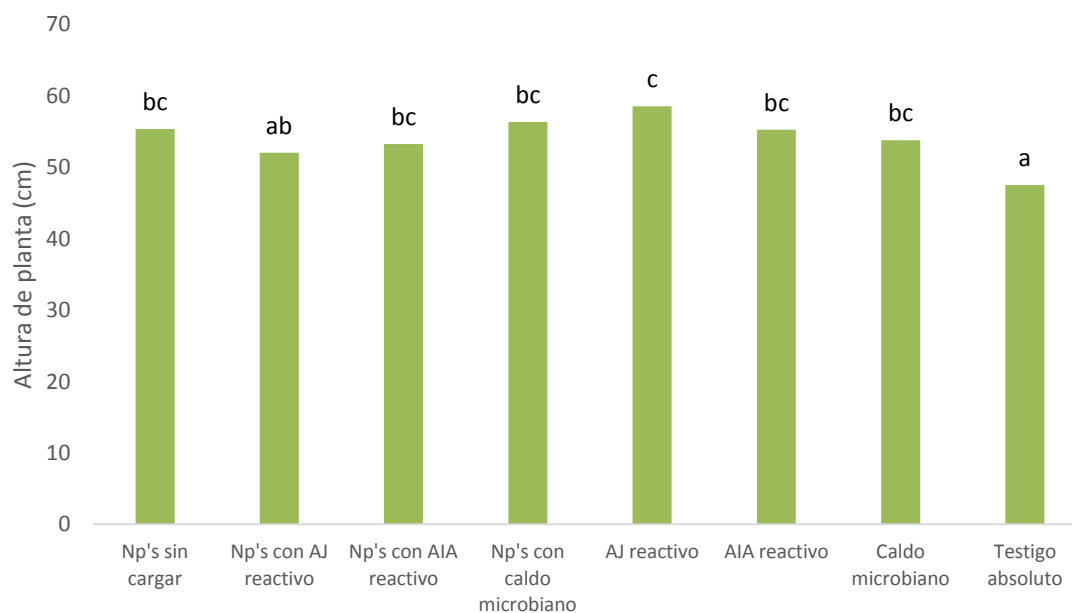
### **Altura de planta**

En relación a la variable de altura de planta (Cuadro 3) los resultados obtenidos indican que existió diferencia estadística entre los tratamientos, se pudo ver que todos los tratamientos indujeron una mayor altura en relación al testigo absoluto; siendo el tratamiento de AJ reactivo el que otorgó a la planta mayor altura con 58.50 cm, seguido de Np's con caldo microbiano y Np's sin cargar y 55.30 cm. La mayor altura obtenida en los tratamientos pudo ser por la aplicación exógena de ácido jasmónico debido a que las hormonas pertenecientes al grupo de las citoquininas presentes en el caldo microbiano ayudan al desarrollo celular en la promoción y diferenciación de células, obtenido así una mayor altura (Laredo-Alcalá *et al.*, 2016); de igual manera se tienen reportes de que el CaCl<sub>2</sub> usado en la producción de las nano partículas disminuye el estrés en plantas teniendo un incremento en la calidad y tamaño de estas. Los resultados de este trabajo coinciden con el reporte de Santo *et al.* (2017), quienes observaron que usando nano partículas de alginato y quitosan para encapsular hormonas de crecimiento vegetal, se tuvo un mayor tamaño de planta.

**Cuadro 3. Efectos de los diferentes tratamientos en plantas de tomate a los 45 días después de la primera aplicación.**

Tratamiento	Altura de planta*	Diámetro de Tallo*	Número de Hojas*	Clorofila*
Np's sin cargado	55.30 BC	6.06 B	30.00 BC	41.80 B
Np's con ÁJ grado reactivo	52.00 AB	6.11 B	30.00 BC	43.00 BC
Np's con AIA grado reactivo	54.30 BC	5.49 A	33.00 CD	48.82 CD
Np's con caldo microbiano	55.30 BC	5.77 AB	33.00 D	45.50 BCD
A.J. grado reactivo	59.00 C	6.19 B	30.00 BC	49.63 D
AIA grado reactivo	56.60 BC	6.74 C	32.00 B	42.21 BC
Caldo microbiano	54.00 BC	5.86 AB	33.00 CD	46.13 BCD
Testigo absoluto	47.00 A	5.52 A	23.00 A	30.81 A

\*: Valores con misma letra son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.0$ )

