



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE

QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**MANEJO DE PUDRICIÓN DE RAÍZ EN CHILE (*CAPSICUM ANNUUM L.*) MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE MAGNESIO (MGO NPS) Y SOLUCIONES ACTIVADAS ELECTROQUÍMICAMENTE (SAE).**

TESIS

Como parte de los requisitos para  
obtener el título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN  
INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS**

Presenta:

**LIC. DANIEL JHASUA**

**RUBIO UGALDE**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

**Tesis**

**Manejo de pudrición de raíz en chile (*Capsicum annuum* L.) mediante el uso de nanopartículas de óxido de magnesio (MgO NPs) y soluciones activadas electroquímicamente (SAE).**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

**Presenta:**

Daniel Jhasua Rubio Ugalde

**Dirigido por:**

Dra. Marcela Vargas Hernández

Dra. Marcela Vargas Hernández

Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco

Secretario

Dr. Israel Macías Bobadilla

Vocal

Dra. Samantha de Jesús Rivero Montejo

Suplente

Dr. Ramón González Guevara

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Abril, 2024

México

## RESUMEN

*Phytophthora capsici* es un oomiceto hemibiotrófico que causa la pudrición de raíz, esta enfermedad afecta el sistema vascular de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) y es la más perjudicial para el cultivo, si las condiciones para su crecimiento y desarrollo son favorables puede ocasionar hasta el 100% de pérdidas en poco tiempo; el manejo de esta enfermedad con el uso de agroquímicos ha sido ineficiente, ya que ha provocado fitotoxicidad y ha tenido repercusiones medioambientales dañinas. El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes dosis de soluciones activadas electroquímicamente (SAE) comparando dos frecuencias de aplicación quincenalmente y cada 72 h en plantas de chile que presentaran la enfermedad en condiciones de invernadero para determinar el efecto bioestimulante, antifúngico y elicitor de los tratamientos. Ninguna de las concentraciones de nanopartículas de óxido de magnesio mostró actividad antifúngica, mientras que el tratamiento con bajas concentraciones de SAE aplicadas a través de aspersion foliar causó un incremento en la biomasa de la planta, así como un aumento significativo en el rendimiento de éstas, a una concentración de 12 ppm con una frecuencia de aplicación de 72 h y 20 ppm aplicadas cada quince días respectivamente se obtuvieron los mejores resultados; así mismo se redujo significativamente la incidencia de la enfermedad y la severidad del daño debido a la acción directa de sus compuestos sobre el fitopatógeno; enzimas relacionadas con la defensa de la planta como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y la fenilalanina amonio liasa (PAL) mostraron un incremento de su actividad al ser aplicadas quincenalmente, lo cual se correlaciona con un efecto elicitor. Las plantas tratadas no acumularon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tejidos foliares, por lo que no son un riesgo fitotóxico para las plantas a diferencia del control negativo; el estrés biótico fue menor en plantas elicitadas con una frecuencia de aplicación quincenal a bajas dosis que cada tercer día, por lo que el uso de SAE se vuelve una estrategia de manejo eficiente contra la enfermedad de pudrición de raíz.

**Palabras clave:** resistencia sistémica adquirida, elicitación mediada, soluciones activadas electroquímicamente, *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*.

## SUMMARY

*Phytophthora capsici* is a hemibiotrophic oomycete that causes root rot, this disease affects the vascular system of chili pepper plants (*Capsicum annuum* L.) and is the most harmful to the crop, if the conditions for its growth and development are favorable it can cause up to 100% losses in short time; the management of this disease with the use of agrochemicals has been inefficient, as it has caused phytotoxicity and has had harmful environmental impacts. The aim of this study was to evaluate different doses of electrochemically activated solutions (EAS) by comparing two frequencies of application biweekly and every 72 h in chili pepper plants that presented the disease under greenhouse conditions to determine the biostimulant, antifungal and elicitor effect of the treatments. None of the concentrations of magnesium oxide nanoparticles showed antifungal activity, whereas, the treatment with low concentrations of EAS applied through foliar spraying caused an increase in the biomass of the plant, as well as a significant increase in the yield of these, at a concentration of 12 ppm with an application frequency of 72 h and 20 ppm applied every fifteen days respectively the best results were obtained; likewise, the incidence of the disease and the severity of the damage due to the disease were significantly reduced. the direct action of its compounds on the plant pathogen; Enzymes related to plant defense such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and phenylalanine ammonium lyase (PAL) showed an increase in their activity when applied biweekly, which correlates with an elicitor effect. The treated plants did not accumulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in leaf tissues, so they are not a phytotoxic risk to the plants unlike the negative control; biotic stress was lower in plants elicited with a frequency of biweekly application at low doses than every other day, so the use of SAE becomes an efficient management strategy against root rot disease.

**Key words:** Systemic acquired resistance, mediated elicitation, electrochemically activated solutions, *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*.

*A mi madre por enseñarme los fundamentos de una vida plena, dichosa y feliz.*

*A mi herma por sus consejos y compañía en todo momento, sobre todo en la adversidad.*

*A mi abuela quien a través del amor me enseñó que lo complejo no significa que sea profundo y lo sencillo no carece de profundidad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi madre y a mi hermana por estar conmigo en cualquiera de los momentos adversos y felices que viví durante estos años, por su comprensión mientras yo me dedicaba a estudiar y escribir, a mis amigos de maestría quienes además de sus conocimientos académicos me dieron su apoyo y amistad, a mis profesores, a mi directora de tesis la Dra. Marcela Vargas Hernández y sinodales quienes me transmitieron con pasión y alegría sus conocimientos y sobre todo a la Universidad Autónoma de Querétaro la cual me ha permitido desarrollarme en todos los aspectos de una vida dedicada al saber.

Agradezco al CONAHCyT y al Estado mexicano por brindarle a estudiantes, así como a mí la oportunidad de llevar a cabo estudios de posgrado mediante una beca para continuar preparándonos y lograr aportar a la ciudadanía mexicana y a la humanidad.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>SUMMARY</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 JUSTIFICACIÓN</b> .....	4
<b>1.2 HIPÓTESIS</b> .....	5
<b>1.3 OBJETIVOS</b> .....	5
1.3.1 Objetivo general .....	5
1.3.2 Objetivos particulares .....	6
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	7
2.1 Taxonomía del chile .....	7
2.2 Marchitez del chile .....	9
2.3 <i>Phytophthora capsici</i> .....	9
2.4 Manejo de la pudrición de raíz .....	10
2.4.1 Manejo cultural .....	11
2.4.2 Manejo químico .....	12
2.4.3 Manejo biológico .....	12
2.4.4 Manejo con extractos naturales como fungicidas .....	13
2.5 Nanopartículas .....	14

2.5.1 Nanopartículas metálicas .....	14
2.5.2 Vía de entrada de las nanopartículas .....	15
2.5.3 Nanopartículas de MgO .....	16
2.6 Soluciones activadas electroquímicamente (SAE) .....	17
2.6.1 Propiedades fisicoquímicas de las soluciones activadas electroquímicamente.....	18
2.6.2 Síntesis de las soluciones activadas electroquímicamente .....	18
2.6.3 Mecanismo de acción de las soluciones activadas electroquímicamente .....	20
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Ubicación del área de investigación.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.2 Obtención de las nanopartículas de óxido de magnesio (MgO).....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.3 Obtención de las soluciones activadas electroquímicamente (SAE).....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.4 Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de las NPs MgO y SAE contra <i>P. capsici</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Evaluación del efecto de las NPs MgO y SAE <i>in vivo</i> en chile cultivado en condiciones de invernadero contra <i>P. capsici</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.1 Selección del material vegetal.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2 Producción del material vegetal.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3 Diseño experimental.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.4 Inoculación de plantas de <i>Capsicum annuum</i> con zoosporas de <i>Phytophthora capsici</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.5 Método de aplicación de SAE <i>in vivo</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Determinación del mecanismo de acción de las SAE mediante análisis enzimáticos para evaluar la actividad elicitora de los tratamientos aplicados en las plantas de chile.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.1 Actividad enzimática de la superóxido dismutasa.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.2 Actividad enzimática de la peroxidasa.....</b>	<b>26</b>

3.3.3 Actividad enzimática de la catalasa.....	26
3.3.4 Actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa.....	27
3.3.5 Determinación del peróxido de hidrógeno.....	28
3.4 Análisis estadístico.....	28
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
4.1 Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de las SAE contra <i>Phytophthora capsici</i> .....	29
4.2 Evaluación del efecto de las SAE <i>in vivo</i> en chile cultivado en condiciones de invernadero contra <i>P. capsici</i> para determinar la severidad del daño.....	32
4.3 Determinación del mecanismo de acción de las SAE mediante análisis enzimáticos para evaluar la actividad elicitora de los tratamientos aplicados en las plantas de chile.....	40
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 1.** Altura, diámetro del tallo, número de hojas y frutos de plantas de *C. annuum* a diferentes concentraciones de SAE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando Tucky  $p < 0.05$

**Cuadro 2.** Altura, diámetro del tallo, número de hojas y frutos de plantas de *C. annuum* a diferentes concentraciones de SAE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando Tucky  $p < 0.05$ . Valor p con un \* se utilizó Tucky  $p < 0.1$

**Cuadro 3.** Escala de sanidad cada 72 h. de plantas de *C. annuum* presentando pudrición de raíz. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando Tucky  $p < 0.05$

**Cuadro 4.** Escala de sanidad quincenal de plantas de *C. annuum* presentando pudrición de raíz. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando Tucky  $p < 0.05$ .

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta adulta de <i>Capsicum annuum</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Estructuras morfológicas de <i>Phytophthora capsici</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Celda electroquímica prototípica utilizada para generar soluciones activadas electroquímicamente (SAE).....	17
<b>Figura 4.</b> Resultados de la aplicación <i>in vitro</i> de nanopartículas de óxido de magnesio a concentraciones de 1000 y 250 ppm.....	29
<b>Figura 5.</b> Inhibición del crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> bajo diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de magnesio.....	30
<b>Figura 6.</b> Inhibición completa del crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> a una concentración de 250 ppm con soluciones activadas electroquímicamente (SAE) en pruebas <i>in vitro</i> .....	31
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>P. capsici</i> bajo distintas dosis de soluciones activadas electroquímicamente en medios de cultivo <i>in vitro</i> .....	31
<b>Figura 8.</b> Plántulas de <i>Capsicum annuum</i> en almácigo de dos semanas de crecimiento mostrando los cotiledones.....	32
<b>Figura 9.</b> Plántula de <i>Capsicum annuum</i> mostrando hojas verdaderas, es en este estadio cuando se llevó a cabo el trasplante.....	33
<b>Figura 10.</b> Método de aplicación de las soluciones activadas electroquímicamente a través de la aspersión foliar en plantas de <i>Capsicum annuum</i> , hasta alcanzar el punto de goteo.....	33

<b>Figura 11.</b> A la izquierda planta de <i>Capsicum annuum</i> presentando una ligera necrosis basal del tallo, síntoma leve de pudrición de raíz, a la derecha se observa una planta saludable.....	34
<b>Figura 12.</b> Escala de severidad de la enfermedad de pudrición de raíz en tratamientos aplicados cada 72 h.....	38
<b>Figura 13.</b> Escala de severidad de la enfermedad de pudrición de raíz en tratamientos aplicados quincenalmente.....	38
<b>Figura 14.</b> Plantas de <i>Capsicum annuum</i> mostrando síntomas de la enfermedad de pudrición de raíz avanzada causada por <i>Phytophthora capsici</i> .....	39
<b>Figura 15.</b> Actividad de la enzima superóxido dismutasa en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 horas.....	40
<b>Figura 16.</b> Actividad de la enzima superóxido dismutasa en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente.....	40
<b>Figura 17.</b> Actividad de la peroxidasa en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 horas.....	42
<b>Figura 18.</b> Actividad de la peroxidasa en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente.....	42
<b>Figura 19.</b> Actividad de la catalasa en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 horas.....	44
<b>Figura 20.</b> Actividad de la catalasa en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente.....	44
<b>Figura 21.</b> Actividad de la fenilalanina-amonio liasa en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 horas.....	46

<b>Figura 22.</b> Actividad de la fenilalanina-amonió liasa en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente.....	46
<b>Figura 23.</b> Actividad del peróxido de hidrógeno en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 h.....	48
<b>Figura 24.</b> Actividad del peróxido de hidrógeno en <i>C. annuum</i> después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente.....	48

## I. INTRODUCCIÓN

El chile *Capsicum annuum* L. pertenece a la familia de las solanáceas, existen cinco especies domesticadas en el mundo, *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. annuum* (Pérez-Castañeda *et al.*, 2015), siendo esta última una de las más importantes en México, además esta especie es representativa del país, el cual es el centro de origen y de diversificación (Julio *et al.*, 2018). De acuerdo con la FAO, el chile se encuentra entre los 50 principales productos alimenticios (FAO, 2019), es la especie más cultivada tanto en sistemas de producción a cielo abierto, así como en agricultura protegida (FAOESTAT, 2019). La importancia nutracéutica de esta hortaliza se debe a que es una fuente importante de bioactivos como vitaminas A, E y C, compuestos fenólicos, flavonoides y capsaicinoides, todos ellos con actividades biológicas como antioxidante, antimutagénica, antifúngica y antimicrobiana (Antonious *et al.*, 2018). Cabe mencionar que los compuestos mencionados anteriormente provienen del metabolismo secundario de la planta y son inducidos a través de la aplicación de factores de estrés tanto bióticos como abióticos (Jan *et al.*, 2021). Sin embargo, cuando estos factores son expuestos a las plantas de chile a niveles altos se provocan efectos de estrés o efectos negativos, lo que disminuye el rendimiento de la producción hortícola (Vargas-Hernández *et al.*, 2017). Entre los factores bióticos se encuentran varias plagas y enfermedades que amenazan el cultivo de chile en todo el mundo.

El cultivo de chile se ve afectado por la pudrición de raíz, esta enfermedad es la más importante económicamente del género *Capsicum* en el mundo (Medina *et al.*, 2002; Gomez-Hernández *et al.*, 2018; Fawke *et al.*, 2015), es provocada por un oomiceto hemibiotrófico *Phytophthora capsici* (Medina *et al.*, 2002; Rico *et al.*, 2001; Glosier *et al.*, 2007); el cual, en condiciones propicias puede causar daños severos en poco tiempo. Dentro de los síntomas que provoca están la marchitez vascular, necrosis en la base del tallo y en raíces, hojas colgantes y en ocasiones se presenta crecimiento de micelio de color blanco en el tallo (Velásquez-Valle *et al.*, 2020; Hausbeck y Lamour, 2004), en el fruto ocasiona

madurez precoz e irregular, por lo que la planta muere rápidamente debido al desecamiento de la raíz.

Debido a la necesidad de mitigar o retrasar esta enfermedad se han utilizado varias estrategias para su manejo, como el control preventivo, rotación del cultivo, el manejo cultural, donde se recomienda el uso de suelos planos y livianos con buen drenaje y libre de malezas (Valiela, 2014; Mont, 1993), el mejoramiento genético, el control biológico y el uso de agroquímicos (Carmona y Sautua, 2017; Barchenger *et al.*, 2018); sin embargo, estas prácticas no han conferido protección adecuada contra la enfermedad (Hausbeck y Lamour, 2004). En la búsqueda de nuevas estrategias sostenibles para mitigar la enfermedad y controlar a los agentes fitopatógenos con antagonistas, además de beneficiar a las plantas, se han buscado opciones que actúen como elicitores, estos son moléculas que inducen la respuesta de protección en la planta ante cualquier tipo de estrés (Zhao *et al.*, 2005) y como bioestimulantes, los cuales funcionan como activadores de mecanismos fisiológicos de la planta, por lo que su aplicación permite un mejor aprovechamiento de los nutrientes y mayor crecimiento de la planta (Ojeda-Silvera *et al.*, 2015). Se ha propuesto el uso de nanopartículas y soluciones activadas electroquímicamente como opción de manejo de esta enfermedad.

Las nanopartículas se definen como material particulado con tamaños de entre 1 a 100 nm (Khan *et al.*, 2020). La clasificación general de este tipo de partículas es metálicas y no metálicas, poseen una amplia superficie de área por unidad de volumen y de sitios activos catalíticos (Fu *et al.*, 2014). El uso de nanopartículas tiene un amplio rango de aplicaciones en los campos de la ciencia y tecnología, han sido empleadas para la descontaminación del agua y como agentes de desinfección (Purwajanti *et al.* 2015). En la agricultura como antimicrobianos y antifúngicos. Han sido consideradas como una alternativa para el manejo de patógenos (Chen *et al.*, 2020; Koka *et al.*, 2019) debido a los mecanismos de estrés oxidativo, liberación de iones metálicos y estrés no oxidativo que producen simultáneamente (Zaidi *et al.*, 2017). Las propiedades más importantes de las nanopartículas de MgO son que

no son tóxicas, son amigables con el medio ambiente, poseen baja fitotoxicidad y son fáciles de obtener (Kumar y Yadav, 2009). Estudios *in vitro* han demostrado que las nanopartículas de MgO podrían ser aplicadas como microbiocidas contra bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) y bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Stoimenov et al., 2002; Makhluaf, 2005) así como en patógenos fúngicos (Parizi *et al.*, 2014).

