

Manejo del TMV (*Virus Mosaico del Tabaco*) en *Capsicum annum* L. Rivas Ramírez

2021

Luisa Katiana

con nanopartículas de ZnO.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Manejo del TMV (*Virus Mosaico del Tabaco*) en
Capsicum annum L. con nanopartículas de ZnO.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas.

Presenta:

Q.A Luisa Katiana Rivas Ramírez

Dirigido por:

Dr. Irineo Torres-Pacheco

Querétaro, Qro. a 11 de Junio del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA
Maestría en ciencias en Ingeniería de Biosistemas.

Manejo del TMV (*Virus Mosaico del Tabaco*) en *Capsicum annum* L.
con nanopartículas de ZnO.

TESIS

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

Presenta:

Q.A Luisa Katiana Rivas Ramírez

Dirigido por:

Dr. Irineo Torres-Pacheco

SINODALES

Dr. Irineo Torres-Pacheco
Presidente

Dra. Marcela Vargas-Hernández
Secretario

Dr. Ramón Gerardo Guevara-González
Vocal

Dra. Rosalía Virginia Ocampo-Velázquez
Suplente

Dr. Enrique Rico-García
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro. México.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario 22 de Febrero del 2021

© 2021 - Luisa Katiana Rivas Ramírez

All rights reserved.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Para Emil

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo en los estudios de posgrado con número 749228, así como el financiamiento de la propuesta de trabajo denominada A1-S-33677 de la convocatoria de Ciencia Básica-2017-2018 del “Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT”.

A mis maestros mentores, Dr. Torres-Pacheco y Dr. Guevara-González, que con su dirección y conocimientos posibilitaron la realización de este proyecto.

A mi familia, por sus buenas intenciones.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABSTRACT

Viral disease is one of the most difficult challenges in crop production due to there no cure to virus management and effective tools to control is lacking. Nevertheless, there are increasing evidence that nanoparticles can interact with plant viruses and diminish the prejudicial syndrome. A nanoparticle are less than 100 micrometers in size and the antiviral capacity of nanoparticles depends on its characteristics itself as well the host and experimental design; in particular, zinc oxide nanoparticles (NP-ZnO) are well documented to control wide range of agricultural pathogens. This work tests the use of NP-ZnO as management of *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) in chilli plants. NP-ZnO were synthesized by chemical reaction with a nanoflower form and -3 size to control TMV infection *in vivo* using chilli plants (*Capsicum annum*) under greenhouse condition. TMV particles were inoculated in chilli plants and treated 3 times by foliar spray each 72 h with five pretreatments and posttreatments concentrations of NP-ZnO which were: 0, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g/L}$. According to DAS-ELISA test used to measure the relative viral load in each treatment; the concentration 200 $\mu\text{g/L}$ was the best treatment under this experimental design with significant diminish of relative viral load from 7.36 ± 0.14 mg/mL compared to 10.35 ± 0.25 mg/mL of the positive control TMV. Nevertheless, these results are not related with those to sanity in which the pretreatment 3 (100 $\mu\text{g/L}$) got the best sanity features and phenological characteristics among which the number and sizes of fruits significantly improved. These results suggest a mechanism of elicitation pathway by which the plant attenuate the observed symptoms, this notion was reinforced with the significant increase in enzymatic and antioxidant activity. However, the strategy for the management of TMV disease using NP-ZnO require to test different sizes of nanoparticles, doses and frequencies to define the best fit to chilli plants.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

Las enfermedades virales son uno de los desafíos más difíciles en la producción de cultivos; la razón es que no existe cura eficaz para el manejo de virosis y se carece de herramientas efectivas para su control, sin embargo, existe una creciente evidencia de que las nanopartículas de óxidos metálicos pueden desintegrar la cápside de los virus y de este modo inhiben significativamente la infección. Una nanopartícula tiene un tamaño inferior a 100 micrómetros y su capacidad antiviral depende de sus características fisicoquímicas, así como del hospedero y del diseño de experimento; en particular, las nanopartículas de óxido de zinc (NP-ZnO) se han utilizado para el control de una amplia gama de patógenos agrícolas. Este trabajo prueba el uso de NP-ZnO como manejo del TMV en plantas de Chile. Las NP-ZnO se sintetizaron químicamente con una forma tipo nanoflor y tamaño aproximando de 3 micrómetros; las cuales se probaron bajo condiciones de invernadero. El experimento consistió en la aspersión foliar de NP-ZnO sobre plantas de Chile infectadas con TMV; la aplicación se realizó por triplicado cada 72 h probando 5 pretratamientos y postratamientos con concentraciones de: 0, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/L}$. Los resultados de carga relativa viral obtenidos de la prueba DAS-ELISA sugieren que el pretratamiento con 200 $\mu\text{g/L}$ NP-ZnO presentó el mejor resultado bajo este diseño experimental; con una disminución significativa de la concentración de $7,36 \pm 0,14$ mg/mL en comparación con $10,35 \pm 0,25$ mg/mL del control positivo con TMV. No obstante, estos resultados no se relacionaron con la variable sanidad, donde el pretratamiento 3 (100 $\mu\text{g/L}$) obtuvo las mejores características de sanidad y las variables fenológicas mejoraron significativamente el número y tallas de frutos aunque la carga viral permaneció inalterada (similar al control con TMV); posiblemente debido al tamaño micrométrico de las nanoflores. Estos resultados sugieren un mecanismo vía elicitación por el cual la planta atenúa los síntomas observados para el pretratamiento 3; noción que se refuerza con el incremento significativo de la actividad enzimática y antioxidante. Finalmente, dado que la capacidad antiviral de las nanopartículas depende de sus características *per se*, así

como del diseño experimental y la especie vegetal; la estrategia eficaz para el manejo de la enfermedad de TMV utilizando NP-ZnO en plantas de Chile requiere probar diferentes tamaños de partículas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
a. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
III. HIPÓTESIS	12
IV. OBJETIVO GENERAL	12
a. OBJETIVOS PARTICULARES	13
V. MATERIALES Y MÉTODOS	13
V.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas	13
V.2 Condiciones de crecimiento de las plantas y tratamientos utilizados de NP-ZnO	13
V.3 Medición de variables y toma de muestra	15
V.4 Inoculación del TMV	16
V.5 Actividad enzimática y capacidad antioxidante	16
V.5.1 Preparación del extracto enzimático	15
V.5.2 Cuantificación de Proteína	17
V.5.3 Actividad de PAL	18
V.5.4 Actividad de SOD	20
V.5.5 Actividad de CAT	22
V.5.6 Actividad de POD	23
V.5.7 Preparación del extracto metanólico	25
V.5.8 Actividad de eliminación de radicales DPPH [·] (DRSA)	25
V.5.9 Actividad de eliminación de radicales ABTS ^{·+} (ARSA)	25
V.6 Carga relativa viral	26
V.7 Análisis estadístico	28
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
VI.1 Caracterización de NP-ZnO	28
VI.2 Normalidad de variables explicativas	31
VI.3 Evaluación de las NP en la planta	32

VI.3.1	<i>Altura</i>	32
VI.3.2	<i>Diámetro</i>	33
VI.3.3	<i>Número de Hojas</i>	34
VI.3.4	<i>Número de Flores</i>	35
VI.3.5	<i>Número de Frutos</i>	36
VI.3.6	<i>Peso del Fruto</i>	38
VI.3.7	<i>Largo del Fruto</i>	39
VI.3.8	<i>Ancho del Fruto</i>	40
VI.4	Sanidad y carga viral asociada a síntomas	45
VI.4.1	<i>Sanidad</i>	45
VI.4.2	<i>Carga relativa viral</i>	48
VI.5	Actividad enzimática	51
VI.5.1	<i>Proteína</i>	52
VI.5.2	<i>Actividad PAL</i>	53
VI.5.3	<i>Actividad SOD</i>	55
VI.5.4	<i>Actividad CAT</i>	56
VI.5.5	<i>Actividad POD</i>	56
VI.6	Actividad Antioxidante	59
VI.6.1	Actividad antiradical DPPH [•]	59
VI.6.2	Actividad antiradical ABTS ^{•+}	60
VII.	CONCLUSIÓN	61
VIII.	REFERENCIAS	64

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
RESULTADOS DEL PROCESAMIENTO DE IMAGEN DE LAS NP	29
RESULTADOS DE LA DISTRIBUCIÓN NORMAL AJUSTADA	31
RESULTADOA DE LA EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE LA PLANTA	42
RESULTADOS DE LA PRODUCCIÓN DE CHILES	43
RESULTADOS DE LA VARIABLE SANIDAD	46
RESULTADOS DE CARGA VIRAL RELATIVA NP-ZNO – TMV	49
CORROBORACIÓN DE CARGA VIRAL RELATIVA DE T3	50
RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	52
RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	59

ÍNDICE DE IMÁGENES

	Página
IMÁGENES DE LAS NP-ZnO POR SEM	30
FOTOGRAFÍA DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS DE CHILES	44
FOTOGRAFÍA DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE NP-ZNO	47
CARICATURA DE LA INTERACCIÓN NP-VIRUS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
GRÁFICO 1 DE LA VARIABLE ALTURA DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS Y CONTROLES	33
GRÁFICO 2 DE LA VARIABLE DIÁMETRO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS Y CONTROLES	34
GRÁFICO 3 DE LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS Y CONTROLES	35
GRÁFICO 4 DE LA VARIABLE NÚMERO DE FLORES DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS Y CONTROLES	36
GRÁFICO 5 DE LA VARIABLE NÚMERO DE FRUTOS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS Y CONTROLES	37
GRÁFICO 6 DE LA VARIABLE PESO DE PRODUCCIÓN DE CHILES PARA LOS TRATAMIENTOS Y CONTROLES	39
GRÁFICO 7 DE LA VARIABLE LARGO DE PRODUCCIÓN DE CHILES PARA LOS TRATAMIENTOS Y CONTROLES	40
GRÁFICO 8 DE LA VARIABLE ANCHO DE PRODUCCIÓN DE CHILES PARA LOS TRATAMIENTOS Y CONTROLES	41
GRÁFICO 9 DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR LA CARGA RELATIVA VIRAL	48
GRAFICO 10 DE RESULTADOS DE PROTEÍNA T3 Y CONTROLES	53
GRAFICO 11 DE RESULTADOS DE PROTEÍNA T3 Y CONTROLES	53
GRÁFICO 12 DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE PAL	54
GRÁFICO 13 DE RESULTADOS DE PAL T3 Y CONTROLES	55
GRÁFICO 14 DE RESULTADOS DE SOD T3 Y CONTROLES	56
GRÁFICO 15 DE RESULTADOS DE CAT T3 Y CONTROLES	57
GRÁFICO 16 DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE POD	58
GRÁFICO 17 DE RESULTADOS DE POD T3 Y CONTROLES	58

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ARSA	ABTS ^{•+} radical scavenging activity
BSA	Bovine Serum Albumin (proteína estándar)
CAB	Buffer de recubrimiento de carbonato
CAT	Catalasa
DAS-ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de doble anticuerpo
DRSA	DPPH [•] radical scavenging activity
EC₅₀	Concentración del antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial en un 50%
ET	Transferencia de un solo electrón
GEB	Buffer General de extracción
GSH	Glutación reducido
GPX	Glutación Peroxidasa
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
HRP	Horseradish Peroxidase
NP	Nanopartículas
NP-Ag	Nanopartículas de Plata
NP-ZnO	Nanopartículas de óxido de zinc
PAL	Fenilalanina-amonio liasa
PBS	Buffer de fosfato salino
PBST	Buffer de lavado de la reacción Elisa
POD	Peroxidasa
ROS	Especies reactiva de oxígeno
SOD	Superóxido-dismutasa
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TMV	<i>Virus Mosaico del Tabaco</i>
U	Unidad enzimática

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCIÓN

En México el cultivo de chile jalapeño (*Capsicum annum*) es altamente demandado debido a nuestra cultura culinaria. El chile es un cultivo endémico cuyo esquema de producción protegido puede ser en malla sombra e invernaderos; con una participación del 9% y 6% respectivamente. La forma principal de producción de esta hortaliza a campo abierto con un 85% (SIAP, 2020); razón por la cual queda expuesto altamente a plagas y enfermedades como son bacterias, hongos y virus.

En particular, las infecciones por virus a menudo no inducen una enfermedad notable; pero influyen en las plantas de formas más sutiles como es la reducción en el rendimiento, lo cual es una característica común y un aspecto económico importante de las virosis en plantas. El menor rendimiento puede deberse a veces a una reducción tanto en el tamaño como en el número de frutas o semillas (Hull, 2014). En México las pérdidas de producción causadas por virus oscilan desde un 20% hasta 100% (INIFAP, 2014); siendo aún más específicos, las pérdidas causadas por el *Virus del Mosaico del Tabaco* (TMV) son de 1 billón de dólares por año alrededor del mundo (Waziri *et al.*, 2015).

En general, las plantas contaminadas por virus se contagian por vectores portadores de virus como son ácaros, trips, mosca blanca y áfidos; también pueden transmitirse por semilla contaminada o por contacto mecánico. El TMV es un tipo de virus de RNA que pertenece al género *Tobamovirus*. Se transmite comúnmente por contacto y por el uso de semillas contaminadas, es considerado uno de los virus más perjudiciales debido a que es particularmente estable. Este virus puede permanecer infeccioso en residuos de plantas contaminadas, compost, suelo y agua de riego (Parisi *et al.*, 2020). Las pérdidas ocasionadas por virus son a menudo infravaloradas, esto es porque los virus no matan a las plantas, sino que afectan la calidad y rendimiento de los cultivos. Las enfermedades virales son

económicamente importantes cuando causan una desviación significativa en el crecimiento de una planta (Hull, 2014).

Al día de hoy, el manejo de virosis en plantas no tiene agentes antivirales tan efectivos como aquellos para el control de hongos y bacterias. Por lo tanto, el esfuerzo de mantener la sanidad vegetal se limita al manejo preventivo mediante buenas prácticas agrícolas, así como el uso de variedades resistentes a virus. El control químico, por otro lado, se basa en el cambio de la carga superficial de los virus. Sin embargo, su uso inadecuado ha generado resistencia a fármacos, disminuyendo la eficacia de la estrategia de control, además de los riesgos que supone a nuestra salud y seguridad alimentaria. Debido a lo anterior es necesario encontrar alternativas de manejo contra virus que impliquen menores o nulos riesgos a la salud y el medio ambiente.

El uso de la nanotecnología como herramienta en la estrategia del manejo de enfermedades ha introducido innovadores campos de investigación con aplicaciones de interés agrícola, como son el uso de nanopartículas para el desarrollo de nanofertilizantes, nanoplaguicidas y nanobiosensores. Las nanopartículas (NP) son materiales con tamaño de partículas < 100 nm en al menos una de sus tres dimensiones (largo, alto y ancho). La actividad biológica de las NP esta estrechamente relacionada con las propiedades fisicoquímicas como son la morfología, carga superficial, tamaño, concentración entre otras. Estas propiedades, son resultado de las condiciones de síntesis bajo las que fueron formados como también de los materiales utilizados (Siddiqi and Hunsen. 2017). Una ventaja útil de la nanoescala es que son semejantes a tamaños presentes en moléculas biológicas y por tanto posibilitan el fácil acceso de las NP dentro de las células. Las NP con tamaños inferiores a 50 nm pueden atravesar la pared celular y transportarse vía simplástica, mientras que las NP de tamaños más grandes (200 nm) se traslocan vía apoplastica (Paramo *et al.*, 2020).

Adicionalmente, la actividad antimicrobiana de las NP en plantas se da a través de distintos mecanismos de acción. Por ejemplo, en bacterias lo más aceptado es que la simple adhesión de las NP con los lipopolisacáridos de las membranas bacterianas compromete la integridad de la membrana y de este modo se ejerce el efecto antimicrobiano (Jacobson *et al.*, 2015). Para el caso de los virus, se proponen dos mecanismos de actuación mediado por NP; el 1) es la agregación de las NP sobre la capsida viral, lo cual imposibilita el reconocimiento y entrada a la célula evitando de este modo una infección sistémica, el 2) mecanismo, implica la interacción NP-virus, la cual produce especies reactivas de oxígeno (ROS) *in situ*, y debido a la proximidad con el virus desintegran la cubierta proteica viral; de este modo se logra su inactivación permanente (Vecitis, 2020).

Dentro del abanico de posibilidades, las nanopartículas de óxido de zinc (NP-ZnO) presentan la versatilidad de usarse como nanofertilizante y nanoplaguicida. El Zn es un micronutriente y se encuentra presente en más de 300 enzimas, Reddy Pullagurala *et al.*, (2018) reportan que las NP-ZnO aumentan la cantidad de pigmentos fotosintéticos carotenoides y clorofila en cilantro, también benefician la toma de nutrientes y agua del suelo al favorecer la formación de raíces adventicias en trigo (Anderson *et al.*, 2017) y mejoran la actividad enzimática del suelo (Asadishad *et al.*, 2018). Como nanoplaguicida, está ampliamente reportada su actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos (Malandrakis *et al.*, 2019) y recientemente, la aplicación de NP-ZnO como manejo antiviral ha sido probado en plantas modelo. Por ejemplo Abdelkhalek & Al-Askar (2020) usaron plantas de jitomate infectadas con TMV para evaluar la actividad antiviral con 100 µg/mL de NP-ZnO sintetizadas biogénicamente a partir de extractos de hierbabuena; sus resultados sugieren que con tamaños de partícula esféricos de 75 nm se logra disminuir significativamente la expresión viral respecto del control con TMV (63.55 a 136.6), después de aplicar foliarmente un doble tratamiento con NP 24 h antes y 24 h después de la infección con TMV.

Con esta propuesta se pretende generar evidencia científica de la actividad antivírica que presentan las nanopartículas de óxido de Zinc contra el *Virus Mosaico del Tabaco* en *Capsicum annuum*, además de dilucidar parte del mecanismo de las NP-ZnO sobre el virus y proponer concentraciones eficaces de control sin causar fitotoxicidad.