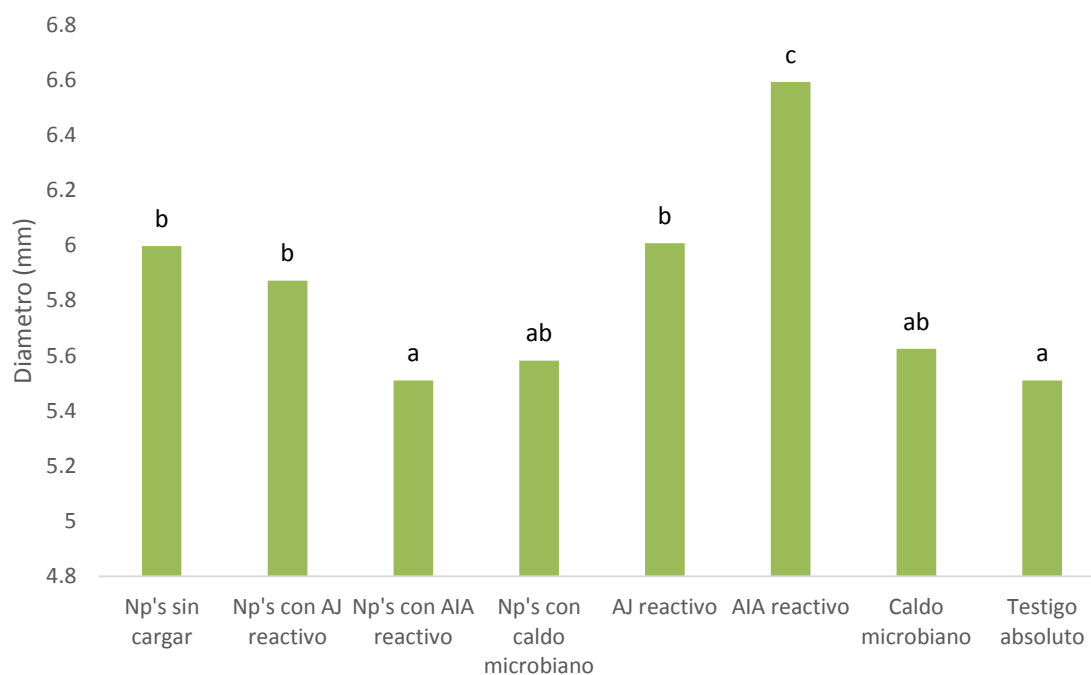


**Figura 4. Altura de plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*, tratadas con hormonas nano encapsuladas y sin encapsular.**

### Diámetro de tallo

Los resultados obtenidos demuestran que estadísticamente se presentó un mayor diámetro de tallo (Cuadro 3) con el tratamiento AIA reactivo con 6.74

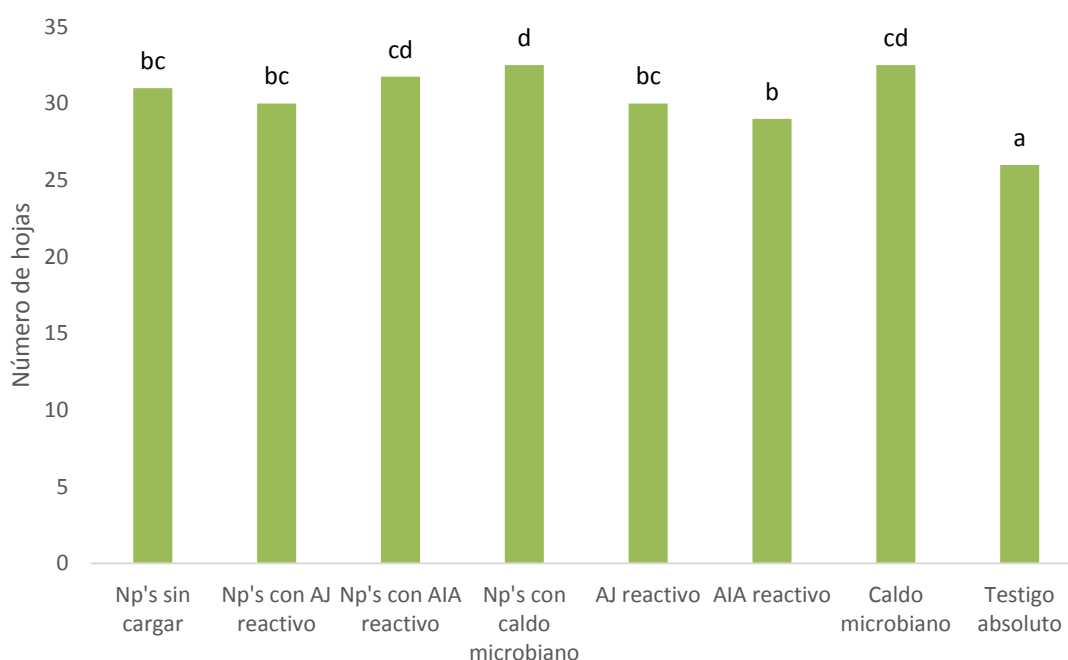
mm, seguido de los tratamientos AJ reactivo, Np's con AJ y Np's sin cargar con 6.19mm, 6.11 mm y 6.06 mm respectivamente; en tanto que el testigo absoluto presento un diámetro de tallo de 5.52 mm. El incremento en el tallo por aplicación exógena de ácido indolacético puede ser debido a que fitohormonas como el ácido indolacético, promueven el desarrollo y aceleran la división celular en plantas (Xu *et al.*, 2012). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Hadi *et al.* (2010) quienes observaron un aumento en el crecimiento de la planta, así como un aumento en la biomasa por la aplicación en aspersión de ácido indolacético. En cuanto a las nano partículas, el aumento del diámetro puede ser debido a que el alginato estimula varios procesos fisiológicos los cuales ayudan al crecimiento de la planta (Hussein y Hamideldin, 2014).



