Evaluación de un protocolo sobre el efecto de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG para control de *Fusarium solani* en condiciones in vitro e in vivo en plantas de tomate chonto *Solanum lycopersicum.*

Pamela Roxana Ávila Bernal.

Universidad el Bosque.
Facultad de Ingeniería
Bioingeniería.
Bogotá D.C.
2019-1

Evaluación de un protocolo sobre el efecto de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG para control de *Fusarium solani* en condiciones in vitro e in vivo en plantas de tomate chonto *Solanum lycopersicum.*

Pamela Roxana Ávila Bernal.

Trabajo de grado de Bioingeniería

Tutor: MSc. Graciela Juez Castillo
Cotutor: MSc. Carel Elizabeth Carvajal Arias

UNIVERSIDAD EL BOSQUE.
FACULTAD DE INGENIERÍA
BIOINGENIERIA.
BOGOTÁ D.C.
2019-1

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por su apoyo y amor incondicional a lo largo de mi proceso académico, ya que sin su respaldo no hubiera sido posible alcanzar todo lo que se logró durante la carrera.

A mi tutora Graciela Juez Castillo y cotutora Carel Elizabeth Carvajal Arias por el apoyo, asesoría y acompañamiento durante el proceso del trabajo de grado ya que sin ellas no hubiera sido posible la ejecución del este.

A los profesores María Ximena Rodríguez Bocanegra de la Pontificia Universidad Javeriana, Héctor Orlando Lancheros Redondo docente del programa de biología y Andrea Melisa Sánchez docente del programa de Ingeniería Ambiental por la dedicación de su tiempo y conocimiento en las diferentes fases de ejecución del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE TABLAS viii
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE ANEXOS xii
ABREVIATURAS xiii
RESUMEN xiv
INTRODUCCION xvi
1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA 1
2. JUSTIFICACIÓN 3
3. OBJETIVOS 5
3.1. GENERAL 5
3.2. ESPECÍFICOS 5
4. MARCO REFERENCIAL 6
4.1. ESTADO DEL ARTE 6
4.2. MARCO TEORICO 10
4.2.1. Tomate 10
4.2.1.1. Enfermedades limitantes del tomate 11
4.2.2. Control Biológico 13
4.2.2.1. Nanotecnología y control biológico 15
4.2.2.2. Quitosano 15
4.2.2.3. Nanopartículas de Quitosano 17
4.2.3. Hongos fitopatógenos 18
4.2.3.1. Fusarium solani. 19
4.2.4. Métodos de evaluación antifúngica 21
4.2.4.1. In vitro. 21
4.2.4.2. In vivo 22
4.2.5. Métodos de Caracterización de nanopartículas con acción antifúngica. 22
4.2.5.1. Microscopia electrónica de transmisión. MET. 23
4.2.6. Modelos de estadística para análisis de datos. ANOVA 23
4.3. MARCO NORMATIVO 23
4.3.1. Practicas estándar, equipos de seguridad y requisitos de instalación se aplican a nivel de bioseguridad 2 24
4.3.1.1 Prácticas microbiológicas estándar 24
4.3.1.2. Equipos de seguridad 24
5. METODOLOGIA PROPUESTA 26
5.1. LEVANTAMIENTO DE REQUERIMIENTOS 26
5.1.1. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*). 26

5.1.2. Identificar el daño celular del hongo *Fusarium solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica. 29
5.1.3. Caracterizar la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica. 30
5.2. INGENIERÍA DE DISEÑO 30
5.2.1. Obtención de ChNPs+TPP+PEG.....30
5.2.1.1. Diseño experimental para valoración in vitro e in vivo de QNP 31
5.2.2. Parámetros de las muestras tomadas para la caracterización mediante MET 32
5.2.2.1. *In vitro* 32
5.2.2.2. *In vivo* 33
5.3. METODOLOGÍA.....35
5.3.1. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*). 35
5.3.1.1. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG sobre crecimiento *In vitro* de *Fusarium solani* 35
5.3.1.2. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG en modelo *in vivo.* 39
5.3.1.3. Análisis estadístico para los resultados de la actividad antifúngica de la evaluación *in vitro* e *in vivo* 42
5.3.2. Identificar el daño celular del hongo *F. solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica. 43
5.3.3. Caracterizar la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica. 44
5.4. MARCO NORMATIVO 45
5.4.1. Practicas estándar, equipos de seguridad y requisitos de instalación se aplican a nivel de bioseguridad 2.....45
5.4.1.1 Prácticas microbiológicas estándar 45
5.4.1.2. Equipos de seguridad.....46
5.5. PRUEBAS PRELIMINARES.....46
6. RESULTADOS.....48
6.1. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*).....48
6.1.1. Caracterización microscopia y Macroscópica del hongo *F. solani* 48
6.1.2. Curva de crecimiento de *F. solani*.....49
6.1.3. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG sobre crecimiento *In vitro* de *Fusarium solani*.....51
6.1.3.1. Método de Dilución en Agar 51

6.1.3.2. Método de Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar 56
6.1.3.3. Método de Inoculación con Discos de Micelio 61
6.1.3.4. Esporulación 64
6.1.4. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG en modelo *in vivo.* 65
6.2. Identificación el daño celular del hongo *F. solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica. 73
6.3. Caracterización la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica. ..77
6.4. Consolidación de la metodología evaluada. Protocolo establecido apartir de la evaluación *in vitro e in vivo* 81
6.4.1. Materiales y reactivos para la ejecución del protocolo de evaluación ...82
6.4.2. Metodología 82
6.4.2.1. Evaluación *in vitro* 82
6.4.2.2. Evaluación *in vivo* 84
6.4.2.3.Análisis estadístico para los resultados obtenidos 85
6.4.3. Recomendaciones 85
7. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS 86
7.1. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*). 86
7.1.1. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG sobre crecimiento *In vitro* de *Fusarium solani* 87
7.1.2. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG en modelo *in vivo.* 89
7.2 Identificación del daño celular del hongo *F. solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica. 91
7.3. Caracterización de la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica. ..93
7.4. Consolidación de la metodología evaluada para la actividad antifúngica de QNP2 frente al modelo *in vivo* e *in vitro* 95
8. CONCLUSIONES 98
9. RECOMENDACIONES 100
10. BIBLIOGRAFIA 102
ANEXOS 110

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Requerimientos para la etapa de evaluación de las nanopartículas 26
Tabla 2. Requerimientos para la etapa de evaluación de las nanopartículas 27
Tabla 3. Requerimientos para la etapa de evaluación de las nanopartículas 28
Tabla 4. Requerimientos para el análisis estadístico 29
Tabla 5. Requerimientos para la segunda etapa del proyecto (caracterización por MET) 29
Tabla 6. Requerimientos para la tercera etapa del proyecto (caracterización MET) 30
Tabla 7. ChNPs+TPP+PEG utilizadas en el modelo experimental propuesto y sintetizadas a partir del protocolo modificado por Granados, Guzmán y Sánchez (2018) 31
Tabla 8**.** Diseño factorial 3x8 de los tratamientos usados para la evaluación in vitro. 31
Tabla 9**.** Diseño factorial 2x2x5x2 propuesto para para la evaluación in vivo. 32
Tabla 10**.** Datos del crecimiento en diámetro para los días de evaluación 47
Tabla 11**.** Datos de PICR para el ensayo utilizando el método de Dilución en Agar 52
Tabla 12**.** ANOVA para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de dilución en agar. 53
Tabla 13**.** HSD Tukey para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de dilución en agar. 53
Tabla 14**.** PICR para los tratamientos que son preparados con ácido acético al 0.15%p/v.....55
Tabla 15**.** Resultados del ANOVA para los tratamientos QNP1, QNP2, QNP3, QC1 y QC2.....56
Tabla 16**.** Comparación de los tratamientos QNP1, QNP2, QC1 y QC2 con test de Tukey. 56
Tabla 17. Datos de PICR para el ensayo utilizando el método de Inoculación por Pozos.....57
Tabla 18**.** ANOVA para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar.....58
Tabla 19. HSD Tukey para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar.....58
Tabla 20**.** PICR para los tratamientos que son preparados con ácido acético al 0.15%p/v.....60
Tabla 21. ANOVA para el diámetro de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar.....60

Tabla 22. Datos de PICR para el ensayo utilizando el método de Inoculación con Discos de micelio 61
Tabla 23. ANOVA para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de Inoculación con discos de micelio 62
Tabla 24**.** HSD Tukey para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de Inoculación con discos de micelio 62
Tabla 25. PICR para los tratamientos que son preparados con ácido acético al 0.15%p/v.....64
Tabla 26. ANOVA para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de Inoculación con discos de micelio 64
Tabla 27. Resultados del conteo de conidios realizado a cada uno de los tratamientos. 65
Tabla 28. Resultados del ANOVA One Way para el ensayo in vivo. ABC para cada uno de los ensayos teniendo en cuenta el tipo de inoculación usado para F. solani (Sin herida por Drench-SH/D, Sin herida por Root Dipping-SH/RD, Con herida por Drench-H/D, Con herida por Root Dipping-H/RD) 66
Tabla 29. Resultados del Test Duncan para comparaciones de los tratamientos en el ensayo de Sin herida por Drench-SH/D 67
Tabla 30. Resultados del Test Duncan para comparaciones de los tratamientos en el ensayo de Sin herida por Root Dipping-SH/RD 67
Tabla 31. Resultados del Test Duncan para comparaciones de los tratamientos en el ensayo de con herida por Root Dipping-H/RD 68
Tabla 32. Resultados del Test Duncan para comparaciones de los tratamientos en el ensayo de con herida por Drench-H/D.....69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol del Problema 2
Figura 2. Grafica de Área sembrada y cultivada entre 2015-2018 (MinTIC,2019 7
Figura 3. Aplicaciones de las nanopartículas de quitosano en la agricultura (Kashyapa, Xiang, & Heidenb, 2015). 10
Figura 4. Ciclo de crecimiento del cultivo de tomate (Cámara de Comercio de Bogotá., 2015). 11
Figura 5. Efecto regulador en el control biológico. (Nicholls Estrada, 2008). 14
Figura 6. A) Estructura química de la quitina. B) Estructura química del quitosano (Mármol, y otros, 2011).....16
Figura 7. Morfología de Fusarium solani. Macroscópica (Robles Yerena et al., 2016).....20
Figura 8. Sintomatología causada por Fusarium solani. (Doan, Miyao, & Davi, 2018).....21
Figura 9. Diagrama de bloques del diseño global del proyecto.....34
Figura 10. Esquema general que representa las fases de desarrollo metodologico. 35
Figura 11. Esquema metodología para la fase de evaluación in vitro.....35
Figura 12. Esquema de toma de medidas del micelio 36
Figura 13. Esquema metodología para la fase de evaluación in vivo 39
Figura 14. Escala de síntomas causados por Fusarium spp. (Herrera Cid, 2017) .39
Figura 15. Técnica Root Dipping. (De Silva, 2016) 41
Figura 16. Técnica Drench (Inoculación directo al suelo) (Greenfield, y otros, 2016) 41
Figura 17. Esquema metodología para la fase de identificación del daño celular de F. solani mediante microscopia electrónica. 43
Figura 18. Procedimiento previo a la inclusión de las muestras en glutaraldehido (2,5%) para la microscopia MET.....44
Figura 19. Esquema metodología para la fase de caracterización con microscopia electrónica en el modelo vegetal 44
Figura 20. Macroscopía de Fusarium solani en PDA, anverso (A) y Reverso (B)..48
Figura 21. Microscopia de Fusarium solani.....49
Figura 22. Registro fotográfico de la curva de crecimiento realizada en 1 de las réplicas. 50
Figura 23**.** Gráfico del crecimiento micelial del hongo Fusarium solani. 51
Figura 24**.** Resultados de la evaluación in vitro utilizando la técnica de Dilución en Agar donde se observa el Anverso y reverso para cada uno de los tratamientos en una de las réplicas. 54
Figura 25. Resultados de la evaluación in vitro utilizando la técnica de Pozos donde se observa el Anverso y reverso para cada uno de los tratamientos en una de las réplicas. 59

Figura 26. Resultados de la evaluación in vitro utilizando la técnica de Disco de micelio donde se observa el Anverso y reverso para cada uno de los tratamientos en una de las réplicas. 63
Figura 27 Fotografías del ensayo in vivo para el tratamiento Mertect al 2,0mg/ml 70
Figura 28. Grafica de la respuesta de la planta a la inoculación por root dipping con sin herida de F. solani y tratada posteriormente con Mertect al 2,0mg/ml por root dipping. 70
Figura 29. Gráficos de severidad vs tiempo para los ensayos con QNP2. 71
Figura 30. A. QNP2 para el ensayo con H/RD/RD y B. QNPP2 para el ensayo SH/RD/D 72
Figura 31 Control negativo para los tratamientos (de izquierda a derecha) H/RD, H/D y SH/D 73
Figura 32. Micrografía MET de las ChNPs+TPP+PEG del modelo experimental 2. 73
Figura 33. MET del control negativo (F. solani sin tratamiento) donde se observan hifas con cortes transversales y longitudinales. 74
Figura 34. MET del control positivo (F. solani expuesto al fungicida Mertect con una concentración de 2.0mg/ml) 75
Figura 35. . MET del tratamiento con las ChNPs+TPP+PEG (F. solani expuesto a las nanopartículas QNP2) 76
Figura 36. MET del tratamiento con las ChNPs+TPP+PEG (F. solani expuesto a las nanopartículas QNP2). 77
Figura 37. Visualización de las muestras fijada en microscopia óptica a 10X.. 78
Figura 38. MET de las muestras de raíz de plántula de tomate chonto.1, 2 y 3. Planta sana (S) Plántula sin inocular con F. solani. 4, 5, 6 y 6.1 Control negativo (C-) Plántula de tomate chonto inoculada con F. solani 79
Figura 39. MET de las muestras de raíz de plántula de tomate chonto tratada con QNP2 a los 3 días de haberse inoculado con F. solani y se tomó la muestra a los 45 días después de aplicadas 80
Figura 40. MET de las muestras de raíz de plántula de tomate chonto tratada con una suspensión de QNP2 por 12h a los 3 días de haberse inoculado con F. solani. 81
Figura 41. Comparación de los resultados del MET para el ensayo in vivo (1) e in vitro (2).....96

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Presupuesto.....110
Anexo 2. Cronograma.....112
Anexo 3. Registro de medidas de la curva de crecimiento 113
Anexo 4. Resultados de las pruebas in vitro.....114
Anexo 5. Fórmula para el cálculo de PICR 117
Anexo 6. Método de conteo de conidios en Cámara de Neubauer.....117
Anexo 7. Datos de significancia para el análisis de comparaciones múltiples.....118
Anexo 8. Datos registrados de la evaluación in vivo. 123
Anexo 9. Registro fotográfico de la evaluación In vivo.....127
Anexo 10. Registro fotográfico del invernadero 137
Anexo 11: Graficas de severidad vs días de evaluación para cada ensayo propuesto en la evaluación in vivo.....138
Anexo 12. Ficha técnica de las plántulas usadas en el ensayo. Proporcionada por el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.....146
Anexo 13. Protocolo obtenido de la evaluación in vitro e in vivo de las ChNPs+TPP+PEG frente a F. solani. 147

ABREVIATURAS

ChNPs: Nanopartículas de Quitosano
TPP: Tripolifosfato
PEG: Polietilenglicol
PICR: Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial
MET: Microscopia electrónica de transmisión.
ABC: Área Bajo la Curva
RD: Root Dipping
D: Drench

RESUMEN

El manejo integrado de las enfermedades es uno de los mayores retos del sector agrícola. En el caso de las enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos como *Fusarium solani* al tomate chonto (*Solanum lycopersicum*) se ha realizado el manejo con fungidas químicos de amplio espectro que pueden ser dañinos para el medio ambiente y que comprometen la inocuidad de los alimentos. Las nanopartículas de quitosano son propuestas como una alternativa dentro del control biológico para el manejo de enfermedades fungosas en cultivos como el de tomate. El presente trabajo tiene como objetivo principal realizar la evaluación de las nanopartículas de quitosano con tripolifosfato y polietilenglicol (ChNPs+TPP+PEG) en un modelo *in vitro* e *In vivo* frente a *F. solani* y evidenciar mediante microscopia electrónica de transmisión (MET) la interacción de éstas con el hongo y con las célula hospedera. Se usaron 2 modelos experimentales de nanopartículas y se encontró que el modelo experimental 2 (QNP2) presento un mejor efecto antifúngico en el ensayo *in vitro,* por lo cual se realizó con éstas nanopartículas la evaluación *in vivo* en plántulas de tomate chonto (*Solanum lycopersicum*) determinando un método de aplicación óptimo para las nanopartículas del modelo experimental 2. La Microscopia electrónica de transmisión permitió evidenciar la interacción entre el modelo experimental de nanopartículas 2 y la pared y membrana celular del hongo, así como determinar la interacción entre ésta nanopartícula y el modelo vegetal. Concluyendo que las nanopartículas del modelo experimental 2 tienen un efecto antifúngico sobre la pared y membrana del hongo y por su composición es posible que generen una respuesta de resistencia sistémica adquirida en la planta generando mecanismos de defensa frente al hongo.

