

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Actividad Antimicrobial de Nanopartículas de Cobre y Óxido de Zinc contra Hongos y Bacterias Fitopatógenas

Por:

**ELDA LUZ ESPARZA RIVERA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Actividad Antimicrobial de Nanopartículas de Cobre y Óxido de Zinc contra Hongos y Bacterias Fitopatógenas

Por:


**ELDA LUZ ESPARZA RIVERA**

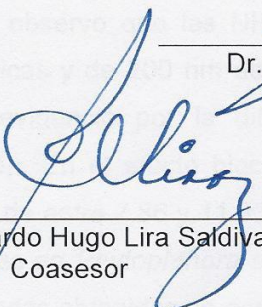
TESIS

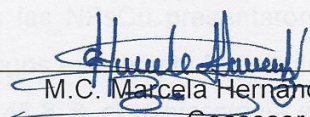
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

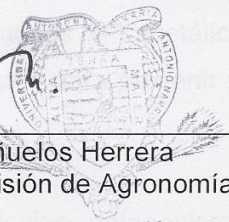
Aprobada

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Asesor Principal

  
Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar  
Coasesor

  
M.C. Marcela Hernández Suárez  
Coasesor

  
Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía

  
Coordinación  
División de Agronomía  
Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2015

## RESUMEN

Se elaboraron nanopartículas (NPs) de cobre y óxido de zinc solas y dopadas con plata. Para determinar su actividad biocida, fueron evaluadas en condiciones *in vitro* e *in vivo* contra *Phytophthora sp* y *Rhizoctonia solani* y en las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas axonopodis*, *Curtobacterium flaccumfaciens* y *Clavibacter michiganensis*. La evaluación se realizó en medio de cultivo sólido a diversas concentraciones de nanopartículas y en base en un diseño experimental completamente al azar. Se encontró que las NPs<sub>Cu</sub> son agentes de control microbioestadísticamente superiores que las NPs<sub>ZnO</sub>, ya que mostraron un efecto inhibitorio significativo contra las tres cepas bacterianas, provocando claros halos de inhibición; este mismo efecto inhibitorio se detectó en los dos hongos evaluados. En el bioensayo *in vivo* con plántulas de tomate (Cv. floradade) donde se aplicaron las NPs<sub>Cu</sub> puras y las de ZnO + Ag 5 % para control de *Phytophthora sp*, no se detectó efecto significativo en las variables agronómicas de crecimiento.

Se observó que las NPs<sub>Cu</sub> fueron esféricas y de 4 a 18 nm, las de ZnO semiesféricas y de 200 nm de tamaño, mientras que las de ZnO + Ag de 100 nm; esto se evidenció por la difracción de rayos X y microscopía electrónica de transmisión. En el efecto biocida en bacterias las NPs<sub>Cu</sub> presentaron un halo de inhibición de entre 7.86 y 11.83 mm. En los hongos este efecto fue similar, causando inhibiciones en *Phytophthora sp* de 55.17 % y 46.8 % en *Rhizoctonia solani*. Según los resultados obtenidos se puede señalar que las NPs metálicas de Cu y ZnO tienen el uso potencial para utilizarse como productos para prevenir y controlar el deterioro por microorganismos fitopatógenos.

**Palabras clave:** Nanotecnología, nanopartículas, antagonismo, hongos y bacterias fitopatógenas.

Correo Electronico; Elda Luz Esparza Rivera, [moos.esparza@gmail.com](mailto:moos.esparza@gmail.com)



## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme salud y ser siempre fiel.

A Mi **Alma Terra Mater**, que me dio la oportunidad y la fortuna de estudiar en ésta gran casa de estudios.

Al **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)**, por abrirme las puertas para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar**, muchas gracias por aceptar ser mi asesor de tesis, por brindarme su confianza y por su apoyo incondicional en este trabajo, su paciencia, consejos y exhortaciones para mi superación personal.

A la **M.C. Marcela Hernández Suarez**, especialmente para ti, gracias por tu orientación y valioso apoyo en este trabajo, el cual fue fundamental y sin él no hubiese sido posible.

Al **Dr. Gabriel Gallegos Morales**, gracias doctor por su apoyo y por enseñarme los primeros pasos para este trabajo.

Al **Dr. Luis Alfonso García Cerda** por su apoyo para la caracterización de las nanopartículas por microscopía TEM y rayos X.

A la **Q.F.B. Bertha A. Puente Urbina**, por su apoyo en la preparación de las nanopartículas y orientación en este trabajo.

A quienes fueron mis maestros de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y que fueron parte fundamental de mi formación profesional.

A la **Familia Castañeda Vázquez**, por su ayuda y apoyo a lo largo de toda mi carrera.

A la **Ing. Silvia Rivera**, por siempre brindarme su apoyo y porque sé que lo seguirá haciendo, gracias por estar presente en los mejores momentos de mi vida

## DEDICATORIA

**Adrián Emiliano Castañeda Esparza,**

*Cuando puedas leer esto quiero que sepas que te dedico, este y cada uno de mis logros además de mi vida, porque fuiste tú quien me motivo a seguir este sueño, llegaste a mi vida como un regalo perfecto y siempre te estaré agradecida por tu paciencia y esperar hasta tarde mi ausencia, gracias mi vida, por tu amor sincero y perfecto.*

**A Mis Padres:**

*Sepan que también todos mis logros son dedicados a ustedes, Gracias por su amor, y por el hogar que me han dado, por sus sacrificios y por apoyarme siempre a lo largo de mi vida*

**Marisol Rivera Bazaldúa,** *por ser mi Mami mujer fuerte y siempre luchadora a ti porque te encargas de darme lo mejor de ti y siempre estás conmigo, por tu amor que se, nunca cambiara y jamás morirá.*

**Luis Enrique Esparza Aguilar,** *por formarme desde pequeña, siempre tratando de guiarme por el buen camino, gracias por tus consejos y porque sé que aun de adulto me quieres cuidar, por ser como eres. “Un padre es más valioso que cien años de escuela” G. Herbet*

**César Adrián Castañeda Vázquez,**

*Este logro es de los dos, y estaré por siempre agradecida pues siempre me pusiste antes que a ti mismo. Muchas gracias por tu apoyo y por estar siempre a mi lado en todo momento. Gracias.*

**A mis hermanos Neri Marisol y Luis Ángel,**

*También les dedico esta parte tan importante de mi vida, amigos a pesar de que no estemos juntos, siempre están en mi corazón y sé que siempre estarán para mí, espero compartir más logros con ustedes, los quiero mucho.*



## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN -----	I
AGRADECIMIENTOS -----	II
DEDICATORIA -----	III
ÍNDICE DE CONTENIDO -----	IV
ÍNDICE DE CUADROS -----	VII
INDICE DE FIGURAS -----	VIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> -----	1
<b>2. OBJETIVOS</b> -----	2
2.1 Objetivo general -----	2
2.2 Objetivos específicos -----	2
2.3 Hipótesis -----	3
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> -----	3
3.1 La nanotecnología en la agricultura -----	4
3.2 Uso de nanopartículas -----	8
3.3 Propiedades antimicrobiales de las nanopartículas -----	9
3.4 Nanopartículas de cobre (NPsCu) -----	11
3.5 Nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) -----	11
3.6 Nanopartículas de plata (NPsAg) -----	12
3.7 El cultivo del tomate -----	13
3.7.1 Enfermedades del tomate -----	14
3.8 <i>Phytophthora capsici</i> -----	16
3.8.1 Características del patógeno -----	16
3.8.2 Daños causados por <i>Phytophthora capsici</i> -----	16
3.9 <i>Rhizoctonia solani</i> -----	17
3.9.1 Características del patógeno-----	17
3.9.2 Daños Causados por <i>Rhizoctonia solani</i> -----	18
3.10 <i>Xanthomonas axonopodis</i> -----	19
3.10.1 Características del patógeno -----	20



3.10.2 Daños causados por <i>Xanthomonas axonopodis</i> -----	19
3.11 <i>Clavibacter michiganensis</i> -----	20
3.11.1 Características del patógeno -----	20
3.11.2 Daños causados por <i>Clavibacter michiganensis</i> -----	21
3.12 <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> -----	21
3.12.1 Características del patógeno -----	21
3.12.2 Daños causados por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> -----	22
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	<b>23</b>
4.1 Área de trabajo-----	23
4.2 Síntesis de nanopartículas -----	24
4.3 Caracterización de nanopartículas por patrones de difracción de rayos X---	24
4.4 Caracterización De NPs por microscopía electrónica de transmisión-----	26
4.5 Bioensayos realizados-----	28
4.5.1 Bioensayo 1. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de NpsCu y ZnO solas y dopadas con plata contra los hongos <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	28
4.5.2 Purificación de <i>P. capsici</i> y <i>R. solani</i> -----	28
4.5.3 Bioensayos-----	29
4.6 Bioensayo 2. Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de NpsCu y ZnO solas y dopadas con plata contra las bacterias <i>Xanthomonas axonopodis</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> y <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> -----	30
4.7 Bioensayo 3. Actividad antifúngica <i>in vivo</i> de NpsCu y ZnO dopadas con plata contra <i>Phytophthora capsici</i> .-----	31
4.8 Diseño experimental empleado-----	32
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> -----	<b>32</b>
5.1 Actividad antifúngica de las NPs de cobre y óxido de zinc-----	32
5.2 Actividad antibacteriana de las NPs de cobre y óxido de zinc-----	34
5.3 Actividad antifúngica de las NPs de cobre y óxido de zinc <i>in vivo</i> -----	38
5.3.1 Severidad de la enfermedad-----	38
5.3.2 Altura de plantas-----	39
5.3.3 Longitud de raíz-----	40
5.3.4 Área foliar-----	40

5.3.5 Peso seco de plantas-----	41
<b>6. CONCLUSIONES</b> -----	<b>43</b>
<b>7. LITERATURA CITADA</b> -----	<b>44</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos con base de NPs de Cu y ZnO evaluados <i>in vitro</i> contra los hongos fitopatógenos <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> .	30
Cuadro 2. Tratamientos con base de NPs de Cu y ZnO evaluados contra las bacterias fitopatógenas <i>Xanthomonas axonopodis</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> y <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> .	31
Cuadro 3. Tratamientos evaluados <i>in vivo</i> contra el hongo fitopatógeno <i>Phytophthora capsici</i> , con base de NPs de Cu y ZnO.	32
Cuadro 4. Efecto antifúngico <i>in vitro</i> de las NPs de cobre y óxido de zinc contra el crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> .	33
Cuadro 5. Efecto de los tratamientos de NPs de cobre y óxido de zinc solas y dopadas con plata a dos concentraciones aplicados contra la bacteria fitopatógena <i>Xanthomonas axonopodis</i> .	35
Cuadro 6. Efecto de NPs de cobre y óxido de zinc, aplicadas contra las bacterias <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> y <i>Clavibacter michiganensis</i> .	37
Cuadro 7. Escala de severidad (Carlin y Leiner 1989)	39
Cuadro 8. Medias de severidad, longitud de la planta y área foliar.	41
Cuadro 9. Medias de la producción de biomasa seca	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis de nanopartículas. A) Material primario después de salir de la estufa de secado B) Molienda del material para ser llevado a tratamiento térmico C) Vial con NPs de ZnO+Ag terminadas.-----	25
Figura 2. Difractograma del precursor obtenido para la preparación de las NPs de ZnO.-----	25
Figura 3. Difractograma del precursor obtenido para la preparación de las NPs de ZnO dopadas con Ag (2.5% en peso).-----	25
Figura 4. Difractograma del precursor obtenido para la preparación de las NPs de ZnO dopadas con Ag (5% en peso).-----	26
Figura 5. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las características visuales de las nanopartículas. (A) NPs de óxido de zinc y (B) NPs de óxido de zinc mas plata.-----	27
Figura 6. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de algunas características visuales de las NPsde plata.-----	27
Figura 7. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de algunas características visuales de las NPs de cobre obtenidas por descomposición térmica.-----	28
Figura 8. A) Prensa compactadora utilizada para la creación de pastillas compuestas de las diferentes NPs B) Caja Petri preparada con una pastilla lado izquierdo y explante del hongo lado derecho.-----	29
Figura 9. Efecto antifúngico <i>in vitro</i> de las NPs de cobre y óxido de zinc. (1) <i>Phytophthora capsici</i> , (2) <i>Rhizoctonia solani</i> . (A) Testigo o control sin inhibición; (B) NPsCu, (C) NPsZnO 100%, (D) NPsZnO 95 + 5Ag %-----	33
Figura 10. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de los diferentes tratamientos contra <i>P. capsici</i> y <i>R. solani</i> .-----	34

Figura 11. Ilustración del efecto antibacterial <i>in vitro</i> de la bacteria <i>Xanthomonas axonopodis</i> : A) Testigo o control y B) Halo de inhibición causado por NPsCu.--	35
Figura 12. Efecto inhibidor de las NPs de cobre y óxido de zinc contra <i>X. axonopodis</i> .-----	36
Figura 13. Efecto antibacterial <i>in vitro</i> de las NPs de cobre (A) Testigo sin inhibición; (B) halo de inhibición causado por las NPs de cobre en <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> y (C) contra <i>Clavibacter michiganensis</i> .-----	37
Figura 14. Efecto inhibidor de las NPs de cobre y óxido de zinc contra <i>C. flaccumfaciens</i> y <i>C. michiganensis</i> .-----	38
Figura 15. Raíz de tres plantas de tomate tratadas a los 40 días después de la siembra. A) Raíz con NPsCu; B) Raíz con NPsZnO +Ag 5%; C) Raíz con el tratamiento químico Carbendazim (testigo químico).-----	40
Figura 16. Peso seco de las diferentes partes de la planta se muestra diferenciándose por la gama de colores, fruto, hojas, tallos y raíz.-----	42

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de nuevas tecnologías está adquiriendo cada vez más protagonismo en la vida diaria, un ejemplo de ello es la nanotecnología o ciencia a nanoescala, encargada de la manipulación y aplicación directa de materiales a través del control de la materia, es decir de átomos y moléculas con el fin de construir productos y la explotación de fenómenos (RS y RAE, 2004). Estas tecnologías han tenido un desarrollo en las últimas décadas y han demostrado tener un gran potencial en la prestación de nuevos y mejoradas soluciones a muchos grandes retos de la sociedad (Chen *et al.*, 2011), y al mismo tiempo han abierto nuevas posibilidades en el campo de la ciencia y la técnica, que abarcan desde aplicaciones en medicina, electrónica, biología, bioquímica y hasta la agricultura (Ghormade *et al.*, 2011).