**Figura 5. Diámetro de tallo de las plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*, tratadas con hormonas nano encapsuladas y sin encapsular.**

## Numero de hojas

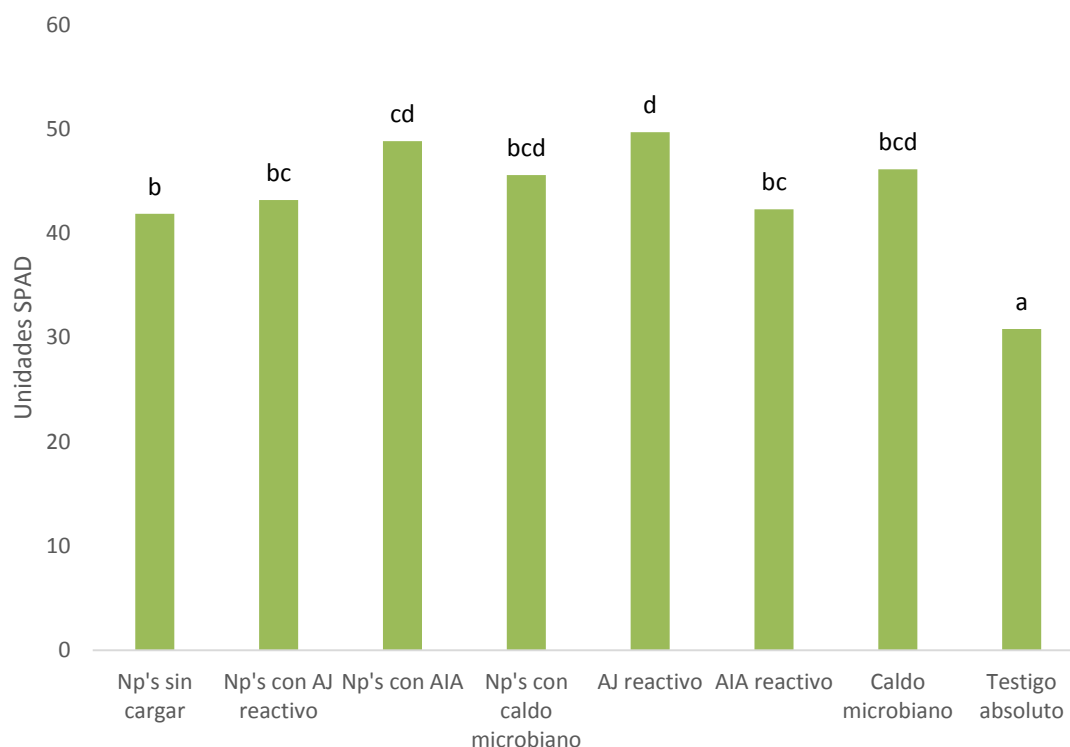
En el caso de numero de hojas (Cuadro 3), el análisis mostró que si existió diferencia estadística entre los tratamientos y el testigo absoluto. De los tratamientos aplicados a las plantas de tomate, se observó que el Caldo microbiano y las Np's con caldo microbiano fueron los que indujeron una mayor producción de hojas en las plantas con 33.00 en ambos tratamientos, a estos le siguieron Np's con AIA reactivo y las Np's sin cargar cada una con 32.00 y 30.00 respectivamente. Estos resultados coinciden con los reportados por García-Corzo *et al.* (2015), quien al utilizar diversas concentraciones de ácido indolacético, reportó un aumento en el número de hojas de *Chamaedorea oblongata*.