Dentro de la actividad antifúngica reportada para las nanopartículas de MgO contra *R. solanacearum*, además se ha encontrado que el efecto es a través del encendido de la respuesta inmune de la planta en jitomate, ya que se activan moléculas de defensa como ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Conrath, 2015).

La solución llamada agua activada electroquímicamente (SAE) ha sido introducida en procesos de desinfección médica, varias industrias como la alimenticia y para la desinfección de agua potable (Thorn *et al.*, 2017). Estas soluciones se generan a partir de electrolisis de una solución con baja concentración de sal dentro de una celda electroquímica, la cual puede ser configurada para producir soluciones con una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas (Thorn *et al.*, 2012; Wang, 2019). Como consecuencia de las reacciones que se generan en el proceso, se produce una mezcla de productos oxidantes como son cloro, óxidos de cloro, peróxidos de hidrogeno, oxígeno, ozono y radicales, presentando características importantes como un pH de 2.3-2.7, un potencial de óxido-reducción (redox) mayor a 1.100 mV (Gaitán y González, 2019). Debido a estas propiedades, las SAEs tienen un gran poder biocida y antimicrobiano de rápida acción (Robinson *et al.*, 2021). Reportes en agricultura muestran que las SAE son un método eficaz para reducir significativamente la presencia de microorganismos patógenos en las superficies de jitomates, sin afectar sus características organolépticas (Deza *et al.*, 2013) y de cebolla (Park *et al.*, 2008). Estos compuestos son una fuente ecológica de diversas actividades antimicrobianas contra diversas bacterias y hongos como *Aspergillus* spp., *Candida* spp. y *Cryptosporidium parvum* oocysts. Actualmente no existen reportes de la evaluación de nanopartículas de MgO y SAEs contra

*P. capsici* en Chile. Por lo tanto, en este trabajo se propuso el uso de nanopartículas de óxido de magnesio y soluciones activadas electroquímicamente como una opción de manejo de la enfermedad de pudrición de raíz.

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

Las prácticas de control actuales se basan en el uso de productos químicos contra el patógeno, sin embargo, estas prácticas sólo actúan parcialmente y no han logrado ser completamente eficaces en el control de la enfermedad en Chile (Jian *et al.*, 2016). Además, los pesticidas presentan el inconveniente de propiciar contaminación ambiental, suelen ser costosos para los productores, principalmente para los de bajos recursos. Por otro lado, se ha encontrado la presencia de residuos tóxicos en los cultivos, además, debido a que las cosechas se dan en condiciones libres de estrés no se sintetizan compuestos benéficos para la salud (Carmona y Sautua, 2017). Mediante el manejo cultural la infección se ha propagado a través de las esporas, las cuales son transportadas por el agua mediante del riego (Fernández-Pavía *et al.*, 2013). Debería haber conocimiento relativo al tema que evalúe el efecto de las opciones de manejo en la enfermedad de pudrición de raíz.

El control biológico ha tenido la deficiencia de no ser específico contra *Phytophthora* sp. ya que podría afectar a hongos simbióticos presentes en la raíz del Chile, además de que el patógeno tiene una mayor velocidad de crecimiento que los antagonistas (Ferrer, 2020). Se han reportado que algunos agentes antagónicos como *Bacillus* sp. no mostraron inhibición de *Phytophthora capsici*, es decir, no redujeron la incidencia y marchitez en el Chile (Ferrer, 2020) pues una cepa de la misma especie puede exhibir diferentes capacidades para producir toxinas e inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos.

Por otro lado, a pesar de que los posibles usos de las nanopartículas son muy amplios, las aplicaciones actuales en el sector alimentario y agrícola son relativamente pocas, debido a que su implementación se encuentra en un estado emergente (Rawat *et al.*, 2018, Yu *et al.* 2022). Además, las soluciones activadas electroquímicamente, han mostrado actividades antimicrobianas y antifúngicas, aunque no se han probado actualmente contra patógenos como *P.capsici* en cultivos de Chile.

Para implementar soluciones viables que sean de bajo costo para los productores, fáciles de implementar y amigables con el medio ambiente se requiere demostrar que el uso de nanopartículas de óxido de magnesio (NPs MgO) y/o el uso de soluciones activadas electroquímicamente (SAE) pudieran contribuir en el manejo de la pudrición de raíz en Chile y si éstas tienen un efecto sobre el agente fitopatogénico, puesto que no se han documentado estudios en cultivos de *C. annuum*.

## **1.2 HIPÓTESIS**

La aplicación de NPs de MgO y SAE pueden reducir significativamente el daño causado por *Phytophthora capsici* en *Capsicum annuum*, de manera que, al menos estadísticamente igual a la aplicación de fosetil-al, sin fitotoxicidad. Lo anterior, debido a que estos tratamientos no convencionales tienen efecto elicitor, bioestimulante y antifúngico.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar la actividad bioestimulante, antifúngica y elicitora de las NPs de MgO y SAE en *Capsicum annuum* presentando pudrición de raíz contra *Phytophthora capsici*.

### 1.3.2 Objetivos particulares

- Aplicar MgO NPs y SAEs a través de ensayos inhibitorios *in vitro* para evaluar la actividad antifúngica contra *P. capsici*.
- Evaluar el efecto de las SAE *in vivo* en chile cultivado en condiciones de invernadero contra *P. capsici* para determinar la severidad del daño.
- Determinar el mecanismo de acción de las SAE mediante análisis enzimáticos para evaluar la actividad elicitora de los tratamientos aplicados en las plantas de chile.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### Taxonomía del chile

El género *Capsicum* comprende plantas herbáceas o sufruticasas, así como arbustivas, aunque es poco frecuente; hojas simples, pecioladas y alternas, aunque frecuentemente se encuentran geminadas y desiguales en porciones lejanas en tallos, margen entero o repado. Las flores son axilares, pueden estar en conjuntos de dos o tres o solitarias, en pedúnculos prolongados; el cáliz tiene forma de campana, con cinco lóbulos pequeños o truncado un poco acrecentado durante la fructificación; corola campanulada, con cinco lóbulos a menudo poco profundos, de coloración blancuzca, amarilla o morada; presenta 5 estambres, de filamentos delgados, glabros, anteras amarillentas, dehiscencia longitudinal; ovario bilocular, con copiosos óvulos, estilo alargado, frecuentemente exerto; el fruto tiene forma de baya jugosa, pungente considerablemente; las semillas son numerosas, comprimidas y aplanadas. *Capsicum annuum* L. es una planta herbácea o arbustiva, alcanza hasta dos metros de altura; con tallos estriados, pueden ser pubescentes o glabros; las hojas tienen pecíolos entre 0.5 a 3.5 cm de largo, lanceoladas, de entre 2-12 cm de largo, de ancho entre 1 a 7 cm, acuminadas en el ápice, su textura es membranácea a cartácea; las flores generalmente son solitarias, con el pedúnculo erecto; de cáliz campanulado, truncado en la parte del ápice y con pequeños apéndices insertos en la parte inferior del borde, considerablemente acrescente durante la fructificación; corola de color blanco, campanulado rotácea, con cinco o a veces nueve lóbulos aproximadamente del mismo largo que el tubo; el fruto tiene forma de una baya hueca, su coloración y tamaño son variables, en algunos cultivos alcanza hasta de 20 cm de largo y de diámetro hasta 15 cm, a menudo pungente; semillas discoides, amarillentas a blanquecinas, de entre 3 - 5 mm de largo (Martínez *et al.*, 2020).



Figura 1. Planta adulta de *Capsicum annuum* L.

Reino: Plantae  
Superdivisión: Spermatophyta  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Asteridae  
Orden: Solanales  
Familia: Solanácea  
  
Género: *Capsicum*  
Especie: *C. annuum*

El género *Capsicum* tiene una taxonomía compleja, esto se debe principalmente a las diversas formas cultivadas y también en los criterios en los que se fundamenta su clasificación. Se estiman diferentes cantidades de especies dependiendo los autores, según Nuez *et al.* (1996), el género comprende alrededor de 30 especies, mientras que otros autores mencionan que el género comprende entre 20 y 23 especies silvestres; sin embargo, son cinco las especies domesticadas en el mundo (Morán *et al.*, 2004; Milla, 2016).

## **2.2 Marchitez del chile**

Se le denomina marchitamiento a la etapa en la que las plantas pierden vigor y sus tejidos, hojas, tallos o frutos pierden la turgencia normal (García, 1984), por su naturaleza, puede ser de origen fisiológico, el cual es ocasionado por condiciones de escasa humedad en el suelo o exceso de evapotranspiración, también puede tener un origen patológico el cual principalmente está caracterizado por una necrosis del sistema radicular o del cuello de las plantas (Chávez *et al.*, 1994), este tipo de marchitamiento por lo general es irreversible. Dentro de los síntomas que se presentan se encuentran la marchitez, en horas donde las temperaturas son mayores, hojas colgantes, rizadas, de coloración marrón. Los bordes o puntas de las hojas pueden llegar a presentar lesiones de coloración café. La producción de flores, botones y frutos se ve afectada con tendencia a abortarse, mismos que presentan una lesión café alrededor del pedúnculo. El fruto puede llegar a presentar una madurez precoz e irregular (Medina *et al.*, 2002). La planta muere rápidamente debido al desecamiento de la raíz provocada por el patógeno *P. capsici* (Rico *et al.*, 2001).

## **2.3 *Phytophthora capsici***

*Phytophthora capsici* es un oomiceto hemibiotrófico, el cual presenta un mecanismo de infección provocado por este fitopatógeno comienza con la germinación de esporangios caducifolios y germinación indirecta a partir de zoosporas. Posteriormente los oomicetos realizan hemibiotrofia, la entrada de éstos a la planta se realiza a través de células epidérmicas o entre células. En el caso de un oomiceto hemibiotrófico que coloniza una raíz, la interacción es inicialmente biotrófica cuando el oomiceto se propaga a través de la corteza, sin embargo, cuando se establece el oomiceto y las hifas han ingresado a la endodermis y la vasculatura, se puede observar necrotrofia (Fawke *et al.*, 2015).

*Phytophthora* sp., fue considerado un hongo, hasta mediados de los años 80, donde por consenso se le consideró en el reino Stramenopila, *Phylum* Oomycota (Lamour, 2013). Se consideran diferentes características de las esporas asexuales para su determinación taxonómica, tales como, número de papilas, longitud del pedicelo, tipo y fenotipo del esporangio, forma que tiene la base y características morfológicas del esporangióforo, mientras que para las esporas sexuales se considera el tipo de anteridio y características particulares del oogonio. En algunos casos se considera la presencia de clamidosporas, temperatura óptima de crecimiento y tipo de reproducción (Martin *et al.*, 2012). Las especies del género *Phytophthora* están presentes en un amplio número de hospederos y se encuentran presentes en diversas etapas fenológicas. Provocan pudrición de la raíz, de los tubérculos y ahogamiento en plántulas (*damping off*), pueden causar pudriciones de yemas o frutos colonizando otras partes de la planta hospedera. *P. capsici* genera la pudrición de la raíz del pimiento, zanahoria y calabaza; pudrición del fruto del pimiento, tomate, berenjena y de las cucurbitáceas, entre otras plantas (Agrios, 2005). Este oomiceto es heterotálico, por lo que produce un gametangio masculino, denominado anteridio y un gametangio femenino denominado oogonio, esta característica le permite producir oosporas cuando ambos tipos de apareamiento se encuentran en el mismo sitio, causando así la formación de oosporas, éstas son esporas sexuales que funcionan como inóculo para la hibernación del patógeno. Las oosporas pueden germinar directamente a través de la formación de un tubo germinativo o indirectamente a través de la formación de esporangios (Ristaino y Johnston, 1999). En plantas de Chile pudren las raíces provocando marchitez irreversible; también puede colonizar las hojas y en algunos casos donde la enfermedad ha avanzado pueden afectar también el fruto.

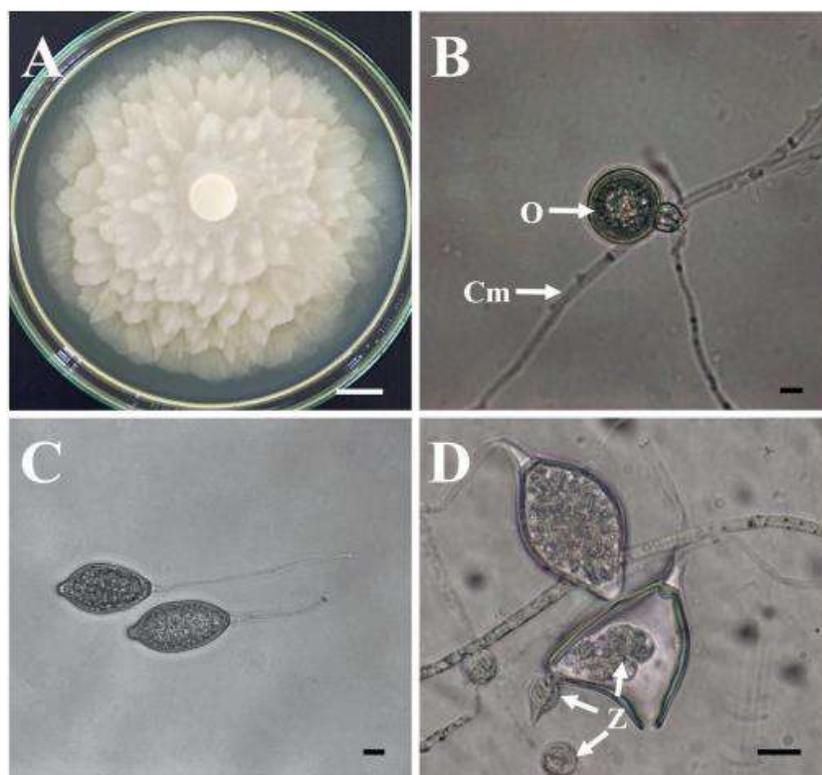


Figura 2. Estructuras morfológicas de *Phytophthora capsici*: A) Morfología de la colonia después de 14 días de crecimiento a 25 °C en medio PDA; B) Micelio cenocítico y oospora (espora sexual); C) Esporangios papilados limoniformes produciendo tubos germinativos; D) Zoosporas dentro y fuera de los esporangios. Cm: Micelio cenocítico; O: Oospora; Z: Zoosporas. Barras: 1 cm (A) y 10  $\mu$ m (B-D). Fuente: Moreira-Morrillo *et al.* 2022.

#### 2.4 Manejo Cultural

El manejo cultural se da mediante el acolchado, el cual consiste en el arropamiento del suelo mediante el uso de plástico degradable. El control preventivo se realiza a través del cultivo en suelos planos, livianos con buen drenaje y libre de maleza; también se sugiere efectuar siembras ralas, nunca densas, se recomienda la rotación de cultivos usando especies que no sean cucurbitáceas, ni solanáceas (Morales-Valenzuela *et al.*, 2002; Barchenger *et al.*, 2018).

### **2.4.1 Manejo químico**

El control químico preventivo se lleva a cabo principalmente por fungicidas como captan, propamocarb, cimoxanil, azoxistrobina, trifloxistrobina, Dimetomorf, entre otros. Se ha evaluado el efecto del Azoxystrobin, Metalaxyl, Propamocarb clorhidrato y 2 Tiocianometiltio Benzotiasol, siendo este último inhibitorio para los aislamientos de *Phytophthora* spp mientras que Azoxystrobin, Metalaxyl y Propamocarb clorhidrato en diferente dosis han mostrado reducción en el crecimiento micelial (Pérez *et al.*, 2005). Otros estudios relacionados con el control químico muestran que el Thiabendazol y Metalaxyl aplicándolos de manera preventiva-curativa disminuyen la presencia de la marchitez del chile ya que el Thiabendazol está dirigido al control de *R. solani* y *Fusarium* spp; mientras que el Metalaxyl controla a *Phytium* spp y *Phytophthora* spp (Chew *et al.* 2007). El principal control de estos fitopatógenos se realiza con la aplicación de agroquímicos, entre ellos, etridiazol, fosetilaluminio, metalaxyl, azoxystrobin y propamocarb clorhidrato (Pérez-Moreno *et al.*, 2004). Recientemente se han desarrollado nuevas clases de plaguicidas con nuevos mecanismos de acción, como los fenilpirroles, anilino pirimidinas, fenoxiquinolinas, las estrobirulinas o los neonicotinoides e inhibidores de la síntesis de quitina (Rubio y Fereres, 2005).