La agricultura se está viendo beneficiada a través de aplicaciones nanotecnológicas, las cuales con técnicas experimentales permiten fabricar, caracterizar y manipular partículas de tamaño minúsculo llamadas nanopartículas, (NPs) que ofrecen múltiples beneficios para los cultivos (Quispe, 2010). Estas NPs se han examinado y utilizado para el tratamiento de algunas enfermedades en cultivos de importancia agronómica. En este trabajo se evaluaron algunas NPs de manera *in vitro* e *in vivo* aplicadas en tomate ya que esta hortaliza es de gran importancia económica. Entre los patógenos que atacan a numerosos cultivos hortícolas en nuestro país y el mundo entero, se encuentran los hongos *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*; así como tres de bacterias fitopatógenas: *Xanthomonas axonopodis*, *Curtobacterium flaccumfaciens* y *Clavibacter michiganensis*. Estos microorganismos causan enfermedades de gran impacto económico en el cultivo de tomate y muchos otros más, ya que estos patógenos afectan a las plantas durante su desarrollo y algunos en poscosecha. Para el control de estas agresivas enfermedades, normalmente se recurre al uso de agroquímicos sintéticos de diferentes características, pero que siempre ocasionan un severo impacto en los humanos y los ecosistemas (Lira-Saldivar *et al.*, 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antagónico *in vitro* e *in vivo* de las NPs de cobre y óxido de zinc dopadas con plata, contra diferentes microorganismos fitopatógenos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Aplicar a diversos microorganismos las diferentes concentraciones de NPs<sub>Cu</sub> (100 %) y NPs<sub>ZnO</sub> + Ag (ZnO 100 %, ZnO 97.5 % mas 2.5 Ag, ZnO 95 % mas 5 % Ag) y valorar cuál de las tres concentraciones tiene un efecto dominante.
- Evaluación *in vitro* del porcentaje de inhibición que tienen las NPs<sub>Cu</sub> y NPs<sub>ZnO</sub> sobre los hongos fitopatógenos *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*,
- Evaluación *in vitro* de la inhibición contra tres bacterias fitopatógenas, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Xanthomonas axonopodis* y *Clavibacter michiganensis*.
- Valorar *in vivo* en plantas de tomate la inhibición potencial de las NPs<sub>Cu</sub> y NPs<sub>ZnO</sub> contra el hongo *Phytophthora capsici*.

### 2.3 Hipótesis

Se espera que en condiciones *in vitro* una determinada concentración de NPs de cobre y óxido de zinc, muestren algún efecto antagonista en al menos una cepa de los hongos y bacterias fitopatógenas de importancia agrícola antes mencionadas.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 La nanotecnología en la agricultura

La Nanotecnología (NT) se define como el campo de las ciencias aplicadas dedicadas al control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro, es decir, partículas de dimensiones de 1 a 100 nanómetros de tamaño donde se presentan propiedades químicas y físicas únicas (Dawson 2008), hace referencia a la integración de diferentes disciplinas científicas capaces de crear y desarrollar nuevos materiales, aplicaciones entre ellas la industria del agro, estructuras funcionales y aparatos a escala nanométrica (Ghormade *et al.*, 2011). Para tener una idea de lo que estamos hablando, la medida *Nano* equivale a 70 mil veces menos que la espesura de un cabello. La NT trabaja claramente con materiales estructurados en escala nanométricas o sea nanoestructuras. La aparición de la NT y el desarrollo de nuevos nano dispositivos y nanomateriales abren nuevas aplicaciones potenciales en la agricultura y la biotecnología, representa una de las innovaciones científicas, y en muchos sentidos, la de mayor alcance en lo referente a la alta tecnología para la agricultura y los alimentos frescos (Gruere, 2012).

La agricultura es un área donde las nuevas tecnologías se aplican para mejorar el rendimiento de los cultivos. Nano agricultura implica el empleo de NPs en la agricultura, considerando que estas NPs impartirán algunos efectos beneficiosos para los cultivos. Es así que la nanotecnología da respuesta a los medidas actuales de la tecnología en formulaciones agroquímicas: minimiza el uso de solventes orgánicos y eleva la eficiencia de los ingredientes activos desde la fórmula, y no desde la dosis.

A pesar de que las aplicaciones de la NT son abundantes, en el sector alimentario y agrícola son pocas, debido a que la nanociencia se encuentra en un estado emergente. Una visión general de más de 800 productos de consumo basados en NT que están actualmente disponibles a nivel mundial, sugiere que sólo alrededor del 10% de ellos son alimentos, bebidas y productos de envasado de



alimentos. Sin embargo, los productos y aplicaciones derivados de la NT de estos sectores han ido en constante aumento en los últimos años, y se prevé que siga creciendo rápidamente en el futuro (Mendoza y Rodríguez, 2007). Se estima que a partir del año 2014, más del 15 por ciento de todos los productos en el mercado mundial tendrá algún tipo de nanotecnología incorporada en su proceso de fabricación.

La NT tiene el potencial de revolucionar las vigentes tecnologías utilizadas en diversos sectores, puede tener soluciones concretas contra muchos de los problemas relacionados con la agricultura, como el control de plagas de insectos utilizando los métodos tradicionales, los efectos adversos que provoca la sustancia química que contienen los pesticidas y la transferencia de genes mediada por NPs que sería útil para el desarrollo de variedades mejoradas de cultivos resistentes a plagas de insectos, etc. (Azeredo *et al.*, 2009). Los nanomateriales en diferentes formas se pueden utilizar para la gestión eficiente y las formulaciones de insecticidas y plaguicidas potenciales. Por lo tanto, puede concluirse también que la NT puede proporcionar alternativas verdes y ecológicas para el manejo de plagas de insectos sin dañar la naturaleza. (Rai e Ingle, 2012).

Sager, (Diciembre, 2013) miembro de la Fundación Argentina de Nanotecnología (FAN) asegura que en la agricultura la NT ayuda a mejorar desde la maquinaria utilizada en la producción, a través de superficies de contacto, optimizar la resistencia al desgaste con mejor respuesta a procesos de oxidación, hasta mecanismos de entrega de productos plaguicidas o fertilizantes en dosis mínimas y eficientes que reduzcan la contaminación ambiental.

Las NPs metálicas, dan un nuevo reto ambiental para los científicos y para los ambientalistas en todo el mundo, el uso de nanotecnología en la agricultura ha sido más teórica, pero ha empezado a tener un efecto significativo en las principales áreas de la industria de alimentos, en plantas se ha utilizado para combatir las infecciones patogénicas, suplementos de nutrientes y como reguladores de crecimiento (Thul *et al.*, 2013).

En la industria de la tecnología medioambiental, los nanomateriales permiten nuevos medios de reducir la producción de residuos, el uso de los recursos con más moderación, y hasta limpieza de la contaminación industrial, el abastecimiento de agua potable, y la mejora de la eficiencia de la producción y uso de energía. También ayudará a la industria agrícola para luchar contra diferentes patógenos de los cultivos, lo que aumentará la eficacia de los pesticidas e insecticidas disponibles en el mercado y también reducir el nivel de dosis requerido para las plantas de cultivo (Rai *et al.*, 2012).

Las NPs son materiales que son lo suficientemente pequeños como para caer dentro del rango nanométrico ( $10^{-9}$  a  $10^{-12}$ ), teniendo sus dimensiones de menos de unos pocos cientos de nanómetros. Estos materiales pueden ser usados para liberar pesticidas o fertilizantes en un momento y orientación específico. Logrando de esta manera aplicar sustancias en áreas muy localizadas que podrían reducir el daño a otros tejidos de la planta y a la vez en cantidades pequeñas reduciendo así el efecto adverso al medio ambiente (Srilatha, 2011).

Mediante la NT se elaboran NPs metálicas y de polímeros capaces de unirse a biomacromoléculas específicas que son de interés significativo, ya que las NPs pueden ser utilizadas como aditivos de películas plásticas para bioespacios en agricultura protegida, para empaques plásticos de alimentos, así como para elaborar materiales funcionales de bajo costo y estables para la medicina, para direccionar los fármacos a sitios específicos, para usarse en biosensores, en diagnóstico y como antimicrobiales de toxinas, bacterias, hongos y virus (Adner *et al.*, 2013). Es decir, el nanocompuesto es factible para la fabricación de diversos productos poliméricos incluyendo películas para emplearse en embalaje y posiblemente en acolchado para suelos, túneles, microtúneles e invernaderos.

En los últimos años se ha incorporado los plásticos a la agricultura con buenos resultados, la inserción de NPs de acilla, oro, plata, cobre, aluminio, almidón, etc., han mostrado que descargan a las cubiertas plásticas del invernadero propiedades deseables para el mejor desarrollo del cultivo y como consecuencia una mejor producción (Agam *et al.*, 2007). A la fecha, la población mundial que está

demandando alimentos es de 6,768 millones y de acuerdo con proyecciones de estadísticas la población continuará creciendo hasta el 2050, sin embargo, la superficie de siembra se ha estancado debido a que ya no existen más áreas que se estén abriendo a la agricultura, por lo que deberemos incrementar la eficacia en el uso de los recursos para aumentar la productividad agrícola bajo condiciones de agricultura protegida en bioespacios, incluyendo invernaderos, túneles, casasombras, etc. (FAO, 2012). En el horizonte, algunos eventos prometen traer más complicaciones. Entre ellos la utilización de invernaderos de alto costo para la producción de hortalizas, los cambios ecológicos empujados por el calentamiento global, la contaminación y las enfermedades patogénicas detectadas en la población por el consumo de hortalizas contaminadas (Costa *et al.*, 2002).

Las NPs se han explorado en el uso de acolchados plásticos, ya que actúan como filtros para controlar la longitud de onda incidente y de esta forma se controla la temperatura y la radiación solar, también en las aplicaciones de acolchados plásticos se han explorado en la encapsulación de nutrientes dentro de la película y los liberan de manera progresiva durante su aplicación, o bien se pueden incorporar NPs de plata que pueden tener una acción bactericida o fungicida, reduciendo así el efecto adverso de microorganismos patogénicos que afecten el sistema radicular de las plantas.

Con la utilización de las diferentes películas para invernaderos y mallasombras conteniendo NPs en su formulación que les proporcionen mayor fuerza tensil resistencia (Nagalingam *et al.*, 2010), se pueden reducir costos e incrementar significativamente los rendimientos unitarios de manera competitiva a los sistemas de producción de invernaderos que con películas de plástico tradicional, logrando en la mayoría de los casos menor costo energético y mayor rentabilidad por tonelada producida así como mayor durabilidad de los materiales empleados (Lamont, 2005).

Un problema, al que se enfrentan muchos agricultores que utilizan invernaderos son las elevadas temperaturas en los meses de verano, lo que provoca numerosos efectos adversos como: estrés fisiológico, aborto floral, disminución de rendimiento y calidad de las hortalizas, ennegrecimiento de pétalos en flores de

corte, quemaduras en plántulas y otros más. Para contrarrestar lo antes señalado los agricultores tienen que utilizar pantallas metalizadas, mallasombras, sistemas de nebulización o encalar las cubiertas del invernadero, con el subsecuente incremento en los costos para la adquisición de las mallas y pantallas o la disminución de la vida útil de las películas de PE. Existen otros plásticos modernos los cuales contienen NPs de cobre o plata que confieren propiedades antimicrobiales y son de larga vida útil, lo cual presentan grandes beneficios al agricultor (Delgado *et al.*, 2013).

La NT es tan importante porque podría tener el potencial para resolver muchos de los problemas de la humanidad. Si se desarrolla de forma responsable, la NT podría resolver problemas en los países más pobres del mundo tan importantes como enfermedades, hambre, falta de agua potable. Si se desarrolla de forma no responsable, la NT podría ser algo muy peligroso, permitiendo la fabricación de armas muy pequeñas con una fuerza de destrucción inimaginable. Algunos expertos creen que su impacto sobre nuestra vida será tan importante como en su día fue el impacto de la medicina o el impacto de las computadoras

### **3.2 Uso de nanopartículas**

A inicios de la década del año 2000, aproximadamente la era nanotecnológica comenzó a generarse en los laboratorios textiles del mundo y junto con la era de la alta tecnología, consiguieron un mayor avance en calidad y beneficios. La NT Podría clasificarse en cuatro grupos por beneficios: a) Estética, ya que permite que las piezas puedan resistir derrames de líquidos sin ser absorbidos, que no se arruguen y sean anti-manchas. b) Terapéuticos, hidratantes, prevención de varices y estrías, tonificador muscular y equilibrador molecular. c) Fármacos, administración de vitaminas y remedios. d) Protectores, bactericida, protector de rayos UVB/UVA, protector contra la polución y gases nocivos (Quintili, 2012). Las NPs, ya sean de nanopolvo, nanoracimo, o nanocrystal, es una partícula microscópica que cuenta con dimensiones en el rango de entre 1 y 100 nm.

La Iniciativa Nacional de Nanotecnología del gobierno de los Estados Unidos ha dispuesto de cantidades enormes de financiamiento exclusivamente para esta investigación de las NPs (Alam *et al.*, 2013). Los materiales nanoestructurados son una clase general de estos materiales con una microestructura modulada de cero a tres dimensiones con un tamaño de escala menor de 100 nm. Son materiales con átomos agrupados ordenadamente según sea el tamaño nanométrico, los cuales son la base para construir estructuras mayores de este tipo de materiales.

Un material nanoestructurado es aquel material que está constituido por partículas primarias nanométricas y presentan una elevada uniformidad (homogeneidad) de tamaños, estructuras, etc. Los nanocompuestos poliméricos, es la mezcla de una matriz polimérica con inclusiones de partículas: orgánicas o inorgánicas de escala nanométrica. Existen tres categorías básicas de los nanomateriales dependiendo de las dimensiones espaciales del material: nanopartículas, nanotubos y nanolaminillas (Bharat, 2010). Los nanocompuestos son una nueva generación de polímeros emergente en todos los aspectos de nuestras vidas. Ellos muestran una gran promesa para aplicaciones potenciales como de alto rendimiento en materiales biodegradables, que son nuevos tipos de materiales basados en plantas, animales, y otros materiales naturales (Ruixiang *et al.*, 2008).

El uso principal de las NPs en la industria alimentaria se debe a su actividad antimicrobiana, por ejemplo el dióxido de titanio, es un colorante alimentario que puede utilizarse como barrera de protección en el envasado de alimentos o las NPs de plata utilizadas como agentes antimicrobianos en los paneles de los refrigeradores y frigoríficos, así como en los recipientes de almacenamiento, líneas de envasado y otras superficies destinadas a entrar en contacto con los alimentos, estos materiales pueden ser usados para liberar pesticidas o fertilizantes en un momento y orientación específico logrando de esta manera aplicar sustancias en áreas muy localizadas que podrían reducir el daño a otros tejidos de la planta y a la vez en cantidades pequeñas reduciendo así el efecto adverso al medio ambiente (Srilatha, 2011).

Procesos como la nanoencapsulación muestran el beneficio de un uso más eficiente y un manejo más seguro de los plaguicidas con menor exposición al medio ambiente que garantiza la eco protección (Chinnamuthu y Boopathi, 2009). Además, las NPs son usadas para propósitos de limpieza en agua y suelos, aun así, los cultivos no están excluidos, resultando en la exposición potencial para el consumidor (Bouwmeester *et al.*, 2009).

Por otra parte, la salud y el medio ambiente necesitan un mayor estudio sobre los riesgos planteados por la exposición a las NPs de ingeniería. En la actualidad, los esfuerzos de investigación apenas están comenzando, y menos del 4 % de todos los actuales gastos de investigación gubernamentales estadounidenses sobre nanotecnología están dirigidos a estudiar los efectos sobre la salud humana y el medio ambiente (Kumar *et al.*, 2012). Una vez más el potencial del medio ambiente sobre los impactos de la exposición a los nanomateriales son aún menos entendidos que los efectos en la salud humana. Por lo tanto, se requieren más y extensos estudios para comprender el mecanismo de los nanomateriales y su impacto en el medio ambiente natural. Los efectos de la exposición a las NPs de ingeniería puede ser diferente de los efectos causados por las NPs de origen natural (Nair *et al.*, 2010).

