



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería

APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE ZINC (ZnO) PARA EL  
MANEJO DE ENFERMEDADES VIRALES DE CHILE

**Tesis**

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

**Presenta**

M. en C. Samantha de Jesús Rivero Montejo

**Dirigido por**

Dr. Irineo Torres Pacheco

Querétaro, Qro.  
Noviembre, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Aplicación de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO)  
para el manejo de enfermedades virales en Chile

**por**

Samantha de Jesús Rivero Montejó

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](#).

**Clave RI:** IGDCC-254150



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Doctorado en Ingeniería en Biosistemas

APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC (ZnO) PARA EL MANEJO DE  
ENFERMEDADES VIRALES DE CHILE

**TESIS**

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

**Presenta:**

M. en C. Samantha de Jesús Rivero Montejo

**Dirigido por:**

Dr. Irineo Torres Pacheco

SINODALES

Dr. Irineo Torres Pacheco

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Marcela Vargas Hernández

Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Enrique Rico García

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Rosalía Virginia Ocampos Velázquez

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Toledo Ayala

Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.

Noviembre 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por otorgar la beca de posgrado para la realización del este doctorado para la obtención del grado de Doctora en Ingeniería de Biosistemas, así como el apoyo para la realización de este proyecto mediante el financiamiento A1-S-33677 de Ciencia Básica.

A mi director de tesis, el Dr. Irineo Torres Pacheco, por brindarme la confianza en la realización de este proyecto, así como compartirme su experiencia y conocimientos.

Al sínodo de este proyecto, por el apoyo brindado en sus observaciones, cuestionamientos y conocimientos.

A mis compañeros, amigos y colegas del doctorado, por su apoyo durante todo el desarrollo de este proyecto, pero en especial a Ana Laura, Diana, Alejandra y Nayeli por sus consejo, paciencia, experiencia y conocimientos. Gracias

A mi esposo, Oscar de los Ángeles Rocha y a Poppy, por siempre estar.

A mi familia por las porras incondicionales.

## DEDICATORIA

*Para mí esposo Oscar, gracias por siempre apoyarme*

*A mis padres*

*A Dios por nunca dejarme rendir*

# Tabla de contenido.

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	0
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	4
2.1 Respuesta del Chile ( <i>Capsicum annuum</i> L.) contra patógenos.....	4
2.2 Virus Huasteco de las Venas Amarillas en Chile (PHYVV). .....	5
2.4 Medidas de control de enfermedades en Chile .....	6
2.5 Nanopartículas (NP) .....	7
2.6 Actividad antiviral de las nanopartículas .....	9
2.7 Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO).....	10
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	12
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	12
4.1 Objetivos Particulares .....	12
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
5.1 Evaluación del efecto de la aplicación foliar de nanopartículas (NP) de ZnO en el comportamiento de variables asociadas a la enfermedad y su efecto en el rendimiento en Chile jalapeño.....	13
5.1.1 Ubicación del área de investigación .....	13
5.1.2 Síntesis y caracterización de nanopartículas .....	13
5.1.3 Material vegetal.....	14
5.1.4 Diseño experimental .....	14
5.1.5 Infección del material vegetal .....	16
5.1.6 Evaluación de la severidad de la enfermedad .....	16
5.1.7 Cuantificación viral .....	16
5.1.8 Evaluación del crecimiento y la producción del Chile jalapeño.....	18

5.2. Elucidación del mecanismo de acción de NP de ZnO en plantas de chile infectadas con PHYVV.....	19
5.2.1 Movilidad viral.....	19
5.2.2 Actividad enzimática .....	20
5.2.3 Acumulación de NPs en las hojas infectadas con PHYVV.....	22
5.2.4 Prueba de reactividad .....	22
5.3. Determinación de posibles efectos fitotóxicos y tóxicos al consumidor derivado de la aplicación de NP de ZnO en plantas de chile infectadas con PHYVV. ....	23
5.3.1 Determinación de efectos fitotóxicos.....	23
5.3.1.1 Prueba de germinación .....	23
5.3.1.2 Determinación de actividad enzimática .....	23
5.3.1.3 Prueba en planta .....	24
5.3.1.4 Determinación del efecto fisiológico.....	24
5.3.1.5 Determinación bioquímica al estrés .....	24
5.4 Análisis estadístico.....	25
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
6.1 Evaluación del efecto de la aplicación foliar de nanopartículas (NP) de ZnO y NPs de TiO <sub>2</sub> en el comportamiento de variables asociadas a la enfermedad y su efecto en el rendimiento en chile jalapeño.....	25
6.1.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas.....	25
6.1.2 Evaluación de la severidad de la enfermedad.....	28
6.1.6 Cuantificación viral .....	35
6.1.7 Efectos de la aplicación de ZnO NPs en la movilidad del PHYVV.....	40
6.1.8 Efectos de la aplicación de ZnO NPs en el crecimiento y rendimiento de las plantas.....	42
6.2. Elucidar el mecanismo de acción de NP de ZnO en plantas de chile infectadas con PHYVV.....	44
6.2.1 Actividad enzimática .....	45
6.2.2 Capacidad antioxidante.....	50
6.2.3 Actividad no enzimática.....	51
6.2.4 Acumulación de NPs en las hojas infectadas con PHYVV.....	53
6.2.5 Prueba de reactividad.....	56
6.3. Determinar posibles efectos fitotóxicos derivado de la aplicación de NP de ZnO en plantas de chile infectadas con PHYVV. ....	57

6.3.1 Determinación de efectos fitotóxicos.....	57
6.3.1.1 Prueba de germinación .....	58
6.3.1.2 Determinación de actividad enzimática .....	62
6.3.1.3 Prueba en planta .....	65
6.3.1.4 Determinación del efecto fisiológico .....	65
<b>7. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>83</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, municipio del Marques, Qro (Google Maps, 2023).....	13
Figura 2. Imagen SEM de las nanopartículas de ZnO: a) Forma de los aglomerados de NP de ZnO, b) Estructura y forma de las NP de ZnO individuales y, c) patrón XRD de las NP de ZnO preparadas .....	26
Figura 3. Imagen SEM de las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> : a) Forma de los aglomerados de NP de TiO <sub>2</sub> , b) Estructura y forma de las NP de TiO <sub>2</sub> individuales y, c) patrón XRD de las NP de TiO <sub>2</sub> preparadas.....	27
Figura 4. Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la severidad de la enfermedad de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito en general. Distintas letras son estadísticamente significativas ( $\alpha=0.0007$ ), Tukey (n=15 por tratamiento). .....	28
Figura 5. Efecto sobre la severidad de la enfermedad causada por el virus PHYVV en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho y cv Don Benito: tratamientos con ZnO NPs: a) Efecto en la severidad de la enfermedad en función del tiempo de aplicación según el cultivar, b) Efecto sobre los síntomas causados por el virus PHYVV en cv Don Pancho y cv. Don Benito como aplicación preventiva (* indique un $\alpha = 0.1$ suponiendo un error tipo B), c) Efecto sobre los síntomas provocados por el virus PHYVV en cv Don Pancho y cv. Don Benito como aplicación curativa. El número de plantas por tratamiento fue n = 15. Las barras de error representan la media $\pm$ errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas frente a los tratamientos utilizando la prueba de Tukey ( $\alpha \geq 0,05$ ) .....	30
Figura 6. Efectos de las aplicaciones de TiO <sub>2</sub> NPs sobre la severidad de la enfermedad de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito en general. Distintas letras son estadísticamente significativas ( $\alpha=0.0001$ ), Tukey (n=15 por tratamiento). .....	31
Figura 7. Efecto sobre la severidad de la enfermedad causada por el virus PHYVV en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho y cv Don Benito: tratamientos con TiO <sub>2</sub> NPs: a) Efecto en la severidad de la enfermedad en función del tiempo de aplicación según el cultivar, b) Efecto sobre los síntomas causados por el virus PHYVV en cv Don Pancho y cv. Don Benito como aplicación preventiva c) Efecto sobre los síntomas provocados por el virus PHYVV en cv Don Pancho y cv. Don Benito como aplicación curativa. El número de plantas por tratamiento fue n = 15. Las barras de error representan la media $\pm$ errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas frente a los tratamientos utilizando la prueba de Tukey ( $\alpha \geq 0,05$ ) .....	33
Figura 8. Efecto sobre los síntomas causados por virus PHYVV en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho y cv Don Benito: tratatados con NPs de ZnO:y NPs de TiO <sub>2</sub> a) Efecto sobre los síntomas causados por virus PHYVV.en plantas con aplicación de NPs y sus controles en cv. Don Pancho b) efecto de la aplicación de las NPs de ZnO a 100 mM POST (T3) en chile jalapeño cv Don Pancho y el control PHYVV (GV) y c) efecto de la	

aplicación de las NPs de ZnO a 100 mM POST (T3) en chile jalapeño cv Don Benito y el control PHYVV (GV). .....	34
Figura 9. Efecto de la aplicación de NPs de ZnO en los niveles virales en general para ambos cultivares ( $\alpha=0.0625$ ). .....	35
Figura 10. Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito con 55 días de edad. a) el tratamiento preventivo fue de NPs de ZnO 72 h antes de la infección y b) el tratamiento curativo fue de NPs de ZnO 72 h después de la infección Las letras diferentes son estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ), Tukey's (n=10 por tratamiento). c) Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento preventivo y d) Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento curativo Distintas letras son estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ), Tukey's (n=4 por tratamiento). .....	38
Figura 11. Efectos de las aplicaciones de TiO <sub>2</sub> NPs sobre la multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito con 55 días de edad. a) el tratamiento preventivo fue de NPs de TiO <sub>2</sub> 72 h antes de la infección y b) el tratamiento curativo fue de NPs de TiO <sub>2</sub> 72 h después de la infección Las letras diferentes son estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ), Tukey's (n=10 por tratamiento). c) Efectos de las aplicaciones de TiO <sub>2</sub> NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento preventivo y d) Efectos de las aplicaciones de TiO <sub>2</sub> NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento curativo Distintas letras son estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ), Tukey's (n=4 por tratamiento). .....	39
Figura 12. Efectos de las aplicaciones de NPs de ZnO sobre la movilidad de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento preventivo y tratamiento correctivo. a) la respuesta general de las aplicaciones de NPs de ZnO en el cv. Don Pancho en general, b) Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento preventivo y como tratamiento correctivo Letras diferentes son significativas estadísticamente ( $P<0.05$ ), Tukey (n=4 por tratamiento). .....	41
Figura 13. Efecto de los tratamientos con NPs de ZnO en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho: a) Experimentos en maceta después de 12 semanas: 1) NPs de ZnO, 2) WC-P, 3) PHYVV,(GV) 4) T3-curativo(100) Mm) y 5) preventivo de T4 (150 mM); b) efectos sobre tratamientos con ZnO NPs y testigos en plántulas de chile jalapeño cv Don Pancho; c) efectos sobre tratamientos con NPs de ZnO y testigos en plántulas de chile jalapeño cv Don Benito; d) efecto de la aplicación foliar con 100 mM de ZnO NPs sobre los síntomas de PHYVV en plántulas de chile jalapeño cv Don Pancho y e) efecto de la aplicación foliar con 100 mM de ZnO NPs sobre los síntomas de PHYVV en plántulas de chile jalapeño cv Don Benito. ....	42
Figura 14. Efecto de la aplicación de Nps de ZnO Y TiO <sub>2</sub> en el desarrollo del fruto comparado con el control sano, control PHYVV y control comercial. ....	44
Figura 15. Actividad de POD, CAT, SOD, PAL y APX en respuesta al tratamiento con ZnO t3-dpi (100 mM) en plantas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito con infecciones	

de PHYVV y los controles. El número de plantas por tratamiento fue n = 18. Las barras de error representan la media ± errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas frente a los tratamientos mediante la prueba de Tukey (P< 0.05).....	46
Figura 16. Actividad de POD, CAT, SOD, PAL y APX en respuesta al tratamiento con TiO <sub>2</sub> de 100 mM en plantas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito con infecciones de PHYVV y los controles. El número de plantas por tratamiento fue n = 18. Las barras de error representan la media ± errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas frente a los tratamientos mediante la prueba de Tukey (P< 0.05).....	48
Figura 17. Actividad de ARSA y DRSA, en respuesta al tratamiento 100 mM de NPs ZnO en plantas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito infectadas con PHYVV y sus controles (planta sana, planta infectada y planta sana con la aplicación de 100 mM de NPs de ZnO). .....	50
Figura 18. Actividad de ARSA y DRSA, en respuesta al tratamiento 100 mM de NPs de TiO <sub>2</sub> en plantas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito infectadas con PHYVV y sus controles (planta sana, planta infectada y planta sana con la aplicación de 100 mM de NPs de TiO <sub>2</sub> ). .....	51
Figura 19. Actividad de Peróxido de hidrogeno y prolina en respuesta al tratamiento 100 mM de NPs ZnO en plantas de jalapeño cv. Don Pancho and cv. Don Benito infectadas con PHYVV y los controles (planta sana, planta infectada y planta sana con la aplicación de 100 mM de NPs de ZnO).....	52
Figura 20. Actividad de Peróxido de hidrogeno y Prolina en respuesta al tratamiento 100 mM de NPs de TiO <sub>2</sub> en plantas de jalapeño cv. Don Pancho and cv. Don Benito infectadas con PHYVV y los controles (planta sana, planta infectada y planta sana con la aplicación de 100 mM de NPs de TiO <sub>2</sub> ).....	53
Figura 21. Absorción y distribución de la aplicación por aspersion foliar de NPs de ZnO en hojas de plantas de chile jalapeño infectadas con PHYVV: a) Células de hojas de plantas de chile cv. Don Pancho infectado con PHYVV tratado con 100 mM; b) Células de hojas de plantas de chile cv. Don Benito fue infectado con PHYVV y tratado con 100 mM y c) Células de cloroplasto sanas con NPs de ZnO. ....	54
Figura 22. Absorción y distribución de la aplicación por aspersion foliar de NPs de TiO <sub>2</sub> en hojas de plantas de chile jalapeño infectadas con PHYVV: a) Células de hojas de plantas de chile cv. Don Pancho infectado con PHYVV tratado con 100 mM; b) Células de hojas de plantas de chile cv. Don Benito fue infectado con PHYVV y tratado con 100 mM.....	55
Figura 23. Efecto en la germinación derivado del priming con NPs. a) Porcentaje de germinación con ambas variedades de chile jalapeño con NPs de ZnO Y b) ) Porcentaje de germinación con ambas variedades de chile jalapeño con NPs de TiO <sub>2</sub> . ....	58
Figura 24. Efecto en el desarrollo del germinado con NPs de ZNO y NPs de TiO <sub>2</sub> , a) Germinados tratados con NPs de ZnO y TiO <sub>2</sub> cv. Don Pancho y b) Germinados tratados con NPs de ZnO y TiO <sub>2</sub> cv. Don Benito. ....	59
Figura 25. Efecto en el desarrollo fisiológico de los germinados tratados con NPs de ZnO y su control en ambas variedades de chile jalapeño. a) Altura del germinado en ambas variedades, b) Diámetro del tallo en ambas variedades y c) Largo de la raíz en ambas variedades .....	60

Figura 26. Efecto en el desarrollo fisiológico de los germinados tratados con NPs de TiO <sub>2</sub> y su control en ambas variedades de chile jalapeño. a) Altura del germinado en ambas variedades, b) Diámetro del tallo en ambas variedades y c) Largo de la raíz en ambas variedades .....	61
Figura 27. Actividad enzimática de POD, PAL y CAT en cv. Don Pancho y cv. Don Benito en germinados tratados con NPs de ZnO. ....	63
Figura 28. Actividad enzimática de POD, PAL y CAT en cv. Don Pancho y cv. Don Benito en germinados tratados con NPs de TiO <sub>2</sub> . ....	64
Figura 29. Efecto de la fisiología en plantas tratadas foliarmente con NPs de ZnO en ambas variedades de chile jalapeño. ....	66
Figura 30. Efecto de la fisiología en plantas tratadas foliarmente con NPs de ZnO en ambas variedades de chile jalapeño. ....	67
Figura 31. Curva de calibración para Proteína .....	83
Figura 32. Curva de calibración Fenilalanina Amomía-liasa .....	83
Figura 33. Curva de calibración Prolina.....	84

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Nanopartículas metálicas y óxidos metálicas con actividad antiviral (modificado de Vargas-Hernández et al., 2020). .....	10
Cuadro 2. Mezcla de reactivos para qPCR .....	18
Cuadro 3. Efecto sobre la varianza de la variable independiente tiempo de aplicación de las NPs de ZnO sobre la infección viral en Chile Jalapeño, así como la interacción de cada cv. con el tiempo de aplicaciones, el tiempo de interacción de las aplicaciones con cada CV y la interacción de los dos cultivares con el tiempo de aplicaciones.....	29
Cuadro 4. Efecto sobre la varianza de la variable independiente tiempo de aplicación de las NPs de TiO <sub>2</sub> sobre la infección viral en Chile Jalapeño, así como la interacción de cada cv. con el tiempo de aplicaciones, el tiempo de interacción de las aplicaciones con cada CV y la interacción de los dos cultivares con el tiempo de aplicaciones.....	32
Cuadro 5. Efecto de la varianza en el tiempo de aplicación de las NP de ZnO de la variable independiente sobre la carga viral de la planta de Chile Jalapeño, la interacción de cada cultivar con el tiempo de aplicación, la interacción genotipo. y la interacción de los dos cultivares con el momento de las aplicaciones. ....	36
Cuadro 6. Valor del análisis de varianza de Fisher según los niveles virales. Tiempo de aplicación de las NP de ZnO, considerando la respuesta en carga viral en cada cultivar y tiempo de aplicación. ....	37
Cuadro 7. Valor del análisis de varianza de Fisher según la movilidad de PHYVV. Tiempo de aplicación de las N.P. de ZnO, .....	40
Cuadro 8. Efecto sobre variables fisiológicas y morfológicas de los tratamientos con nanopartículas de ZnO en chile jalapeño cv. Don Pancho.....	43
Cuadro 9. Efecto antiviral después de una exposición directa de NPs de ZnO 100 mM y extracto de hojas de ADN del título viral.....	56
Cuadro 10. Efecto antiviral después de una exposición directa de NPs de TiO <sub>2</sub> 100 mM y extracto de hojas de ADN del título .....	57

## RESUMEN

El virus Huasteco de la vena amarilla (PHYVV) es un geminivirus endémico en México. Este geminivirus pertenece al género begomovirus y causa pérdidas parciales o totales en el cultivo de chile debido a su amplia distribución y la presencia simultánea de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) como vector. Recientemente se propuso que el uso de nanopartículas de óxidos metálicos puede ser una opción para reforzar el manejo integrado de este patógeno. En el presente trabajo se propuso la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc (NPs de ZnO) Y dióxido de titanio (NPs de TiO<sub>2</sub>) en concentraciones de 50 mM, 100 mM, 150 mM y 200 mM para el manejo de las enfermedades virales. En este contexto, se investigó la interacción de NP-virus-planta, así como el efecto de las NPs de ZnO y NPs de TiO<sub>2</sub> para inhibir la infección por PHYVV. Adicionalmente, presentamos información relacionada con el posible mecanismo antiviral que puede estar implicado en las dos variedades diferentes de chile jalapeño. Además, se investigaron los efectos del genotipo sobre la severidad de la enfermedad. En las plantas cultivadas se analizó dosis-respuesta para algunas variables, incluyendo la severidad de la enfermedad y el efecto del tiempo de aplicación (PRE y POST).

La aplicación de las NPs redujo significativamente la gravedad de la enfermedad en plantas de chiles tratadas con 150 mM antes y 100 mM después de la infección. Las plantas tratadas mostraron menos síntomas de virus en comparación con las plantas de control no tratadas. Se redujo significativamente el título viral en ambas variedades de plantas de jalapeño. Las actividades de catalasa y peroxidasa dismutasa aumentaron significativamente en comparación con los controles. Además, las plantas tratadas con NPs activaron resistencias y mejoraron la producción y calidad de frutos de chile jalapeño cv. Don Benito y cv. Don Pancho.

**Palabras claves:** PHYVV, nanopartículas, antivirales, ISR, SAR

## ABSTRACT

Huasteco yellow vein virus (PHYVV) is a geminivirus endemic in Mexico. This geminivirus belongs to the begomovirus genus and causes partial or total losses in the chili crop due to its wide distribution and the simultaneous presence of the whitefly (*Bemisia tabaci*) as a vector. It was recently proposed that the use of metal oxide nanoparticles may be an option to reinforce the integrated management of this pathogen. In the present work, the application of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub> NPs) in concentrations of 50 mM, 100 mM, 150 mM and 200 mM for the management of viral diseases was proposed. In this context, the NP-virus-plant interaction was investigated, as well as the effect of ZnO NPs and TiO<sub>2</sub> NPs to inhibit PHYVV infection. Additionally, we present information related to the possible antiviral mechanism that may be involved in the two different varieties of jalapeño pepper. Furthermore, the effects of genotype on disease severity were investigated. In the cultivated plants, dose-response was analyzed for some variables, including the severity of the disease and the effect of application time (PRE and POST).

The application of the NPs significantly reduced the severity of the disease in pepper plants treated with 150 mM before and 100 mM after infection. Treated plants showed decrease of virus symptoms compared to untreated control plants. The viral titer was significantly reduced in both varieties of jalapeño plants. Catalase and peroxidase dismutase activities were significantly increased compared to controls. Furthermore, treated plants with NPs trigger resistance and improve the production and quality of jalapeño pepper fruits cv. Don Benito and cv. Don Pancho.

**Keywords:** PHYVV, nanoparticules, antiviral, ISR, SAR

## 1. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annum* L.) es uno de los productos agrícolas de más crecimiento económico. En México, se producen alrededor de 3.1 millones de toneladas anuales, cultivadas en aproximadamente 150 000 hectáreas, lo cual representa una ganancia económica de 30.6 mil millones de pesos (SAGARPA, 2021; SIAP, 2023).

A nivel mundial una de las causas de pérdida económica de mayor importancia en el chile son las enfermedades virales (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993), teniendo efectos reportados en la salud de la planta propiciando la reducción de tamaño y calidad nutricional del fruto (Jones y Naidu, 2019; Farooq *et al.*, 2021).

En México, en los últimos años los ataques de diferentes patógenos en cultivos de hortalizas han representado un factor de riesgo económico, entre las más relevantes se encuentran las enfermedades virales en el cultivo del chile. Estas enfermedades virales representan pérdidas entre un 20 al 100%, afectando el rendimiento y la calidad del producto (Cai *et al.*, 2019; Vargas-Hernández *et al.*, 2020). Estas pérdidas varían según las condiciones climáticas, fechas de cultivo y manejo, provocando en condiciones ideales para la infección del virus pérdidas de hasta un 100% en los cultivos (Velasco *et al.*, 2020). Existen varias enfermedades virales que afectan a cultivo de chile, entre las que destacan el Virus Huasteco de la Vena Amarilla del Chile (PHYVV) (Retas-Manjarra *et al.*, 2019).

Las plantas activan distintos mecanismos para controlar la propagación de los virus evitando su replicación y expresión viral mediante un fenómeno conocido como “recuperación” o “remisión de síntomas” (Chellappan *et al.*, 2004; Ramírez-Prado *et al.*, 2018). Por otro lado, los virus desarrollan mecanismos de adaptación que contrarrestan las defensas del hospedante (Retas-Manjarra *et al.*, 2019).

Sin embargo, una vez infectada la planta en el campo, los virus no pueden ser controlados, pues no existe ninguna solución química directa para el manejo de la enfermedad viral hasta el momento (Pinheiro *et al.*, 2016; Akhter *et al.*, 2019). Las acciones empleadas en el manejo de las plantas enfermas, basadas en estrategias



preventivas, no contemplan la cura o tratamiento para atenuar al patógeno en la planta (Jones y Naidu, 2019).

Por ello, el control de las enfermedades virales en el cultivo de chile representa un reto, ya que no existen productos en el mercado capaces de combatir la infección de origen viral. Debido a la necesidad que representa el manejo de las enfermedades virales se ha logrado la disminución del inóculo en la planta usando tratamientos de quimioterapia y termoterapia, con el propósito de atenuar, retrasar o producir plantas libres de virus (Maruthi *et al.*, 2019); sin embargo, estos tratamientos son muy caros y complicados de usar.

Una opción para el manejo de estas enfermedades es el uso de las nanopartículas (NPs). Las NPs son partículas de pequeño tamaño, el cual oscila entre 1- 100 nm, y poseen una amplia superficie de área por unidad de volumen y de sitios activos catalíticos (Fu *et al.*, 2014). Gracias al mecanismo de acción de las nanopartículas se ha empleado como una opción viable contra patógenos, actualmente sobre todo contra enfermedades virales. Se plantea que mecanismo interfiere con la síntesis de ADN y ARN, la síntesis de proteínas, disrupción en la membrana muy similar al presentado por los antibióticos (Kohanski *et al.*, 2010; Dakal *et al.*, 2016; Vargas-Hernández *et al.*, 2020). Por otra parte, las NPs disminuyen la posibilidad del desarrollo de resistencia por parte de patógenos (Farooq *et al.*, 2021). Asimismo, su pequeño tamaño y superficie de área le confiere la posibilidad de cruzar la membrana celular, el peptidoglicano y otras barreras biológicas causando la muerte de organismos (Lara *et al.*, 2010; Blecher *et al.*, 2011).

Gracias a estos mecanismos la aplicación foliar de nanopartículas y óxidos metálicos a diferentes concentraciones en plantas con enfermedades virales presenta una opción para el manejo de estas enfermedades (Vargas-Hernández *et al.*, 2020).

Con base en lo anterior, se propuso la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc en concentraciones de 50 mM, 100 mM, 150 mM y 200 mM para el manejo de las enfermedades virales. En este contexto, se investigó la interacción de NP-virus-

planta, así como el efecto de las NPs de ZnO para inhibir la infección por PHYVV. Así mismo, desencadenar resistencias y mejorar la producción y calidad de frutos de chile jalapeño cv. Don Benito y cv. Don Pancho. Adicionalmente, presentamos información relacionada con el posible mecanismo antiviral que puede estar implicado en las dos variedades diferentes de chile jalapeño.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 Respuesta del Chile (*Capsicumm annuum* L.) contra patógenos.

El chile es una planta frutal perteneciente al género *Capsicum* que presenta una sustancia llamada capsaicina almacenada en venas y semilla en mayor o menor medida la cual genera el grado de picor del chile. También se encuentran mayormente carotenoides que aportan sabor, color y propiedades antioxidantes y bioactivos. Los chiles son mayormente ricos en derivados de compuestos flavonoides y fenólicos, vitamina A, B, C y E, carotenoides, capsaicinoides y minerales tales como el hierro, calcio y magnesio (Pandey y Rizvi, 2009; Baenas *et al.*, 2018; Than *et al.*, 2008).

Cuando el chile es atacado por patógenos de origen viral puede activar diferentes mecanismos de defensa como la resistencia al virus o de adaptación, en la cual el huésped reconoce y genera una respuesta contra el patógeno, mediante la modificación de su ARN (Palukaitis, 2011; Kachroo y Kachroo, 2020). Como mecanismo de resistencia puede activar los alelos del gen *L* permitiendo codificar una proteína resistente tipo *CC-NB-LR* y la expresión del gen *L* confiriendo a la planta resistencia contra el virus restringiendo el sitio de infección (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Tomita *et al.*, 2011). Así mismo se activan los genes *WRKY* y *NMAPK* como respuesta contra la infección (Kim *et al.*, 2007).

Entre otro de los mecanismos que puede optar el chile como respuesta contra los virus puede ser mediante la producción de los genes *CaWRKYa* y *MAPKs* (*CaMK1* y *CaMK2*), que están involucrado en la resistencia de *L*-mediación los cuales son respuestas de la defensa en el chile con el TMV (Huh *et al.*, 2015). Así mismo puede optar por inducir su mecanismo de adaptación, y subsecuentemente la fosforilación de CaPR-10 incrementando la actividad de los ribonucleótidos que se adhieren al ARN o AND viral, activando así una ruta antiviral *in vivo* (Park *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2015).

Las plantas deben regular su desarrollo y crecimiento en función a la respuesta de la temperatura, patógenos, agua y nutrientes, etc. Involucrando complejos mecanismos de percepción, respuesta y adaptación mediante alteraciones fisiológicas, cambios bioquímicos y ajustes osmótico (Chaves *et al.*, 2003; Sriza *et al.*, 2008; Anjum *et al.*, 2012).