II. ANTECEDENTES

Uno de los desafíos más difíciles en la producción de los cultivos es la infección viral; esta representa una amenaza para la seguridad alimentaria humana debido a que carece de estrategias de control efectivas. Las interacciones entre las nanopartículas, los fitopatógenos de plantas y las respuestas de las plantas han atraído una atención creciente para el estudio de la actividad antiviral (Cai *et al.*, 2019).

La influencia de las nanopartículas en las plantas, respalda la idea de que las NP pueden emplearse como una nueva estrategia antiviral en la agricultura. Cai y colaboradores (2019), reportan que la aspersion diaria durante 12 días con NP-ZnO en plantas de tabaco inoculadas con TMV, inhibe marcadamente su replicación debido a la activación del sistema de defensa de la planta.

Ghaffari y colaboradores (2019) reportaron actividad antiviral post-infección en células animales contra el virus de la influenza H1N1, usando nanopartículas NP-ZnO de forma esférica con un tamaño de 20nm a 50nm y, nanopartículas pegelizadas ZnO-PEG-NP con un tamaño de 16nm-20nm a concentraciones de 25, 75, 100, y 200 µg/mL. Sus resultados muestran que usando una concentración de 75 µg/mL se observan tasas de inhibición de 78.2% y 52.2% para ZnO-PEG-NP y NP-ZnO respectivamente. Su estudio sugiere que las PEG-ZnO-NPs podrían ser un agente antiviral novedoso, efectivo y prometedor contra la infección por el virus de la influenza H1N1.

Por otro lado, estudios similares usando otro tipo de nanopartículas han sido probados. Elbeshehy y colaboradores (2015), mostraron excelente actividad antimicrobiana *in vitro* contra patógenos humanos y una considerable actividad antiviral contra el Virus del Mosaico del Frijol Amarillo (BYMV) en Haba, usando NP-Ag sintetizadas a partir de cepas bacterianas, con tamaño de partículas entre el rango de 77–92 nm. Sus resultados sugieren que el tratamiento post-inoculo (es decir, 24 horas después de la inoculación) previenen todos los síntomas destructivos causados por el virus, mientras que los síntomas débiles de BYMV se observaron cuando las plantas fueron tratadas con NP-Ag simultáneamente con la infección.

Sharma y colaboradores (2018), evaluaron las propiedades antivirales contra el virus chikungunya, usando NP-Ag sintetizadas a partir de extractos de plantas de *Andrographis paniculata*, *Phyllanthus niruri* y *Tinospora cordifolia*. Sus resultados basados en ensayos de citotoxicidad en células Vero, revelaron que las NP-Ag de *A. paniculata* fueron más citotóxicos con un valor de dosis máxima no tóxica (MNTD) de 31.25 µg / mL seguido de *P. niruri* (MNTD, 125 µg / mL) y NP-Ag de *T. cordifolia* (MNTD), 250 µg / ml). El ensayo con NP-Ag de *A. paniculata* inhibieron el virus en su totalidad.

La creciente evidencia científica, que muestran estos materiales a nanoescala con importante actividad antiviral, representa una excelente oportunidad para el desarrollo de nuevos materiales antivirales en la agricultura.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Virus

Un virus es una entidad biológica que es capaz de la proliferación asistida dentro de las células activas y la transmisión entre células y organismos. Un virus consiste en una capa o cápside de proteína que contiene material genético, ADN, ARN.

La cápside de proteína es una molécula multipropósito que proporciona simultáneamente estabilidad para proteger el genoma viral contra el ambiente externo, así como una nanoestructura dinámica que liberará el genoma después de la infección celular. La cápside está compuesta de decenas a cientos de copias de oligómeros de proteínas ensambladas en una estructura metaestable simétrica y típicamente tiene forma icosaédrica (esférica) o helicoidal (tubular) con un diámetro en el rango de 20-200 nm. La metaestabilidad de la cápside surge de los enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y enlaces covalentes débiles (disulfuros), que unen los oligómeros. Biológicamente, el virus primero se une específicamente a un receptor que típicamente está incrustado en la membrana celular, como una glicoproteína, y permite la transferencia activa de los componentes virales a la célula. Fisicoquímicamente, la superficie del virus tiende a estar cargada negativamente e interactúa predominantemente a través de fuerzas electrostáticas e hidrófobas. Esta descripción física básica del virus guiará el desarrollo de los principios fundamentales de diseño de NP para la eliminación e inactivación viral (Vecitis, 2020).

Virus Mosaico del Tabaco

La partícula de TMV es una varilla helicoidal hueca y rígida, con dimensiones de 300 nm de largo, 18 nm de ancho y 4 nm de diámetro interno; está compuesto de 2130 subunidades proteicas idénticas ordenadas en una hélice. La composición de la partícula es aproximadamente 95% de proteína y aproximadamente 5% de ARN. Es una estructura extremadamente estable, se ha informado que retiene la infectividad en extractos no estériles a temperatura ambiente durante al menos 50 años. La estabilidad del ARN del TMV desnudo no es mayor que la de cualquier otro ssRNA. Por lo tanto, la estabilidad del virus con respecto a la infectividad es una consecuencia de las interacciones entre las subunidades proteicas vecinas y entre la proteína y el ARN (Hull, 2014).

Compuestos antivirales

Los antivirales son compuestos utilizados desde la década de 1960 que pueden obtenerse por síntesis química o aislarse de múltiples fuentes como animales, plantas, bacterias u hongos. Su función es interferir en el desarrollo del ciclo viral sin dañar al huésped, debe de poder intervenir en al menos un paso del ciclo viral, que son: 1) reconocimiento celular 2) Penetración celular, 3) Liberación del genoma viral (desintegración de la capsida) 4) Replicación viral (ADN/ARN) 5) Maduración (ensamblaje de aminoácidos) 6) Liberación de la progenie (Villa *et al.*, 2017).

Nanopartículas

El tipo de nanomateriales más estudiado es la nanopartícula, esto es en gran medida debido a su facilidad y eficiencia de producción a partir de una variedad de materiales. Cuando se reduce a nivel nanoescala, el tamaño, la composición y el tipo de moléculas en la superficie de la partícula constituyen una identidad sintética; esto provoca propiedades distintas de las mismas moléculas en la macroescala. La propiedad más útil es el aumento en el área superficial, ya que aumenta el número de átomos en la superficie del material lo cual produce mejores interacciones y efectos cuánticos que pueden afectar la reactividad química y otros efectos físico-químicos. Las características más relevantes en la interacción NP-Virus y actividad antimicrobiana son las siguientes:

Tamaño y concentración de partícula

Esta ampliamente aceptado que un menor tamaño de partícula (mayor área superficial) y mayor concentración son responsables de la actividad antibacteriana de las NP. Las NP se benefician de tener una dimensión similar o menor que el virus objetivo debido a que permite una interacción íntima (Sirelkhatim *et al.*, 2015).

Forma de partícula

La actividad antimicrobiana de una nanopartícula dependiente de la forma, se determina en términos del porcentaje de facetas activas en las NP. Las estructuras de varilla tienen (111) y (100) facetas, mientras que las nanoestructuras esféricas tienen principalmente (100) facetas. Las facetas con una alta densidad de átomos de (111) exhiben una mayor actividad antimicrobiana. Por otro lado, las NP en forma de varillas pueden atravesar más fácilmente las paredes celulares que las NP en forma esférica (Sirelkhatim *et al.*, 2015).

Carga superficial

Las NP deben diseñarse no solo para atraer virus a través de interacciones electrostáticas o fuerzas de van der Waals, sino también para prevenir la auto-agregación. Por lo tanto, un NP con una carga muy positiva suficiente para atraer virus electrostáticamente mientras se repele a sí mismo al mismo tiempo, es una característica deseable. Una manera de obtenerlo sería diseñando una nanopartícula con un alto punto isoeléctrico de modo que se cargue positivamente a pH neutro (Vecitis, 2020).

Recubrimiento superficial

El diseño y la manipulación de la química de la superficie de las NP a través de recubrimientos superficiales ofrece un método racional para mejorar las interacciones nanopartícula-virus. Las NP pueden recubrirse con un receptor celular que imite un oligosacárido reconocido por el virus, una amina orgánica o cualquier nanomaterial que produzca propiedades de atracción viral con el fin de lograr una interacción más específica de las NP-virus (Vecitis, 2020).

Mecanismo de acción de las NP-ZnO

Los distintivos mecanismos de actuación antimicrobiana que se han propuesto en la literatura se enumeran a continuación:

1. *Contacto directo de NP-ZnO con las paredes celulares:* En bacterias Gram positivas, los iones metálicos forman enlaces con los grupos fosfatos presentes en la azúcar de los Liposacaridos de la membrana bacteriana; esta interacción por si misma modifica la integridad de la membrana provocando su disrupción y exposición al medio circundante, en consecuencia, cesan sus funciones vitales (Jacobson, 2015).
2. *Liberación de iones Zn^{2+} antimicrobianos:* El ZnO es una sustancia anfótera, es decir, que puede reaccionar como un ácido o como una base liberando iones Zn^{2+} ; estos cationes forman enlaces con grupos aniónicos de biomoléculas como son proteínas y azucares, presentes en la superficie celular de patógenos como son bacterias, hongos y virus. Por lo tanto, la actividad antimicrobiana del ZnO es directamente proporcional a la capacidad de liberar iones Zn^{2+} (Siddiqi *et al.*, 2018).



3. *Formación de ROS:* Cuando la interacción o adhesión NP-virus ocurre, la nanopartícula puede producir ROS localizadas; lo cual produce la degradación de los receptores de la cápside viral, la estabilidad y pérdida del material genético. La producción de ROS mediada por NP proporciona una solución de inactivación viral permanente (Vecitis, 2020).

El mecanismo de toxicidad varía en función del medio, ya que las especies de Zn disuelto, además de las propiedades fisicoquímicas de los NP-ZnO pueden cambiar según los componentes del medio (Sirelkhathim *et al.*, 2015).

Actividad antioxidante

Los elementos ROS, son intermediarios importantes que se generan a partir de procesos fisiológicos incluida la fotosíntesis, la respiración y la señalización celular. La concentración de ROS dentro de las células está regulada por enzimas, como SOD, CAT y GPX; o de manera no enzimática mediante antioxidantes, incluidos el GSH, vitamina A, vitamina C, complejo de vitamina E (α -tocoferol, tocotrienoles, plastocromanol (PC) y sus derivados hidroxilados), fenoles, flavonoides, carotenoides y antocianinas (Pérez-Labrada *et al.*, 2020). Los elementos ROS biológicamente significativos incluyen radicales libres como: oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), ion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxyl (HO^{\cdot}), hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}), carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$), peroxilo (RO_2^{\cdot}), alcoxilo (RO^{\cdot}) y radicales de dióxido de carbono ($\text{CO}_2^{\cdot-}$); y de forma no radicales, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipobromoso (HOBr), ácido hipocloroso (HOCl), ozono (O_3), peróxidos orgánicos (ROOH) entre otros (Abdal *et al.*, 2017).

De manera general, Las plantas activan su sistema de defensa antioxidante para mitigar los efectos adversos del estrés oxidativo. No obstante, la capacidad de defensa antioxidante depende de varios factores que incluyen la especie vegetal, la edad fisiológica, la tolerancia o sensibilidad en las plantas, así como del tipo de estrés y duración del mismo (Rivero-Montejo *et al.*, 2021).

En las plantas, la enzima SOD está relacionada directamente con el estrés, la cual inicia la primera línea de defensa convirtiendo el ion $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 ; al disminuir el ion superóxido también disminuye la posibilidad de formación del $\cdot\text{OH}$ mediante la reacción Haber-Weiss (Pérez-Labrada *et al.*, 2020). En el sistema de defensa antioxidante enzimático, CAT es una enzima tetramérica que convierte 26 millones de moléculas de H_2O_2 en H_2O en 1 minuto; mientras que POD oxida principalmente el PhOH para producir el radical fenoxilo (PhO^{\cdot}), más comúnmente conocido como Q_A , donde el H_2O_2 acepta electrones y se convierte en H_2O . (Hasanuzzaman *et al.*, 2020).

Antioxidantes	Reacción catalizada	Sitios de reacción catalítica
SOD	$2 O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Cloroplasto, peroxisomas, citosol, mitocondria, apoplasto.
CAT	$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$	Peroxisomas.
POD	$2PhOH + H_2O_2 \rightarrow 2PhO\cdot + 2 H_2O$	Pared celular, apoplasto, vacuola.

Actividad depuradora contra ciertos tipos de radicales libres o ROS

Las actividades antioxidantes se expresan como la inhibición de la oxidación mediada por ROS; o equivalentes de un antioxidante de referencia seleccionado como trolox, ácido ascórbico u otro compuesto dependiendo de las reacciones químicas involucradas, estos ensayos se dividen en dos categorías 1) ensayos basados en la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y 2) ensayos basados en la reacción de transferencia de un solo electrón (ET). Los ensayos químicos para la medición de la actividad antioxidante son simples, rápidos y usualmente automatizados, y se usan ampliamente en la selección y evaluación inicial de nuevos compuestos antioxidantes o extractos de productos/subproductos (Zhong and Shahidi, 2015).

DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging)

DPPH es un radical cromógeno estable con un color violeta intenso. Este ensayo se basa en la donación de electrones de antioxidantes para neutralizar el radical DPPH, que se acompaña de un cambio de color que se mide a 517 nm; la decoloración actúa como un indicador de la eficacia antioxidante y se puede informar como EC₅₀, que se define como la concentración del antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (Zhong and Shahidi, 2015).

Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)

El ensayo TEAC se desarrolló por primera vez como un método simple y conveniente para la determinación de la capacidad antioxidante total. El ensayo mide la capacidad de los antioxidantes para eliminar el catión radical estable ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Los antioxidantes pueden neutralizar el catión radical ABTS^{•+}, un cromóforo azul verdoso con absorción máxima a 734 nm generado a partir de ABTS; ya sea por reducción directa por donación de electrones o por extinción de radicales por donación de átomos de hidrógeno, y el equilibrio de estos dos mecanismos generalmente está determinado por la estructura antioxidante y el pH del medio. Los resultados obtenidos mediante el ensayo TEAC se informan como equivalentes de trolox (Zhong and Shahidi, 2015).

III. HIPOTESIS

La aplicación de NP-ZnO en plantas puede inhibir los síntomas causados por TMV sin afectar otras variables fenológicas involucradas; esto probablemente ocurra debido a la capacidad de las NP-ZnO para formar un complejo sobre las subunidades estructurales de la capsida del virión y por tanto su inhibición se manifiesta de manera significativa en relación al manejo convencional.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la utilización de NP-ZnO como manejo del TMV en plantas de Chile reduce significativamente los síntomas en comparación al manejo convencional; adicionalmente evaluar los efectos de la aplicación de las nanopartículas en variables fenológicas de la planta.

Objetivos particulares

1. Medir las variables fenológicas para determinar el efecto de las NP-ZnO sobre el desarrollo de plantas de chile jalapeño (*Capsicum annum.*).
2. Evaluar la carga relativa viral asociadas a la actividad del TMV; la sanidad en plantas de chile jalapeño para determinar el efecto inhibitor de las NP-ZnO sobre el síndrome de TMV y, elucidar parte del mecanismo de acción de las NP-ZnO sobre el TMV a través de ensayos enzimáticos y actividad antioxidante.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas

Las NP-ZnO se sintetizaron bajo un enfoque de método químico; en el cual se disolvieron 0,675 g de acetato deshidratado de zinc $Zn(CH_3CO_2)_2$ en un vaso de precipitado con 50 mL de agua desionizada; una vez disuelto, se diluyó con 200 ml de agua desionizada y luego se adicionaron lentamente 50 ml de NaOH 0.1 M. Finalmente, se aforo la preparación hasta 1 L. La determinación del tamaño y la forma de las NP se realizó en CFATA; usando un Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución marca HITACHI modelo SU8230.

V.2 Condiciones de crecimiento de las plantas y tratamientos utilizados de NP

Se utilizó semilla de chile jalapeño variedad Don Pancho del INIFAP, la cual se germinó en sustrato peat moss con un régimen de riego con solución steiner al 20% hasta un 40% antes del trasplante. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones protegidas con temperaturas y humedad relativa promedio de 21°C y 63% respectivamente. El trasplante se realizó 41 días después de la germinación, se utilizó una mezcla de tezontle: humus: suelo vertisol; en una relación 2:2:5 en bolsas

negra con capacidad de 9L, el esquema de riego en ese momento fue 50% con asenciones graduales hasta un 100% de solución Steiner, pH = 6.3.

El diseño experimental fue completamente al azar con 5 tratamientos y unidad experimental de 4 plantas. Los experimentos se separaron en dos grupos: el grupo pre-inóculo donde las plantas fueron tratadas antes de la infección y; el grupo post-inóculo donde las plantas fueron tratadas después de la infección. La aplicación de tratamientos para ambos grupos fueron de 3 eventos con intervalos de separación de 72 h por evento; los tratamientos y controles usados fueron los siguientes:

T1=0 $\mu\text{g/L}$ de NP-ZnO con Inoculo TMV.

T2=50 $\mu\text{g/L}$ NP-ZnO con Inoculo TMV;

T3 = 100 $\mu\text{g/L}$ de NP-ZnO con Inoculo TMV;

T4 = 150 $\mu\text{g/L}$ NP-ZnO con Inoculo TMV;

T5 = 200 $\mu\text{g/L}$ NP-ZnO con Inoculo TMV;

T6= Agua sin inoculo TMV (Control negativo);

T7= 200 $\mu\text{g/L}$ NP-ZnO sin inoculo TMV (control negativo);

T8= inoculo TMV (control positivo).