### **2.4.2 Manejo biológico**

El control de las enfermedades y plagas de las plantas por métodos químicos continúa siendo imprescindible para mantener una agricultura económicamente rentable y rendimientos altos de cosecha, para atender estas limitantes surge como alternativa el control biológico, con la finalidad de mejorar la productividad incrementado la disponibilidad de nutrientes y así mismo la protección contra fitopatógenos (Sherathia *et al.*, 2016). Los productos biológicos pueden influenciar en forma directa o indirecta sobre el crecimiento de la planta al ejercer control sobre los fitopatógenos (Bashan *et al.* 2013), dentro de estos productos se encuentra *Bacillus* sp., es un género bacteriano que tiene la habilidad para formar endoesporas y su capacidad de producir metabolitos antimicrobianos y antifúngicos (fenazinas, 2,4- diacetilfloroglucinol, lipopéptidos cíclicos) (Villareal-Delgado *et al.*, 2017).

El género *Trichoderma*, es un hongo anaeróbico que habita el suelo, presenta una etología saprófita e incluso parasítica, algunas especies de este género tienen mecanismos de control a través de competencia directa, ya sea por espacio o por nutrientes e incluso ambas, síntesis de metabolitos antibióticos, inactivación de enzimas de varias especies de *Phytophthora* sp, modificación del entorno para su crecimiento, síntesis de moléculas promotoras del crecimiento vegetal.

### **2.4.3 Manejo con extractos naturales como fungicidas**

Las plantas durante sus procesos evolutivos han desarrollado varios mecanismos defensivos contra insectos, bacterias, hongos y otros microorganismos perjudiciales, siendo los metabolitos secundarios sintetizados por estas moléculas relacionadas con respuestas defensivas. Los compuestos más importantes son flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides, polipéptidos y lectinas (Cowan, 1999). *Lippia graveolens* sintetiza varios compuestos tales como timol, p-cimeno y carvacol, cumarinas, flavonoides, glicosidos cianogénicos, taninos, saponinas, aceites esenciales y quinonas (Silva *et al.*, 2008; Tucuch-Pérez *et al.*, 2018), mientras que *A. lechuguilla* sintetiza sales minerales, oxalatos de calcio, saponinas, cumarinas, triterpenoides, derivados catecoles, fenoles, antraquinonas, benzoquinonas y purinas (Hernández-Soto y Díaz-Jiménez, 2008; Tucuch-Pérez *et al.*, 2018), estas son especies en las que se han encontrado compuestos antimicrobianos.

## 2.5 Nanopartículas

Las ventajas de su uso en la producción de cultivos son una reducción en el uso de químicos, agua y en el manejo de nutrientes; mejorando la asimilación durante la fertilización, incrementando el rendimiento a través del manejo de plagas y de nutrientes (Prasad *et al.*, 2017).

### 2.5.1 Nanopartículas metálicas

Se ha reportado que, entre las nanopartículas metálicas, las de plata, cobre, zinc, titanio tienen propiedades antimicrobianas, así mismo, las nanopartículas de zinc, hierro y magnesio tienen efectos positivos en el crecimiento de las plantas debido a que forman parte de los nutrientes esenciales para éstas (Duhan *et al.*, 2017; Raliya *et al.*, 2017). Su tamaño y morfología pueden modificarse utilizando parámetros como el pH, la fuerza iónica y diferentes temperaturas de calcinación, además de los precursores que modifican su morfología.

Las nanopartículas de óxidos metálicos incluyen varios compuestos tales como  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{CuO}$ ,  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{In}_2\text{O}_3$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{NiO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ , y  $\text{ZrO}$ . Las características morfológicas de las nanopartículas dependen de las condiciones de los procesos utilizados para fabricarlas. La producción de nanopartículas se realiza mediante dos estrategias básicas: top-down, que consiste en romper el material, mientras que la estrategia bottom-up crea nanomateriales a partir de átomos o moléculas. La estrategia top-down incluye métodos mecánicos y sintéticos, de compactación y consolidación, térmicos, de alta energía, de plasma, de fabricación química y litográficos. Por otro lado, los enfoques bottom-up incluyen la deposición química de vapor, la deposición de capas atómicas, la epitaxia de haces moleculares y los métodos en fase líquida. Los métodos químicos, físicos o biológicos pueden producir nanopartículas (Khan *et al.*, 2019; Prasad *et al.*, 2017).

La ventaja de los procesos físicos es que es posible obtener cantidades más significativas de nanopartículas. Por el contrario, el proceso de síntesis químicacoloidal puede controlar el tamaño y la forma de la nanopartícula. También existen métodos de síntesis de nanopartículas verdes que se utilizan para reducir el daño causado por varios compuestos químicos (Casal-Beiroa, 2015). El objetivo de la síntesis verde es en parte disminuir el uso de reactivos y productos peligrosos y ahorrar energía.

### **2.5.2 Vía de entrada de las nanopartículas**

La vía en la cual las nanopartículas entran hacia las plantas está determinada por el método de su aplicación. Las nanopartículas aerotransportadas o rociadas se adherirán a las hojas y a otras partes aéreas de las plantas, mientras que las raíces interactuarán con las nanopartículas asociadas al material del suelo (Navarro *et al.*, 2008). Las NPs pueden ser absorbidas en las superficies de las plantas a través de aberturas naturales como los estómas o tricomas facilitando su entrada, mientras que en la superficie del suelo se facilita la absorción gracias a las raíces semipermeables (Dietz y Herth, 2011). La absorción de las NPs en la planta tiene diversas rutas las cuales dependen del tamaño y superficie que utilizan éstas, debido a que las hojas o frutos tienen una epidermis que está cubierta por una cutícula que permite la entrada de las NPs muy pequeñas, pero las propiedades permeables entre la cutícula, la epidermis y tricómas o estomas son diferentes ya que las propiedades de la cutícula pueden cambiar de acuerdo a la temperatura (Schreiber, 2011).

### 2.5.2 Nanopartículas de MgO

Las nanopartículas de óxido de magnesio (NPs MgO) tienen importantes usos industriales en productos farmacéuticos, remediación de desechos tóxicos, eliminación de gases tóxicos (Hossainet *et al.*, 2014). La exposición a varios tipos de estrés biótico y abiótico genera la acumulación celular de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como radicales superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $OH^-$ ) (Vestíbulo *et al.*, 1997). Las ROS no sólo limitan la entrada de patógenos, sino que también juegan un papel importante en la activación de respuestas de defensa locales y sistémicas, como la inducción de genes para llevar a cabo la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Henry *et al.*, 2013). Las hormonas de la planta como el ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno juegan un papel importante en la respuesta defensiva como moléculas de señalización (Robert-Seilanian *et al.*, 2011) y están involucradas en dos vías principales de señalización defensiva contra patógenos: la vía mediada por ácido salicílico y la vía mediada por ácido jasmónico y etileno, las cuales se estimulan como respuesta a patógenos biotróficos y necrotrofos respectivamente.

Las NPs MgO se pueden preparar con áreas de superficie extremadamente altas y morfología de cristal con numerosos bordes, esquinas y sitios de superficie reactiva. Debido a las características de sus estructuras las NPs MgO pueden producir ROS en sus superficies (Sawai *et al.*, 1996); una propiedad notable que atrae el interés como posible tratamiento antibacteriano es que éstas pueden inactivar bacterias a través de la formación de  $O_2^-$  mediante la adsorción de bacterias cargadas negativamente en sus superficies cargadas positivamente (Jin y He, 2011). La frecuencia de contacto entre las células bacterianas y las nanopartículas de óxido de magnesio determina la actividad bactericida (Jin y He, 2011). En comparación con otros bactericidas sólidos como  $TiO_2$ , plata y cobre soportados, las NPs MgO tienen ventajas de no ser tóxicas, son preparadas fácilmente a partir de precursores económicos accesibles; por lo tanto, tienen un potencial considerable para su uso como material bactericida y fungicida (Huang *et al.*, 2005).

## 2.6 Soluciones activadas electroquímicamente (SAE)

Las soluciones activadas electroquímicamente (SAE) se obtienen a través de la electrólisis de un mineral en una solución salina (el electrolito) en una celda electroquímica Fig. 1. Cuando se aplica una corriente continua (A), los procesos electroquímicos en la superficie del material del electrodo transforman el electrolito (NaCl) en un estado "metaestable" activado, exhibiendo reactividad química elevada y resultando en la modificación de estructuras iónicas moleculares (Petrushanko y Lobyshev, 2001; Thorn *et al.*, 2012).

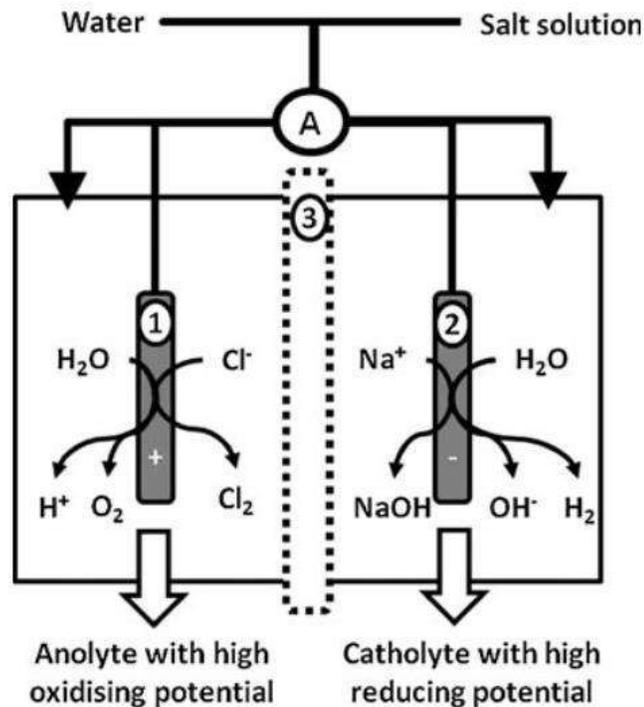


Figura 3. Celda electroquímica prototípica utilizada para generar soluciones activadas electroquímicamente (SAE), que consta de dos electrodos, un ánodo (1) y un cátodo (2), separados por un ion permeable cambio de diafragma (3) Fuente: (Thorn *et al.*, 2012)

### **2.6.1 Propiedades fisicoquímicas de las SAE**

Las propiedades fisicoquímicas del anolito resultante son dependientes de ambas características de la celda electroquímica y sus parámetros de operación, aunque las condiciones propicias tienden hacia un bajo pH, entre 2 y 3 y un alto potencial de óxido-reducción cercano a +800 mV son buscados usualmente. En la cámara catódica se genera hidrógeno, con otras sustancias reactivas, las cuales son principalmente antioxidantes, resultando en un decremento en el potencial redox y un incremento en el pH. Éstas son denominadas soluciones catódicas SAE<sup>c</sup> han sido usadas para tratar efectivamente efluentes industriales, sin embargo, poseen sólo actividad microbiana limitada (Trudova *et al.*, 2016).

La transformación del electrolito a un estado metaestable no es permanente. Tras la generación y la recuperación de las SAEs las especies químicas presentes se desplazarán espontáneamente de su condición termodinámicamente desequilibrada a una forma estable no activada, durante lo que se conoce como “periodo de relajación” (Petrushanko y Lobyshev, 2001).

### **2.6.2 Síntesis de las soluciones activadas electroquímicamente**

El agua se somete a un tratamiento electrolítico en una de las cámaras (anódica o catódica) en una celda electroquímica. Mediante conversión de sustancias disueltas, se vuelve una solución fuerte de oxidantes y ácidos, de álcalis y agentes reductores. La aplicación de estas soluciones se debe a su efecto antimicrobiano y a sus propiedades antisépticas.

Se encuentran varios equipos diferentes para llevar a cabo la síntesis electroquímica de soluciones, se dividen en dos grupos, los que tienen diafragma entre electrodos, y sin diafragma. Todos los equipos tienen al menos una celda electroquímica con una fuente de alimentación. Pueden contener sistemas técnicos, que permiten mejorar la comodidad y fiabilidad: dispositivos de medición, reguladores de presión y flujo, bombas, tanques, filtros, dispositivos para ablandar el agua, para la preparación de salmuera, para lavado de las líneas hidráulicas, para la recogida y neutralización de los gases de la electrólisis, de mantenimiento automático de corriente y tensión, de cortes de electricidad y de agua de emergencia (Thorn *et al.*, 2017)

La tecnología de la activación electroquímica de soluciones acuosas se fundamenta en el proceso electrolítico a través de una membrana porosa de material cerámico, durante el cual la solución de agua y NaCl se separan en dos flujos, una corriente eléctrica entre dos polos de metal inerte actúa a través de dicha solución. Este tratamiento es resultado de la acción ocurrida en la cámara del ánodo, es decir en la fracción anódica, que es un fuerte oxidante altamente eficaz a bajas concentraciones, mientras que, dada su acción eficaz a bajas concentraciones, no lo convierte en tóxico para la salud humana ni repercute en el medio ambiente, además no se acumula en el suelo. Se usa principalmente en la desinfección microbiológica como antiséptico. La fracción catódica (el flujo separado por el polo negativo) posee propiedades reductoras, siendo un buen catalizador de reacciones químicas, formación de cristales, etc (Zarattini, 2015).

Por otra parte, a nivel molecular, sucede que el campo eléctrico creado entre ambos polos es mayor que la energía que tienen los enlaces puente de hidrógeno del agua, disociando las fuerzas de Van der Waals, y atrayendo así, a sus respectivos elementos al polo eléctrico opuesto. El cloruro sódico, actúa como electrolito, aumentando el rendimiento de la electrólisis del agua, también rompe sus enlaces y se disocia en iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ; mientras que el diafragma permite el paso de los iones al lado correspondiente de la membrana, concentrando los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$  en el polo negativo y los iones  $\text{O}_2^-$  y  $\text{Cl}^-$  y sus compuestos en el positivo (Trasatti, 1991).

En la salida de las celdas, debido a la barrera de la membrana porosa, ambos efluentes están separados uno del otro. La solución alcalina (fracción catódica) contendrá compuestos de hidrógeno y sodio, mientras que la fracción anódica será una mezcla de compuestos inestables de oxígeno y cloro (Belitzkaya *et al.* 2021). La fracción anódica es un desinfectante no tóxico de alto rendimiento. Esta solución, tiene un elevado número de compuestos oxigenados y de cloro metaestable, su acción directa puede degradar las proteínas de las células y elimina bacterias, hongos, virus e incluso esporas de éstos (incluidos los patógenos presentes en hospitales e infecciones anaerobias, así como a *Mycobacterium tuberculosis*) (Vinogradov *et al.* 2011).

### **2.6.3 Mecanismo de acción de las SAE**

El mecanismo de acción a través del cual la fracción anódica elimina múltiples microorganismos se debe principalmente a su acción, ésta se basa en la irrupción de las moléculas de los compuestos metaestables del oxígeno y del cloro molecular sobre la superficie de los microorganismos y de sus esporas. Primeramente, los iones libres reaccionan rápidamente y desnaturalizan las proteínas de los microorganismos. Una vez que la fracción anódica entra en contacto con un microorganismo, ésta desnaturaliza las proteínas que constituyen las membranas celulares bacterianas. Debido a la diferencia de la presión osmótica, la fracción anódica causa una ruptura en la membrana exterior que lleva a la muerte celular.

Esta mezcla metaestable de oxidantes es un medio eficaz con acción biocida contra microorganismos, ya que causa daños irreversibles en la estructura y función de los biopolímeros de los microorganismos a nivel de reacciones de transferencia de electrones. Las partículas metaestables con diferentes valores de potencial electroquímico tienen un amplio espectro universal de actividad, es decir, son capaces de ejercer un efecto perjudicial en todos los principales grupos taxonómicos de microorganismos (bacterias, mycobacterias, virus, hongos, esporas) sin dañar las células de los tejidos humanos y otros organismos pluricelulares, como plantas, es decir, a las células somáticas en el sistema multicelular (Belitzkaya y Gribus, 2019).

La concentración de los compuestos activados de cloro y oxígeno es el resultado de la concentración de NaCl suministrada en la entrada y también dependerá de la intensidad de la corriente eléctrica que hay entre ambos polos. Cuando la solución oxidante deja la celda electroquímica, comienza lentamente un proceso de vuelta al equilibrio electroquímico. Éste tiene una duración de entre tres y seis meses aproximadamente, mientras los cuales la solución se mantiene activada. Debido a esta característica, este tipo de soluciones se deben generar *in situ*, y su mayor poder desinfectante se manifiesta durante los primeros días (Belitzkaya y Gribus, 2019).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Ubicación del área de investigación**

La experimentación se llevó a cabo en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala. La localidad de Amazcala perteneciente al municipio de El Marqués, Querétaro, se encuentra localizado en el sector suroeste del Estado, entre los 20° 31' y 20° 58' latitud norte. La experimentación se realizó en un invernadero completamente condicionado, para evitar la posible diseminación del fitopatógeno, también se controlaron las condiciones del cultivo del chile.