PALABRAS CLAVES: Nanopartículas, *Fusarium solani,* Tomate, efecto antifúngico, interacción.

INTRODUCCION

Las diferentes plagas y enfermedades son un creciente problema en la industria agraria, estas pueden ser causadas por diferentes organismos como insectos, bacterias, hongos, etc. que pueden causar diferentes daños en los cultivos más importantes de del sector agrícola como hortalizas, legumbres, tubérculos, entre otros. Para el manejo integrado de las plagas y enfermedades se utilizan diferentes métodos de manipulación, cuidado y tratamiento de estas en los diferentes cultivos. En el área de prevención y tratamiento para enfermedades fitosanitarias se utilizan muchas veces productos químicos que no aseguran la inocuidad de los alimentos producidos, es por esto que se ha buscado en los últimos años la implementación de otras maneras de control.

El control biológico es una de estas formas donde se utilizan organismos antagonistas, extractos naturales y compuestos producidos por estos organismos antagonistas que permiten el control de aquellos que causan enfermedades en los cultivos (Nicholls Estrada, 2008). Dentro de estos compuestos se encuentra el quitosano, el cual ha sido implementado en ciertos ensayos para su actividad antifúngica contra hongos del genero Fusarium spp (Mármol, y otros, 2011).

Se han realizado estudios de compuesto nanoparticulados que puedan utilizarse como controladores biológicos y dentro de esos compuesto se propone el uso de Las nanopartículas de quitosano+TPP+PEG para evaluar su actividad antifúngica contra el hongo *Fusarium solani*, microorganismo causante de la podredumbre de pie de tomate.

Se realizó una evaluación de las ChNPs+TPP+PEG de forma *in vitro* con 3 métodos de evaluación y comparando diferentes modelos experimentales de estas nanopartículas con el efecto antifúngico del quitosano y un fungicida comercial y finalmente se determinó la actividad antifúngica de estas nanopartículas teniendo en cuenta el PICR y se estableció el protocolo que mejor se adaptó a la evaluación para este tipo de nanopartículas. Igualmente se realizó una evaluación *in vivo* de la actividad antifúngica en plantas de tomate chonto lo cual permitió establecer un modelo de aplicación para las ChNPs+TPP+PEG que podría ser utilizado para la futura aplicación de estas en futuras evaluaciones.

Por otro lado, con el fin de observar cómo interactúan las ChNPs+TPP+PEG con el hongo *F. solani* y eventualmente con la zona radicular de la planta se propuso la utilización de un MET que permite ver la ultraestructura del hongo y la raíz al ser expuestas a las nanopartículas. Se logró visualizar las ChNPs+TPP+PEG y su efecto al interactuar con la pared y membrana de *F. solani* y compararse con un fungicida comercial que tiene efectos negativos en el crecimiento de este hongo; así mismo se logró determinar la interacción entre el modelo vegetal, es decir, la zona radicular de la planta al ser expuesta frente a *F. solani* y lo que ocurre al

agregarse las ChNPs+TPP+PEG como un método para controlar la incidencia de la podredumbre de pie de tomate causad por este microrganismo en la planta. Los resultados obtenidos permiten ver que las ChNPs+TPP+PEG tiene un comportamiento similar frente al hongo *F. solani* tanto en el modelo *in vitro* como en el modelo *in vivo.*

La implementación de estas ChNPs+TPP+PEG que poseen un efecto antifúngico frente al hongo fitopatogeno *F. solani* permite proponer una alterativa dentro del área del control biológico para el manejo de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Este complejo de nanopartículas tiene la ventaja de que puede usarse como un sistema de entrega de compuestos naturales que puedan complementar su efecto antifúngico frente a estos microorganismos.

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La incidencia de las plagas y enfermedades en la agricultura es uno de los problemas más importantes del sector, ya que afectan los cultivos causando pérdidas significativas y en ciertos casos suponiendo una amenaza a la seguridad alimentaria (FAO, 2018). En Colombia, un país mayormente agricultor debido a sus condiciones climáticas cultivos como las hortalizas son afectados por un número alto de plagas y enfermedades agrícolas (ICA, 2015). Dentro de estos cultivos uno de los más afectados es el tomate de variedad chonto *Solanum lycopersicum* siendo extremadamente susceptibles a los cambios climáticos en especial a las lluvias prolongadas puesto que ocasiona el surgimiento de microrganismo a quienes le beneficia la humedad de ambiente y el suelo como lo son los hongos los cuales causan diversas enfermedades; dentro de otras causas se tiene el manejo incorrecto de los suelos y de las fuentes hídricas para la agricultura así como el uso indiscriminado de pesticidas lo cual ha causado el incremento de las diferentes plagas y enfermedades ocasionando que sea cada vez más difícil eliminarlas (Barrientos, 2009), y suponiendo un problema en el sector ya que estas se pueden propagar fácilmente provocando pérdidas, afectando al sector y la producción de este producto que es altamente consumido en el país y que debido a hongos como *Fusarium* spp. (Arbeláez, 2000), se pueden generar pérdidas entre 21 y 47% en monocultivos (Vásquez & Castaño, 2017)

Dentro del género de hongos fitopatógenos *Fusarium spp.* se encuentra *Fusarium solani,* un hongo que es de importancia agrícola y médica. Este hongo suele afectar diferentes cultivos como el de alverja(Adriana & Jairo, 2011), frijol(Guerrero & Guerra, 2010) y en tomate donde se ha reportado como una de las causas principales de pudrición de la raíz de tomate en plantas resistentes a *Fusarium oxysporum* (Montealegre, Donoso, Herrera, & Besoain, 2003). Este tipo de hongo "se dispersa por medio de semillas contaminadas, el viento, labores del cultivo, plantas enfermas o herramientas contaminadas. Sobrevive en el suelo durante años" (Lopez, 2016, p69) y entra a la planta por medio de las raíces, razón por la cual la labor durante el trasplante es de suma importancia con el fin de no causar heridas en la raíz.

Es por eso que es de gran importancia generar tratamientos alternativos contra microorganismos como *Fusarium* spp. Por medio del control biológico, razón por la cual se plantea como solución el uso de biopesticidas que puedan atacar a este microrganismo, ya que en la actualidad se usan técnicas dentro del MIPE que buscan evitar la contaminación por la enfermedad y en caso de presentarse se usan fungicidas como clorotalonil, Carbendazim, mancozeb y tiabendazole (Elosan et al., 2007) que se deben aplicar de forma racional y alterna por lo que se busca aplicar otras fórmulas que generen menos contaminación.

Por lo tanto se ha buscado evaluar nuevos pesticidas ecológicos y en este caso basados en nanopartículas de quitosano, el cual debido a su composición le permite interactuar con la pared de quitina del hongo y generándole un estrés metabólico, explorando nuevas soluciones para enfermedades como marchitamiento vascular causado por este microorganismo, promoviendo la biotecnología y el control biológico como una nueva medida para tratar los diferentes problemas causados por las enfermedades que afectan los cultivos hoy en día.

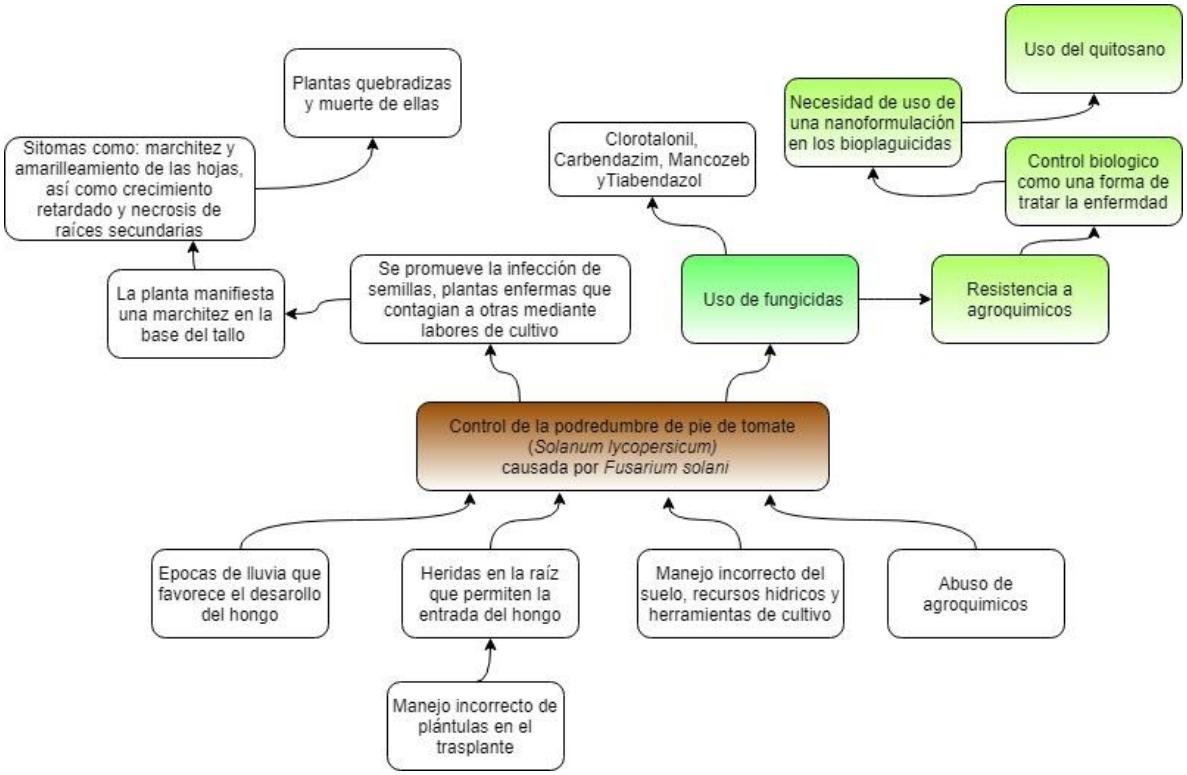

Figura 1. Árbol del Problema

2. JUSTIFICACIÓN

La agricultura es uno de los sectores más importantes económicamente ya que impulsa a un país, es una forma de vida, hace parte del patrimonio y la identidad cultural, esta va más allá de un valor monetario pues representa seguridad alimentaria (FAO, 2005). Uno de los principales problemas que tiene este sector económico son los daños provocados por las plagas y las enfermedades ya que pueden significar pérdidas económicas (pérdida de productividad, ingresos e inversiones) y causar impacto psicológicos (conmoción y pánico); por lo cual es de suma importancia en la actualidad combatirlas (FAO, 2001).

Debido a esto y como alternativa ecológica propuesta y acorde con los objetivos de desarrollo sostenible, el control biológico ha supuesto una de las mejores alternativas para tratar el creciente problema de enfermedades en los diferentes cultivos las cuales pueden ser causadas por diferentes agente fitopatógenos como hongos, bacterias, insectos, nematodos, etc. Es esta la razón por la cual es de suma importancia que las nuevas tecnologías en la agricultura tengan un enfoque biotecnológico orientado al uso de biopesticidas y biofertilizantes los cuales tienen amplios beneficios pero sobre todo, la reducción del uso de pesticidas comunes a los cuales las diferentes plagas han empezado a generar cierta resistencia en los últimos años (PBS and ABSP II, 2004).

Colombia siendo principalmente un país con gran potencial agrícola podría abastecer y suplir la demanda de alimentos en todo el territorio e igualmente generar ganancias relacionadas con la exportación de productos agrícolas. La producción ciertos cultivos y en especial de hortalizas en el país es baja, ya que se ve afectada por la alta incidencia de plagas, el problema ambiental, el mal manejo de los suelos y en algunos casos el uso de aguas contaminadas para el riego de los cultivos lo cual ha afectado la inocuidad de los mismos provocando que se infecten con organismos patógenos e incrementando el uso de agroquímicos más allá de las cantidades recomendadas, esto con el fin de tener un mejor control fitosanitario, lo que genera grandes gastos para intentar mantener la producción (DANE, 2014).

Es esta la razón por la cual es de suma importancia la inversión en el sector, procurando el mejoramiento de la producción mediante la implementación de diferentes técnicas de MIPE e igualmente resaltando la importancia de que los productores las conozcan e implementen, lo que les permitiría tener cultivos rentables y que no afecta el medio ambiente. Dentro del MIPE se encuentra el control biológico el cual “contribuye a mantener el equilibrio ecológico en el medio ambiente y la producción de alimentos inocuos” (DANE, 2014, pág. 7).

En el caso de las hortalizas el control biológico se enfoca en el manejo de enfermedades como: la Botrytis, insectos como la mosca blanca y hongos como *Fusarium sp, Rhizoctonia sp. y Pythium sp,* mediante el uso de otros organismos y de extractos vegetales o naturales (DANE, 2014), que al implementarse permitan obtener mejores rendimientos en los cultivos de hortalizas resultando en productos de mejor calidad e inocuidad.

La bioingeniería propone y participa en la implementación de soluciones a este problema fitosanitario en cultivos desde un enfoque ambiental y de sostenibilidad alimentaria. Por lo cual es de vital importancia proponer soluciones tecnológicas para el sector agrícola a través del uso del control biológico y aplicación de la nanotecnología. Tenido en cuenta la problemática descrita y las necesidades que presenta el sector se propone el uso bioplaguicidas basados en la implementación de sistemas nanotecnológicos que permiten y confieren protección y la liberación controlada y eficiente de las sustancias biológicamente activas y disminución de los efectos ambientales y costos económicos causados por el alto uso de agroquímicos usados.

La propuesta que se hace en el presente trabajo se orienta hacia la implementación de biotecnologías enfocadas a la aplicación del control biológico, como lo son los bioplaguicidas, con el fin de aplicar nanoformulaciones a estos productos. Es por esto que el propósito del presente trabajo se orienta hacia la implementación de nanopartículas de quitosano con matriz polimérica de tripolifosfato y polietilenglicol para el control anti fúngico del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* ya que son nanopartículas que tienes ventajas como que se reabsorben y de biodegradan en el sistema, el polietilenglicol les confiere más estabilidad en caso de que el microorganismo genere metabolitos secundarios causados por el estrés generado por las nanopartículas y le confiere liberación controlada en caso del uso de un compuesto bioactivo y de igual forma gracias a su tamaño interactúan más fácil con la membrana plasmática, generando un mejor efecto inhibitorio.

La aplicación de estas nanopartículas en las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum) de debe a que es* una de las hortalizas más afectadas por diferentes organismos fitopatógenos y la de las más tratadas con un sinnúmero de agroquímicos; buscando obtener un producto que permite estimular la investigación y el desarrollo de plaguicidas ecológicos que promuevan la creciente industria del control biológico en el sector agrario del país.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Evaluar un protocolo sobre el efecto de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG en el control de *Fusarium solani* en condiciones *in vitro* e *in vivo* en plantas de tomate chonto *Solanum lycopersicum*.