Como respuesta al estrés generado por patógenos se induce principalmente daño oxidativo y especies reactivas del oxígeno (ROS), por lo cual la planta acumula osmolitos en el citosol y protoplasma, como prolina, glicinabetaina, ascorbato, carotenoides, a-tocoferoles y fenoles, así mismo la activación de enzimas antioxidantes, es decir, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), guaicol peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) (Gill y Tuteja, 2010; Gill *et al.*, 2013). La respuesta de la planta también incluye la regulación de fitohormonas: ácido abscísico (ABA), etileno, citoquinina (CK), auxina (IAA), giberelina (GA), jasmonato (JA), brasinosteroides (BR), ácido salicílico (SA), óxido nítrico (NO) y estrigolatonina (SL), siendo la síntesis de ABA una de las respuestas más rápidas de la planta al estrés (Peleg y Blumwald, 2011).

## 2.2 Virus Huasteco de las Venas Amarillas en Chile (PHYYV).

El Virus Huasteco de las venas amarillas en Chile (PHYYV) pertenece al género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae* y es transmitido por la mosca blanca (*B. tabaci*). Las plantas infectadas presentan una coloración amarillo brillante, el número de frutos disminuye, distorsión en hojas, venas amarillas y las hojas presentan un mosaico difuso (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Rentería-Cannet *et al.*, 2011). Este virus se encuentra mundialmente distribuidos afectando alrededor de 200 plantas (González-jara *et al.*, 2011; Pacheco-Olvera *et al.*, 2012)

Este virus afecta principalmente a las plantas de Chile y a otras plantas de la familia *Solanacea* en México (García-Nería y Rivera-Bustamante, 2011) y se encuentra

diseminado en Guatemala, México y el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

El PHYVV es un virus que posee un genoma segmentado en dos secciones (ADN-A y ADN-B), de forma circular de una hebra de ADN. La sección de ADN-A es la encargada de descodificar las proteínas virales requeridas para la replicación (proteína de replicación, *REP*), el control de la expresión de genes (potenciador de replicación, *REn*), proteína transactivadora y determinante de patogenicidad con una actividad supresora-silenciadora (activador de la proteína de transcripción, *TrAP*), y la encapsulación (proteína de encapsulación, *CP*). Por otro lado, el segmento ADN-B se encarga de la producción de dos proteínas: la proteína de movimiento (*MP*) y la proteína de exposición nuclear (*NSP*), las cuales están involucradas en el movimiento intra- e intercelular (Torres-Pacheco *et al.*, 1993; 1996; Eagle y Hanley-Bowdoin, 1997; Bisaro, 2006; Shimada-Beltran y Rivera-Bustamante, 2007; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015).

En el proceso de infección del PHYVV, el virus entra primero en la célula huésped sin su capsula y toma el genoma ssADN, el cual es transformado en un ADN de doble hebra para poder formar la forma replicada (RF) generando una copia para la transcripción, permitiendo la expresión de los genes *Rep* y *TrAP* durante la infección en el núcleo de la célula huésped. La expresión de estos genes prepara a la célula huésped para la replicación del virus y el bloqueo de algunas rutas metabólicas de defensa (Bass *et al.*, 2000; Tijerina-Ramírez *et al.*, 2014).

#### 2.4 Medidas de control de enfermedades en Chile

El manejo de las enfermedades virales en Chile es complicado debido a su amplio rango de huésped y vectores de transmisión, siendo las prácticas culturales una de las alternativas más empleadas para el control en la prevención o retardo de las enfermedades virales principalmente en la interferencia del vector y el control de la transmisión de la enfermedad (Karungi *et al.*, 2013)

Con la finalidad de mejorar la durabilidad y la producción del cultivo de chile se han optado por el empleo de medidas de protección como es el uso de insecticidas a gran escala y plantas resistente a virus. Así mismo, se emplea el control integral y medidas pragmáticas las cuales se ha buscado combinar en el manejo de virus en plantas (Kenyon *et al.*, 2014).

Estas prácticas consisten en las prácticas culturales, uso de insecticidas, agentes de biocontrol o productos naturales que induzcan resistencia en la planta o afecten el comportamiento del vector y resistencia poligenética en plantas, remover plantas enfermas e intervenciones agronómicas, como cambiar las fechas de cultivo, lugar, etc., sin mucho éxito (Thakur *et al.*, 2019). Así mismo la implementación de plantas resistentes es una forma factible de acción para el control de virus, pero la sinergia de interacción de diferentes virus infectando la planta propicia el rompimiento de esta resistencia (Srivastava *et al.*, 2017).

## 2.5 Nanopartículas (NP)

Las nanopartículas (NP) son partículas de dimensiones menores de 100 nm, poseen grandes superficies de área por unidad de volumen causando el incremento de sitios activos catalíticos, estas NP pueden ser producidas de diferentes materiales como zeolitas, carbón, hierro, plata, oro, paladio, platino, óxidos de platino, óxidos de titanio, óxidos de fierro, óxidos cobre, óxidos de zinc, óxidos de níquel (Santacruz-Gutiérrez, 2013).

La obtención de NP metálicas puede producirse por distintos métodos físicos (top-down) produciendo una distribución de partícula mayor a 10 nm entre los cuales encontramos por mezcla en fusión, ablación de láser, deposición física de vapor entre otros, y los métodos químicos (bottom-up) siendo altamente estables se pueden producir por sol-gel, termólisis, fotorreducción y microemulsión (Singh *et al.*, 2018)

Las NP metálicas son de gran interés debido a su forma, tamaño, sitios activos y área-volumen, ya que su pequeño tamaño les permite fácilmente penetrar membranas celulares y otros tipos de barreras biológicas provocando una disfunción celular (Nel *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2008) las cuales han sido aplicadas contra distintos patógenos (Huh y Kwon, 2011; Fernandez Moure *et al.*, 2017).

Los mecanismos de acción más importantes estudiados son la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés) y uno de los más importantes para las plantas en defensa al estrés (Yang *et al.*, 2018), las cuales son un subproducto de los metabolismos oxidativos celulares incluyendo la superoxidación de radicales libres, radicales hidroxilo y peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (González *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2012). La sobreproducción de ROS puede inducir el estrés oxidativo, provocando el fallo de las funciones de regulación-redox (Meng *et al.*, 2009), y el nivel de producción dependerá de la naturaleza química de la nanopartícula (González *et al.*, 2008).

Para poder mitigar los efectos ocasionados por el estrés oxidativo derivado de la aplicación de NPs las plantas activan su mecanismo de defensa tanto enzimático como antioxidante. Por lo cual, para mitigar la alteración de la homeostasis derivado al incremento de ROS pueden activar superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) (Tan *et al.*, 2018).

El ROS puede provocar daños en el desarrollo y funcionamiento de la célula, incluyendo modificación oxidativa de proteínas, peroxidación de lípidos, modificación de ácidos nucleicos, como la ruptura de las hebras de ADN, modulación de los genes de expresión, respuestas inflamatorias, las cuales pueden causar eventualmente cambios en la movilidad, apoptosis, citotoxicidad y efectos genotóxicos (Stadtman y Berlett, 1998; Shi *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2014)

## 2.6 Actividad antiviral de las nanopartículas

Las nanopartículas han reportado con actividad antibacteriana y antiviral incluyen plata, hierro, óxido de hierro, óxido de cobre, óxido de zinc, óxido de aluminio, dióxido de titanio, oro y galio. Las NPs se han usado para tratamientos médicos, bactericidas, virales, etiquetado biológico y tratamiento de algunos cánceres (Aderibigbe, 2017; Gupta *et al.*, 2018). Debido al mecanismo de acción reportado de las nanopartículas que consiste principalmente en la interferencia de la síntesis de ADN, RNA y proteínas, así mismo la ruptura de membrana (Corrêa *et al.*, 2015; Dakal *et al.*, 2016), se ha observado que esta variedad de mecanismos disminuye la posibilidad de desarrollar resistencia al microorganismo (Slavin *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2018)

El uso de NP de óxidos de metales de plata, hierro, cobre, zinc, aluminio, dióxido de titanio, oro y galio ha reportado efectos favorables como bactericidas, tratamientos médicos, fungicidas, como terapia médica para algunas células cancerígenas y a ciertos virus como el VIH, herpes, influenza y hepatitis (Hasan, 2015; Aderibigbe, 2017). Así mismo se han reportado efectos favorables de estas nanopartículas en virus de plantas (Cuadro 1). Derbalah y Elsharkawy (2019) estudiaron el efecto las nanopartículas de óxido de níquel contra CMV teniendo una disminución de hasta cerca de un 95% de la infección viral mediante aspersiones foliares y drenaje, además se mejoraron ciertas características fisiológicas de la planta.

En la actualidad el estudio de la activación de factores de resistencia o la inducción de genes en las plantas que tengan una actividad antiviral debido al uso de nanopartículas ha llevado al estudio de los mecanismos de acción, el análisis de las características fisiológicas en función de la respuesta de la aplicación de las NPs por diferentes autores (Elbeshehy *et al.*, 2015; Zholobak y Kharchenko, 2016, El-Shazly *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2019; Elsharkaway y Derbalah, 2019), demostrando igualmente la eficiencia y el potencial de las nanopartículas como una opción más amigable con el medio ambiente para el manejo de las enfermedades virales en plantas.



Cuadro 1. Nanopartículas metálicas y óxidos metálicas con actividad antiviral (modificado de Vargas-Hernández et al., 2020).

<b>Nanopartícula</b>	<b>Infección</b>	<b>Acción</b>	<b>Referencia</b>
NP de plata	SHRV	Disminución en la carga viral y completa supresión de la enfermedad	Jain et al., 2014
NP de dióxido de titanio	BBSV	Reducción de la severidad de la infección.	Elsharkaway y Derbalah, 2018
NP de dióxido de titanio	ToMV	Limitación de infección y la replicación viral.	Hao et al., 2018
NP de óxido de zinc	TMV	Supresión de la velocidad de invasión del virus	Cai et al., 2019
NP de óxido de zinc	CMV	Disminución en la severidad e incidencia de la enfermedad	El-Sawy et al., 2017a
NP de dióxido de sílice	TVLCV	Reducción en la severidad de los síntomas y de la concentración viral	El-Sawy et al., 2017b

## 2.7 Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO)

Las nanopartículas (NPs) de ZnO no son tóxica, material semiconductor, fotocatalíticas, alta transparencia. Estas NPs han demostrado actividad antibacterial, fungicida y fotodegradación y aplicaciones para componentes de compuesto en drogas, quimioterapias y contra células cancerígenas (Vimala et al., 2014; Ali et al., 2016).

Se ha reportado la producción de ROS y producción de aniones súper óxidos y peróxido de hidrogeno en las NP de ZnO (Kumar et al., 2011; Horie et al., 2012). El mecanismo de acción reportado consiste en ROS, causando que la membrana filtre proteínas y ácidos nucleicos mediante el aumento de la peroxidación de lípidos. Adicionalmente se liberan iones de  $Zn^{+2}$  dañando la membrana celular permitiendo que estos iones interactúen con los componentes intracelulares (Li et al., 2011; McDevitt et al., 2011).

Por otro lado, la aplicación de las NP de ZnO en plantas ha reportado diferentes efectos en las plantas tanto benéficos como adversos. Entre los efectos benéficos en plantas se encuentra la producción en el aumento y tipos de proteínas, fibra, raíces, clorofila y grasa vegetal, también promueve la fotosíntesis, el crecimiento foliar y la producción de bioactivos (Kisan *et al.*, 2015; El-Hak *et al.*, 2019; Joshi y Somdutt, 2019).

Las NPs también presenta efector adversos en las plantas en las que se han presentado la disminución del índice mitótico, aumento en la modificación cromosómica y micronúcleos, disminución de raíz y efectos de estrés oxidativo (McDevitt et al., 2011: Joshi y Somdutt, 2019). Sin embargo, esta respuesta varía en función de la concentración que se aplica (Siddiqi y Husen,2017), por ejemplo, una respuesta máxima con respecto al peso seco del brote en plántulas tratadas con NP de ZnO de 1,5 ppm, mientras que a 10 ppm las nanopartículas ejercieron efectos adversos sobre el crecimiento de la raíz (Das y Roychoudhury, 2014).

### **3. HIPÓTESIS**

La aplicación de NP de ZnO yTiO<sub>2</sub> reduce significativamente los síntomas de la enfermedad, la carga viral y su efecto en el rendimiento en chile jalapeño infectado con virus PHYVV. Así mismo, sin efectos fitotóxicos, favoreciendo la inducción de bioactivos de defensa y benéficos al consumidor, en comparación al manejo convencional.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la concentración de NPs de ZnO y NPs de TiO<sub>2</sub> que se debe aplicar, en chile infectado con el virus PHYVV, reduciendo significativamente los síntomas de la enfermedad y su efecto en el rendimiento. Asimismo, sin presentar efectos fitotóxicos favoreciendo la inducción de bioactivos de defensa y benéficos al consumidor, en comparación al manejo convencional.

#### 4.1 Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto de la aplicación foliar de nanopartículas (NP) de ZnO en el comportamiento de variables asociadas a la enfermedad y su efecto en el rendimiento en chile jalapeño.
2. Elucidar el mecanismo de acción de NP de ZnO en plantas de chile infectadas con PHYVV.
3. Determinar posibles efectos fitotóxicos derivado de la aplicación de NP de ZnO en plantas de chile infectadas con PHYVV.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Evaluación del efecto de la aplicación foliar de nanopartículas (NP) de ZnO en el comportamiento de variables asociadas a la enfermedad y su efecto en el rendimiento en chile jalapeño.

### 5.1.1 Ubicación del área de investigación

El experimento se desarrolló en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala. El poblado de Amazcala (Figura 1) pertenece al municipio del Marqués, Qro., el cual se localiza en el sector Suroeste del estado, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud Norte. La temperatura media oscila entre los 18 °C y los 24 °C, con un clima predominante subtropical, templado semiseco.

La experimentación se realizó en un invernadero completamente condicionado para evitar la posible diseminación del virus PHYVV, de igual forma se controlaron las condiciones de cultivo del chile jalapeño Don Benito y chile jalapeño Don Pancho.

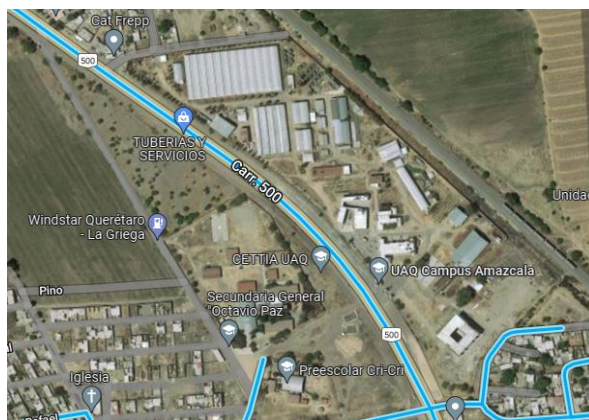


Figura 1. Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, municipio del Marques, Qro (Google Maps, 2023).

### 5.1.2 Síntesis y caracterización de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas de ZnO se realizó mediante un método de coprecipitación química con modificaciones menores. Se disolvió  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$  (11,2 g) en 50 ml de agua desionizada y se agitó durante 30 min. Una vez disuelto,

se adicionaron 200 mL de agua desionizada y 50 mL de NaOH (0.1 M) hasta aforar un litro.

Las NP de ZnO se analizaron mediante difracción de rayos X de ángulo bajo (XRD) con un difractómetro Ultima IV Rigaku. Los compuestos se caracterizaron por su estructura y morfología mediante micrografías XRD y SEM (microscopía electrónica de barrido) que ilustraron las formas de las aglomeraciones de las NP de ZnO y la variación de tamaño de las NP de ZnO. usando un Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución marca HITACHI modelo SU8230.

### 5.1.3 Material vegetal

Las plantas de chile jalapeño (*C. annuum* L.) cv. Don Benito y cv. Don Pancho se utilizaron para los ensayos de infección y supresión de PHYVV mediante el uso de NPs de ZnO y TiO<sub>2</sub>. Las semillas fueron obtenidas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Las semillas se germinaron en un sustrato de turba comercial (sustrato IQ, EE. UU.) en una cámara de poliestireno con 200 pozos; se sembró una semilla por pozo a una profundidad de 0.2 a 0.3 cm. Posteriormente, se plantaron en vasos de poliestireno después de la aparición de 6 a 8 hojas. Luego de 55 días las plantas se trasplantaron en bolsas de 9 L con sustrato de tezontle, humus y tierra en proporción 2:2:5 para producción. Las plantas de chile jalapeño se cultivaron en condiciones de invernadero ( $23,5 \pm 5$  °C, humedad de  $75,7 \pm 17,3$  % y fotoperíodos de luz de 14 h). A las plantas se les suministró una solución Steiner para nutrición que fue del 20 % al 100% gradualmente.

### 5.1.4 Diseño experimental

El diseño experimental se dividió en dos experimentos. Estos experimentos consistieron en la aplicación foliar de las NPs de ZnO y NPs TiO<sub>2</sub>. El diseño de tratamientos se realizó mediante un factorial completo, el cual generó 64 tratamientos en la plántula. Utilizamos un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental fue una planta y diez repeticiones.

En esta investigación se consideraron las siguientes variables independientes

1. **Efecto del genotipo del chile jalapeño:** cv. Don Pancho y cv. Don Benito, esto con el propósito de determinar la influencia que puede tener el genotipo en la interacción virus-planta-NPs.
2. **La concentración de las NPs:** se determinó para ver el efecto de la aplicación de las NPs en la severidad de la enfermedad. Por lo cual se propusieron las concentraciones de T1:0 mM, T2:50 mM, T3:100 mM, T4:150 mM, and T5:200 mM basado en estudios previos de Shafie et al., 2018; Cai et al., 2019 y Cai et al., 2020.
3. **El tiempo de aplicación:** se determinó para ver el efecto de la aplicación de las NPs antes (preventivo) o después (curativo) de la infección del virus. Los tratamientos se aplicaron 72 hora antes de la infección (PRE) y 72 horas después de la infección (POST). Los tiempos de las aplicaciones se basaron resultados previos publicados por los autores Cai et al., 2019 y Cai et al., 2020.

La aplicación de las NPs se realizó de forma foliar en suspensión con agua realizando un total de 3 aplicaciones en plántulas y 2 aplicaciones en plantas cercanas a la floración (alrededor de 65 días de edad). La aplicación de las NPs para la etapa de producción se realizó a los siete días del trasplante y al mes de la última aplicación. La aplicación de las NPs se realizó mediante el uso de una bomba manual de aspersion de 5 L.

Para la etapa de producción se escogió la variedad de Don Pancho debido la facilidad visual de identificar los síntomas asociados al PHYVV. De igual manera, se realizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro replicas.

Las variables dependientes analizadas en esta investigación fueron:

1. **Severidad de la expresión del síndrome:** Severidad de los síntomas, carga viral y movilidad del virus.
2. **Efecto en la producción:** altura de la planta, diámetro de tallo, número de floras, número de botones florales, número de flores, número de fruto, peso

del fruto, largo del fruto y ancho del fruto.

3. **Actividad enzimática:** Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD), fenilalanina amonio-liasa (PAL), ascorbato peroxidasa (APX).
4. **Actividad no enzimática:** Prolina y peróxido de hidrógeno, actividad eliminadora de radicales DPPH• (DRSA), actividad eliminadora de radicales ABTS•+ (ARSA).
5. **Actividad antiviral:** Acumulación y distribución de las NPs en hojas y actividad antiviral directa.

#### 5.1.5 Infección del material vegetal

La infección del virus PHYVV se realizó mediante biobalística (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993). La inoculación se realizó en la parte apical de las plantas (dos hojas), se inoculó con plásmidos pIGV21 y pIGV22 cubiertos con partículas de tungsteno (0,7 mm, BioRad). que gentilmente fueron proporcionados por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), campus Irapuato, México.

#### 5.1.6 Evaluación de la severidad de la enfermedad

Para la evaluación del comportamiento asociado a la enfermedad y la elucidación del mecanismo de acción de NP de ZnO se realizó bajo condiciones protegidas y confinadas propuestas en “Guidelines for Ecological Risk Assessment” (US EPA, 1998). En cada tipo de ensayo, una vez que se presentaron los síntomas (entre 4-8 días después de la inoculación) se midieron las variables explicativas las cuales fueron: síntomas y rendimiento. La evaluación de los síntomas del PHYVV en los experimentos se realizó bajo un esquema de variable nominal ordinal basado en una escala de 1-5 reportada por Torres-Pacheco, *et al.* (1996).

#### 5.1.7 Cuantificación viral

Para determinar si existe un efecto antiviral directo en las plantas infectadas según el experimento, genotipo, tratamiento y tiempo de aplicación, se realizó la cuantificación viral del PHYVV en hojas. Para la obtención del DNA fue realizada

mediante la extracción de DNA genómico por el método de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Lee et al., (1988). Se pesaron 150 mg de muestra previamente molida con nitrógeno líquido en un tubo eppendorf de 2 ml y se agregaron 750  $\mu$ L de buffer CTAB (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoetanol). Se incubaron a 60°C por 30 minutos en baño maría y se centrifugo por 10 min a 10,000 xg. Se trasladó el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 750  $\mu$ L de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizo con vortex por 1 minuto. Se centrifugo a 12, 000 rpm por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante (fase acuosa). Se colocó en un nuevo tubo eppendorf el sobrenadante. Se agregó 700  $\mu$ L de isopropanol frío y 250  $\mu$ L de acetato de potasio 5M y se incubó -20 °C por 15 minutos. Se centrifugo a 12, 000 rpm por 10 minutos a 4°C y se decantó y lavo con etanol frío al 70 %. y se centrifugo a 10,000 rpm por 5 min. Se desecho y seco el etanol remanente. Se resuspendió el DNA en 50  $\mu$ L de buffer TE (10 mM Tris- pH 8.0, 1 mM EDTA).

Para verificar la presencia del DNA se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando la tinción con GelRed® (Biotium); los geles fueron corridos con buffer TAE 1X, a 80V por 45 min. La concentración del DNA se midió usando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 con salida espectral completa (190-840 nm), empleando 1  $\mu$ L de las muestras.

La concentración viral se determinó a través de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) con los primers 240 (5'-GGCTTATTTGTAATAAGAG-3') y 241 (5'-GAATTA-AAGGTACATGGAC-3') (Torres-Pacheco et al., 1996)., que amplifican un fragmento de 350 pb componente A del virus. Las condiciones de amplificación fueron 95°C/2min, para la desnaturalización inicial, 94°C/1min para 45 ciclos, 53°C/1min y 72°C/5 min para la extensión final siguiendo la mezcla de reacción descrita en la Cuadro 2.



Cuadro 2. Mezcla de reactivos para qPCR

Reactivo	Cantidad
Mezcla maestra para qPCR Maxima™ SYBR™ Green	5 µL
Oligonucleótido adelantado 10 µM	0.5 µL
Oligonucleótido de reversa 10 µM	0.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1 µL
DNA (100 ng/ µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	Vol. Para ajustar 15 µL

La determinación de la carga viral de PHYV se llevó a cabo mediante un protocolo de expresión relativa según el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livjak et al., 2001) utilizando el gen del factor de elongación alfa 1 (EF1- $\alpha$ ) de *C. annuum* como control normalizador.

Para medir el rendimiento se contaron los frutos maduros y se pesaron por cada unidad experimental. A los frutos se midieron largo, ancho y diámetro, asimismo se pesaron para calcular el rendimiento promedio.

#### 5.1.8 Evaluación del crecimiento y la producción del chile jalapeño

Para determinar el efecto en el desarrollo de la morfología de la planta derivado de la aplicación de las NPs se midió el tamaño de la planta (cm), diámetro del tallo (mm), número de hojas, número de botones florales y número de flores. Las mediciones se realizaron mediante una regla de madera graduada, un vernier digital y el uso de una escala blanca.

Para medir el rendimiento se contaron los frutos maduros a los cuales se midieron largo (cm) y diámetro (mm), asimismo se pesaron para calcular el rendimiento promedio por cada unidad experimental. Además, se midió el número de frutos. Las

mediciones se realizaron con ayuda de una regla graduada, un vernier digital y una balanza analítica.

## 5.2. Elucidación del mecanismo de acción de NP de ZnO en plantas de Chile infectadas con PHYVV.

Para determinar los posibles mecanismos que interfieren en la actividad antiviral de las NPs de ZnO y TiO<sub>2</sub>, se analizaron las actividades enzimática, capacidad antioxidante y actividad no enzimática. Estos con la finalidad de analizar el efecto que tuvo en las plantas infectadas la aplicación foliar de las NPs. Así mismo, se analizó la interacción planta-PHYVV- NPs de ZnO, es decir, si se estimulaba a la defensa de la planta. Además, se examinó el mecanismo de respuesta en función del genotipo de cada variedad propuesta. Por otro lado, se estudió la interacción -PHYVV- NPs de ZnO, determinando si hay una respuesta antiviral directa en el virus al ser expuesto directamente a las NPs. Para observar el efecto antiviral directo se realizó la prueba de reactividad y así poder determinar que posibles mecanismos interactúan para que exista un efecto antiviral.

La elucidación de los mecanismos se realizó de acuerdo con el mejor tratamiento observado (plántula y maceta) en hojas de plantas de Chile jalapeño 3 semanas después de la infección viral tratadas con una aplicación foliar de NPs de ZnO a 100 mM y NPs de TiO<sub>2</sub> a 100 mM utilizando como tratamiento efectivo después de la infección.

### 5.2.1 Movilidad viral

Para determinar si la aplicación de las NPs pudiese tener algún efecto en el virus aparte de disminuir su carga viral (reproducción), también se analizó la restricción de la movilidad del virus. La movilidad de PHYVV se cuantificó mediante la carga viral en las hojas apical y las hojas medias. La cuantificación se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.1.7.

### 5.2.2 Actividad enzimática

La actividad SOD se determinó según el método descrito por Hayat et al. (2018), el cual fue estimado por la inhibición de la reducción fotoquímica del nitro azul tetrazolio (NBT). La mezcla de reacción contenía 1,5 mL de tampón fosfato (0,5 M, pH 7,8), 0,3 mL de EDTA- $\text{Na}_2$  (0,1 mmol/L), 0,3 mL de metionina (0,13 mmol/L), 0,3 mL de NBT (0,75 mmol/L), 0,3 mL de mL de riboflavina (0,02 mmol/L), 0,05 mL de extracto enzimático y 0,25 mL de agua destilada para un volumen total de 3 ml.

La actividad CAT se determinó según el método descrito por Afiyanti & Chen (2014) con una modificación menor. Se añadió una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático a 200  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción (tampón fosfato 50 mM, pH 8,0) y 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno (100 mM); la absorbancia se midió a 240 nm cada 1 min durante 6 min.

La actividad POD se determinó utilizando el kit de ensayo Amplex® Red para peroxidasa de Invitrogen (n.º de cat. A22188) siguiendo las instrucciones del fabricante; la absorbancia se midió a 560 nm.

La actividad PAL se determinó según el método descrito por Toscano et al. (2018) con una modificación menor. Se añadió una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático a 200  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción (borato a 0,1 M, L-fenilalanina 10 mM, pH 8,8). la mezcla se agitó y se incubó durante 60 min a 40 °C. La reacción se detuvo con 50  $\mu\text{L}$  de solución de HCl (1 N) y se dejó reposar por 10 min; la absorbancia se midió a 290 nm. El tampón de extracción se utilizó como blanco.

APX se determinó de acuerdo con el método descrito por Murshed et al. (2008). En primer lugar, se homogeneizaron 200 mg de muestra de hoja pulverizada en 1 ml de tampón MES/KOH 50 mM (pH 6,0), que contenía KCl 40 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, ácido L-ascórbico (AsA) 1 mM y 1 ml de AsA (1 M) y se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C. Se colocaron 185  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción (/pocillo) (PBS 50 Mm y AsA 0,25 mM, pH 7,0) y 10  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de muestra en cada pocillo de la

microplaca y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  200 mM. La reacción se midió a 290 nm. La actividad relativa de cada enzima se mencionó como unidad  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

La actividad de captación de radicales DPPH• (DRSA) en hojas se determinó de acuerdo con el método descrito por Chen et al. (2012). Se añadió una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico a 200  $\mu\text{L}$  de radical DPPH• (0,1 mM) en solución de metanol. La absorbancia se midió a 515 nm. Se usó metanol en lugar de DPPH• para el blanco, mientras que se usó agua destilada en lugar de extracto para el control.

El DRSA se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\text{DRSA (\%)} = [1 - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

donde A es el valor de la absorbancia a  $\lambda_{515 \text{ nm}}$

ABTS •+ actividad captadora de radicales (ARSA).