##### **3.1.2 Obtención de las nanopartículas de óxido de magnesio (MgO NPs)**

Las nanopartículas de óxido de magnesio (MgO NPs) se obtuvieron del Laboratorio de Micro y Nanotecnología del Campus aeropuerto de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro a cargo del Dr. Rufino Nava Mendoza y la Dra. Viviana Palos.

##### **3.1.3 Obtención de las soluciones activadas electroquímicamente**

Las SAE se produjeron a partir de una solución de cloruro de sodio (NaCl) en agua H<sub>2</sub>O en una celda electroquímica, los ánodos de ésta estaban elaborados de titanio y recubiertos con óxidos metálicos basados en rutenio e iridium, mientras que los cátodos solamente de titanio. El pH de las SAE se ajustó hasta alcanzar la neutralidad (7).

##### **3.1.4 Evaluación de la actividad *in vitro* de las NPs MgO y SAE contra *P.capsici***

La cepa de *Phytophthora capsici* fue proporcionada por el Doctor Mario González Chavira y la Maestra en Ciencias Brenda Guerrero, ambos pertenecientes al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo experimental Bajío.

La cepa fue crecida en cajas Petri con medio nutritivo PDA (papa dextrosa agar) durante 7 días, a una temperatura controlada de 25°C ± 2 °C, estas muestras sirvieron como

inóculo. Para la actividad antimicrobiana se preparó medio enriquecido con las nanopartículas a una concentración de C0 = 0 ppm, C1= 50 ppm, C2 = 100 ppm, C3 = 250 ppm, C4= 500 ppm, C5= 1000 ppm, C6=1500 ppm, cada una de las preparaciones se llevó a cabo por quintuplicado. Las concentraciones usadas de nanopartículas fueron las mismas que para las soluciones activadas electroquímicamente. Posteriormente se inocularon discos de 5 mm de diámetro de micelio del fitopatógeno en las cajas de Petri con el medio PDA. Se incubaron las cajas a temperatura ambiente, estuvieron selladas con parafilm y se midió el crecimiento de micelio cada 24h durante 7 días tal como lo reporta (Kokka *et al.*, 2019).

### **3.2 Evaluación del efecto de las MgO NPs y SAE *in vivo* en chile cultivado en condiciones de invernadero contra *P. capsici*.**

#### **3.2.1 Selección del material vegetal**

Se utilizaron semillas de chile jalapeño variedad Jalapeño M.

#### **3.2.2 Producción del material vegetal**

Se utilizaron contenedores de polietileno de 200 cavidades, rellenas con sustrato comercial peat moss. Después de la siembra, las charolas se mantuvieron en condiciones de invernadero hasta que alcanzaron la fenología óptima para su trasplante. Se trasplantaron en bolsas de cultivo de invernadero, de 4 l de capacidad con orificios en la base de éstas para facilitar el drenado de agua y nutrientes.

#### **3.2.3 Diseño experimental**

Una vez acondicionado el invernadero se estableció el diseño experimental con unidades experimentales en bloques acomodados completamente al azar, se contó con 10 tratamientos con 4 plantas por tratamiento, 3 repeticiones. Se hizo un acomodo de tal manera que las plantas estuvieran expuestas a las soluciones activadas electroquímicamente y por otra parte se confrontaran estos mismos tratamientos con la presencia del *P. capsici* siguiendo el mismo diseño experimental.

### 3.2.4 Inoculación de plantas de *Capsicum annuum* con zoosporas de *Phytophthora capsici*

De un cultivo de *Phytophthora capsici in vitro* de 15 días de crecido se vertió 1 ml de agua destilada estéril con una micropipeta del mismo volumen. Posteriormente con un asa bacteriológica estéril se hizo un raspado del micelio del oomiceto para recuperarlo en un tubo Ependorff de 10 ml de capacidad, el agua destilada junto con el micelio compone el inóculo, éste se recuperó con la finalidad de que el fitopatógeno liberase zoosporas. Del tubo Ependorff que contenía el inóculo se llevaron a cabo cinco diluciones seriadas ( $10^{-5}$ ) en tubos Ependorff, los cuales contenían 9 ml de agua destilada estéril, a cada uno de los tubos se le agregó 1 ml del inóculo para aforar hasta llegar a los 10 ml de volumen, así se disminuyó la concentración de esporas en la solución; se agitó manualmente para inducir que las zoosporas se enquistaran y se volvieran viables para llevar a cabo la infección en la planta. (Chávez-Díaz y Zavaleta-Mejía, 2019). Una vez realizadas las diluciones seriadas del tubo final con la ayuda de una micropipeta de 200  $\mu$ l se tomó el mismo volumen y se vertió en una cámara de Neubauer para contabilizar el número de esporas, para posteriormente llevar a cabo la infección en las plantas.

La inoculación de *P. capsici* se llevó a cabo mediante dos métodos, uno causando un daño mecánico en la corona del tallo, con la ayuda de una micropipeta, sin perforar los tejidos de la planta ni hierirla demasiado para matarla, se aplicaron 25 ml hacia la base del tallo de cada una de las plantas y 25 ml de inóculo hacia el suelo, este método es conocido como *drench*. Todas las plantas fueron infectadas con una misma concentración del inóculo de  $6 \times 10^6$  zoosporas/ml, las plantas control usaron agua destilada estéril como inóculo. Las plantas fueron monitoreadas a las 72 h después de la inoculación para evaluar el desarrollado la enfermedad.

### 3.2.5 Método de aplicación de soluciones activadas electroquímicamente *in vivo*.

Las soluciones activadas electroquímicamente contenían 250 mg l<sup>-1</sup> cloro activo y estaban ajustadas a un pH deseado (7), fueron asperjadas vía foliar a través del transporte apoplástico de las plantas de chiles trasplantadas con 6 u 8 hojas hasta que estuvieron completamente mojadas, *drop point* (Zarattini *et al.*, 2015). La variable control consistió en planta de chile sin ningún tratamiento.

La aplicación de las NPs MgO fue vía foliar, con base en las dosis que mostraron los mejores resultados en las pruebas *in vitro* en plantas de *C. annuum*; su aplicación se llevó a cabo en plantas trasplantadas con 6 u 8 hojas verdaderas. Se aplicaron diez tratamientos, los cuales fueron aplicados con intervalos de 0, 15, 30 y 45 días y 72 h según sea el tratamiento, con 3 repeticiones por tratamiento. La variable control consistió en plantas sin las nanopartículas de óxido de magnesio, ni SAE; las variables de respuesta medidas fueron las siguientes: severidad de los síntomas, altura de la planta, ancho del tallo y número de hojas.

**3.3** Después de la inoculación, la presencia de los síntomas y la severidad de la enfermedad fueron evaluadas acorde a la escala de severidad reportada por Mmbaga *et al.* (2018), con ligeras modificaciones, en la cual: 0 = planta saludable, asintomática y vigorosa, 1 = las hojas más bajas con presencia de clorosis, algunas hojas presentan pérdida de turgencia, 2 = la mayoría de las hojas presentan pérdida de turgencia y marchitamiento, pocas hojas defoliadas 3 = todas las hojas presentan marchitamiento, la planta está defoliada, 4 = marchitamiento de la corona y del tallo con una coloración parda, presencia de necrosis, 5 = planta muerta.

La evaluación de los síntomas se realizó bajo un esquema de variable nominal ordinal acorde a la escala mencionada previamente.

Después de haber sido recolectadas las hojas de chile cada 15 días fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, molido en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C.

### **3.3.1 Actividad enzimática de la superóxido dismutasa**

La enzima se extrajo de 0.2 g de polvo de acetona de tejido, se homogeneizó 30 segundos a 15,000 rpm en 10 ml de tampón de fosfato de sodio 50mM (pH 7.8) a 4°C, se utilizó homogeneizador Ultra Turrax T25D (IKA Works, Wilmington, NC); luego, se centrifugó durante 30 minutos a 20,984  $\times$  g y 4°C; el sobrenadante fue decantado. La mezcla de reacción fue, en 27 ml de buffer de fosfato 0.05 M (pH 7.8) la cual contenía EDTA a 0.1mM, 1.5 ml de solución de L-metionina 0.2 M y 1 ml de nitroazul de tetrazoilo 1.7 mM y 0.75 ml de TritonX-100 al 1%. Se emplearon 0.3 ml de la solución de riboflavina 117  $\mu$ M y 0.4 ml de extracto de enzima, al cual fueron añadidos ml de mezcla de reacción y posteriormente se agitaron. La mezcla de reacción se expuso a luz fluorescente emitida por una lámpara de 20 W durante 15min, y la absorbancia se midió a 560 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 40, Perkin Elmer). La velocidad de reacción se determinó como el incremento de la absorbancia debido a la formación de formazán de nitroazul de tetrazoilo por unidad de tiempo. Una unidad de SOD se definió como la concentración de extracto de enzima que inhibió el 50% de la formación de formazán de nitroazul de tetrazoilo. Los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente, entre 26-28 °C). La actividad enzimática específica de SOD fue expresada como unidades de actividad por miligramo de proteína (U/mg). Se determinó con base en lo reportado por Rivera-Pastrana *et al.* (2013) con algunas modificaciones.

### **3.3.2 Actividad enzimática de la peroxidasa**

La enzima se extrajo de 0.2 g de tejido fresco, se homogenizó en 10 ml de solución tampón de fosfatos 0.1 M (pH 7) a 4°C. La mezcla se agitó durante 20 minutos a 4 °C, después se centrifugó durante 20 minutos a 20 984  $\times$ g a 4 °C. El decantado se consideró como el extracto enzimático. Después se preincubó durante 5 minutos 1030  $\mu$ l de mezcla de reacción (fosfato de sodio 100 mM, pH 7; que contenía 20 mM de guayacol) y 270 $\mu$ l de extracto de enzima a 30°C. La actividad de POD se midió a 470 nm durante 5 minutos a 30 °C incubada. La reacción comenzó con la adición de 500  $\mu$ l de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM y fue medido el incremento en la absorbancia por 120 s. La actividad específica de esta enzima se reportó

como  $\Delta A_{460}$  (U/mg). Esta actividad se determinó con base en el método reportado por Sellamuthu *et al.*, (2013) con modificaciones para ajustarlo a un volumen de 3 ml.

### **3.3.3 Actividad enzimática de la catalasa.**

Para la preparación del buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, glicerol al 20% v/v, 2-mercaptoetanol 30 mM, pH 8.0. Se disolvieron 1.575 g de tris-HCl en 60 ml de agua destilada. Posteriormente se añadieron 20 ml de glicerol y 210  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol. Fue necesario hacer un ajuste de pH hasta llegar a 8 con ácido, posteriormente se aforó hasta alcanzar un volumen final de 100 ml con agua destilada.

Para la preparación del buffer de reacción (fosfato de potasio 50 mM, pH 8. Se disolvieron 0.0965 g de fosfato de potasio monobásico y 0.749 g de fosfato de potasio dibásico en 60 ml de agua destilada. Se ajustó el pH hasta alcanzar a 8 con ácido. Posteriormente se aforó a un volumen final de 100 ml usando agua destilada. La solución de peróxido de hidrógeno 100 mM, se añadieron 0.566 ml de peróxido, con 50% de pureza y se volvió a aforar hasta conseguir 100 ml con agua destilada. Para la preparación del extracto enzimático se pesaron 0.3 g del tejido vegetal y se homogeneizaron utilizando un mortero con 1 ml de buffer de extracción a 4 °C. A continuación, se colocó la muestra homogeneizada en un tubo de ensayo, se le añadió 1ml de buffer de extracción y se agitó en un vórtex durante 2 minutos, después se centrifugó la mezcla a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4°C y finalmente se separó el sobrenadante, el cual fue el extracto enzimático requerido y se almacenó a 4°C.

El ensayo de la actividad enzimática se llevó a cabo en celda, en la cual se colocaron 2 ml de buffer de reacción, después se añadieron 0.2 ml de solución de peróxido de hidrógeno, posteriormente se añadió 0.1 ml del extracto enzimático y finalmente el cambio de la absorbancia fue medido a 240 nm durante 6 minutos, se hizo una lectura cada 60 s.

### **3.3.4 Actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa**

Los extractos se realizaron de acuerdo con el método propuesto por Sellamuthu *et al.*, (2013). Se homogeneizaron 0.2g de tejido en 10 ml de solución tampón de boratos

0.1M, pH 8.8, se añadieron 5 mM de  $\beta$ - mercaptoetanol, 2 mM de EDTA y 1% de Polivinil-polipirrolidona (PVPP) durante 30 segundos a 15 000 rpm usando un homogeneizador Ultra Turrax (IKA Works, Wilmington, NC). Después se centrifugó la mezcla durante 30 minutos a  $20,984 \times g$  a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.45  $\mu$ m y fue considerado como extracto enzimático. La reacción se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por (Da Cunha, 1987) para inhibir la actividad de fenilalanina amonio transaminasa (PAT) y la formación de fenilpiruvato: 440  $\mu$ l de extracto enzimático y 1300  $\mu$ l de una solución inhibidora de PAT (10 mM L-aspartato, 20 mM de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico y 20 mM de piridoxal-5'- fosfato) se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, TA, (24-26°C). Posteriormente se añadió 1300  $\mu$ l de L-fenilalanina (para conseguir una concentración final de 10 mM en la reacción). La reacción se incubó durante dos horas a temperatura ambiente (26-28°C), ésta se detuvo con la adición de 100  $\mu$ l de HCl 6 M y su absorbancia fue medida a 290 nm. La actividad enzimática fue expresada como nm de ácido cinámico (U/mg).

### **3.3.5 Actividad del peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno fue determinado de acuerdo con el método descrito por Junglee *et al.* (2014). Primero 150 mg de muestra de hoja pulverizado con nitrógeno líquido fue homogenizado con 0.25 ml de ácido tricloroacético (TCA) (0.1% (peso: volumen), 0.5 ml KI. (1 M) y 0.25 ml buffer fosfato de potasio (10 mM, pH 5.8). La absorbancia fue medida a 350 nm.

### **3.4 Análisis estadístico**

Los resultados de los ensayos fueron expresados como el promedio de 3 ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. El análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía se realizó con el software estadístico Minitab, para el análisis de comparación entre medias se hizo una prueba de Tukey, con un 95% de nivel de confianza ( $p < 0.05$ ).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación de la actividad *in vitro* de las SAE contra *Phytophthora capsici*

Para los ensayos de inhibición del crecimiento del fitopatógeno se utilizaron diferentes concentraciones de soluciones activadas electroquímicamente, las cuales fueron: 50, 100, 250 y 500 ppm, además de los controles; el control positivo consistió en *P. capsici* sin ningún tratamiento, mientras que para el control negativo se usó Fosetil-al, también conocido comercialmente como Aliette®.

El crecimiento de *Phytophthora capsici* ocurrió a los tres días después de haber sido cultivado en cajas de Petri en medio papa dextrosa agar (PDA). Ninguna de las concentraciones de nanopartículas de óxido de magnesio utilizadas en los ensayos inhibitorios mostró el efecto esperado, ya que se observó crecimiento de *P. capsici* en cada uno de los cultivos *in vitro* bajo todas las concentraciones, tal como se muestra en la figura 4.

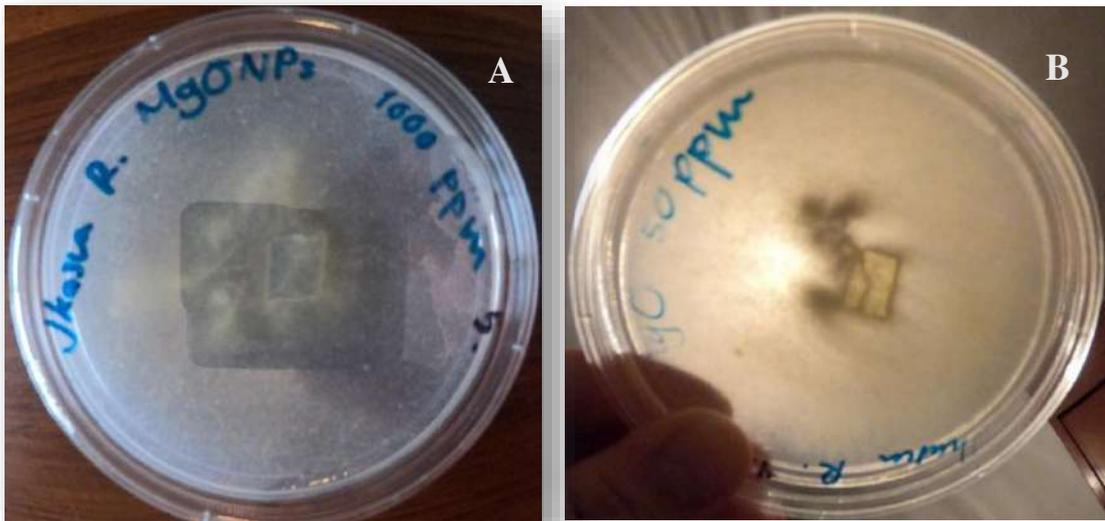


Figura 4. A) Medio de cultivo PDA adicionado con una concentración de 1000 ppm de nanopartículas MgO, en medio se observa el disco de micelio de *P. capsici*. B) Medio de cultivo PDA adicionado con una concentración de 50 ppm de nanopartículas MgO, en medio se observa el disco de micelio de *P. capsici*.