El control negativo de agua consistió en 10 plantas mientras que el control negativo con nanopartículas y el control positivo fue de 8 plantas. Finalmente la preparación de soluciones se realizó a partir de la solución madre de 250 mg/L NP-ZnO, donde se utilizó la ecuación de diluciones $C_1V_1 = C_2V_2$, siendo C concentración y V volumen de cada solución respectivamente. Un ejemplo del calculo para hacer 5L del tratamiento 4 se muestra a continuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$(250 \text{ mg/L}) V_x = (150 \text{ } \mu\text{g/L})(5\text{L})$$

$$V_x = \frac{(150 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}})(5\text{L}) \left(\frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}}\right)}{\left(250 \frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \left(\frac{1 \mu\text{g}}{1 \times 10^{-3} \text{ mg}}\right)}$$

$$V_x = 3 \text{ mL}$$

V.3 Medición de variables y toma de muestra

Las variables explicativas ordinales referente a la planta, se midieron semanalmente contando el número de hojas, flores, frutos y midiendo la altura y el diámetro del tallo una vez iniciados los experimentos hasta la duración de los mismos.

Las variable cualitativa nominal tomada fue la escala de sanidad adaptada de Torres-Pacheco (1997), la cual consistió en 5 niveles que fueron los siguientes:

1. Sin daño aparente, no hay presencia de mosaico (planta sana).
2. Daño tenue Aparición de manchas de color verde amarillento (mosaico) en 2-4 hojas.
3. Daño moderado con aparición de hojas rizadas.
4. Daño alarmante de 50 a 80% con presencia de aborto de flores y atrofia del crecimiento .
5. Daño severo con aparición de necrosis en hojas, aborto de flores y defoliación.

La toma de muestra se realizo 20 días después de la infección y aplicación de tratamientos. El cual consistió en cortar muestras de hojas de la parte superior e inferior de 2 plantas diferentes por cada tratamiento, las cuales se colocaron dentro de papel aluminio y se sumergieron en nitrógeno líquido para su preservación;

posteriormente se resguardaron en bolsas ziploc y se mantuvieron con hielo seco hasta su traslado y almacenamiento en el ultracongelador del laboratorio A4 del campus amazcala.

V.4 Inoculación del TMV

La muestra de TMV fue proporcionada por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Recinto Iztacala. Para asegurar la suficiente cantidad de inóculo en los experimentos, primero se propagó el inóculo a través de plántulas de tabaco, las cuales se inocularon con el extracto de TMV; éste último se preparó en una proporción 1:10 con buffer de extracción general (GEB) del kit DAS-ELISA Agdia. La infección de los experimentos se realizó usando un hisopo con carborundum 100 por frotación mecánica sobre las hojas de plántulas de chile con 6 hojas verdaderas (Dijkstra and De Jager, 1998).

V.5 Actividad enzimática y capacidad antioxidante

V.5.1 Preparación del extracto enzimático

La muestra de tejido sintomático se homogeneizó en mortero con nitrógeno líquido para cada tratamiento; se pesó aproximadamente 300 mg de muestra homogeneizada en viales ependorf previamente tarados y se adicionó 2 mL de buffer de extracción Fosfato de Potasio 0.05 M, pH 7.8 a 4 °C (se mezcló 0.7054 g de fosfato de potasio monobásico y 3.46 g de fosfato de potasio dibásico en 150 mL de agua destilada. Finalmente se ajustó el pH a 7.8 y se aforó a un volumen final de 250 mL con agua destilada), enseguida se agitó en vortex durante 2 minutos y se centrifugó la mezcla a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Finalmente se separó el sobrenadante (extracto enzimático) y se almacenó a 4 °C hasta su análisis (Toscano *et al.*, 2018).

V.5.2 Cuantificación de Proteína

La cuantificación de proteína se determinó de acuerdo al método reportado por Bradford (1976). La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm por la cuantificación del complejo azul brillante de Coomassie G-250 con la proteína de la muestra. Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Solución Stock de albúmina de suero bovino (20 mg/mL). Reactivo Thermo Scientific

Reactivo Bradford Reactivo Thermo Scientific

Curva de calibración

La curva patrón se realizó a partir de la solución stock de albumina a 20 mg/mL, con la cual se preparó 650 μ L de la dilución a 1.4 mg/mL. De esta última se tomaron los volúmenes de 28.6 μ L, 85.7 μ L, 114.3 μ L, 142.9 μ L los cuales se aforaron a un volumen final de 200 μ L con buffer de extracción Fosfato de Potasio 0.05 M, pH 7.8. Las concentraciones finales fueron de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1 mg/mL de proteína estándar respectivamente. La producción del complejo azul brillante se desarrolla con la adición del reactivo de Bradford bajo la relación de una parte de proteína por 30 partes de reactivo Bradford, de tal modo que se tomó un volumen de 50 μ L por triplicado de cada solución de proteína estándar y se adicionó 1.5 mL de reactivo Bradford, se agito y se dejó reposar en oscuridad durante 20 minutos. Finalmente se tomó la absorbancia a 595 nm. El blanco de reacción se midió con 1.5 mL de buffer de extracción de fosfatos.

Procedimiento en celda

Se coloraron 50 μ L de extracto enzimático (ver V.4.1) con 1.5 mL de reactivo de Bradford (previamente aclimatado a temperatura ambiente) en viales ependorf de 2mL correctamente etiquetados, enseguida se agitó en vortex durante 30 segundos. Se dejaron reposar en la oscuridad durante 20 minutos (desarrollo de color azul) y se midió la absorbancia en el espectrofotometro X modelo Y. El blanco de reacción utilizado fue buffer de fosfatos. La cuantificación de proteína en la muestra se calculó a partir de la ecuación de regresión lineal de la curva patrón.

V.5.3 Actividad de Fenilalanina-amonio liasa (PAL)

Se determinó la actividad de PAL (Fenilalanina-amonio liasa, por sus siglas en inglés) de acuerdo al método reportado por Toscano et al. (2018), con modificaciones. La actividad de PAL se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 290 nm por la cuantificación de ácido cinámico formado a partir de la catálisis de L-fenilalanina.

L-Fenilalanina \rightarrow Ácido cinámico

(Sustrato) (Producto)

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Búfer de reacción (Borato 0.1 M, L-Fenilalanina 10 mM, pH 8.8). Se mezcló 0.451 g de ácido bórico, 1.029 g de borato de sodio y 0.1652 g de L-Fenilalanina en 60 mL de agua destilada; posteriormente se ajustó el pH a 8.8 (con ácido o base, según corresponda). Finalmente se aforó a 100 mL con agua destilada.

Solución de ácido clorhídrico (HCl) 1N. En un matraz aforado de 100 ml, se colocó 20 mL de agua destilada y se añadió 8.3 mL de HCl (por las paredes del

matraz con precaución), finalmente se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

Solución Stock de ácido cinámico (20 mg/mL). Se disolvió 0.5 g de ácido cinámico en 15 mL de etanol, se aforó con agua destilada hasta un volumen final de 25mL.

Curva de calibración

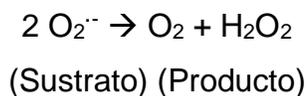
La curva patrón se realizó a partir de la solución stock de ácido cinámico a 20 mg/mL; de ésta se tomaron los volúmenes de 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 μ L los cuales se aforaron a un volumen final de 2000 μ L con mezcla etanol-agua (1.5:1). Las concentraciones finales fueron de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 mg/mL. Finalmente se tomó la absorbancia a una longitud de onda de 340nm; el blanco de reacción se midió con 1.5 mL de la solución etanol-agua.

Procedimiento en celda

Se colocaron 1.15 mL de buffer de reacción y se añadió 100 μ L de extracto enzimático en viales ependorf de 2 mL, enseguida se preparó un baño maría a 40 °C donde se incubaron los viales durante 60 minutos. Después del tiempo de incubación se añadió 0.5 mL de HCl 1N para detener la reacción y se dejó reposar durante 10 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm; el blanco de reacción se midió con 1.5 mL de buffer de reacción de Borato 0.1 M, L-Fenilalanina 10 mM, pH 8.8. La actividad de PAL en la muestra se calculó a partir de la ecuación de regresión lineal de la curva patrón.

V.5.4 Actividad de Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se determinó de acuerdo al método reportado por Hayat et al. (2018). La actividad se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 560 nm por la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio.



Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Buffer de reacción (Fosfato de potasio 0.05 M, pH 7.8). Se mezcló 0.7054 g de fosfato de potasio monobásico y 3.46 g de fosfato de potasio dibásico en 150 mL de agua destilada; enseguida se ajustó el pH a 7.8 (con ácido o base, según sea el caso) y finalmente se aforó a un volumen final de 250 mL con agua destilada.

Solución de EDTA-Na₂ 0.1 mM. Se disolvió 3.72 mg en 60 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 100 mL.

Solución de Metionina 0.13 M. Se disolvió 1.94 g de metionina en 60 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 100 mL.

Solución de NBT 0.75 mM. Se disolvió 61.3 mg de NBT en 60 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 100 mL. Se almacenó en frasco ambar a 4 °C.

Solución de Riboflavina 0.02 mM. Se disolvió 1.88 mg de metionina en 150 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 250 mL. Se almacenó en frasco ambar a 4 °C.

Procedimiento en celda

Se colocaron 1.5 mL de buffer de reacción en un tubo de ensayo y se añadió 300 µL de EDTA-Na₂ 0.1 mM, 300 µL de Metionina 0.13 M, 300 µL de NBT 0.75 mM, 300 µL de Riboflavina, 250 µL de agua destilada y 50 µL del extracto enzimático.

Enseguida se mezcló por inversión de tubos y se expusieron a luz fluorescente durante 30 min (desarrollo de color). Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm; el blanco de reacción se preparó con todos los reactivos excepto el extracto enzimático el cual se sustituyó por agua destilada. La cuantificación de las unidades enzimáticas de SOD se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde

A = Absorbancia de la muestra.

B = Absorbancia del blanco de reacción.

A partir de la curva de inhibición de reducción de NBT vs actividad de SOD se obtiene la siguiente ecuación:

$$y = 8.6026 \ln(x) + 55.836 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde

y = % inhibición

x = Actividad de SOD (U/mL)

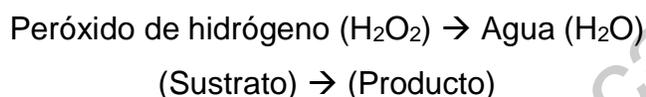
Despejando x

$$x = e^{\left(\frac{y-55.836}{8.6026}\right)} \quad (\text{Ec. 4})$$

Sustituir (y) por la absorbancia de la muestra para obtener la actividad de SOD (x)

V.5.5 Actividad de Catalasa (CAT)

Se determinó la actividad de CAT de acuerdo al método reportado por Afiyanti & Chen (2014) con modificaciones. CAT se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 240nm por la cuantificación de peróxido de hidrógeno catalizado.



Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Buffer de reacción (Fosfato de potasio 50 mM, pH 8.0). Se mezcló 0.0965 g de fosfato de potasio monobásico y 0.749 g de fosfato de potasio dibásico en 60 mL de agua destilada. Finalmente se ajustó el pH a 8.0 (con ácido o base, según sea el caso) y se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

Solución de H₂O₂ 100 mM. Se tomó 566 µL de peróxido de hidrogeno al 50% y se aforó a 100 mL con agua destilada. Esta solución se preparó con unos minutos de anticipación a su uso.

Procedimiento en celda

Se colocaron 2 mL del buffer de reacción y 200 µL de la solución de peróxido de hidrógeno en una celda de cuarzo, enseguida se añadió 100 µL del extracto enzimático, se agitó y se midió el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 240 nm durante 10 segundos el primer minuto y posteriormente cada minuto hasta completar 6 minutos. Las unidades enzimáticas de CAT se calcularon con la siguiente ecuación:

$$U = \frac{(\Delta A_{240nm})(V_t)(FD)}{(\epsilon)(V_e)(l)} \quad (\text{Ec. 5})$$

ΔA_{240nm} = Diferencia entre la Absorbancia final (min 6) – Absorbancia inicial (min 1)

V_t = Volumen total de ensayo en mL

V_e = Volumen del extracto enzimático en mL

ϵ = coeficiente de extracción molar de H_2O_2 ($0.0394 \frac{M}{m \text{ cm}}$)

l = Longitud de la celda en cm.

FD = Factor de dilución

V.5.6 Actividad de Peroxidasa (POD)

La actividad de POD se midió espectrofotométricamente usando el Kit de ensayo Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase. El reactivo Amplex® Red (10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina) en combinación con peroxidasa de rábano (HRP), se ha utilizado para detectar el H_2O_2 . En presencia de peroxidasa, el reactivo Amplex® Red reacciona con H_2O_2 en una estequiometría 1:1 para producir el producto de oxidación rojo fluorescente, resorufina.

Las soluciones stock utilizadas fueron las siguientes:

Buffer de reacción 1X se mezcló 4 mL de buffer de reacción 5X (vial tapa blanca) con 16 mL de agua desionizada. Los 20 mL preparados son suficientes para realizar 100 ensayos y soluciones stock.

Solución stock 10 U/mL Horseradish Peroxidase (HRP) se disolvió el contenido de HRP (vial tapa amarilla) en 1mL de buffer de reacción 1X. El resto de stock se dividió en viales ependorf con 1mL cada uno y se almacenó a -20°C .

Solución Amplex® Red 10 mM los reactivos Amplex® Red (vial tapa azul) y DMSO (vial tapa verde) se aclimataron a temperatura ambiente antes de mezclarse y deben

usarse el mismo día de su preparación. Enseguida se mezcló el contenido del vial azul con 60 μL de DMSO, ésta solución es suficiente para realizar 100 ensayos.

Solución de H_2O_2 20 mM se diluyó 22.7 μL de la solución stock de H_2O_2 0.88 M (3%) en 977 μL de buffer de reacción 1X. Ésta solución es poco estable, razón por la cual debe prepararse poco antes de su uso para evitar su degradación.

Solución de trabajo 100 μM Amplex® Red - 2 mM H_2O_2 se mezcló 50 μL de la solución Amplex® Red 10 mM, 500 μL de H_2O_2 20 mM y 4.45 mL de buffer de reacción 1X.

Curva de calibración

La curva patrón se realizó a partir de la solución stock 10 U/mL HRP, de la cuál se tomó 1 μL y se agregaron 999 μL del buffer de reacción 1X en un vial ependorf para obtener una concentración de 10 mU/mL. De ésta última solución se tomaron los volúmenes 6, 12, 20, 26, 32, 40 μL los cuales se diluyeron con buffer de reacción 1X a un volumen final de 200 μL para obtener las concentraciones finales de 0.3, 0.6, 1, 1.3, 1.6 y 2 mU/mL respectivamente. Enseguida se colocaron por triplicado 50 μL de cada solución estándar y 50 μL de la solución de trabajo 100 μM Amplex® Red - 2 mM H_2O_2 , en diferentes celdas de reacción de una microplaca de polietireno. Finalmente se incubó bajo oscuridad durante 30 minutos y se tomaron las absorbancias en un espectrofotómetro Thermo Scientific MULTISKAN GO a una longitud de onda de 560 nm.

Procedimiento en microplaca

se mezcló 1.1 μL del extracto enzimático y 48.9 μL del buffer de reacción (dilución adecuada para evitar la oxidación de resorufin a resazurin) en celdas individuales de una microplaca de polietireno, enseguida se adicionó 50 μL de la solución de trabajo 100 μM Amplex® Red - 2 mM H_2O_2 y se dejó incubar bajo oscuridad durante 30 minutos (desarrollo de color rojo); finalmente se leyó la absorbancia a una

longitud de onda de 560 nm. El control negativo se realizó con 50 µL de buffer de reacción 1X, mientras que el control positivo se realizó con 50 µL de HRP 2 mU/mL.

V.5.7 Preparación del extracto metanólico

El extracto para la medición de actividad antioxidante se preparó homogeneizando el tejido sintomático en mortero con nitrógeno líquido, enseguida se pesaron 9 mg de muestra homogénea y se adicionó 15 mL de metanol en un tubo de ensayo. La extracción se mantuvo bajo oscuridad y en agitación durante 24 horas.

V.5.8 Actividad de eliminación de radicales DPPH• (DRSA)

La determinación de DRSA se realizó de acuerdo al método de Chen et al. (2012) con modificaciones. Se mezcló 0.5 mL del extracto metanólico (ver V.4.7) y 0.5 mL del radical DPPH• 0.1 mmol/L (se pesó 3.94 mg y se aforó a 100 mL con metanol), se agitó vigorosamente y se dejó incubar en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se tomó la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm; el blanco de reacción fue metanol y el control agua destilada. El % DRSA se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ARSA} = [1 - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

Curva de calibración

V.5.9 Actividad de eliminación de radicales ABTS•+ (ARSA)

La determinación de ARSA se realizó de acuerdo al método de Re et al. (1999) con modificaciones. El radical ABTS•+ se generó mezclando la solución stock de ABTS 7 mmol/L con persulfato de potasio 2.45 mmol /L bajo oscuridad (generación del radical ABTS•+) 12 horas previo al análisis. Enseguida se diluyó la solución ABTS•+

en buffer de fosfato salino (PBS) a 0.15 M/L, pH 7.4 hasta obtener una lectura de 0.7 Abs a una longitud de onda de 734 nm. Posteriormente se mezclaron 3 mL de ésta última solución con 150 μ L del extracto metanólico (ver V.4.7) en una celda de vidrio, finalmente se midió el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 734 nm cada minuto durante 6 minutos. El blanco de reacción utilizado fue PBS y el control agua destilada. El % ARSA se calculó de acuerdo la siguiente ecuación (6).