El ARSA de las hojas se determinó según el método descrito por Re et al. (1999). Inicialmente, el radical catiónico ABTS•+ se generó mezclando la solución madre de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM); la mezcla resultante se dejó reposar en la oscuridad durante 12 h a temperatura ambiente. Luego, la solución radical ABTS•+ se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 0.15 M, pH 7.4) para obtener una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 730 nm. Para el ensayo se mezclaron 230  $\mu\text{L}$  de esta solución diluida con 20  $\mu\text{L}$  del extracto de hojas. La absorbancia se midió a 730 nm de 1 a 6 min después de la mezcla inicial, en condiciones de oscuridad. Se usó PBS en lugar de ABTS•+ para el blanco, mientras que se usó agua destilada en lugar del extracto para el control. El ARSA se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\text{ARSA (\%)} = [1 - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

donde A es el valor de la absorbancia a  $\lambda_{730 \text{ nm}}$

La concentración de prolina se determinó según el método descrito por Lee et al. (2018). En primer lugar, se homogeneizaron 300 mg de muestra de hoja pulverizada con nitrógeno líquido en ácido sulfosalicílico al 1%. Luego se hicieron reaccionar

100  $\mu$ L de extracto de muestra con 200  $\mu$ L de ninhidrina ácida (1.25 (p/v) de ninhidrina en ácido acético al 80 % (v/v)) y se calentó hasta 100 °C durante 60 min. La absorbancia se midió a 520 nm.

El peróxido de hidrógeno se determinó según el método descrito por Junglee et al. (2014). Los primeros 150 mg de muestra de hoja pulverizada con nitrógeno líquido se homogeneizaron con 0,25 ml de ácido tricloroacético (TCA) (0,1 % (p:v)), 0.5 ml de KI (1 M) y 0.25 ml de tampón de fosfato de potasio (10 mM, pH 5.8) . La absorbancia se midió a 350 nm

### 5.2.3 Acumulación de NPs en las hojas infectadas con PHYVV.

Las muestras de hojas del tratamiento curativo T3 (100 mM de NPs), WC, GV y ZnO NPs se analizaron con SEM a través de un corte diagonal de 0.3 mm en las muestras tratadas con glicerol para observar la acumulación y posibles efectos antivirales en hojas de plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito.

### 5.2.4 Prueba de reactividad

El extracto de ADN se obtuvo mediante una extracción de hojas de chile jalapeño infectado con PHYVV por el método CTAB descrito en el apartado 5.1.7. El extracto de ADN vegetal infectado con PHYVV y tungsteno se mezcló con las NPs para obtener una dosis de 100 mM. El extracto con material viral se puso en contacto inmediato (5 s) con las NPs. Se utilizó agua destilada para el control en blanco. La mezcla interactuó en condiciones *in vitro* a temperatura ambiente. Para observar el efecto antiviral, la mezcla se inoculó en plántulas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito (con 4-6 hojas). El inóculo que contenía las NPs-Virus después del tiempo de interacción *in vitro* se introdujo a la planta por biobalística. El propósito de la infección con el inóculo expuesto a las NPs fue para ver la actividad antiviral directa mediante la cuantificación de la concentración viral. Los tratamientos testigo fueron WC y GV. El experimento consistió en siete plantas como unidades experimentales.

5.3. Determinación de posibles efectos fitotóxicos y tóxicos al consumidor derivado de la aplicación de NP de ZnO en plantas de chile infectadas con PHYVV.

#### 5.3.1 Determinación de efectos fitotóxicos

##### 5.3.1.1 Prueba de germinación

Las NPs de ZnO se suspendieron en agua desionizada (pH 6,4) en diferentes concentraciones 100, 150 y 1000 mM.y para las NPs de TiO<sub>2</sub> el de igual exceptuando la concentración más alta la cual fue de 3200 mM. Las semillas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito se expusieron a estas concentraciones basado en la investigación reporta por Magaña-Lopez et al. (2022). Las suspensiones de las NPs de ZnO se dispersaron por sonicación y almacenaron en la ausencia de luz antes de su uso.

Para los ensayos de imbibición se sumergieron 45 semillas en 50 mL de las NPs de ZnO y NPs de TiO<sub>2</sub> por tratamiento en ambas variedades. Las semillas se incubaron durante 1 h con ligera agitación y luego se colocaron en un papel de filtro (Whatman grado 1) dentro de una placa de Petri. En cada placa se colocaron 15 semillas para evitar aglomeraciones y permitir el crecimiento de estas. Este experimento fue por triplicado Las cajas Petri se cerraron para asegurar mantener la humedad. La germinación de semillas fue evaluada diariamente según lo determinado por la aparición de la radícula. Después de 25 días, se evaluó la altura de la planta, diámetro de tallo y largo de raíz. Las plántulas se almacenaron a -80 C para posterior análisis.

##### 5.3.1.2 Determinación de actividad enzimática

Para la detección una posible respuesta a la toxicidad de las semillas de chile jalapeño al ser expuestas a las NPs de ZnO y a las NPs de TiO<sub>2</sub> se analizó las enzimas implicadas en la defensa de la planta a nivel celular y subcelular I. Las enzimas analizadas fueron superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT),

peroxidasa (POD). Para su determinación se usaron las referencias anteriormente mencionadas en el apartado 5.2.1.

#### 5.3.1.3 Prueba en planta

Para determinar si se puede generar fitotoxicidad en las plantas de chile jalapeño derivado a exposiciones mayores de NPs a las propuestas como antivirales se realizó una prueba en plántulas hasta la fase de producción. Este ensayo consistió en exponer de manera foliar con 3 aplicaciones cada semana a las plantas. Las concentraciones propuestas que consistieron en 100 y 1000 mM de NPs de ZnO en ambas variedades. Después de una semana de la aplicación foliar de las NPs se tomaron muestras de hojas y fruto de ser el caso. Las muestras se conservaron a -80 para su posterior análisis. La unidad experimental fue de 16 plantas por tratamiento para cv. Don Pancho y cuatro plantas por tratamiento para cv. Don Benito.

#### 5.3.1.4 Determinación del efecto fisiológico

Se midió el posible efecto fitotóxico a la exposición de NPs mediante la cuantificación de las variables altura, diámetro de tallo, cuantificación de clorofila (SPAD), número de hojas, número de botones, número de flores y número de frutos. Dependiendo de la variable se midieron con una escala blanda mediante conteo debido al carácter cuantitativo discreto del número de hojas, botones, flores y fruto. Mientras que para las demás variables se utilizó una regla de madera y un vernier digital.

#### 5.3.1.5 Determinación bioquímica al estrés

Para la detección de otros bioactivos implicadas en la defensa de la planta a nivel celular y subcelular se cuantificaron las enzimas CAT, peroxidasa, POD y ascorbato peroxidasa. De igual manera se midió prolina usando las referencias anteriormente mencionadas en el apartado 5.2.1, 5.2.2 y 5.2.3.

#### 5.4 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el análisis de varianza (ANOVA) mediante el uso de software JMP. La media de los tratamientos fue analizada utilizando Turkey, HSD. Para la comparación de las medias se consideró un valor de alfa dependiendo del tipo de error asumido, es decir, error tipo A o error tipo B (Cochran yCox 1990).

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados presentados a continuación fueron obtenidos de la experimentación de las NP de ZnO así como de las NPs de TiO<sub>2</sub>, las cuales se probaron como posibles antivirales de forma paralela durante la realización de esta tesis. Por lo cual se detallarán los resultados obtenidos como posibles antivirales de las dos NPs contra el virus PHYVV.

6.1 Evaluación del efecto de la aplicación foliar de nanopartículas (NP) de ZnO y NPs de TiO<sub>2</sub> en el comportamiento de variables asociadas a la enfermedad y su efecto en el rendimiento en chile jalapeño.

### 6.1.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) fueron examinadas mediante SEM para determinar el tipo de morfología, estructura y tamaño. La morfología de las NP de ZnO fue de wurtzita y se ilustra en la Figura 2 (a, b). Se observó que el nanomaterial es consistente con aglomeraciones irregulares con formación de estrellas o flores y que la NPs de ZnO de forma individual tienen una forma de wurtzita. El tipo de NPs se confirmó mediante XRD (Figura 2c) por ángulos bajos utilizando los ángulos de referencia del material informados por Kumar et al. (2013). Asimismo, se obtuvo el tamaño de las NP de ZnO, las cuales tienen un tamaño largo de 33,44 nm a 148,229 nm y un tamaño ancho de 13,907 nm a 15,662 nm. Lo cual confirma que es un nanomaterial.



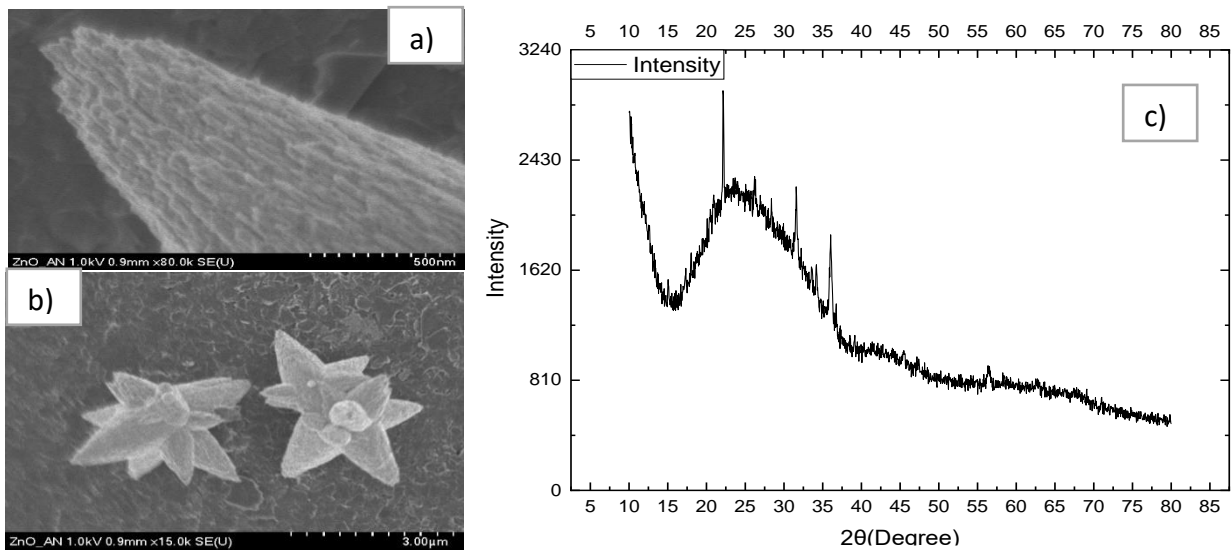


Figura 2. Imagen SEM de las nanopartículas de ZnO: a) Forma de los aglomerados de NP de ZnO, b) Estructura y forma de las NP de ZnO individuales y, c) patrón XRD de las NP de ZnO preparadas

De igual manera, las NPs de  $\text{TiO}_2$  fueron examinadas mediante SEM y XRD. El análisis demostró que estas NPs tienen una forma esférica con un tamaño promedio individual de aproximadamente 11 nm a 15 nm (Fig. 3). Por otro lado, las NPs formaron aglomerados de grupos irregulares, las cuales tienen un tamaño de aproximadamente 0,6 micrones, formando vacíos intersticiales (Fig. 3a, b).

Por otro lado, el análisis del XRD permitió determinar la fase cristalina correspondiente a las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  preparadas (Fig. 3c). Se identificó una combinación de polimorfos de la fase anatasa, con una menor fase de brookita. El análisis mediante el método de Rietveld con el software GSAS-II, determinó que el porcentaje en peso de los polimorfos correspondió al 91% para anatasa y 9% para la brookita, con tamaños de cristal promedio de 11,6 nm y 13,5 nm, respectivamente.

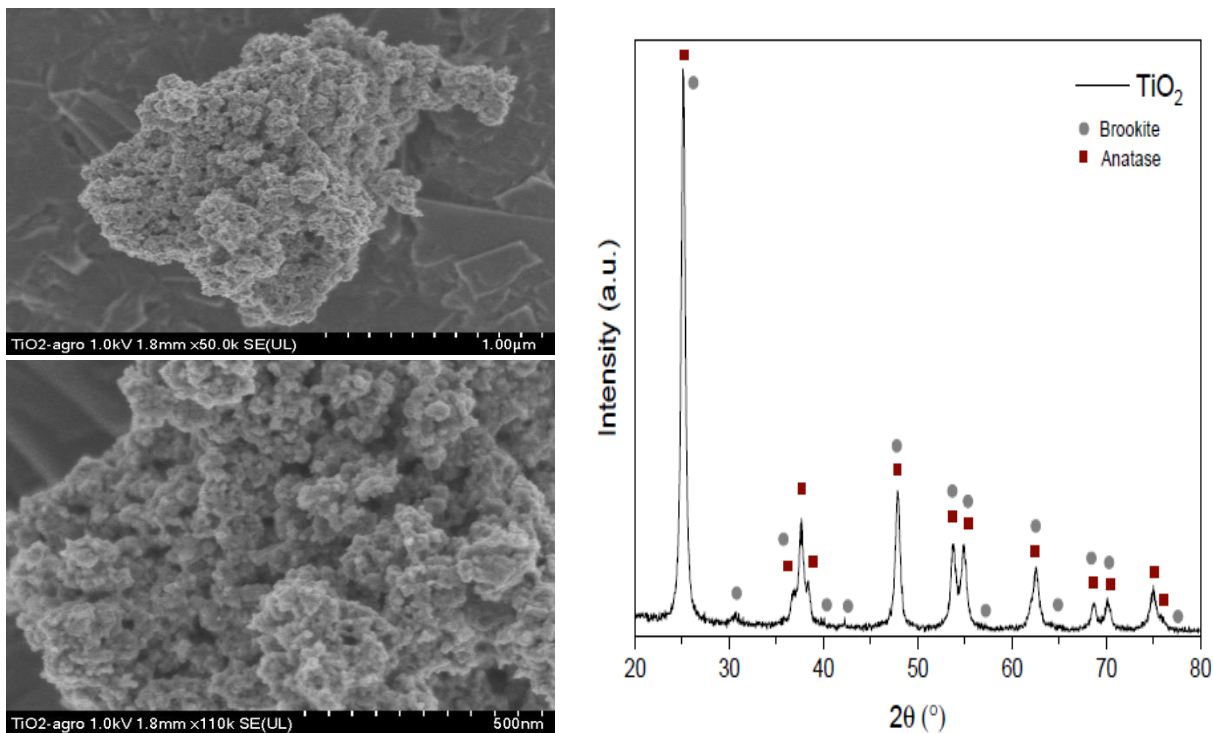


Figura 3. Imagen SEM de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>: a) Forma de los aglomerados de NP de TiO<sub>2</sub>, b) Estructura y forma de las NP de TiO<sub>2</sub> individuales y, c) patrón XRD de las NP de TiO<sub>2</sub> preparadas

Los resultados obtenidos demuestran que ambas NPs cumple con los tamaños necesarios para ser considerados un nanomaterial. Debido a sus propiedades únicas, como su pequeño tamaño, forma y estructura (Joshi et al., 2019), los nanomateriales han sido utilizados contra diversos patógenos como los virus (Kumaraswamy et al., 2019; Vargas-Hernandez et al., 2020). Esto es de suma importancia, ya que entre más pequeñas son las NPs, las células no las reconocen como cuerpos extraños facilitando su entrada a través de los poros de la membrana (Salatín et al., 2015).

El tamaño pequeño de las NPs facilita la difusión en las células, que a su vez es afectada por translocación y distribución en las plantas (Hu et al., 2020). En las plantas, el tamaño celular afecta no sólo a la biodistribución sino también a la cinética de liberación y absorción celular (Lee y Jun, 2019). La absorción de NP puede activarse mediante varios sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos

(Rico et al., 2015). Un efecto similar ocurre con la forma de las NPs, ya que se ha demostrado que afecta la penetración celular, el tiempo de circulación, la biodistribución y el tiempo que puede permanecer en las células (Lee y Jun, 2019).

### 6.1.2 Evaluación de la severidad de la enfermedad.

En este estudio se observó una reducción significativa de los síntomas. Los resultados sugieren con una confiabilidad de un  $\alpha=0.0007$  que las NPs de ZnO reducen los síntomas provocados por PHYVV (Fig.4). Así mismo, los mejores tratamientos fueron 100 mM y 150 mM de NPs de ZnO, siendo el mejor tratamiento 100 mM, basado en que no existió diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos.

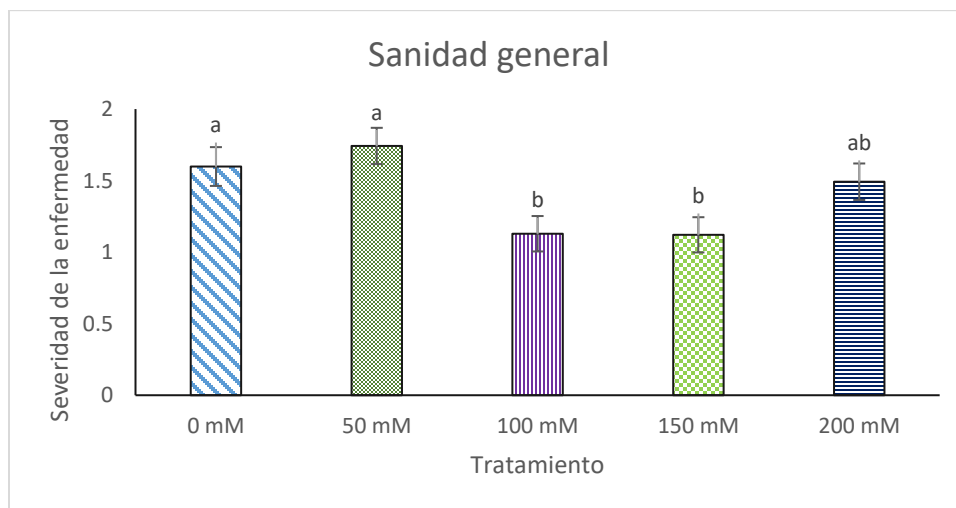


Figura 4. Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la severidad de la enfermedad de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito en general. Distintas letras son estadísticamente significativas ( $\alpha=0.0007$ ), Tukey (n=15 por tratamiento).

Sin embargo, asumiendo el error tipo B, ergo las medias son todas diferentes, encontramos que a un  $\alpha = 0.18$  que el tiempo de la aplicación de ZnO NPs tiene un efecto en la disminución de los síntomas de la enfermedad (Cuadro 3). Por lo cual, se puede asumir que en el 82% de los casos la oportunidad de aplicación influye en la sanidad del chile jalapeño.

El efecto del genotipo como una variable independiente también fue estudiado. Los resultados demuestran con un  $\alpha$  de 0.77 que el genotipo no tiene efecto en la severidad de la enfermedad incluso asumiendo un error tipo B. Si bien, con respecto al tiempo de aplicación según el genotipo, se pudo observar que el efecto de inmunización de PHYVV en la disminución de los síntomas difiere según el tiempo de aplicación como se muestra en el Cuadro 3. En la interacción del genotipo y tiempo de aplicación cv. Don Benito con un  $\alpha$  de 0.0430, en el caso de cv. Don Pancho el  $\alpha$  fue 0.0066 asumiendo un error tipo A fueron significativamente estadísticamente para ambos casos (Fig.5).

Cuadro 3. Efecto sobre la varianza de la variable independiente tiempo de aplicación de las NPs de ZnO sobre la infección viral en Chile Jalapeño, así como la interacción de cada cv. con el tiempo de aplicaciones, el tiempo de interacción de las aplicaciones con cada CV y la interacción de los dos cultivares con el tiempo de aplicaciones.

<b>Variable</b>	<b>Mejor tratamiento</b>	<b>Valor de <math>\alpha</math></b>
<b>Tiempo de aplicación</b>	Tratamiento PRE	0.1802
<b>Genotipo</b>	NS	0.7700
<b>Interacción entre cv. Don Benito y el tiempo de aplicación</b>	POS cv. Don Benito	0.0430
<b>Interacción entre cv. Don Pancho y el tiempo de aplicación</b>	PRE cv. Don Pancho	0.0066
<b>Interacción entre PRE y el genotipo</b>	PRE cv. Don Pancho	0.0062
<b>Interacción entre POST y el genotipo</b>	POS cv. Don Benito	0.0043
<b>Interacción genotipo y tiempo de aplicación</b>	PRE cv. Don Pancho	0.0010

NS: No significancia estadística

La interacción entre genotipo y tiempo de aplicación, el mayor efecto de inmunización fue antes de la inoculación en el caso cv. Don Benito, es decir una aplicación preventiva mientras que en cv. Don Pancho fue después de la inoculación, es decir de forma curativa (Fig. 5a). En este contexto, el tiempo de aplicación puede estar induciendo una respuesta en el sistema de inmune de la planta dependiendo de la variedad.

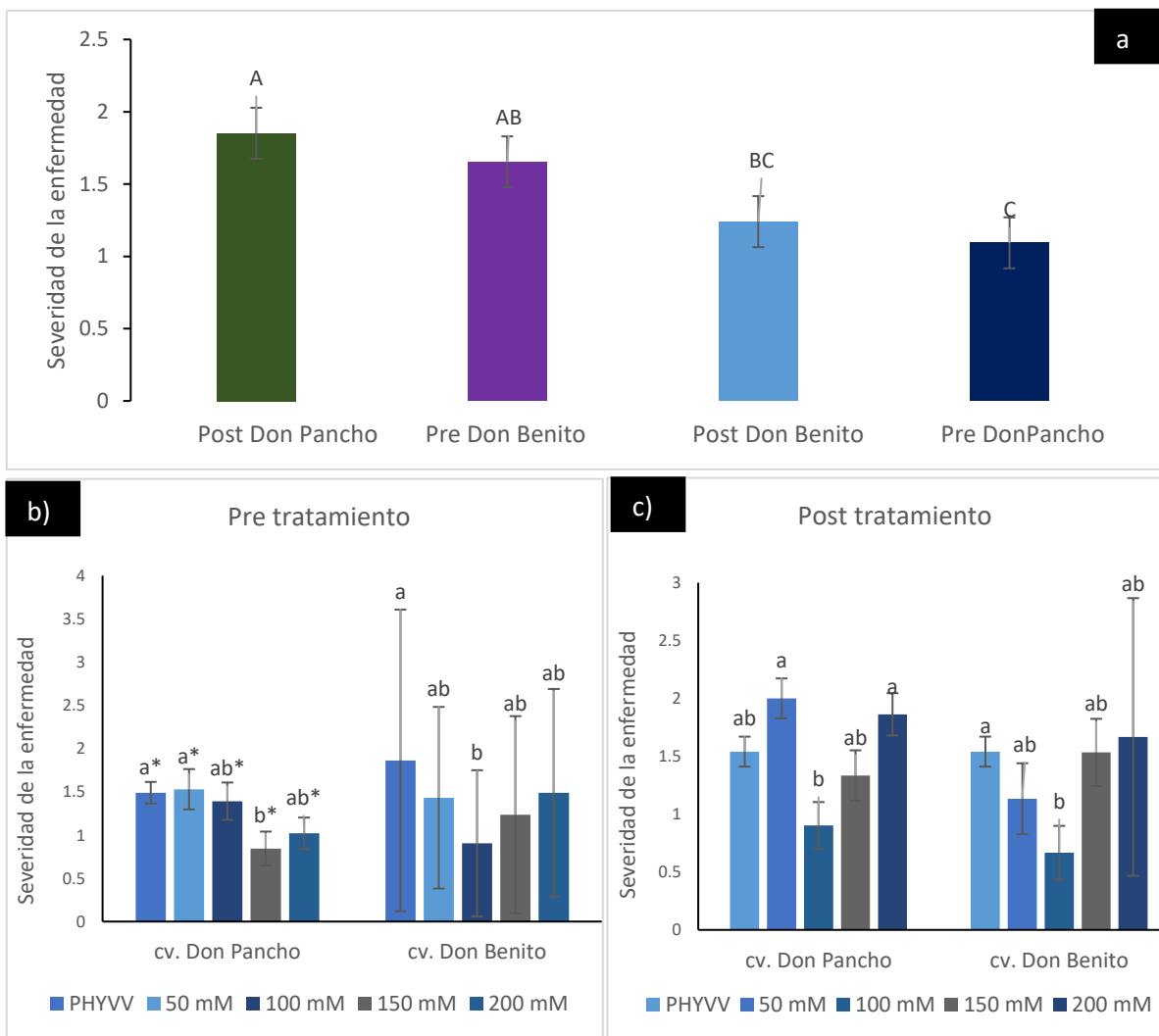


Figura 5. Efecto sobre la severidad de la enfermedad causada por el virus PHYVV en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho y cv Don Benito: tratamientos con ZnO NPs: a) Efecto en la severidad de la enfermedad en función del tiempo de aplicación según el cultivar, b) Efecto sobre los síntomas causados por el virus PHYVV en cv Don Pancho y cv. Don Benito como aplicación preventiva (\* indique un  $\alpha = 0.1$  suponiendo un error tipo B), c) Efecto sobre los síntomas provocados por el virus PHYVV en cv Don Pancho y cv. Don Benito como aplicación curativa. El número de plantas por tratamiento fue  $n = 15$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas frente a los tratamientos utilizando la prueba de Tukey ( $\alpha \geq 0,05$ )

La reducción de los síntomas fue significativa estadísticamente dependiendo del tiempo de aplicación en cada cultivar particularmente (Figura 5). El cv. Don Benito el efecto fue significativo en la reducción como PRE con un  $\alpha$  de 0.0018 mientras que como POST el  $\alpha$  tuvo un valor de 0.0190, es decir, la disminución de los síntomas es mayor cuando se aplica antes de la infección. Sin embargo, en el caso de cv. Don Pancho la disminución de los síntomas fue significativa asumiendo un error tipo A como POST con un  $\alpha$  de 0.0006 mientras que como PRE el  $\alpha$  fue de

0.0082. Esto implica que puede haber una respuesta específica en el mecanismo de respuesta en la reducción de la severidad de PHYVV dependiendo del cultivar derivado de la aplicación de las NPs de ZnO.

Los resultados demuestran que las NPs de TiO<sub>2</sub> en todas las concentraciones aplicadas reducen la severidad de PHYVV con un  $\alpha$  menor de 0.0001. Como se muestra en la Fig. 6 el mejor tratamiento aplicado fue el de 100 mM.

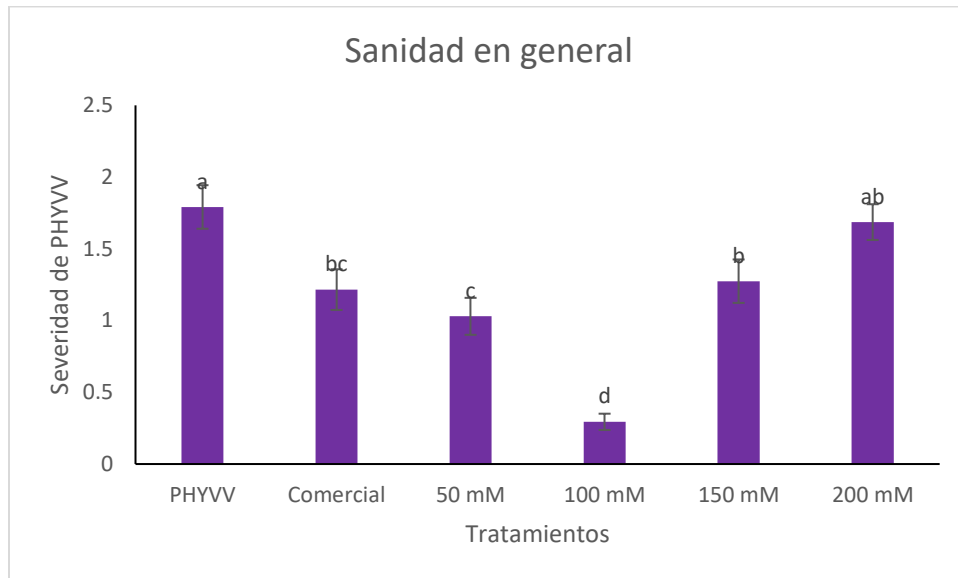


Figura 6. Efectos de las aplicaciones de TiO<sub>2</sub> NPs sobre la severidad de la enfermedad de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito en general. Distintas letras son estadísticamente significativas ( $\alpha=0.0001$ ), Tukey (n=15 por tratamiento).

Los resultados demuestran que el tiempo de la aplicación de las NPs de TiO<sub>2</sub> tiene un efecto en la disminución de los síntomas de la enfermedad (Cuadro 4). Por lo cual, se puede asumir con un  $\alpha$  menor de 0.0001 que la oportunidad de aplicación influye en la sanidad del chile jalapeño. Siendo la mejor oportunidad de aplicación POST.