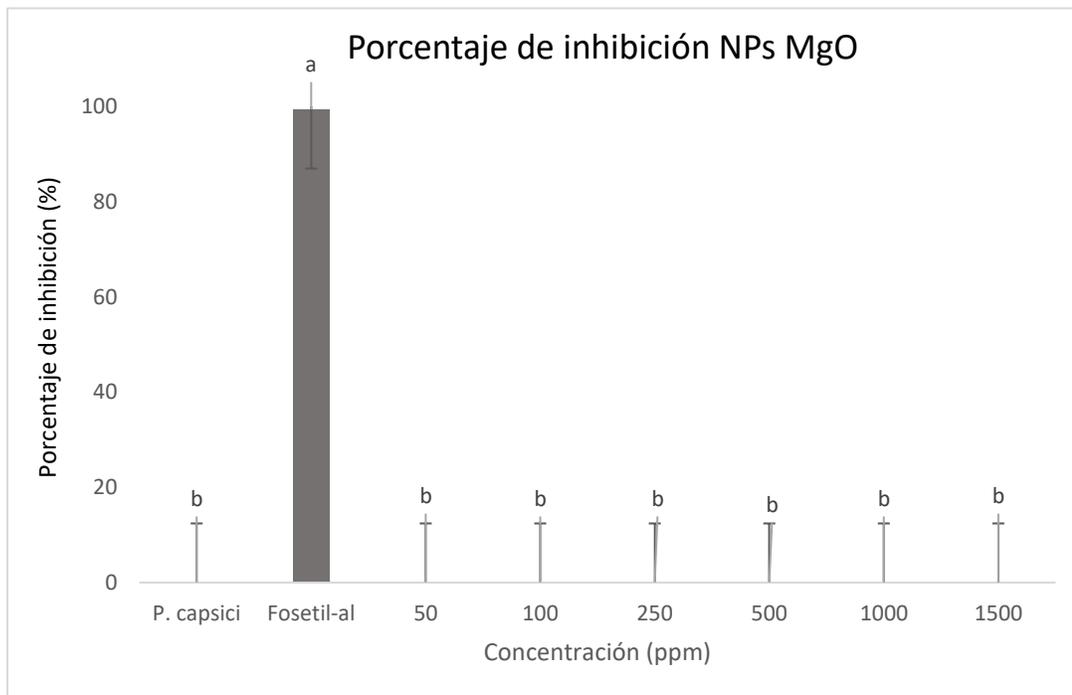


Figura 5. Inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici* causante de la enfermedad de pudrición de raíz tratado con diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de magnesio. No se muestra diferencia significativa con respecto al control positivo, prueba de Tuckey:  $p < 0.05$ ; letras diferentes indican diferencia significativa.

Las pruebas *in vitro* con nanopartículas de óxido de magnesio no mostraron ningún efecto en la inhibición del crecimiento del oomiceto, por lo que no hubo diferencia significativa con respecto al control positivo, esto podría deberse a las propiedades químicas de éstas, debido a que el magnesio es un elemento crucial para la nutrición de varios microorganismos fitopatógenos incluyendo oomicetos, y éstos podrían utilizar este compuesto para su crecimiento y desarrollo. Los datos se muestran en la figura 5.



Figura 6. Inhibición completa del crecimiento de *Phytophthora capsici* agente causal de la enfermedad de pudrición de raíz a una concentración de 250 ppm con soluciones activadas electroquímicamente (SAE) en pruebas *in vitro*.

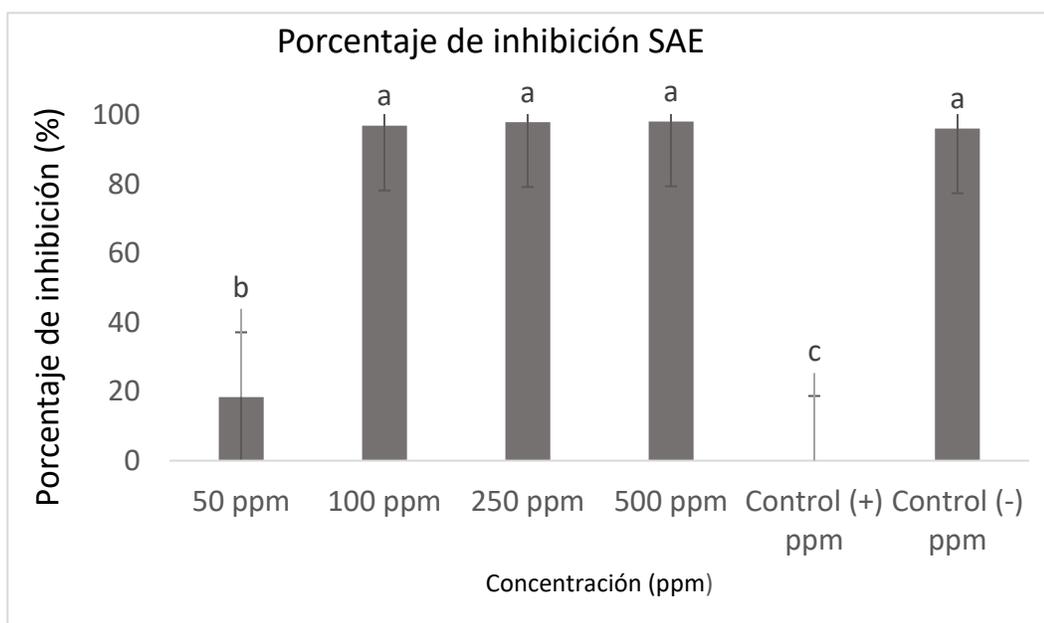


Figura 7. Medición del porcentaje de inhibición del crecimiento bajo distintas dosis de soluciones activadas electroquímicamente en medios de cultivo *in vitro*, se muestra que, a una concentración baja de 50 ppm, el crecimiento de *P. capsici* se ve mitigado, dosis más altas de estas soluciones inhiben completamente el crecimiento del fitopatógeno, con respecto al control positivo. Prueba de Tuckey:  $p < 0.05$ , letras diferentes indican diferencia significativa.

#### 4.2 Evaluación del efecto de las SAE *in vivo* en chile cultivado en condiciones de invernadero contra *P. capsici* para determinar la severidad del daño.

El material vegetal que se utilizó fue proveniente de semillas Jalapeño M, las plántulas debían de alcanzar de 6 a 8 hojas verdaderas para llevar a cabo la experimentación, plántulas con características distintas no fueron seleccionadas para la experimentación, tampoco para la inoculación de éstas.



Figura 8. Plántulas de *Capsicum annuum* en almácigo de dos semanas de crecimiento mostrando los cotiledones.



Figura 9. Plántula de *Capsicum annuum* mostrando hojas verdaderas, es en este estadio cuando se llevó a cabo el trasplante.



Figura 10. Método de aplicación de las soluciones activadas electroquímicamente a través de la aspersión foliar en plantas de *Capsicum annuum*, hasta alcanzar el punto de goteo

El crecimiento de las plantas fue monitoreado diariamente, en cuanto a la altura de la planta y el número de hojas, los tratamientos tuvieron diferencia significativa con respecto al control, pero no hubo diferencia significativa en el grosor del tallo. En el número de hojas se observó una diferencia significativa con respecto al control, a una concentración de SAE de 20 ppm aplicada quincenalmente. En el cuadro 1 y 2 se muestran las diferencias entre las variables de respuesta morfológicas evaluadas.



Figura 11. A la izquierda planta de *Capsicum annuum* presentando una ligera necrosis basal del tallo, síntoma leve de pudrición de raíz, a la derecha se observa una planta con la enfermedad mitigada por el tratamiento con SAE.

Tratamiento 72h	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Número de hojas	Número de frutos
<i>C. annuum</i>	24.82 <sup>b</sup>	5.82 <sup>a</sup>	52.47 <sup>a</sup>	4.75 <sup>b</sup>
<i>C. annuum</i> + SAE 4 ppm	31.14 <sup>ab</sup>	6.7 <sup>ab</sup>	59.2 <sup>a</sup>	7.71 <sup>b</sup>
<i>C. annuum</i> + SAE 8 ppm	29.73 <sup>ab</sup>	6.3 <sup>a</sup>	65.3 <sup>a</sup>	5.85 <sup>b</sup>
<i>C. annuum</i> + SAE 12 ppm	25.52 <sup>b</sup>	6.3 <sup>a</sup>	52.80 <sup>a</sup>	13.13 <sup>a</sup>
<i>C. annuum</i> + SAE 16 ppm	33.75 <sup>a</sup>	7.01 <sup>a</sup>	73.40 <sup>a</sup>	9.25 <sup>ab</sup>

Cuadro 1. Altura, diámetro del tallo, número de hojas y frutos de plantas de *C. annuum* a diferentes concentraciones de SAE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando Tucky  $p < 0.05$

Tratamiento quincenal	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Número de hojas	Número de frutos
<i>C. annuum</i>	32.0 <sup>a</sup>	6.07 <sup>a</sup>	51.40 <sup>b</sup>	5.12 <sup>b</sup>
<i>C. annuum</i> + SAE 20 ppm	34.4 <sup>a</sup>	5.98 <sup>a</sup>	81.7 <sup>a</sup>	9.87 <sup>ab</sup>
<i>C. annuum</i> + SAE 40 ppm	26.94 <sup>a</sup>	4.97 <sup>a</sup>	75.00 <sup>ab</sup>	11.12 <sup>a*</sup>
<i>C. annuum</i> + SAE 60 ppm	28.5 <sup>a</sup>	6.46 <sup>a</sup>	64.70 <sup>ab</sup>	8.37 <sup>ab</sup>
<i>C. annuum</i> + SAE 80 ppm	28.24 <sup>a</sup>	5.44 <sup>a</sup>	71.80 <sup>ab</sup>	7 <sup>ab</sup>

Cuadro 2. Altura, diámetro del tallo, número de hojas y frutos de plantas de *C. annuum* a diferentes concentraciones de SAE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando Tucky  $p < 0.05$ . Valor p con un \* se utilizó Tucky  $p < 0.1$

Plantas tratadas con la concentración más alta aplicada cada 72 horas mostraron tener un efecto significativo en su altura, en comparación con los controles. La concentración de 16 ppm aumentó la altura de la planta en un 67.5%. A una concentración de 12 ppm no hubo una diferencia significativa en la altura de la planta comparada con el control. Ninguno de los tratamientos con SAE parece tener un efecto en el diámetro del tallo y en el número de hojas comparada con el control. Con respecto a la variable rendimiento, la dosis de 12 ppm fue el mejor de los tratamientos, aumentando significativamente el número de frutos en un 138% comparada con la planta control, mientras que las demás dosis no mostraron diferencia significativa.

Por otra parte, las plantas que fueron tratadas con SAE aplicadas quincenalmente no mostraron diferencia significativa en su altura comparadas con las plantas control, de la misma manera, ninguna de las concentraciones aplicadas tuvo un efecto en el diámetro del tallo cuando fueron comparadas con el control, en el cual no se hizo ninguna aplicación. Sin embargo, el número de hojas se vio aumentando significativamente al aplicarse una concentración de SAE de 20 ppm quincenalmente, este aumento representó el 79.5 % de la biomasa producida por las plantas de Chile, lo que indica que en esta concentración y esta frecuencia se obtiene el mejor efecto bioestimulante, mientras que las otras concentraciones arrojaron resultados similares entre concentraciones, a excepción de la concentración de 40 ppm la cual fue la segunda con mayor producción de biomasa además de que mostró el mayor rendimiento al aumentar el número de frutos en un 100%, mientras que las otras concentraciones obtuvieron valores similares a los de las plantas control.

Fluctuaciones de los niveles ROS potenciadas por el HOCl y -OCl son interpretadas como moléculas de señalización requeridas para el crecimiento y desarrollo adecuado de la planta, el resultado biológico de la señalización de las ROS está intrínsecamente relacionado con la naturaleza de la señal y es dependiente de la dosis, pues se correlaciona con procesos como la respuesta hipersensible, resistencia sistémica adquirida y regulación hormonal (Devireddy *et al.* 2021).

Tratamiento 72 h	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Severidad de la enfermedad
<i>P. capsici</i>	21.03 <sup>b</sup>	4.8 <sup>c</sup>	2.29 <sup>a</sup>
Aliette®	26.47 <sup>ab</sup>	5.3 <sup>bc</sup>	1 <sup>ab</sup>
<i>P. capsici</i> + SAE 4 ppm	28.48 <sup>ab</sup>	6.7 <sup>a</sup>	1.3 <sup>ab</sup>
<i>P. capsici</i> + SAE 8 ppm	37.52 <sup>a</sup>	6.3 <sup>ab</sup>	0.76 <sup>ab</sup>
<i>P. capsici</i> + SAE 12 ppm	35.33 <sup>a</sup>	6.3 <sup>ab</sup>	0.59 <sup>b</sup>
<i>P. capsici</i> + SAE 16 ppm	30.94 <sup>ab</sup>	7.01 <sup>a</sup>	1.18 <sup>ab</sup>

Cuadro 3. Escala de sanidad cada 72 h de plantas de *C. annuum* presentando pudrición de raíz. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando Tucky  $p < 0.05$

Tratamiento quincenal	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Severidad de la enfermedad
<i>P. capsici</i>	21.03 <sup>a</sup>	4.83 <sup>b</sup>	2.7 <sup>a</sup>
Aliette®	26.47 <sup>a</sup>	5.33 <sup>b</sup>	0.8 <sup>ab</sup>
<i>P. capsici</i> + SAE 20 ppm	29.30 <sup>a</sup>	5.98 <sup>ab</sup>	0.5 <sup>b</sup>
<i>P. capsici</i> + SAE 40 ppm	24.91 <sup>a</sup>	4.97 <sup>b</sup>	1.4 <sup>ab</sup>
<i>P. capsici</i> + SAE 60 ppm	27.35 <sup>a</sup>	6.46 <sup>a</sup>	1.2 <sup>ab</sup>
<i>P. capsici</i> + SAE 80 ppm	28.56 <sup>a</sup>	5.44 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>

Cuadro 4. Escala de sanidad quincenal de plantas de *C. annuum* presentando pudrición de raíz. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando Tucky  $p < 0.05$ .

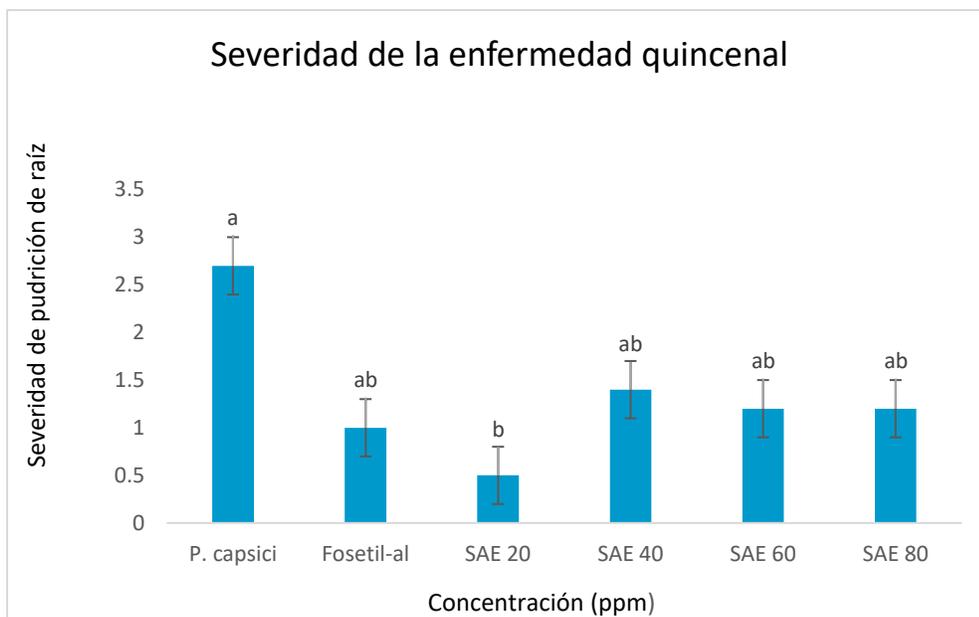


Figura 12. Escala de severidad de la enfermedad de pudrición de raíz en tratamientos aplicados quincenalmente. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$ .