### **3.3 Propiedades antimicrobiales de las nanopartículas**

Las NPs que se producen a partir de metales como oro, cobre y plata presentan además características eléctricas, ópticas y microbianas. Estas últimas permiten visualizar su aplicación efectiva en dispositivos electrónicos, catalizadores, sensores y productos bactericidas, entre otros. Además su síntesis da lugar a mezclas de diferentes tamaños y morfologías. El uso principal de las NPs en la industria alimentaria se debe a su actividad antimicrobiana, por ejemplo el dióxido de titanio, es un colorante alimentario que puede utilizarse como barrera de protección en el envasado de alimentos o las NPs de plata utilizadas como agentes antimicrobianos en los paneles de los refrigeradores y frigoríficos, así como en los

recipientes de almacenamiento, líneas de envasado y otras superficies destinadas a entrar en contacto con los alimentos (Begum *et al.*, 2010).

Las NPs orgánicas se emplean principalmente para mejorar el valor nutritivo de los alimentos, utilizándose como vehículo para la liberación de vitaminas y otros nutrientes en nanocápsulas (Zhang *et al.*, 2006). Mediante el uso de NPs metálicas, se direccionan los fármacos a sitios específicos, para usarse en biosensores, en diagnóstico y como antimicrobiales de toxinas, bacterias, hongos y virus (Adner *et al.*, 2013).

### **3.4 Nanopartículas de cobre (NPsCu)**

Las NPs de diferentes metales han sido aplicadas en optoelectrónica, nanodispositivos, la nanoelectrónica, nanosensores, almacenamiento de información y la catálisis. Entre las diversas partículas de metal, las NPs de cobre han tenido más atención debido a sus aplicaciones antibacterianas y antifúngicas (Scarascia *et al.*, 2006). Las NPs de cobre han atraído mucho la atención en los últimos años por ser un metal semiconductor, por sus propiedades físicas, químicas, antimicrobianas, así como por su abundancia (Betancourt *et al.*, 2013). Además, el cobre posee un importante papel biológico en el proceso de fotosíntesis de las plantas, aunque no forma parte de la composición de la clorofila. El cobre contribuye a la formación de glóbulos rojos y al mantenimiento de los vasos sanguíneos, nervios, sistema inmunitario y huesos. Por tanto, es un oligoelemento esencial para la vida humana y tiene un gran potencial para emplearse en desarrollos tecnológicos sustentables y las NPs de cobre ya han demostrado su acción antibacterial en patógenos de humanos y enfermedades (Baba, 2006).

Cuando el cobre está en un estado de oxidación ( $\text{Cu}^{2+}$ ), es altamente efectivo como antimicrobial debido a la interacción con ácidos nucleicos, sitios activos enzimáticos y componentes de la membrana de las células que causan la enfermedad. Más aun, ha sido demostrado que el cobre tiene la habilidad de reducir el índice de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* como un agente microbial en

más de 99.99%, ya que le causa daño a las paredes de las células y altera su contenido celular negativamente (Cioffi *et al.*, 2005).

El cobre ha sido de interés particular porque a diferencia de otros metales antimicrobiales, presenta un espectro amplio de acción contra bacterias y hongos. De acuerdo a una investigación las NPs de óxido de cobre resultaron efectivas matando un rango de bacterias patogénicas involucradas en infecciones contraídas en hospitales, en comparación con NPs de plata (Ren *et al.*, 2008).

La eficacia del cobre depende de las condiciones del medio ambiente, la concentración de iones de cobre y el tipo de microorganismos. Dada la efectividad del cobre contra organismos patógenos asociados con enfermedades de plantas y animales, ha sido utilizado ampliamente en el sector agropecuario como pesticida desde hace miles de años y últimamente como promotor de crecimiento vegetal. (Buzea *et al.*, 2007). Los metales plata y cobre son tradicionalmente bien conocidos como materiales antimicrobiales. Se ha considerado que estos metales reaccionan con proteínas combinando el grupo de enzimas SH, dada esta reacción se hace la inactivación de proteínas, cuando estos materiales son preparados en la forma de pequeñas partículas, se espera que resulten con mejores características antimicrobiales porque tienen un área de aplicación específica (Yoon *et al.*, 2007).

### **3.5 Nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO)**

Comparado con materiales orgánicos, los materiales inorgánicos como lo es el óxido de zinc poseen una superior durabilidad, una mejor selectividad y resistencia al calor. Además el zinc es un elemento mineral esencial para la salud humana. ZnO es una forma en diaria de suplemento del zinc. Además las NPs de óxido de zinc tienen también una biocompatibilidad con las células humanas (Padmavathy *et al.*, 2008).

La actividad antibacteriana y antifúngicas del uso de NPs en especial el uso de NPs de óxido de zinc, se han demostrado en las investigaciones recientes. Es cierto que entre más pequeño sea el tamaño de la partícula de ZnO, más fuerte es su



actividad antimicrobial (Yamamoto, 2001). En métodos como el ensayo de conductividad indirecta se han usado para investigar la mínima actividad antibacterial de polvos cerámicos, entre estos las NPs de óxido de zinc se encuentran en la vanguardia de la investigación debido a sus propiedades únicas y aplicaciones generalizadas (Zänker y Schierz, 2012).

La ventaja de usar NPs de óxido de zinc es que estas inhiben fuertemente la acción de microbios patogénicos cuando se usan en concentraciones pequeñas, puesto que poseen actividades antifúngicas y antibacteriales a bajas concentraciones, además el uso de NPs de óxido de zinc no afecta la fertilidad del suelo en comparación con los agentes antifúngicos tradicionales (Ruparelia *et al.*, 2008).

### **3.6 Nanopartículas de plata (NPsAg)**

Una de las grandes ventajas de utilizar plata es que actúa como agente antimicrobiano, sus propiedades antimicrobianas ya se explotaban antiguamente con la medicina tradicional (Behera *et al.*, 2011). Razón por la cual se incorpora para la fabricación de materiales de envasado, también no guarda olores, además que no presenta problema alguno de descomposición a las temperaturas de extrusión de los plásticos, sin dejar de mencionar su volatilidad (Layani *et al.*, 2012).

La actitud de los consumidores respecto a la buena higiene y de vida activa, ha creado un creciente mercado de textiles antimicrobianos, que a su vez ha estimulado la investigación intensiva y el desarrollo de trabajos con NPsAg. El crecimiento de microbios en los textiles durante el uso y su almacenamiento afecta negativamente al usuario, así como el propio textil. Estos autores reportan que los más recientes desarrollos en los tratamientos antimicrobianos de textiles están utilizando diversos agentes bioactivos como plata, sales de amonio cuaternario, el triclosán, el quitosán, tintes y compuestos N-halamina regenerables y peroxiácidos. El efecto perjudicial pueden ser controlados por una acción antimicrobiana duradera

mediante los textiles con biocidas de amplio espectro o mediante la incorporación de productos biocidas en fibras sintética durante la extrusión (Gao y Cranston, 2008).

Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. Estas NPs pueden aplicarse junto con un recubrimiento biodegradable en los frutos, mediante la inmersión de los mismos en la solución formadora de recubrimiento (Aguilar, 2009).

### **3.7 El cultivo de tomate**

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pertenece a la familia de las Solanáceas, es un cultivo alimentario y es originario de América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México y aparentemente su nombre deriva de la lengua Náhuatl de México. Actualmente se ha convertido en la gran hortaliza del siglo XXI, tanto en cultivo comercial como en los huertos familiares. Debido a su nivel de consumo relativamente alto, el tomate interviene en gran parte en el aporte de vitaminas y sales minerales en la alimentación. Es un cultivo anual y su fruto es una baya normalmente ovalada a redonda y su tamaño desde frutos muy pequeños hasta frutos de 750 gr es un cultivo de estación cálida en el cual las variedades ya sean indeterminadas o determinadas pasan por las mismas etapas fenológicas. (SAGARPA, 2010).

La producción y consumo de tomate en el mundo ha crecido dramáticamente en las dos décadas pasadas. A pesar de la significación nutricional del tomate como fuente de vitaminas A y C, su consumo per cápita es aproximadamente cuatro veces mayor en los países desarrollados comparados con los países en desarrollo. En muchas partes del mundo, el tomate sigue siendo un cultivo menos de consumo de

lujo, y existen todavía importantes oportunidades para incrementar su contribución al bienestar en la nutrición de la humanidad.

Se usa aproximadamente 75 % de la producción global de tomate para el consumo fresco, mientras que el 25 % es para propósitos industriales. China fue el principal productor en el mundo, aportando un 36%, le sigue Estados Unidos con 14 % y Turquía 12 %, mientras que México ocupó el doceavo lugar con 3 % de participación en la producción (SAGARPA, 2010).

México a pesar de no ser el principal productor, ocupa el primer lugar como país exportador de tomate fresco a nivel mundial, en 2013 generó 15,045,508.72 mdp. Dentro de los principales estados de México que producen tomate rojo se encuentra Sinaloa, Baja California, Jalisco, Baja California Sur, Zacatecas y Michoacán, registrando un volumen de producción de 2,134,839 ton/año (SHCP, 2014).

La importancia de esta hortaliza viene a ser la más consumida después de la papa en todo el mundo, tanto en fresco como después de transformación, el consumo por individuo, no deja de aumentar a escala mundial y es probable que la demanda de tomate continúe aumentando, debido al crecimiento de la población humana y a la duración de conservación, que permite el transporte a larga distancia, la diversificación de los tipos variedades y los cambios alimentarios que orientan al consumidor hacia productos como esta hortaliza (Blancard *et al.*, 2009).

### **3.7.1 Enfermedades del tomate**

En México, la producción del cultivo es afectada por diversos organismos patógenos causantes de siniestros parciales o totales (Ruiz, 1994). Dentro de estos se encuentran hongos, bacterias, virus y nematodos, cuyos daños pueden variar de acuerdo a la región en que se ubiquen (Sandoval, 1993). Las enfermedades constituyen el factor limitante en la producción de tomate en muchas partes del mundo cuando no se utilizan las medidas debidas para su control, existen cerca de

200 enfermedades del tomate de diversas causas y etiologías, para cuyo control se utilizan cultivares resistentes, así como medidas de exclusión, erradicación y protección en el contexto de un programa de control integrado (Nuez, 2001).

Si el estado nutritivo de la planta se encuentra desequilibrado, ésta se pone más susceptible a las plagas y enfermedades. Por ejemplo un desequilibrio por exceso de nitrógeno hará que la planta crezca rápido, y debido a que las células nuevas son relativamente débiles, ellas son más susceptibles a insectos penetrantes. Para que la enfermedad pueda desarrollarse es necesaria la presencia de un huésped, un agente patogénico, y del ambiente adecuado.

Un desequilibrio por deficiencia de calcio es también un factor que conduce a que la planta tenga células y frutos más débiles que las hacen más susceptibles a agentes patogénicos como los hongos (Chen *et al.*, 2001).

Las esporas de los hongos son diseminadas fácilmente por el viento, la lluvia, las salpicaduras de agua, por personas, animales y plantas. Los hongos sobreviven en plantas vivas o muertas, en suelo y en o sobre insectos y no cabe duda de que las enfermedades constituyen una amenaza para los cultivos en todos los sitios en los que se encuentra, esta es la razón por la que los seleccionadores han realizado tantos esfuerzos para mejorar la resistencia.

Entre los patógenos que atacan al cultivo de tomate con mayor frecuencia en nuestro país, se encuentran; marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum*), la sarna bacteriana causada por varias especies de *Xanthomonas*, el chancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis*) puede ser devastador cuando se transmite mecánicamente durante las operaciones culturales. (Blancard *et al.*, 2009). El chancro negro (*Alternaria alternata*, *Alycopersici*), antracnosis (*Colletotrichum* spp.), podredumbre del fruto (*Phytophthora parasitica*), fusariosis (*Fusarium oxysporum*), mildiu (*Phytophthora infestans*), el moho gris o podredumbre causado por el hongo *Botrytis cinerea* y entre otras, una de las enfermedades que provoca daño severo es *Phytophthora capsici*, causante del tizón en tomate.

### **3.8 *Phytophthora capsici***

#### **3.8.1 Características del patógeno**

*Phytophthora capsici* fue descrita por primera vez por Leon H. Leonense en Nuevo México, USA, por la Estación de Investigación Agrícola en Las Cruces en 1922 (Satour y Butler, 1967). En griego, *P. capsici* significa "destructor de plantas de pimientos" (Bosland, 1991). En condiciones de campo, *P capsici* se ha encontrado por afectar a una amplia gama de los ejércitos en las familias *Cucurbitaceae*, *Fabaceae* y *Solanaceae*, incluyendo: melón, pepino, sandía, pimiento, tomate, ejotes, frijol y limón.

La enfermedad se produce inicialmente en las zonas bajas de los campos donde se acumula el agua, a menudo lleva a los productores a creer que el retraso del crecimiento y la muerte del cultivar se deben a la acumulación de agua. *P. capsici* crece mejor a 80 °F. Se propaga rápidamente en condiciones húmedas cálidas y sus estructuras de soporte de esporas asexuales son llamadas esporangios estas se propagan por el agua de riego, el agua de drenaje, y la lluvia las cuales indirectamente germinan y liberan zoosporas (Monar y Ronald, 2006).

Una importante Investigación de este hongo fue realizada por Hausbeck y Lamour (2004), cuando las pérdidas de cosechas debido a *P .capsici* amenazaban con la quiebra a numerosos productores de hortalizas en Michigan que potencialmente podrían poner en peligro 134 millones de dólares el valor de los cultivos de hortalizas. A escala mundial *P .capsici* es una importante enfermedad ya que es potencialmente la enfermedad más destructiva de pimientos en España (Plata *et al.*, 2006).

#### **3.8.2 Daños causados por *Phytophthora capsici***

Este Oomyceto afecta a una amplia gama de solanáceas y curcubitáceas en todo el mundo. Satour y Butler informaron que 45 especies entre plantas y malezas, que representan a 14 familias en total de plantas con flores, son susceptibles a

*P.capsici* (Satour y Butler, 1967). El cultivo del frijol, haba y soya fueron reportados como “inmunes”, tiempo después se reportó que bajo condiciones de invernadero eran altamente favorable para la infección, ya que este hongo fue aislado de cinco cultivares comerciales de frijol en Delaware, Maryland y Nueva Jersey (Davidson *et al.*, 2002). *P .capsici* causa la marchitez permanente hasta que la planta muere. Las plantas presentan seguido un color marrón, pudrimiento, necrosis y un retraso general en el crecimiento.

En el cultivo de tomate *P .capsici* se presenta causando infecciones de la corona, la mancha foliar y un tizón foliar en el fruto. La planta puede llegar a caerse de la pudrición de la corona y del mismo modo otro posible síntoma es que el fruto presenta podredumbre con los patrones de anillos concéntricos. Un clima extremadamente lluvioso que satura al suelo durante períodos prolongados puede provocar una severa podredumbre en la raíz y corona la cual mata a las plantas de tomate aún y así estén establecidos (Leonian, 1922).