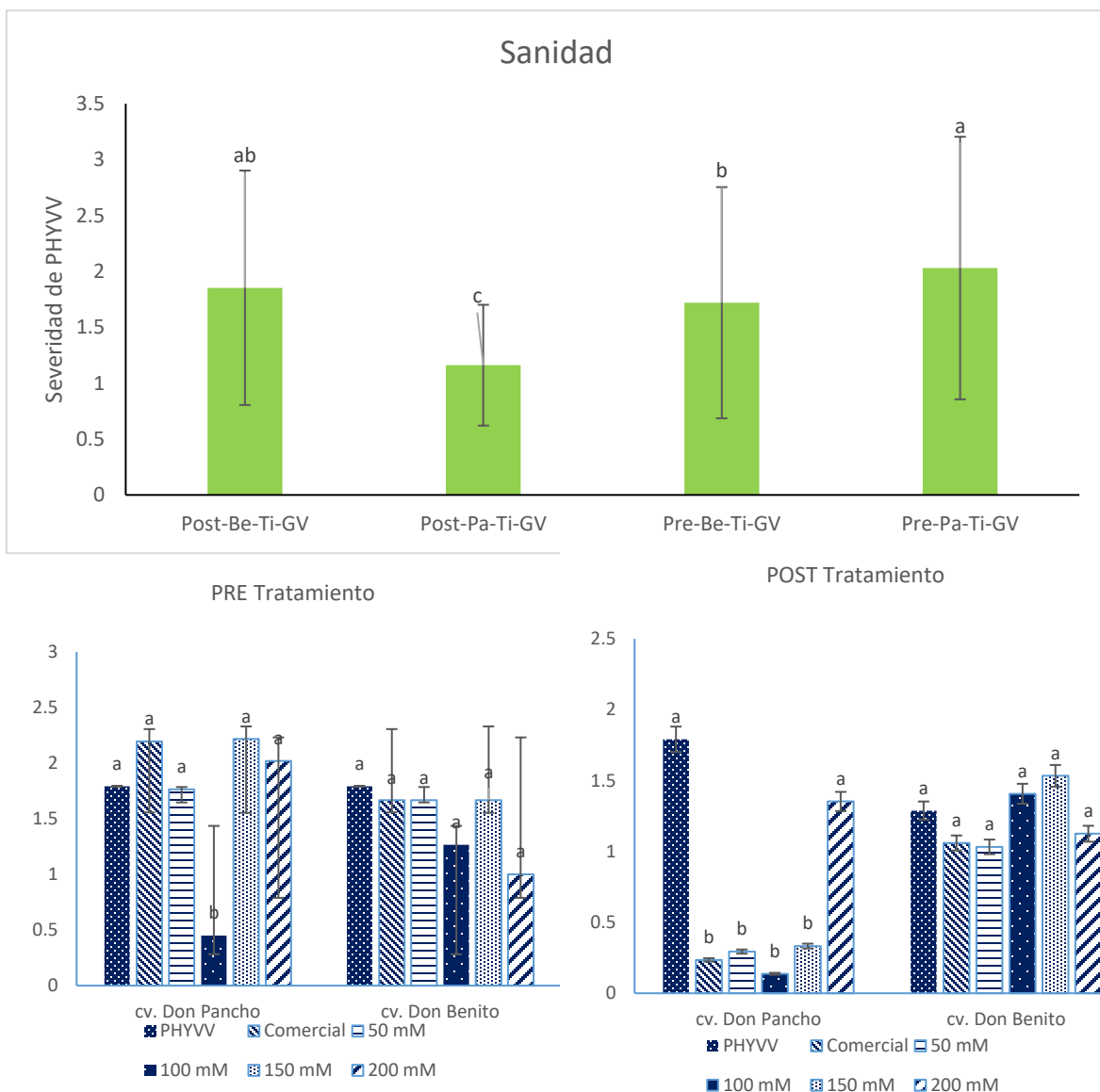
El efecto del genotipo como una variable independiente también fue estudiado. Los resultados demuestran con un  $\alpha$  de 0.0335 que el genotipo tiene efecto en la severidad de la enfermedad. Si bien, con respecto al tiempo de aplicación según el genotipo, se pudo observar que el efecto de inmunización de PHYVV en la disminución de los síntomas difiere según el tiempo de aplicación como se muestra en el Cuadro 4. La interacción del genotipo y tiempo de aplicación cv. Don Benito

presento un  $\alpha$  de 0.4343, por lo cual no se presenta diferencia ningún efecto, ni siquiera asumiendo un error tipo B. En el caso de cv. Don Pancho el  $\alpha$  fue 0.0001 asumiendo un error tipo A, lo cual indica que esta variedad el efecto es significativo (Fig.7).

*Cuadro 4.* Efecto sobre la varianza de la variable independiente tiempo de aplicación de las NPs de TiO<sub>2</sub> sobre la infección viral en Chile Jalapeño, así como la interacción de cada cv. con el tiempo de aplicaciones, el tiempo de interacción de las aplicaciones con cada CV y la interacción de los dos cultivares con el tiempo de aplicaciones.

<b>Variable</b>	<b>Mejor tratamiento</b>	<b>Valor de <math>\alpha</math></b>
<b>Tiempo de aplicación</b>	Tratamiento POST	0.0001
<b>Genotipo</b>	cv. Don Pancho	0.0335
<b>Interacción entre cv. Don Benito y el tiempo de aplicación</b>	NS	0.4343
<b>Interacción entre cv. Don Pancho y el tiempo de aplicación</b>	POST cv. Don Pancho	0.0001
<b>Interacción entre PRE y el genotipo</b>	PRE cv. Don Benito	0.0324
<b>Interacción entre POST y el genotipo</b>	POS cv. Don Pancho	0.0001
<b>Interacción genotipo y tiempo de aplicación</b>	POS cv. Don Pancho	0.0001

La interacción entre genotipo y tiempo de aplicación, el mayor efecto de inmunización fue despues de la inoculación en el caso cv. Don Pancho, es decir una aplicación curativa mientras que en cv. Don Benito fue antes de la inoculación, es decir de forma preventiva (Fig. 7a). En este contexto, el tiempo de aplicación puede estar induciendo una respuesta en el sistema de inmune de la planta dependiendo de la variedad.



**Figura 7.** Efecto sobre la severidad de la enfermedad causada por el virus PHYVV en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho y cv Don Benito: tratamientos con TiO<sub>2</sub> NPs: a) Efecto en la severidad de la enfermedad en función del tiempo de aplicación según el cultivar, b) Efecto sobre los síntomas causados por el virus PHYVV en cv Don Pancho y cv. Don Benito como aplicación preventiva c) Efecto sobre los síntomas provocados por el virus PHYVV en cv Don Pancho y cv. Don Benito como aplicación curativa. El número de plantas por tratamiento fue n = 15. Las barras de error representan la media ± errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas frente a los tratamientos utilizando la prueba de Tukey ( $\alpha \geq 0,05$ )

Esta reducción de síntomas se muestra en la Fig. 8, en donde se puede observar plantas con un desarrollo normal o superior en contraste al control positivo. En el caso particular del control PHYVV se observó una remisión de la enfermedad en todos los tratamientos con NPs, además de un desarrollo fisiológico superior al control positivo.





Figura 8. Efecto sobre los síntomas causados por virus PHYVV en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho y cv Don Benito: tratados con NPs de ZnO y NPs de TiO<sub>2</sub> a) Efecto sobre los síntomas causados por virus PHYVV en plantas con aplicación de NPs y sus controles en cv. Don Pancho b) efecto de la aplicación de las NPs de ZnO a 100 mM POST (T3) en chile jalapeño cv Don Pancho y el control PHYVV (GV) y c) efecto de la aplicación de las NPs de ZnO a 100 mM POST (T3) en chile jalapeño cv Don Benito y el control PHYVV (GV).

Los resultados previos con respecto a la severidad de la enfermedad demuestran que cada variedad responde de manera diferente a la aplicación de las NPs. Por lo cual la respuesta derivada de la aplicación de las NPs puede ser de forma directa o indirecta contra el virus provocada por la inducción de la resistencia sistémica ((Elsharkawy y Derbalah, 2019). En este contexto, la disminución de los síntomas puede estar relacionada por efectos directos de las NPs en la partícula viral,

mediante la inducción del mecanismo de defensa de la planta mediante la inducción de resistencias y/o la inmediata muerte o destrucción del virus (Cai et al., 2019).

### 6.1.6 Cuantificación viral

Derivado de la aplicación foliar de las NPs se presentó una disminución de la carga viral significativa estadísticamente en todos los tratamientos con NPs de ZnO comparado con el control PHYVV (Fig 79) con una confiabilidad de un  $\alpha$  de 0.0625, asumiendo un error tipo B. Es decir, se asume que hay un 94% de que los tratamientos de NPs de ZnO puedan reducir el inóculo viral.

Los resultados presentados en la Figura 9 demuestran que los tratamientos de 100 mM y 200 mM fueron significativos para ambas variedades de chile jalapeño.

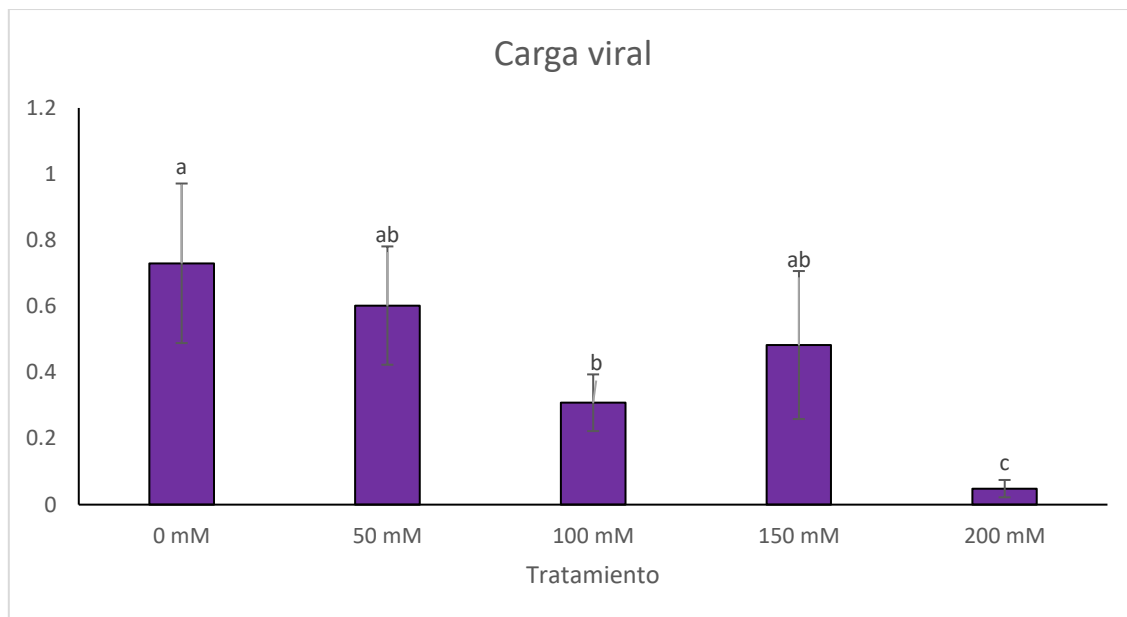


Figura 9. Efecto de la aplicación de NPs de ZnO en los niveles virales en general para ambos cultivares ( $\alpha=0.0625$ ).

Se determinó si el genotipo o el tiempo de aplicación podría afectar en el tiempo de infección o replicación del virus en la planta (Cuadro 5). Los resultados en el Cuadro 2 indican con un  $\alpha$  de 0.53, aun asumiendo un error tipo B que no hay diferencias entre el tiempo de aplicación, es decir PRE o POST. Sin embargo, el genotipo si

afecta la infección o replicación del virus con un  $\alpha$  de 0.0127 asumiendo el error tipo A. El análisis estadístico indica que la variedad afecta la acción como un posible antiviral de las NPs, lo cual podría sugerir que pueden actuar diferentes mecanismos de defensa contra el virus.

Cuadro 5. Efecto de la varianza en el tiempo de aplicación de las NP de ZnO de la variable independiente sobre la carga viral de la planta de Chile Jalapeño, la interacción de cada cultivar con el tiempo de aplicación, la interacción genotipo. y la interacción de los dos cultivares con el momento de las aplicaciones.

<b>Variable</b>	<b>Mejor tratamiento</b>	<b>Valor <math>\alpha</math></b>
Tiempo de aplicación	NS	<b>0.53420</b>
Cultivar	cv. Don Benito	<b>0.0127</b>
Interacción cv. Don Benito y tiempo de aplicación	POS cv. Don Benito	<b>0.0243</b>
Interacción cv. Don Pancho y tiempo de aplicación	NS	<b>0.8122</b>
Interacción PRE y cultivar	NS (cv. Don Benito)*	<b>0.3094</b>
Interacción POST y cultivar	POST cv. Don Benito	<b>0.0152</b>
Interacción genotipo y tiempo de aplicación	POST cv. Don Benito	<b>0.0519</b>

NS: No significancia estadística \*Indica una predominancia de la variedad de chile inferior al 80% utilizado en esta investigación.

El efecto de la interacción genotipo y tiempo de aplicación se puede observar en la Fig. 10. Los resultados sugieren que el tiempo de aplicación de las NPs de ZnO tienen diferentes efectos en la disminución de la carga viral. En el Cuadro 5 se observa que en el caso de la cv. Don Benito el mejor tiempo de aplicación es POST (después de la infección) con un  $\alpha$  de 0.0519. Por el contrario, cv. Don Pancho y el tiempo de aplicación no hubo diferencias estadísticas significativas ni asumiendo un error tipo B, con un  $\alpha$  de 0.8122.

Sin embargo, la interacción del cultivar con el virus si se ve afectado por el tiempo de aplicación en el título viral (Cuadro 6). En ambas variedades las diferencias de las medias indica que ambas variedades los valores de  $\alpha$  fueron significativos estadísticamente. En el caso de cv. Don Pancho PRE tuvo un valor de  $\alpha$  de 0.0082 y POST con un valor de  $\alpha$  de 0.0006. Para la variedad de Don Benito el valor de  $\alpha$  en PRE fue de 0.0018 y para POST fue de un valor de  $\alpha$  de 0.0190.

Cuadro 6. Valor del análisis de varianza de Fisher según los niveles virales. Tiempo de aplicación de las NP de ZnO, considerando la respuesta en carga viral en cada cultivar y tiempo de aplicación.

	<b>PRE Tratamiento (Valor <math>\alpha</math>)</b>	<b>POST Tratamiento (Valor <math>\alpha</math>)</b>
<b>Don Pancho</b>	0.0082	0.0006
<b>Don Benito</b>	0.0018	0.0190

Los resultados muestran que el tiempo de aplicación tiene un efecto entre la respuesta NPs-Virus-Planta. Esto se puede observar en el Cuadro 5 y en la Fig. 10 en donde se ve que cada variedad responde de manera significativa estadísticamente al tiempo de aplicación con una mayor respuesta a PRE o POST aplicación, asumiendo un error tipo A. En este contexto el cv. Don Pancho tiene un efecto mayor en la disminución de la carga viral cuando las NPs de ZnO se aplican POST. Mientras que para el cv. de Don Benito el efecto es predominante en PRE.

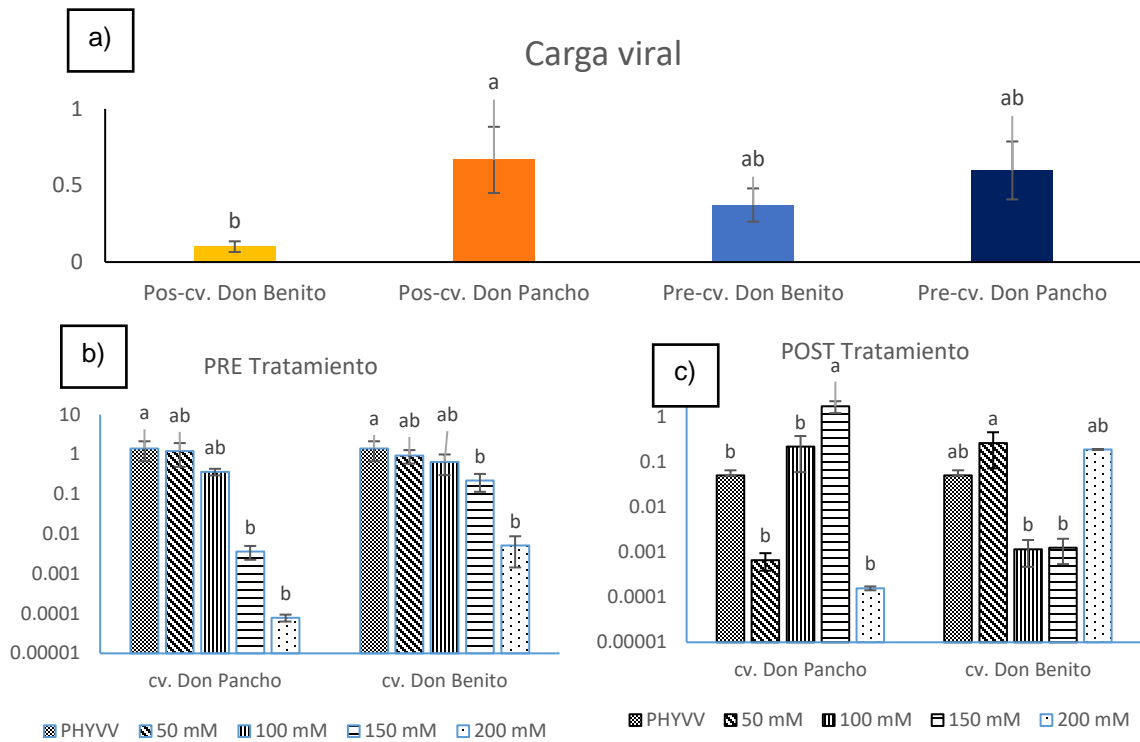


Figura 10. Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito con 55 días de edad. a) el tratamiento preventivo fue de NPs de ZnO 72 h antes de la infección y b) el tratamiento curativo fue de NPs de ZnO 72 h después de la infección. Las letras diferentes son estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), Tukey's ( $n = 10$  por tratamiento). c) Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento preventivo y d) Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento curativo. Distintas letras son estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), Tukey's ( $n = 4$  por tratamiento).

En la Fig. 10 se puede observar el efecto de la reducción del título viral en cada variedad. En el caso del cv. Don Benito la reducción de la carga viral fue mayor en comparación a el cv. Don Pancho. Lo cual puede estar implicado a las respuestas particular de la variedad a la aplicación de las NPs de ZnO. Por lo cual, sugiere que la posible acción viricida de las NPs puede estar ligadas a la respuesta de la planta a la exposición de las NPs.

Las respuestas derivadas de la aplicación de las NPs de ZnO como PRE para cv. Don Pancho y cv. Don Benito las mejores concentraciones fueron 150 y 200 mM (Fig 10b). Sin embargo, como POST aplicación la respuesta en la disminución del título viral fue diferente. Para el cv. Don Pancho los mejores tratamientos fueron 50 y 200 mM, mientras que para el cv. Don Benito fueron 100 y 150 mM (Fig 10c).

Los resultados demuestran que el tratamiento de 200 mM reduce significativamente la carga viral con un  $\alpha$  menor del 0.0001. Como se puede observar en la Fig. 11 los tratamientos de 50, 100 y 200 mM redujeron significativamente la carga viral en comparación a los controles PHYVV y comercial.

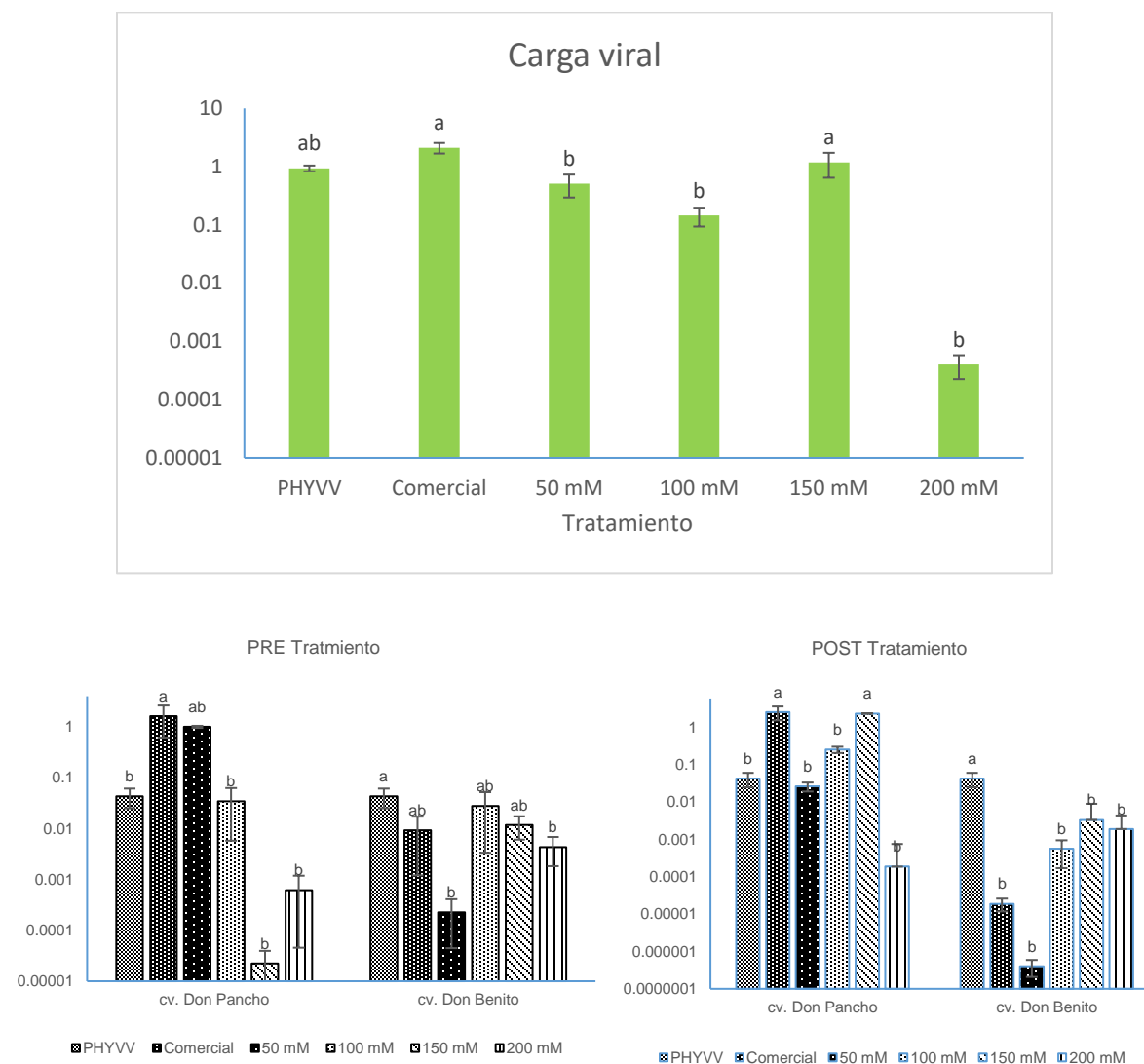


Figura 11. Efectos de las aplicaciones de  $\text{TiO}_2$  NPs sobre la multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito con 55 días de edad. a) el tratamiento preventivo fue de NPs de  $\text{TiO}_2$  72 h antes de la infección y b) el tratamiento curativo fue de NPs de  $\text{TiO}_2$  72 h después de la infección. Las letras diferentes son estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), Tukey's ( $n=10$  por tratamiento). c) Efectos de las aplicaciones de  $\text{TiO}_2$  NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento preventivo y d) Efectos de las aplicaciones de  $\text{TiO}_2$  NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Benito como tratamiento curativo. Distintas letras son estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), Tukey's ( $n=4$  por tratamiento).

Con respecto al tiempo de aplicación se puede observar en la Fig. 11, que cv. Don Benito tuvo una disminución mayor de la carga viral en POST mientras que cv. Don Pancho tuvo en PRE. Lo cual indicaría al igual que con las NPs de ZnO que el

mecanismo de defensa y la acción de la NPs como posible antiviral dependerá del mecanismo de acción que se active en respuesta NPs-Planta-Virus.

#### 6.1.7 Efectos de la aplicación de ZnO NPs en la movilidad del PHYVV.

El efecto de la movilidad se analizó mediante la cuantificación de la carga viral en las hojas apicales y medias para determinar si se podría afectar por la aplicación foliar de las NPs de ZnO (Cuadro 7). Los resultados muestran que la movilidad del virus se ve influenciada por los tratamientos de NPs con una confiabilidad de un  $\alpha$  de 0.0056.

Cuadro 7. Valor del análisis de varianza de Fisher según la movilidad de PHYVV. Tiempo de aplicación de las N.P. de ZnO,

<b>Variable</b>	<b>Mejor tratamiento</b>	<b>Valor de <math>\alpha</math></b>
Tiempo de aplicación	PRE tratamiento	0.0321
Concentración	100 mM	0.0056
Posición del virus	NS	0.5088
PRE-posición del virus	Hojas apical	0.1170
POST- posición del virus	N.S. (Hojas medias)*	0.6764

NS: No significancia estadística \*Indica una predominancia de la variedad de Chile inferior al 80% utilizado en esta investigación

La movilidad y la carga viral se midieron solo en el cv. Don Pancho debido a la facilidad visual de la expresión de los síntomas. Los resultados muestran que en las hojas apicales como en las hojas medias hubo una limitación de la movilidad de la parte media a la zona apical de la planta. En la Fig. 12 se muestra que el mejor tratamiento en general en la disminución de la carga viral y la limitación de la movilidad es el de 100 mM, siendo la misma concentración la mejor para la reducción de síntomas y la carga viral.

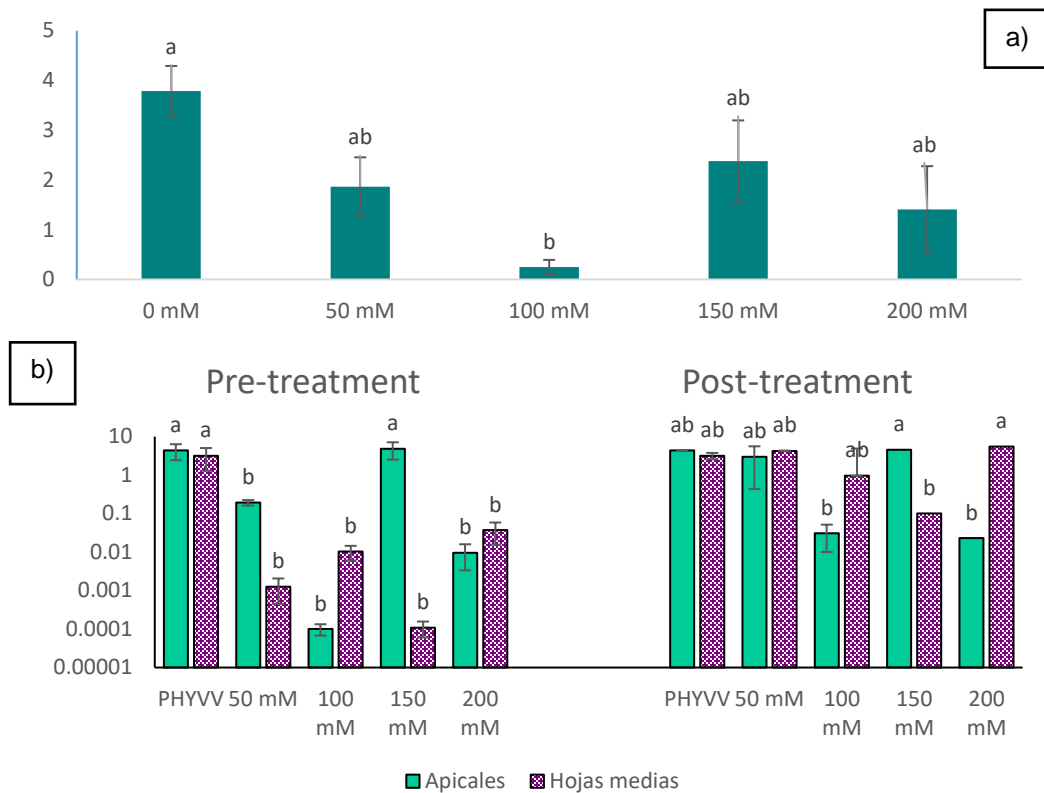


Figura 12. Efectos de las aplicaciones de NPs de ZnO sobre la movilidad de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento preventivo y tratamiento correctivo. a) la respuesta general de las aplicaciones de NPs de ZnO en el cv. Don Pancho en general, b) Efectos de las aplicaciones de ZnO NPs sobre la movilidad y multiplicación de PHYVV en plantas de chile jalapeño cv. Don Pancho como tratamiento preventivo y como tratamiento correctivo Letras diferentes son significativas estadísticamente ( $P < 0.05$ ), Tukey ( $n = 4$  por tratamiento).