3.2. ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*).
2. Identificar el daño celular del hongo *Fusarium solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica.
3. Caracterizar la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. ESTADO DEL ARTE

Colombia tiene un importante potencial productivo en el sector agrícola ya que el país tiene suficientes suelos fértiles que pueden ser usados con tal fin debido a su ubicación y su condición de país tropical lo cual le permite mantener la producción durante todo el año. En el país hay 22,1 millones de hectáreas destinadas al sector agrícola, que es aproximadamente un 36,2% del territorio total, pero actualmente solo se usan 5.3 millones por lo cual solo se está empleando solo el 24,1% del territorio nacional destinado al sector agropecuario (Perfetti, Balcázar, Hernández, & Leibovich, 2013). Es por esto que es importante reconocer la relevancia del sector agrícola en el país y de direccionar el desarrollo tecnológico a incrementar el rendimiento y la calidad de los productos agrícolas lo que hace más competitivo al sector. Por lo cual este desarrollo tecnológico debe estar enfocado al impulso de nuevas técnicas, métodos e insumos (Castellanos, Fonseca, & Ramirez, 2011) Que permitan mejorar la eficiencia y productividad del área es de gran importancia, con el fin de incrementar el comercio agrícola en el país y evitar el deterioro de los productos y pérdidas que pueden alcanzar hasta un 50% en productos como yuca, mango, hortalizas, entre otros (FAO, 2018).

En Colombia las perdidas en el sector agrícola son causadas en parte por las diversas enfermedades presentadas en los diferentes cultivos agrícolas más representativos como el banano, tomate, pepino, papa, entre otros (DANE 2014). Muchos de estos cultivos, en especial las hortalizas, son afectadas principalmente por hongos fitopatógenos. En el caso de una de las hortalizas más afectada por diversas plagas y enfermedades es el tomate chonto (*Solanum lycopersicum*) de las cuales se ha reportado que se han sembrado y cosechado entre el 2015-2018 casi 7000ha en los departamentos productores de esta hortaliza como Antioquia, Norte de Santander y Santander (MinTic, 2019), por lo que supone uno de los cultivos más importantes del país.

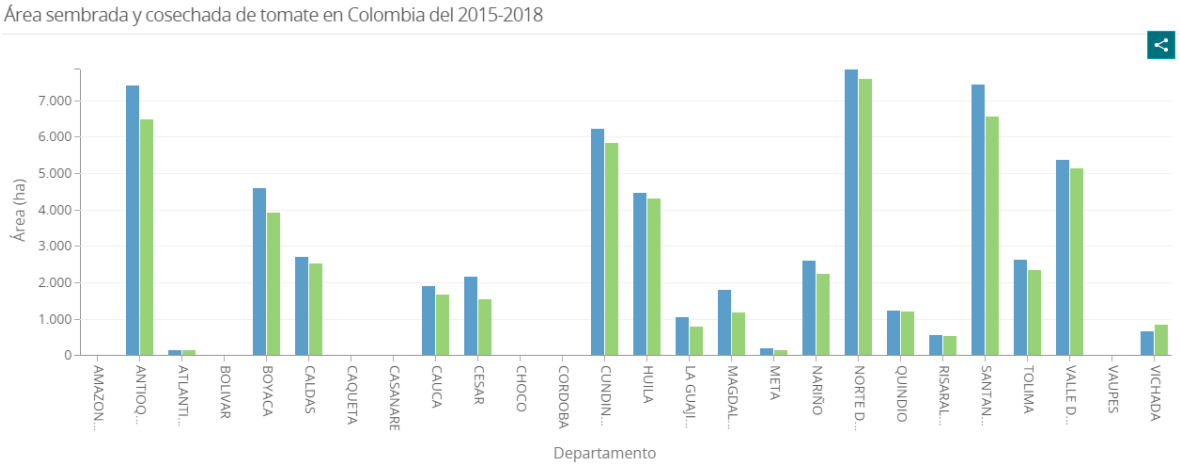

Figura 2. *Grafica de Área sembrada y cultivada entre 2015-2018 (MinTIC, 2019*

Una de las hortalizas que representa alta demanda en el mercado colombiano y por lo tanto, es una de las especies más usadas y estudiadas debido que el cultivo es de alto costo por las labores de crecimiento de la planta como los amarres, la poda y la aplicación de diferentes pesticidas (Burbano & Vallejo, 2017), es el tomate de variedad chonto (*Solanum lycopersicum*).

Se han reportado perdida a causa de los hogos fitopatógenos del genero *Fusarium* spp. dentro de las cuales encontramos a *Fusarium solani, Fusarium oxysporum, y Fusarium gramineum. Fusarium solani* es un hongo que junto con *Fusarium oxysporum* ha tenido incidencia en cultivos en América Latina como en México y Chile (Villa–Martínez et al., 2015). En Colombia teniendo en cuenta que en el país se cultivan más de 16000ha en tomate, siendo una de las hortalizas más consumidas en el mundo y cultivada en más de 100 países para consumo, las pérdidas de cosecha perjudican la economía agrícola de cualquier país; en el caso de Colombia se han reportado perdidas causada por hongos de este género en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y el Valle del Cauca (Arbeláez, 2000), con cifras de entre 21 y 47% en monocultivos (Vásquez & Castaño, 2017).

Con el fin de evitar las pérdidas económicas causada por organismos fitopatógenos se implementa el uso de métodos incluidos en el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE) que están orientados a prácticas agrícolas que buscan la producción de alimentos limpios e inocuos, dentro de estos método encontramos el control biológico (Cámara de Comercio de Bogotá., 2015). En el caso del control de *Fusarium* spp. se usan actualmente para su control en el tomate de variedad chonto agroquímicos con componentes activos como los benzimidazoles, donde se incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato, y también otros componentes como Azoxystrobin, Dimetamorf (Villa–Martínez et al., 2015) etc.

Como uno de los campos de desarrollo de control biológico para cultivos que se encuentra actualmente en auge es el uso de los bioplaguicidas (Cotes, 2014). Estos productos son considerados también como biopesticidas o plaguicidas naturales y pueden ser microorganismos, sustancias que liberan estos organismos o extractos naturales derivados de plantas (SEPSA, 2012) como por ejemplo el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal que permiten reducir la severidad de enfermedades se inducen mecanismos de resistencia propios de la planta u otros compuestos naturales que generen el mismo beneficio (Kashyapa, Xiang, & Heidenb, 2015). Estos productos son clasificados según la literatura en cuatro grupos: A base de microorganismos (Virus, bacterias y hongos), a base de macroorganismos (Insectos entomófagos, nematodos entomopatógenos), Ingredientes activos de bioplaguicidas a base de sustancias bioactivas (Extractos botánicos, minerales y otras sustancias bioactivas derivadas de microrganismos) y por último sustancias afines (Atrayentes, feromonas, adherentes para trampas, repelentes, etc.) (SEPSA, 2012).

En Colombia se ha incrementado el uso de bioplaguicidas ya que varios centros de investigación promueven su desarrollo e implementación. Siendo Colombia un país megadiverso se debe tener en cuenta el uso de diferentes tipos de biotecnologías para promover un desarrollo económico sostenible y convertirse en un pionero en el biocontrol, sin embargo, los bioplaguicidas usados actualmente son obtenidos y desarrollados de distribuidores internacionales y Colombia avanza paulatinamente en el desarrollo de este tipo de productos (Cotes, 2014).

La investigación en Colombia acerca del desarrollo de bioplaguicidas solo se ha enfocado en la selección de microorganismos mas no en “el desarrollo de productos con alta calidad tecnológica, fáciles de aplicar, ecológicos y con prolongada vida útil” (Cotes, 2014), sin embargo, algunos estudios buscan superar las dificultades que se presentan en la estabilidad de dichos productos debido a las condiciones de almacenamiento y aplicación, facilitando el uso y aplicación en el sector agrícola. En Colombia los bioplaguicidas son formulados en forma de polvos humectables, gránulos dispersables en agua y formulaciones líquidas (2014) (Kashyapa, Xiang, & Heidenb, 2015).

Desde los años 70 se empezó a implementar el uso de lo bioplaguicidas en Colombia importando baculovirus desde Estados Unidos para controlar *Tricoplusia ni* y *Heliothis spp*, en los 80 se empezó a usar *Trichoderma spp.* Para el control de *Rhizoctonia solani* y de *Fusarium* spp*,* en los 90 Corpoica empezó a promover una estrategia para la investigación en biocontrol y el desarrollo de tecnología más avanzada para el avance en la comercialización en los bioplaguicidas convirtiendo a Colombia en uno de los primeros países en América Latina en incursionar en el desarrollo, uso y comercialización de estos productos (2014).

Actualmente algunos productos generados a partir de nanotecnología se han desarrollado como una alternativa de bioplaguicidas para control de plagas en

agricultura, ya que esta práctica se enfoca en reducir la dosis del ingrediente activo generando menos residuos y permitiéndole al plaguicida actuar de forma más eficiente (Lugo, García, & Ruelas, 2010). Entre estos avances se ha buscado la reducción del tamaño de las nanopartículas así como nanocápsulas diseñadas con el fin de que liberen el componente activo bajo ciertas condiciones. Varias compañías e investigadores han desarrollado diferentes productos como micro emulsiones, cápsulas de nano arcilla con fertilizantes y agentes de biocontrol (Programa de Cooperación Científico Técnico. Pakistán- EE.UU), un nanoformulado que degrada el revestimiento de semillas de maleza en el suelo (Universidad Agrícola Tamil Nadu (India) y Tecnológico de Monterrey (México)), nanocápsulas que aumentan las potencia y la liberación dirigida de ingrediente activo (Organización de Investigación Científica e Industrial del Commonwealth de Australia), entre otros (Lugo, García, & Ruelas, 2010).

Dentro de los compuestos más utilizados actualmente como bioplaguicidas con sistemas nanotecnológicos se encuentra el quitosano, ya que es uno de los polímeros más eficientes y, en caso de tener tamaño de nanopartícula, funcionan como uno de los más prometedores en la acción antifúngica debido a varias propiedades que le confieren ventajas, entre ellas, es biocompatible, biodegradable, posee una alta permeabilidad en la células de la planta, no es tóxico y posee alta capacidad de formar reticularidad con otros polímeros lo que le confiere diferentes aplicaciones en la agricultura como se puede ver en la Figura 3. En sistemas nanoparticulados el quitosano tiene la habilidad de servir como un método de entrega de agroquímicos y micronutrientes, ya que por ser un nanoformulado se espera más eficiencia y eficacia causada por un área de interacción superficial mayor entre la nanopartícula y la planta, por la inducción de actividad sistémica y una mayor movilidad. Algunos estudios han reportado el uso de quitosano para la síntesis de nanopartículas con compuestos de cobre por su naturaleza antifúngica, se han generado nanocompuestos con quitosano con partículas de plata, nanopartículas de quitosano, tripolifosfato y polietilenglicol (ChNPs+TPP+PEG) (Kashyapa, Xiang, & Heidenb, 2015).

Figura 3. Aplicaciones de las nanopartículas de quitosano en la agricultura (Kashyapa, Xiang, & Heidenb, 2015).

Teniendo en cuenta la gran cantidad de avances que ha habido en el área de la agricultura y la nanotecnología, la Universidad el Bosque específicamente en el programa de Bioingeniería acorde con el enfoque de sostenibilidad alimentaria perteneciente a los cuatro ejes temáticos que componen el programa se ha desarrollado un estudio preliminar en la producción y evaluación antifúngica de nanopartículas de quitosano en una matriz polimérica de tripolifosfato (TPP) y polietilenglicol (PEG) frente a los hongos *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma spp,* mostrando resultados de estrés metabólico e inhibición del micelio (Pardo, 2017), así como también actualmente se encuentra en curso un trabajo de grado para la automatización de la síntesis de este tipo de nanopartículas (Granados, Guzmán, & Sánchez, 2018), por lo tanto, el presente proyecto tiene como propósito continuar el estudio de esta línea de nanotecnología aplicada a la agricultura, como un campo de desarrollo de la Bioingeniería para potenciar las aplicaciones en Colombia.

4.2. MARCO TEORICO

4.2.1. Tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum*, es una hortaliza originaria del centro y sur de América. Existen diferentes variedades pero las más comunes en Colombia son chonto, cherry y milano. Es una planta perenne anual y arbustiva que se desarrolla de forma rastrera semierecta. Dentro de las condiciones ideales para su desarrollo están: La humedad relativa entre el 60% y el 85%, requiere de 6 a 8 horas diarias de luz y el riego debe ser frecuente y uniforme, la temperatura debe estar entre 15 y 25 °C, no es muy exigente para el suelo pero lo ideal es un suelo profundo de

textura franca y se adapta a pH ácidos de 6 a 7 (Cámara de Comercio de Bogotá., 2015).

La producción del cultivo se da bajo invernadero y al aire libre desde los 0 a 1500 m.s.n.m. En Colombia, en el año 2013, se produjeron de 412.351,2ton, entre los departamentos de Norte de Santander, Antioquia, Boyacá, Santander y Cundinamarca, por lo que es uno de los cultivos más importantes del país. Este presenta diferentes etapas de desarrollo (Figura 4) durante su crecimiento (Cámara de Comercio de Bogotá., 2015):

- Establecimiento de la planta: Germinación de 4 a 7 días después de la siembra, comienza formación parte aérea de la planta
- Crecimiento vegetativo: La planta crece y desarrolla frutos rápidamente
- Floración y cuaja: De los 20-40 días después del trasplante, Se promueve la polinización del cultivo para la cuaja
- Desarrollo del fruto: El fruto se empieza a desarrollar y a crecer.
- Madurez fisiológica y cosecha: 80 a 120 días después del trasplante. La cosecha es permanentemente pero se limita por factores climáticos y económicos

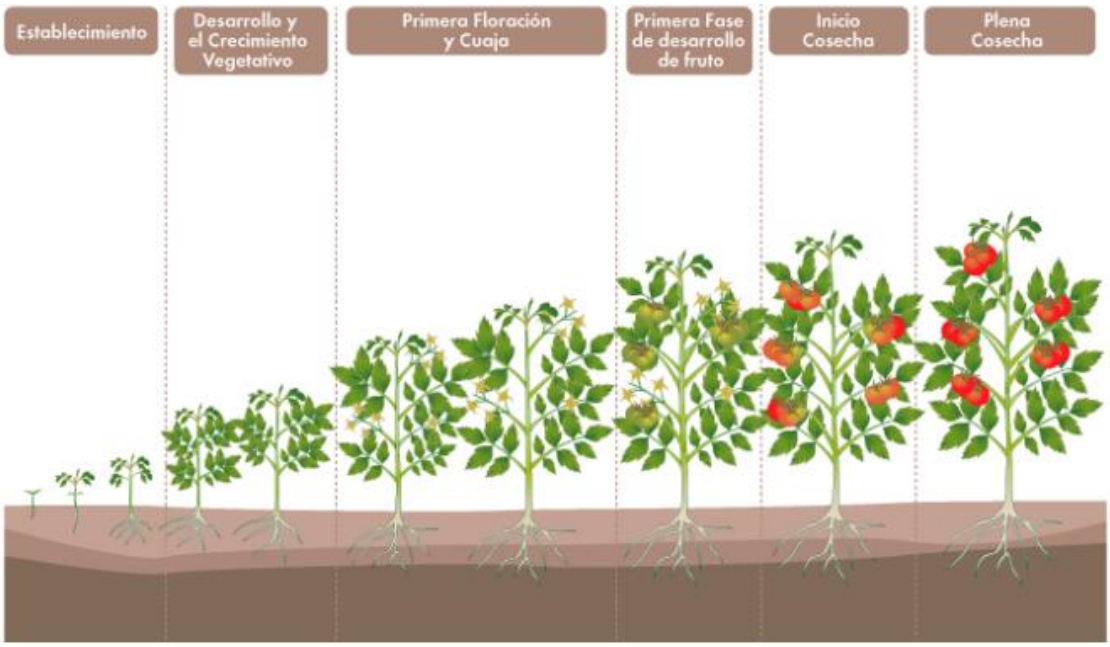

Figura 4. Ciclo de crecimiento del cultivo de tomate (Cámara de Comercio de Bogotá., 2015).