V.6 Carga relativa viral

Para confirmar indirectamente la tasa de inhibición de TMV, se utilizó el kit PathoScreen para TMV de Agdia DAS-ELISA para cuantificar la acumulación de antígeno viral. La prueba “double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay” por sus siglas en inglés DAS-ELISA consistió en los siguientes pasos:

1. **Adición del anticuerpo** se requieren 10 mL de anticuerpo de captura para la utilización completa de la microplaca (96 celdas de reacción); éste se preparó diluyendo 0.1 mL de anticuerpo con 9.9 mL del buffer de recubrimiento de carbonato (CAB) (mezclar 1 mL de CAB con 9 mL de agua destilada). Enseguida 100 μ L de anticuerpo fue colocado en cada celda de reacción de la microplaca de polietireno y se dejó incubar dentro de un refractario húmedo durante 4 horas o bien a 4°C durante la noche.
2. **Adición del antígeno** después del tiempo de incubación se vació la microplaca y se lavó 3 veces con buffer de lavado PBST (disolver 5g en 500 mL de agua destilada), lista la microplaca, se colocaron 100 μ L de los controles del kit recién preparados, 100 μ L del extracto de cada muestra (antígeno) y controles del experimento en diferente celda de reacción. Los extractos y controles se preparan homogeneizado el tejido sintomático a través de trituración con nitrógeno líquido; se pesó 30 mg muestra homogeneizada y se maceró con 300 μ L de GEB (Mezclar 10 g Tween 20 + 16.5 g de GEB + 500mL agua destilada), enseguida se recolectó el extracto

en viales ependorf y se mantuvieron en hielo hasta completar todas las maceraciones. Una vez dispuestos los volúmenes se dejó incubar la microplaca dentro de un refractario húmedo durante 2 horas o bien a 4°C durante la noche.

- 3. Adición de la enzima conjugada (doble sandwich)** se requieren 10 mL de enzima fosfatasa alcalina para la utilización completa de la microplaca (96 celdas de reacción); ésta se preparó diluyendo 0.1 mL de enzima con 9.9 mL del buffer ECI (mezclar 2 mL de 5x Buffer ECI con 8 mL de agua destilada). Después del tiempo de incubación con el antígeno, se vació la microplaca y se lavó 8 veces con buffer de lavado PBST, enseguida 100 μ L de enzima fue colocada en cada celda de reacción de la microplaca de polietireno y se dejó incubar dentro de un refractario húmedo durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 4. Adición del sustrato** el sustrato PNP es el cromóforo que confiere el color amarillo en la reacción positiva a TMV. Por esta razón, la cantidad de color producida es proporcional a la cantidad de antígeno unido al anticuerpo. La preparación del sustrato PNP se realiza 5 minutos antes de su uso para evitar su degradación por exposición con la luz; éste se preparó mezclando una tableta de 5 mg PNP con 5 mL de agua destilada en un tubo de ensayo recubierto con papel aluminio. Después del tiempo de incubación con la enzima, se vació la microplaca y se lavó 8 veces con buffer de lavado PBST, enseguida 100 μ L de sustrato se colocó en cada celda de reacción de la microplaca y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y bajo condiciones de oscuridad.
- 5. Curva de calibración** la preparación de la curva patrón se realizó a partir del control positivo de TMV del Kit Adgia con concentración de 1 mg/mL. Se colocaron los volúmenes de 10, 30, 50, 60, 70, 80 y 90 μ L del control y se llevo a un volumen final de 100 μ L con agua destilada para obetener las concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 mg/mL respectivamente. La medición del color se realizó por espectrofotometría usando un

espectrofotómetro Thermo Scientific MULTISKAN GO, modelo SN 1510-02385C a una longitud de onda de 405 nm.

V.7 Análisis estadístico

Los datos recabados para cada variable se ajustaron a una distribución normal mediante la prueba de bondad de ajuste Anderson-Darling (Anderson & Darling, 1954). La significancia estadística para las variables con ajuste normal se determinó mediante ANOVA de un factor seguida de la prueba Tukey α 0.05, mientras que la significancia estadística para las variables con ajuste anormal se determinó mediante pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis post hoc Games Howell α 0.05 (ver Tabla 1). Las pruebas se realizaron usando los paquetes estadísticos JMP Pro 15 y SPSSStatistics.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Caracterización de NP-ZnO

Las imágenes por SEM de las NP-ZnO se muestran en la Figura 1. Se observa que la forma que tienen las NP de estudio son de tipo nanoflores o nanoestrellas. Para la evaluación del tamaño; se usó el programa Image J de procesamiento de imagen del cual se determinó la media de distintas y aleatorias medidas de los “bastones” tipo lámina que se observa en la imagen 1. Los resultados de la medida promedio de las laminas se muestran en la tabla 1, de la cual se obtiene un promedio para el largo es de 84 ± 10 nm hasta 153 ± 12 nm mientras que para el ancho es 23 ± 4 nm hasta 45 ± 5 nm.

	LARGO (nm)	ANCHO (nm)	LARGO (nm)	ANCHO (nm)
1	81.348	20.337	160.845	42.361
2	86.015	31.235	160.845	40.494
3	81.124	21.837	146.003	47.849
4	97.739	19.513	159.706	49.251
5	78.75	21.072	131.345	38.697
6	93.983	21.187	161.23	49.376
7	67.891	22.63		
PROMEDIO	83.84	22.54	153.33	44.67
Desviación estandar	9.96	3.96	12.27	4.73

Tabla 1. RESULTADOS DEL TAMAÑO DE NP-ZnO. Resultados del procesamiento de imagen de las medidas del largo y ancho para diferentes bastones de NP-ZnO.

El tamaño promedio de las nanoestrellas de NP-ZnO están en el rango de los micrometros, no obstante, la unidad estructural dispuesta a manera de bastones está en la escala nanométrica, con porosidad textural que resulta útil en procesos de adsorción con otras partículas del medio circundante. Finalmente, la obtención de éstos resultados son debidos, posiblemente, a las modificaciones en la síntesis original estandarizada por la Facultad de Ingeniería, campus Aeropuerto, donde el cambio del solvente alcoholico por agua así como el cambio de temperaturas frías a temperatura ambiente; pudieron influir en la obtención de micropartículas en lugar de nanopartículas.

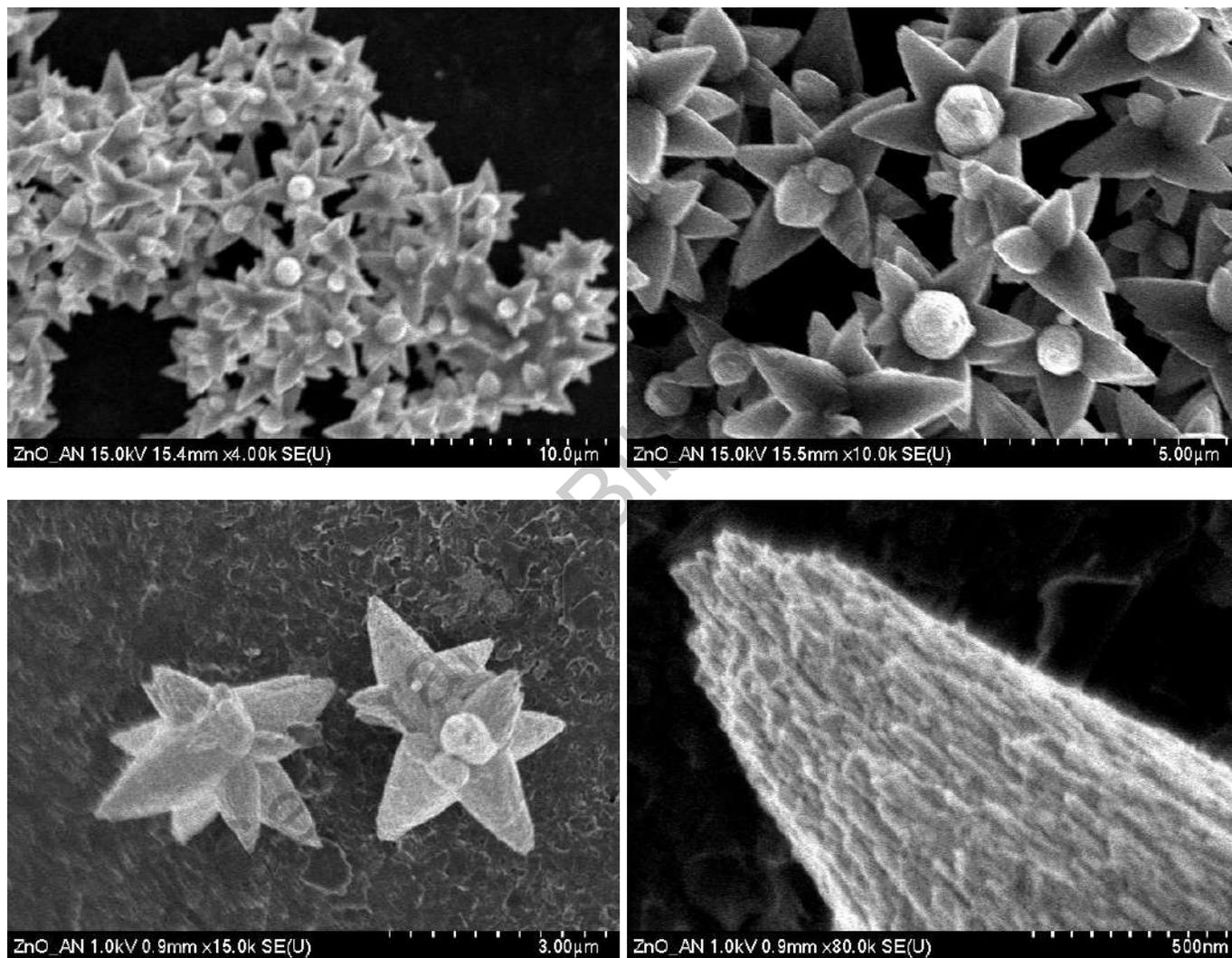


Imagen 1. Imágenes de la microscopía electrónica de barrido de las NP-ZnO utilizadas.

VI. 2 Normalidad de variables

La evaluación de la distribución normal para las variables explicativas se muestran en la Tabla 2. Las variables con distribución en forma de campana de Gauss (normal) para el experimento preinóculo son: carga viral, número de hojas y número de flores; mientras que las variables normales para el experimento postinóculo fueron: carga viral, altura y número de flores. El resto de las variables explicativas no se ajustan a una distribución normal, razón por la cual fue necesario el uso de análisis no paramétricos Kruskal Wallis; los cuales usan los rangos en lugar de la media como requiere ANOVA, para encontrar apropiadamente las diferencias. La prueba post hoc de Games Howell es la más utilizada para encontrar las diferencias entre tratamientos, analoga a la prueba Tukey.

Variable	<i>Preinóculo</i>		<i>Postinóculo</i>	
	Prueba de bondad de ajuste Anderson-Darling	Análisis estadístico	Prueba de bondad de ajuste Anderson-Darling	Análisis estadístico
Sanidad	No Normal	Kruskall Wallis – Games Howell	No Normal	Kruskall Wallis – Games-Howell
Carga viral	Normal	ANOVA - Tukey	Normal	ANOVA - Tukey
Altura	No Normal	Kruskall Wallis – Games Howell	Normal	ANOVA - Tukey
Diámetro	No Normal	Kruskall Wallis – Games Howell	No Normal	Kruskall Wallis – Games-Howell
Hojas	Normal	ANOVA - Tukey	No Normal	Kruskall Wallis – Games-Howell
Flores	Normal	ANOVA - Tukey	Normal	ANOVA - Tukey
Frutos	No Normal	Kruskall Wallis – Games Howell	No Normal	Kruskall Wallis – Games-Howell
Largo	Normal	ANOVA - Tukey	Normal	ANOVA - Tukey
Ancho	No normal	Kruskall Wallis – Games-Howell	No normal	Kruskall Wallis – Games-Howell
Peso	No normal	Kruskall Wallis – Games-Howell	No normal	Kruskall Wallis – Games-Howell

Tabla 2. Resultados de la distribución de ajuste normal de las variables explicativas de estudio.

VI.3 Evaluación de las NP en la planta

El adecuado manejo agronómico en los cultivos permite lograr el máximo desarrollo de altura, área foliar, flores, frutos entre otras características fisiológicas; aunado a esto, la planta presenta la mejor condición contra el ataque por patógenos, sin embargo, la pérdida de producción por enfermedades virales en Chile puede ocurrir aun teniendo no tan malos escenarios. Por otro lado, para evaluar la estrategia de manejo de TMV con NP-ZnO, éstos materiales deben garantizar ser bioseguros y presentar el mínimo o nulo efecto adverso sobre las plantas. La evaluación de dicho efecto de la aplicación de NP-ZnO sobre cada variable explicativa será descrito a continuación:

VI.3.1 Altura

La variable altura del experimento preinóculo no presentó diferencias significativas entre tratamientos y controles (ver Tabla 3); los resultados sugieren que la aplicación foliar con NP-ZnO antes de la inoculación del virus no afecta el crecimiento de las plantas. El gráfico 1, muestra la significancia estadística de los tratamientos y controles para el experimento de postinóculo. Los resultados señalan que el control negativo con agua presentaron la mayor altura seguido del control negativo con NP; éstos dos grupos son estadísticamente distintos entre ellos y los tratamientos. Entre tratamientos no hay diferencias significativas, lo que es igual a que crecen similarmente entre ellos e igual al TMV y control con NP, con la excepción del T5 que es el tratamiento con menor altura. Los resultados sugieren que la aplicación con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de la infección viral puede comprometer el crecimiento de las plantas.

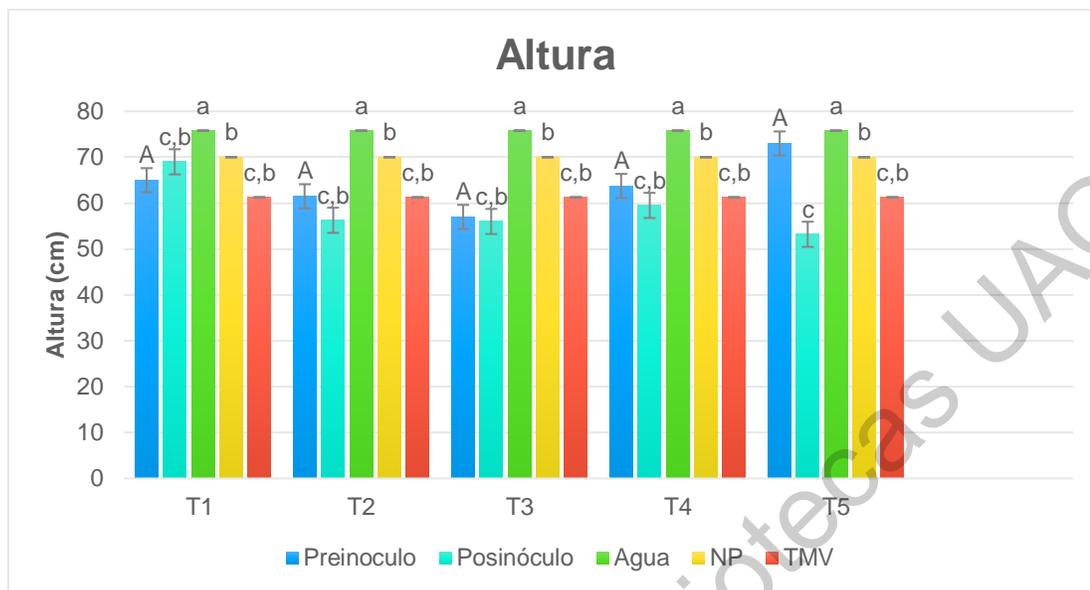


Gráfico 1. Resultados de la variable altura para los experimentos preinóculo, posinóculo y controles. Preinóculo = 72h antes de la inoculación; Postinóculo = 72 h después de la inoculación; Agua = Control negativo con agua; NP = Control con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP-ZnO y TMV = Control positivo con TMV (sin NP).

VI.3.2 Diámetro

La variable diámetro del experimento preinóculo no presentó diferencias significativas entre tratamientos y controles (ver Tabla 3); los resultados sugieren que la aplicación foliar con NP-ZnO antes de la inoculación del virus no afecta el crecimiento del tallo. El gráfico 2. muestra la significancia estadística de los tratamientos y controles para el experimento de postinóculo. Los resultados señalan que los tratamientos T3, T4 Y T5 son similares a los controles con agua, NP y TMV; mientras que los tratamientos T1 Y T2 presentaron la menor anchura del tallo. Los resultados sugieren que la aplicación de NP-ZnO después de la infección viral con dosis de 100 a 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ no afectan la anchura del tallo; mientras que menores dosis pueden tener menor anchura del tallo. Esto sugiere un efecto positivo en el crecimiento de las plantas tras la aplicación de NP-ZnO con dosis mayores.