Como se puede observar en la Fig. 12b que el tiempo de aplicación influyó en la carga viral, así como la restricción de la movilidad. En la aplicación PRE y POST, los mejores tratamientos fueron 100 y 200 mM, es decir, aquellos que tuvieron menos carga viral en la zona apical comparado con la zona media. Sin embargo, el efecto de se muestra de forma más significativamente como PRE a una concentración de 100 mM con un  $\alpha$  de 0.1170, asumiendo un error tipo B. Lo cual indica que hay una posibilidad de 88% de casos donde la aplicación PRE a 100 mM de NPs de ZnO afecte la movilidad del virus.



### 6.1.8 Efectos de la aplicación de ZnO NPs en el crecimiento y rendimiento de las plantas.

La aplicación de ZnO NPs mostró efectos positivos en los parámetros de crecimiento y rendimiento de las plantas infectadas con PHYVV en el cv. Don Pancho (Fig. 13). La aspersion foliar a una concentración de 100 mM de ZnO NPs como tratamiento curativo (POST) demostró una disminución de los síntomas que se puede observar en Fig. 13 en ambos cultivares. Además, el tratamiento con las NPs en las plantas infectadas con PHYVV aumentó la altura y el diámetro de las plantas en comparación con las plantas sanas, lo que puede ser un efecto bioestimulante derivado de la aplicación de las NP de ZnO.

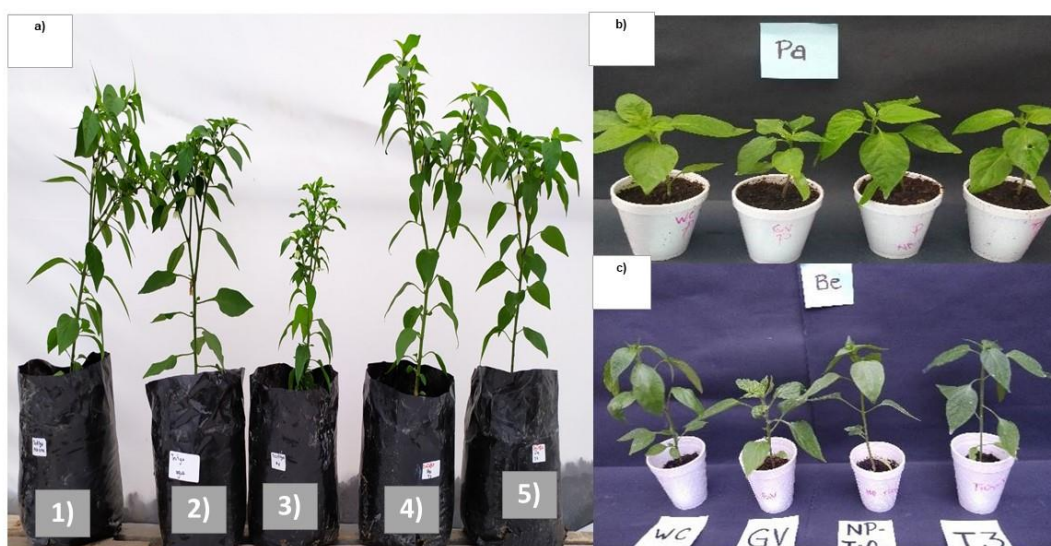


Figura 13. Efecto de los tratamientos con NPs de ZnO en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho: a) Experimentos en maceta después de 12 semanas: 1) NPs de ZnO, 2) WC-P, 3) PHYVV,(GV) 4) T3-curativo(100 Mm) y 5) preventivo de T4 (150 mM); b) efectos sobre tratamientos con ZnO NPs y testigos en plántulas de chile jalapeño cv Don Pancho; c) efectos sobre tratamientos con NPs de ZnO y testigos en plántulas de chile jalapeño cv Don Benito; d) efecto de la aplicación foliar con 100 mM de ZnO NPs sobre los síntomas de PHYVV en plántulas de chile jalapeño cv Don Pancho y e) efecto de la aplicación foliar con 100 mM de ZnO NPs sobre los síntomas de PHYVV en plántulas de chile jalapeño cv Don Benito.

Los datos mostraron una mejora en altura, diámetro de tallo, número de hojas, botones florales, número de flores, número de frutos, peso de frutos, altura de frutos y diámetro de frutos con respecto al testigo PHYVV (Cuadro 8). Así mismo, las plantas infectadas con el virus tratadas con las NPs de ZnO mostraron un aumentó

el número de hojas, botones florales y flores con respecto a los controles WC, ZnO NP y PHYVV.

Cuadro 8. Efecto sobre variables fisiológicas y morfológicas de los tratamientos con nanopartículas de ZnO en chile jalapeño cv. Don Pancho.

Dosis	Altura (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Núm. De hojas	Núm de botones florales	Núm de flores	Núm. De frutos	Peso por unidad (gr)	Largo fruto (mm)	Diámetro fruta (mm)
<b>0 mM</b>	41.90 98b	6.9059ab	137.142 8ab	47.9464ab	15.589 2a	8.4821b	10.8704c	52.8014c	20.4117b
<b>50 mM</b>	42.61 27ab	7.0883ab	138.821 4a	49.5357ab	17.196 4a	7.0535b	13.3415b	60.5281b	21.5563b
<b>100 mM</b>	46.02 35ab	7.1052ab	145.321 4a	46.0535abc	15.267 8a	10.6785 ab	10.6004c	48.4416c	21.7125b
<b>150 mM</b>	42.34 01b	6.7350ab	131.821 4ab	44.2678abc	14.892 8a	8.6964b	11.5661bc	54.1693b c	20.4274b
<b>200 mM</b>	44.09 6ab	6.9776ab	151.892 8a	51.0357a	16.625 a	8.2678b	10.296c	50.3537c	20.9956b
<b>WC</b>	52.96 25a	7.466a	137.362 3a	35.1888c	15.304 3a	16.2753 a	15.30 abc	85.00a	24.200ab
<b>ZnO NPs</b>	44.81 56ab	6.8044ab	125.767 8ab	40.2321abc	15a	8.1607b	20.20a	103.00a	24.00ab
<b>PHY VV</b>	39.66 17b	6.1078b	109.166 6b	37.9166bc	13.729 1a	7.5b	11.7891bc	48.2297c	23.233378 a

La aplicación de NPs de ZnO mejoró la altura, el diámetro y el número de hojas en chile jalapeño cv. Don Pancho en cuanto al control positivo, lo cual puede deberse a un efecto de la disminución de los síntomas y disminución del título viral. Además, las plantas de control de ZnO NPs mejoraron en las características fisiológicas y morfológicas en comparación con las plantas sanas, lo que indica un efecto promotor del crecimiento derivado de las aplicaciones foliares de NPs.

En la Fig. 14 se puede observar el efecto que tuvo en el desarrollo de los chiles jalapeños al ser tratados con NPs comparados con el control infectado con el virus. Esto implica que la aplicación de las NPs no solo disminuye la severidad de la enfermedad, sino que mejora la calidad del fruto en comparación a los frutos de las plantas sin tratar.

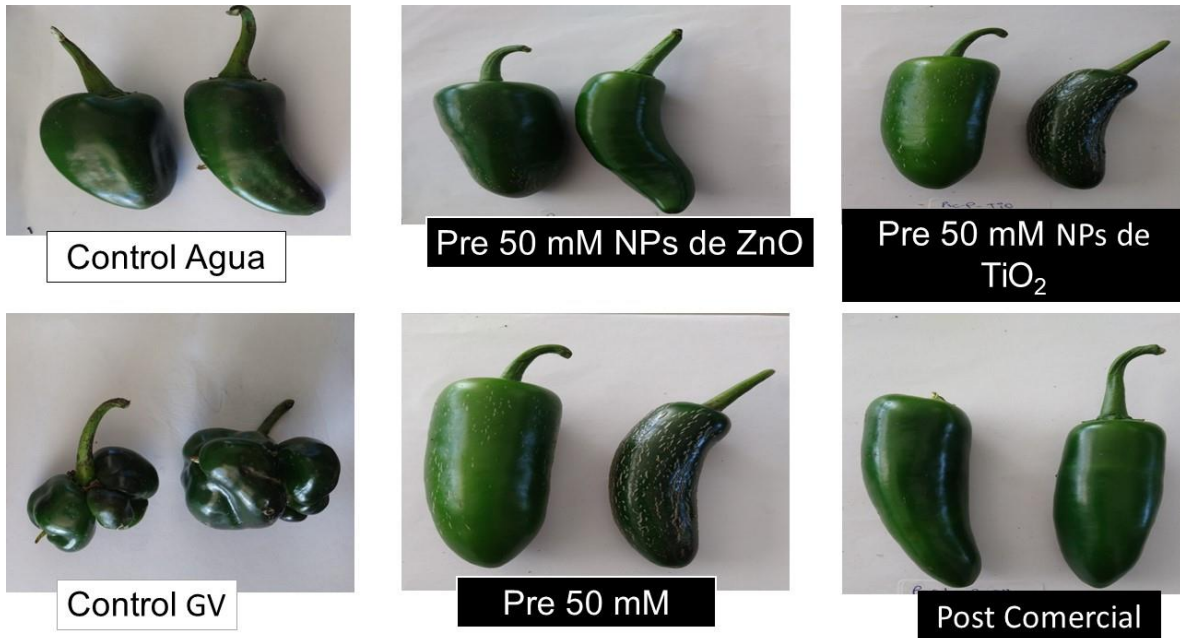


Figura 14. Efecto de la aplicación de Nps de ZnO Y TiO<sub>2</sub> en el desarrollo del fruto comparado con el control sano, control PHYVV y control comercial.

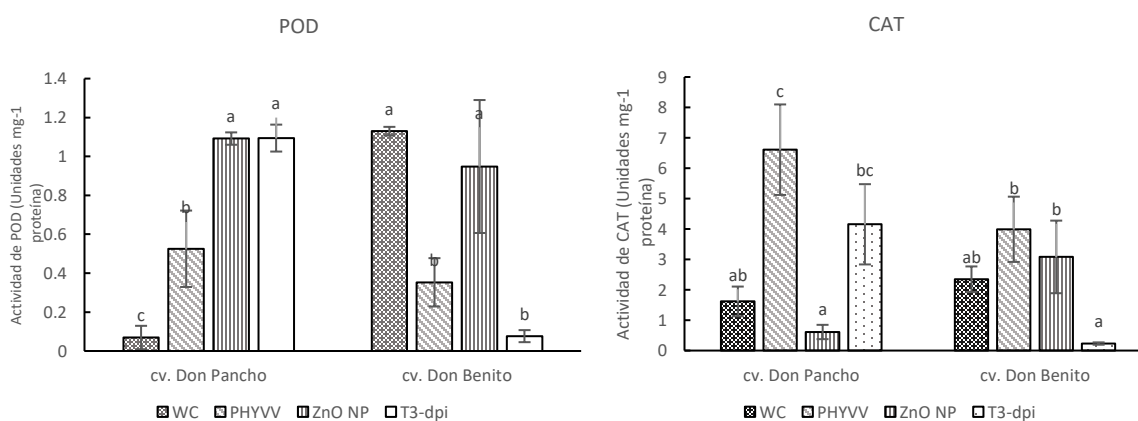
Se ha observado que la aplicación de NPs de óxidos metálicos aumentan los parámetros fisiológicos y morfológicos de la planta, así como la producción y la calidad (El-Sawy et al., 2017; Addelkhalek y Al-Askar, 2020). Los resultados demuestran que las NPs afectaron positivamente todas las variables fisiológicas y morfológicas asociadas con el rendimiento en el cv. Don Pancho en contraste con el control de PHYVV. Esto puede estar relacionado con el efecto derivado de las concentraciones adecuadas de NPs, las cuales tienen el potencial de promover el crecimiento de las plantas e inhibir las infecciones por patógenos (Jha et al., 2011).

## 6.2. Elucidar el mecanismo de acción de NP de ZnO en plantas de chile infectadas con PHYVV.

La elucidación de los mecanismos se realizó de acuerdo con el mejor tratamiento observado (plántula y maceta) en hojas de plantas de chile jalapeño 3 semanas después de la infección viral. En tratamiento de las plantas consistió en la aplicación foliar de nanopartículas de ZnO a una concentración de 100 mM como POST tratamiento efectivo después de la infección.

### 6.2.1 Actividad enzimática

Para determinar si las NP de ZnO podrían ser un elicitador para inducir la inmunidad de las plantas y la producción de metabolitos secundarios, se evaluó la actividad de SOD, CAT, POD, PAL y APX (Fig. 15). Se observó un aumento significativo en las actividades de la enzima POD después del tratamiento con control de ZnO NPs y el control 100 mM en contraste con el PHYVV por un aumento de 2.08 y 2.08 veces, respectivamente en cv. Don Pancho. Además, en el cv. Don Benito también se observó un aumento de las actividades enzimáticas de POD después del tratamiento con el control de ZnO NPs y el 100 mM en contraste con el GV en 2.75 y 0.25 veces, respectivamente. Además, la actividad de la enzima SOD se incrementó en los mismos tratamientos en 1.103 y 0.998 veces, respectivamente, en el cv. Don Pancho. en cv. Se observó que cv. Don Benito incremento la actividad de SOD con los mismos tratamientos en 1.52 y 1.38 veces, respectivamente. Si bien, en la actividad CAT se observó una disminución en comparación con los mismos controles de 0.1 y 0.61 veces en el cv. Don Pancho también en el cv Don Benito disminuyó 0.83 y 0.058, respectivamente. La mejora de la actividad de SOD y POD puede inferirse como una activación del sistema de defensa que ayuda a la planta a defenderse de la infección por virus.



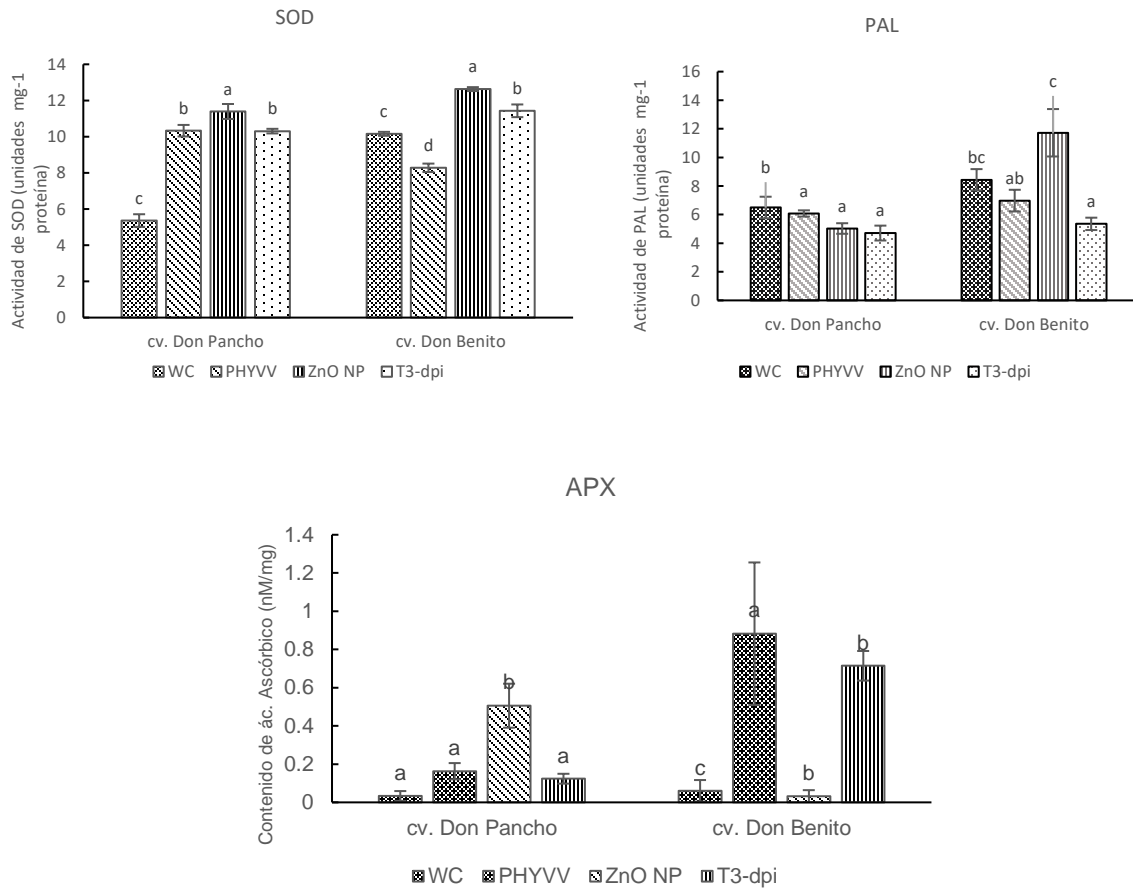


Figura 15. Actividad de POD, CAT, SOD, PAL y APX en respuesta al tratamiento con ZnO t3-dpi (100 mM) en plantas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito con infecciones de PHYVV y los controles. El número de plantas por tratamiento fue n = 18. Las barras de error representan la media  $\pm$  errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas frente a los tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Se observó que la actividad PAL en comparación con el control de NPs de ZnO y el tratamiento de 100 mM en contraste con el PHYVV disminuyó en 0.83 y 0.78, respectivamente en el cv. Don Pancho. Por otro lado, en el cv. Don Benito el control de NPs de ZnO aumentó en 1.66 veces, lo que indicó que una aplicación foliar de NPs en el cv Don Benito tiene un efecto elicitor que puede estar estimulando el metabolito secundario. Sin embargo, el tratamiento de 100 mM en cv. Don Benito disminuyó la actividad de PAL en 0.77 veces respectivamente al control GV. Un efecto similar se observó en la actividad de APX con un aumento de 3.10 veces y una disminución de 0.76 veces en el cv Don Pancho, pero en el cv Don Benito se produjo un aumento de la actividad de APX de 1.02 y 1.0019, respectivamente.

En las NPs de TiO<sub>2</sub> al igual que en las NPs de ZnO se analizó la actividad enzimática, con la finalidad de determinar si la aplicación de las NPs induce el sistema de resistencia de las plantas (Fig. 16). Así mismo, se evaluó si su aplicación pudiese inducir la producción de metabolitos secundario mediante la actividad de PAL.

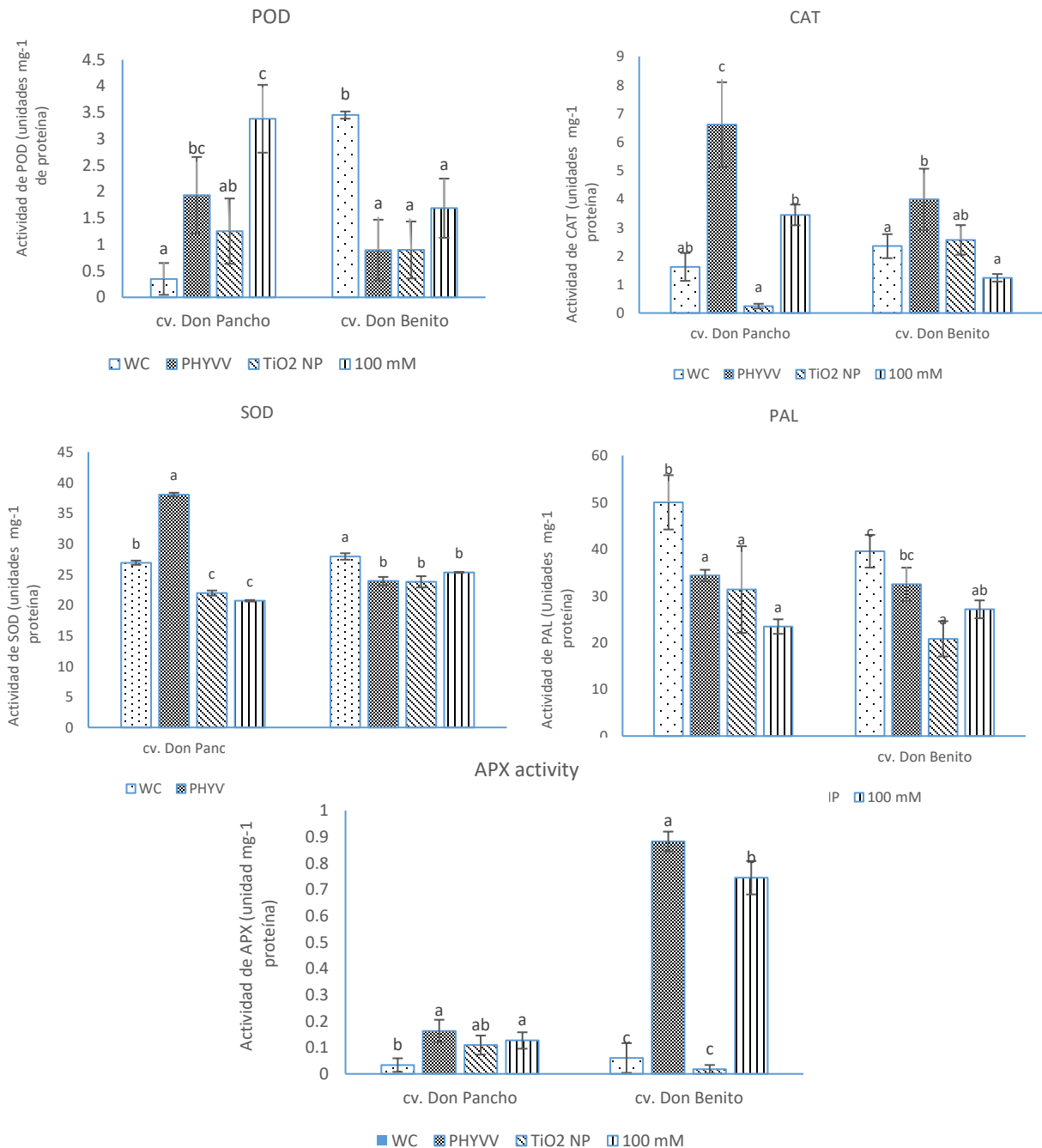


Figura 16. Actividad de POD, CAT, SOD, PAL y APX en respuesta al tratamiento con  $\text{TiO}_2$  de 100 mM en plantas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito con infecciones de PHYVV y los controles. El número de plantas por tratamiento fue  $n = 18$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas frente a los tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Los resultados sugieren que las enzimas responsables de la activación del sistema inmune de las plantas se activaron. La actividad de POD incremento en 1.75 veces en el tratamiento de 100 mM comparándolo con el positivo en cv. Don Pancho. El control con NPs también incremento POD en 3.61 veces en comparación con el control negativo. Por el contrario, en cv. Don Benito POD disminuyo 1.89 veces en las plantas tratados con 100 mM de NPs comparado con el control PHYVV. Esta disminución se presento en el control de NPs comparado con el control negativo en 3.85 veces.

La actividad de CAT en cv. Don Pancho disminuyo en 1.92 veces en plantas tratadas con NPs comparado con el control positivo. Así mismo el control de NPs disminuyo la actividad de CAT 6.68 veces comparado con el control negativo. La disminución de CAT también se presentó en la cv. Don Benito en 3.23 veces en plantas tratadas con NPs en comparación con PHYVV. Al comparar el control de NPs con el control negativo se presentó una disminución de CAT en 1.09 veces.

La actividad de SOD disminuyo en ambas variedades. En cv. Don Pancho disminuyó en 1.84 veces en las plantas tratadas con 100 mM en comparación al control positivo. Mientras que en el control de NPs comparado con el control negativo en 1.23 veces. En el caso de cv. Don Benito disminuyó en 1.06 veces en plantas tratadas con NPs en comparación con PHYVV. Así mismo, se presento una reducción de la actividad en 1.17 veces en comparación con el control negativo.

PAL disminuyó su actividad en 1.47 veces en las plantas tratadas con 100 mM comparadas con el control positivo en cv. Don Pancho. El control de NPs disminuyo de igual manera en 1.59 veces comparado con el control WC. Así mismo, cv. Don Benito disminuyo en 1.20 veces su actividad en plantas tratadas con las NPs comparado con el control PHYVV. Lo mismo ocurrió en el control de NPs comparado con el control WC, disminuyendo 1.90 veces, respectivamente.

La actividad de APX incremento en el control de NPs comparado con el control WC en 3.26 veces en cv. Don Pancho. En cv. Don Benito su actividad disminuyó en 1.18 veces en las plantas tratadas en comparación con el control PHYVV.

La aplicación de las NPs para la protección de las plantas contra virus puede ocurrir mediante una acción directa sobre la partícula viral, mejorando la defensa de la planta al inducir resistencia contra el virus (Elsharkawy & Derbalah, 2019). Uno de los mecanismos que activa la planta puede ser la inducción de resistencia adquirida sistemática (SAR) y el aumento de ROS aumentando la actividad antioxidante en la planta (Salam et al., 2022). La activación de resistencia contra el virus puede ser debido a la activación de enzimas de defensa y actividad antioxidante, donde la planta puede expresar resistencia inicial y superar diferentes etapas de la enfermedad (Ulhasan et al., 2023). Por lo cual, la activación o inactivación del estrés oxidativo dependerá de varios factores, entre ellos la especie vegetal (Hasanuzzaman et al., 2020), la edad y el tipo de tejidos (Vannini et al., 2013), la tolerancia o sensibilidad en las plantas y el tipo de estrés (Tassi et al., 2017).

Los resultados demostraron que este efecto inhibitor sobre PHYVV puede estar relacionado con activación de SOD, POD y CAT, ambas enzimas de defensa. Esto debido a una expresión inicial de resistencia contra el virus en ambas variedades de plantas de chile jalapeño. Adbelkhalek y Al-Askar (2020) reportaron efectos similares con el mismo tratamiento de 100 µg/mL de NPs de ZnO mediante aplicación foliar en plantas enfermas del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) en tomate (*Solanum Lycopersicum*), coincidiendo con nuestro mejor tratamiento en PRE y POST. La aplicación de NPs indujo SAR, disminuyó la gravedad de la enfermedad, redujo la carga viral de TMV, aumentando las variables de crecimiento y POD. Esta respuesta de la planta puede estar asociada al aumento de ROS debido al estrés, lo que limita la entrada y movilidad del patógeno, además de inducir respuestas locales y sistémicas de la planta (Cai et al., 2019).



## 6.2.2 Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada por DPPH y ABTS (Figura 17). La capacidad antioxidante de DPPH se vio disminuida en el cv. Don Pancho estuvo expuesto a las NPs de ZnO en plantas sanas e infectadas en 0.83 y 0.87 veces, respectivamente. Al contrario, en el cv. Don Benito donde aumentó en 1.031 y 1.085, respectivamente en contraste con PHYVV sin embargo no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, la capacidad antioxidante de ABTS de los extractos tratados con las NPs de ZnO se vio disminuida en el cv. Don Pancho y cv. Don Benito por 0.98, 0.99, 0.94 y 0.99 veces, respectivamente en contraste con PHYVV.

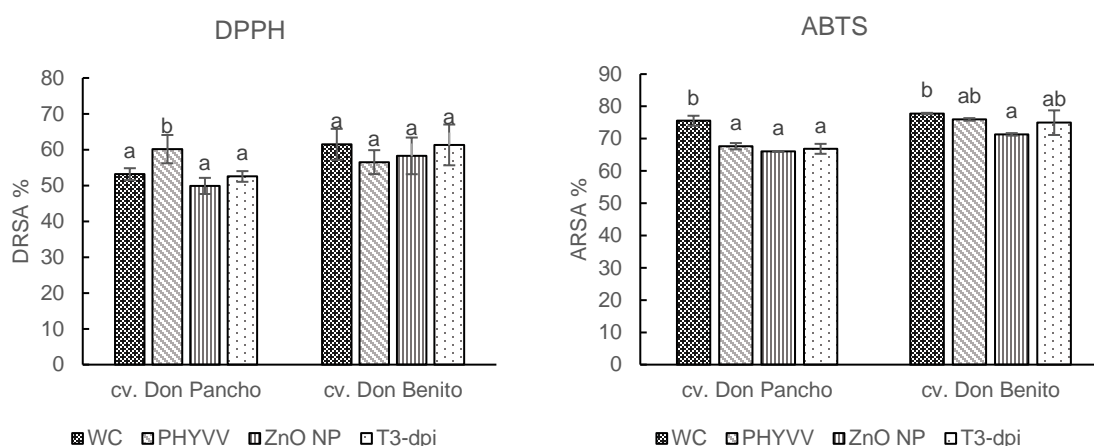


Figura 17. Actividad de ARSA y DRSA, en respuesta al tratamiento 100 mM de NPs ZnO en plantas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito infectadas con PHYVV y sus controles (planta sana, planta infectada y planta sana con la aplicación de 100 mM de NPs de ZnO).

La actividad antioxidante resultante de la aplicación de NPs de TiO<sub>2</sub> fue determinada por DPPH y ABTS (Figura 18). La capacidad antioxidante de DPPH disminuyó en el tratamiento de 100 mM con respecto al control positivo en 1.05 veces en cv. Don Pancho. Por el contrario, en control de NPs en comparación al control negativo incremento DPPH en 1.28 veces en esta variedad. Sin embargo, al comparar nuestro tratamiento con el control negativo se pudo observa un incremento en DPPH en 1.08 veces.