4.2.1.1. Enfermedades limitantes del tomate

Las enfermedades en los cultivos de tomate constituyen un factor limitante en la producción, son causadas por la presencia de microorganismos patógenos. Dentro de las enfermedades se destacan aquellas que son causadas por

microorganismos que viven en el suelo los cuales provocan daño a la raíz y tejidos y enfermedades que alteran el funcionamiento de las plantas, originando así síntomas como pudriciones, manchas y deformaciones. Dentro de las principales enfermedades que afectan al tomate encontramos (Carrillo & García, 2012):

- Enfermedades Fungosas: son enfermedades causadas por hongos y que afectan el sistema vascular de la planta como el Damping off (causada por *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*) generando la pudrición de semilla o muerte de la plántula antes de germinar, la marchitez sureña (agente causal *Sclerotium rolfsii*), el Moho blanco que tiene como responsable al hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, y las enfermedades causada por *Fusarium sp*p. como (Carrillo & García, 2012):
    - Pudrición en la base del tallo o del pie de tomate: Causada principalmente por hongos del genero *Fusarium* spp. donde se encuentra *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* donde se presentan síntomas como lesión necrótica en tejido cortical, defoliación, necrosis del pivote de la raíz y podredumbre de raíces secundarias (Wolcan & Lori, 1991).
    - Marchitez por *Fusarium*: es una de las enfermedades más comunes y destructiva que llega a limitar el cultivo de tomate. Tiene como agente causal *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*. Produciendo amarillamiento de las hojas y necrosis del tejido vascular hasta matar la planta (Carrillo & García, 2012).
    - Pudrición de la corona y raíz del tomate: también causada por *Fusarium oxysporum* pero por la forma especial. sp. *radicis-lycopercisi*. Es una de las enfermedades radicales más destructivas, marchitando rápidamente la planta e invadiendo la vena principal hasta causar la muerte (Carrillo & García, 2012).

- Enfermedades foliares como el Tizón tardío que provoca epifitias en tomate y es generada por *Clavibacter michiganensis* causando daño a todos los tejidos aéreos de la planta y dañando los frutos (Carrillo & García, 2012)
- Enfermedades bacterianas del tomate: Las enfermedades bacterianas dañan tejidos vasculares, el follaje y los frutos. Dentro de estas se encuentran el Cáncer bacteriano del tomate generada por *Clavibacter michiganensis*, la marchitez bacteriana de las solanáceas generada por *Ralstonia solanacearum*, la mancha bacteriana que tiene como agente causal a la bacteria *Xanthomonas campestris* (Carrillo & García, 2012).

Es esta la razón por la cual se buscan diferentes métodos de control como la implementación de cultivos resistentes, medidas de exclusión, erradicación y protección (Carrillo & García, 2012). Así como el Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades siendo un sistema que busca el monitoreo constante y el cuidado y

prevención para enfrentar las enfermedades encontrando dentro de estas prácticas como el manejo de suelo y recursos hídricos, la prevención y algunas medidas como el control físico, el control químico y el control biológico; esto con el fin de producir un producto limpio e inocuo para el consumidor (Cámara de Comercio de Bogotá., 2015).

4.2.2. Control Biológico

El control biológico es una técnica en la cual se realiza el manejo natural de poblaciones animales o plantas con el uso de otros organismos que ayudan a regular el crecimiento del organismo que está causando algún daño. En este caso se define como el uso de organismos benéficos contra aquellos que causan daño. (Nicholls Estrada, 2008).

El control biológico se realiza de forma local con el fin de eliminar el organismo problemático reduciendo así la población de este a un porcentaje que no cause un daño grave u económico, por lo cual el organismo benéfico o enemigo natural lo reduce la plaga hasta una población que garantice su propia supervivencia (Figura 5), puesto que si lo elimina por completo se quedaría sin sustento y no podría seguir desarrollándose. Este tipo de medida se realiza contra todo clase de plagas en las plantas como depredadores (Insectos) o microorganismos (hongos, bacterias parásitos) usando enemigos naturales como depredadores, parasitoides y patógenos que al ser manejados de forma adecuada se convierten en reguladores naturales de los organismos maléficos, a esta regulación es lo que se le llama control biológico. (Nicholls Estrada, 2008)

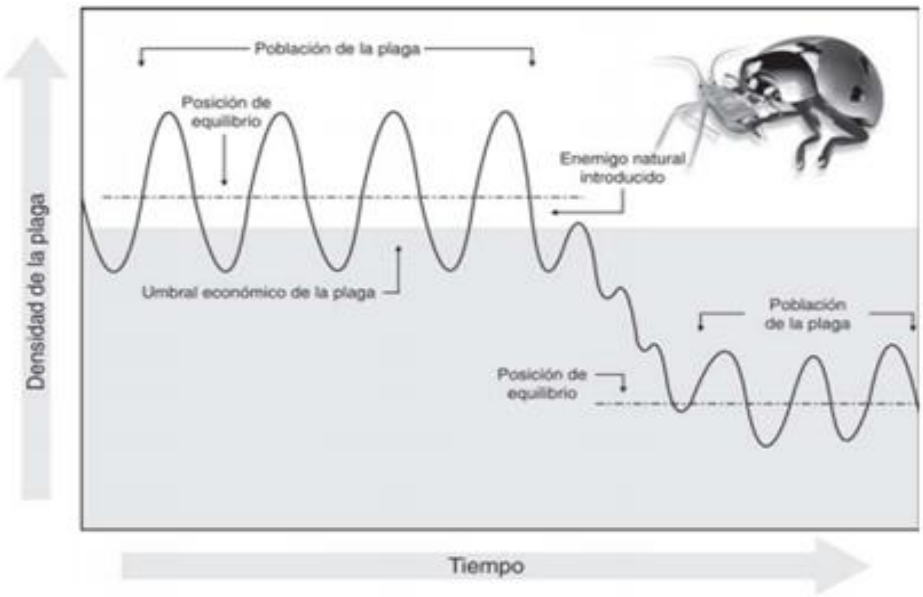

Figura 5. Efecto regulador en el control biológico. (Nicholls Estrada, 2008).

El control biológico es una práctica autosostenible y depende directamente de la población del plaga y de diferentes factores ambientales como temperatura, humedad, acidez del medio, exposición a la luz UV entre otras; es de suma importancia tener en cuenta la plaga que se ha de combatir ya que el espectro de acción de estos biocontroladores es menor que el de los plaguicidas comerciales y antimicrobianos químicos. (Nicholls Estrada, 2008) (Serrano Carreón & Galindo Fentanes, 2007).

En el control biológico se pueden encontrar desde microorganismos seleccionados para combatir directamente las plagas, así como cepas de estos que pueden ser añadidos en formulados comerciales como hongos levaduras o bacterias a los cuales se les denominan biopesticidas (Mondino, 2003). Uno de los mejores ejemplo de estos productos es el usos de *Bacillus thuringiensis* y hongos que atacan a los insectos, de tal forma que los hongos de género como *Trichoderma, Gliocladium, Streptomyces, Coniothyrium* y *Candida* y bacterias como *Pseudomonas, Bacillus y Agrobacterium* son usados para el control de enfermedades también producidas por otros hongos fitopatógenos (Serrano Carreón & Galindo Fentanes, 2007). Igualmente se utilizan sustancias de origen natural como los propóleos, extractos de plantas, bicarbonato de sodio, vinagres, quitosano entre otros. (Mondino, 2003)

Dentro del control biológico uno de los microorganismos a combatir son los hongos patógenos que causan enfermedades en diferentes partes de las plantas (raíz, tallo, hoja, fruta, etc.), enfocando el tratamiento en las enfermedades transmitidas por suelo buscando la supresión inicial de la enfermedad en la planta y reduciendo la tasa de infección; entre estos se encuentran el uso de agentes de control biológico de origen fúngico y bacteriano (Heydari & Pessarakli, 2010)

Otra de las practicas relacionadas con el control biológico es la aplicación de la biotecnología en la agricultura entendiéndose como serie de prácticas y técnicas que se usan para mejorar microrganismos, plantas y animales y dentro de las cuales se encuentran desde métodos que implican la alteración del ADN para mejorar la productividad (PBS and ABSP II, 2004) hasta herramientas como los biopesticidas que combaten las enfermedades sin dejar ningún residuo químico y en ciertos casos beneficiando el crecimiento de la planta (Balvantín García, 2009) Dentro de estos avances se encuentra la nanotecnología aplicada a la agricultura sustentable generando nuevos productos como bioplaguicidas y fertilizantes químicos que son más eficientes que los usados actualmente (Lugo, García, & Ruelas, 2010).

4.2.2.1. Nanotecnología y control biológico

La nanotecnología hace referencia a técnicas de la ingeniería que permiten el manejo y creación de materiales a una pequeña escala. Es un enfoque multidisciplinar que tiene una orientación hacia la agricultura donde se ha encaminado hacia el uso de nuevas tecnologías de producción de fertilizantes, los cuales proveen todos los nutrientes necesarios para los cultivos, y biopesticidas basados en el uso de agentes que son encapsulados y liberados lentamente. (Medina, García Gutiérrez, & Ruelas, 2010)

La razón del uso de las nanopartículas radica en que son más reactivas químicamente y bioactivas que partículas de mayor tamaño lo que les confiere acceso a órganos, tejido y células. Su aplicación en el área de la agricultura y biotecnología es la incorporación de materiales sintéticos a las estructuras biológicas puesto que si su tamaño es menor a 300nm estos compuestos pueden ser absorbidos por las células y su núcleo. Por esta razón se ha incursionado en el diseño de plaguicidas donde se reduzca el ingrediente activo o se cambia por uno menos contaminante. (Medina, García Gutiérrez, & Ruelas, 2010).

Algunos estudios reportan el uso de las nanopartículas de quitosano para control antifúngico evaluando su efecto frente al crecimiento micelial de hongos como *Rhizopus* sp., *C. capsici*, *C. gloeosporioides* y *A*. *niger, A. alternata*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani* encontrando una reducción o inhibición del crecimiento y en algunos casos se ha reportado la reducción de enfermedades como la antracnosis presentada en el mango. Es por esto que el quitosano se ha propuesto como una alternativa para tratar y prevenir enfermedades en el área agrícola y ofreciendo así desde el enfoque de la nanotecnología tratamientos seguros que garanticen la inocuidad de los alimentos (Bautista, Ventura, Correa, & Corona, 2017).

4.2.2.2. Quitosano

El quitosano es un polisacárido y es la forma desacetilada de la quitina, que se obtiene mediante la hidrólisis de esta en un medio alcalino. Está compuesto de 2 subunidades D– glucosamina y N–acetil–D–glucosamina conectadas por una unión 1-4 glicosídica. (Cárdenas *et al.*, 2015). La quitina (Figura 6A) es un biopolímero que es altamente soluble en agua y en otros compuestos ácidos o fluroalcoholes, esto hace que sus aplicaciones sean pocas; de ahí sale el quitosano (Figura 6B) que al ser una forma desacetilada de esta que le concede mejores propiedades de reactividad y solubilidad. (Mármol, y otros, 2011).

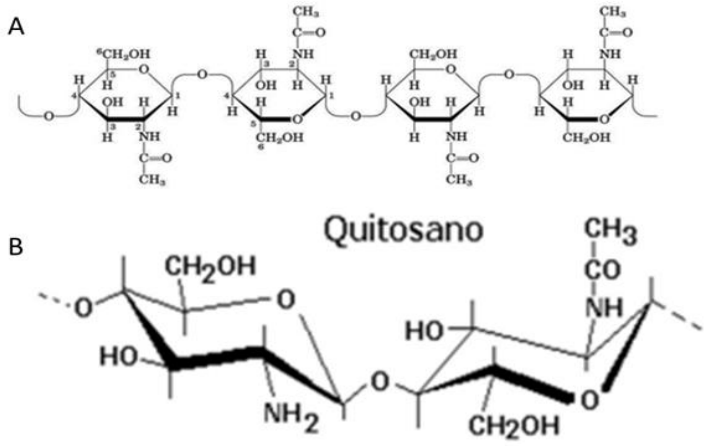

Figura 6. A) Estructura química de la quitina. B) Estructura química del quitosano (Mármol, y otros, 2011)

El quitosano es obtenido a partir de la quitina que se consigue por medio de métodos químicos y físicos aplicados a conchas de crustáceos o desde la industria de fermentación en hongos. Una vez obtenida la quitina se desacetila con un tratamiento alcalino fuerte a altas temperaturas para obtener el quitosano dejándolo con grupos aminos que lo hacen muy versátil para las diferentes aplicaciones en biotecnología, agricultura, biomedicina, entre otros. En la agricultura se utiliza para el control de enfermedades y plagas vegetales y promoviendo el crecimiento y desarrollo de las semillas. (Mármol, y otros, 2011).

- Actividad antifúngica.

El quitosano tiene diferentes usos en la agricultura ya que ayuda al crecimiento de las plantas y les protege contra infecciones causadas por hongos. Tiene un uso muy importante en como bioplaguicidas, ya que se ha encontrado que tiene actividades antifúngica relacionadas con: 1) Concentración utilizada, 2) Naturaleza poli catiónica del quitosano, 3) Longitud de la cadena, 4) Efecto inhibitorio en la síntesis de enzimas producida por los hongos, 5) Producción de compuestos fenólicos como ácido cloro génico, entre otros y 6) Formación de barreras estructurales (Cárdenas *et al.,* 2015).

La actividad antifúngica también depende de la cepa, el peso molecular, la concentración, el grado de desacetilación, el tipo de quitosano. De todos estos el factor más importantes es el grado de desacetilación, puesto que se ha relacionado el número de grupos amino libres en la molécula con la actividad antimicrobiana gracias a la interacción entre el grupo amino (policatiónico) del quitosano y la superficie de la membrana fúngica (cargas electronegativas) lo que

aumenta la permeabilidad celular aunque se debe tener en cuenta la composición de esta y la afinidad entre los compuestos. (Bautista, Ventura, Correa, & Corona, 2017).

Teniendo esto en cuenta (Peña, Sánchez, & Calahorra, 2013) la unión del quitosano a la membrana provoca desequilibrios homeostáticos, causando la salida de moléculas como: K+, Ca2+, nucleótidos, fosfatos y algunos sustratos necesarios para el metabolismo celular afectando así la respiración y fermentación en el hongo; asimismo se dice que interfiere en la síntesis de mRNA y proteínas lo que le permite penetrar en el núcleo de los hongos. Se menciona en la literatura que la interacción del quitosano con el hongo se puede observar por las alteraciones de gran magnitud en la pared celular y la membrana plasmática, así mismo algunos organelos se ven afectados lo que en algunos casos causa la apoptosis (Bautista, Ventura, Correa, & Corona, 2017).

Dentro de los hongos fitopatógeno se ha comprobado la actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* del quitosano sobre: *Mucoraceae, Pleosporaceae* y *Glomerellaceae.* Además*, Alternaria alternata, Rhizopus stolonifer, Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum, Aspergillus flavus* y varias especies de *Penicillium* también pueden ser afectados por este polímero. (Bautista, Ventura, Correa, & Corona, 2017).