**Figura 6. Numero de hojas de las plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*, tratadas con hormonas nano encapsuladas y sin encapsular.**

### Clorofila en hojas

Finalmente, para esta variable, el análisis demostró que, si se presentó diferencia estadística entre los tratamientos (Cuadro 3), en este caso las plantas tratadas con AJ reactivo, Np's con AIA y caldo microbiano, fueron los que indujeron mayor producción de clorofila en las hojas con 49.63, 48.82 y 46.13 respectivamente, todos los valores fueron mayores al testigo absoluto el cual presentó 30.81. Esto puede ser debido a que la aplicación exógena de fitohormonas acelera la actividad biológica de la enzima rubisco lo que ocasiona un aumento en la actividad fotosintética y un incremento en la clorofila de las hojas (Tucuch-Haas *et al.*, 2015).



**Figura 7. Clorofila en hojas de las plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*, tratadas con hormonas nano encapsuladas y sin encapsular.**

## CONCLUSIÓN

Mediante la fermentación en estado líquido de *B. theobromae*, se logró obtener, identificar y cuantificar fitohormonas de origen microbiano.

El uso de los biopolímeros quitosan y alginato permitieron el desarrollo de nanopartículas cargadas con fitohormonas sintéticas y de origen microbiano con características estables, proporcionando una encapsulación eficiente.

La evaluación biológica bajo condiciones controladas (cámara climática) de estas nanopartículas usando plantas de tomate, presentaron en general un efecto positivo de las Np`s en el desarrollo de las plantas en relación a un testigo absoluto.

De acuerdo a estos resultados podemos mencionar que el sistema desarrollado para la producción de fitohormonas de origen microbiológico y de la producción de nanopartículas para encapsular ingredientes activos son una opción ideal y pueden ser potencialmente eficientes para aplicaciones agrícolas.

## REFERENCIAS

- Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D., and Turner, W. B. 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. Journal of the Chemical Society C: Organic, 1623-1627.
- Andolfi A, Maddau L, Cimmino A, Benedetto T, Basso S, Deidda A, Serra S, Evidente A. 2014. Lasio jasmonates A-C, three jasmonic acid esters produced by *Lasiodiplodia* sp., a grapevine pathogen. Fitoquímica. 103; 145-153.
- Bautista-Baños, S., M. Hernández and E. Bosquez. 2004. Growth inhibition of select fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatología 22 (2): 178-186.
- Campos, F. S., Franco, A. C., Oliveira, M. T., Firpo, R., Strelczuk, G., Fontoura, F. E., and Silva, A. D. 2014. Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. Veterinary microbiology, 171(1-2), 182-188.
- Cook, R. J., and Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control
- Deighton, F. C., Stevenson, J. A., and Cummins, G. B. 1962. Formae speciales and the code. Taxon, 11(3), 70-71.
- Draget, K.I. 2009. Alginates: Handbook of Hydrocolloids, 2a. edición. Woodhead. Cambridge, 379–395.
- Draget, K.I., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G. 2005. Alginates from algae, en (Steinbüchel A., Rhee, S.K., eds.) Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, production and patents. Wiley-VCH, Weinheim, 1-30.
- Dubey, A. and Mailapalli, D.R. 2016p. Nanofertilisers, nanopesticides, nanosensors of pest and nanotoxicity in agriculture. In Sustainable Agriculture Reviews. Springer International Publishing. 307-330pp
- Eng, F, M. Gutiérrez, E. Favela, 1998. Culture conditions for jasmonic acid and biomass production by *Botryodiplodia theobromae* in submerged fermentation. Process Biochemistry 33: 715-720.
- Fernández, C., y Juncosa, R. 2002. Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro?. Phytoma, 141, 14-19.
- FIRA, Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura. 2017. Panorama Agroalimentario, Tomate Rojo.