### **3.9 *Rhizoctonia solani***

#### **3.9.1 Características del patógeno**

*Rhizoctonia solani* Kühn es un patógeno de distribución cosmopolita nativo del suelo, que afecta a un gran número de hospederos, principalmente cultivos anuales, es una plaga que recibe generalmente el nombre de Damping off, entre otros como mal de los almácigos, cancro del cuello, costra negra o podredumbre negra de la raíz (Santillán, 2012). Es uno de los más importantes patógenos fúngicos transmitidas por el suelo que se desarrolla tanto en suelos cultivados y no cultivados, causando enfermedades en diferentes cultivos como el arroz, frijol y tomate, entre otros (Sneh *et al.*, 1991).

Es un hongo que corresponde a la Clase de Basidiomycetes, es saprofita sobre restos orgánicos, como parásito en las raíces y otros órganos de plantas y, en forma pasiva, como esclerocios. El hongo puede infectar en muy distintas

condiciones de temperatura y humedad, pero como patógeno relativamente débil ataca principalmente en tejido estresado y debilitado del hospedante. El ataque en los frutos se produce en condiciones húmedas y calurosas. (Trias *et al.*, 2008).

*Rhizoctonia solani*, una vez introducido, permanece allí indefinidamente. Su distribución en los suelos a menudo es irregular, pero se encuentra predominantemente en los superiores de 15 a 20 cm del perfil del suelo como micelio o esclerocios, o en los restos orgánicos. Los Hospederos principales de este patógeno son papa alfalfa, kiwi, maní, pimiento, soya, sorgo, tabaco y tomate.

### **3.9.2 Daños causados por *Rhizoctonia solani***

La severidad de la enfermedad depende de la temperatura, de la humedad del suelo y de los exudados de la planta y sus raíces, los cuales se han encontrado que estimulan el crecimiento del micelio. La infección de las plantas por este hongo es más severa cuando el crecimiento es lento, crecen mejor en suelos moderadamente húmedos que en suelos secos. El desarrollo del hongo se produce entre los 9 y 27 °C, el rango óptimo es de 15-20 °C (Agrios, 2005; Carling *et al.*, 1990). El patógeno se mantiene de una temporada a otra en forma de esclerocios en el suelo y como micelio en restos vegetales en el suelo (Roberts y Boothroyd 1978).

En el cultivo de tomate, *R. solani* produce el cancro del cuello ataca en plántula y en estadios más avanzados de desarrollo puede manifestarse como podredumbre de las raíces, con lesiones oscuras de las mismas, o bien como canchros del tallo a nivel del suelo. Los canchros son lesiones necróticas de color pardo que profundizan en el tejido y pueden abarcar porciones más o menos extendidas de la circunferencia del cuello causando marchitamiento, debilitamiento, detención del crecimiento y muerte de la planta.

Los frutos en contacto con el suelo o cercanos al mismo, pueden desarrollar una podredumbre parda con bandas concéntricas más claras y más oscuras alternadas. Estas lesiones se expanden y pueden presentar hendiduras en forma de

estrella; son primero firmes pero luego se transforman en una podredumbre húmeda. Los frutos verdes son más resistentes que los frutos maduros. Las Infecciones iniciales en el momento de la cosecha pueden manifestarse recién durante el transporte y la comercialización (Brandán *et al.*, 2009).

### **3.10 *Xanthomonas axonopodis***

#### **3.10.1 Características del patógeno**

Estas bacterias causan enfermedades en una amplia gama de especies vegetales. Sin embargo cada cepa causa la enfermedad en un número limitado de plantas huésped. Las cepas de la misma especie que causan el mismo tipo de síntoma en el mismo rango de hospederos, se clasifican en la misma patovar (Alavi *et al.*, 2008).

Es un agente causante de tizón bacteriano común del frijol. Esta enfermedad tiene una distribución mundial y sigue siendo uno de los la mayoría de los elementos disuasorios para la producción de frijol que justifican que estos patógenos se clasifican en las listas de cuarentena en los países que todavía están libres de la enfermedad, la bacteriosis induce síntomas en hojas, tallos y vainas del frijol común.

Es una bacteria Gram negativa (0.4 a 0.9  $\mu$  diámetro; 0.6 a 2.6  $\mu$  de longitud), móvil con un solo flagelo polar y aeróbica, y las colonias son convexas, de color amarillo brillante, con actividad lipolítica e hidrolizan gelatina, caseína y almidón (Cruz *et al.*, 2001). La temperatura óptima de desarrollo está entre 28 y 30 °C. Alavi *et al.* (2007) señalan que el crecimiento de la bacteria patógena en un medio de cultivo, produce un pigmento de color café después de 24 horas en el medio de cultivo YCDA (levadura, dextrosa, carbonato de calcio).

#### **3.10.2 Daños causados por *Xanthomonas axonopodis***

Después de una infección en el campo, aparecen en la hoja áreas pequeñas, llenas de agua, rodeado por una zona relativamente pequeña de tejido de color



amarillo limón. Estas lesiones se vuelven de un color café marrón, la hoja presenta rápidamente necrosis y puede aparecer la defoliación. La cosecha enferma adquiere un aspecto quemado, lo que la distingue de las infecciones de tizón de halo en el que el cultivo aparece generalmente más amarillo.

Es una infección sistémica, se produce la coloración marrón rojiza de las venas y la apariencia de agua en los tejidos cercanos. Si la infección de la hoja comienza en el pecíolo, la vena principal y sus ramas superiores aparecen al principio y más tarde empapada en agua toma un color rojo ladrillo. Los síntomas del tizón común bacteriano son manchas foliares necróticas irregulares rodeadas por un delgado halo amarillo. Estas manchas pueden desarrollarse en el borde o en diferentes áreas de las hojas. La enfermedad se transmite a la planta a partir de semillas infectadas (Francisco *et al.*, 2014).

### **3.11 *Clavibacter michiganensis***

#### **3.11.1 Características del patógeno**

Es un bacilo Gram positivo, no móvil, aeróbico, colonias de color amarillo claro a naranja, mucoide, cuya temperatura óptima de crecimiento *in vitro* es de 25 a 28 °C. La bacteria se transmite por semilla infectada y posteriormente penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátides de la hoja (Kleitman *et al.*, 2008).

*Clavibacter michiganensis* spp *michiganensis* (Cmm) genera la enfermedad denominada “ojo de pájaro” o “cancro bacteriano del tomate” en la familia de las solanáceas como el tomate, chiles, berenjena y papa es una enfermedad que causa la muerte prematura de la planta y severas pérdidas en el rendimiento, presentándose en otras solanáceas, pero solamente en el tomate representa importancia económica (Nazari *et al.*, 2007).

### **3.11.2 Daños causados por *Clavibacter michiganensis***

Esta bacteria ha causado pérdidas serias a las cosechas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) en invernadero y en campo cultivados a cielo abierto, matando a las plantas jóvenes o reduciendo su producción comercial (Borboa *et al.*, 2010).

Uno de los primeros síntomas presente es el marchitamiento marginal de folíolos en plantas de todas las edades. Posteriormente aparecen estrías necróticas que se extienden desde la parte inferior del peciolo hasta el punto que se une con el tallo, ya que la bacteria es un invasor sistémico de tejidos del floema, médula y corteza, finalmente la planta se necrosa y se marchita, y es característico que los bordes de folíolos inferiores aparezcan secos y curvados hacia abajo, y que luego adquieran un color castaño y necrótico con el peciolo unido al tallo. Bajo ciertas condiciones, las manchas necróticas se abren y forman canchales, como fuente de infecciones secundarias.

En tomate el cancro bacteriano se ha dispersado en el mundo y ha causado pérdidas serias a las cosechas de tomate del invernadero y del campo, porque mata plantas jóvenes y reduce la producción comercial. La reducción en la producción se puede asociar con la pérdida directa de la planta, o con frutos de menor tamaño y cantidad.

## **3.12 *Curtobacterium flaccumfaciens***

### **3.12.1 Características del patógeno**

La marchitez bacteriana del frijol, es una enfermedad causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), fue descrita por primera vez en los EE.UU., en 1921 por Hedges, causando graves problemas a la cosecha. Esta enfermedad se presenta en varios países europeos, así como en Australia, Canadá, México y Colombia. Es muy resistente a la sequedad y puede permanecer viable hasta por 24 años en semillas almacenadas en el laboratorio.

No hay reportes de vectores, pero el nematodo *Meloidogyne incognita* puede ayudar a la entrada al causar heridas una vez dentro de la planta, la bacteria coloniza el tejido vascular (Maringoni y Cassia, 2006).

### **3.12.2 Daños causados por *Curtobacterium flaccumfaciens***

Los síntomas típicos de la enfermedad en plantas de frijol son principalmente marchitamiento, oscurecimiento vascular, y la muerte de la parte sobre el suelo de la planta. Los síntomas de la enfermedad son manchas doradas y necrosis en hojas, las plantas se enraízan y marchitan las hojas jóvenes frecuentemente se empardecen y secan. Un aspecto a destacar de este patógeno es su transmisión por semilla, a veces asintomática y su extraordinaria persistencia en las mismas, de modo que ha llegado a comprobar que puede permanecer viable en las semillas durante 24 años (González, 2002).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Área de Trabajo**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Síntesis de Polímeros del departamento de Agroplasticultura del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, durante el período de Enero a Septiembre de 2014.

### **4.2 Síntesis de Nanopartículas (NPs)**

Para este estudio se utilizaron NPs de cobre y de óxido de zinc que se produjeron en los laboratorios del CIQA. La síntesis de las NPs se efectuó mediante el método de Pechini (Puente y García, 2012). El cual consistió en la elaboración de las NPs en tres concentraciones diferentes las cuales fueron óxido de zinc (ZnO) puro al 100 %, ZnO al 97.5 % dopado con plata con un 2.5 % y ZnO al 95 % dopado con plata al 5 % respectivamente. Se preparó el material precursor para la obtención de las nanopartículas, para esto se utilizaron diferentes reactivos en diferentes concentraciones los cuales son nitrato de zinc nitrato de plata, ácido cítrico, etanol glicerol y agua destilada, previamente pesados de acuerdo a una estequiometría establecida.

En general el procedimiento consistió en disolver el ácido cítrico en 60 ml de agua destilada, se agregó cada una de sales metálicas hasta tener una disolución total. Enseguida se añadió la cantidad requerida de etilenglicol y la mezcla fue puesta en agitación a temperatura de entre 120 y 140 °C hasta ser evaporada a 20 ml, después de obtener las soluciones precursoras, éstas se vertieron en cajas de papel teflón y se secaron a 130 °C por 24 h para obtener el material precursor, enseguida se molió el material seco en un mortero de ágata y posteriormente fue llevada a calcinación o tratamiento térmico a la temperatura de 700 °C durante 2 h y finalmente se obtuvo un precipitado de color blanco que corresponde a las NPs de ZnO, los

colores entre las demás NPs variaron debido al contenido de plata que tuvieran, entre más cantidad de plata el color se tornó más oscuro (Figura 1).

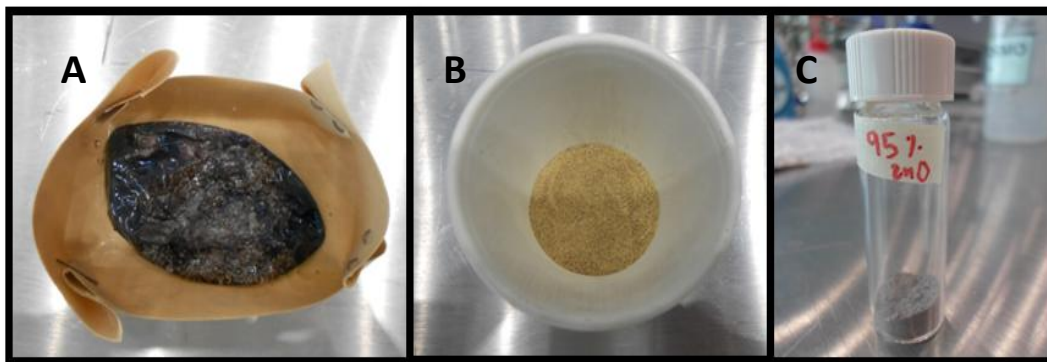


Figura 1. Síntesis de nanopartículas. A) Material primario después de salir de la estufa de secado. B) Molienda del material para ser llevado a tratamiento térmico. C) Vial con NPs de ZnO + Ag terminadas.

#### 4.3 Caracterización de nanopartículas por patrones de difracción de rayos X

Las muestras finales fueron caracterizadas por Difracción de Rayos X (XRD), usando un difractómetro Siemens D-5000 con una fuente de radiación de CuK, operando a 25mA y 35 Kv. En la Figura 2 se presenta el patrón de difracción de las NPs de ZnO, Figura 3 muestra el patrón de ZnO dopadas con Ag, 2.5% en peso y Figura 4 muestra ZnO dopadas con Ag 5% en peso respectivamente.

Para facilitar la identificación de las especies cristalinas, se incluyen ahí mismo los difractogramas reportados en el banco de datos del ICDD (International Centre for Diffraction Data). En ésta, se detectan las reflexiones características del ZnO y de Ag. Debe notarse la intensidad de los picos de Ag-ZnO y la nula existencia de reflexiones adicionales relacionadas con fases secundarias indeseables.

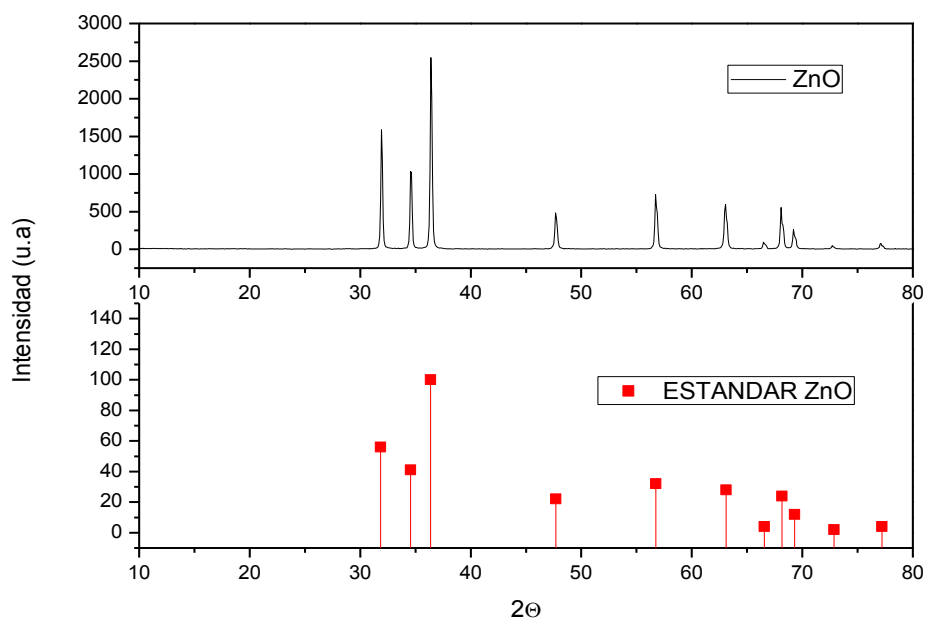


Figura 2. Difractograma del precursor obtenido para la preparación de las NPs de ZnO.