Así mismo más allá del efecto que tiene sobre los hongos fitopatógenos, el quitosano ha demostrado tener efectos positivos sobre el crecimiento de la planta y la inducción de la resistencia. En cuanto al crecimiento de la planta este estimula la germinación de semillas como en el crecimiento de partes de la planta como raíces, retoños y hojas; la inducción de resistencia en ciertas plantas se genera con el fin de responder más rápidamente al ataque de patógenos, por lo que en presencia de quitosano se induce la producción de: fitoalexinas, proteínas relacionadas a la patogénesis, inhibidores proteicos, ligninas, quitinasas y glucanasas (Larez, 2008).

4.2.2.3. Nanopartículas de Quitosano

Las nanopartículas de quitosano son de gran interés en el área de la nanotecnología aplicada a la agricultura debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta permeabilidad, rentabilidad y propiedades no Dependiendo de método físico y químico bajo el cual se preparen le confieren variación en la estabilidad, el tamaño, la forma y la actividad biológica (Sathiyabama & Parthasarathy, 2016).

En el caso de las nanopartículas de quitosano preparadas con Tripolifosfato (TPP) se producen nanopartículas con tamaños variables (250-400 nm) (2016) y al ser modificadas con Polietilenglicol (PEG) no se forman uniones químicas irreversibles que podrían generar toxicidad en el sistema biológico; igualmente el uso de PEG

tiene potencial ser aplicado con el fin de generar nanopartículas que sirvan como medio de entrega de componentes bioactivas y se liberen de forma controlada en sitios específicos. Estas nanopartículas recubiertas con PEG son más estables frente a fluidos fisiológicos o metabolitos secundarios que puedan ser producidos por el organismo a causa de la presencia de la nanopartículas en el organismo (Rodríguez, Valderrama, Alarcón, & López, 2010).

Su estabilidad física depende del pH y temperatura. Las nanopartículas de quitosano son sintetizadas a un pH de 5,5 siendo estables en este valor, en pH muy ácidos (~1) o básicos (> 7,4) en temperatura de 37ºC puede afectar la densidad del entrecruzamiento con TPP lo que genera hinchamiento y en pH muy bajos puede separar la unión entre el quitosano y el TPP, y el pH altos se liberan las cadenas de quitosano. En el caso de la temperatura se ha reportado que la síntesis de las nanopartículas se hace a temperatura ambiente que puede estar entre el rango de 20-37°C por lo que en temperaturas muy bajas o muy altas no se asegura la termoestabilidad de las partículas (Rodríguez, Valderrama, Alarcón, & López, 2010).

El **efecto antifúngico** de las nanopartículas de quitosano es más efectivo que el del quitosano normal, ya que las nanopartículas inhibían mejor el crecimiento micelial debido a su tamaño y a la naturaleza altamente permeable de estas hacia la membrana biológica (Sathiyabama & Parthasarathy, 2016).

4.2.3. Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son los culpables de diversas enfermedades en diferentes cultivos (hortalizas, cereales, frutas, entre otros) ya que causan afectaciones en pre y postcosecha. Estos microorganismos son los “causantes del deterioro patológico de la frutas, hojas, tallos y productos subterráneos (raíces, tubérculos)” (Juárez Becerra, Sosa, & López, 2010). Dentro de estos se encuentran distintas clases de hongos que causan daño a diferentes productos agrícolas como: *Alternaria, Botrytis, Diplodia, Monilinia, Penicillium, Phomopsis, Fusarium, Rhizopus, Mucor y Colletotrichum* Así mismo dentro de estas familias existen más de 8000 especies de hongos patógenos en plantas, los cuales suelen pasar la mayor parte de su vida desarrollándose como huésped o parásitos en la planta y la otra parte en el suelo como saprofitos, las esporas de los hongos se forman en la superficie de los tejidos de la planta lo que les permite diseminarse con facilidad. (Juárez Becerra, Sosa, & López, 2010).

Una vez en la planta el hongo afecta el tejido en pequeñas proporciones de esta lo que eventualmente puede convertirse en un efecto generalizado; principalmente causan necrosis, atrofia o hipertrofia, afectar la raíz o el sistema vascular de la planta lo que genera marchitamiento; todo estos efecto pueden causar la

disminución de la vitalidad de la plata y eventualmente la muerte de la planta o que sea improductiva. (Juárez Becerra, Sosa, & López, 2010).

4.2.3.1. Fusarium solani.

Fusarium solani (teleomorfo *Nectria haematococca*) es un hongo fitopatógeno de gran importancia que causa diferentes enfermedades en los cultivos como la podredumbre de la raíz, la pudrición de la raíz y el tallo, el síndrome de muerte súbita, podredumbre del pie en frijol y tomate (Luginbuhl, 2010).

- Estructura Celular

Las colonias de *Fusarium* crecen a 25°C. Su morfología macroscópica se puede describir como anverso blanco de textura algodonosa y ligeramente amarillento hacia el centro y el reverso blanco crema (Figura 7A) (Robles Yerena, Leyva, & Cruz, 2016). Los hongos de este género se caracterizan por tener tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidiosporas. (Arbeláez, 2000) (Garcés de Granada, Orozco, Bautista, & Valencia, 2001).

- Las microconidias (Figura 7C) son en algunos casos conidios aseptadas y en otros didimoconidios, hialinos, cilíndricos, curvadas. Se forman sobre monofiálides laterales, largas (Figura 7D)(Robles Yerena et al., 2016).
- La macroconidias (Figura 7C) se describen como fragmoconidios con 5 a 6 septos hialinos, fusiformes, robustos, con la célula apical levemente encorvada y puntiaguda (Robles Yerena et al., 2016)
- Las clamidiosporas, son esporas ovales solas o en pares de pared gruesa lo que le confiere resistencia y son las que sobreviven en tejidos muertos de plantas o en el suelo, formadas entre las hifas o terminales en las ramas laterales de las mismas (Yerena, Mir, Gerardo, & Gómez, 2016).

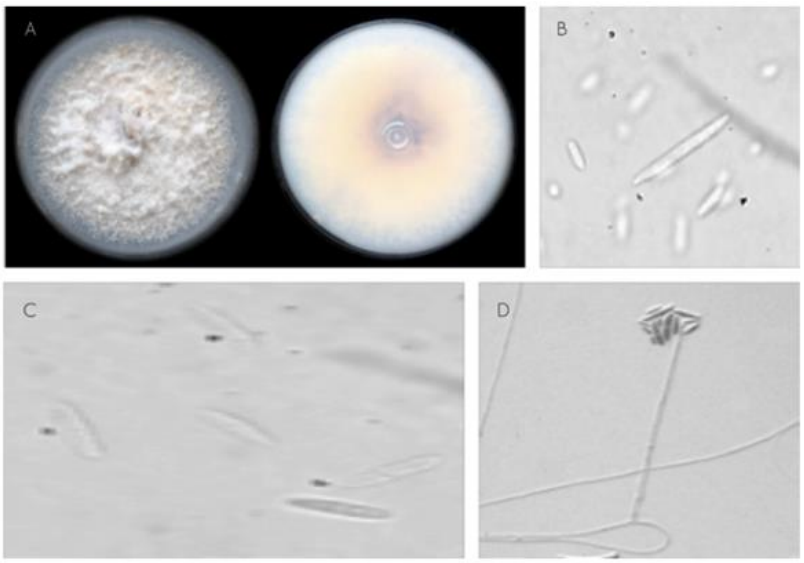

Figura 7. Morfología de Fusarium solani. Macroscópica: A. Anverso y Reverso. Microscópica: B y C. Microconidias y Macroconidias D. Monofiálide alargada con conidios en arreglo de falsas cabezas mucilaginosas. (Robles Yerena et al., 2016)

- Pudrición en la base del tallo o del pie de tomate

La enfermedad causada por la especie de *Fusarium solani* se caracteriza por que los síntomas se presentan como una lesión necrótica de color marrón en el tejido cortical que asciende desde la base hasta el ápice de la planta causando eventualmente la defoliación de la planta. Se evidencia una necrosis en la raíz causando la podredumbre de las raíces secundarias y destrucción de tallo (Luginbuhl, 2010; Robles Yerena et al., 2016).

Dentro de los signos de la enfermedad se producen cuando esta alcanza la raíz primaria la cual se observa de color marrón oscuro y al cortar el tallo en forma longitudinal este se ve de aspecto corchoso, el color oscuro supera la mancha externa y se compromete el tejido parenquimático; por lo que eventualmente se produce la muerte de la planta (Robles Yerena et al., 2016).

Este género de hongos tiene la capacidad de producir macroconidios que están relacionados con la diseminación aérea y el micelio sobrevive en residuos vegetales (saprófito) y en hospedantes alternos, ya que las clamidiosporas permiten al hongo sobrevivir por largo tiempo debido a que son de pared gruesa y estas solo germinan en condiciones favorables además los síntomas causadas por estas son más severos que por los microconidios como se puede observar en la siguiente imagen (Vásquez & Castaño, 2017).

Figura 8. Sintomatología causada por Fusarium solani. (De izquierda a derecha) Necrosis de la raíz de planta de tomate. Síntomas causados por F. solani Clorosis, marchitez y ligera pérdida de turgencia (Doan, Miyao, & Davi, 2018).

4.2.4. Métodos de evaluación antifúngica

4.2.4.1. In vitro.

Las técnicas de evaluación *in vitro* para el estudio de sensibilidad de los hongos se basan en macro y microdilución en medio líquido en su mayoría, es esta se tiene en cuenta el uso de un tampón, la medida de pH, la temperatura, el tiempo y el inóculo. También existen métodos de evaluación donde se usan paneles antifúngicos deshidratados con distintas concentraciones que pueden tener indicadores de pH y en otros casos se utiliza el método por difusión en agar donde se usan sensidiscos o tiras impregnadas con el antifúngico así como también se puede realizar métodos basados en la dilución del extracto o antimicrobiano en el agar. (Prats, 2006).

- Métodos de microdilución en caldo.

Es un método establecido por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) que realizó un el documento M27A para levaduras y M38A para hongos filamentosos. Este método consiste en realizar la dilución del antimicrobiano en un medio de cultivo donde crezca el microorganismo el cual se inocula y es incubado con cierta cantidad de antimicrobiano a diferente concentración para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Universidad Nacional de Rosario, 2013).

- Métodos basados difusión en agar.

Dentro de los métodos basados en difusión en agar se encuentran el método de difusión por disco (Izquierdo, Melhem, Bonfietti, & Rodríguez, 2015) donde se inocula una suspensión del microorganismo en la superficie del agar y se coloca un disco con una concentración conocida del antimicrobiano para ser incubado.

Una vez ha crecido se produce una zona de inhibición alrededor del disco. Dependiendo del tamaño de esta zona, se establece si es sensible, intermedio, indeterminado o resistente al antimicrobiano. (Universidad Nacional de Rosario, 2013).

- Método de dilución en agar.

Para este método se preparan diferentes concentraciones del antimicrobiano con el fin determinar cuál de estas concentraciones es letal para el microorganismo. Estas diluciones son añadidas a los agares y luego servidas en las cajas de Petri para su solidificación, luego se inocula el microorganismo y se evalúa el crecimiento del mismo. Para esta técnica se escoge la mejor concentración mínima que inhiba el crecimiento visible (Reyes Jurado, Palou, & Lopez Malo, 2014).

4.2.4.2. In vivo

Para la aplicación de plaguicidas existen diversos métodos como: Al voleo, bandas, Empapamiento o Drench, Foliar, Inmersión o Root Dipping, incorporación al suelo, etc. El método que se elige depende de los hábitos de la plaga objetivo, las características del sitio y la formulación del plaguicida. (O'Farrill-Nieves, 2004)

- Métodos de aplicación de plaguicidas.

- Drench o Empapamiento: Esta técnica consiste en aplicar sobre la superficie del suelo en la zona radicular de la planta, la mezcla de plaguicidas o fertilizantes disueltos en agua. (O'Farrill-Nieves, 2004)
- Inmersión/ Root Dipping: Consiste en sumergir total o parcialmente las raíces de la planta en el plaguicida (O'Farrill-Nieves, 2004)

- Métodos de inoculación de *Fusarium* spp. en la planta.

Para la inoculación del hongo se debe tomar una muestra del cultivo in vitro de este y realizar una dilución. Se establecen el número de esporas contenidas en ella y por último se tiene en cuenta 2 métodos el primero donde se inocula el suelo con el patógeno algunos días antes del trasplante de las plántulas a la maceta (Córdova Zapata, 2003), y el segundo donde se realiza la inmersión de la raíz de la planta (Root Dipping) en el inóculo durante unos minutos para que impregne a la raíz mientras que el suelo no se le realiza ningún tratamiento (Stéphane Declerck, 2005).

4.2.5. Métodos de Caracterización de nanopartículas con acción antifúngica.

4.2.5.1. Microscopia electrónica de transmisión. MET.

La Microscopía electrónica de transmisión o MET es una técnica donde se utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto en una muestra ultrafina donde la imagen se obtiene por la acción de los electrones que atraviesan la muestra, esto permite amplificar el objeto hasta un millón de veces. El haz de electrones que atraviesa la muestra es enfocado por un condensador similar al del microscopio óptico. Las lentes electromagnéticas permiten controlar la intensidad del haz de electrones, los enfoques y aumentos. Por lo que el haz atraviesa la muestra y llega hasta las lentes (Universidad de Málaga, 2004).

El poder de resolución que tiene esta prueba depende de la longitud de onda y las lentes del objetivo, obteniendo una resolución de hasta 1.5 Å. La imagen que se produce se da “a partir de los electrones difractados (imágenes de campo oscuro) o a partir de los electrones directos que han atravesado la muestra sin interacción (imágenes de campo claro/brillante)” (Universidad de Málaga, 2004). La imagen que se obtiene al final se denomina *microfotografía electrónica de transmisión en la cual aparecen* zonas claras y oscuras de acuerdo con el número de electrones que hayan sido absorbidos por las diversas áreas de la muestra. Esta microscopia tiene una alta resolución y es útil para examinar capas distintas de una muestra y la ultraestructura de los tejidos vivos o de los materiales (Tortora, Funke, & Christine, 2007).

Con la microscopía electrónica de trasmisión se puede obtener información detallada de la morfología e integridad de la célula, en este caso si se ha afectado algún componente de la célula del hongo, y observar detalles ultra estructurales de cualquier alteración morfológica tanto en el hongo como en la raíz de la planta.

4.2.6. Modelos de estadística para análisis de datos. ANOVA

ANOVA es un análisis de varianza donde se prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Este análisis permite evaluar la importancia de uno o más factores cuando se comparan las medias de la variable con respecto a los diferentes factores. Este procedimiento se basa en que se utilizan las varianzas para determinar si las medias son diferentes, ya que, se compara la varianza entre las medias de los grupos y la varianza dentro de los grupos con el fin de determinar si los grupos son todos parte de una población más grande o poblaciones separadas con características diferentes (Minitab, 2017).

4.3. MARCO NORMATIVO

Fusarium solani (American Type Culture Collection, 2018) es un microorganismo con nivel de bioseguridad tipo 2, por lo cual deben seguirse los lineamientos establecidos en por la clasificación de bioseguridad basada *en* “U.S. Public Health Service Guidelines” para asegurar su adecuado manejo. A continuación, se

mencionar las reglas de bioseguridad para el los organismos clasificados en el grupo 2.

El nivel de bioseguridad 2 se basa en los parámetros del nivel de bioseguridad 1 y se aplica para el trabajo donde se involucran agentes que presentan riesgos moderados para el personal y el medio ambiente (U.S. Department of Health and Human Services, 2009). Adicionalmente a lo contenido en el nivel de bioseguridad 1 se tiene que:

- El personal de laboratorio tiene capacitación específica en el manejo de agentes patógenos y está supervisado por científicos competentes en el manejo de agentes infecciosos y procedimientos asociados (2009)
- El acceso al laboratorio está restringido cuando se está trabajando(2009)
- Todos los procedimientos en los que se pueden crear aerosoles infecciosos o salpicaduras se llevan a cabo en cabina de flujo laminar u otro equipo de contención física (2009).