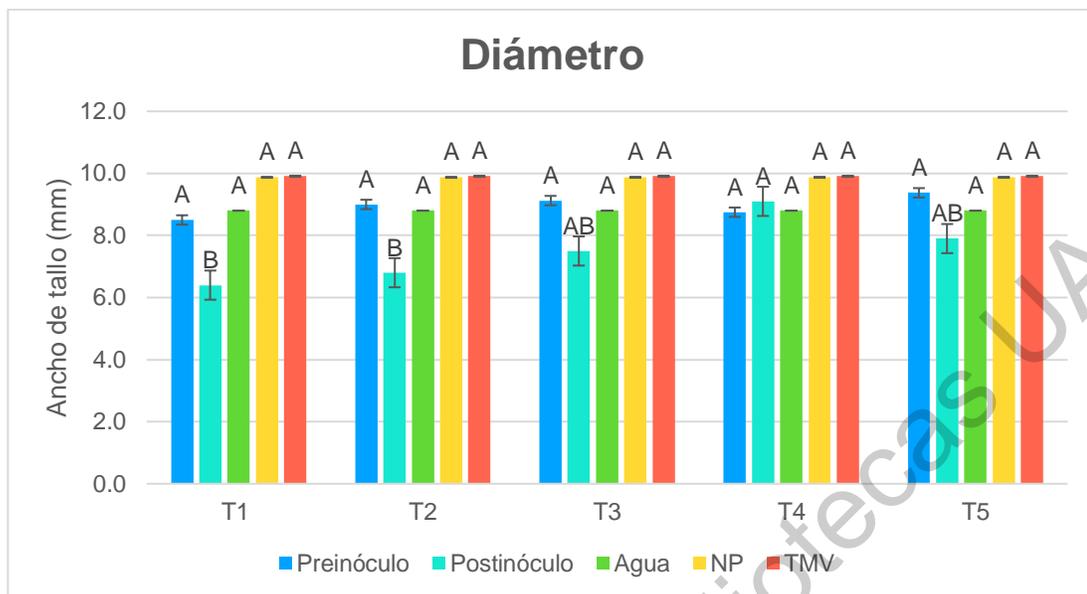


Gráfico 2. Resultados de la variable diámetro para los experimentos preinóculo, posinóculo y controles. Preinóculo = 72h antes de la inoculación; Postinóculo = 72 h después de la inoculación; Agua = Control negativo con agua; NP = Control con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP-ZnO y TMV = Control positivo con TMV (sin NP).

VI.3.3 Número de hojas

La variable número de hojas del experimento preinóculo no presentó diferencias significativas entre tratamientos y controles (ver Tabla 3); los resultados sugieren que la aplicación foliar con NP-ZnO antes de la inoculación del virus no afecta el área foliar. El gráfico 3. muestra la significancia estadística de los tratamientos y controles para el experimento de postinóculo; los cuales señalan que el T1, T3, T4 Y T5 son similares en número de hojas que los controles con NP, agua y TMV; mientras que el T2 presentó el menor número de hojas. Los resultados sugieren que la aplicación de NP-ZnO después de la infección viral con dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puede afectar el número de hojas; mientras que mayores dosis no produce ese efecto.

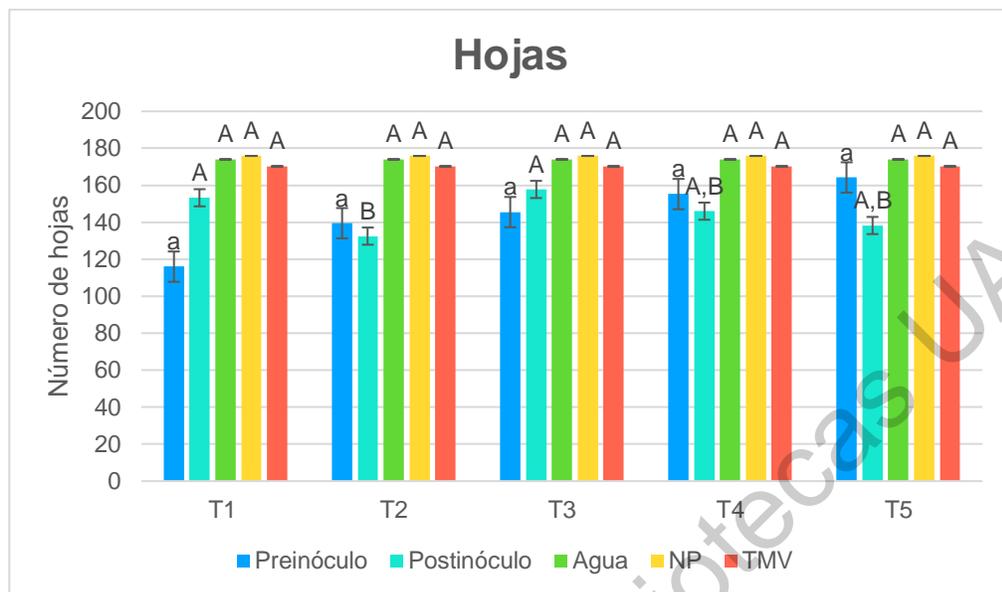


Gráfico 3. Resultados de la variable número de hojas para los experimentos preinóculo, posinóculo y controles. Preinóculo = 72h antes de la inoculación; Postinóculo = 72 h después de la inoculación; Agua = Control negativo con agua; NP = Control con 200 $\mu\text{g/mL}$ NP-ZnO y TMV = Control positivo con TMV (sin NP).

VI.3.4 Número de flores

La variable número de flores para el experimento de preinóculo no presenta diferencias significativas entre tratamientos y controles (ver Tabla 3); los resultados sugieren que la aplicación foliar con NP-ZnO antes de la inoculación del virus no afecta el número de flores. El gráfico 4. muestra la significancia estadística de los tratamientos y controles para el experimento de postinóculo; en el cual similar a preinóculo, el número de flores no se ve afectado, o lo que es igual, la aplicación de NP-ZnO antes o después de la infección viral no afecta el número de flores. No obstante el número de flores en preinóculo es mayor.

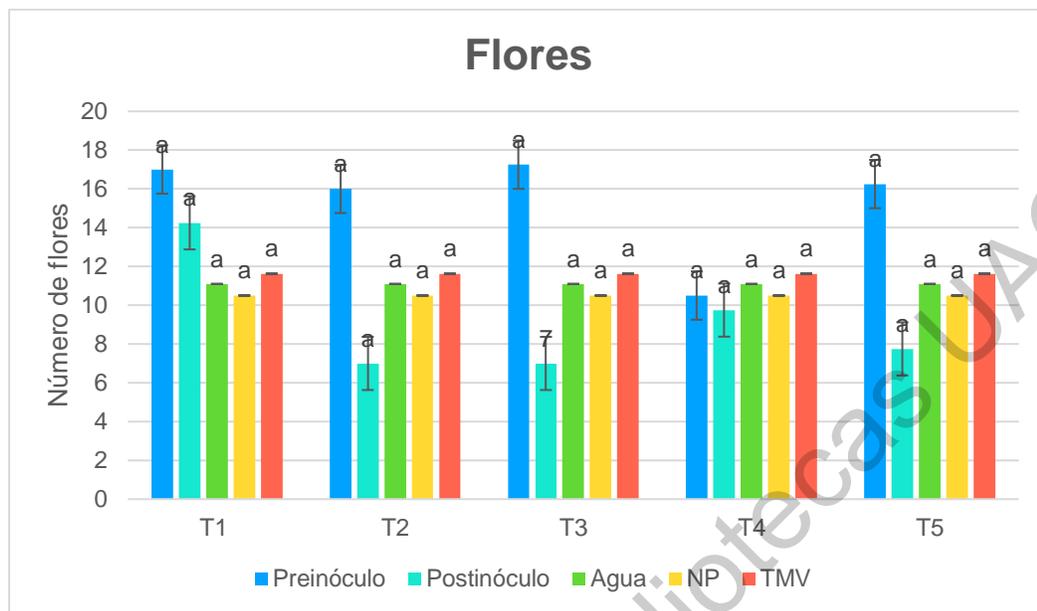


Gráfico 4. Resultados de la variable número de flores para los experimentos preinóculo, posinóculo y controles. Preinóculo = 72h antes de la inoculación; Postinóculo = 72 h después de la inoculación; Agua = Control negativo con agua; NP = Control con 200 $\mu\text{g/mL}$ NP-ZnO y TMV = Control positivo con TMV (sin NP).

VI.3.5 Número de frutos

La variable número de frutos del experimento preinóculo, el control con NP presentó el mayor número de chiles; mientras que los tratamientos no presentaron diferencias significativas (ver Tabla 3). Los resultados sugieren que la aplicación foliar de NP-ZnO antes de la inoculación del virus no afecta el número de frutos respecto al control con agua, pero es mayor respecto al control negativo con NP. El gráfico 5. muestra la significancia estadística de los tratamientos y controles para el experimento de postinóculo; donde similar a preinóculo, el control con NP presentó el mayor número de chiles, mientras que para los tratamientos, control con agua y control positivo con TMV no hay diferencias entre ellos, a excepción del T3 que presentó el menor número de chiles.

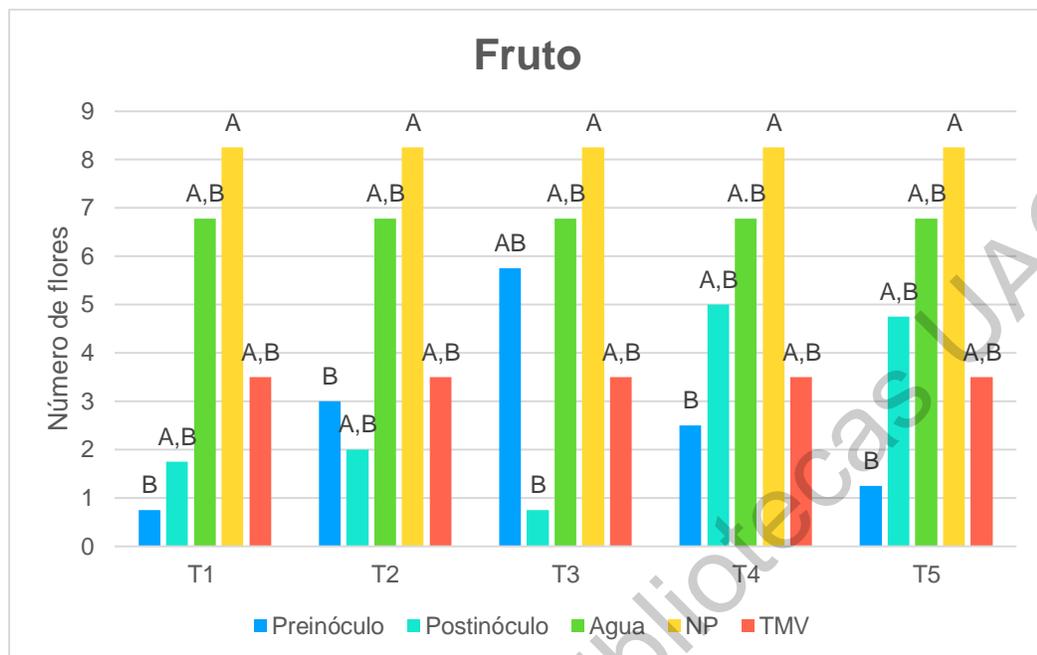


Gráfico 5. Resultados de la variable número de frutos para los experimentos preinóculo, postinóculo y controles. Preinóculo = 72h antes de la inoculación; Postinóculo = 72 h después de la inoculación; Agua = Control negativo con agua; NP = Control con 200 $\mu\text{g/mL}$ NP-ZnO y TMV = Control positivo con TMV (sin NP).

Por otro lado, los valores promedios para cada variable explicativa en ambos experimentos se muestran en la Tabla 3. En general, los resultados sugieren un mejor desarrollo fenológico en el experimento preinóculo que en postinóculo, esto porque no afecta las variables explicativas de los tratamientos con respecto al control, lo cual es lo buscado. Entre tratamientos, el tratamiento 3 (aplicación con 100 $\mu\text{g/L}$) presenta los mayores valores; si bien aunque no hay diferencias estadísticamente con los demás tratamientos, es deseable elegir el tratamiento con mayor número de frutos, debido a que se busca la mejor producción final. En el experimento de postinóculo, de los tratamientos el T2 fue el tratamiento con los menores valores, mientras que T4 sugiere ser el mejor tratamiento especialmente respecto al número de chiles.

En la imagen 2. se observa la tendencia del crecimiento en etapas iniciales del experimento, donde los controles negativos con NP-ZnO y agua presentan el mejor desarrollo seguido de los tratamientos; en particular el T3, que presentó mejores características fenológicas, enseguida el distintivo desarrollo del control con TMV; el cual atrofió el crecimiento en etapas tempranas, sin embargo, como se observó en los resultados de las variables explicativas individuales al final del experimento, el desarrollo del TMV se emparejo con los demás tratamientos y controles, a excepción del número de fruto, donde los valores siempre fueron los menores para el TMV; razón por la cuál se dice que las enfermedades virales si bien no matan a las plantas si afectan significativamente la producción de los cultivos.

Los resultados de las variables de producción de chiles se muestran en la tabla 4. Cada variable se describe a continuación:

VI.3.6 Peso del chile

El gráfico 6 muestra la significancia estadística de los experimentos preinóculo, postinóculo y controles del experimento preinóculo para la variable peso del chile. Los resultados del experimento preinóculo indican que el tratamiento T3 y los controles negativos con agua y NP presentaron significativamente mayor peso de chile; mientras que en el experimento postinóculo, el tratamiento T3 presentó el significativamente el menor peso, donde T4 y T5 fueron estadísticamente similares a los controles con NP y agua. Si bien no hay diferencias significativas entre los controles, se observa que el peso en los chiles tratados con sólo NP-ZnO fueron mayores (ver tabla 4).

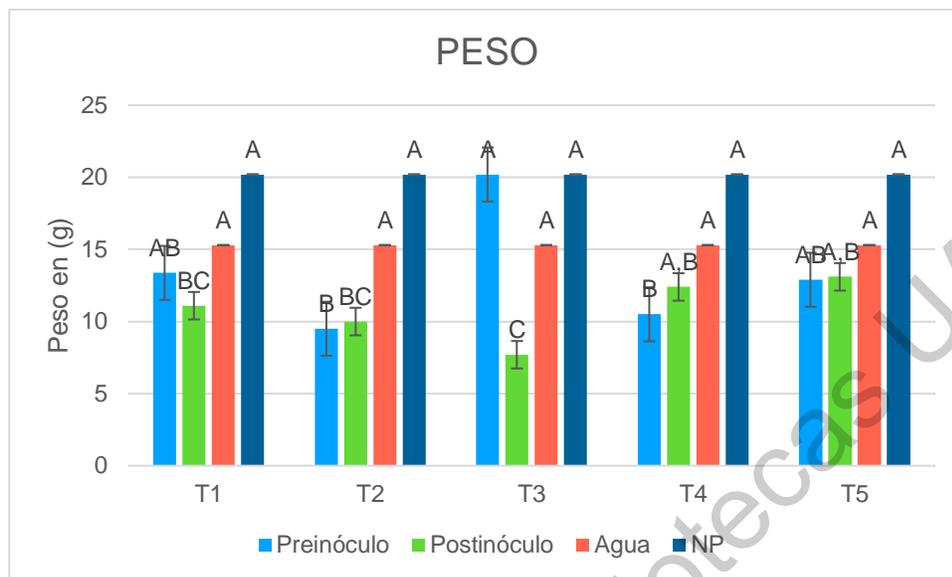


Gráfico 6. Resultados de la variable peso de la producción de chiles para los experimentos preinóculo, posinóculo y controles. Preinóculo = 72h antes de la inoculación; Postinóculo = 72 h después de la inoculación; Agua = Control negativo con agua y NP = Control con 200 $\mu\text{g/mL}$ de NP-ZnO.

VI.3.7 Largo de chile

El gráfico 7 muestra la significancia estadística de los experimentos preinóculo, posinóculo y controles del experimento preinóculo para la variable largo de chile; donde se observa que para el experimento preinóculo los tratamientos y controles no presentaron diferencias significativas; los resultados sugieren que el largo de chile no es afectado por la aplicación de NP antes de la infección viral; mientras que el tratamiento T3 tuvo significativamente menor tamaño de chile en postinóculo que el resto de los tratamientos y mantuvo similitud con los controles NP y agua.

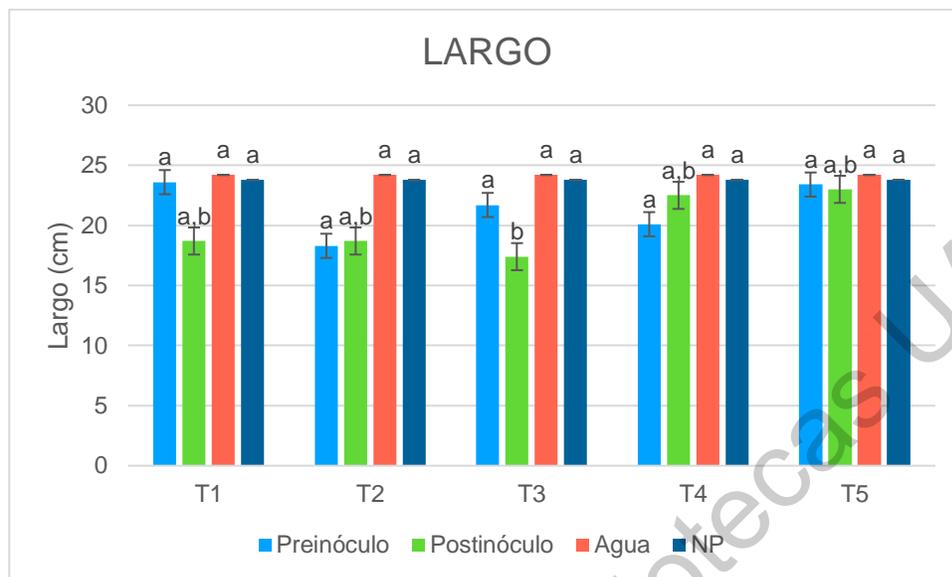


Gráfico 7. Resultados de la variable largo de la producción de chiles para los experimentos preinóculo, posinóculo y controles. Preinóculo = 72h antes de la inoculación; Postinóculo = 72 h después de la inoculación; Agua = Control negativo con agua y NP = Control con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NP-ZnO.

VI.3.8 Ancho del chile

El gráfico 8 muestra la significancia estadística de los experimentos preinóculo, posinóculo y controles del experimento preinóculo para la variable ancho del chile. Los resultados para el experimento preinóculo señalan que el control con NP y el T3 presentaron significativamente mayor anchura del chile respecto al resto de los tratamientos y el control con agua; mientras que el experimento postinóculo el control con NP presentó significativamente la mayor anchura del chile y el tratamiento T3 la menor (ver tabla 4).