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama\\_Agro\\_alimentario\\_Tomate\\_Rojo\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agro_alimentario_Tomate_Rojo_2016.pdf) (Consulta, Octubre 2019).

- Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT) 2018.
- Frankenberger, W.T. and Arshad, M. 1995 Phytohormones in soils: microbial production and function. Marcel Dekker, New York.
- García-Corzo P.G. 2015. Evaluación de ácidos idolacético e indolbutírico y extracto de algas marinas sobre el desarrollo de follaje de xate jade (*Chamaedorea oblongata*). Universidad Rafael Landívar. Tesis de licenciatura. 53 pp.
- González, I., Arias, Y. and Peteira, B. 2012. Aspectos Generales de la Interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Tomate. Rev. Protección Veg 27(1): 1-7.
- Gross, D., and Parthier, B. 1994. Novel natural substances acting in plant growth regulation. Journal of plant growth regulation, 13(2), 93.
- Hadi, F., Bano, A., and Fuller, M. P. 2010. The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (*Zea mays* L.): the role of plant growth regulators (GA3 and IAA) and EDTA alone and in combinations. Chemosphere, 80(4), 457-462.
- Hernández, A. N.; S. Bautista y M. G. Velázquez. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana 30 (2): 119-123.
- Hernández-Martínez, R., López-Benitez, A., Borrego-Escalante, F., Espinoza-Velásquez, J., Sánchez-Aspeytia, D., Maldonado-Mendoza, E. y López-Ochoa, L. 2014. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. Rev. Mex. Cienc. Agric. 5(7): 1169-1178.
- Horinouchi T., Terada K., Higa T., Aoyagi H., Nishiya T., Suzuki H., Miwa S. 2011. Function and regulation of endothelin type A receptor-operated transient receptor potential canonical channels. Journal of Pharmacological Sciences 117: 295–306.
- Hussein, O. S., and Hamideldin, N. A. H. L. A. 2014. Effects of spraying irradiated alginate on *Solanum tuberosum* L. plants: Growth, yield and physiological changes of stored tubers. Journal of Agriculture and Veterinary Science (7), 1, 75-79.



- Igbinosa, O. O.; E. O. Igbinosa and O. A. Aiyegoro. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). African Journal of Pharmacy and Pharmacology 3 (2): 58-62.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) Página sobre exportaciones hacia otros países. Consultado 14 Agosto 2017 Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/default.aspx>
- Jaramillo, J. 2007. Buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas, Manual técnico. Convenio corporaica, Gobierno de Antioquía, FAO. Colombia. 103pp.
- Kah, M., and Hofmann, T. 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. Environment international, 63, 224-235.
- Kistler, H. C. 2001. Evolution of the host specificity in *Fusarium oxysporum*. Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium, pp. 70-96. Summerell, A., Leslie, J. F., Badihouse, D., Bryden, W. L. and Burgess, L.W.
- Kitahara, T., Kiyota, H., Kurata, H., & Mori, K. 1991. Synthesis of oxygenated eremophilanes, gigantone, phomenone and phaseolinone, phytotoxins from pathogenic fungi. Tetrahedron, 47(9), 1649-1654.
- Koda, Y., Kikuta, Y., Tazaki, H., Tsujino, Y., Sakamura, S., and Yoshihara, T. 1991. Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. Phytochemistry, 30(5), 1435-1438.
- Koshiba, T., and Matsuyama, H. 1993. An *in vitro* system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. Plant Physiology, 102(4), 1319-1324.
- Kottegoda, N., Munaweera, I., Madusanka, N., Karunaratne, V. 2011. A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood. Current Science (Bangalore). 101: 73-78.
- Lee K.Y. and Mooney D.J. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. Prog Polym Sci 37: 106–126.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., and Summerell, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 59(3), 107-117.
- Manimaran, M. 2015. A review on nanotechnology and its implications in agriculture and food industry. Asian Journal of Plant Science and Research. 5:13-15.