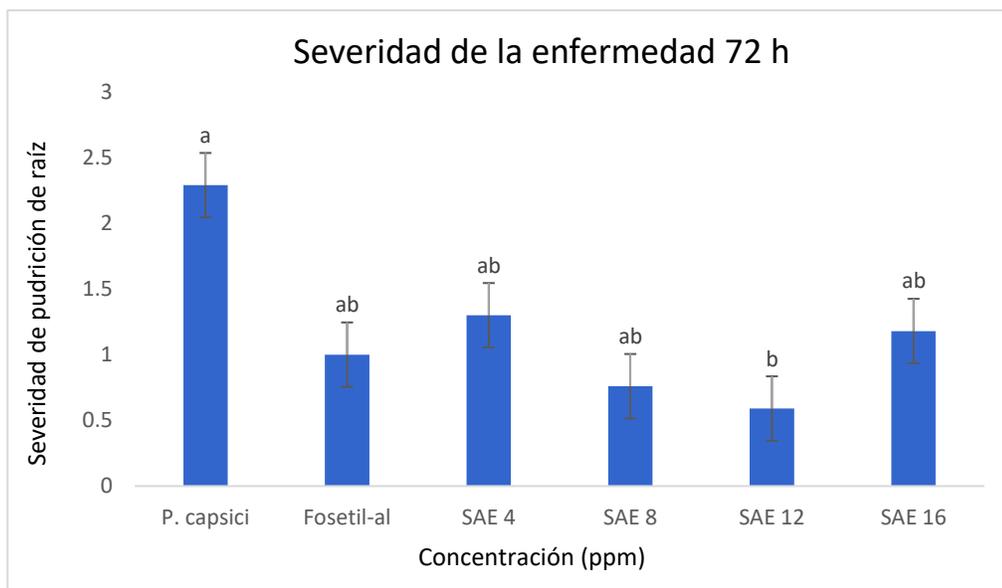


Figura 13. Escala de severidad de la enfermedad de pudrición de raíz en tratamientos aplicados quincenalmente. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$ .

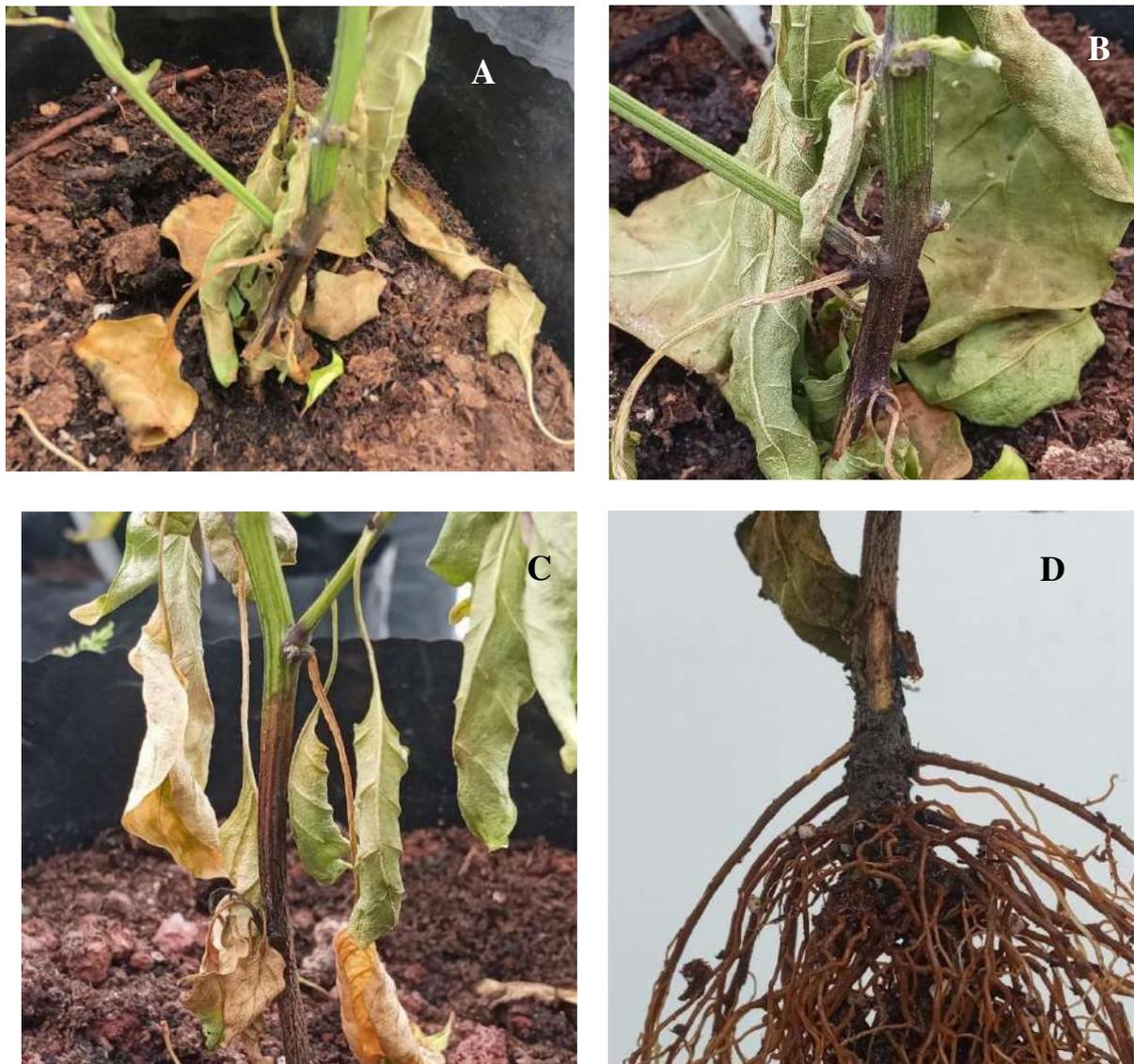


Figura 14. A) Plantas de *Capsicum annuum* mostrando cambio en la coloración de las hojas y defoliación. B) Oscurecimiento del tallo progresivamente hacia arriba sobre la línea del suelo indica el crecimiento de *Phytophthora capsici*. C) Colonización completa del tallo y del sistema vascular. D) Pudrición severa del sistema radicular con lesiones de coloración marrón.

### 4.3 Determinación del mecanismo de acción de las SAE mediante análisis enzimáticos para evaluar la actividad elicitora de los tratamientos aplicados en las plantas de Chile.

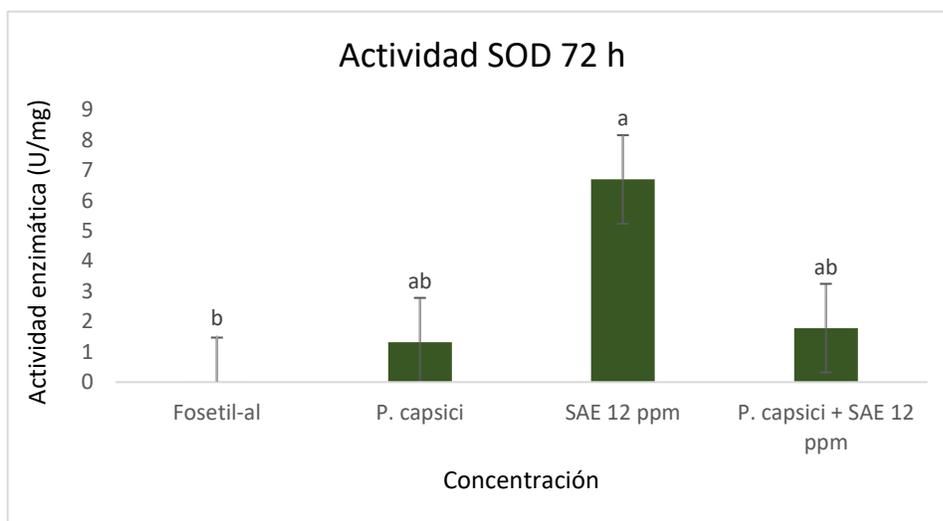


Figura 15. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 horas. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$

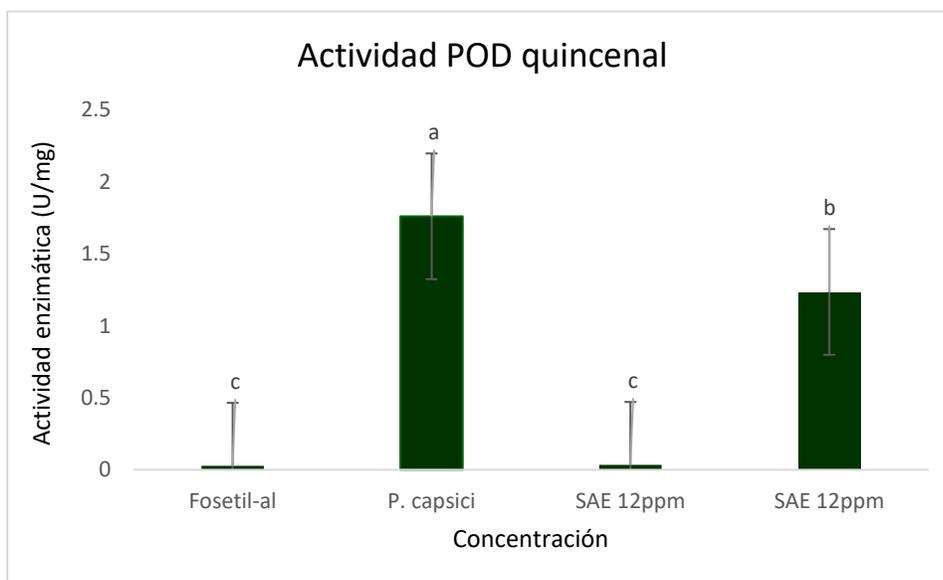


Figura 16. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$

Plantas tratadas con una concentración de 12 ppm aplicada frecuentemente cada tercer día mostraron un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa; en comparación con las aplicaciones quincenales se demostró que existe diferencia significativa, es decir, las plantas enfermas con el fitopatógeno mostraron niveles más bajos de estrés con respecto a aquellas que no fueron tratadas, aumentando la actividad enzimática de SOD, el producto comercial no mostró un aumento en la actividad de esta enzima. Los valores más altos fueron los aplicados cada tercer día, mientras que las aplicaciones quincenales tuvieron los niveles más bajo en la actividad enzimática de SOD.

Los tratamientos quincenales, aunque fueron valores menores a los tratamientos aplicados cada setenta y dos horas mostraron una disminución del estrés comparados con el control positivo, es decir, las plantas con síntomas de pudrición de la raíz sin ningún tratamiento mostraron los valores más altos de estrés, esto indica que hay una elevada cantidad del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en los tejidos de la planta, a esto se le atribuye la elevada actividad enzimática de SOD.

SOD es considerada una de las principales en sistemas enzimáticos responsable de remover los radicales libres  $O_2^-$  producidos por las plantas bajo condiciones de estrés. La enzima súper óxido dismutasa participa reduciendo el estrés biótico ocasionado por *Phytophthora capsici*, disminuyendo los niveles del anión superóxido en los tejidos de la planta (Gechev *et al.* 2016). Los resultados muestran que debido a un aumento en la concentración del anión superóxido provocado por la aplicación de los elicitores para contrarrestar el daño oxidativo.

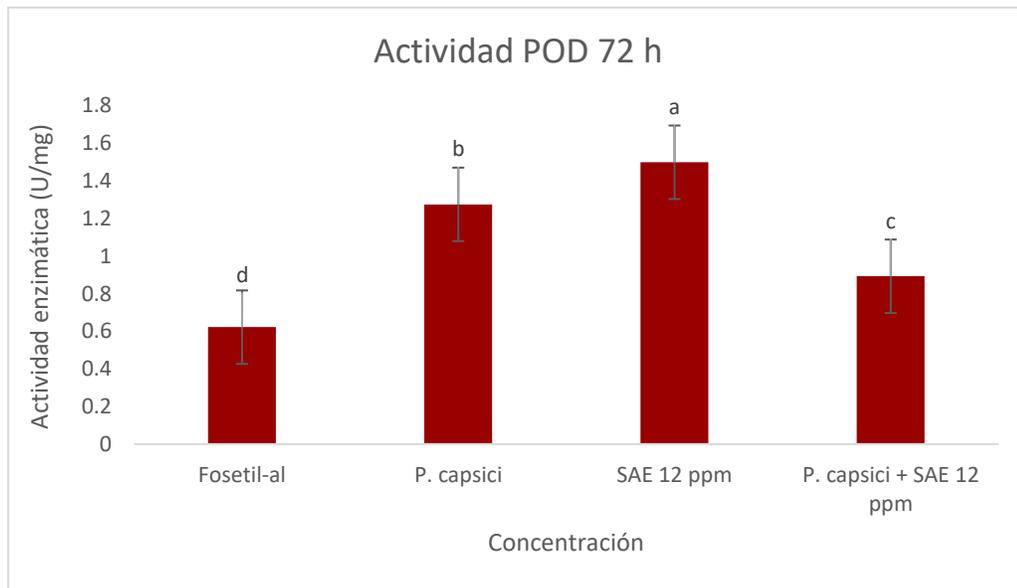


Figura 17. Actividad de la peroxidasa en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 horas. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$

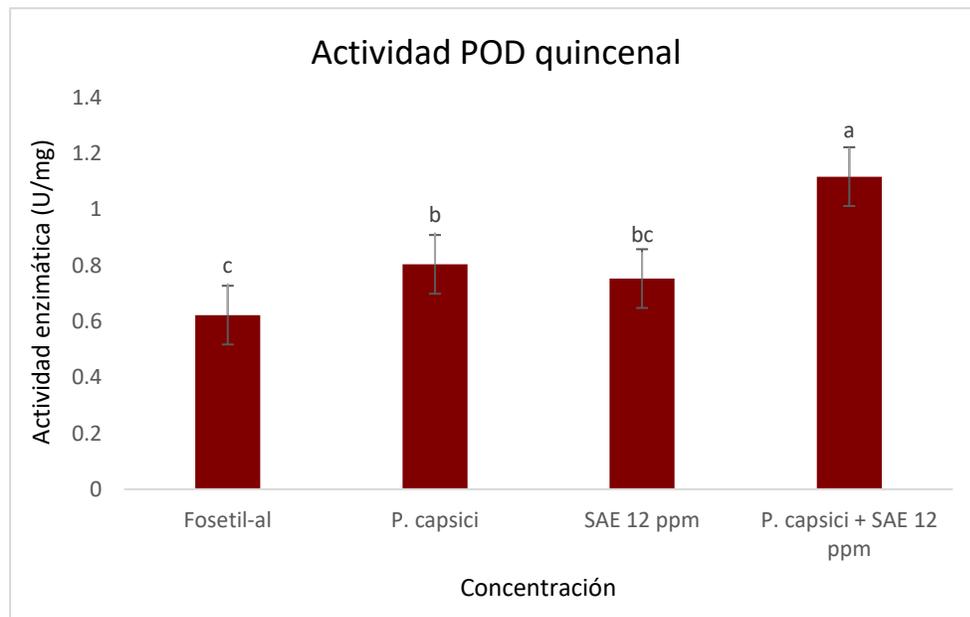


Figura 18. Actividad de la peroxidasa en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$

Los resultados de la actividad de la peroxidasa muestran que hubo un aumento en la actividad de esta enzima comparada con los controles positivos en los tratamientos aplicados cada tercer día, este aumento se atribuye a la señalización molecular posterior a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, sin embargo al aplicarse cada 72 horas en plantas enfermas con síntomas de pudrición de raíz se observó una disminución significativa del estrés, dicha disminución se debió a la acción directa de las soluciones activadas electroquímicamente sobre *P. capsici* y a la activación de la respuesta defensiva de la planta permitiéndole resistir a la colonización y al avance del oomiceto.

Por otra parte, los resultados de las aplicaciones quincenales mostraron los valores más altos de POD en plantas presentando pudrición de raíz tratadas con SAE a diferencia del control negativo, el cual mostró los niveles más bajos de la actividad de esta enzima, es decir los niveles más bajos de estrés, mientras que en el control positivo se observan niveles más altos de la actividad de esta enzima. Estos resultados comprueban el efecto elicitor que tienen las soluciones activadas electroquímicamente, los tratamientos provocaron un aumento de la actividad de la peroxidasa, debido a que ésta participa en la eliminación del  $H_2O_2$ , especie reactiva de oxígeno relacionada con la señalización molecular y un aumento de ésta se relaciona como una variable de respuesta ante el estrés.