4.3.1. Practicas estándar, equipos de seguridad y requisitos de instalación se aplican a nivel de bioseguridad 2.

4.3.1.1 Prácticas microbiológicas estándar

Se deben cumplir los siguientes parámetros para el trabajo (2009):

- Las personas deben lavarse las manos después de trabajar con materiales potencialmente peligrosos y antes de abandonar el laboratorio.
- No se debe permitir comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, aplicarse cosméticos y almacenar alimentos para el consumo humano en las áreas de laboratorio.
- No pipetear con la boca
- Material corto punzante debe desecharse en los guardianes
- Realizar todos los procedimientos con el fin de minimizar la creación de salpicaduras y / o aerosoles.
- Descontaminar las superficies de trabajo después de terminar el trabajo

4.3.1.2. Equipos de seguridad

En el equipo de seguridad se incluyen barreras primarias y equipo de protección personal, como batas, batas, batas o uniformes de laboratorio de protección designados para el uso de laboratorio. Así mismo se tiene en cuenta el equipo u otros dispositivos físicos de contención deben usarse siempre que se vayan a causar salpicaduras o general aerosoles (2009).

Se recomienda el uso de protección para los ojos y la cara (gafas protectoras, máscara, máscara) La manipulación del material fuera de la cabina de flujo laminar debe hacerse con protección ocular y facial (2009).

Se bebe eliminar los artículos de protección desechables con otros residuos de laboratorio contaminados o descontaminarse antes de volver a utilizarlos. Se debe usar guantes para proteger las manos de la exposición a sustancias peligrosas, los cuales no deben ser usados fuera del laboratorio. Además, si los guantes están en mal estado se debe cambiar los guantes y lavar las manos al finalizar la práctica (2009).

5. METODOLOGIA PROPUESTA

5.1. LEVANTAMIENTO DE REQUERIMIENTOS

El protocolo para la evaluación de las ChNPs+TPP+PEG se realizó teniendo en cuenta protocolos experimentales de diferentes artículos científicos para la evaluación de otras ChNPs. La caracterización de estas ChNPs se realizó considerando el tipo de muestras obtenidas a partir de la fase de evaluación.

Los requerimientos se construyeron a partir de cada objetivo propuesto para el desarrollo del presente trabajo, teniendo como resultado 3 etapas: Evaluación de las ChNPs+TPP+PEG, Identificación del daño causado por las ChNPs+TPP+PEG al hongo por MET y caracterización de la interacción de las ChNPs+TPP+PEG por MET.

Las ChNPs+TPP+PEG elegidas para la evaluación *in vitro* e *in vivo* son proporcionadas según el protocolo modificada por Granados, Guzmán y Sánchez (2018) (Ver sección de diseño) donde se usaron diferentes concentraciones de PEG para la síntesis de estas. La concentración de quitosano se mantuvo en 2,0mg/ml según lo establecido por el protocolo mencionado; esta concentración está entre los rangos que han sido reportadas en la literatura como una concentración de quitosano con efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial en hongos como *Fusarium* spp. (El-mohamedy, Abdel-Kareem, Jaboun-Khiareddine, & Daami-Remadi, 2014)

5.1.1. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*).

Tabla 1. Requerimientos para la etapa de evaluación de las nanopartículas

Fase	Requerimiento	Funcional	Restricción
ChNPs+ TPP+ PEG	Temperatura	20-37°C	Complejo de nanopartículas mayor a 500nm
	Tamaño	100-500nm	
	pH (*In vitro)*	5,6±0.2 (pH final de medio PDA) (Acumedia Manufacturers, 2015)	
	pH (*In vivo)*	2.0 – 9.0 (rangos de pH en que puede crecer *F. solani*) (Garcés de Granada, Orozco, Bautista, & Valencia, 2001)	
Establecer curva de crecimiento	Registro de medida del micelio Tiempo de toma de datos	4 medidas del diámetro 7 días, cada 24 horas	No Aplica

Tabla 2. Requerimientos para la etapa de evaluación de las nanopartículas

Fase	Requerimiento	Funcional	Restricción
Método de evaluación *in vitro*.	Aplicación de diferentes Métodos de evaluación.	Método de evaluación 1: Dilución en Agar Método de evaluación 2: Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar Método de evaluación 3: Inoculación con Discos de Micelio	Concentración de quitosano para las nanopartículas: 2.0 mg/ml.
	Controles	Control Negativo: *Fusarium solani* sin agente antifúngico Control positivo - Hongo contra quitosano comercial marca Santa Cruz - Hongo contra agente antifúngico comercial Control de reactivo: Hongo y ácido acético.	Concentración del quitosano comercial y el fungicida comercial. 0.5 y 2.0 mg/ml.
	Tratamiento	Tratamiento 1: Nanopartícula QNP1 y el hongo Tratamiento 2: Nanopartícula QNP2 y el hongo	
	Cantidad de aplicación del tratamiento	100µl (Pardo, 2017) del tratamiento por caja de Petri con medio PDA	
	Datos	Crecimiento micelial (igual que para la fase de la curva de crecimiento) Conteo de conidios: 5 cuadros de la cámara central	
Manejo y cuidado de las plántulas	Temperatura	20 a 30° C en invernadero	Depende del área disponible para la instalación de un invernadero en el área destinada en Madrid, Cundinamarca
	Humedad	Humedad relativa entre 60 y 80%	
	Suelo	Suelo comercial para trasplante, posteriormente esterilizado	
	Estado de desarrollo	Crecimiento vegetativo	
Condiciones para que crezca *F. solani.*	Temperatura	24-26°C	Rango de temperatura y pH en que se mantenga estable la nanopartícula
	pH de desarrollo	2.0 -9.0	
	Humedad del suelo	>10%	
Escalamiento síntomas para el marchitamiento causado por *Fusarium solani*	Escala (Marlatt, Correll, Kaufmann, & Cooper, 1996)	1 Sin síntomas 2 Ligero marchitamiento, atrofia o clorosis 3 Moderado marchitamiento, atrofia o clorosis 4 Severo marchitamiento, atrofia o clorosis 5 Muerte de la planta	
	Tiempo de toma de datos	15 días	

Tabla 3. Requerimientos para la etapa de evaluación de las nanopartículas

Fase	Requerimiento	Funcional	Restricción
Inoculación del hongo	Técnica de aplicación Concentración Tiempo de espera antes de aplicar el tratamiento	Root Dipping (RD) por 2 min Drench (D) $1x10^5$ conidios/ml 2 a 3 días	No aplica
Tratamiento	Tiempo/Cantidad para técnica de aplicación Control Tratamiento	Root Dipping (RD) Drench (D) Control Negativo: Ningún tratamiento para *Fusarium solani* Control positivo - Quitosano comercial marca Santacruz - Agente antifúngico comercia Control positivo biológico: *Trichoderma spp.* Control de reactivo: Hongo y ácido acético. Tratamiento Nanopartícula con mejor actividad antifúngica presentada en el ensayo *in vitro*	30 min 10 ml Concentración para *Trichoderma spp.:* suspensión de $5x10^6$ conidios/ml. Concentración para las nanopartículas y el quitosano comercial dependiendo del resultado de las pruebas *in vitro*

Tabla 4. Requerimientos para el análisis estadístico

Fase	Requerimiento	Funcional	Restricción
Datos *In vitro*	Variables Independiente Dependiente	Tiempo de crecimiento Tratamiento Crecimiento micelial Esporulación	Numero de muestras mínima por tratamiento debe ser 3
Datos *In vivo*	Variables Independiente Dependiente	Tiempo de toma de datos Valoración de la severidad de los síntomas de la enfermedad	Numero de muestras mínima por tratamiento debe ser 3
Procesamiento datos	Uso de test ANOVA Confiabilidad Aplicación del test Tukey	Anova One Way para datos de la evaluación *in vitro*. Análisis simple de la varianza Anova de Kruskal Wallis para datos de la evaluación *in vivo.* Valores de Significancia y Valor F: Cuando la significancia de F sea menor de 0,05 es que las dos variables están relacionadas. Comparar las medias de los t niveles de un factor y encontrar diferencias entre las medias comparadas	Pruebas adicionales según diferencia estadística menor a 0.05.

5.1.2. Identificar el daño celular del hongo *Fusarium solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica.

Tabla 5. Requerimientos para la segunda etapa del proyecto (caracterización por MET)

Fase	Requerimiento	Funcional	Restricción
MET Microscopia electrónica de transmisión	Manipulación *in vitro*	Preparación de la muestra en medio líquido (YPG liquido) y aplicación del tratamiento (ChNPs+TPP+PEG y Mertect) en este medio. Recolección de la muestra 12 h después de aplicar el tratamiento al cultivo en medio liquido YPG	Tipo de muestra cambia la recolección y la preparación preliminar
	Recursos	Asociados a disponibilidad de las técnicas en servicios privados	Tiempo de observación depende de la empresa que preste el servicio
	Estandarización	Imagen obtenida. Observar estructura del hongo -Estructura del hongo sin las ChNPs+TPP+PEG -Estructura del Hongo después de aplicar las ChNPs+TPP+PEG	Porcentaje de interacción de la nanopartícula con el hongo

5.1.3. Caracterizar la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica.

Tabla 6. Requerimientos para la tercera etapa del proyecto (caracterización MET)

Fase	Requerimiento	Funcional	Restricción
MET Microscopia electrónica de transmisión	Manipulación *in vivo*	Preparación de la muestra: Plantas tratadas después de los 45 días de evaluación, control negativo, planta sana y planta infectada con el hongo, sumergir raíz 12h en suspensión de ChNPs+TPP+PEG Recolección de la muestra: 2mm^3 de la raíz de la planta afectada y tratada con ChNPs+TPP+PEG	Tipo de muestra cambia la recolección y la preparación preliminar
	Recursos	Asociados a disponibilidad de las técnicas en servicios privados	Tiempo de observación depende de la empresa que preste el servicio
	Estandarización	Imagen obtenida. Análisis de la interacción de la nanopartícula de quitosano con la estructura afectada por el hongo	Evidenciar la presencia y localización de nanopartículas de quitosano en la muestra

5.2. INGENIERÍA DE DISEÑO

Se diseñó un protocolo preliminar de evaluación antifúngica frente al hongo *Fusarium solani,* que permita determinar la eficiencia de las ChNPs+TPP+PEG comparada con otros tratamientos de actividad antifúngica. Para esto se requiere de dos tipos de valoración; una en la parte *in vitro,* con la cual se busca establecer la nanopartícula que tenga mejor efecto antifúngico mediante la implementación de diferentes métodos de evaluación en cultivo: dilución en Agar, inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar e inoculación con discos de micelio. Otra valoración en la parte *in vivo* con la cual se verificará frente a un modelo vegetal infectado con el hongo (*Fusarium solani*), cómo reaccionan estas nanopartículas y si le benefician o no con respecto a otros tratamientos (Control positivo: quitosano, fungicida comercial, *Trichoderma* spp.) ya establecidos previamente para el tratamiento de enfermedades fungosas.

5.2.1. Obtención de ChNPs+TPP+PEG

Las nanopartículas evaluadas son obtenidas a partir de un protocolo modificado de obtención de las nanopartículas en un trabajo de grado previo realizado por Granados, Guzmán y Sánchez (2018) en el cual se obtuvieron 2 tipos de ChNPs+TPP+PEG (Tabla 1Tabla 7) nombradas en el presente trabajo como QNP1 (Modelo experimental 1), QNP2 (Modelo experimental 2). Para cada uno de

los ensayos se realizaron 3 réplicas con el fin de obtener datos estadísticamente significativos.

Tabla 7. ChNPs+TPP+PEG utilizadas en el modelo experimental propuesto y sintetizadas a partir del protocolo modificado por Granados, Guzmán y Sánchez (2018)

	Modelo Experimental 1 (QNP1)	Modelo Experimental 2 (QNP2)
Quitosano	2,0 mg/ml	2,0 mg/ml
Ácido Acético	0.15% v/v	0.15% v/v
TPP	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml
PEG	30 mg/ml	50 mg/ml

5.2.1.1. Diseño experimental para valoración in vitro e in vivo de QNP

El diseño experimental para cada valoración, *in vitro* e *in vivo*, se estableció en las siguientes tablas:

Tabla 8. Diseño factorial 3x8 de los tratamientos usados para la evaluación in vitro. Métodos: M1: Método de evaluación por Dilución en Agar, M2: Método de evaluación por Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar y M3: Método de evaluación por Inoculación con Discos de Micelio. Nanopartículas: QNP1 nanopartícula del modelo experimental 1, QNP2 nanopartícula del modelo experimental 2, QC1: quitosano al 0,5mg/ml, QC2: quitosano al 2,0mg/ml, F1: el fungicida comercial al 0,5mg/ml, F2: el fungicida comercial al 2,0mg/ml, Cr: control del reactivo ácido acético al 0.15% v/v y Cn: Control negativo.

	M1	*M2*	*M3*
QNP1	M1QNP1	M2QNP1	M3QNP1
QNP2	M1QNP2	M2QNP2	M3QNP2
QC1	M1QC1	M2QC1	M3QC1
QC2	M1QC2	M2QC2	M3QC2
F1	M1F1	M2F1	M3F1
F2	M1F2	M2F2	M3F2
Cr	M1Cr	M2Cr	M3Cr
Cn	M1Cn	M2Cn	M3Cn

Con el fin de conocer el comportamiento del hongo *F. solani* en las condiciones de laboratorio, se realizó una curva de crecimiento previa a la valoración *in vitro* para la cual se utilizaron 7 cajas de Petri. En la evaluación *in vitro* se utilizaron un total de 90 cajas de Petri.

Tabla 9. Diseño factorial 2x2x5x2 propuesto para para la evaluación in vivo. I: tipo de inoculación del hongo (I1 Root Dipping e I2 Drench). R: Estado de la raíz de la planta (R1 raíz con herida, R2 raíz sin herida). A: tipo aplicación del tratamiento (A1 Root Dipping y A2 Drench). QNP2: Nanopartículas de quitosano con mejor efecto antifúngico presentado en la evaluación in vitro. Qc: Quitosano comercial marca Santa Cruz. F: Fungicida comercial. Cr: control del reactivo ácido acético al 0.15%v/v. Cb: control biológico con Trichoderma spp. Control negativo (Planta inoculada con F. solani con la raíz con herida y sin herida): 6 plántulas.

		I1		I2	
		R1	R2	R1	R2
QNP2	A1	I1R1QNP2A1	I1R2QNP2A1	I2R1QNP2A1	I2R2QNP2A1
	A2	I1R1QNP2A2	I1R2QNP2A2	I2R1QNP2A2	I2R2QNP2A2
Qc	A1	I1R1QcA1	I1R2QcA1	I2R1QcA1	I2R2QcA1
	A2	I1R1QcCEA2	I1R2QcA2	I2R1QcA2	I2R2QcA2
F	A1	I1R1FA1	I1R2FA1	I2R1FA1	I2R2FA1
	A2	I1R1FA2	I1R2FA2	I2R1FA2	I2R2FA2
Cr	A1	I1R1CrA1	I1R2CrA1	I2R1CrA1	I2R2CrA1
	A2	I1R1CrA2	I1R2CrA2	I2R1CrA2	I2R2CrA2
Cb	A1	I1R1CbA1	I1R2CbA1	I2R1CbA1	I2R2CrA1
	A2	I1R1CbA2	I1R2CbA2	I2R1CbA2	I2R2CrA2
					Control negativo

Para el escalamiento de síntomas (Ver sección 5.3.1.2.) se usaron 6 plántulas y para la evaluación de los tratamientos se utilizaron 168 plántulas, por lo que será un total de 174 plántulas usadas para la fase *in vivo.*

Posteriormente con el fin de determinar cómo afectan estas ChNPs+TPP+PEG a la estructura celular del hongo *F. solani*, se tomaron algunas muestras representativas de cada uno de los ensayos *in vitro* e *in vivo* y se evaluaron mediante microscopía MET.