- Marlatt, M. L. J.; Correll, J. C.; Kaufman, P. and Cooper, P. E. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ivcopersici* race 3 in the United States. *Plant Dis.* 80(12):1336-1342.
- Michelena, G., E. Carrera, A. Bell, B. Altuna, G. Almeida, 2001. Proceso de separación y decoloración del ácido jasmónico a partir de *Botryodiplodia theobromae* cepa 715. *Revista Tecnología, Ciencia y Educación del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos* 16: 12-19.
- Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En M.E. Mace, A.A. Bell and e.H. Beckman (eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press. New York. p. 51-80.
- Nuruzzaman, M., Rahman, M.M., Liu, Y., Naidu, R. 2016. Nanoencapsulation, Nano-Guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. *Journal of agricultural and food chemistry*. 64: 1447-1483. of plant pathogens. American Phytopathological Society.
- Prasad, T.N., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K.R., Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*. 35: 905-92.
- Ramírez, V.J y Sáinz, R.R. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate 1ra. ED. Once Ríos. México p.p. 19-160.
- Ramírez, V.J. 1998. Enfermedades de la raíz en tomate. pp. 29-49. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). *Enfermedades de las Hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.
- Ramírez, V.J. 1998. Enfermedades de la raíz en tomate. pp. 29-49. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). *Enfermedades de las Hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.
- SAGARPA. 2010. Monografía de Cultivos: Jitomate. Consultado 20 Abril 2019. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>
- Sánchez, C.M.A. 1998. Enfermedades causadas por hongos en tomate. pp. 17-28. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). *Enfermedades de las Hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p
- Santo Pereira, A. E., Silva, P. M., Oliveira, J. L., Oliveira, H. C., and Fraceto, L. F. 2017. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth

hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 141-152.

Sembdner, G. A. P. B., & Parthier, B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual review of plant biology*, 44(1), 569-589.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Consultado 20 Abril 2019. Disponible en [http://infosiap.siap.gob.mx/agricola\\_siap\\_gb/ientidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/ientidad/index.jsp)

Tucuch-Haas, C. J., Alcántar-González, G., & Larqué-Saavedra, A. (2015). Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de la raíz y biomasa total de plántulas de trigo. *Terra Latinoamericana*, 33(1), 63-68.

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

Vásquez-Ramírez, L. M., & Castaño-Zapata, J. 2017. MANEJO INTEGRADO DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL TOMATE [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) WC SNYDER & HN HANSEN] UNA REVISIÓN. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363-374.

Xu, Y., Zhang, Y., Li, Y., Li, G., Liu, D., Zhao, M., and Cai, N. 2012. Growth promotion of *Yunnan pine* early seedlings in response to foliar application of IAA and IBA. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 6507-6520.

Yadollahi, A., Arzani, K., Khoshghalb, H. 2009. The role of nanotechnology in horticultural crops postharvest management. In *Southeast Asia Symposium on Quality and Safety of Fresh and Fresh-Cut Produce* 875. 49-56pp.

Wohlfart S, Khalansky AS, Gelperina S, et al. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. *PLoS One*. 2011;6:e19121.

Rohwer, C., J. Erwin, 2010. Spider mites (*Tetranychus urticae*) perform poorly on and disperse from plants exposed to methyl jasmonate. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1: 1-10.

Cabané P., Alvo A., Neira-Carrillo A., Caviedes P., Gac P. 2011. Microencapsulación de células y tejido para terapia celular. *Revista Chilena de Cirugía* 63: 110-113

- Egaña R. 2013. Preparación de esferas de alginato purificado de origen comercial y desde algas chilenas *Lessonia nigrescens* como implante para terapia celular. Tesis de pregrado para optar al título de Médico Veterinario (MDV).
- Neira-Carrillo A., Vasquez-Quitral P., Paz Díaz M., Fernandez M.S., Arias J.L., Yazdani-Pedram M. 2012. Control of calcium carbonate crystallization by using anionic polymethylsiloxanes as templates. *J. of Solid State Chemistry* 194: 400-408.
- Sáenz L., Neira-Carrillo A., Paredes R., Cortés M., Bucarey S., Arias J. L. 2009. Chitosan formulations improve the immunogenicity of a GnRH-I peptide based vaccine. *International Journal of Pharmaceutics* 369: 64-71.
- Mena J., Neira-Carrillo A., YazdaniPedram M., Kogan M. 2013. Capping gold nanoparticles with modified chitosan polymers for biomedical applications.
- Neira-Carrillo A., Retuert J., Martínez F., Arias J.L. 2008. Effect of crosslinked chitosan as a constrained volume on the in vitro calcium carbonate crystallization. *Journal of the Chilean Chem. Soc.* 53: 1367-1372.
- Almeida, G., M. Klibansky, B. Altuna, F. Eng, S. Legra, M. Armenteros, 1999. Some considerations about the using of carbon sources in the production of jasmonic acid. *Revista Iberoamericana de Micología* 16: 166-169.
- Romero C. 1993. Hongos Fitopatogenos. Universidad Autonoma Chapingo. Direccion del Patronato Universitario. Pp 333.
- Tucuch CFM, Palacios PA, Ku NR y Guzman EC. 2005. Ma-nejo del cultivo de mango en el estado de Campeche. Cam-po Experimental Edzna, INIFAP. Folleto Tecnico. Camoe-che, Camp., Mexico. 33-34. <http://www.cesix.inifap.gob.mx/frutalestropicales/articulos/37.pdf>