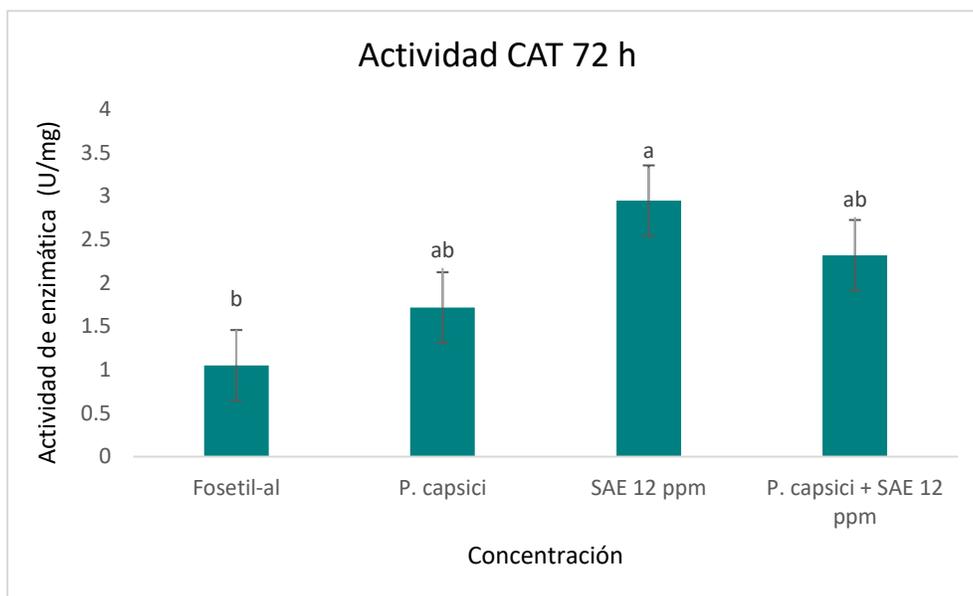


Figura 19. Actividad de la catalasa en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 horas. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$

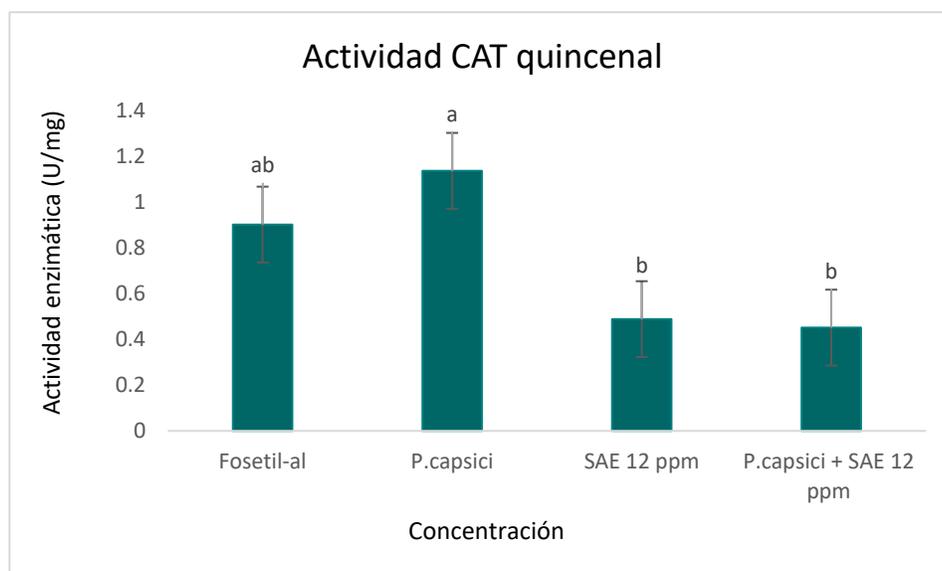


Figura 20. Actividad de la catalasa en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.5$ .

La actividad de la catalasa se vio aumentada debido a las soluciones activadas electroquímicamente, los valores más altos de esta enzima fueron las plantas que presentaban síntomas de pudrición de raíz, mientras que los valores disminuyeron significativamente en plantas donde se aplicaron bajas concentración de SAE con una frecuencia de quince días, es decir que su actividad se vio disminuida comparada con el control negativo, por lo que demuestra su eficacia en el manejo de la pudrición de raíz. al aumentar la actividad enzimática. Por otra parte, los controles positivos muestran valores similares comparados con los tratamientos con una dosis de 12 ppm con una frecuencia de 72 h.

La actividad de la enzima catalasa aumentó en el control positivo en aplicaciones quincenales, mientras que las plantas tratadas con las soluciones activadas electroquímicamente disminuyeron su actividad enzimática, lo cual indica que el estrés es menor con tratamientos aplicados quincenalmente. El aumento en los niveles de la peroxidasa se asocia con una respuesta relacionada con el estrés de la planta debido al aumento que hubo en los niveles de peróxido de hidrógeno, esta molécula a altas concentraciones debe ser removida de los tejidos de la planta a través de la actividad de CAT, por lo que en la gráfica se aprecia un decremento en la actividad de CAT comparada con un incremento en su actividad en plantas enfermas.

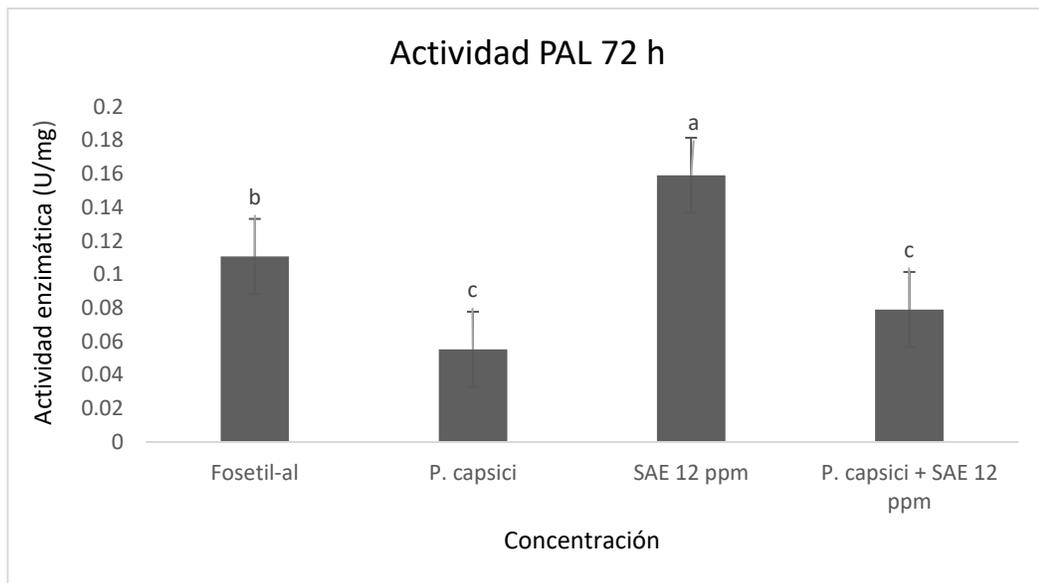


Figura 21. Actividad de la fenilalanina-amonio liasa en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 horas. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$

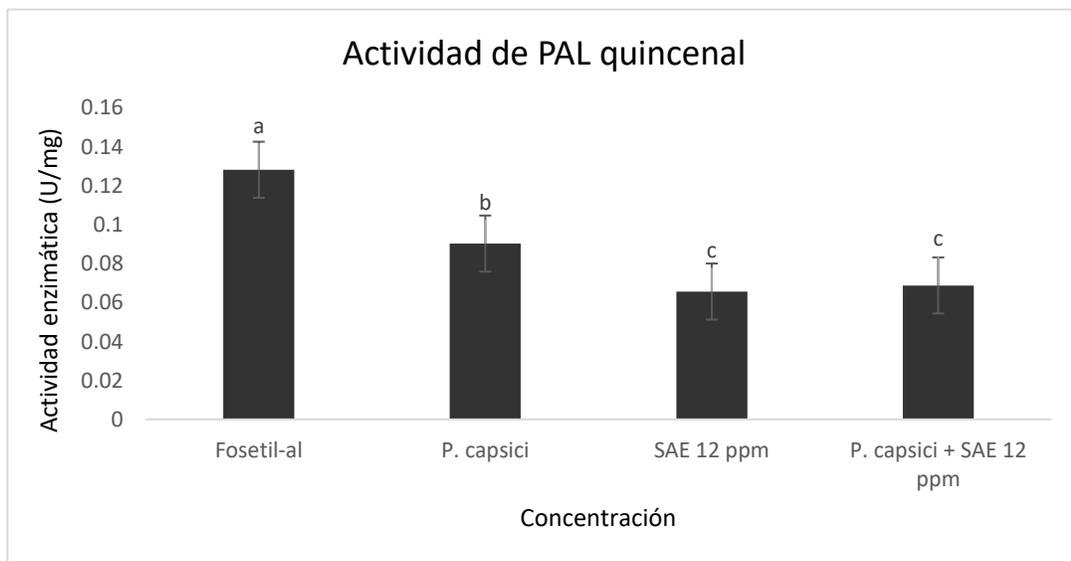


Figura 22. Actividad de la fenilalanina-amonio liasa en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.1$

En cuanto a la evaluación de la enzima PAL hubo un incremento de la actividad de esta enzima a una concentración de 12 ppm, por otra parte, se incrementó la actividad a diferencia de las plantas del control positivo, es decir, en plantas con *Phytophthora capsici*. Las plantas enfermas presentaron baja actividad de esta enzima, fue menor comparada con la asperjadas con SAE, por lo que su respuesta ante el estrés estaba más elevada, mientras que las plantas enfermas con *Phytophthora capsici* y tratadas con SAE mostraron una actividad enzimática similar, esto pudo deberse a una mitigación del estrés. Por otra parte, la actividad enzimática de PAL mostró diferencia estadística significativa, es decir, en plantas enfermas sin tratamiento la actividad de esta enzima fue mayor que en plantas enfermas y tratadas con las SAE aplicadas en tejido foliar evaluado cada quince días, esta diferencia significativa se obtuvo usando la prueba de Tucky con un índice de confianza del 90 %.

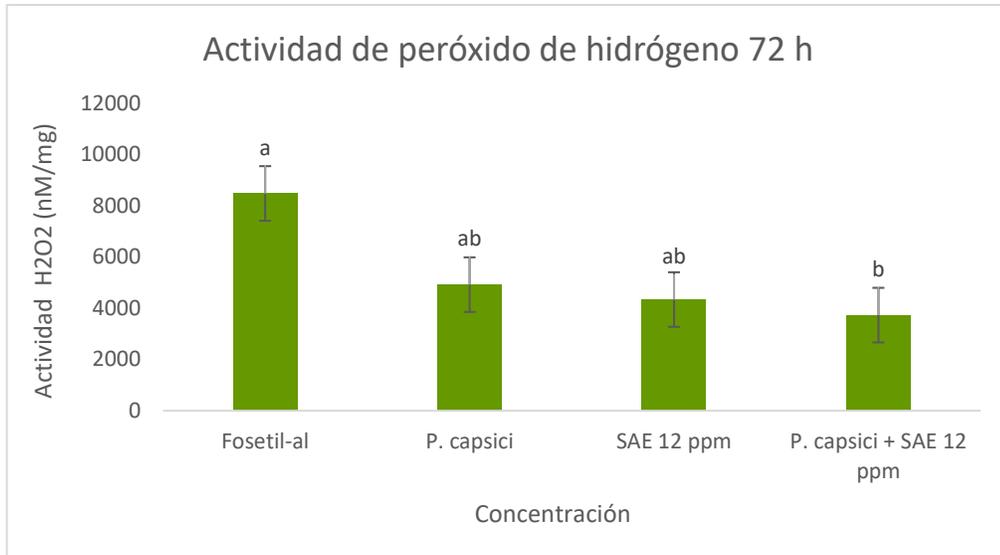


Figura 23. Actividad del peróxido de hidrógeno en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado cada 72 h. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$

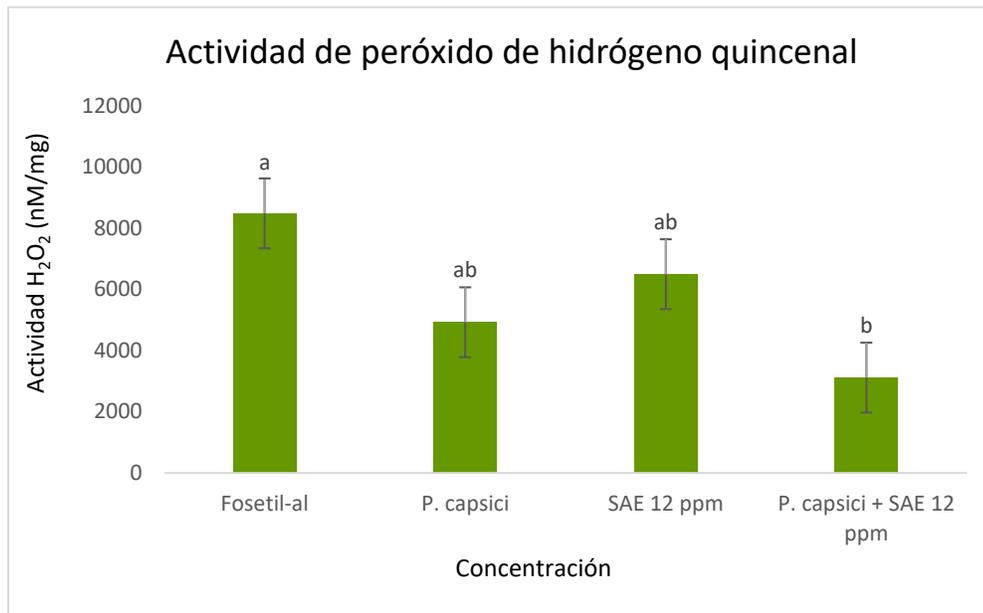


Figura 24. Actividad del peróxido de hidrógeno en *C. annuum* después del tratamiento con SAE aplicado quincenalmente. Letras diferentes indican diferencia significativa usando Tucky  $p < 0.05$

Las plantas de *Capsicum annuum* tratadas con el producto comercial como control negativo mostraron la mayor acumulación de peróxido de hidrógeno, es decir, mostraron los niveles más altos de estrés oxidativo, pues el peróxido de hidrógeno es una molécula que se acumula en los tejidos de la planta y a altos niveles puede causar daño severo y fitotoxicidad, mientras que las plantas con pudrición de raíz y tratadas con las soluciones activadas electroquímicamente a diferencia de ambos controles, positivo y negativo, mostraron los niveles más bajos de estrés oxidativo, tanto en los tratamientos quincenales como a las 72 horas, esto demuestra que las plantas que presentaban la enfermedad de pudrición de raíz tratadas con las soluciones activadas electroquímicamente redujeron el estrés oxidativo y resistieron considerablemente la infección de *Phytophthora capsici*.

Las principales especies que proveen la característica antifúngica de las SAE son el ácido hipocloroso (HOCl) y los iones hipoclorito (-OCl), se ha reportado que concentraciones de ambas especies están relacionadas con el pH y el potencial redox, la cual se correlaciona con su habilidad de ser oxidada o reducida, generando su efecto antifúngico. La pérdida de la integridad de la pared celular incrementa la permeabilidad y genera lisis, así como daño al ADN de *P. capsici*, lo anterior debido a que el HOCl puede penetrar la pared celular del oomiceto (Albrich *et al.*, 1986) y oxidar proteínas involucradas en vías metabólicas importantes (Hurst *et al.* 1991). Las SAE se mantienen más estables y mantienen sus características después de su almacenamiento a un pH neutro, esto es crucial debido a que su efecto antimicrobiano a través del cloro libre decrece cuando se aumenta el pH.

En plantas susceptibles, los síntomas iniciales aparecieron entre los cuatro y siete días después de la inoculación, y en los controles positivos murieron aproximadamente a los doce días después de la misma, mientras que, en plantas resistentes después de los diez días se observaron lesiones ligeras, principalmente debido a la habilidad para contrarrestar el avance de la colonización de *Phytophthora capsici* e inhibiendo su crecimiento, inhabilitándolo para que se desarrolle dentro de la planta hospedera.

Las plantas responden al estrés produciendo diferentes moléculas, dentro de las cuales se encuentran las especies reactivas de oxígeno, éstas son moléculas de señalización clave y tienen un papel fundamental en la regulación de diferentes procesos como el metabolismo y la respuesta ante condiciones estresantes, participando activamente en la fisiología de la planta. Estas especies en el sitio donde se colonizó a la planta es directamente dañino para los patógenos y pueden causar una respuesta hipersensible que resulta en muerte celular localizada, limitando la propagación de la infección (Mahapatra, 2020).

El ácido hipocloroso es una especie reactiva de oxígeno y se encuentra dentro de la categoría de los no radicales (Gechev *et al.*, 2006), estas especies químicas han sido identificadas como segundos mensajeros en cascadas de señalización intracelular, esta molécula está correlacionada con el desarrollo de tolerancia al estrés tanto biótico como abiótico (Devireddy *et al.* 2021). La respuesta hipersensible inducida mediante moléculas radicales de oxígeno resulta en la fortificación de la pared celular mediante la estimulación de la síntesis de lignina a través de la vía de fenilpropanoide, actividad que también incrementó con la aplicación de los tratamientos (Devireddy *et al.* 2021).