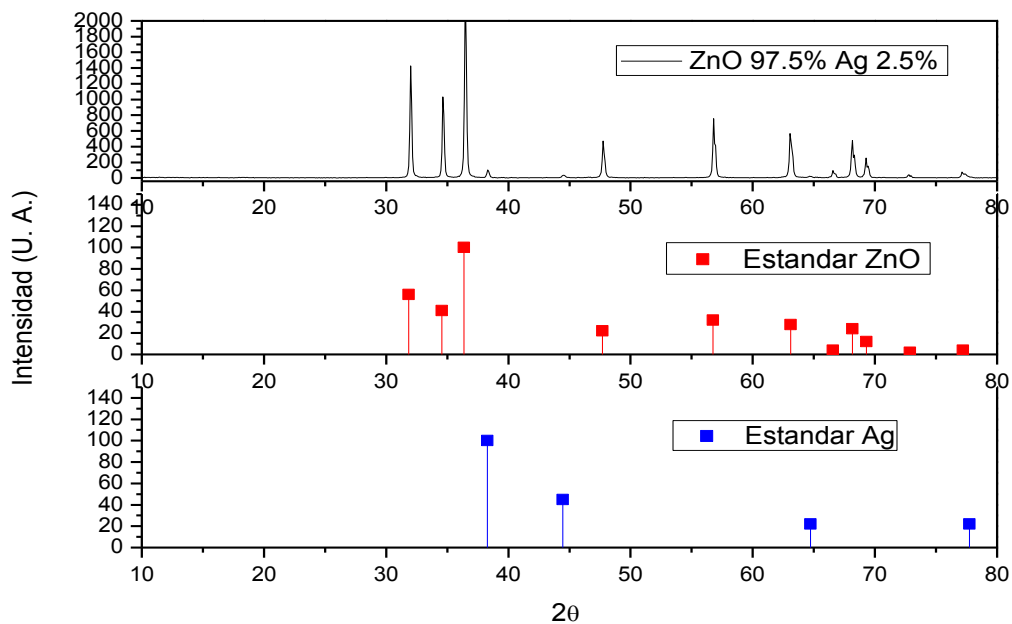


Figura 3. Difractograma del precursor obtenido para la preparación de las NPs de ZnO dopadas con Ag (2.5 % en peso).

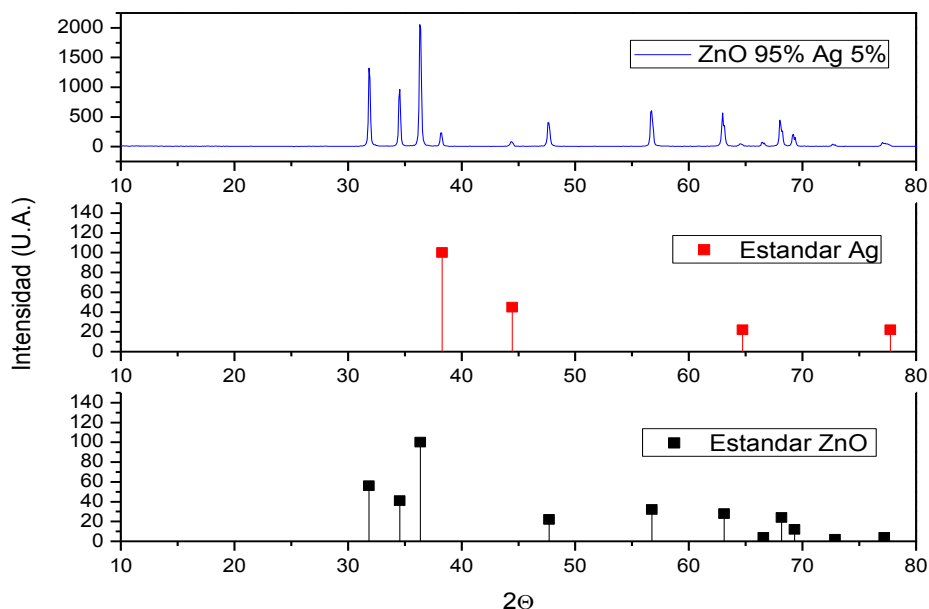
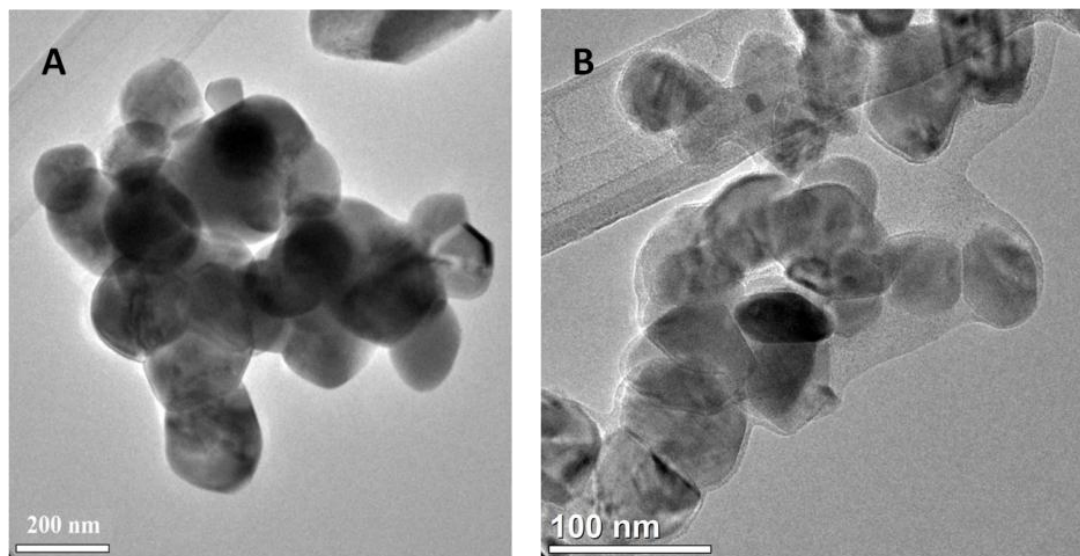


Figura 4. Difractograma del precursor obtenido para la preparación de las NPs de ZnO dopadas con Ag (5 % en peso).

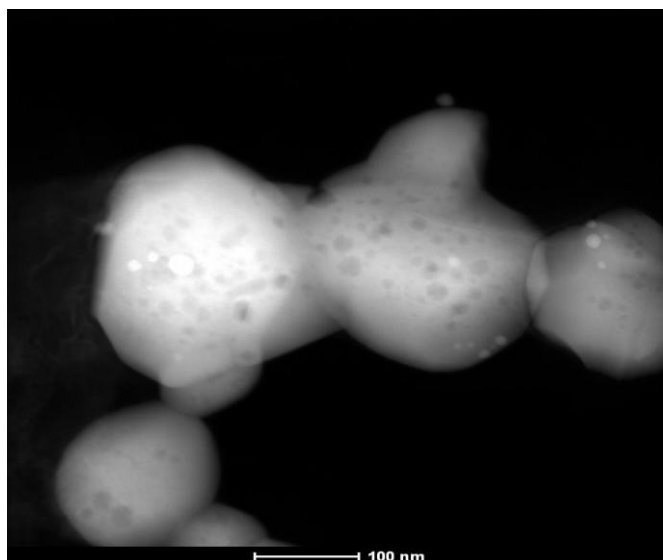
#### 4.4 Caracterización de NPs por microscopía electrónica de transmisión

Se estudió la morfología y el tamaño de las NPs usando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM) FEI TITAN. Esta caracterización de NPs de ZnO y ZnO dopado con Ag, se muestran en la Figura 3 las cuales son micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las NPsZnO (A) y en relación en peso de 90:10 de las NPsZnO + Ag (B). Se puede observar que las NPs tienen forma semiesférica y tamaños menores a 200 nm para el caso de las partículas de ZnO. Para el sistema de ZnOAg, el tamaño de las partículas es menor a 100 nm. De estas micrografías es difícil distinguir entre las partículas de ZnO y Ag, por lo que se tomaron nuevas micrografías en el modo de barrido del TEM (STEM).



**Figura 5.** Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las características visuales de las nanopartículas. (A) NPs de óxido de zinc y (B) NPs de óxido de zinc más plata.

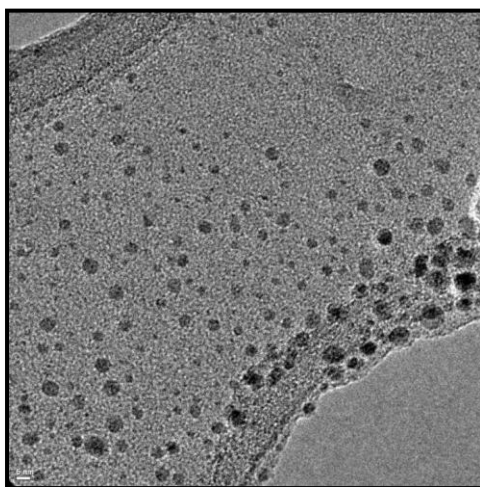
En la Figura 6 se observa la micrografía en modo STEM de la muestra de ZnOAg en la misma relación en peso ya mencionada anteriormente. Las partículas de mayor tamaño corresponden al ZnO y se observan pequeñas partículas (más brillantes) corresponden a la de plata.



**Figura 6.** Micrografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de algunas características visuales de las NPs de plata.



En la Figura 7 se muestra la micrografía TEM de las NPs de cobre su tamaño y su distribución, se presentan NPs esféricas con tamaños por debajo de 20 nm. así como la uniformidad de la distribución debido al ácido oleico unido químicamente en su superficie. La distribución del tamaño de la partícula se obtuvo midiendo el diámetro de las partículas en diferentes partes de la rejilla para así obtener un número promedio que fue de 9 nm.



**Figura 7.** Micrografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de algunas características visuales de las NPs de cobre obtenidas por descomposición térmica.

## 4.5 Bioensayos realizados

### 4.5.1 Bioensayo 1. Actividad antifúngica *in vitro* de NPs<sub>Cu</sub> y ZnO solas y dopadas con plata contra los hongos *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

Esta fue la primera parte del estudio en la cual se hicieron pruebas de antagonismo con dos diferentes microorganismos fitopatógenos, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

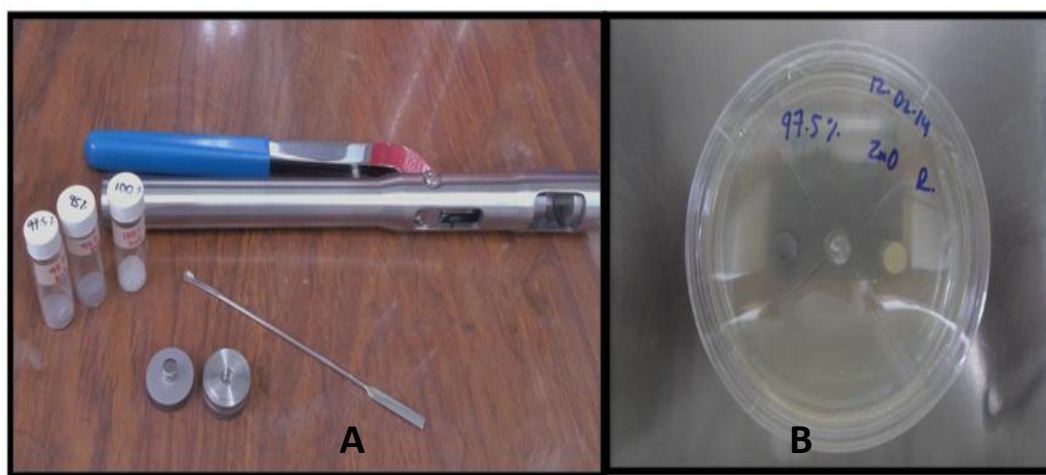
### 4.5.2 Purificación de *P. capsici* y *R. solani*

Se utilizaron cepas de *P. capsici* y *R. solani*, obtenidas de la colección del laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se sembraron en agar papa dextrosa (PDA) para multiplicarlas y obtener la cantidad necesaria para los bioensayos

### 4.5.3 Bioensayos

Para los bioensayos *in vitro* se formaron pastillas con cada una de las NPs a evaluar de un promedio de 35 mg de peso con ayuda de una prensa

Las pruebas de antagonismo *in vitro* fueron preparados de la siguiente manera: Se preparó medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se vació en cajas Petri, una vez solidificado se colocó en una parte la caja, un explante de 5 mm de diámetro de *P. capsici* y en el extremo contrario una pastilla a evaluar, se colocaron en una incubadora a  $23 \pm 25$  °C durante 5 días hasta que el testigo llenó la caja. Se realizaron 4 tratamientos con 4 repeticiones los tratamientos fueron cobre y óxido de zinc; para esta última se usaron dos diferentes concentraciones (100% y 95%) (Cuadro 1). Esta metodología fue la misma que se aplicó para *R. solani*. (Figura 8).



**Figura 8.** A) Prensa compactadora utilizada para la creación de pastillas compuestas de las diferentes NPs. B) Caja Petri preparada con una pastilla lado izquierdo y explante del hongo lado derecho.

**Cuadro 1.** Tratamientos con base de NPs de Cu y ZnO evaluados *in vitro* contra los hongos fitopatógenos *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

Tratamientos	<i>P. capsici</i>	<i>R. solani</i>
1	NPsCu 100%	NPsCu 100%
2	NPsZnO 100 %	NPsZnO 100%
3	NPsZnO 95 + 5% Ag	NPsZnO 95 + 5% Ag
4	Testigo	Testigo

**4.6 Bioensayo 2. Actividad antibacteriana *in vitro* de NPsCu y ZnO solas y dopadas con plata contra con *Xanthomonas axonopodis*, *Clavibacter michiganensis* y *Curtobacterium flaccumfaciens*.**

Se utilizaron cepas de *C. flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens*, *X. axonopodis* y *C. michiganensis*, obtenidas de la colección del laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Para reactivar cada una de las bacterias se sembraron en matraces conteniendo caldo nutritivo, se colocaron en una incubadora con agitación durante 48 h. Posteriormente se realizaron diluciones de  $1 \times 10^{-6}$  para la realización de los bioensayos se sembraron en cajas Petri conteniendo medio de cultivo King de B (KB) se colocaron 50  $\mu$ l de la dilución, se sembró por extensión en superficie utilizando una varilla de vidrio, se colocó en el centro una pastilla de NPs, se incubaron a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 48 h. Posteriormente se midió el halo de inhibición en todas las unidades experimentales con ayuda de un vernier electrónico y se estimó el porcentaje. Las NPs a evaluar contra las bacterias fueron de cobre al 100%, óxido de zinc puro (100%) y óxido de zinc dopado con plata (97.5 % y 95 %). Se realizaron 4 tratamientos con 4 repeticiones para cada uno (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Tratamientos con base de NPs de Cu y ZnO evaluados contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas axonopodis*, *Clavibacter michiganensis* y *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Tratamientos aplicados y bacterias estudiadas		
<i>X. axonopodis</i>	<i>C. flaccumfaciens</i>	<i>C. michiganensis</i>
NPsCu 100%	NPsCu 100 %	NPsCu 100 %
NPsZnO 100 %	NPsZnO 100 %	NPsZnO 100 %
NPsZnO 97.5 + 2.5 Ag %	NPsZnO 97.5 + 2.5 Ag %	NPsZnO 97.5 + 2.5 Ag %
ZnO 95 + 5 Ag %	Testigo	Testigo
Testigo		

#### 4.7 Bioensayo 3. Actividad antifúngica *in vivo* de NPsCu y ZnO dopadas con plata contra *Phytophthora capsici*.

Esta tercera fase del estudio se realizó bajo condiciones de invernadero. Se utilizaron 64 plántulas de tomate, cuando las plántulas medían de 10 a 15 cm de altura y se trasplantaron en bolsas de 5 kg conteniendo una mezcla de turba-perlita (50:50) y se colocaron en una casa sombra con riego por goteo.