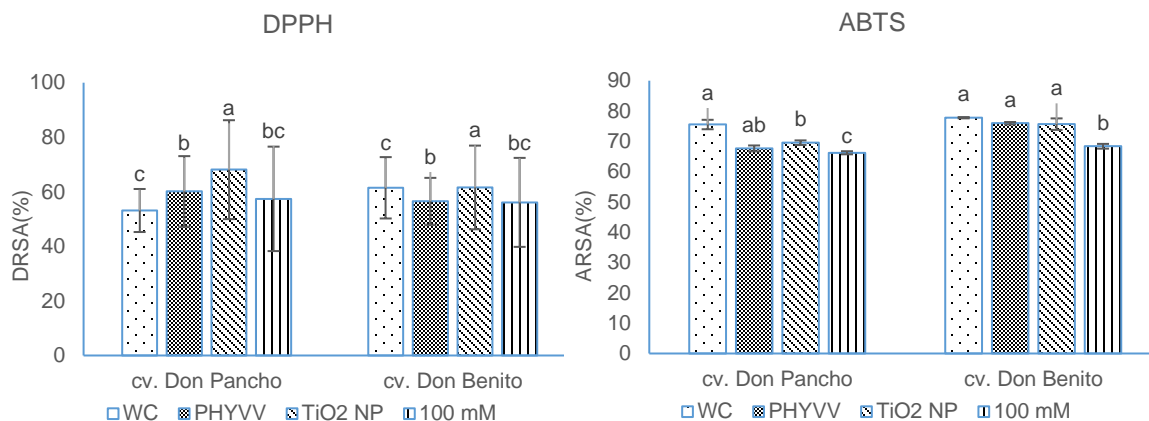


Figura 18. Actividad de ARSA y DRSA, en respuesta al tratamiento 100 mM de NPs de TiO<sub>2</sub> en plantas de jalapeño cv. Don Pancho y cv. Don Benito infectadas con PHYVV y sus controles (planta sana, planta infectada y planta sana con la aplicación de 100 mM de NPs de TiO<sub>2</sub>).

En el cv. Don Benito la capacidad de DPPH disminuyó en las plantas tratadas con 100 mM de NPs de TiO<sub>2</sub> en 1.01 veces en comparación al control positivo. Además, es comparación el control de NPs incremento la actividad de DPPH en contraste al control negativo en 1.02 veces.

La actividad de ABTS disminuyó en comparación del tratamiento de 100 mM de NPs contra el control positivo en 1.02 veces en cv. Don Pancho. Así mismo, el control con NPs comparado con el control negativo también disminuyó en 1.09 veces, respectivamente.

En el cv. Don Benito la capacidad de ABTS disminuyó en las plantas tratadas con NPs de TiO<sub>2</sub> a 100 mM en comparación con el control positivo en 1.11 veces. Sin embargo, en el control de NPs y el control negativo no hubo diferencias estadísticas significativas.

### 6.2.3 Actividad no enzimática

El contenido de prolina disminuyó significativamente en el cv. Don Pancho cuando estuvo expuesto a NPs de ZnO en plantas sanas e infectadas (Fig. 19) por 0.785 y 0.7801 veces en contraste con PHYVV. Por otro lado, en el cv. Don Benito, se

observó una disminución del contenido de prolina en el control de NPs de ZnO por 0.99 veces y, por el contrario, en el tratamiento 100 mM hubo un incremento de 1.046 veces en comparación con PHYVV. Una disminución en el contenido de Prolina puede estar relacionada con una disminución del título viral que está relacionado con un estrés abiótico derivado del virus PHYVV y puede estar relacionado con la no fitotoxicidad por parte de las NPS de ZnO. Además, el incremento puede estar asociado a una interacción NPs-Plantas.

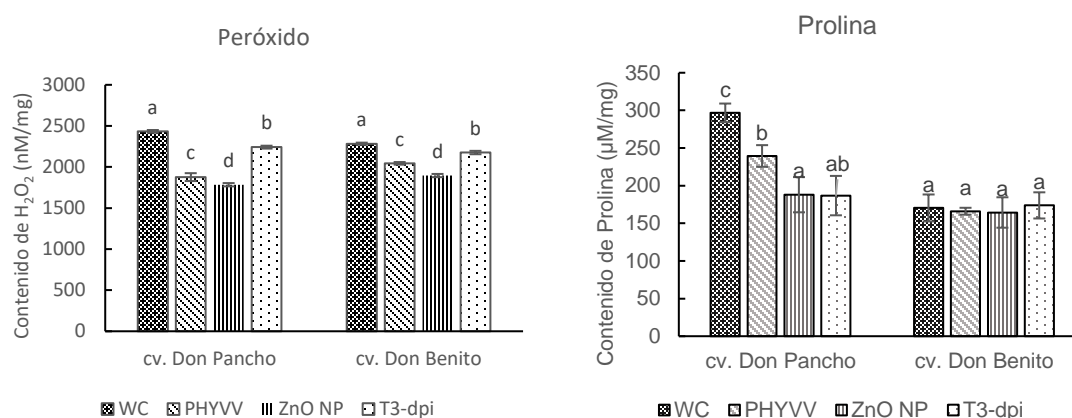


Figura 19. Actividad de Peróxido de hidrogeno y prolina en respuesta al tratamiento 100 mM de NPs ZnO en plantas de jalapeño cv. Don Pancho and cv. Don Benito infectadas con PHYVV y los controles (planta sana, planta infectada y planta sana con la aplicación de 100 mM de NPs de ZnO).

El contenido de peróxido de hidrógeno tiene una respuesta similar a la actividad de APX en el cv Don Pancho expuesto a NPs de ZnO en plantas sanas e infectadas con un aumento de 0.951 veces y una disminución de 1.195 veces, respectivamente. Sin embargo, en el cv Don Benito aumentó el contenido de peróxido de hidrógeno en 1.022 y 1.001 veces, respectivamente.

En la Figura 20 se puede observar el efecto de la aplicación de las NPs de TiO<sub>2</sub> a la concentración de 100 mM y su efecto en el contenido de peróxido y prolina. La aplicación foliar de las NPs de TiO<sub>2</sub> incrementaron el contenido de peróxido en comparación al control PHYVV en 1.10 veces mientras que el control NPs de TiO<sub>2</sub> disminuyo la cantidad de peróxido en comparación al control negativo por 1.88 veces en cv. Don Pancho.

Por otro lado, el contenido de peróxido disminuyó en las plantas tratadas con las NPs en comparación al control positivo en 1.16 veces en cv. Don Benito. Sin embargo, en el caso del control NPs de TiO<sub>2</sub> comparada con el control negativo no hubo diferencia estadísticamente significativa.

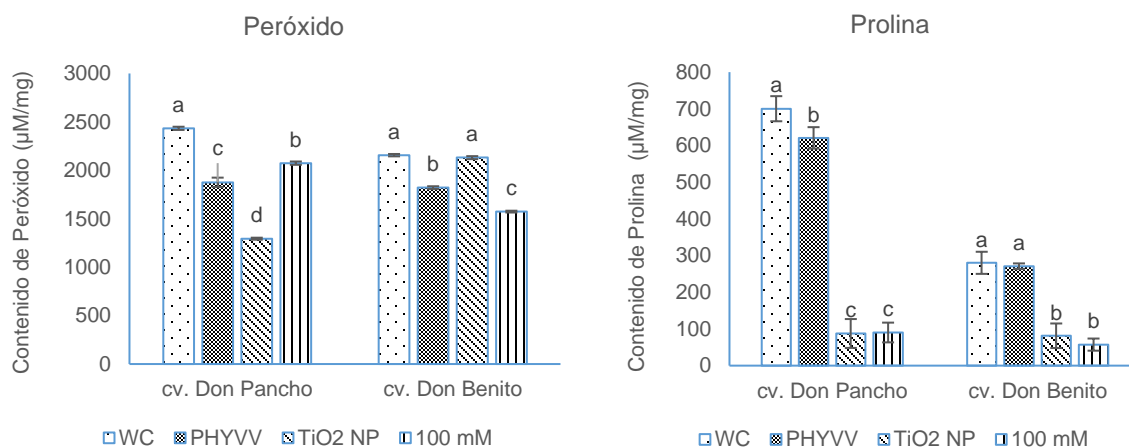


Figura 20. Actividad de Peróxido de hidrogeno y Prolina en respuesta al tratamiento 100 mM de NPs de TiO<sub>2</sub> en plantas de jalapeño cv. Don Pancho and cv. Don Benito infectadas con PHYVV y los controles (planta sana, planta infectada y planta sana con la aplicación de 100 mM de NPs de TiO<sub>2</sub>).

El contenido de prolina en cv. Don Pancho y cv. Don Benito disminuyó en comparación al control positivo en 6.88 y 4.73 veces, respectivamente. Por otro lado, el control NPs de TiO<sub>2</sub> en comparación con el control negativo disminuyó en ambas variedades en 7.99 y 3.44 veces, respectivamente.

#### 6.2.4 Acumulación de NPs en las hojas infectadas con PHYVV.

En este estudio, como se muestra en la Fig. 21, se confirmaron que las NPs de ZnO mantuvieron su morfología a nanoescala incluso después de la interacción con tejidos biológicos de la hoja de chile, según lo detectado a través de TEM. En la imagen se pueden ver muchas partículas negras, que en su mayoría estaban presentes en o alrededor de los cloroplastos en las hojas tratadas con NPs.

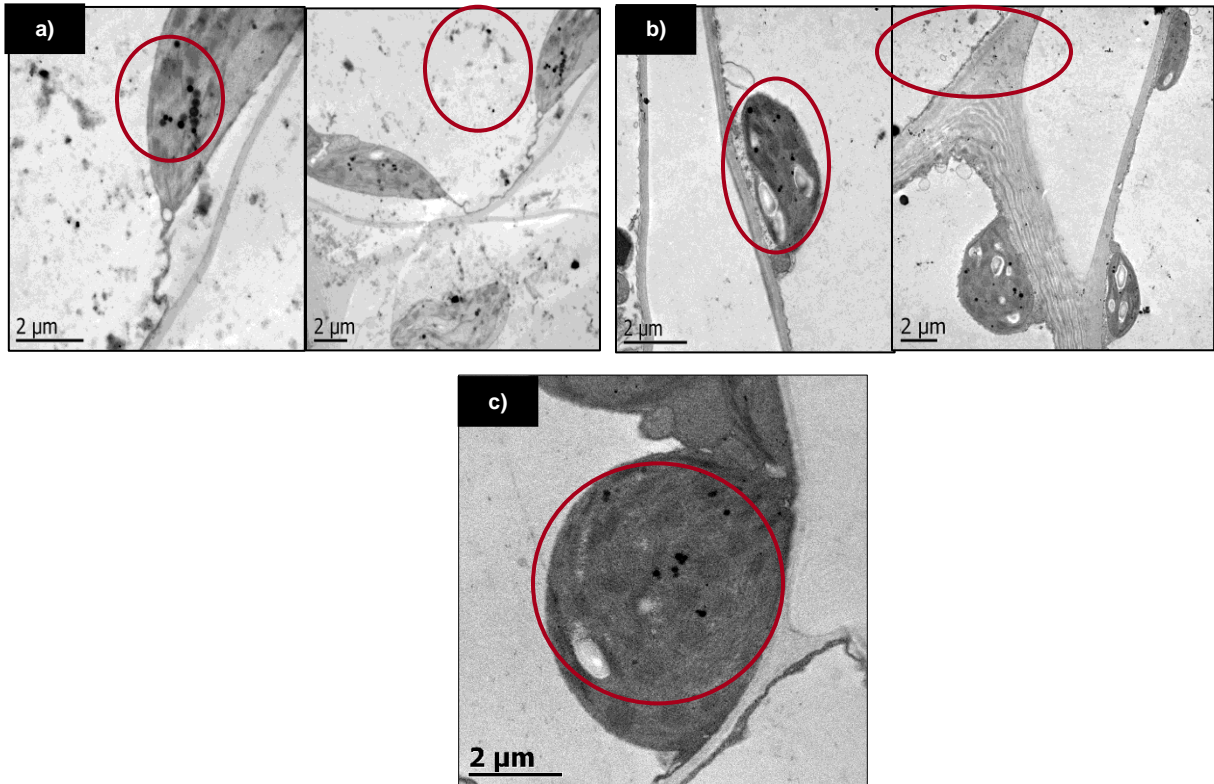


Figura 21. Absorción y distribución de la aplicación por aspersión foliar de NPs de ZnO en hojas de plantas de chile jalapeño infectadas con PHYVV: a) Células de hojas de plantas de chile cv. Don Pancho infectado con PHYVV tratado con 100 mM; b) Células de hojas de plantas de chile cv. Don Benito fue infectado con PHYVV y tratado con 100 mM y c) Células de cloroplasto sanas con NPs de ZnO.

En las hojas de chile de cv. Don Pancho y cv. Don Benito se puede observar la interacción de las NPs con el virus señaladas en el círculo rojo. Se puede observar la acumulación de NPs de ZnO sobre cloroplastos y NPs rodeadas por una expansión del virus PHYVV. Esto implica que las NP de ZnO son absorbidas y acumuladas en el tejido de la hoja, lo cual permite que la NPs y el virus PHYVV interactúan directamente con las células de la planta.

Para poder tener una referencia específica de cómo se podrían ver el PHYVV en una hoja se utilizó la imagen del virus PHYVV como referencia reportada por Rentería-Canett et al. (2011). Además, este tipo de actividad NP-virus en células de plantas ha sido reportada por otros autores (Cai et al., 2019; Srujana y Bhagat, 2022).

Este mismo fenómeno de adsorción y acumulación se puede observar de en la Fig. 22 la acumulación de NPs de  $\text{TiO}_2$  en el tejido celular de la hoja de chile jalapeño. como se puede observar en la Fig. 19a el cv. Don Pancho acumulo las NPs principalmente el cloroplasto y vacuolas formando cúmulos circulares. En los círculos rojo que indica la interacción NPs-virus. Estos resultados señalan la posibilidad de la interacción entre el virus y la NPs, así como NPs-Planta.

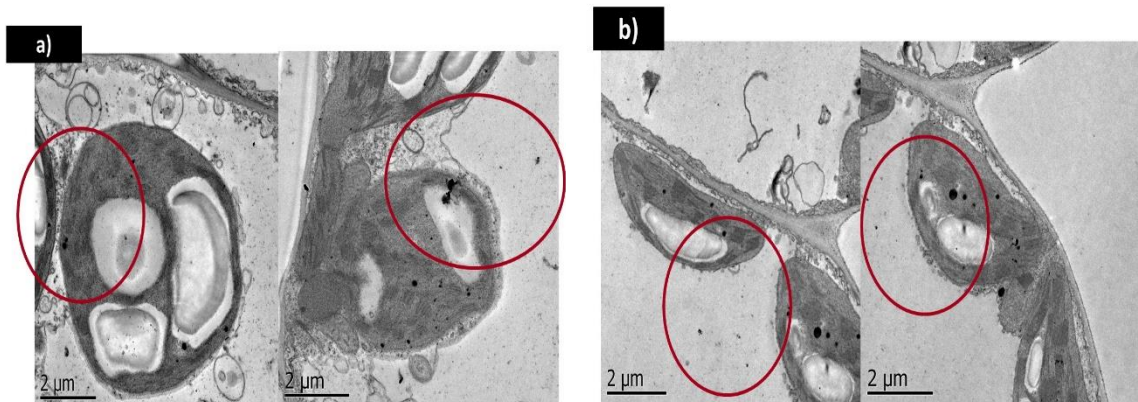


Figura 22. Absorción y distribución de la aplicación por aspersión foliar de NPs de  $\text{TiO}_2$  en hojas de plantas de chile jalapeño infectadas con PHYVV: a) Células de hojas de plantas de chile cv. Don Pancho infectado con PHYVV tratado con 100 mM; b) Células de hojas de plantas de chile cv. Don Benito fue infectado con PHYVV y tratado con 100 mM

Se ha reportado que la penetración de las NPs en las hojas puede ser exclusivamente a través de las estomas y distribuirse dentro de los espacios extracelulares esponjoso de aire del mesófilo sin penetrar ninguna pared celular (El Shetehy et al., 2021). Así mismo, el tamaño de las nanopartículas puede impedir su absorción en el citoplasma y su translocación de célula a célula a través de los plasmodesmos (Ma et al., 2018). En las imágenes 21 y 22 observamos que la penetración y distribución en las hojas de jalapeño en ambas variedades puede deberse a distribución en el mesófilo esponjoso pero también una absorción en el citoplasma a través de los plasmodesmos, por lo que esta observación puede ser una posibilidad de fitotoxicidad en caso de la dosis superior diferente a la propuesta en este estudio. Además, la distribución y acumulación de NPs en la hoja podría explicarse como un efecto antiviral, como un desencadenante en el sistema de defensa de la planta y la interacción directa con el virus.

### 6.2.5 Prueba de reactividad

La actividad antiviral directa de NPs de ZnO contra PHYVV se evaluó mezclando las NPs con PHYVV e inoculando la mezcla en plantas de chile jalapeño cv Don Pancho por biolística. La velocidad de invasión de PHYVV en las hojas inoculadas fue marcadamente suprimida por las NP de ZnO (Cuadro 9) en una disminución a las 48 h después de la inoculación. Sin embargo, el título viral aumentó a las 144 h, lo que puede implicar que la exposición directa puede ser insuficiente para destruir el virus por completo. La inhibición de la infección por PHYVV a una concentración específica de NPs de ZnO 100 mM reveló una actividad antiviral más fuerte. Sin embargo, esta inhibición puede estar relacionada con otros factores como el sistema de defensa de la planta, la exposición del extracto de ADN viral y el tiempo de exposición del virus y las NPs de ZnO.

Cuadro 9. Efecto antiviral después de una exposición directa de NPs de ZnO 100 mM y extracto de hojas de ADN del título viral

Tiempo (h)	Control PHYVV	NPs de ZnO (100 mM)
24	4.150989 ± 0.638314 a	1.077955 ± 0.525725 a
48	0.098024 ± 0.037545 b	0.0327 ± 0.027331 b
96	1.852235 ± 0.727208 ab	6.0605 <sup>-05</sup> ± 3.6179 <sup>-05</sup> b
144	2.893321 ± 1.970082 ab	0.031451 ± 0.024621 b
192	3.137482 ± 1.761897 ab	0.751266 ± 0.481252 ab

Distintas letras son estadísticamente significativas (P<0.05), Tukey's (n=7 por tratamiento).

Este efecto antiviral derivado de la aplicación directa de las NPs de ZnO contra el virus PHYVV muestra que los mecanismos implicados en la disminución de la carga viral pueden estar relacionado a una interacción NPs-Planta-Virus. Por lo tanto, también se puede relacionar con los posibles mecanismos implicados en el efecto antiviral contra el virus PHYVV.

Las NPs se evaluó la reactividad que presentas estas NPs al ser expuesta en contacto directo con el virus. Por ello, se expusieron las NPs a un extracto de ADN viral para ver su efecto directo NPs-Virus como posibles antivirales (Cuadro 10). En el caso particular de las NPs de TiO<sub>2</sub> se pudo observar un efecto contrario a las NPs de ZnO, sobre todo en el incremento del título viral a las 48 h en comparación. Sin embargo, en el caso particular de las NPs de TiO<sub>2</sub> se pudo observar que a partir

de las 98 h hubo una inhibición del inoculo que continuo en el tiempo en comparación al control PHYV.

Cuadro 10. Efecto antiviral después de una exposición directa de NPs de TiO<sub>2</sub> 100 mM y extracto de hojas de ADN del título

Time (h)	PHYVV control	TiO <sub>2</sub> NPs (100 mM)
24	4.150989 ± 0.638314 a	1.01186 ± 0.155594 b
48	0.098024 ± 0.037545 b	1.20021 ± 0.559118 a
96	1.852235 ± 0.727208 ab	1.15061 ± 0.632497 ab
144	2.893321 ± 1.970082 ab	0.16548 ± 0.035342 bc
192	3.137482 ± 1.761897 ab	0.00863 ± 0.004760 c

Distintas letras son estadísticamente significativas (P<0.05), Tukey's (n=7 por tratamiento).

Los resultados demuestran que el efecto de las NPs contra el virus depende no solo de la respuesta de la planta y el virus, sino que además del tipo de nanomaterial/nanopartículas. Lo cual implica que el mecanismo de acción de las nanopartículas como potenciales antivirales puede ser más complejo de lo planteado por diversos autores (Cai et al., 2019; Cai et al., 2020; Farooq et al., 2021)

El contacto directo de las NPs de ZnO tuvo una inactivación directa de PHYVV observada inicialmente pero incapaz de detener la proliferación y propagación en las plantas hospedantes. Cai et al. (2020) reportaron resultados similares en NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> con una exposición directa como antiviral con TMV, mostrando que la inactivación directa de TMV fue insuficiente para prevenir la proliferación. Este estudio sugirió la posibilidad de un efecto directo entre las NP de ZnO y PHYVV, mediante una posible interacción con la estructura del virus PHYVV, causando la ruptura de la estructura del virus. Sin embargo, estas observaciones indicaron que los efectos antivirales de las NP de ZnO en las plantas están más relacionados con la activación de la inmunidad de la planta y un mecanismo antiviral con la inactivación inicial del virus PHYVV indicada en la reducción del título viral.

6.3. Determinar posibles efectos fitotóxicos derivado de la aplicación de NP de ZnO en plantas de Chile infectadas con PHYVV.

#### 6.3.1 Determinación de efectos fitotóxicos

Con la finalidad de observar el posible efecto fitotóxico de la aplicación de las NPs de ZnO Y TiO<sub>2</sub> se aplicaron las mejores concentraciones utilizadas contra PHYVV



así como la concentración más alta para fines prácticos propuesto por Magaña-Lopez et al. (2022). Se analizaron sus efectos para futuras aplicaciones en condiciones de producción en plantas sanas con las NPs.

### 6.3.1.1 Prueba de germinación

Los resultados muestran que el priming de semillas de ambas variedades no tuvieron diferencias estadísticamente diferente ni siquiera asumiendo el error tipo B. Sin embargo, los resultados muestran que el mayor porcentaje de germinación fue el tratamiento de 1000 mM de NPs de ZnO con un porcentaje de alrededor del 89% en el caso de cv. Don Pancho (Fig.23).

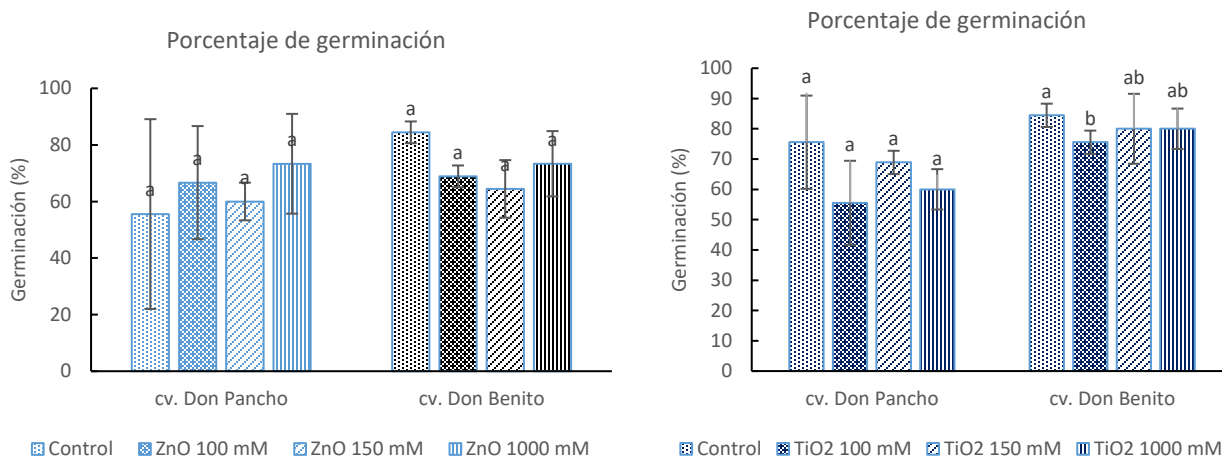


Figura 23. Efecto en la germinación derivado del priming con NPs. a) Porcentaje de germinación con ambas variedades de chile jalapeño con NPs de ZnO Y b) ) Porcentaje de germinación con ambas variedades de chile jalapeño con NPs de TiO<sub>2</sub>.

En el caso de las NPs de TiO<sub>2</sub> se observó respuestas diferentes como efecto del priming con estas NPs. El cv. Don Pancho no presentó diferencias significativas mientras que cv Don Benito se observó una diferencia estadística en la germinación de las semillas con un  $\alpha$  de 0.1972, asumiendo un error tipo B. En este contexto, la respuesta del priming con las NPs de TiO<sub>2</sub> fue negativa ya que todas las concentraciones de NPs disminuyeron el porcentaje de germinación comparado con el control con agua (Fig. 23b).

Los germinados se pueden observar en la Fig. 24, no presentaron diferencias visuales a comparación entre las tratadas con NPs y el control. Estos pueden significar que durante su desarrollo las NPs pueden elicitar a la plántula. Asimismo, visualmente no se observa efectos de fitotoxicidad.

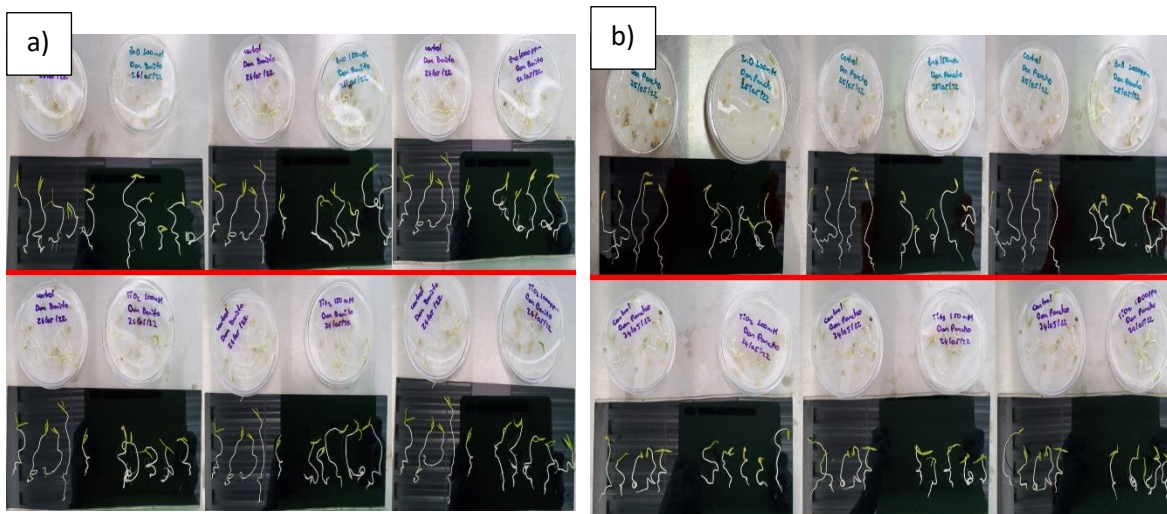


Figura 24. Efecto en el desarrollo del germinado con NPs de ZnO y NPs de TiO<sub>2</sub>, a) Germinados tratados con NPs de ZnO y TiO<sub>2</sub> cv. Don Pancho y b) Germinados tratados con NPs de ZnO y TiO<sub>2</sub> cv. Don Benito.

Se analizó si el contacto de las NPs de ZnO pudieron afectar el desarrollo fisiológico normal de los germinados del cv. Don Pancho y cv. Don Benito. Para ello se analizaron su altura, diámetro de tallo y largo de raíz. Los resultados muestran que la altura no se ve afectada por la aplicación de las NPs de ZnO en ambas variedades (Fig. 25). Así mismo. El diámetro de tallo de los germinados tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas.