# **ANEXOS**

Anexo A.1. Promedio y Desvest de altura de planta de tomate (cm) tomada a los 15, 30 y 45 días en condiciones controladas.

TRATAMIENTOS	15		15 DD2A		15 DD3A	
	DD1A					
1. Np's sin cargado	19.50	2.08	31.87	1.75	55.33	3.21
2. Np's con ácido jasmonico	20.75	0.50	35.00	4.08	52.00	4.35
3. Np's con ácido indolacetico	21.30	1.62	37.50	2.38	53.25	3.59
4. Np's con caldo microbiano	20.62	2.561	40.50	4.12	56.30	3.51
5. Ácido jasmonico	19.87	1.43	42.50	1.77	58.50	1.73
6. Ácido indolacetico	19.75	2.06	40.25	3.77	55.25	3.30
7. Caldo microbiano	24.25	3.59	36.00	2.00	53.75	2.21
8. Testigo absoluto	19.00	1.00	40.00	4.35	47.50	2.12

Anexo B. Promedio y Desvest de diametro de tallo (mm) de planta de tomate tomada a los 15, 30 y 45 días en condiciones controladas.

TRATAMIENTOS	15		15 DD2A		15 DD3A	
	DD1A					
Np's sin cargado	4.74	0.48	5.51	0.27	5.99	0.25
Np's con ácido jasmonico	4.49	0.94	5.24	0.84	5.87	0.52
Np's con ácido indolacetico	4.28	0.54	5.14	0.31	5.51	0.37
Np's con caldo microbiano	4.25	0.43	5.21	0.18	5.58	0.40
Ácido jasmonico	4.92	0.25	5.65	0.68	6.00	0.48
Ácido indolacetico	4.25	0.37	5.98	0.86	6.59	0.34
Caldo microbiano	3.71	0.26	5.34	0.48	5.62	0.57
Testigo absoluto	4.08	0.317	5.12	0.13	5.51	0.04

Anexo C. Promedio y Desvest de numero de hojas de plantas de tomate tomada a los 15, 30 y 45 días en condiciones controladas.

Tratamiento	15 DD1A		15 DD2A		15 DD3A	
Np's sin cargado	27.00	2.00	26.00	2.00	31.00	0.00
Np's con ácido jasmonico	19.00	3.00	23.00	4.00	30.00	2.00
Np's con ácido indolacetico	15.00	3.00	25.00	1.00	31.00	0.00
Np's con caldo microbiano	16.00	3.00	23.00	4.00	32.00	0.00
Ácido jasmonico	15.00	1.00	25.00	0.81	30.00	3.00
Ácido indolacetico	15.00	4.00	22.00	1.00	29.00	1.00
Caldo microbiano	16.00	3.00	19.00	5.00	32.00	2.00
Testigo absoluto	16.00	2.00	20.00	2.00	26.00	2.00

Anexo D. Promedio y Desvest de clorofila (Unidades SPAD) de plantas de tomate tomada a los 15, 30 y 45 días en condiciones controladas.

Tratamiento	15 DD1A	15 DD2A	15 DD3A			
Np's sin cargado	33.66	4.14	36.26	1.93	37.26	5.56
Np's con ácido jasmonico	35.02	2.41	36.80	5.73	38.16	6.93
Np's con ácido indolacetico	32.35	4.23	31.70	5.29	45.72	6.35
Np's con caldo microbiano	35.77	3.34	35.75	4.18	42.71	4.61
Ácido jasmonico	32.35	9.12	36.16	5.47	47.18	3.92
Ácido indolacetico	35.86	4.18	32.93	4.73	39.47	4.37
Caldo microbiano	33.96	2.84	34.02	4.41	46.26	4.89
Testigo absoluto	32.90	3.65	36.25	5.67	34.21	4.68