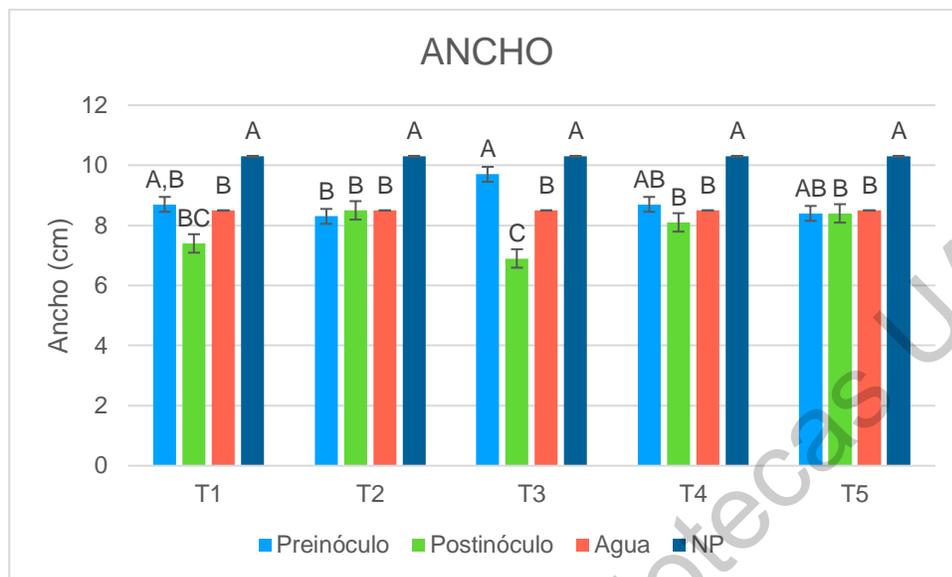


Gráfico 8. Resultados de la variable ancho de la producción de chiles para los experimentos preinóculo, posinóculo y controles. Preinóculo = 72h antes de la inoculación; Postinóculo = 72 h después de la inoculación; Agua = Control negativo con agua y NP = Control con 200 $\mu\text{g/mL}$ de NP-ZnO.

De manera general, si bien los resultados sugieren que los controles con 200 $\mu\text{g/L}$ NP-ZnO y con agua son estadísticamente similares; a excepción de la variable de ancho de chile la cual es mayor en el control con NP, se observan mayores medidas de chiles en el control con NP. De manera similar con las variables fenológicas, el tratamiento T3 en las variables de producción presenta tallas estadísticamente similares al control con NP. Estos resultados refuerzan la noción de que el tratamiento T3 presenta las mejores características fenológicas usando NP-ZnO como manejo de TMV.

PREINÓCULO

VARIABLE/ TRATAMIENTO	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Número Hojas	Número Flor	Número Fruto
T1 (0 µg/L)	65 ± 10.2 ^A	8.5 ± 0.7 ^A	116 ± 30.5 ^a	17 ± 2.6 ^a	0.8 ± 1.5 ^B
T2 (50 µg/L)	61.5 ± .3 ^A	9 ± 1.2 ^A	139.5 ± 19.8 ^a	16 ± 2.9 ^a	3 ± 1.2 ^B
T3 (100 µg/L)	67 ± 7.4^A	9.1 ± 1.1^A	145.5 ± 23.1^a	17.3 ± 2.9^a	5.8 ± 7.1^B
T4 (150 µg/L)	63.8 ± 1.5 ^A	8.8 ± 0.5 ^A	155.3 ± 25.1 ^a	10.5 ± 0.5 ^a	2.5 ± 3.3 ^B
T5 (200 µg/L)	73 ± 5.2 ^A	9.4 ± 0.5 ^A	164.3 ± 67.6 ^a	16.3 ± 2 ^a	1.3 ± 1.9 ^B
Agua	75.8 ± 12.8^A	8.8 ± 1.1^A	174 ± 15.6^a	11 ± 6.7^a	6.8 ± 6^B
NP-ZnO (200 µg/L)	70 ± 9.8 ^A	9.8 ± 0.9 ^A	175.9 ± 17.6 ^a	10.5 ± 4.6 ^a	8.3 ± 5 ^A
TMV	61.3 ± 9.8 ^A	9.9 ± 1.2 ^A	170.25 ± 18.2 ^a	11.6 ± 4 ^a	3.5 ± 3.7 ^B

POSTINÓCULO

T1 (0 µg/L)	69 ± 7.9 ^{c, b}	6.4 ± 0.4 ^B	153.3 ± 48.9 ^A	14.3 ± 5.7 ^a	1.8 ± 1 ^{A, B}
T2 (50 µg/L)	56.3 ± 10.6 ^{c, b}	6.8 ± 0.5 ^B	132.5 ± 9.7 ^B	7 ± 4 ^a	2 ± 2.2 ^{A, B}
T3 (100 µg/L)	56 ± 2.9 ^{c, b}	7.5 ± 1.2 ^{A, B}	157.8 ± 27.5 ^A	7 ± 4 ^a	0.8 ± 0.9 ^B
T4 (150 µg/L)	59.5 ± 7.9 ^{c, b}	9.1 ± 0.6 ^A	146 ± 16.4 ^{A, B}	9.8 ± 5.6 ^a	5 ± 3.6 ^{A, B}
T5 (200 µg/L)	53.3 ± 3.8 ^c	7.9 ± 0.8 ^{A, B}	138.3 ± 28 ^{A, B}	7.8 ± 1.9 ^a	4.8 ± 3.7 ^{A, B}
Agua	75.8 ± 12.8^a	8.8 ± 1.1^A	174 ± 15.6^A	11.1 ± 6.7^a	6.8 ± 6^{A, B}
NP-ZnO (200 µg/L)	70 ± 9.8 ^b	9.9 ± 1 ^A	175.9 ± 17.6 ^A	10.5 ± 4.6 ^a	8.3 ± 5 ^A
TMV	61.3 ± 9.8 ^{c, b}	9.9 ± 1.2 ^A	170.3 ± 18.2 ^A	11.6 ± 4 ^a	3.5 ± 3.7 ^{A, B}

Tabla 3. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LA PLANTA. La determinación estadística del efecto de la aplicación de tratamientos en las variables de altura, diámetro, número de hojas, flores y frutos para los experimentos Preinoculo y se realizó usando la prueba Kruskal-Wallis y la diferencia entre sus rangos mediante la prueba de Games-Howell (mayúsculas) y la prueba ANOVA-Tukey (minúsculas) con un α 0.05. Los valores se muestran como el rango o la media correspondiente de las determinaciones con 9 repeticiones.

PREINÓCULO

TRATAMIENTO	Peso por chile (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Rendimiento Parcial g
T1 (0 µg/L)	36.15 ^{A, B}	23.6 ^a	33.2 ^{A, B}	330
T2 (50 µg/L)	13 ^B	18.3 ^a	23.6 ^B	385
T3 (100 µg/L)	53.05 ^A	21.7 ^a	48.35 ^A	557
T4 (150 µg/L)	16 ^B	20.1 ^a	31.35 ^{A, B}	593
T5 (200 µg/L)	32.55 ^{A, B}	23.4 ^a	29.70 ^{A, B}	382
Agua	42.70 ^A	24.2 ^a	27.45 ^B	1731
NP-ZnO (200 µg/L)	54.05 ^A	23.8 ^a	54.85 ^A	1555
POSTINÓCULO				
T1 (0 µg/L)	28.90 ^{B, C}	18.7 ^{a, b}	23.50 ^{B, C}	378
T2 (50 µg/L)	24.55 ^{B, C}	18.7 ^{a, b}	39.50 ^B	179
T3 (100 µg/L)	14.05 ^C	17.4 ^b	15.30 ^C	164
T4 (150 µg/L)	36.65 ^{A, B}	22.5 ^{a, b}	35.35 ^B	596
T5 (200 µg/L)	36.85 ^{A, B}	23 ^{a, b}	35.85 ^B	470
Agua	49.05 ^A	24.2 ^a	39.65 ^B	1731
NP-ZnO (200 µg/L)	58.45 ^A	23.8 ^a	59.35 ^A	1555

Tabla 4. RESULTADOS DE PRODUCCIÓN DE CHILES. La determinación estadística del efecto de la aplicación de tratamientos en las variables peso, largo y ancho de chile para los experimentos Preinóculo y Postinóculo se realizó usando la prueba Kruskal-Wallis y la diferencia entre sus rangos mediante la prueba de Games-Howell (mayúsculas) y la prueba ANOVA-Tukey (minúsculas) con un α 0.05. Los valores se muestran como el rango o la media correspondiente de las determinaciones con $n=10$.



Fotografía 2. Efecto de las NP-ZnO y TMV sobre el desarrollo de las plantas de chile. De izquierda a derecha T3 Preinóculo, T3 Posinóculo, Control positivo TMV, Control negativo con NP (200 µg/mL), Control negativo con agua.

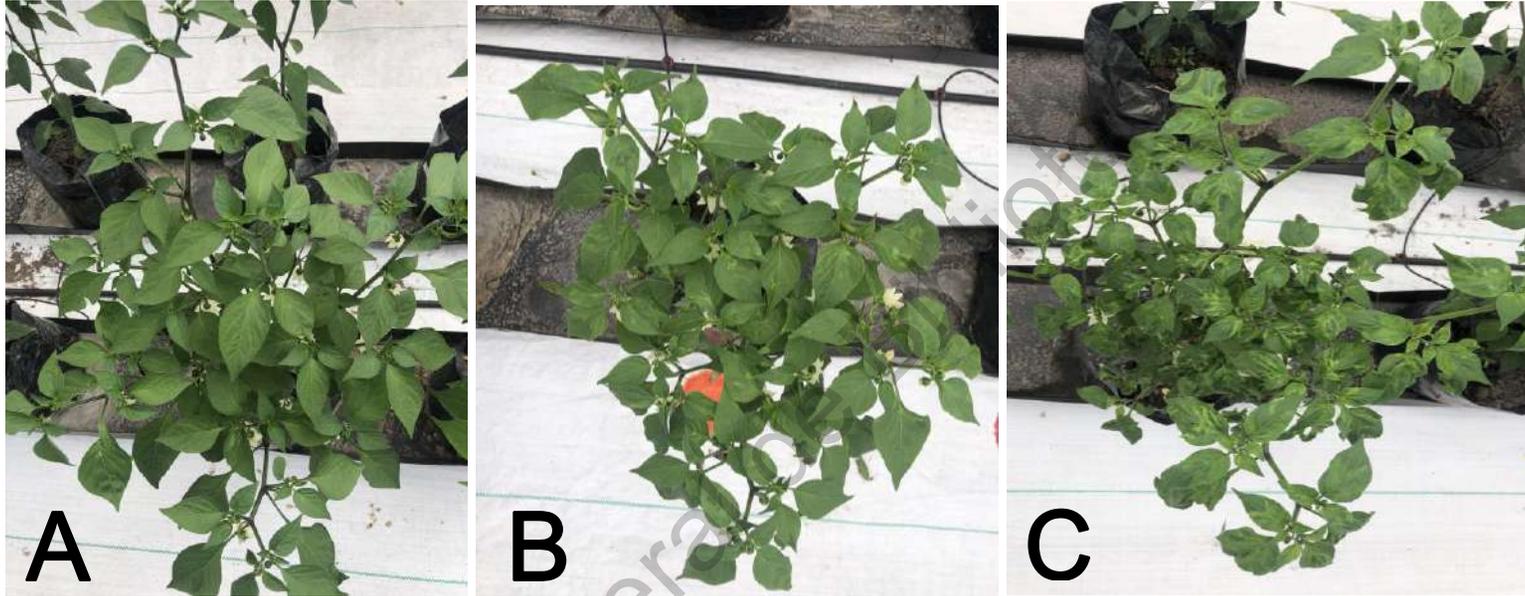
VI.4 Sanidad y carga relativa viral asociada a síntomas

Por otro lado, los resultados de la variable sanidad se muestran en la tabla 5. Los resultados para el experimento postinóculo indican que los tratamientos controles negativos con agua y NP-ZnO; son los que presentan significativamente mejor sanidad (menor rango) con respecto a los tratamientos y el control positivo con TMV (misma letra de unión indica similitud entre tratamientos). Si bien, el TMV presenta la peor sanidad (mayor rango), no es estadísticamente significativo con los tratamientos probados, razón por la cual no podemos establecer un mejor tratamiento. No obstante, en los resultados del experimento preinóculo si bien sugieren que entre los tratamientos no hay diferencias entre ellos; se observa que los tratamientos T3, T2 Y T1 son significativamente distintos a el control con TMV y similares a los controles negativos con agua y NP-ZnO; mientras que los tratamientos T5 y T4 son similares al TMV. Al igual que en postinóculo, los controles con agua y NP-ZnO presentaron la mejor sanidad en el experimento preinóculo. Si bien, los tratamientos T3, T2 y T1 son similares, se escogió trabajar con el tratamiento T3; esto debido a los resultados favorables del desarrollo vegetal con este tratamiento (ver *VI.3 Evaluación de las NP en la planta*).

En la imagen 3, se muestra la planta típica del control negativo con agua (A) en contraste con la planta típica del tratamiento T3 (B), se observa la atenuación del mosaico así como un desarrollo vegetal semejante. En la imagen 4, por otro lado, se muestra la planta típica del control negativo con agua (A) en contraste con la planta típica del control con TMV (C), donde el mosaico es más claro y el área foliar reducida, esto compromete la fotosíntesis y en consecuencia el rendimiento de la producción mermado. Finalmente, los resultados de la variable sanidad sugieren que para mejorar la resistencia a la infección por TMV las NP deben usarse antes de la emergencia viral (preinóculo), esto es debido posiblemente a que se mejora la distribución de las mismas dentro de la planta previo a un ataque por patógenos y concomitante a ello, el sistema de defensa de la planta se enciende.

PREINÓCULO			POSTINÓCULO		
Tratamiento	Rango	Letras de union	Tratamiento	Rango	Letras de unión
TMV	41.75	A	TMV	38	A
T1 (200 µg/L)	33.75	AB	T1 (200 µg/L)	29	A
T4 (150 µg/L)	31.5	AB	T4 (150 µg/L)	32.25	A
T3 (100 µg/L)	27	BC	T3 (100 µg/L)	32.25	A
T2 (50 µg/L)	27	BC	T2 (50 µg/L)	29	A
T1 (0 µg/L)	24.75	BC	T1 (0 µg/L)	29	A
Agua (control sin virus)	9.5	C	Agua (control sin virus)	9.5	B
NP-ZnO (200 µg/L)	9.5	C	NP-ZnO (200 µg/L)	9.5	B

Tabla 5. RESULTADOS DE SANIDAD. La determinación estadística del efecto de la aplicación de tratamientos en la variable sanidad se realizó usando la prueba Kruskal-Wallis y la diferencia entre sus rangos mediante la prueba de Games-Howell con una α 0.05. Los valores se muestran como el rango de las determinaciones de 6 repeticiones.



Fotografía 3. Efecto de la aplicación de NP-ZnO en plantas de chile. A) Planta control con agua B) Planta infectada con TMV tratada con 150 $\mu\text{g/L}$ NP-ZnO y C) Planta control con TMV.

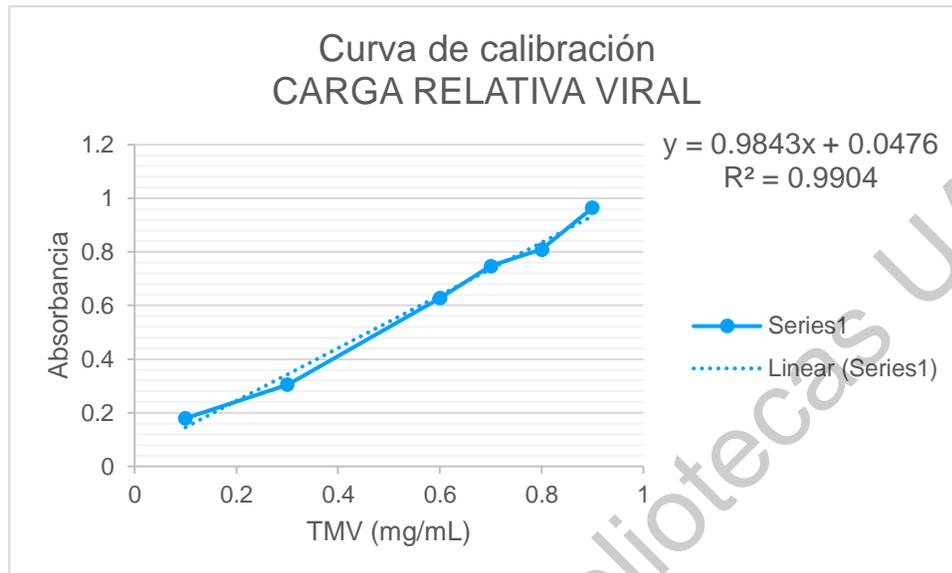


Gráfico 9. Curva de calibración utilizada para el cálculo de la carga relativa viral asociada a la enfermedad por TMV.

VI.4.2 Carga relativa viral

Respecto a la carga relativa viral, el gráfico 9 indica la ecuación lineal con un factor de correlación de 0.990; la cual se usó para calcular los resultados de carga relativa viral de las absorbancias medidas en los ensayos DAS-ELISA. Los resultados se muestran en la tabla 6, éstos indican que los tratamientos de mayor concentración T5 y T4 presentaron significativamente menor carga viral respecto al control con TMV, para los experimentos de preinóculo y postinóculo respectivamente.

La actividad antimicrobiana de NP-ZnO se correlaciona directamente con su concentración según lo informado por varios estudios, igualmente, la actividad depende del tamaño de partícula, aunque esta dependencia también está influenciada por la concentración de NP (Sirelkhatim et al., 2015). Si bien, presentar mayor inhibición viral en concentraciones mayores es lo esperado, no se observa una estricta tendencia dependiente de la dosis, aunado a ello, tampoco se relacionan los resultados de carga viral con sanidad como se hipotetizó. Los resultados sugieren que el tratamiento T3 de preinóculo presenta carga relativa viral

similar al control TMV, sin embargo, los resultados de la variable sanidad y el desarrollo vegetal en éste tratamiento sugirieron presentar los mejores resultados sobre los demás tratamientos.