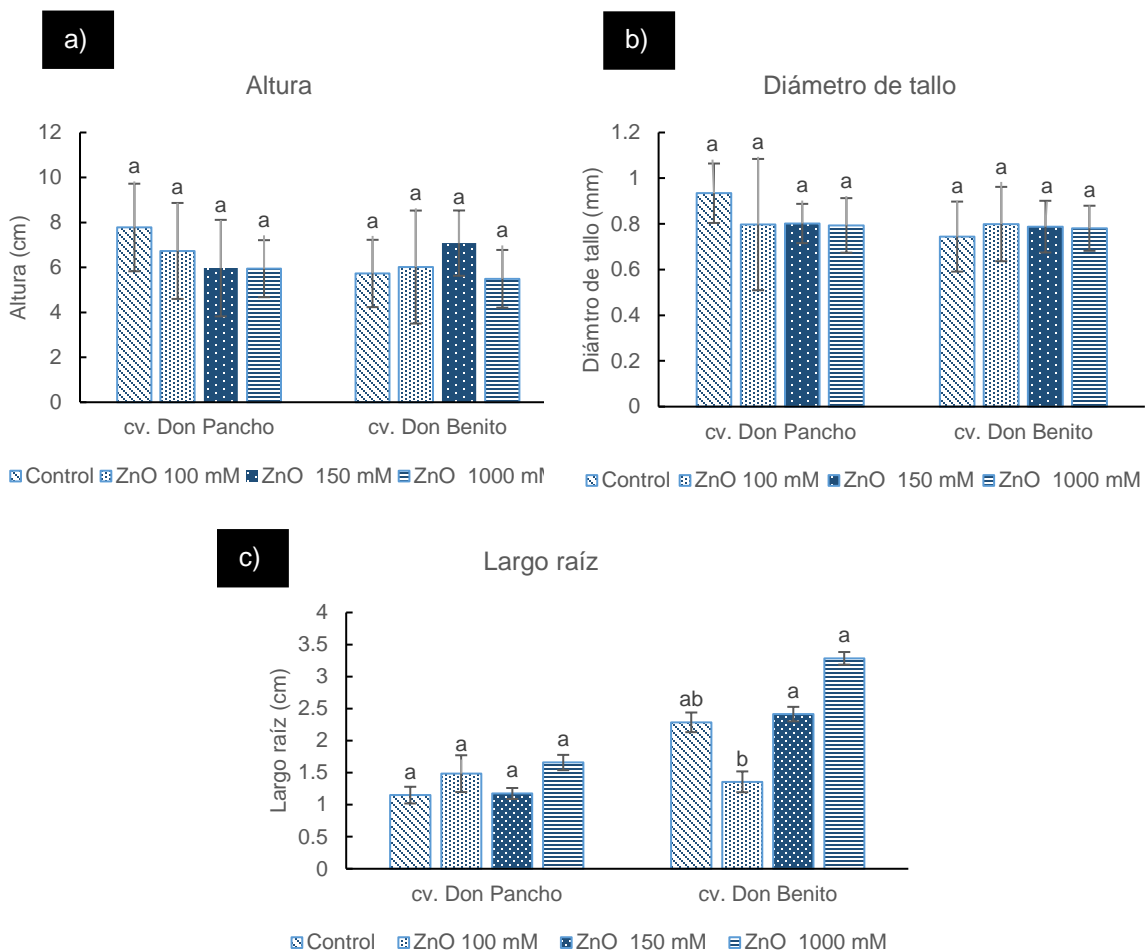


Figura 25. Efecto en el desarrollo fisiológico de los germinados tratados con NPs de ZnO y su control en ambas variedades de chile jalapeño. a) Altura del germinado en ambas variedades, b) Diámetro del tallo en ambas variedades y c) Largo de la raíz en ambas variedades

Sin embargo, para el largo de raíz se presentaron diferencias estadísticas en cv. Don Benito con un  $\alpha$  menor de 0.05 (Fig 25c). Los resultados demuestran que la concentración de 100 mM de NPs de ZnO tuvo un efecto negativo en el desarrollo de la raíz en comparación al control de 1.6841 veces. Por otro lado, las concentraciones de 150 y 1000 mM incrementaron el desarrollo de la raíz por 1.0563y 1.4370 veces, respectivamente.

El contacto de las NPs de TiO<sub>2</sub> tuvo efecto diferente en la fisiología del germinado dependiendo del cultivar. En la Fig. 26 se pueden observar que en cv. Don Pancho no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa. Mientras que el cv. Don Benito, la altura, el diámetro de tallo y el largo de la raíz presentaron diferencias significativas.

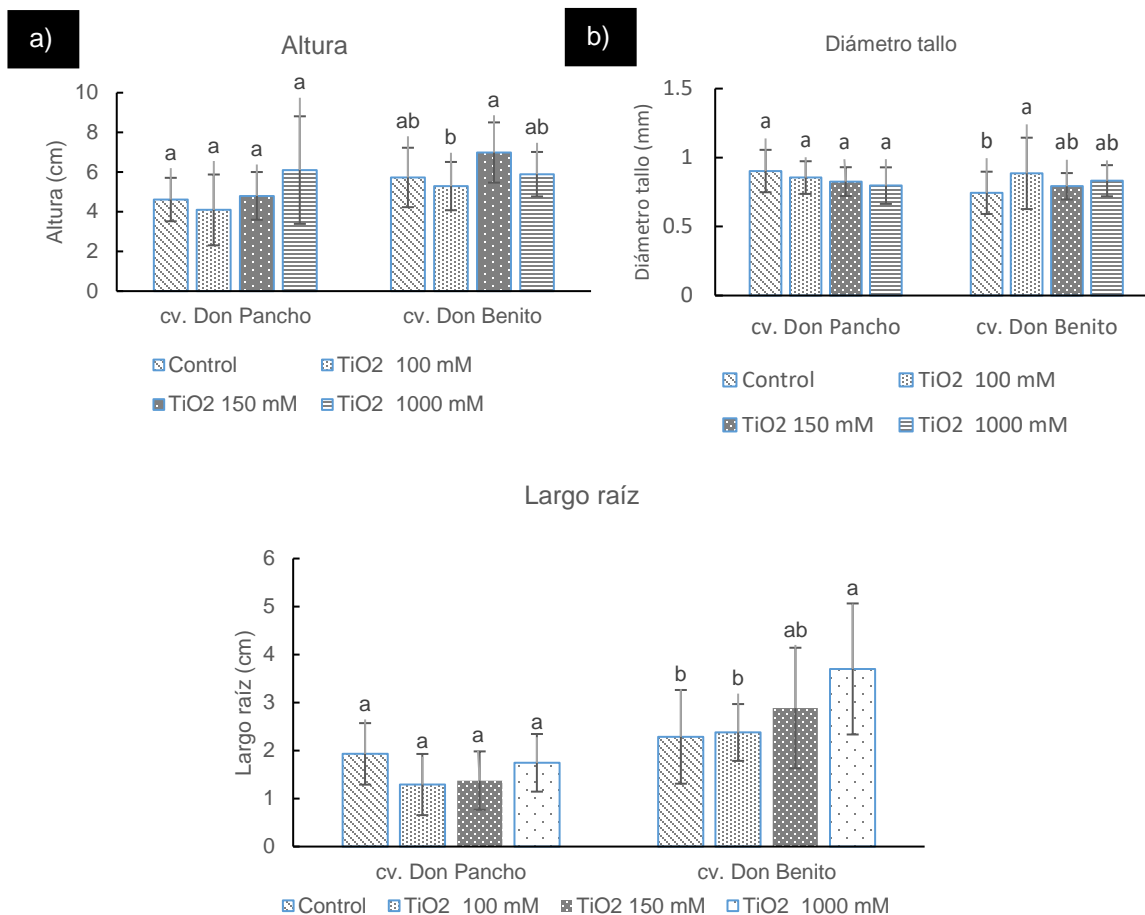


Figura 26. Efecto en el desarrollo fisiológico de los germinados tratados con NPs de TiO<sub>2</sub> y su control en ambas variedades de chile jalapeño. a) Altura del germinado en ambas variedades, b) Diámetro del tallo en ambas variedades y c) Largo de la raíz en ambas variedades

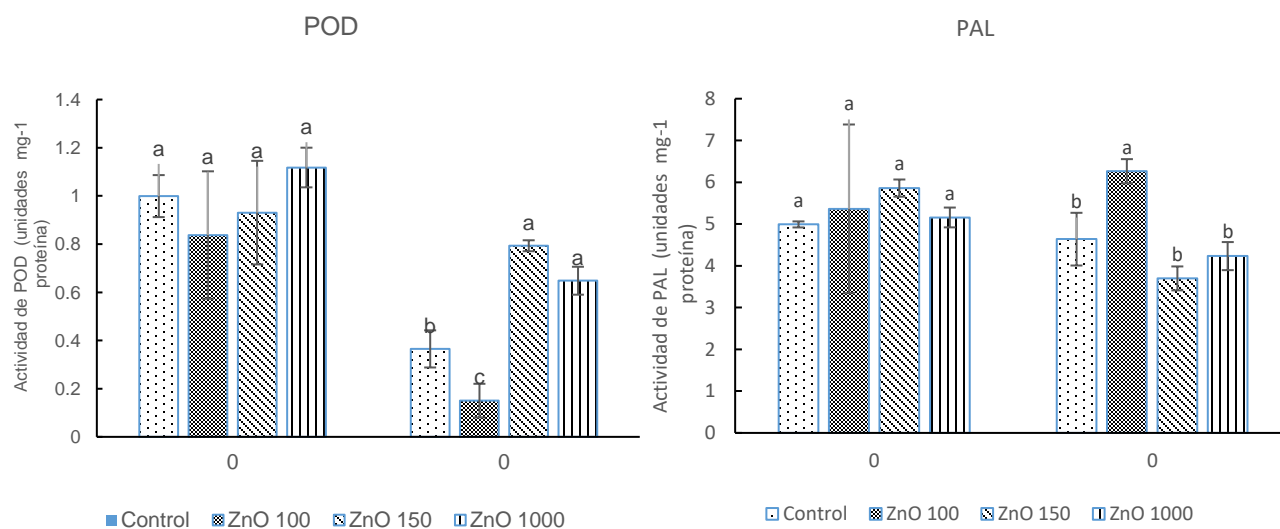
La altura se vio afectada en una disminución de 1.0824 veces cuando la semilla es tratada con NPs de TiO<sub>2</sub> a una concentración de 100 mM en comparación con el control. Sin embargo, cuando fueron tratadas con una concentración de 150 mM hubo un incremento de 1.2131 veces con respecto al control.

El diámetro de tallo incremento en el cv. Don Benito en comparación con el control con todas las concentraciones de NPs de TiO<sub>2</sub> por 1.1896, 1.0642 y 1.1180 veces a 100, 150 y 1000 mM, respectivamente. Para el crecimiento del largo de raíz se observó que las concentraciones de 150 y 1000 mM incrementaron por 1.2625 y 1.6188 veces en comparación con el control.

Los resultados demuestran que cada NPs tiene efectos distintos en el desarrollo de los germinados. Para las NPs de ZnO no provocaron diferencias en el desarrollo de ninguna variedad, lo cual implica que estas NPs en general no presentan ningún signo de fitotoxicidad aún en concentraciones altas. Sin embargo, las NPs de TiO<sub>2</sub> presentaron efectos significativamente estadísticos en la cv. Don Benito a diferencia de cv. Don Pancho. En este contexto, las NPs presenta cierta fitotoxicidad en la cv. Don Benito en ciertas concentraciones, además ser promotores del crecimiento en otras.

### 6.3.1.2 Determinación de actividad enzimática

La actividad de POD y PAL no tuvo diferencias significativas en cv. Don Pancho en los germinados tratados con NPs de ZnO (Fig 27). En el caso de cv. Don Benito POD incremento en los tratamientos de 150 y 1000 mM por 2.1422 y 1.7746 veces en comparación con el control. En PAL cv Don Benito incremento 1.3506 veces a la concentración de 150 mM.



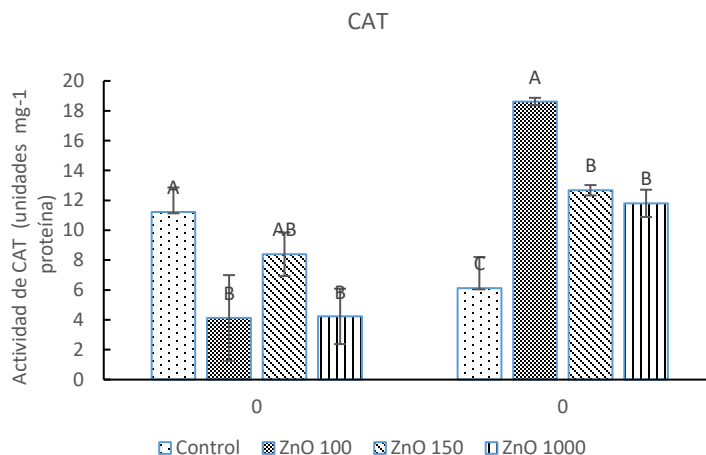


Figura 27. Actividad enzimática de POD, PAL y CAT en cv. Don Pancho y cv. Don Benito en germinados tratados con NPs de ZnO.

Las NPs de ZnO disminuyeron la actividad de CAT en cv Don Pancho por 2.7233, 1.3375 y 2.6529 veces a concentraciones de 100, 150 y 1000 mM comparadas con el control, respectivamente. Sin embargo, el cv. Don Benito CAT incrementó en todas las concentraciones comparadas con el control. CAT incrementó por 3.0443, 2.0725 y 1.9297, respectivamente.

La actividad enzimática de las NPs de TiO<sub>2</sub> incrementaron o disminuyeron su actividad dependiendo de la concentración y la variedad (Fig. 28). Para POD cv. Don Pancho redujo su actividad en todas las concentraciones por 10.96, 1.21 y 6.06 veces a las concentraciones de 100, 150 y 1000 mM, respectivamente. En el caso de cv. Don Benito la actividad de POD incrementó en todas las concentraciones de NPs por 2.23, 3.46 y 2.96 veces comparado con el control, respectivamente.

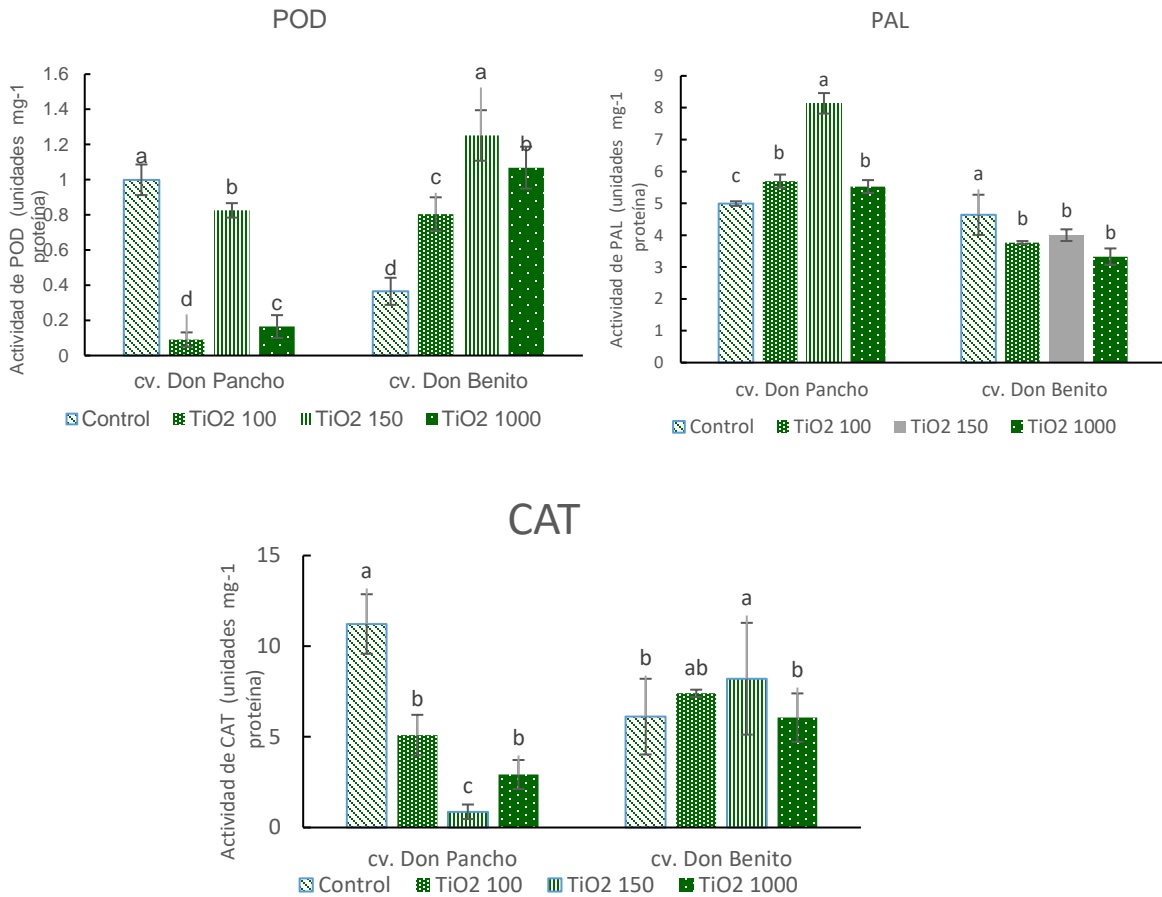


Figura 28. Actividad enzimática de POD, PAL y CAT en cv. Don Pancho y cv. Don Benito en germinados tratados con NPs de TiO<sub>2</sub>.

La actividad de PAL incremento en todos los tratamientos con NPs de TiO<sub>2</sub> en cv. Don Benito comparados con el control. PAL aumento por 1.14, 1.63 y 1.11 veces en comparación con el control, respectivamente. La actividad de CAT en cv. Don Pancho disminuyo por 2.20, 12.93 y 3.84 veces comparado con el control. Sin embargo, en la cv. Don Benito las concentraciones de 100 y 150 mM presentaron un incremento de 1.21 y 1.34 veces.

Los resultados indican que el priming de las semillas estimula el metabolismo secundario en el caso de cv. Don Benito de manera general cuando es expuesto a NPs de ZnO, mientras que las NPs de TiO<sub>2</sub> pueden activar el metabolismo secundario en ambas variedades provocando incrementos o la disminución de la actividad enzimática. Principalmente, la actividad de CAT señala que las NPs de

TiO<sub>2</sub> pueden estar generando un proceso de estrés provocado por la activación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

#### 6.3.1.3 Prueba en planta

Se determinó si la aplicación de NPs de ZnO y TiO<sub>2</sub> podrían provocar algún grado de fitotoxicidad en plantas de chile jalapeño al ser asperjadas. Esto con la finalidad de ver si las NPs pueden ser viables para su uso como posibles antivirales en futuras prácticas agrícolas. Por lo cual se provo el mejor tratamiento (100 mM) y una concentración mayor (1000 mM).

#### 6.3.1.4 Determinación del efecto fisiológico

Para ver si las plantas podrían presentar algún tipo de elicitación provocados por las NPs se midieron las variables fisiológicas y productivas de cada variedad (Fig. 29 y Fig. 30). Los resultados demuestran que las NPs de ZnO en cv. Don Pancho no tuvieron un efecto negativo ni positivo estadísticamente en la altura. En este contexto, al comparar la planta tratada con NPs con el control no presentaron algún tipo de fitotoxicidad. Por otro lado, en cv. Don Benito la concentración de 100 mM de NPs de ZnO incremento la altura por 1.11 veces comparado con el control.

El diámetro del tallo en cv Don Pancho aumento en todos los tratamientos con NPs de ZnO en 1.22 Y 1.10 veces comparado con el control mientras que en cv. Don Benito no hubo diferencias significativas estadísticamente. Un comportamiento similar tuvo cv. Don Pancho con respecto al número de hojas las cuales incrementaron en todos los tratamientos en 1.36 y 1.16 comparado con el control, respectivamente.

El número de flores no fue estadísticamente significativo en ningunas de las dos variedades. El número de botones incremento en cv. Don Pancho con respecto al control por 1.85 y 1.42 veces, respectivamente. En cv. Don Benito no se presentaron diferencias significativamente estadísticas.



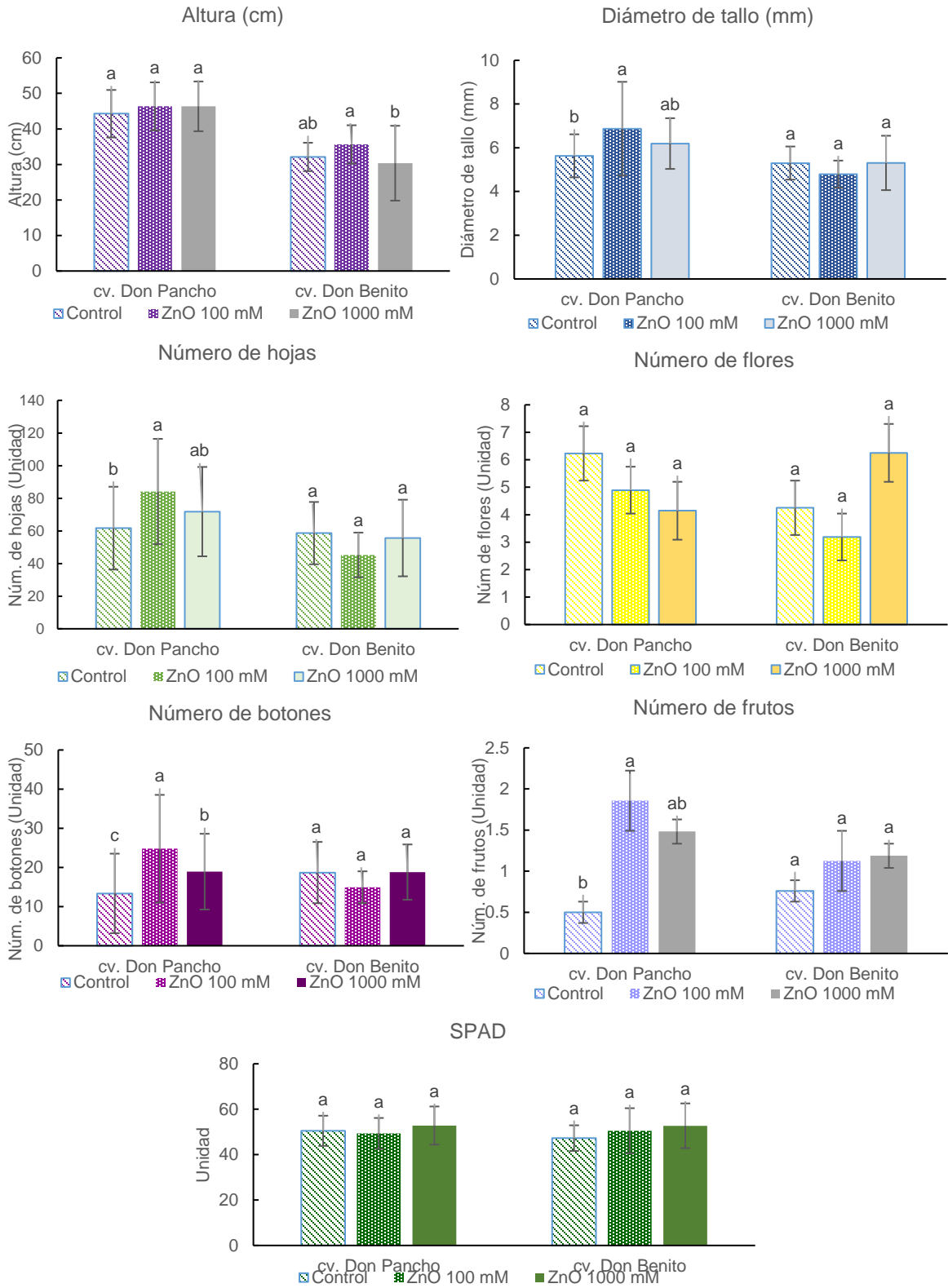


Figura 29. Efecto de la fisiología en plantas tratadas foliarmente con NPs de ZnO en ambas variedades de chile jalapeño.

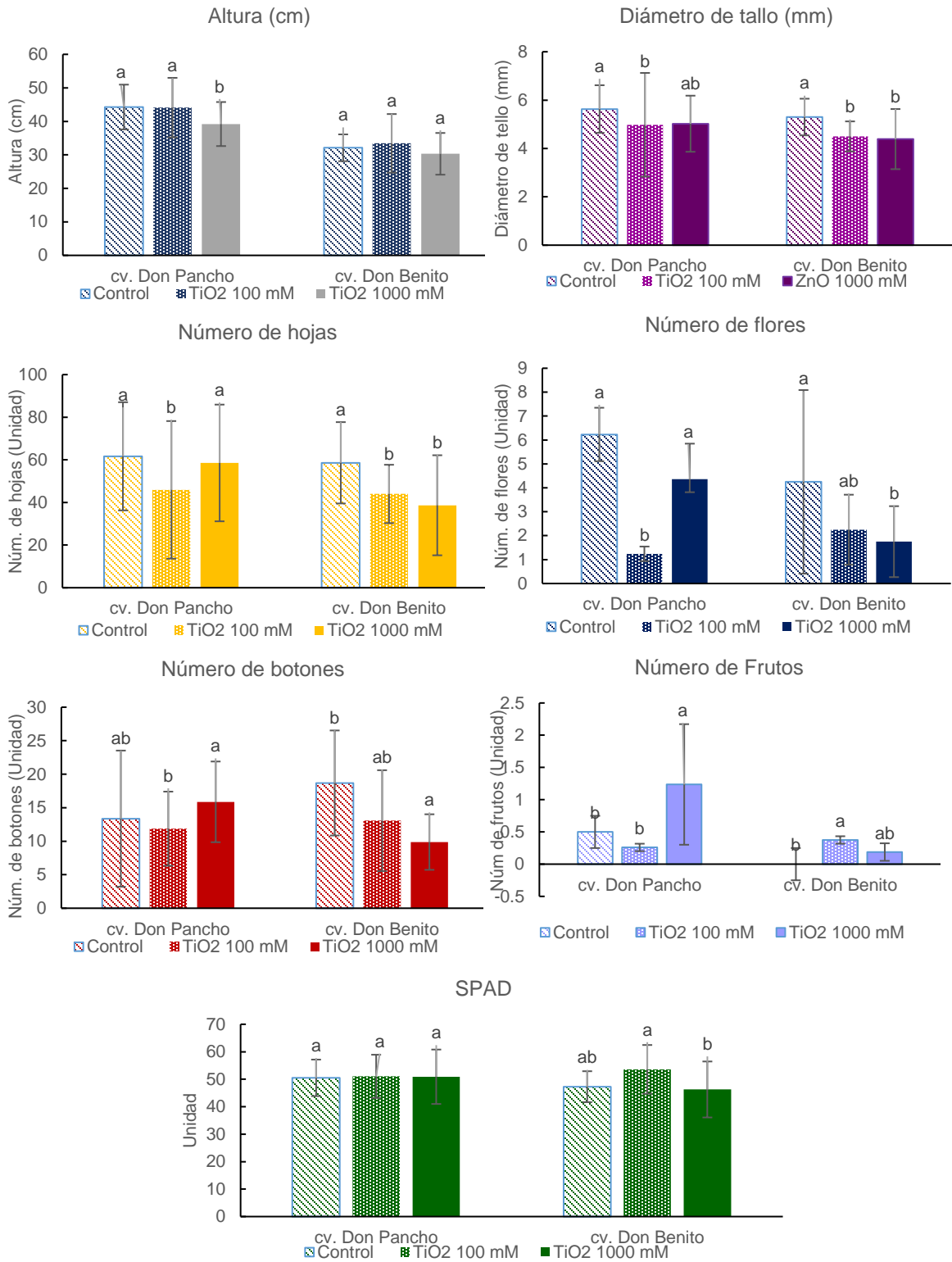


Figura 30. Efecto de la fisiología en plantas tratadas foliarrmente con NPs de ZnO en ambas variedades de chile jalapeño.

El número de frutos en cv. Don Pacho incremento 7.71 y 2.96 veces en comparación al control, La medición de clorofila mediante el aparato SPAD no reportó diferencias significativas.

La respuesta de las variables fisiológicas a las NPs de  $\text{TiO}_2$  tuvieron repuesta muy variadas dependiendo de la variedad y concentración de NPs (Fig. 30). La altura no tuvo diferencias estadísticamente significativas. El diámetro de tallo tuvo una disminución de 1.13 y 1.12 veces en comparación con el control en cv. Don Pancho. En el caso de cv. Don Benito disminuyó en 1.17 y 1.21 veces en comparación al control.

El número de flores en cv. Don Pancho disminuyo 1.34 veces a la concentración de 100 mM en comparación con el control. Así mismo, cv. Don Benito disminuyo de igual forma 1.33 y 1.51 veces comparado con el control el número de hojas. En número de flores disminuyo en ambas variedades después de la aspersion de las NPs de  $\text{TiO}_2$  5.02 y 1.42 veces en cv. Don Pancho y 1.89 y 2.43 veces en cv. Don Benito.

El número de botones disminuyó en 1.13 veces a una concentración de 100 mM y aumento en 1.19 veces a 1000 mM en cv. Don Pancho. En cv. Don Benito los botones florales disminuyeron en 1.43 y 1.89 veces en comparación con el control. La medición de clorofila mediante el SPAD incremento 1.13 veces a una concentración de 100 mM, pero a 1000 mM hubo una disminución de 1.02 veces en comparación con el control.