El reconocimiento de un patógeno por parte de la planta conduce a un estallido oxidativo, el cual resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno y su acumulación en grandes cantidades, cada forma de las ROS influye en varios procesos fisiológicos y bioquímicos en plantas que son controlados por varios genes y tienen una capacidad oxidativa distintiva (Huang *et al.*, 2019). Las especies reactivas de oxígeno desempeñan un papel dual, actuando como moléculas de señalización a una concentración óptima y moléculas tóxicas a altas concentraciones, el sistema antioxidante de la planta la protege de las perjudiciales ROS.

Siguiendo la infección de los patógenos, numerosas enzimas, como las quinonas reductasa-b, amino oxidasas, oxalatos oxidasas, peroxidasas, superóxido dismutasa, y lipoxigenasas, son activadas para controlar la producción y la transición de ROS (Akbar *et al.* 2020). El incremento de la producción de ROS ha sido asociado con un gran número de

procesos fisiológicos, incluyendo la resistencia a varios estresores (del Río 2015; Akbar *et al.* 2020; Abdul Malik *et al.* 2020).

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos son capaces de mantener el equilibrio redox en los tejidos de las plantas a través de contrarrestar el efecto dañino de la ROS y desintoxicar a la planta, debido a esto, la medición de la actividad enzimática de la catalasa y la peroxidasa fue crucial para la adecuada regulación de la concentración de las ROS dentro de las células, ya que estas enzimas controlan la cantidad intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula, mientras que las catalasas son muy eficientes eliminando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y separándola en dos moléculas de H<sub>2</sub>O y oxígeno.

Los eventos de señalización ocurren dentro de los primeros minutos a unas pocas horas después de la percepción de la elicitación mediada (Boubakri, 2017). Una respuesta fuerte que se mantiene en las primeras semanas, pero decrece gradualmente en intensidad mientras que permanecen detectables después de un mes. Naaven y colaboradores (2013) demostraron que en un intervalo de 12 horas la actividad enzimática de PAL disminuyó gradualmente en plantas de Chile elicitadas con cerebrósidos, pero se mantiene estable en la actividad de la peroxidasa en el mismo intervalo de tiempo. Debido a la cinética de la actividad enzimática se explica la disminución de la actividad enzimática en los tratamientos quincenales, ya que en el transcurso de los días pudo haber disminuido entre un análisis enzimático y el otro, por lo que se sugiere que se lleven a cabo análisis enzimáticos en intervalos más cortos de tiempo para obtener resultados más precisos.

Las reacciones de la planta más rápidas para infectar es la alteración en el estatus de los tejidos redox como resultado de los organismos de los patógenos infección y la rápida producción de ROS. El efecto de las soluciones activadas electroquímicamente podría depender de la densidad del inóculo de *Phytophthora capsici*, el estado fisiológico, el estadio fenológico de la planta, la frecuencia de aplicación y el intervalo de medición de la actividad enzimática.

Las enzimas analizadas son inducibles y están involucradas en el sistema defensivo de la planta contra fitopatógenos, es sabido que su expresión desempeña un papel importante determinando la resistencia de la planta hospedera contra varios fitopatógenos, en este trabajo su expresión permitió contrarrestar el daño causado por *P. capsici*, sin embargo, según los resultados obtenidos se sugiere hacer los análisis de la actividad enzimática con mayor frecuencia, estableciendo un intervalo de horas para ambos tratamientos, cada tercer día y quincenales para obtener resultados más precisos.

## V. CONCLUSIÓN

La aplicación vía foliar de soluciones activadas electroquímicamente demostró tener un efecto bioestimulante, antifúngico y elicitor, permitiendo a las plantas de *C. annum* adquirir resistencia sistémica ante la enfermedad de pudrición de raíz y mitigar el daño causado por *Phytophthora capsici*, además de inducir la respuesta defensiva de la planta sin llegar a niveles de fitotoxicidad en la planta al mantener baja concentración de ROS en los tejidos, la inducción mediada de la respuesta inmune no interfirió en el crecimiento ni en el desarrollo de la planta, al contrario, se demostró una mejora significativa en el rendimiento de la planta a una baja concentración de 12 ppm aplicada cada 72 horas, pero demostrando un aumento de la actividad enzimática en los tratamientos aplicados quincenalmente, demostrando así que el uso de SAE junto con buenas prácticas culturales pueden mitigar el efecto perjudicial de *Phytophthora capsici* en plantas de *Capsicum annum*.

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5edition. Elsevier the Academic Press.London. 838 p.
- Albrich, J. M., Gilbaugh, J. H., Callahan, K. B., & Hurst, J. K. (1986). Effects of the putative neutrophil-generated toxin, hypochlorous acid, on membrane permeability and transport systems of *Escherichia coli*. *The Journal of clinical investigation*, 78(1), 177-184.
- Arévalo, P. W. 2013. Efectos de la aplicación de agua activada electroquímicamente en un cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo invernadero.
- Belitskaya MN, Gribust IR. 2019. *Scientific and agronomic journal* 2(105) 40–45
- Belitskaya, M. N., Gribust, I. R., Drevin, V. E., Minchenko, L. A., & Bakradze, N. Y. 2021, February). The use of electroactivated solutions for plants phytosanitary optimization in a forest-agricultural landscape. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 659, No. 1, p. 012039). IOP Publishing.
- Buck, J. W., Van Iersel, M. W., Oetting, R. D., y Hung, Y. C. 2002. In vitro fungicidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water. *Plant Disease*, 86(3), 278-281.
- Carmona M, and Sautua F. 2017. La problemática de la resistencia de hongos afungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía y ambiente* 37(1).
- Casal-Beiroa, P. 2015. Síntesis de nanopartículas con propiedades adsorbentes mediante métodos de química sostenible.
- Chandra, P.; Sharma, R. K. and Arora, D. S. 2020. Antioxidant compounds from microbial sources: a review. *Food Res. Int.* 129 p.
- Chávez-Díaz, Ismael Fernando, and Emma Zavaleta-Mejía. "Molecular communication in the pathosystem *Capsicum* species-*Phytophthora capsici*." *Revista mexicana de fitopatología* 37.2 2019: 251-278.
- Chávez JJ, Zabaleta ME.; Teliz OD. 1995. Control integrado de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L) ocasionado por el hongo *Phytophthora capsici* en la región de

Valseguillo, Puebla, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:47-55.

Duhan, J. S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., y Duhan, S. 2017. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, 15, 11-23.

Da Cunha, A., 1987. The estimation of l-phenylalanine ammonia-lyase shows phenylpropanoid biosynthesis to be regulated by l-phenylalanine supply and availability. *Phytochemistry* 26, 2723–2727.

Devireddy, A. R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Mittler, R. 2021. Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress. *The Plant Journal*, 105(2), 459-476.

Fu, P. P., Xia, Q., Sun, X., y Yu, H. 2014. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 30(1), 1-41.

Fiske, S., Doumane, M., y Schornack, S. 2015. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 263-280.

Fernández-Pavía SP, Díaz-Celaya M and Rodríguez-Alvarado G. 2013. *Phytophthora* in México. *Phytophthora: a global perspective*.

Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., & Laloi, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28(11), 1091-1101.

González, M.M., I. Torres y H. Guzmán 2002. Patógenos involucrados con la marchitez del chile. International Pepper Conference. Tampico, Tamps., México (16).

Glosier BR, Ogundiwin EA, Sidhu GS, Sicho DR, and Prince JP. 2008. A Differential serie of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of

*Phytophthora capsici* (physiological races of *P. capsici* in pepper). *Euphytica* 162: 23-30.

Hausbeck, K. M. and Lamour, H. K. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Dis.* 88:1292- 1303.

Hong, J., Rico, C. M., Zhao, L., Adeleye, A. S., Keller, A. A., Peralta-Videa, J. R., y Gardea-Torresdey, J. L. 2015. Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(1), 177-185.

Huang, H.; Ullah, F.; Zhou, D.-X.; Yi, M.; Zhao, Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front. Plant Sci.* **2019**, 10, 800.

Hurst, J. K., Barrette Jr, W. C., Michel, B. R., & Rosen, H. 1991. Hypochlorous acid and myeloperoxidase-catalyzed oxidation of iron-sulfur clusters in bacterial respiratory dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, 202(3), 1275-1282.

Imada, K., Sakai, S., Kajihara, H., Tanaka, S., y Ito, S. 2016. Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Plant Pathology*, 65(4), 551-560.

Issa-Zacharia, A., Kamitani, Y., Tiisekwa, A., Morita, K., & Iwasaki, K. 2010. In vitro inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. using slightly acidic electrolyzed water. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(3), 308-313.

Jiang, H., Zhang, L., Zhang, J. Z., Ojaghian, M. R., y Hyde, K. D. 2016. Antagonistic interaction between *Trichoderma asperellum* and *Phytophthora capsici* in vitro. *Journal of Zhejiang university-science b*, 17(4), 271-281.

Julio, C. V., de la Cruz-Lazaro, E., Osorio-Osorio, R., y Preciado-Rangel, P. 2018. Morphological variation of wild peppers (*Capsicum* spp.) from the state of Tabasco, Mexico. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 115-121.

Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., y Lopez-Lauri, F. (2014). Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *American Journal of*

*Analytical Chemistry*, 5(11), 730.

Kanhed, P., Birla, S., Gaikwad, S., Gade, A., Seabra, A. B., Rubilar, O., y Rai, M. 2014. In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. *Materials Letters*, 115, 13-17.

Khan, I., Saeed, K., y Khan, I. 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.

Koka, J. A., Wani, A. H., & Bhat, M. Y. 2019. Evaluation of antifungal activity of Magnesium oxide (MgO) and Iron oxide (FeO) nanoparticles on rot causing fungi. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(2-s), 173-178.

Lagunas, J., Zavaleta, E., Osada, S., Aranda, S., Luna, I., & Vaquera, H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1), 57-65.

Lamour K (Ed.). 2013. *Phytophthora: a global perspective* (vol. 2). cabi.

Leyva Morales, J. B., Garcia De la Parra, L. M., Bastidas Bastidas, P. D. J., Astorga Rodriguez, J. E., Bejarano Trujillo, J., Cruz Hernandez, A., y Betancourt Lozano, M. (2014). Pesticide use in a technified agricultural valley in Northwest Mexico. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30(3), 247-261.

Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., y Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 2926-2930.

M. Reynaldo-Escobar, F. H. Ruíz-Espinoza y J. L. García-Hernández. 2015. Emergencia y crecimiento de plántulas de variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sometidas a estrés hídrico. *Ecosist. Recur. Agropec.* 2: 151-160.

Makhluf, S., Dror, R., Nitzan, Y., Abramovich, Y., Jelinek, R., and Gedanken, A. (2005). Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bacteriocide. *Adv.*

*Funct. Mater.* 15, 1708–1715.

Martin FN, Abad ZG, Balci Y and Ivors K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant dis.*, 96(8):1080-1103.

Mmbaga, M. T., Gurung, S., & Maheshwari, A. 2018. Screening of plant endophytes as biological control agents against root rot pathogens of pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Plant Pathol. Microbiol*, 9(3), 1000435.

Mont, R.M. 1993. Principios del control de enfermedades de las plantas. Lima, Perú: Edit. Talleres del Centro Preuniversitario, Universidad Nacional Agraria La Molina.

Morales-Valenzuela, G., Redondo-Juárez, E., Covarrubias-Prieto, J., y Cárdenas Soriano, E. 2002. Detección y localización de *Phytophthora capsici* Leo. en semilla de chile. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20(1), 94-97.

Moreira-Morrillo, A. A., Monteros-Altamirano, Á., Reis, A., y Garcés-Fiallos, F. R. 2022. *Phytophthora capsici* on *Capsicum* Plants: A Destructive Pathogen in Chili and Pepper Crops.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J. y Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372-386.

Naveen, J., Hariprasad, P., Nayaka, S. C., y Niranjana, S. R. 2013. Cerebroside mediated elicitation of defense response in chilli (*Capsicum annum* L.) against *Colletotrichum capsici* infection. *Journal of plant interactions*, 8(1), 65-73.

Oelke, L. M., Bosland, P. W., & Steiner, R. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), 213-218.

Parizi, M. A., Moradpour, Y., Roostaei, A., Khani, M., Negahdari, M., y Rahimi, G. 2014. Evaluation of the antifungal effect of magnesium oxide nanoparticles on *Fusarium oxysporum* F. Sp. *lycopersici*, pathogenic agent of tomato. *Eur. J. Exp. Biol*, 4, 151-156.

Park, E. J., Alexander, E., Taylor, G. A., Costa, R., y Kang, D. H. (2008). Fate of foodborne pathogens on green onions and tomatoes by electrolysed water. *Letters in applied microbiology*, 46(5), 519-525.

Pérez ML, Medina LO, Salinas GJG. 1990. Control genético y químico de la marchitez del chile *Capsicum annum* L. causada por *Phytophthora capsici* Leo. En la región de Irapuato, Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:71-76

Petrushanko IY, Lobyshev VI. 2001. Nonequilibrium state of electrochemically activated water and its biological activity. *Biofizika*46(3):389–401.

Prasad, R.; Bhattacharyya, A.; Nguyen, Q.D. 2017. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 101.

Prasad, R.; Shivay, Y. S. and Kumar, D. 2014. Chapter two agronomic biofortification of cereal grains with iron and zinc. In: Donald LS. (Ed) *advances in agronomy*. Academic Press. 55- 91 pp.

Rahman, S.; Khan, I.; Oh, D.H. Electrolyzed Water as a Novel Sanitizer in the Food Industry: Current Trends and Future Perspectives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, 15, 471–490

Raliya, R., Saharan, V., Dimkpa, C., y Biswas, P. (2017). Nanofertilizer for precision and sustainable agriculture: current state and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6487-6503.

Rawat, S., Pullagurala, V. L., Hernandez-Molina, M., Sun, Y., Niu, G., Hernandez Viezcas, J. A., ... y Gardea-Torresdey, J. L. (2018). Impacts of copper oxide nanoparticles on

bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants: a full life cycle study. *Environmental Science: Nano*, 5(1), 83-95.

Rico, G. L., Guerrero, A. B., López, V. A., Muñoz, C. I., Guevara, L., Guevara, R. G., ... & González, M. M. 2001. Búsqueda de resistencia natural en plantas de Chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. In *XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología*.

Ristaino JB and Johnston SA. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Dis.* 83: 1080–1089.

Rivera-Pastrana, D.M., Gardea, A.A., Yahia, E.M., Martínez-Téllez, M.A., González-Aguilar, G.A., 2013. Effect of UV-C irradiation and low temperature storage on bioactive compounds, antioxidant enzymes and radical scavenging activity of papaya fruit. *J. Food Sci. Technol.* 51, 3821–3829.

Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttgupta, S. P., y Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomaterialia*, 4(3), 707-716.

Sellamuthu, P.S., Mafune, M., Sivakumar, D., Soundy, P., 2013a. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. *J. Sci. Food Agric.* 93, 3024–3031.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) 2018. CHILES Y PIMIENTOS mexicanos. Ciudad de México. Consultado el 10 de octubre del 2021 en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/Potencial-Chiles\\_y\\_Pimientos-parte\\_uno.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/Potencial-Chiles_y_Pimientos-parte_uno.pdf).

Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., and Klabunde, K. J. 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* 18, 6679–6686.

Thorn, R. M. S., Lee, S. W. H., Robinson, G. M., Greenman, J., y Reynolds, D. M. 2012.

Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(5), 641-653.

Thorn, R., Pendred, J., y Reynolds, D. M. 2017. Assessing the antimicrobial potential of aerosolised electrochemically activated solutions (ECAS) for reducing the microbial burden on fresh food produce held under cooled or cold storage conditions. *Food microbiology*, 68, 41-50.

Trudova E.A et al. 2016 *Bulletin of the technological University* 19 (10) 149–151

Vahabi, K., Mansoori, G. A., & Karimi, S. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (a route for large-scale production of AgNPs). *Insciences J.*, 1(1), 65-79.

Valiela, F. 1978. Introducción a la Fitopatología. Buenos Aires, Argentina: Colección científica del INTA.

Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M., y Luna-Ruiz, J. D. J. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 175-181.

Vinogradov, V., Cuevas, A., y Vinogradov, D. 2011. Activación electroquímica de soluciones acuosas (ECAS). *Ingeniería química*, 498, 68-76.

Wani, A. H., & Shah, M. A. 2012. A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(3), 4.

Zhao J, Lawrence CD, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 2005; 23:283- 333.

Zaidi, S., Misba, L., y Khan, A. U. 2017. Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(7), 2281-

Zarattini, M., De Bastiani, M., Bernacchia, G., Ferro, S., y De Battisti, A. 2015. The use of ECAS in plant protection: a green and efficient antimicrobial approach that primes selected defense genes. *Ecotoxicology*, 24(9), 1996- 2008.

Zavaleta-Mejía, E. 1994. Control biológico de fitopatógenos. pp 115-125. In: R. Alatorre R. y A.W. Guzmán F. (eds.). Memorias V Curso de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México.

Zeng X, Tang W, Ye G, Ouyang T, Tian L, Ni Y, Li P. 2010. Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci* 75(5):M253–M2.