Estos resultados contrastantes sugieren que el modo en que las NP-ZnO atenúan los síntomas virales no sea mediante la desintegración de la cápside viral; ya que bajo nuestras condiciones de estudio, no se disminuyó la carga viral. Este resultado se corroboró en una segunda corrida experimental con plántula. Los resultados se muestran en la tabla 7, donde se vuelve a encontrar una concentración no significativa entre el tratamiento T3 y el control con TMV.

PREINÓCULO			POSTINÓCULO		
Tratamiento	Carga relativa viral [mg/mL]	Letras unión	Tratamiento	Carga relativa Viral [mg/mL]	Letras unión
TMV	10.35	A	TMV	8.51	A
T3	10.2 ± 0.15	A	T2	8.38 ± 0.54	A
T2	8.84 ± 0.48	A, B	T3	7.96 ± 0.55	A
T4	8.18 ± 0.69	B C	T1	7.83 ± 0.61	A, B
T1	7.32 ± 0.85	C	T5	7.3 ± 0.21	A, B
T5	7.36 ± 0.14	C	T4	6.6 ± 0.35	B

Tabla 6. RESULTADOS DE CARGA RELATIVA VIRAL NP ZnO-TMV La determinación estadística del efecto de la aplicación de tratamientos en la variable carga relativa viral se realizó usando la prueba ANOVA y la diferencia entre sus medias mediante la prueba de Tukey con una α 0.05. Los valores se muestran como la media \pm desviación estándar de las determinaciones por triplicado.

TRATAMIENTO	Plántula	Juvenil
T3	7.71 ± 0.006	10.20 ± 0.15
TMV	8.17 ± 0.04	10.35

Tabla 7. CORROBORACIÓN CARGA RELATIVA VIRAL T3. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar de las determinaciones por triplicado.

Otros trabajos donde probaron la actividad antiviral de las NP-ZnO contra TMV, son los de Cai y colaboradores (2019) y Abdelkhalek & Al-Askar (2020) en plantas de tabaco y jitomate con tamaños de partícula esféricas de 18 nm y 75 nm respectivamente; en ambos casos de estudio la concentración usada fue de 100 µg/mL de NP-ZnO. Los resultados de la acumulación viral en jitomate evaluados por qRT-PCR de Abdelkhalek & Al-Askar (2020) indican una disminución significativa de 63.55 respecto del control con TMV (136.6). Por otro lado, los resultados de Cai y colaboradores muestran supresión de la invasión viral del 35.53%, donde la inoculación de plantas de tabaco se realizó después de haber incubado el complejo NP-Virus durante dos horas, por esta razón la inhibición se atribuye al daño directo de la capsida viral. En ambos estudios es importante notar el tamaño y forma de la NP utilizada.

Una de las propiedades más importantes de las NP es el tamaño, esto es debido a que no se reconocen como material extraño y pueden fácilmente difundirse a través de las células (Rivero-Montejo, et al. 2021); otra característica que afecta significativamente la actividad antimicrobiana es la morfología de las NP-ZnO (Sirelkhatim et al., 2015). En este trabajo, las NP-ZnO presentaron una forma de nanoflores con tamaños en la escala micrométrica, posiblemente el tamaño de tres ordenes de magnitud (micras) mayor al tamaño del TMV (nano) no favoreció la interacción NP-Virus; por la razón de que hay menos área de contacto interactuando con el virus, una interpretación de esto se observa en la imagen 5. Aunado a esto,

la forma de los conos que forman la nanoflor podría dificultar el contacto íntimo con el virus en comparación con una forma esférica.

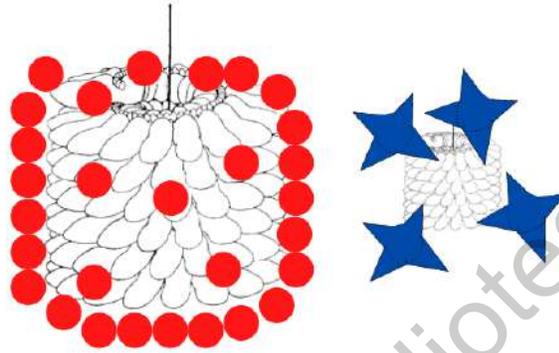


IMAGEN 4. CARICATURA DE LA INTERACCIÓN NP-TMV

La cápside del TMV, por otro lado, debe ser suficientemente protectora para dos cometidos, 1) para proteger satisfactoriamente al ácido nucleico que con facilidad se desintegraría en el medio circundante y 2) para conferirle la característica bien consabida de ser una estructura extremadamente estable; cuya infectividad se mantiene hasta por 50 años e incluso en material vegetal muerto. Por estas razones debe garantizarse que la NP entre en contacto íntimo y en suficiente cantidad para comprometer la capsida viral.

VI.5 Actividad enzimática y antioxidante

La homeostasis puede alterarse como resultado de factores bióticos (por ejemplo el ataque por virus) y abióticos (por ejemplo la aplicación de NP). La actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y POD puede proteger las células vegetales contra los efectos adversos de las ROS, esto ocurre de manera en que POD actúa como eliminador de ROS, mientras que SOD y CAT convierten conjuntamente O_2^-

y H₂O₂ en H₂O y O₂ y también reducen el radical ·OH libre total. (Sidiqqi and hunsen, 2017). La tabla 8 muestra los resultados de la actividad enzimática para los tratamientos controles y el tratamiento T3.

TRATAMIENTO	Proteína	PAL (U/proteína)	SOD (U/proteína)	CAT (U/proteína)	POD (U/proteína)
AGUA	1.8 ± 0.1 ^a	10.2 ± 0.5 ^c	0.5 ± 0.1 ^c	0.8 ± 0.12 ^b	5.9 ± 0.7 ^a
NP (100 µg/L NP sin virus)	1.7 ± 0.04 ^b	25.4 ± 0.9 ^a	1.9 ± 0.8 ^c	0.3 ± 0.12 ^b	3.5 ± 0.8 ^{a, b}
T3 (100 µg/L NP con virus)	1.6 ± 0.1 ^{b, c}	16 ± 0.7 ^b	23.9 ± 0.4 ^b	7. ± 1.4 ^a	2.6 ± 0.6 ^b
TMV	1.5 ± 0.01 ^c	12.8 ± 0.3 ^c	80.9 ± 4.2 ^a	1.3 ± 0.9 ^b	5. ± 1.1 ^a

Tabla 8. RESULTADOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. La determinación estadística del efecto de la aplicación de tratamientos en la variable de actividad enzimática de Fenilalanina-Amonio Liasa (PAL), Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Peroxidasa (POD) se realizó usando la prueba de mínima diferencia significativa (DMS) con una α 0.05. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar de las determinaciones por duplicado.

VI.5.1 Proteína

El gráfico 10 muestra el factor de correlación lineal de 0.993 de la ecuación utilizada para calcular la concentración de proteína en hojas de los tratamientos. El gráfico 11 indica las diferencias significativas entre los tratamientos señalados en la tabla 8, donde se observa que el control negativo con agua tiene significativamente mayor proteína en hojas, seguido del control negativo con NP; mientras que el control positivo con TMV presenta la menor cantidad de proteína en hoja. Los resultados sugieren que la aplicación de NP-ZnO puede afectar la cantidad de proteína en hojas.

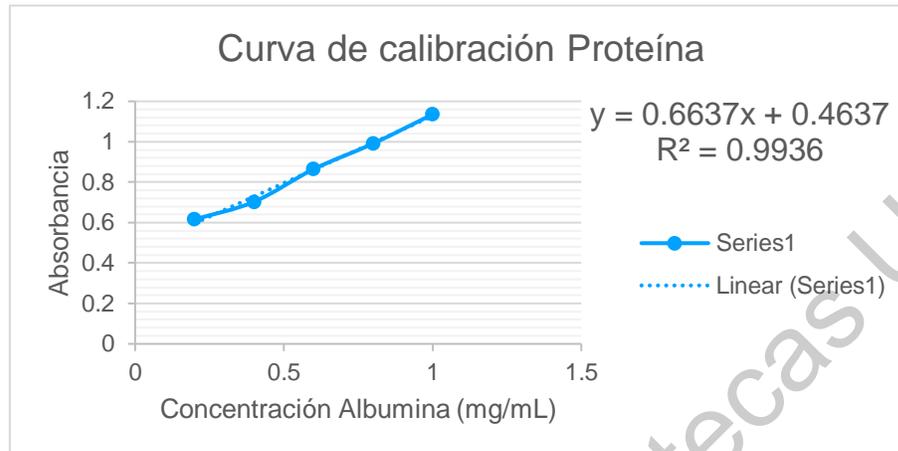


Gráfico 10. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de proteína.

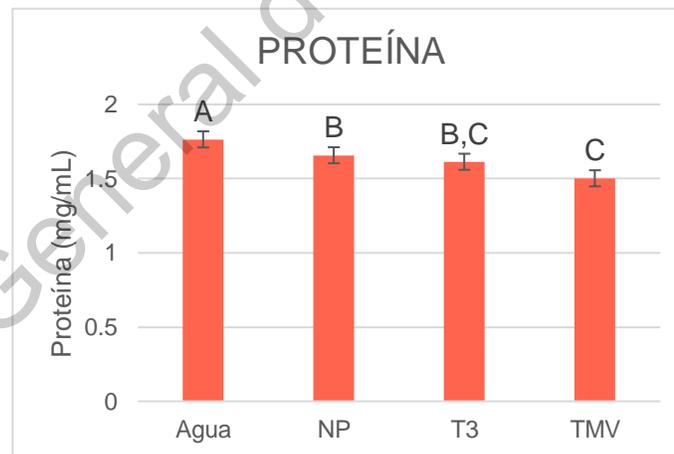


Gráfico 11. Significancia estadística para proteína de los controles y T3. Control negativo con agua (sin virus), Control negativo con NP (100 µg/L de NP-ZnO), T3 (virus + 100 µg/L de NP-ZnO) y Control positivo con TMV (con virus).

VI.5.2 Actividad de PAL

El gráfico 12 muestra el factor de correlación lineal de 0.998 de la ecuación utilizada para calcular la actividad de PAL en los tratamientos. El gráfico 13 indica las diferencias significativas entre los tratamientos señalados en la tabla 8 para PAL, donde el control con NP-ZnO (100 µg/L) tuvo significativamente mayor actividad de PAL, seguido del tratamiento T3 (Virus + 100 µg/L de ZnO) mientras que el control negativo con agua y el control positivo con TMV son similares estadísticamente con la menor actividad de PAL. Los resultados sugieren que la aplicación de NP en plantas de Chile con o sin virus promueve la actividad de PAL; molécula precursora de la síntesis de moléculas de defensa de las plantas.

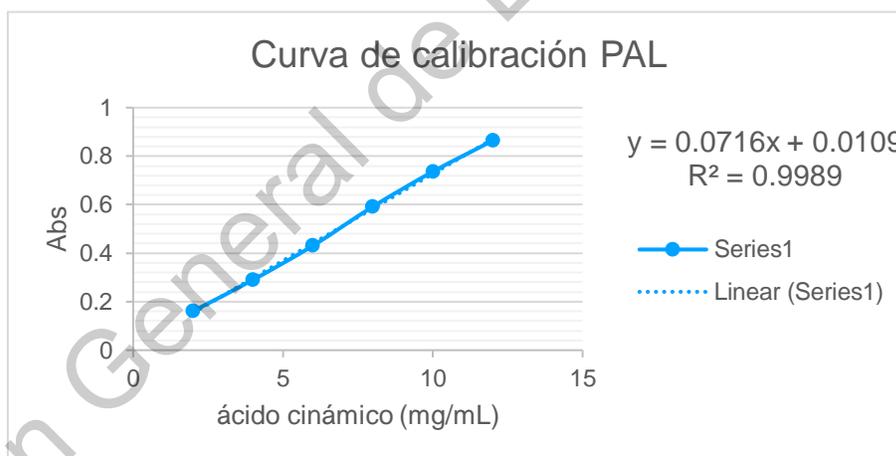


Gráfico 12. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de la actividad de PAL.

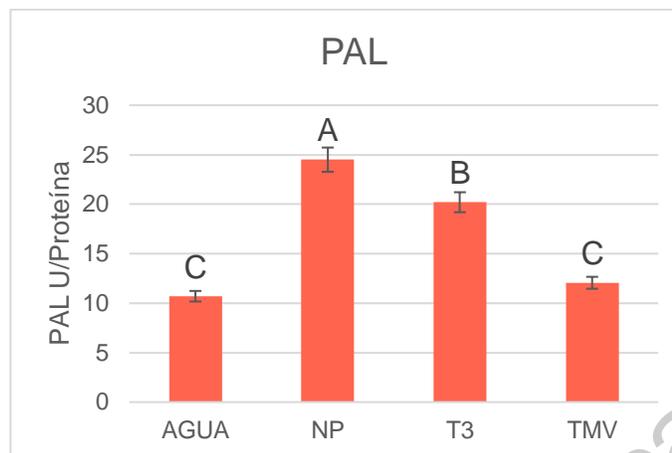


Gráfico 13. Significancia estadística para PAL de los controles y T3. Control negativo con agua (sin virus), Control negativo con NP (100 µg/L de NP-ZnO), T3 (virus + 100 µg/L de NP-ZnO) y Control positivo con TMV (con virus).

VI.5.3 Actividad de SOD

El gráfico 14 indica las diferencias significativas entre los tratamientos señalados en la tabla 8 para la enzima SOD, donde el control positivo con TMV muestra significativamente mayor actividad, seguido del tratamiento T3; mientras que el tratamiento control con NP y con agua son similares entre ellos y con la menor actividad de SOD. La enzima SOD dismuta al radical libre $O_2^{\cdot-}$ (superóxido); con una vida biológica corta atribuida a su rápida reducción a H_2O_2 . Los resultados sugieren que el control con virus TMV produce mayor cantidad de radicales superóxidos; además esta actividad se disminuye significativamente al tratar las plantas infectadas con NP-ZnO. En contraste una planta control con agua (sin estrés biótico y abiótico) presenta una actividad baja relacionada con el balance redox.

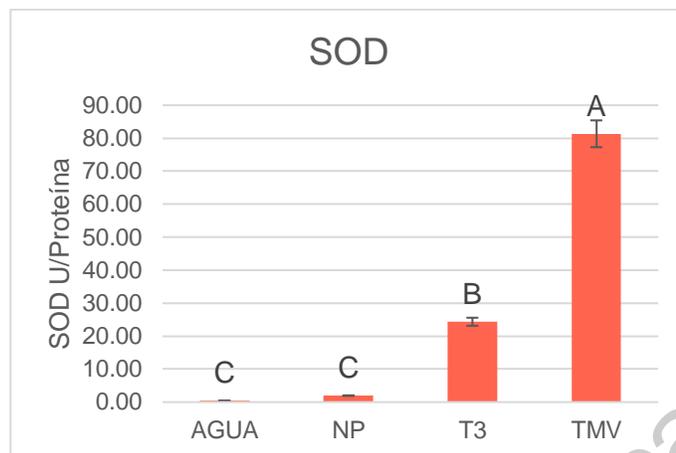


Gráfico 14. Significancia estadística para SOD de los controles y T3. Control negativo con agua (sin virus), Control negativo con NP (100 µg/L de NP-ZnO), T3 (virus + 100 µg/L de NP-ZnO) y Control positivo con TMV (con virus).

VI.5.4 Actividad de CAT

El gráfico 15 indica las diferencias significativas entre los tratamientos señalados en la tabla 8 para la enzima CAT, donde se observa que la mayor actividad significativa la tuvo el T3 mientras que los controles positivos con TMV y negativos con agua y NP son similares entre ellos y con una menor actividad de catalasa. Los resultados sugieren que la eliminación del peróxido de hidrógeno mediada por catalasa principalmente ocurre en T3; si bien los controles con TMV, agua y NP deben presentar residuos de H₂O₂ como resultado de su actividad de SOD, los resultados sugieren que esta eliminación es realizada principalmente por otras vías de eliminación y en menor medida por CAT.

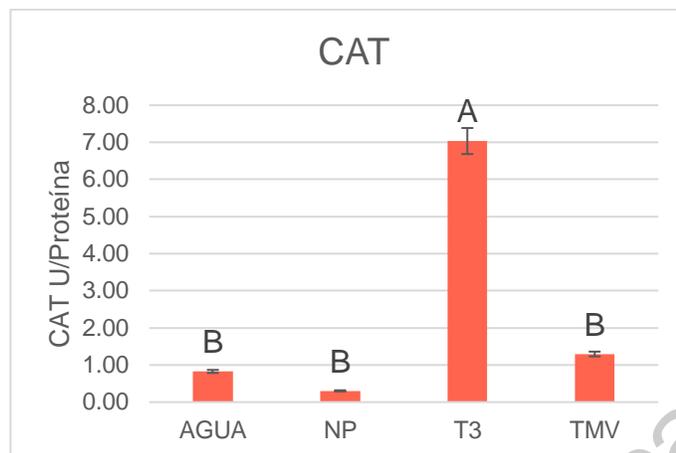


Gráfico 15. Significancia estadística para CAT de los controles y T3. Control negativo con agua (sin virus), Control negativo con NP (100 µg/L de NP-ZnO), T3 (virus + 100 µg/L de NP-ZnO) y Control positivo con TMV (con virus).