## 7. CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados sugieren que las NPs de ZnO y TiO<sub>2</sub> pueden ser utilizadas como práctica complementaria en los sistemas de manejo integral contra enfermedades por geminivirus en chile jalapeño. Además, esta investigación reveló que las NP de ZnO y TiO<sub>2</sub> pueden actuar como un potencial antiviral, activar el sistema de resistencia en la planta y como promotor del crecimiento. Los resultados indican que la aplicación foliar de NP de ZnO y TiO<sub>2</sub> puede inducir una acción indirecta mediante la activación de enzimas relacionadas con la defensa y una acción directa como un antiviral contra PHYVV en plantas de chile jalapeño. Así mismo, los resultados presentados en esta investigación concluyen que la respuesta como posible antiviral de las NPs dependerá de la interacción NPs-Planta-virus. Por otro lado, el efecto de los síntomas antivirales dependerá de la concentración y tiempo de aplicación además de la variedad. En esta investigación las NP de ZnO a 150 mM tuvieron efecto antes de la infección (preventivo) y 100 mM después de la infección (correctivo) de PHYVV. Sin embargo, estos efectos pueden diferir según el cultivo, la concentración, el tiempo de exposición, el tipo de NP y otros productos. Sin embargo, para prácticas futuras en agricultura se puede recomendar en base a los resultados obtenidos que el modo de empleo consista en una aplicación foliar de 150 mM de NP de ZnO con tres aspersiones como aplicación preventiva y, en el caso de plantas infectadas, una aplicación foliar de 100 mM de NP de ZnO con tres aspersiones como correctivo. tratamiento.

Así mismo, los resultados para determinar la fitotóxicidad demuestran que las NPs de ZnO no generan toxicidad en las plantas aún a concentraciones superiores a las usadas como antivirales. Sin embargo, las NPs de TiO<sub>2</sub> pueden provocar daños a las plantas derivados posiblemente de una toxicidad, Además, estas NPs demostraron que pueden elicitar la producción de metabolitos secundarios

## 8. REFERENCIAS.

- Aderibigbe, B. (2017). Metal-based nanoparticles for the treatment of infectious diseases. *Molecules*, 22(8), 1370.
- Afiyanti, M., y Chen, H. J. (2014). Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato. *Journal of Plant Physiology*, 171(2), 35-47.
- Ali, K., Dwivedi, S., Azam, A., Saquib, Q., Al-Said, M. S., Alkhedhairy, A. A., y Musarrat, J. (2016). Aloe vera extract functionalized zinc oxide nanoparticles as nanoantibiotics against multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *Journal of colloid and interface science*, 472, 145-156.
- Anjum, S. A., Farooq, M., Xie, X. Y., Liu, X. J., y Ijaz, M. F. (2012). Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia horticulturae*, 140, 66-73.
- Akhter, M. S., Akanda, A. M., Kobayashi, K., Jain, R. K., y Mandal, B. (2019). Plant virus diseases and their management in Bangladesh. *Crop Protection*, 118, 57-65.
- Baenas, N., Belović, M., Ilic, N., Moreno, D. A., y García-Viguera, C. (2019). Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food chemistry*, 274, 872-885.
- Bass, H. W., Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L., y Robertson, D. (2000). Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. *J Cell Sci*, 113(7), 1149-1160.
- Bisaro, D. M. (2006). Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology*, 344(1), 158-168.
- Blecher, K., Nasir, A., y Friedman, A. (2011). The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, 2(5), 395-401.

- Cai, L., Liu, C., Fan, G., Liu, C., & Sun, X. (2019). Preventing viral disease by ZnONPs through directly deactivating TMV and activating plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Environmental Science: Nano*, 6(12), 3653-3669.
- Cai, L., Cai, L., Jia, H., Liu, C., Wang, D., & Sun, X. (2020). Foliar exposure of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles on *Nicotiana benthamiana*: Evidence for nanoparticles uptake, plant growth promoter and defense response elicitor against plant virus. *Journal of Hazardous Materials*, 393, 122415.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., y Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Fauquet, C. (2004). Short interfering rna correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of Virology*. 78: 7465-7477.
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., y Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38(2), 344-349
- Cochran, W.G. y Cox, G.M. (1990). *Experimental Designs*, Second Edition, John Wiley & Sons, Second edition, Pp. 510-615, Trillas, México, D.F.
- Corrêa, J. M., Mori, M., Sanches, H. L., Cruz, A. D. D., Poiate, E., y Poiate, I. A. V. P. (2015). Silver nanoparticles in dental biomaterials. *International journal of biomaterials*, 2015.
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., y Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, 7, 1831.
- Das, K., y Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.

- Derbalah, A. S. H., y Elsharkawy, M. M. (2019). A new strategy to control Cucumber mosaic virus using fabricated NiO-nanostructures. *Journal of Biotechnology*, 306, 134-141.
- Eagle, P. A., y Hanley-Bowdoin, L. (1997). cis elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *Journal of virology*, 71(9), 6947-6955.
- El-Hak, R. E. S. A., El-Said, S. A. E. A., El-Shazly, A. A. E. F., El-Gazzar, M., Shaaban, E. A. E. A., y Saleh, M. M. S. (2019). Efficiency of Nano-Zinc Foliar Spray on Growth, Yield and Fruit Quality of Flame Seedless Grape. *Journal of Applied Sciences*, 19(6), 612-617.
- El-Sawy, M. M., Elsharkawy, M. M., Abass, J. M., y Kasem, M. H. (2017a). Antiviral activity of 2-nitromethyl phenol, zinc nanoparticles and seaweed extract against cucumber mosaic virus (CMV) in Eggplant. *J Virol Antivir Res*, 6(2).
- El-Sawy, M. M., Elsharkawy, M. M., Abass, J. M., y Hagag, E. S. (2017b). Inhibition of tomato yellow leaf curl virus by zingiber off cinaleand mentha longifolia. *International Journal ofAntivirals & Anti retrovirology*, 1 (1)(December), 1-6.
- El-Shazly, M. A., Attia, Y. A., Kabil, F. F., Anis, E., y Hazman, M. (2017). Inhibitory effects of salicylic acid and silver nanoparticles on potato virus Y-infected potato plants in Egypt. *Middle East J. Agric. Res*, 6(3), 835-848.
- El-Shetehy, M., Moradi, A., Maceroni, M., Reinhardt, D., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., ... y Schwab, F. (2021). Silica nanoparticles enhance disease resistance in Arabidopsis plants. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 344-353.
- Elbeshehy, E. K., Elazzazy, A. M., y Aggelis, G. (2015). Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. *Frontiers in microbiology*, 6, 453.
- Elsharkawy, M. M., y Derbalah, A. (2019). Antiviral activity of titanium dioxide nanostructures as a control strategy for broad bean strain virus in faba bean. *Pest management science*, 75(3), 828-834
- Farooq, T., Adeel, M., He, Z., Umar, M., Shakoor, N., da Silva, W., ... & Rui, Y. (2021). Nanotechnology and plant viruses: an emerging disease management approach for resistant pathogens. *ACS nano*, 15(4), 6030-6037.
- Fernandez-Moure, J. S., Evangelopoulos, M., Colvill, K., Van Eps, J. L., y Tasciotti, E. (2017). Nanoantibiotics: a new paradigm for the treatment of surgical infection. *Nanomedicine*, 12(11), 1319-1334.
- 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.
- García-Neria, M. A., y Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Characterization of Geminivirus resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 172-182.
- Garzón-Tiznado, J. A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Iba ez, J. T., y Herrera-Estrella, L. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *PHYTOPATHOLOGY-NEW YORK AND BALTIMORE THEN ST PAUL-*, 83, 514-514.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., ... y Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212.
- Gill, S. S., y Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Godínez-Hernández, Y., Anaya-López, J. L., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R. F., y Guevara-González, R. G. (2001). Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatan, Mexico. *HortScience*, 36(1), 139-142
- Gonzalez, L., Lison, D., y Kirsch-Volders, M. (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: a critical review. *Nanotoxicology*, 2(4), 252-273.
- González-Jara, P., Moreno-Letelier, A., Fraile, A., Piñero, D., y García-Arenal, F. (2011). Impact of human management on the genetic variation of wild pepper, *Capsicum annum* var. *glabriusculum*. *PLoS One*, 6(12), e28715
- Gupta, M., Tomar, R. S., Kaushik, S., Sharma, D., y Mishra, R. K. (2018). Effective antimicrobial activity of green ZnO nano particles of *Catharanthus roseus*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2030.



- Hao, Y., Yuan, W., Ma, C., White, J. C., Zhang, Z., Adeel, M., ... y Xing, B. (2018). Engineered nanomaterials suppress Turnip mosaic virus infection in tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *Environmental Science: Nano*, 5(7), 1685-1693.
- Hasan, S. (2015). A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences*. ISSN, 2277, 2502.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... y Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
- Hayat, S., Ahmad, H., Ali, M., Ren, K., y Cheng, Z. (2018). Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Scientia Horticulturae*, 240, 139-146.
- Horie, M., Fujita, K., Kato, H., Endoh, S., Nishio, K., Komaba, L. K., ... y Niki, E. (2012). Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics*, 4(4), 350-360.
- Hu, P., An, J., Faulkner, M. M., Wu, H., Li, Z., Tian, X., y Giraldo, J. P. (2020). Nanoparticle charge and size control foliar delivery efficiency to plant cells and organelles. *ACS nano*, 14(7), 7970-7986.
- Huh, A. J., y Kwon, Y. J. (2011). "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of controlled release*, 156(2), 128-145.
- Huh, S. U., Lee, G. J., Jung, J. H., Kim, Y., Kim, Y. J., y Paek, K. H. (2015). Capsicum annum transcription factor WRKYa positively regulates defense response upon TMV infection and is a substrate of CaMK1 and CaMK2. *Scientific Reports*, 5(1), 7981.
- Jha, A. K., Kumar, V., y Prasad, K. (2011). Biosynthesis of metal and oxide nanoparticles using orange juice. *Journal of Bionanoscience*, 5(2), 162-166.
- Jones, R. A., y Naidu, R. A. (2019). Global dimensions of plant virus diseases: Current status and future perspectives. *Annual review of virology*, 6, 387-409.

- Joshi, H., y Somdutt, P. C. S. (2019). Future prospects of nanotechnology in agriculture. *IJCS*, 7(2), 957-963.
- 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.
- Kachroo, A., & Kachroo, P. (2020). Mobile signals in systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 58, 41-47.
- Karungi, J., Obua, T., Kyamanywa, S., Mortensen, C. N., y Erbaugh, M. (2013). Seedling protection and field practices for management of insect vectors and viral diseases of hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) in Uganda. *International Journal of Pest Management*, 59(2), 103-110.
- Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W. S., y Hughes, J. D. A. (2014). Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. In *Advances in virus research* (Vol. 90, pp. 297-354). Academic Press.
- Kim, D. H., Kang, J. G., y Kim, B. D. (2007). Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated orf456 gene of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Molecular Biology*, 63, 519-532.
- Kisan, B., Shruthi, H., Sharanagouda, H., Revanappa, S. B., y Pramod, N. K. (2015). Effect of nano-zinc oxide on the leaf physical and nutritional quality of spinach. *Agrotechnology*, 4, 1-3.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., y Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423.
- Kumar, S. S., Venkateswarlu, P., Rao, V. R., & Rao, G. N. (2013). Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles. *International Nano Letters*, 3(1), 1-6.
- Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Choudhary, R. C., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., ... y Saharan, V. (2019). Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: a sustainable biostimulant for plant. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 59-69
- Lara, H. H., Ayala-Nuñez, N. V., Ixtapan-Turrent, L., y Rodríguez-Padilla, C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of nanobiotechnology*, 8(1), 1.

- Lee, M. R., Kim, C. S., Park, T., Choi, Y. S., y Lee, K. H. (2018). Optimization of the ninhydrin reaction and development of a multiwell plate-based high-throughput proline detection assay. *Analytical biochemistry*, 556, 57-62.
- Lee, S. B., Milgroom, M. G., y Taylor, J. W. (1988). A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet. Newsl*, 35, 23-24.
- Lee, S. H., y Jun, B. H. (2019). Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 865.
- Li, M., Zhu, L., y Lin, D. (2011). Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. *Environmental science & technology*, 45(5), 1977-1983.
- Lim, S., Kim, K. H., Zhao, F., Yoo, R. H., Igori, D., Lee, S. H., y Moon, J. S. (2015). Complete genome sequence of a novel endornavirus isolated from hot pepper. *Archives of virology*, 160, 3153-3156.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Ma, C., White, J. C., Zhao, J., Zhao, Q., y Xing, B. (2018). Uptake of engineered nanoparticles by food crops: characterization, mechanisms, and implications. *Annual review of food science and technology*, 9, 129-153.
- Magaña-López, E., Palos-Barba, V., Zuverza-Mena, N., Vázquez-Hernández, M. C., White, J. C., Nava-Mendoza, R., ... y Guevara-González, R. G. (2022). Nanostructured mesoporous silica materials induce hormesis on chili pepper (*Capsicum annuum* L.) under greenhouse conditions. *Heliyon*, 8(3).
- Maruthi, M. N., Whitfield, E. C., Otti, G., Tumwegamire, S., Kanju, E., Legg, J. P., ... y Munga, T. (2019). A method for generating virus-free cassava plants to

combat viral disease epidemics in Africa. *Physiological and molecular plant pathology*, 105, 77-87.

McDevitt, C. A., Ogunniyi, A. D., Valkov, E., Lawrence, M. C., Kobe, B., McEwan, A. G., y Paton, J. C. (2011). A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS pathogens*, 7(11), e1002357.

Meng, H., Xia, T., George, S., y Nel, A. E. (2009). A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. *ACS nano*, 3(7), 1620-1627.

Murshed, R., Lopez-Lauri, F., y Sallanon, H. (2008). Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. *Analytical Biochemistry*, 383(2), 320-322.

Nel, A., Xia, T., Mädler, L., y Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *science*, 311(5761), 622-627.

Nigam, K., Suhail, S., Verma, Y., Singh, V., y Gupta, S. (2015). Molecular characterization of begomovirus associated with leaf curl disease in chilli. *World J Pharm Res*, 4, 1579-1592.

Pacheco-Olvera, A., Hernández-Verdugo, S., Rocha-Ramírez, V., González-Rodríguez, A., y Oyama, K. (2012). Genetic diversity and structure of pepper (*Capsicum annuum* L.) from Northwestern Mexico analyzed by microsatellite markers. *Crop Science*, 52(1), 231-241.

Palukaitis, P. (2011). The road to RNA silencing is paved with plant-virus interactions. *Plant Pathol. J*, 27(3), 197-206.

Pandey, K. B., y Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2, 270-278.

Park, C. J., An, J. M., Shin, Y. C., Kim, K. J., Lee, B. J., y Paek, K. H. (2004). Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16

- family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta*, 219, 797-806.
- Peleg, Z., y Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 290-295.
- Pinheiro, P.V.; Ghanim, M.; Alexander, M.; Rebelo, A.R.; Santos, R.S.; Orsburn, B.C.; Gray, S.; Cilia, M. (2016). Host Plants Indirectly Influence Plant Virus Transmission by Altering Gut Cysteine Protease Activity of Aphid Vectors. *Mol cel proteomics*. 16(1), S230–S243.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., y Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal*, 8(1), 104.
- Retes-Manjarrez, J. E., Hernández-Verdugo, S., López-Orona, C. A., Medina-López, R., Garzón-Tiznado, J. A., & Retes-Cázarez, J. E. (2019). Inheritance of Resistance to Pepper huasteco yellow vein virus in *Capsicum annuum* L. *HortScience*, 54(5), 783-786.
- Rico, C.M.; Peralta-Videa, J.R.; Gardea-Torresdey, J.L. (2015). In *Nanotechnology and Plant Sciences*; Siddiqui, M., Al-Whaibi, M., Mohammad, F., Eds.; Springer: Cham, Switzerland; pp. 1–17,
- Rodelo-Urrego, M., García-Arenal, F., y Pagán, I. (2015). The effect of ecosystem biodiversity on virus genetic diversity depends on virus species: A study of chiltepin-infecting begomoviruses in Mexico. *Virus evolution*, 1(1).
- Salam, A., Khan, A. R., Liu, L., Yang, S., Azhar, W., Ulhassan, Z., ... y Gan, Y. (2022). Seed priming with zinc oxide nanoparticles downplayed ultrastructural damage and improved photosynthetic apparatus in maize under cobalt stress. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127021.

- Salatin, S., Maleki Dizaj, S., & Yari Khosroushahi, A. (2015). Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell biology international*, 39(8), 881-890.
- Santacruz Gutiérrez, L. (2013). Nanopartículas de oro y de iridio y su aplicación en catálisis. Tesis doctoral. UAB, Barcelona, España. P.12-13
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2018). *CHILES Y PIMIENTOS Mexicanos*. Ciudad de México. Consultado el 14 de mayo del 2019 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)
- Siddiqi, K. S., y Husen, A. (2017). Plant response to engineered metal oxide nanoparticles. *Nanoscale research letters*, 12(1), 92.
- Shafie, R. M., Salama, A. M., y Farroh, K. Y. (2018). Silver nanoparticles activity against Tomato spotted wilt virus. *Middle East J. Agric. Res*, 7, 1251-1267.
- Shi, H., Hudson, L. G., y Liu, K. J. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5), 582-593.
- Shimada-Beltran, H., y Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Early and late gene expression in pepper huasteco yellow vein virus. *Journal of general virology*, 88(11), 3145-3153.
- SIAP. 2023. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera; Consultado el 17 de febrero del 2023 en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Singh, H., Du, J., Singh, P., y Yi, T. H. (2018). Ecofriendly synthesis of silver and gold nanoparticles by *Euphrasia officinalis* leaf extract and its biomedical applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(6), 1163-1170.
- Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., y Bach, H. (2017). Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of nanobiotechnology*, 15(1), 65.
- Srivastava, A., Mangal, M., Saritha, R. K., y Kalia, P. (2017). Screening of chilli pepper (*Capsicum spp.*) lines for resistance to the begomoviruses causing chilli leaf curl disease in India. *Crop Protection*, 100, 177-185.

- Srujana, S., y Bhagat, D. (2022). Chemical-based synthesis of ZnO nanoparticles and their applications in agriculture. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 7(1), 269-275.
- Stadtman, E. R., y Berlett, B. S. (1998). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug metabolism reviews*, 30(2), 225-243.
- Szira, F., Balint, A. F., Börner, A., y Galiba, G. (2008). Evaluation of drought-Related traits and screening methods at different developmental stages in spring barley. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(5), 334-342.
- Thakur, H., Jindal, S. K., Sharma, A., y Dhaliwal, M. S. (2019). A monogenic dominant resistance for leaf curl virus disease in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Crop Protection*, 116, 115-120.
- Tijerina-Ramírez, N., Lira-Méndez, K., Moreno-Medina, V. R., González-Prieto, J. M., y Mayek-Pérez, N. (2014). Efecto del estrés osmótico in vitro en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*. *Revista mexicana de micología*, 39, 31-39.
- Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., y Taylor, P. W. J. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant pathology*, 57(3), 562-572.
- Tan, W., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2018). Interaction of titanium dioxide nanoparticles with soil components and plants: current knowledge and future research needs—a critical review. *Environmental Science: Nano*, 5(2), 257-278.
- Tassi, E., Giorgetti, L., Morelli, E., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., y Barbaferi, M. (2017). Physiological and biochemical responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to nano-CeO<sub>2</sub> and excess boron: modulation of boron phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 50-58.

- Tomita, R., Sekine, K. T., Mizumoto, H., Sakamoto, M., Murai, J., Kiba, A., ... y Kobayashi, K. (2011). Genetic basis for the hierarchical interaction between Tobamovirus spp. and L resistance gene alleles from different pepper species. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(1), 108-117.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Herrera-Estrella, L., y Rivera-Bustamante, R. F. (1993). Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology*, 74(10), 2225-2231.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brown, J. K., Becerra-Flora, A., y Rivera-Bustamante, R. F. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology*, 86(11), 1186-1192.
- Toscano, S., Ferrante, A., Leonardi, C., y Romano, D. (2018). PAL activities in asparagus spears during storage after ammonium sulfate treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 34-41.
- Ulhassan, Z., Yang, S., He, D., Khan, A. R., Salam, A., Azhar, W., ... y Zhou, W. (2023). Seed priming with nano-silica effectively ameliorates chromium toxicity in *Brassica napus*. *Journal of Hazardous Materials*, 131906.
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., y Bracale, M. (2013). Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PloS one*, 8(7), e68752.
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R. G., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R. V., Avila-Juarez, L., y Torres-Pacheco, I. (2020). Nanoparticles as Potential Antivirals in Agriculture. *Agriculture*, 10(10), 444.
- Velasco, L., Ruiz, L., Galipienso, L., Rubio, L., y Janssen, D. (2020). A historical account of viruses in intensive horticultural crops in the Spanish mediterranean arc: New challenges for a sustainable agriculture. *Agronomy*, 10(6), 860.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L.R. y Reveles-Hernández, M. 2013. Manejo de las principales enfermedades del chile para secado en el norte centro de



México. Folleto Técnico. Núm 50. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 57 páginas.

- Vimala, K., Sundarraj, S., Paulpandi, M., Vengatesan, S., y Kannan, S. (2014). Green synthesized doxorubicin loaded zinc oxide nanoparticles regulates the Bax and Bcl-2 expression in breast and colon carcinoma. *Process biochemistry*, 49(1), 160-172.
- Xia, T., Kovochich, M., Liang, M., Madler, L., Gilbert, B., Shi, H., ... y Nel, A. E. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano*, 2(10), 2121-2134.
- Yang, T., Xu, Z. P., Lv, R., Zhu, L. S., Peng, Q. D., Qiu, L., ... y Xi, D. H. (2018). N gene enhances resistance to Chilli vein mottle virus and hypersensitivity to salt stress in tobacco. *Journal of plant physiology*, 230, 92-100.
- Yin, J. J., Liu, J., Ehrenshaft, M., Roberts, J. E., Fu, P. P., Mason, R. P., y Zhao, B. (2012). Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and applied pharmacology*, 263(1), 81-88.
- Zholobak, N., Kharchenko, E., Shydlovska, O., Marynin, A., y Shcherbakov, A. (2016). Increase of Tumor Necrosis Factor Activity by Formation of Nanocomposites From Cerium Dioxide Nanoparticles.

# ANEXO

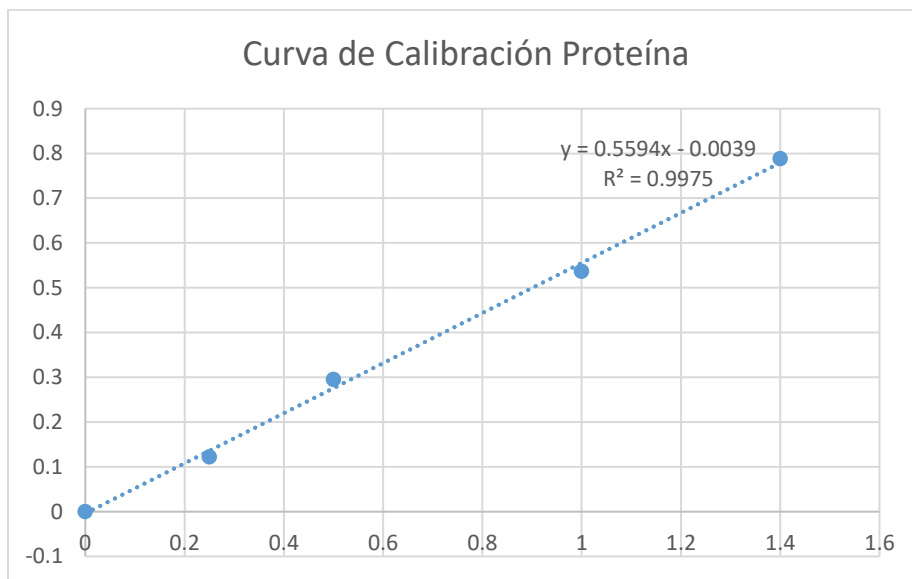


Figura 31. Curva de calibración para Proteína

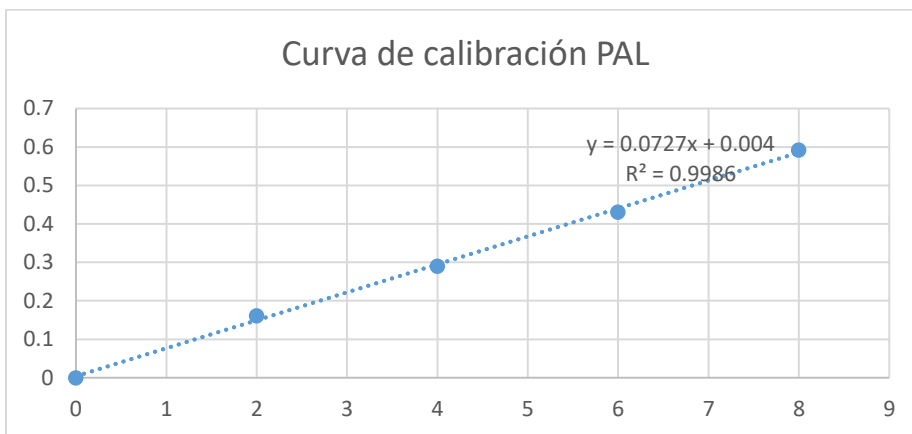
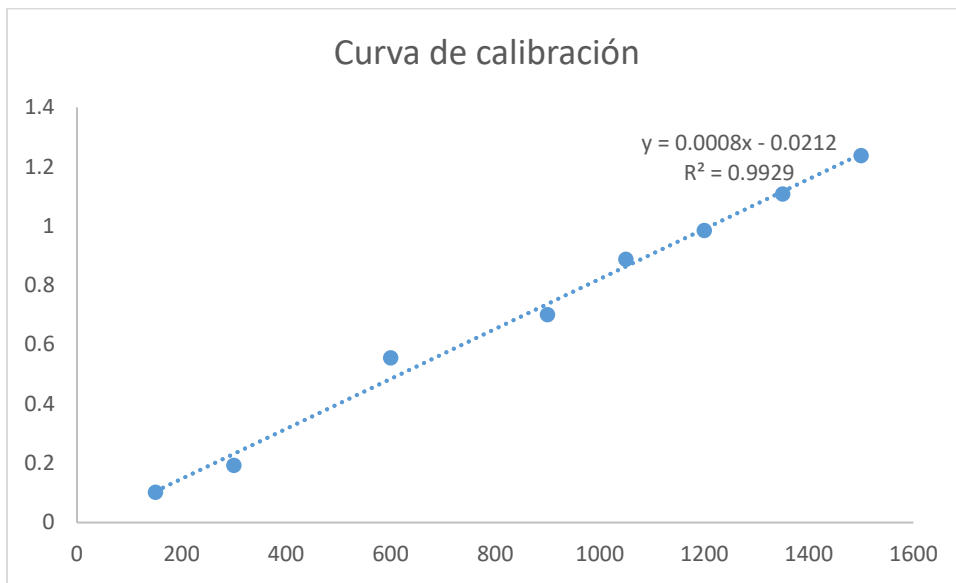
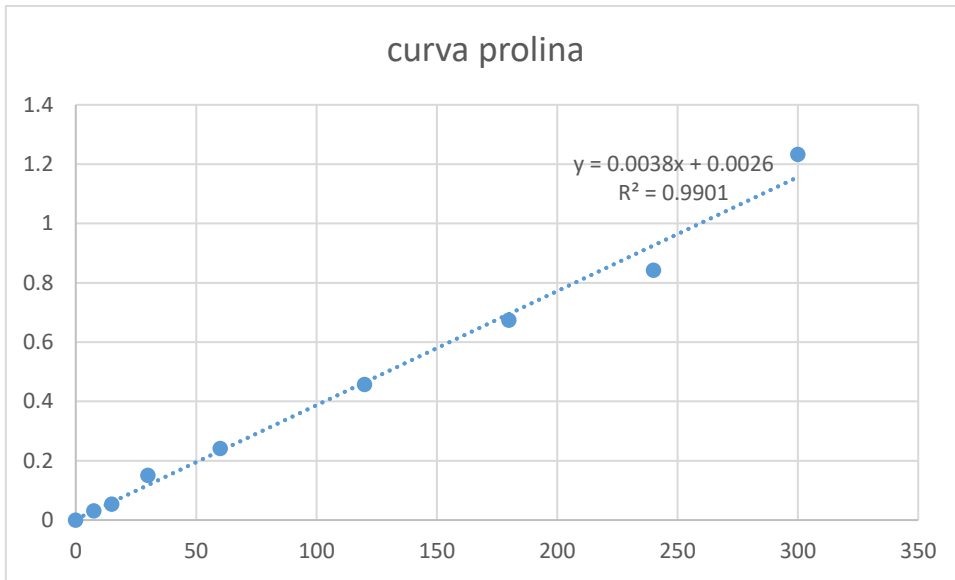


Figura 32. Curva de calibración Fenilalanina Amomia-liasa



*Figura 33. Curva de calibración Prolina*