El primer tratamiento en este trabajo fue aplicar NPs de Cu y ZnO (95%) preparadas a 2000 ppm en las plántulas de tomate, una vez preparada la solución de NPs sonicaron durante 30 minutos para su disolución y que esta quedara homogenizada; en seguida se aplicó a la planta correspondiente 1 ml de la mezcla correspondiente, en la raíz con una micropipeta. A las 72 h después de la aplicación, se inocularon con el patógeno a las cuales en la raíz de la misma zona donde se habían aplicado las NPs, se aplicó 1 ml de una suspensión de esporas de *P. capsici*, y se volvió a cubrir con el sustrato. El primer tratamiento correspondió a la aplicación de NPsCu, en seguida NPsZnO al 95%+ 5% Ag, en testigo químico Carbendazim y agua destilada como testigo absoluto (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Tratamientos evaluados *in vivo* contra el hongo fitopatógeno *Phytophthora capsici*, con base de NPs de Cu y ZnO.

Tratamiento	Concentración
NPsCu 100%	2000 ppm
NPs 95 + 5% Ag%	2000 ppm
Químico	2000 ppm
Testigo	1x10 <sup>-6</sup>

#### 4.8 Diseño experimental empleado.

Para cada bioensayo realizado se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para el caso de *in vitro* se manejaron 5 tratamientos con 4 repeticiones para el caso de *X. axonopodis*, y 4 tratamientos con 4 repeticiones para las siguientes dos bacterias y para el caso *in vivo* se formaron 4 tratamientos con 15 repeticiones. Para estimar los resultados se realizó un análisis de varianza (ANVA).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Actividad antifúngica de las nanopartículas de cobre y óxido de zinc

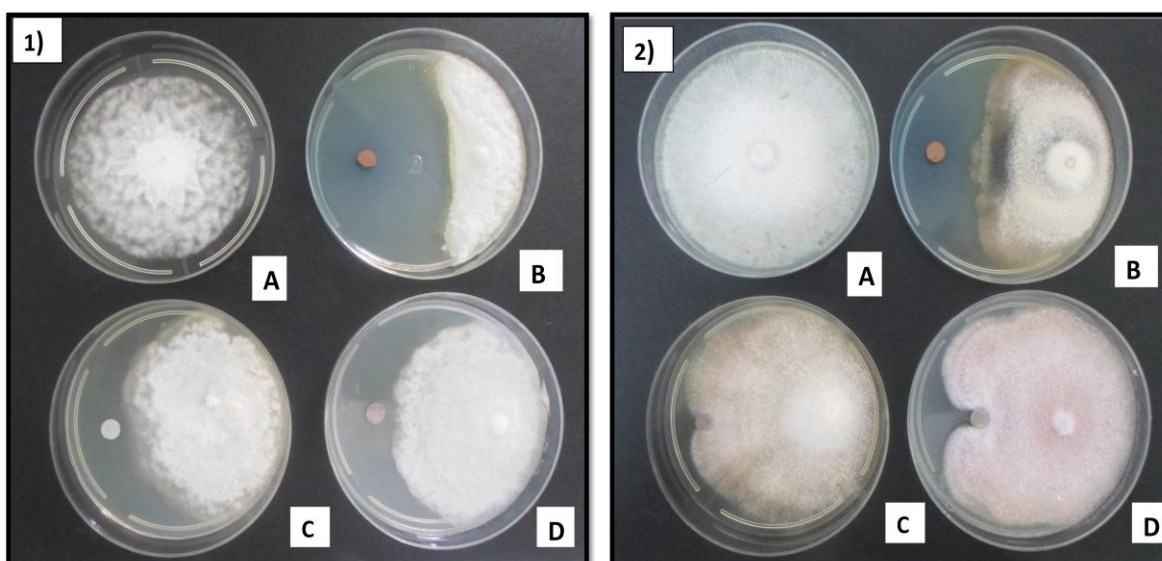
Para este bioensayo realizado, el efecto antimicrobiano que tuvieron las NPs de cobre, óxido de zinc y dopadas con plata sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos, *P. capsici* y *R. solani* se presenta en el Cuadro 4, el cual indica el porcentaje de inhibición de crecimiento de cada uno de estos hongos. Sobresale el tratamiento de NPsCu, ya que mostró 55.17 % de inhibición con respecto a *P. capsici* y 46.8 % en *R. solani*. Por otra parte el grado de toxicidad de los siguientes dos tratamientos a base de óxido de zinc y mezclado con plata mostraron menor toxicidad y resultaron tener casi lo mismo entre ellos, mostrando un porcentaje de inhibición no mayor a 21.04 %.

De forma representativa en la Figura 7 se exhibe el sobresaliente efecto antibacterial de las NPsCu y NPsZnO comparadas con el tratamiento testigo donde se aprecia claramente como el hongo llenó por completo el área de la caja Petri. Se puede apreciar como tienen un efecto predominante las NPsCu de las en comparación de las NPsZnO.

**Cuadro 4.** Efecto antifúngico *in vitro* de las NPs de cobre y óxido de zinc contra el crecimiento de *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

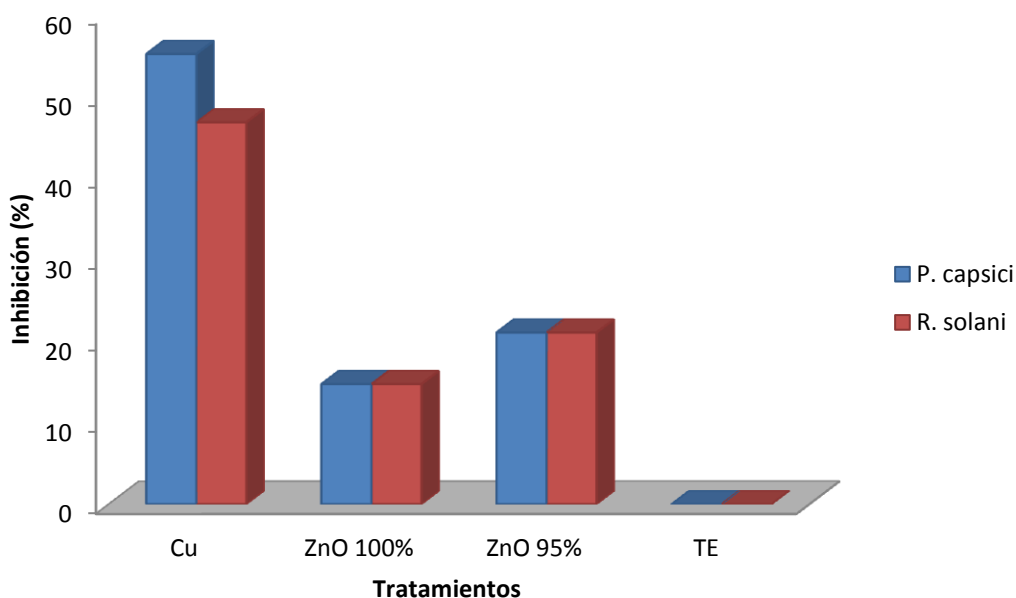
Tratamientos	<i>P. capsici</i>		<i>R. solani</i>	
	Inhibición (mm)	Inhibición Crecimiento (%)	Inhibición (mm)	Inhibición Crecimiento (%)
Cu 100 %	38.61	55.17 A*	30.09	46.8 A*
ZnO 100 %	10.31	14.72 B*	7.2 B	16.26 B*
ZnO 95+ 5Ag %	14.73	21.04 B*	9.24	18.9 BC*
Testigo	70	0 C*	70	0 C*

\*diferencia significativa. Nivel de significancia: 0.01



**Figura 9.** Efecto antifúngico *in vitro* de las NPs de cobre y óxido de zinc. (1) *Phytophthora capsici*, (2) *Rhizoctonia solani*. (A) Testigo o control sin inhibición. (B) NPsCu. (C) NPsZnO 100 %. (D) NPsZnO 95 + 5Ag %.

El efecto por la aplicación de las NPs de cobre y óxido de zinc se puede ver en la Figura 10, en donde muestra el porcentaje de control *in vitro*.



**Figura 10.** Porcentaje de inhibición *in vitro* de los diferentes tratamientos contra *P. capsici* y *R. solani*.

## 5.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de cobre y óxido de zinc

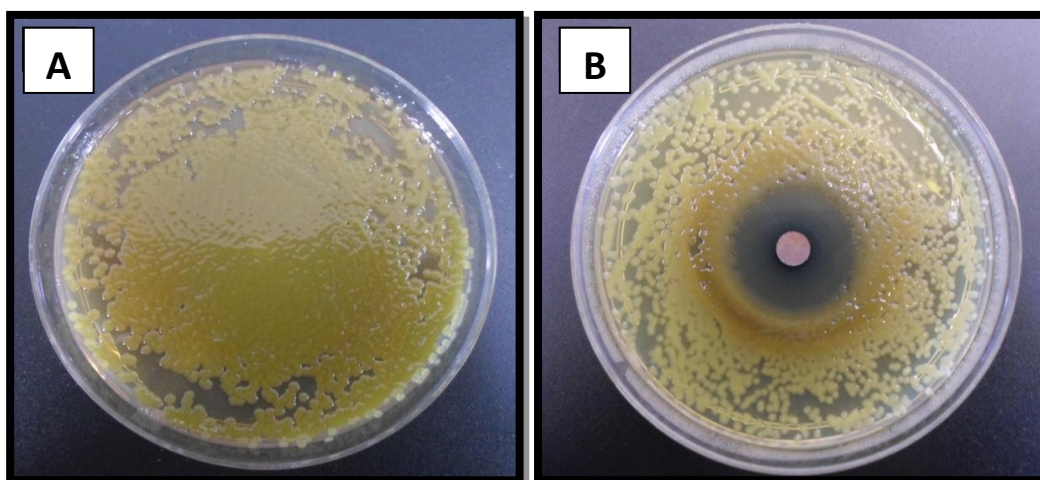
La bacteria *X. axonopodis* resultó ser inhibida en su crecimiento por los tratamientos con NPsCu y NPsZnO, destacando notablemente las NPs de cobre ya que fueron las que mayor halo de inhibición generaron en el crecimiento de este fitopatógeno. En Cuadro 2 se aprecia que el tratamiento antes señalado resultó ser estadísticamente superior que los demás tratamientos ya que formó un halo de inhibición de 8.15 mm mientras que los otros tratamientos solamente inhibieron a la bacteria en 1.46, 1.24 y 0.29 mm; en cambio el testigo no generó ningún efecto inhibitorio. La actividad antibacteriana de NPs contra hongos fitopatógenos ha sido muy poco documentada, pero contra bacterias causantes de enfermedades en humanos si hay gran cantidad de reportes. El trabajo de Hajipour *et al* (2012) indica que *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus hire*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacteroides fragilis* han sido inhibidas por NPs de óxido de zinc y óxido de titanio.

**Cuadro 5.** Efecto de los tratamientos de NPs de cobre y óxido de zinc solas y dopadas con plata a dos concentraciones aplicados contra la bacteria fitopatogena *Xanthomonas axonopodis*.

<i>X. axonopodis</i>		
Tratamientos	Inhibición (mm)	Inhibición (%)
Cu 100 %	8.15 a	9.25
ZnO 100 %	1.46 b	1.71
ZnO 97.5 + 2.5 Ag %	1.24 b	1.45
ZnO 95 + 5 Ag %	0.29 b	0.34
Testigo	0 c	0

\*diferencia significativa. Nivel de significancia: 0.01

Los resultados recientes reportados por Betancourt *et al.* (2013) señalan que las NPs de cobre por ellos producidas también tuvieron un efecto inhibitorio muy claro contra tres bacterias causantes de graves enfermedades en humanos e intrahospitalarias. En la Figura 8 se presenta de manera gráfica el efecto antibacterial de las NPs<sub>Cu</sub> comparada con el tratamiento testigo donde se aprecia claramente la presencia de *X. axonopodis* misma que llenó por completo el área de la caja Petri.



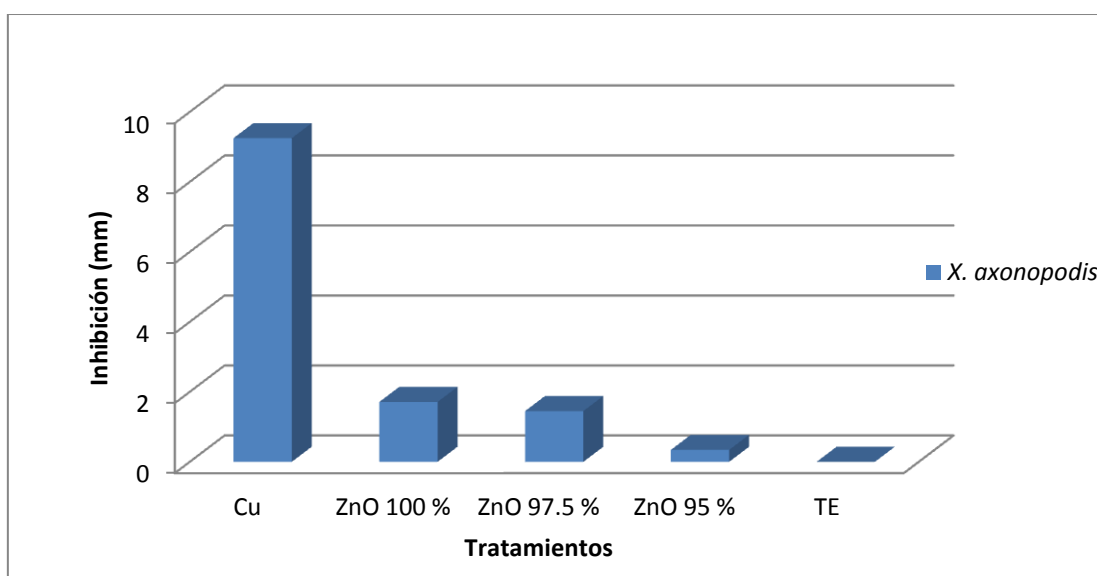
**Figura 11.** Ilustración del efecto antibacterial *in vitro* de la bacteria *Xanthomonas axonopodis*: A) Testigo o control y B) Halo de inhibición causado por NPs<sub>Cu</sub>.



En el trabajo reportado por Usman *et al.* (2013), también se ha destacado el eficaz efecto antimicrobial de NPs metálicas de cobre bajo condiciones *in vitro* contra varios hongos y levaduras causantes de graves enfermedades como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* y *Candida albicans*.

Las NPs<sub>Cu</sub> también consignaron un efecto marcadamente inhibitorio contra *C. michiganensis* al generar un halo inhibitorio de 7.86 mm; en cambio el híbrido NPs<sub>ZnO</sub> 97.5 + 2.5 Ag % no tuvo ningún efecto antibacterial resultando ser estadísticamente igual que el tratamiento testigo. Resultando esto en una diferencia estadística significativa respecto a los otros tratamientos evaluados (Cuadro 6) Estos resultados experimentales preliminares claramente indican que las NPs de cobre tienen un mayor efecto antimicrobiano que el óxido de zinc aún y cuando estuvo dopado con plata. Recientes resultados reportados por Lira *et al.* (2014) también señalan el claro efecto antifúngico de NPs<sub>Cu</sub> obtenidas mediante la técnica de descomposición térmica contra el hongo fitopatógenos *Botrytis cinerea*. Por otra parte, el estudio previo reportado por Kvitek *et al.* (2009) señala evidencias acerca de la toxicidad de NPs de plata contra el microorganismo *Paramecium caudatum*.