5.2.2. Parámetros de las muestras tomadas para la caracterización mediante MET

5.2.2.1. *In vitro*

De la fase *in vitro* se toman 3 muestras de los tratamientos y se caracterizaron por microcopia electrónica de transmisión (MET):

- El hongo sin tratamiento antifúngico
- El hongo expuesto a QNP2 (nanopartícula con mejor efecto antifúngico)
- El hongo expuesto al fungicida comercial.

Esto con el fin de comparar y observar cómo se afectan las estructuras celulares del hongo debido a la exposición a las ChNPs+TPP+PEG

5.2.2.2. *In vivo*

Para la fase *in vivo* también se realizó la caracterización con microscopia electrónica de transmisión (MET), se tomaron en total 4 muestras del modelo vegetal (raíz de tomate chonto); 3 de ellas de plántulas que habían sido expuestas al hongo *F. solani* y una muestra de una planta sana. A continuación se describen las muestras utilizadas:

- Raíz de tomate chonto sana.
- Raíz de tomate chonto afectada por el hongo *F. solani*.
- Raíz de tomate chonto afectada por el hongo *F. solani* y tratada con QNP2, después de un periodo de evaluación de 45 días.
- Raíz de tomate chonto afectada por el hongo *F. solani* y tratada por Root Dipping con una suspensión de QNP2 escogida después de 12h.

La evaluación por MET propende por permitir observar la interacción de la nanopartícula con el modelo vegetal afectado por el hongo.

En el siguiente esquema se puede observar el diseño global del proyecto, el cual incluye todos los modelos experimentales y los procesos desarrollados durante la ejecución del mismo.

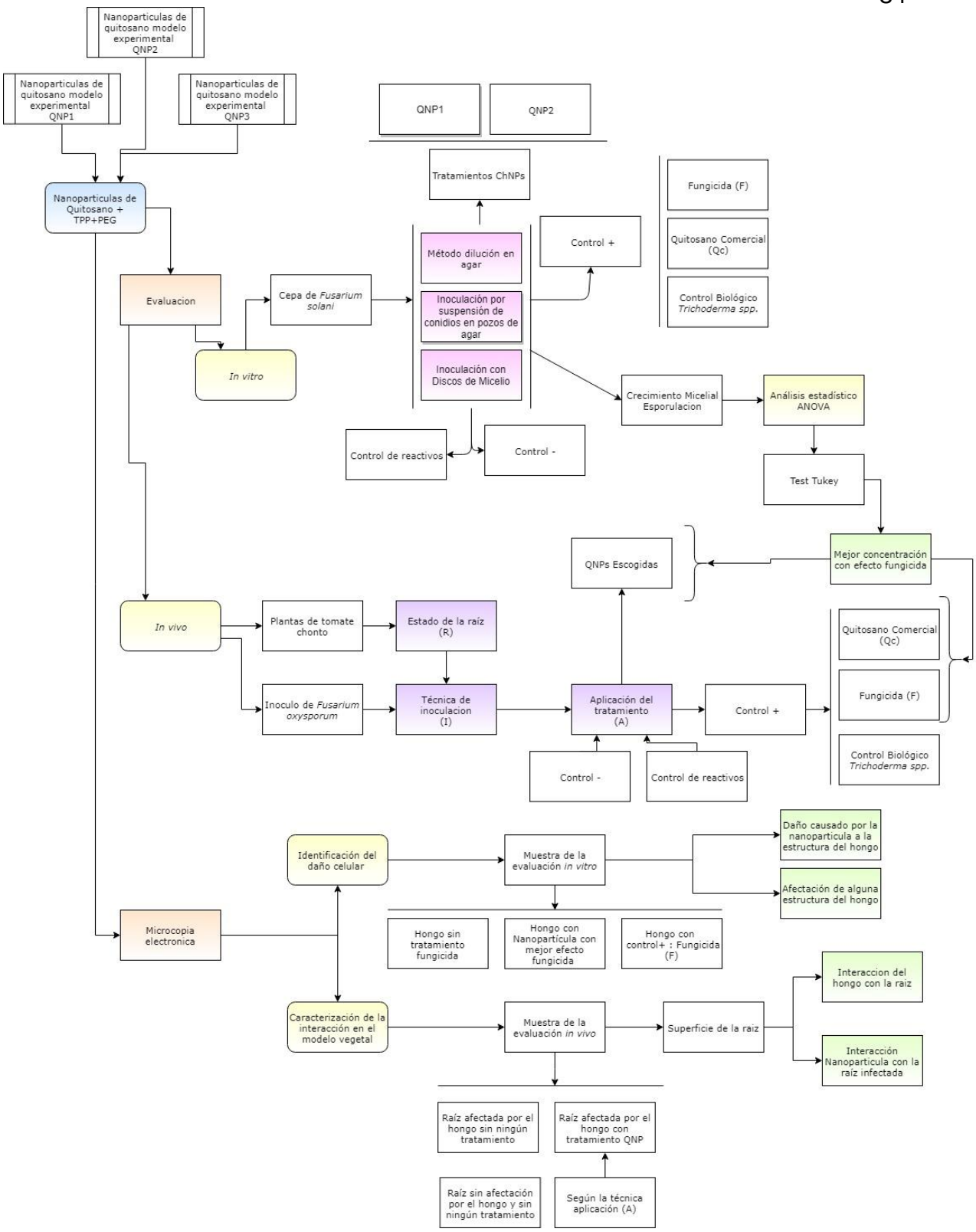

Figura 9. Diagrama de bloques del diseño global del proyecto

5.3. METODOLOGÍA

En el siguiente esquema se puede observar la metodología propuesta en tres fases según el número de objetivos específicos. Posteriormente se describen cada una de las fases.

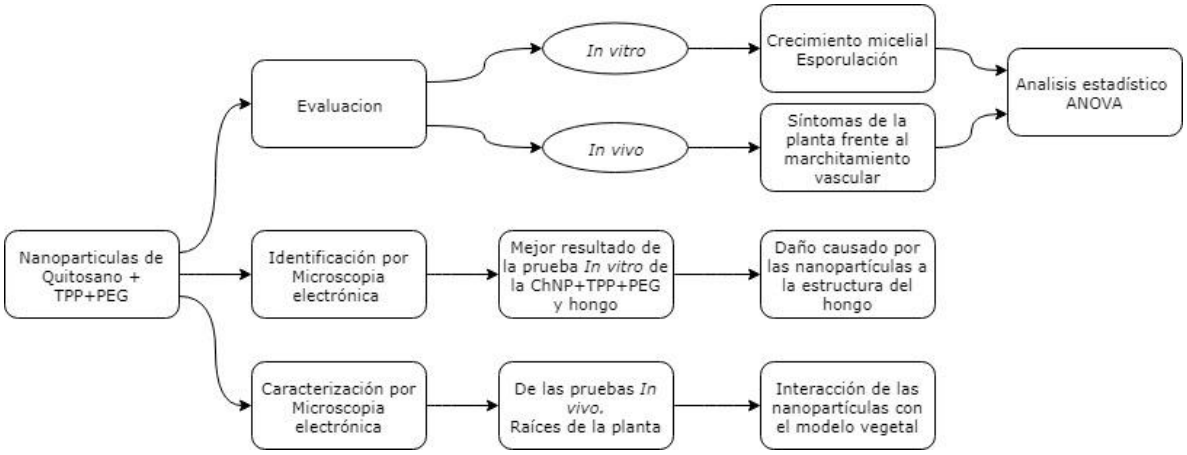

Figura 10. Esquema general que representa las fases de desarrollo metodológico.

5.3.1. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*).

A continuación se muestra la metodología propuesta de evaluación para las ChNPs+TPP+PEG frente a *F. solani* en el modelo *in vitro* e *in vivo.*

5.3.1.1. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG sobre crecimiento *In vitro* de *Fusarium solani*

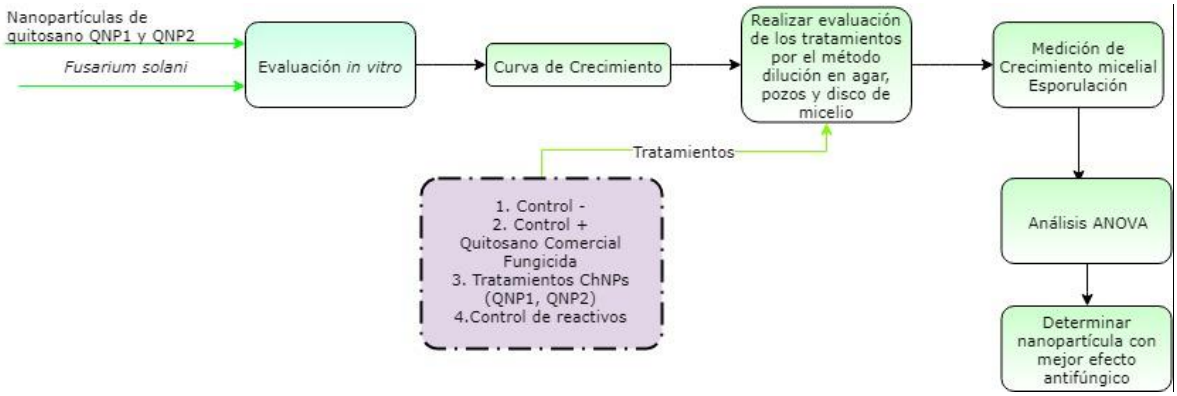

Figura 11. Esquema metodología para la fase de evaluación in vitro

- Caracterización macro y microscópica del hongo *F. solani*

La cepa utilizada de *Fusarium solani* identificada como *Fusarium keratoplasticum* Geiser et al. (ATCC 36031) perteneciente al banco de especies fue proporcionada por la Universidad el Bosque. El uso de esta cepa garantiza la identidad del microorganismo, la pureza, autenticidad y estabilidad del mismo permitiendo la reproducibilidad de la evaluación propuesta. La cepa fue reactivada con 7 días de antelación en medio PDA e incubada a 25°C.

Posteriormente se realizó el reconocimiento del hongo *F. solani* mediante el cultivo del mismo en el agar papa dextrosa (PDA) donde se logró evidenciar las características macroscópicas del hongo, tales como color de anverso, reverso, textura y aspecto; para la caracterización microscópica se hizo una tinción con azul de lactofenol y se observó en el microscopio óptico a 40X y 100X para detallar los conidios como se puede observar en el apartado de resultados 7.1.1.

Con el fin de determinar crecimiento y desarrollo del hongo se realizó una curva de crecimiento, donde se hizo la siembra del hongo por punción en el centro de la caja de Petri con PDA, luego se midió el crecimiento del micelio tomando 4 medidas del diámetro del micelio, como se muestra en la Figura 12, cada 24 h y registrándose los datos (Anexo 3) durante 15 días aproximadamente hasta que el hongo llenó por completo la caja de Petri. Para este procedimiento se realizaron 7 réplicas y se graficó la curva de crecimiento (Ver Resultados 7.1.1.).

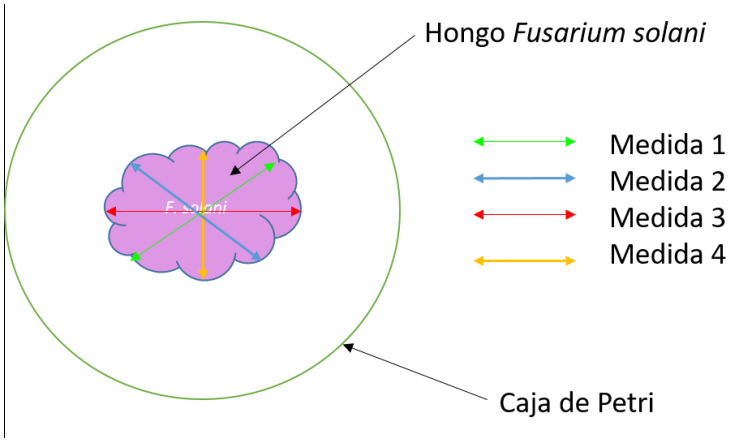

Figura 12. Esquema de toma de medidas del micelio

- **Evaluación de la actividad antifúngica ChNPs+TPP+PEG en cultivo *in vitro* sobre *F. solani***

La evaluación se realizó a partir de un cultivo del hongo *F. solani* de 15 días. Para esta evaluación se trabajaron diferentes tratamientos y métodos de aplicación, que permitieron evaluar la respuesta del hongo frente a las ChNPs+TPP+PEG.

Tratamientos para cultivo *in vitro*: Los tratamientos utilizados son los descritos en la sección de Ingeniería de diseño apartado 5.2.1.1. Tabla 6 y son detallados a continuación:

- Tratamientos con nanopartículas obtenidas QNP1 y QNP2 (Ver 5.2. Ingeniería de diseño, Tabla 7). La concentración de quitosano se mantuvo en 2,0mg/ml, concentración que se encuentra en los rangos en los cuales el quitosano ha sido reportado con acción antifúngica en la literatura (El-mohamedy, Abdel-Kareem, Jaboun-Khiareddine, & Daami-Remadi, 2014).
- Tratamiento con quitosano comercial marca Santa Cruz a dos concentraciones propuestas según la literatura con efecto antifúngico, 0.5, 2.0 mg/ml (El-mohamedy, Abdel-Kareem, Jaboun-Khiareddine, & Daami-Remadi, 2014).
- Control positivo: Tratamiento con agente antifúngico, para el cual se escogió un fungicida de la familia de los benzimidazoles, **Mertect** y que se usa para el control del género *Fusarium* spp. en plantas de tomate (Elosan et al., 2007) y preparado a las mismas concentraciones propuestas para el quitosano (0.5, 2.0 mg/ml).
- Control del reactivo: Tratamiento con ácido acético al 0.15%
- Control negativo

Métodos de aplicación del tratamiento: Para los cada uno de tratamientos descritos anteriormente se implementaron 3 métodos de cultivo *in vitro* (Apartado 5.2.1.1.Tabla 8) según lo encontrado en la literatura, los cuales se describen a continuación.

- Se implementó el **método de dilución en agar** según la metodología propuesta por Saharan, y otros, (2015). Para lo cual se añadió 100µl (Pardo, 2017) de cada uno de los tratamientos respectivos para caja una de las cajas de Petri con medio PDA en fase liquida, se distribuyó el tratamiento en toda la caja y se dejó solidificar en cabina de flujo laminar, posteriormente se sembró el hongo con discos de micelio agar y se incubó a 25°C durante 12 días.
- Para el método de **Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar** se realizó según Rozo Rodríguez y Rodríguez Bocanegra, (2012); para el cual se realizó la siembra del tratamiento en la superficie del medio de forma masiva y se dejó durante a 4°C por 4h, luego se realizó un pozo en el centro del agar donde se colocó una suspensión de conidios de *F-solani* de $1x10^6$conidios/ml y se selló con agar microbiológico.
- El método de **Inoculación con Discos de Micelio** se realizó según Para la técnica de Inoculación con Discos de Micelio se realizó Rozo Rodríguez y Rodríguez Bocanegra, (2012) donde la aplicaino del tratamiento se hizo al

igual que el anterior metodo y luego de esto se tomó un disco de micelio agar previamente cortado de un cultivo del hongo de 15 días y se colocó con la cara anterior hacia el medio PDA. Finalmente se incuba a 25°C durante 15 días.

Adicionalmente se hace un control del reactivo ácido acético al 0.15% v/v agregando igualmente 100µl y un control negativo (al cual no se le agrego ningún agente antifúngico al agar) y se siembra igualmente por punción en el agar. Cada una de estas pruebas se realizó por triplicado.