VI.5.5 Actividad de POD

El gráfico 16 muestra el factor de correlación lineal de 0.97 de la ecuación utilizada para calcular la actividad de POD en los tratamientos. El gráfico 17 indica las diferencias significativas entre los tratamientos señalados en la tabla 8 para POD, donde se observa que los tratamientos controles con agua, TMV y NP son similares entre ellos y presentaron significativamente mayor actividad de peroxidasas que el tratamiento T3. La enzima POD utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar otros sustratos, a diferencia de CAT que dismuta el peróxido de hidrógeno en agua. Los resultados sugieren que los controles con agua, TMV y NP eliminan el peróxido de hidrógeno vía Peroxidasas; mientras que T3 lo hace principalmente vía Catalasa y en menor medida mediante la actividad de Peroxidasas.

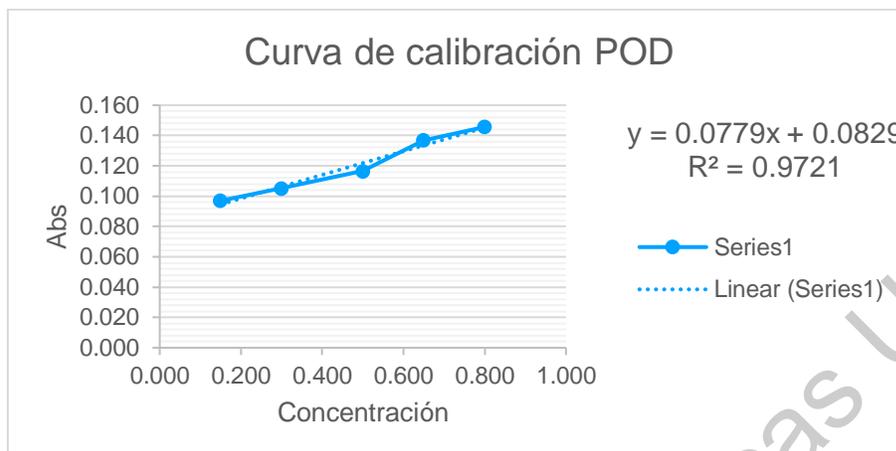


Gráfico 16. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de la actividad de POD.

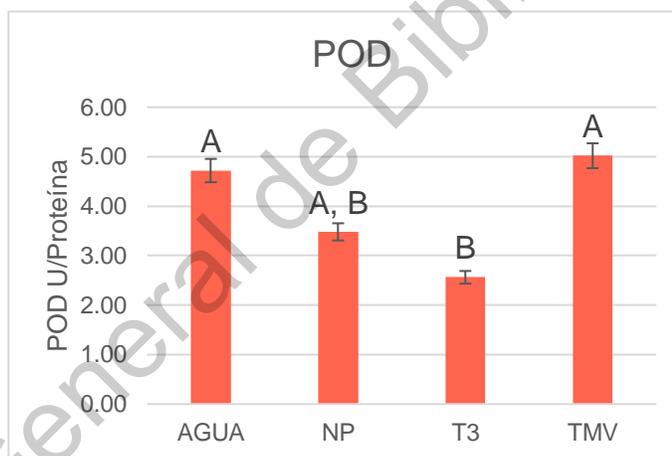


Gráfico 17. Significancia estadística para POD de los controles y T3. Control negativo con agua (sin virus), Control negativo con NP (100 µg/L de NP-ZnO), T3 (virus + 100 µg/L de NP-ZnO) y Control positivo con TMV (con virus).

De manera general, los resultados obtenidos en la tabla 8 sugieren que la aplicación con 100 µg/L de NP-ZnO en plantas de chile infectadas con TMV aumentan SOD y CAT; mientras que POD se disminuye de manera significativa respecto del control con agua. Estos resultados sugieren que el sistema antioxidante se enciende ante la infección viral con TMV; por lo tanto, es posible que el mecanismo de actuación para la atenuación de síntomas observados sea via elicitación.

Resultados similares de la actividad enzimática usando NP-ZnO como manejo de TMV han sido reportados. En plantas de tabaco infectadas con TMV, la actividad de POD y CAT incrementaron marcadamente 208.09% y 65.55% respectivamente, respecto del control (Cai *et al.*, 2019).

Por otro lado, debido a que PAL participa en la biosíntesis del ácido salicílico (SA), el cual participa activamente en la señalización de las respuestas de defensa contra patógenos en plantas; aunado a ello, PAL es la primera enzima en la ruta de la síntesis de fenilpropanoides ligados al metabolismo secundario y primario; es por esto que su medición es un indicador del grado de inmunidad de la plantas.

En este trabajo la actividad de PAL es significativamente 2.5 veces mayor en el control con NP-ZnO y 1.5 veces en el tratamiento T3, lo cual apoya la noción del mecanismo de actuación via elicitación, donde probablemente se promueva la síntesis de metabolitos de defensa. Abdelkhalek & Al-Askar (2020) observaron que asperjando plantas de jitomate con NP-ZnO biogénicas, ya sea con una sola aplicación (antes o después de la inoculación con TMV) o como doble aplicación; se incrementa significativamente la expresión relativa de PAL hasta 2.6 veces.

TRATAMIENTO	DPPH	TEAC
	EC50 (µg/mL)	(µmol TE/mg proteína)
AGUA	1126.5 ± 23.1 ^a	110.2 ± 1.04 ^c
NP (100 µg/L NP sin virus)	995 ± 21.7 ^{a, b}	114 ± 1.9 ^c
T3 (100 µg/L NP con virus)	930.6 ± 31.8 ^b	118.6 ± 1.8 ^b
TMV	1148 ± 43.3 ^a	127.4 ± 2.8 ^a

Tabla 9. RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. La determinación estadística del efecto de la aplicación de tratamientos en la variable de actividad anti-radical DPPH· y

ABTS^{•+} se realizó usando la prueba DMS con un $\alpha = 0.05$. Los valores se muestran como la media \pm desviación estándar de las determinaciones por triplicado.

VI.6 Actividad antioxidante

VI.6.1 Actividad antioxidante DPPH^{•-}

La tabla 9 muestra los resultados de la actividad antiradical para el DPPH^{•-}. Se observa que el tratamiento T3 presentó la menor concentración del radical, o lo que es igual, presentó mayor actividad antioxidante debido a que neutraliza la actividad del DPPH^{•-} y por tanto su concentración disminuye. El control con NP es similar estadísticamente que T3, mientras que los controles con TMV y Agua presentaron significativamente mayor concentración del radical no neutralizado. Los resultados sugieren que los tratamientos con NP-ZnO promueven la actividad antioxidante en plantas de chiles infectadas con TMV.

VI.6.2 Actividad antioxidante ABTS^{•+}

La actividad antioxidante del ABTS^{•+} se muestran en la tabla 9, los resultados fueron significativamente mayor para el control con TMV seguido del tratamiento T3; mientras que el control con NP presentó la menor actividad y fue estadísticamente similar al control con Agua. Los resultados sugieren que el control con NP neutraliza al radical ABTS^{•+} debido a su actividad antioxidante; como consecuencia la concentración del radical disminuye.

En general el tratamiento T3 presentó significativamente mayor actividad antioxidante contra el radical DPPH^{•-} y actividad antioxidante intermedia contra el radical ABTS^{•+}; mientras que el control con NP presentó mayor actividad antioxidante contra el radical ABTS^{•+} e intermedia contra el DPPH^{•-}. Los resultados sugieren que la aplicación de NP-ZnO incrementa la actividad antioxidante en plantas de chiles infectadas con TMV respecto del control.

VII. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados mostrados, la aplicación con NP-ZnO en plantas de chile no afectan significativamente las variables fenológicas de altura, diámetro, número de flores, número de hojas y número de frutos respecto del control con agua. Por otro lado, las variables de producción presentaron mejores tallas de chiles usando NP-ZnO, figurando el pretratamiento foliar con 100 µg/L de NP-ZnO con las mejores tallas de fruto; aunque éstas no son significativas estadísticamente. Que las NP-ZnO no afecten el desarrollo vegetal es una característica necesaria para desarrollar el uso de estos materiales como estrategia de manejo de cualquier patógeno.

Bajo las condiciones de estudio, los resultados sugieren que **el tratamiento foliar antes de la infección viral con 100 µg/L de NP-ZnO presenta un mecanismo de actuación vía elicitación en plantas de chile infectadas con TMV**. Esta noción se refuerza con el incremento significativo de 2.6 veces de la actividad de PAL respecto del control; concomitante al incremento significativo de 7 veces la actividad de CAT, Además se incrementa 17% y 11% la actividad antioxidante antiradical de DPPH⁻ y ABTS⁺ respectivamente, razón por la cual se atenúan los síntomas observados de la enfermedad.

La carga relativa viral, por otro lado, se mantiene inalterada independientemente del tiempo de aplicación del pretratamiento foliar con 100 µg/L de NP-ZnO, es decir antes o después de la inoculación del TMV. Posiblemente, se observaron estas cargas virales debido a las características de las NP-ZnO, especialmente el tamaño obtenido en el régimen de micrómetros; el cual sugiere ser inadecuado para la interacción NP-TMV.

Finalmente, la incógnita científica abarcada en este proyecto resuelve la noción del uso de NP-ZnO como manejo del TMV en plantas de chile jalapeño. Naturalmente, este trabajo presenta oportunidades en la persecución de mejores resultados, algunos de ellos son los siguientes:

- a) Probar alternativas de síntesis de NP-ZnO para la obtención de tamaños en la nanoescala.
- b) Probar diferentes frecuencias de aplicación de NP-ZnO.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VIII. REFERENCIAS

Abdal Dayem, Ahmed; Hossain, Mohammed; Lee, Soo; Kim, Kyeongseok; Saha, Subbroto; Yang, Gwang-Mo; Choi, Hye; Cho, Ssang-Goo (2017). *The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. International journal of molecular sciences*, 18(1), 120–. doi:10.3390/ijms18010120

Abdelkhalek, Ahmed; Al-Askar, Abdulaziz A. (2020). *Green synthesized ZnO nanoparticles mediated by mentha spicata extract induce plant systemic resistance against Tobacco Mosaic Virus. Applied sciences*, 10(15), 5054–. doi:10.3390/app10155054

Afiyanti, M., & 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.

Anderson, A., McLean, J., Jacobson, A., & Britt, D. (2017). *CuO and ZnO nanoparticles modify interkingdom cell signaling processes relevant to crop production. Journal of agricultural and food chemistry*, 66(26), 6513-6524. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01302

Anderson T. W. & D. A. Darling (1954). *A test of goodness of fit. Journal of the american statistical association*, 49:268, 765-769, DOI: 10.1080/01621459.1954.10501232

Asadishad, B., Chahal, S., Akbari, A., Cianciarelli, V., Azodi, M., Ghoshal, S., & Tufenkji, N. (2018). *Amendment of agricultural soil with metal nanoparticles: effects on soil enzyme activity and microbial community composition. Environmental science & technology*, 52(4), 1908-1918. doi: 10.1021/acs.est.7b05389

Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248–254.

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. doi: 10.1039/c9en00850k

Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., & Liu, S. (2012). *Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (Juglans regia L.) protein hydrolysates. Peptides*, 38(2), 344–349. doi:10.1016/j. peptides.2012.09.017

Dijkstra J., de Jager C.P. (1998) *Mechanical inoculation of plants. Practical plant virology. Springer lab manual. Springer, Berlin, Heidelberg.* https://doi.org/10.1007/978-3-642-72030-7_1

Elbeshehy, E., Elazzazy, A., & 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. doi: 10.3389/fmicb.2015.00453

Ghaffari, H., Tavakoli, A., Moradi, A., Tabarraei, A., Bokharaei-Salim, F., & Zahmatkeshan, M. et al. (2019). *Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine. Journal of biomedical science*, 26(1). doi: 10.1186/s12929-019-0563-4

Hayat, S., Ahmad, H., Ali, M., Ren, K. & Cheng, Z. (2018). *Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (Solanum lycopersicum)*. *Scientia horticultrae*, 240, 139–146.

Hull, R. (2014). *Plant Virology*. Ed Elsevier, 5ta edición. Pag 78.

Hasanuzzaman, Mirza; Bhuyan, M.H.M. Borhannuddin; Zulfiqar, Faisal; Raza, Ali; Mohsin, Sayed Mohammad; Mahmud, Jubayer Al; Fujita, Masayuki; Fotopoulos, Vasileios (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–. doi:10.3390/antiox9080681

Jacobson, K., Gunsolus, I., Kuech, T.; Troiano, J., Melby, E., Lohse, S., Hu, D., Chrisler, W., Murphy, C., Orr, G., Geiger, F., Haynes, C., & Pedersen, J. (2015) *Lipopolysaccharide density and structure governs the extent and distance of nanoparticle interaction with actual and model bacterial outer membranes*. *Environmental science & technology*, in press. doi: 10.1021/acs.est.5b01841

Kamal, M., Gieschke, R., Lemenuel-Diot, A., Beauchemin, C., Smith, P., & Rayner, C. (2015). *A drug-disease model describing the effect of oseltamivir neuraminidase inhibition on influenza virus progression*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(9), 5388-5395. doi: 10.1128/aac.00069-15.

Liu, Chengke; Nelson, Richard S. (2013). *The cell biology of tobacco mosaic virus replication and movement*. *Frontiers in plant science*. DOI:10.3389/fpls.2013.00012

Malandrakis, A., Kavroulakis, N., & Chrysikopoulos, C. (2019). *Use of copper, silver and zinc nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens*. *Science of the total environment*, 670, 292-299. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.210

Mittler, Ron (2016). *ROS are good. Trends in plant science*, (), S1360138516301121. doi:10.1016/j.tplants.2016.08.002

Paramo, Luis A.; Feregrino-Pérez, Ana A.; Guevara, Ramón; Mendoza, Sandra; Esquivel, Karen (2020). *Nanoparticles in agroindustry: applications, toxicity, challenges, and trends. Nanomaterials*, 10(9), 1654-. DOI:10.3390/nano10091654

Parisi, M., Alioto, D., & Tripodi, P. (2020). *Overview of biotic stresses in pepper (Capsicum spp.): sources of genetic resistance, molecular breeding and genomics. International journal of molecular sciences*, 21(7), 2587. DOI: 10.3390/ijms21072587

Parola-Contreras, I., Guevara-González, R.G., Feregrino-Pérez, A.A., Reynoso-Camacho, R., Pérez-Ramírez, I. F., Ocampo-Velázquez, R. V., Rojas-Molina, A., Luna-Vazquez, F., Tovar-Pérez, E. G. (2020). *Phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from leaves and flowers of chilcuague (Heliopsis Longipes, Asteraceae). Botanical sciences* 99(1): 149-160. DOI: 10.17129/botsci.2671

Ramírez-Olivencia, G., Estébanez, M., Membrillo, F., & Ybarra, M. (2019). *Use of ribavirin in viruses other than hepatitis C. A review of the evidence. Enfermedades infecciosas Y microbiología clínica (English Ed.)*, 37(9), 602-608. doi: 10.1016/j.eimce.2018.05.018

Rasmussen, J., Martinez, E., Louka, P. and Wingett, D. (2010). *Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. Expert opinion on drug delivery*, 7(9), pp.1063-1077.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization*

assay. *Free radical biology and medicine*, 26, 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Reddy Pullagurala, V., Adisa, I., Rawat, S., Kalagara, S., Hernandez-Viezcas, J., Peralta-Videa, J., & Gardea-Torresdey, J. (2018). *ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (Coriandrum sativum)*. *Plant physiology and biochemistry*, 132, 120-127. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.08.037

Rivero-Montejo, S.D.J.; Vargas-Hernandez, M.; Torres- Pacheco, I. (2021). *Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants*. *Agriculture*, 11, 134. [https://doi.org/ 10.3390/agriculture11020134](https://doi.org/10.3390/agriculture11020134).

Sharma, V., Kaushik, S., Pandit, P., Dhull, D., Yadav, J., & Kaushik, S. (2018). *Green synthesis of silver nanoparticles from medicinal plants and evaluation of their antiviral potential against chikungunya virus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(2), 881-891. doi: 10.1007/s00253-018-9488-1

Siddiqi, K. and Husen, A. (2017). *Plant response to engineered metal oxide nanoparticles*. *Nanoscale research letters*, 12(1).

Siddiqi, K., ur Rahman, A., Tajuddin and Husen, A. (2018). *Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes*. *Nanoscale research letters*, 13(1).

Singh, P., Garg, A., Pandit, S., Mokkaapati, V. and Mijakovic, I. (2018). *Antimicrobial effects of biogenic nanoparticles*. *Nanomaterials*, 8(12), p.1009.

Sirelkhatim, Amna; Mahmud, Shahrom; Seeni, Azman; Kaus, Noor Haida Mohamad; Ann, Ling Chuo; Bakhori, Siti Khadijah Mohd; Hasan, Habsah; Mohamad, Dasmawati (2015). *Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and*

toxicity mechanism. Nano-micro letters, 7(3), 219–242. doi:10.1007/s40820-015-0040-x

Toscano, S., Ferrante, A., Leonardi, C. & Romano, D. (2018). *PAL activities in asparagus spears during storage after ammonium sulfate treatments. Postharvest biology and technology*, 140, 34–41.

Villa, T., Feijoo-Siota, L., Rama, J., & Ageitos, J. (2017). *Antivirals against animal viruses. Biochemical pharmacology*, 133, 97-116. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.029

Vecitis, C. (2021). *Antiviral-nanoparticle interactions and reactions. Environmental science: nano*. DOI: 10.1039/D0EN00980F

Zapata Giraldo, J., Botero Palacio, L., Mejía Suaza, M., Escobar Mora, N., Ortiz Trujillo, I., Galeano, B., Hoyos Palacio, L. and Cuesta, D. (2018). *Textiles funcionales como barrera de protección ante infecciones asociadas a la atención en salud. Revista EIA*, 15(29), p.13.

Zhong, Y. and Shahidi F. (2015). *Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition*. Pages 287-333. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>.

Dirección General de Bibliotecas UAQ