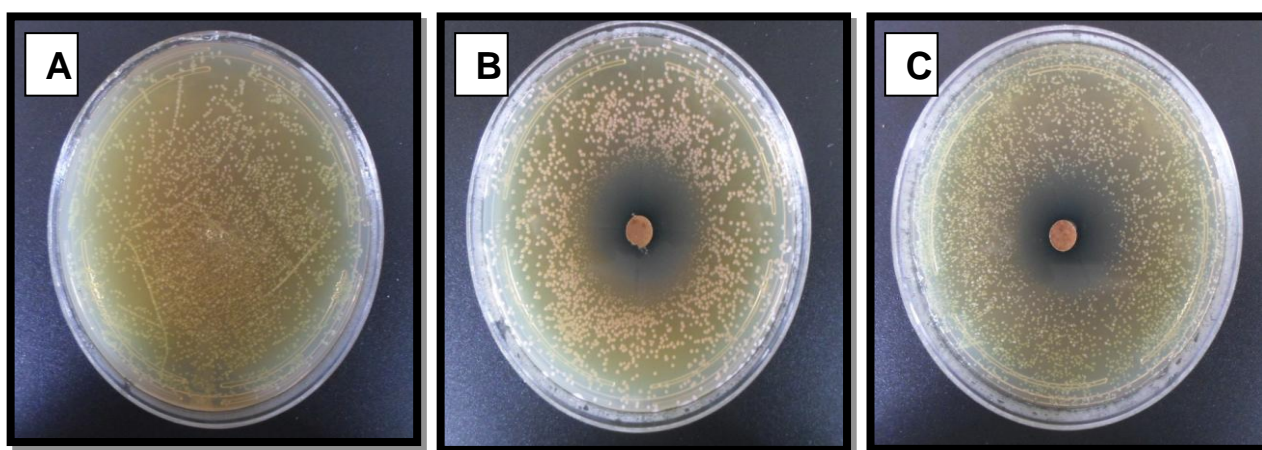
De manera gráfica el efecto antibacterial de las NPs de cobre y óxido de zinc contra estas dos bacterias se ilustra en la Figura 9. Se puede advertir lo que anteriormente y de manera numérica se señaló debiéndose destacar el mayor efecto antibacterial de las NPs<sub>Cu</sub> en comparación de las NPs<sub>ZnO</sub>.



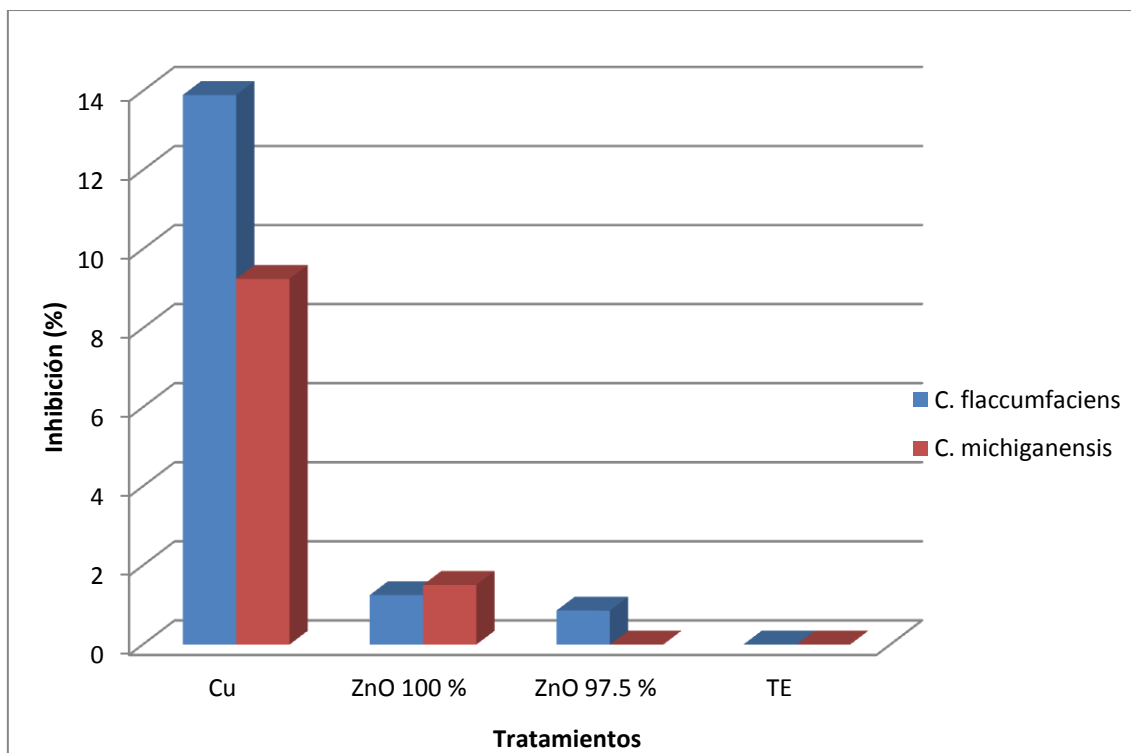
**Figura 12.** Efecto inhibitorio de las NPs de cobre y óxido de zinc sobre *X. axonopodis*.

**Cuadro 6.** Efecto de NPs de cobre y óxido de zinc, aplicadas contra las bacterias *Curtobacterium flaccumfaciens* y *Clavibacter michiganensis*.

Tratamientos	<i>C. flaccumfaciens</i>		<i>C. michiganensis</i>	
	Inhibición (mm)	Inhibición (%)	Inhibición (mm)	Inhibición (%)
NPsCu 100%	11.83 A	13.9	7.86 A	9.25
NPsZnO 100 %	1.06 B	1.25	1.28 B	1.51
NPsZnO 97.5 + 2.5Ag%	0.73 BC	0.86	0 C	0
Testigo	0 C	0	0 C	0



**Figura 13.** Efecto antibacteriano *in vitro* de las NPs de cobre (A) Testigo sin inhibición; (B) halo de inhibición causado por las NPs de cobre en *Curtobacterium flaccumfaciens* y (C) contra *Clavibacter michiganensis*.



**Figura 14.** Efecto inhibitor de las NPs de cobre y óxido de zinc contra *C. flaccumfaciens* y *C. michiganensis*.

### 5.3 Actividad antifúngica de las NPs de cobre y óxido de zinc *in vivo*

En este estudio realizado *in vivo*, se evaluaron las variables de severidad, altura de la planta, longitud de raíz, área foliar y peso seco de la planta. Después de 40 días de haber sido inoculadas se comenzó con la evaluación del muestreo.

#### 5.3.1 Severidad de la enfermedad

Con respecto a la severidad esta se realizó de acuerdo al nivel de daño observado y se clasificó con ayuda de la escala de Carlin y Leiner (1989) (Cuadro 7). Se estimó la severidad de la enfermedad sobre las plantas a los 60 días después de la inoculación, varió entre los diferentes tratamientos únicamente a modo de vista, una vez analizados los datos estos no mostraron diferencia significativa. Entre el tratamiento a base de cobre y el tratamiento a base del químico Carbendazim mostraron el mismo porcentaje de severidad con un 0.75 mientras que el tratamiento

a base de zinc dopado con plata al 5%, mostro un 0.5 % de severidad lo cual indica ser el mejor de los cuatro tratamientos.

**Cuadro 7.** Escala de Severidad (Carlin y Leiner 1989).

0	Sin lesiones
1	Ligero marchitamiento, Clorosis o decoloración vascular en una o más hojas
2	Marchitamiento, algún tipo de necrosis radicular, daño en hojas o vástago en ambas
3	Síntomas de la hoja marchita
4	Marchitamiento total, crecimiento impedido de la planta
5	Planta muerta

La severidad de *P .capsici* sobre las plantas de tomate recibieron un mililitro de una solución conteniendo una suspensión de esporas a la concentración de  $1 \times 10^6$ . Resultó ser notorio que dicha aplicación de este fitopatógeno disminuyó por efecto de las NPs con plata. En el presente ensayo la temperatura influyo en el desarrollo del hongo ya que se presentaron bajas temperaturas las cuales no fueron favorables, otro factor limitante para el mismo crecimiento del hongo fue que debido a la edad de las plantas resultaron ser más resistentes al ataque de la enfermedad.

### 5.3.2 Altura de plantas

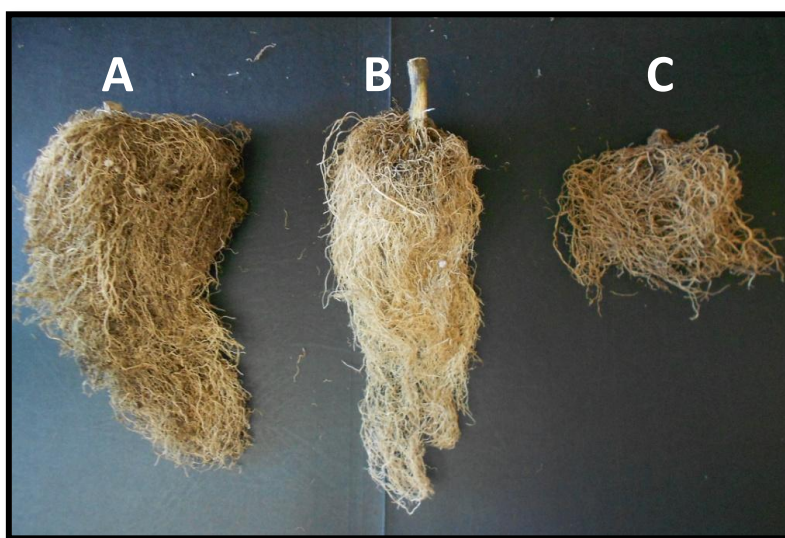
Los resultados de esta variable se tomaron a los 40 días después de haber sido sembradas las plantas de tomate. El tratamiento químico Carbendazim resulta ser el que mayor altura permitió, mientras que el tratamiento con base en cobre tuvo un menor crecimiento y en cambio los dos tratamientos restantes los cuales son NPs de zinc mas plata y el testigo mostraron el mismo porcentaje. Estos resultados bajo los análisis estadísticos muestran que no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos.

Chamarro (1995), señala que a menudo la iluminación es un factor limitante en los cultivos de invernadero, teniendo a si a la iluminación diaria, como el factor que más afecta el desarrollo vegetativo, indicando así que cuando disminuye la iluminación, se reduce la altura de las plantas. Mismo autor indica que también la temperatura tiene un efecto sobre el desarrollo vegetativo de la planta, en que la

velocidad de elongación del tallo, aumenta con la temperatura, y la temperatura óptima depende de la iluminación y se encuentra alrededor de los 25°C lo que concuerda con el presente ensayo realizado en el cual la temperatura se presentó como factor limitante para el buen desarrollo del cultivo de papa.

### 5.3.3 Longitud de raíz

Los resultados obtenidos de la variable Longitud de raíz muestran cierta diferencia visual entre los diferentes tratamientos (Figura 16), a pesar de esto no se obtuvieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos como se observa en el Cuadro 10.



**Figura 15.** Raíz de tres plantas de tomate tratadas a los 40 días después de la siembra. A) Raíz con NPsCu. B) Raíz con NPsZnO + Ag 5%. C) Raíz con tratamiento químico Carbendazim (testigo químico).

### 5.3.4 Área foliar

Para obtener resultados de esta variable se hizo la toma de datos con ayuda del SPAD - 502 la cual se hizo a los 30 días después de la siembra, se tomaron tres capturas de cada planta (hojas viejas, centro y jóvenes) se obtuvo el promedio de cada planta, y así mismo se logró un promedio por cada tratamiento, y en seguida se preparó el análisis estadístico.

La diferencia numérica es mínima entre los tratamientos, pero se observa que las NPs de óxido de zinc más plata mostraron relativamente un mayor efecto sobre el área foliar con respecto a los demás tratamientos y como mínimo el tratamiento a

base del químico Carbendazim, pero a pesar de esto el análisis no mostró que hubiese alguna diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

Las medias de las variables mencionadas anteriormente se muestran dentro del Cuadro 8 .las cuales en ninguno de los tres casos se mostró diferencia significativa.

**Cuadro 8.** Medias de severidad, longitud y área foliar.

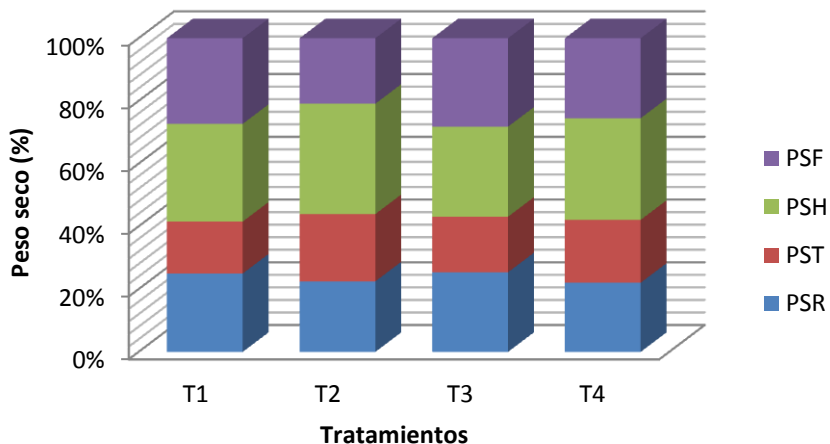
Tratamientos	Severidad	Longitud R.	Área Foliar
Cu 100%	0.75	29.0	913.70
ZnO+ Ag 5%	0.5	25.2	926.01
Carbendazim	0.75	19.79	805.27
Testigo	1.25	23.6	901.97
	N. S	N. S	N. S

\*N.S.: No diferencia significativa

### 5.3.5 Peso seco de plantas

Los resultados de peso seco de las plantas de tomate, se observan en la Figura 17, estos son expresados en gramos. El análisis estadístico mostro que no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos. En un ensayo realizado por Fernandois (2003), orientado a evaluar la eficiencia en el control de *Pyrenochaeta lycopersici* mediante distintas cepas de *Trichodermas spp.* y *Paenibacillus lentimorbus* en tomate producido bajo invernadero, se obtuvieron resultados similares en relación al peso fresco de las plantas, donde no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo, lo que en este caso se explicaría por el efecto de la temperatura y luminosidad sobre el desarrollo vegetativo de las plantas. Como en el caso del presente ensayo donde las bajas temperaturas influyeron de manera significativa para el crecimiento de las plantas de tomate

El Cuadro 9 se muestran las medias de peso seco evaluadas y arrojadas por el análisis estadístico el cual indicó que no hay ninguna diferencia significativa entre tratamientos.



**Figura 16.** Peso seco de las diferentes partes de la planta se muestra diferenciándose por la gama de colores, fruto, hojas, tallos y raíz.

**Cuadro 9.** Medias de la Producción de Biomasa Seca.

Tratamientos	P.S. Raíz	P.S. Tallo	P.S. Hoja	P.S. Fruto
Cu 100%	6.61	4.37	8.24	7.22
ZnO+ Ag 5%	6.05	5.76	9.46	5.61
Carbendazim	6.71	4.67	7.59	7.45
Testigo	5.81	5.28	8.54	6.72
	N.S	N.S	N.S	N.S

\*N.S: No diferencia significativa

## 6. CONCLUSIONES

De los tratamientos aplicados en los bioensayos *in vitro*, las NPs de cobre presentaron un efecto inhibitor contra *Xanthomonas axonopodis* (8.15 mm), *Curtobacterium flaccumfaciens* (11.83 mm) y *Clavibacter michiganensis* (7.86 mm), así como en los hongos *Phytophthora capsici* (55.17%) y *Rhizoctonia solani* (46.8%) respectivamente.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados, se puede concluir que las NPs metálicas de cobre y óxido de zinc tienen el potencial para utilizarse como productos para prevenir y controlar el deterioro de los alimentos por microorganismos fitopatógenos. En el segundo bioensayo el cual correspondió a la aplicación de NPs *in vivo*, no se obtuvieron resultados estadísticamente representativos.

Adicionalmente al estudio de microorganismos fitopatógenos, se caracterizó morfológicamente a las nanopartículas, encontrándose que las de cobre resultaron ser esféricas y en el intervalo de 4 a 18 nm, mientras que las de óxido de zinc poseen una forma semiesférica y tamaños menores a 200 nm. Para el caso de ZnO + Ag el tamaño de las partículas es menor a 100 nm; esto se evidenció por la difracción de rayos X y microscopía electrónica de transmisión.



## 7. LITERATURA CITADA

- Adner, D., Korb, M., Schulze, S., Hietschold, L., 2013. A straightforward approach to oxide-free copper nanoparticles by thermal decomposition of a copper precursor. *Chem. Comm.* 49: 6855-6857.
- Agam, M., Guo, Q., 2007. Electron beam modification of polymer nanospheres. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7: 3615-2019.
- Agrios, N., 2005. *Plant Pathology* 5<sup>a</sup> Edition. El Sevier- Academic Press. San Diego. CA. p. 922.
- Aguilar M., 2009. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*. Tesis doctoral
- Alam, M., Roy, N., Mandal, D., Begum, N., 2013. Green chemistry for nanochemistry: exploring medicinal plants for the biogenic synthesis of metal NPs with fine-tuned properties. *RSC Adv.*, 3: 11935-11956.
- Alavi, S., Poussier, S., Manceau, C. 2007 Caracterización de IS Xax1, una secuencia de inserción novela restringido a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (variantes *fuscans* y *nofuscans* ) y *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol*, 73: 1678-1682.
- Alavi, SM, Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C. y Poussier, S. 2008. Evaluación de la diversidad genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* como base para identificar los genes de patogenicidad putativo y un sistema de secreción tipo III de la familia SPI-1 de múltiples hibridaciones de supresión de sustracción. *Appl. Medio amb. . Microbiol* 74: 3295-3301.
- Azeredo, H., Mattoso, L., 2009. Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *Journal of Food Science*. 74: 31-35.
- Baba, Y. 2006. Nanotechnology in medicine, *Nihon Rinsho*, 64: 189-98.
- Begum, N., Sharma, B, Pandey, R., 2010. Evaluation of insecticidal efficacy of *Calotropis procera* and *Annona squamosa* ethanol extracts against *Musca Domestica*. *J. Biofertil. Biopestici.* 1: 101-109.

- Betancourt, R. Reyes, P., Puente, B., Ávila, O., Rodríguez C., Cadenas O., Lira, S., García, C., 2013. Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *Journal of Nanomaterials*. 5: 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/980545>
- Behera, S, Debata, A y Nayak PL., 2011. Biomedical applications of silver nanoparticles. *J Asian Sci Res*. 1: 27-56.
- Bharat, B, 2010. Introduction to nanotechnology *Handbook of Nano-technology* Springer, pp. 1-5
- Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G., Candresse, T., 2009. Enfermedades del tomate - identificar, conocer, controlar. Editions Quae.
- Borboa, F., Rueda P., Acedo F., Ponce J., Cruz V., García H., Ortega N. 2010. Evaluación De La Actividad Antibacteriana *In Vitro* De Aceites Esenciales Contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.12: 539–547.
- Bosland, P., Lindsey D., 1991. A seedling screen for Phytophthora root rot of peppers, *Capsicum annuum*. *Plant. Dis*. 75:1048-1050.
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Maryvon, Y., Hagens, W., Bulder, A., Heer, C., Voorde, S., Wijnhoven, S., Marvin, H., Sips, A., 2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53: 52-62.
- Brandán de Antoni, González, E., Del Carmen A., Seco, E., 2009. Tomate destinado a la industria. Universidad Nacional de Catamarca, Facultad de Ciencias Agrarias, Cátedra de Horticultura y Economía Agraria. 978-987-1341.
- Buzea, C., Pacheco, I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases*, 2: 17-21.
- Carling, D., Leiner, R., 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopatology*. 80: 930-934.
- César Guigón López, Pablo Andrés González González 2001 Estudio Regional de las Enfermedades del Chile (*Capsicum annuum*, L.) y su Comportamiento Temporal en el Sur de Chihuahua, México *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19: 49- 56.

- Chen H., Yada R., 2011. Nanotechnologies in Agriculture: New Tools for Sustainable development. *Trends in Food Science & Technology* 22: 585-594.
- Chen, S., Edwards, C., Subler, S. 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1971–1980.
- Chinnamuthu, C., Boopathi, P., 2009. Nanotechnology and agroecosystem. *Madras Agricultural Journal*, 96: 17–31.
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., D'Alessio, M., Zambonin, P., Traversa, E., 2005. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem. Mater.* 17: 5255-5262.
- Costa, H., Robb, K., Wilen C., 2002. Field trials measuring the effects of ultraviolet-absorbing greenhouse plastic films on insect population. *Journal of Economic Entomology*, 95:113-120.
- Cruz, I., Ramírez, V., Tlapal B., Ramírez, R., García E., Sandoval, I., Castillo, G. 2001. Producción masiva de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Smith) Dye. *Agrociencia, Colegio de Postgraduados México*, 35: 575-581.
- Davidson, C., Carroll, R., Evans, T., Mulrooney, R., Kim, S. 2002. First report of *Phytophthora capsici* infecting lima bean (*Phaseolus lunatus*) in the Mid-Atlantic Region. *Plant Dis*, 86:1049.
- Dawson, N., 2008. Sweating the Small Stuff: Environmental Risk and Nanotechnology *BioScience*, 58: 690-690.
- Delgado, K., Quijada, R., Palma, R., Palza, H. 2013. Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent *Letters in Applied Microbiology*, 53:50-54.
- Fernandois, C., 2003. Control biológico en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), cultivado bajo invernadero frío en suelo naturalmente infectado con *Pyrenochaeta lycopersici*. Memoria de Título Ing. Agr. Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Ciencias Agronómicas, 71.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2012. Manejo integrado de enfermedades <http://http.fao.org/pdf>.

- Francisco, F., Gallegos, M., Ochoa, F., Hernández, C., Benavides, M., 2014. Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli Smith): Características, Patogenicidad y Control Revista Mexicana de Fitopatología. 31: 147-160.
- Gao, Y., Cranston, R. 2008. Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. Textile Research Journal, 78: 60-72.
- Ghormade, V., Deshpande, M., Paknikar, K. 2011. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. Biotechnology Advances, 29: 792–803.
- González, F., 2002. La marchitez bacteriana de la judía. La prevención es el mejor método de control. Información Agrícola, 8: 8-10.
- Gruere, G.P. 2012. Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in OECD countries. Food Policy, 37: 191-198.
- Hedges, F. A, 1922, La marchitez bacteriana del frijol causada por la bacteria *flaccumfaciens* sp. Ciencia., 55: 433-434.
- <http://www.britania.com.ar/esp/productos/b02/nutritivocaldo.htm>
- <http://www.census.gov/main/www/poclock.html>
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K., Eichenlaub, R., Sasson, S., 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* population in Israel. European Journal of Plant Pathology.
- Kumar, K., Mandal, B., Sinha, M., Krishnakumar, V. 2012. *Terminalia chebula* mediated green and rapid synthesis of gold nanoparticles. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 86: 490–494.
- Kvitek, L., Vanickova, M., Panacek, A., Soukupova, J., Milde, D. Zboril, R. 2009. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles against *Paramecium caudatum*. J. Phys. Chem. C, 113: 4296- 4300.
- Lamont, J. W. 2005. Plastics: Modifying the microclimate for the production of vegetable crops. HortTechnology 15: 477-48

- Lamour, K., y Hausbeck, M., 2004. *Phytophthora capsici* en cultivos de hortalizas: Avances de Investigación y retos de gestión. Sociedad Americana de Fitopatología. 88: 1292-1303.
- Layani, M., Grouchko, M., Shemesha, S., Magdassi, S. 2012. Conductive patterns on plastic substrates by sequential inkjet printing of silver nanoparticles and electrolyte sintering solutions. J. Mater. Chem., 22: 14349-14352.
- Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Phytopathology, 12:401-408.
- Lira-Saldivar, R.H., Corrales-Flores, J., Hernández-Suárez, M., Betancourt-Galindo, R., García-Cerda, L.A., Puente-Urbina, B. 2014. Actividad antifúngica de NPs de cobre y óxido de zinc-plata contra *Botrytis cinerea*. VII Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales, 3-5 de 2014.
- Maringoni, A., Cassia, R., 2006. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detección en semillas de frijol utilizando un medio de cultivo semi selectivo. Brazilian Journal of Microbiology, 37:451-455.
- Mendoza, U., Rodríguez, L., 2007. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. Perfiles Latinoamericanos, 29: 161-186.
- Monar, F., Ronald, D., 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* Associated with Roots of Weeds on Florida Vegetable Farms, 10: 90-0345.
- Nagalingam, R., Sundaram, S., Stanly, B., Retnam, J. 2010. Effect of nanoparticles on tensile, impact and fatigue properties of fiber reinforced plastics. Bulletin of Materials Science, 33: 525-528
- Nair ,R.,Varghese S.,Nair B., Maekawa T., Yoshida Y., Kumar S., 2010. Nanoparticulate Material Delivery to Plants. Plant Science, 179: 154-163.
- Nazari, F., Niknam, G., Ghasemi, A., Taghavi, S., Momeni, H., Torabi, S., 2007. An Investigation on Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in North and North West of Iran. Journal of Phytopathology, 155: 563–569.
- Nuez, 2001. El cultivo del tomate. Ed. Mundi prensa, Madrid, España, 614.
- Padmavathy N., Rajagopalan V., 2008. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles— an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced. Material.* 9.

- Plata, C., Merino, F., Díaz, J., 2006. La diversidad de *Phytophthora capsici* en el noroeste de España: Análisis de la virulencia, Metalaxyl respuesta y Caracterización Molecular, 9: 90.
- Puente, U., García, C., 2012. Nanopartículas de Ni/NiO y Cu-Ag obtenidas mediante el método de Pechini: síntesis y caracterización. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, 25: 183-187.
- Quintili, M. 2012. Nanociencia y Nanotecnología, un mundo pequeño. Cuad. Cent. Estud. Diseño Común., Ens., 42: 125-155.
- Quispe C., 2010. Nanotecnología en la Agricultura. Información, Tecnología y Sociedad, 5.
- Rai M., Ingle, A. 2012. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. Appl Microbiol Biotechnol, 94: 287–293
- Ren, G., Hu, D., Cheng, E., Vargas, R., Reip, P., Allaker, R., 2008. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications ELSEVIER Journal 6: 587-90
- Roberts, A., Boothroyd, C. 1978. Fundamentos de Patología Vegetal. Edit; Acribia. Zaragoza, España. 392.
- RS& RAE (Royal Society & The Royal Academy of Engineering), 2004. Nanoscience and Nanotechnologies: opportunities and uncertainties, Londres, The Royal Society & The Royal Academy of Engineering.
- Ruixiang, Z., Torley, P., Halley, J., 2008. Emerging biodegradable materials: starch- and protein based bio-nanocomposites. Journal.Mater Sci 43:3058-3071.
- Ruiz, N.R. 1994. Efecto del color de acolchado y cintas reflejantes sobre insectos vectores de virus y el desarrollo fenológico del chile serrano (*Capsicum annum* L.). Tesis Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 90.
- Ruparelia, J., Chatterjee, A., Duttagupta, S., Mukherji, S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Science Direct, 4: 707-716.
- Sandoval, B.J. 1993. Chile. En: A.F. Díaz (ed.). Enfermedades Infecciosas de los Cultivos. Ed. Trillas. p. 125-136

- Santillán, V., Mercado C., Chocobar, A., Benedettini, D., Gasca, F. 2012. Comportamiento de un fertilizante químico-orgánico (Vimel) sobre el crecimiento del micelio de *Rhizoctonia solani* agente causal de la podredumbre radicular en tabaco *in Vitro*. Libro de Resúmenes; XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 978-987.
- Satur, M., Butler, E., 1967. A root and crown rot of tomato caused by *Phytophthora capsici* and *P. parasitica*. *Phytopathology*, 57: 510-515.
- Scarascia, M., Schettini, E., Vox, G., Malinconico, M., Immirzi, B., Pagliara, S., 2006. Mechanical properties decay and morphological behaviour of biodegradable films for agricultural mulching in real scale experiment. *Polymer Degradation and Stability*, 91: 2801-2808.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación (SAGARPA) 2010. Monografía de cultivos, Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios.  
<http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación (SAGARPA) 2011. Estudio de Oportunidades de Mercado e Inteligencia Comercial y Estudio de Logística Internacional de Tomate  
[http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios\\_promercado/tomate](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios_promercado/tomate)
- Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP), 2014. Panorama del Jitomate.  
<http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas>
- Sneh, B., LEE, B., Akira, O., 1991. Identificación de *Rhizoctonia* Especies. *The Society Americana Phytopathological*, St. Paul, Minnesota, EE.UU., 129p.
- Srilatha, B. 2011. Nanotechnology in Agriculture. *J. Nanomedic Nanotechnol* 2: 123-128.
- Thul, S., Sarangi, K. Avatar, P. 2013. Nanotechnology in Agroecosystem: Implications on Plant Productivity and its Soil Environment. *Expert Opin Environ Biol*, 2:
- Trias, R., Montesinos, L., Badosa, E., .2008. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as Biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology* 11:231-236.

- USDA. U.S. Department of Agriculture. E.R.S. 2003. Economic Research Service. U.S. Tomato Statistics, 92010.
- Usman, M., Zowalaty, M., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., Ibrahim, N., 2013. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 8: 4467–4479.
- Yamamoto, O. 2001. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *Int J Inorg Mater*, 7: 643- 646.
- Yoon, K., Hoon, B., Park, J., Hwang, J., 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ*, 373: 572-575.
- Zänker, H. Schierz A. 2012. Engineered Nanoparticles and Their Identification Among Natural Nanoparticles. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 5: 107-132.
- Zhang, X., Dong, X., Huang, H., Liu, Y., 2006. Microwave absorption properties of the carbon-coated nickel nanocapsules. *Applied Physics Letters*, 89: 165-171.