- Crecimiento micelial y esporulación

Para evidenciar la actividad antifúngica se den tomar los datos del crecimiento micelial en las cajas de Petri durante el periodo que dure la evaluación, es decir, hasta que el control negativo llene la caja de Petri. Por lo cual se realizó la toma de datos para el crecimiento micelial se registró el diámetro del micelio en tres ocasiones (Anexo 4) durante el tiempo que duró la evaluación (12 días), luego se calculó el PICR para estos tres días según la siguiente formula.

$$PICR = \frac{R1-R2}{R1} * 100\%$$ (1) (Juniors et al., 2017)

R1 - crecimiento radial del no influenciado (Control negativo)

R2 - crecimiento radial influenciado (Tratamiento)

Para la evaluación de la esporulación se realizó, para 1 repetición dentro de cada tratamiento, mediante la preparación de solución salina al 0.85%. Esta fue adicionada al medio de cultivo, luego se raspó cuidadosamente la superficie del cultivo con el fin de arrastrar los conidios y se realizó el conteo en cámara de Neubauer (Anexo 6) (Saharan, y otros, 2015) los datos fueron registrados y analizados (Ver resultados 7.1.1).

5.3.1.2. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG en modelo *in vivo.*

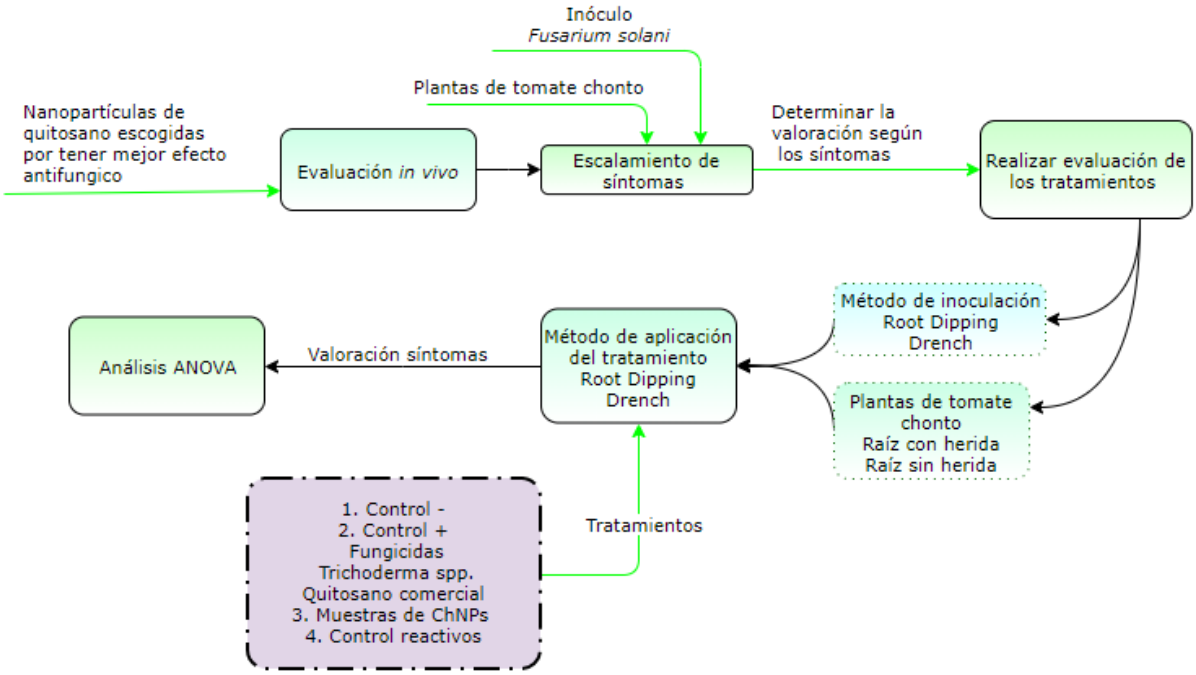

Figura 13. Esquema metodología para la fase de evaluación in vivo

- Escalamiento síntomas de podredumbre de pie de tomate chonto causado por *F. solani.*

La incidencia de *F. solani* se evaluó en 6 plántulas de tomate chonto obtenidas en el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano con 15 días de edad aproximadamente. Se propuso determinando una escala de severidad en la planta de tomate chonto donde se inoculo la planta al sumergir la raíz en una suspensión de $1x10^6$conidios/ml durante 2 minutos, luego se trasplantaron a suelo estéril y se evaluó hasta la muerte de las plántulas. Para soportar la escala de síntomas tuvo en cuenta otras escalas como la de Marlatt, Correll, Kaufmann y Cooper (1996) y de Herrera Cid (2017)

Figura 14. Escala de síntomas causados por Fusarium spp. 1. Planta sana, sin síntomas; 2. Clorosis leve de segunda o tercera hoja; 3. Clorosis moderada de la planta; 4. Clorosis severa y marchitamiento; 5. Muerte de la planta (Herrera Cid, 2017)

- Evaluación *in vivo* de las ChNPs+TPP+PEG

  - Inoculación de *F. solani* en plántulas de tomate chonto.

La incidencia de *F. solani* se evaluó en plántulas de tomate chonto obtenidas en el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano con 15 a 20 días de edad aproximadamente durante el desarrollo y crecimiento vegetativo de la planta. Para esto se utilizó una suspensión de $1x10^5$ conidios/ml de *F. solani* y se realizaron dos tipos de inoculación propuestos en la literatura: Root Dipping (RD) (Figura 15) (El-mohamedy, Abdel-Kareem, Jaboun-Khiareddine, & Daami-Remadi, 2014) (López Benítez, Hernández Martínez, Álvarez Ojeda, Méndez Aguilar, & Mendoza, 2016): y Drench (D) (Figura 16) (Saharan, y otros, 2015) (El-mohamedy, Abdel-Kareem, Jaboun-Khiareddine, & Daami-Remadi, 2014). Las plantas se inocularon para cada técnica con la raíz con herida (H) y raíz sin herida (SH) de la siguiente forma:

- Root Dipping (RD) + raíz con herida (H): se retiraron las plántulas del suelo removiendo con cuidado la tierra de las raíces y enjuagando con un suave chorro de agua para eliminar el exceso, luego se cortaron con tijeras dos centímetros de la punta de la raíz de cada planta y se sumergieron por separado durante dos minutos en la suspensión de conidios, posteriormente las plántulas son trasplantadas a bandejas con vasos de icopor de 24onz con suelo estéril (López Benítez, Hernández Martínez, Álvarez Ojeda, Méndez Aguilar, & Mendoza, 2016).
- Root Dipping (RD) + raíz sin herida (SH): se extrajeron igualmente las plántulas del suelo y se retiró este con cuidado igual que en el proceso anterior. Sin realizar el corte se sumergen las raíces por separado durante dos minutos en la suspensión de conidios y finalmente se trasplantan en las mismas condiciones que la técnica anterior (2016).
- Drench (D) + raíz con herida (H) se realizó un corte de dos centímetros a las raíz de la planta y luego trasplantaron a los vasos de icopor de 24onz con suelo estéril para aplicar la suspensión de conidios sobre suelo en la zona radicular. (Saharan, y otros, 2015).
- Drench (D) + raíz sin herida (SH) para este las plántulas fueron trasplantadas a los recipientes con suelo estéril y se aplicó la suspensión conidios directo al suelo en la zona radicular de las plantas (2015)

Figura 15. Técnica Root Dipping. (De Silva, 2016)

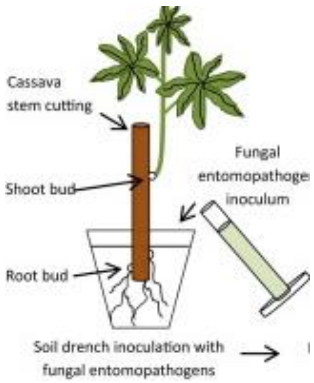

Figura 16. Técnica Drench (Inoculación directo al suelo) (Greenfield, y otros, 2016)

Se emplearon 3 repeticiones por material (teniendo en cuenta el número de tratamientos) y 3 días después de inocular se aplicaron los diferentes tratamientos para cada una de las técnicas usadas.

- Aplicación de los tratamientos a las plántulas infectadas previamente con *F. solani.*

La aplicación de cada tratamiento se realizó de manera individual para cada planta inoculada con *F. solani,* para cada uno de ellos se usaron las técnicas de Root Dipping (RD) y Drench (D) como se describió anteriormente. En el caso de RD (Figura 15) las plantas de tomate fueron extraídas del suelo y luego se le retiró el exceso de tierra a las raíces, para ser sumergida durante 30 minutos en el tratamiento y finalmente se trasplantó nuevamente a suelo infestado con *F. solani.*

De otra forma para la técnica de Drench (Figura 16) se aplicaron 10 ml de cada tratamiento en la zona radicular de la planta sin ser retirada del sustrato (El-mohamedy, Abdel-Kareem, Jaboun-Khiareddine, & Daami-Remadi, 2014). Estas técnicas se realizaron por triplicado y se evaluó la marchitez, clorosis y pérdida de

turgencia cada 7 días durante un periodo de 45 días registrando) el daño en la planta según la escala de severidad establecida (Ver Anexo 8 y Anexo 9).

Tratamientos aplicados a las plántulas infectadas con *F. solani*:

- QNP2: Nanopartícula escogida con 2mg/ml de quitosano, 1,mg/ml de TPP y 50mg/ml de PEG
- Quitosano comercial: se tomó a una concentración de 2mg/ml teniendo en cuenta que es la misma concentración que se utiliza para preparar las nanopartículas.
- Mertect: se tomó a una concentración de 2mg/ml teniendo en cuenta que es la misma concentración que se utiliza para preparar las nanopartículas.
- Control positivo biológico con *Trichoderma spp.* Se utiliza una suspensión de 5x106 conidios/ml.
- El control de reactivo con ácido acético al 0.15% v/v.
- Control negativo (Ningún tratamiento)

5.3.1.3. Análisis estadístico para los resultados de la actividad antifúngica de la evaluación *in vitro* e *in vivo*

Todos los datos obtenidos, tanto de las pruebas *in vitro* como *in vivo*, se analizaron estadísticamente mediante el test ANOVA One Way en el programa SPSS y luego se realizó un test Tukey para el ensayo *in vitro* y un test Duncan para el ensayo *in vivo* con $p<0,5$ para identificar el nivel de significancia de los tratamientos.

En el caso de la evaluación *in vitro* se tomaron los datos del PICR (Ver Resultados 6.1.3.) de cada día y se procesaron estadísticamente para cada uno de los tratamientos y los controles; así mismo se tomó los datos crudos de los diámetros de las QNP1 y QNP2, el quitosano QC1 y QC2 para comparar diferencia entre tratamientos con respecto al ácido acético al 0.15%.

Para la evaluación *in vivo* se ingresaron los datos de los síntomas (marchitez, clorosis y pérdida de turgencia) (Ver Anexo 8) y se dio un numero en la escala general para podredumbre de pie de tomate teniendo en cuenta la escala de severidad propuesta; a estos datos se les calculo el área bajo la curva y se procesaron estadísticamente.

El análisis estadístico permitió determinar si realmente existen diferencias estadísticas entre los tratamientos propuestos para las nanopartículas de quitosano y determinar si el tratamiento es eficaz contra la enfermedad producida por el hongo *F. solani*.

5.3.2. Identificar el daño celular del hongo *F. solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica.

En el caso de las muestras obtenidas de la fase *in vitro* se realizó una microscopia electrónica de trasmisión (MET). Mediante esta técnica se observa la estructura celular del hongo antes, y después de ser expuesto a las nanopartículas, para así evidenciar si la nanopartícula causo algún daño estructural al hongo. Este procedimiento de le realizó a las siguientes muestras:

- Hongo *F. solani* sin el tratamiento antifúngico
- Hongo *F. solani* expuesto a la nanopartícula con mejor efecto antifúngico (QNP2)
- El hongo expuesto al fungicida comercial (Mertect 2,0mg/ml).

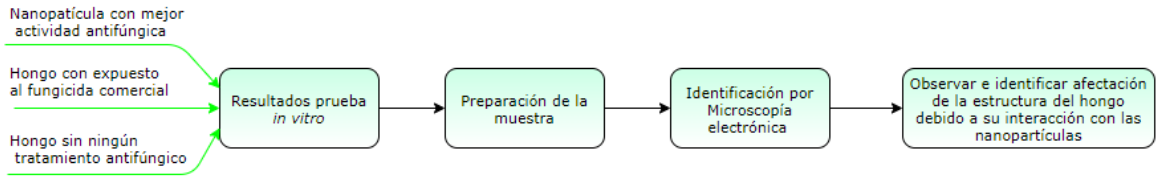

Figura 17. Esquema metodología para la fase de identificación del daño celular de F. solani mediante microscopia electrónica.

Para preparar la muestra se realizó un cultivo en medio liquido (Figura 18) siguiendo el protocolo establecido por Zhang et al. (2019) y Gong et al.,(2015), donde se tomó un inoculo de 10 ml de $1x10^6$ conidios/ml de *F. solani* y se agregó a 90ml de medio liquido YPG para dejar incubando con agitación constante a 100rpm durante 6 h a 25°C. Pasadas las 6h cada cultivo de *F. solani* se expuso a los tratamientos QNP2 y Control positivo de fungicida Mertect al 2,0mg/ml y se incubaron a 25°C por 12h agitación constante. Posteriormente se centrifugaron las células a 3000 rpm por 10 min, se lavaron dos veces con solución salina PBS a pH 7,5, 0,1 M y finalmente se fijaron en glutaraldehído al 2,5% p/v.

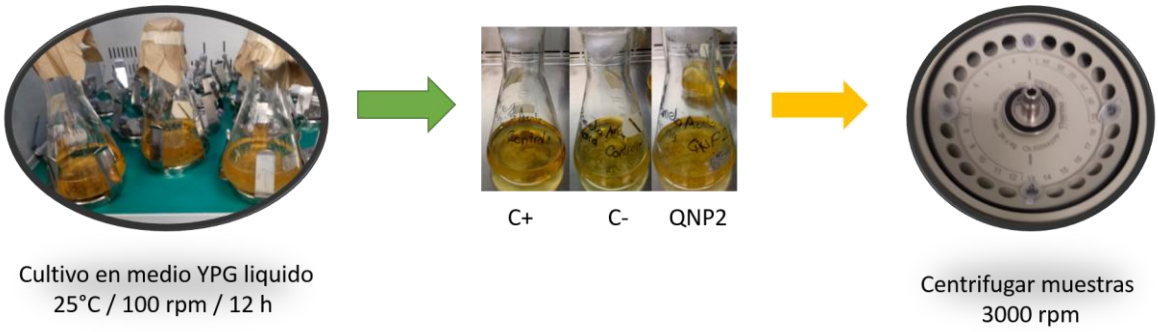

Figura 18. Procedimiento previo a la inclusión de las muestras en glutaraldehido (2,5%) para la microscopia MET

Para la preparación posterior de la muestra para ser sometida a la microscopía electrónica de transmisión (MET) se realizó la pos-fijación en tetraóxido de osmio (OsO4) al 2% de durante 1 h en un rotador, luego la deshidratación se llevó a cabo enjuagando con concentraciones seriadas de etanol; finalmente se realizó la inclusión de la muestra en plástico con corte semi-fino para ser analizada en el microscopio (Jeol JEM-1400 plus TEM). Estos procesos fueron realizados directamente por la Fundación Santa Fe de Bogotá lugar en el cual se obtuvo el servicio de MET (Resultados 6.2.).

5.3.3. Caracterizar la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica.

De las muestras obtenidas del ensayo *in vivo* se tomó una porción de la raíz de las plantas de tomate en diferentes casos para analizar mediante MET y se obtuvieron las siguientes muestras para analizar:

- Raíz de tomate chonto sana.
- Raíz de tomate chonto con afectación por el hongo *F. solani*.
- Raíz de tomate chonto con afectación por el hongo *F. solani* y tratado con la nanopartícula QNP2 después de un periodo de evaluación de 45 días.
- Raíz de tomate chonto con afectación por el hongo *F. solani* y tratado por Root Dipping con una suspensión de la nanopartícula QNP2 después de 12h.

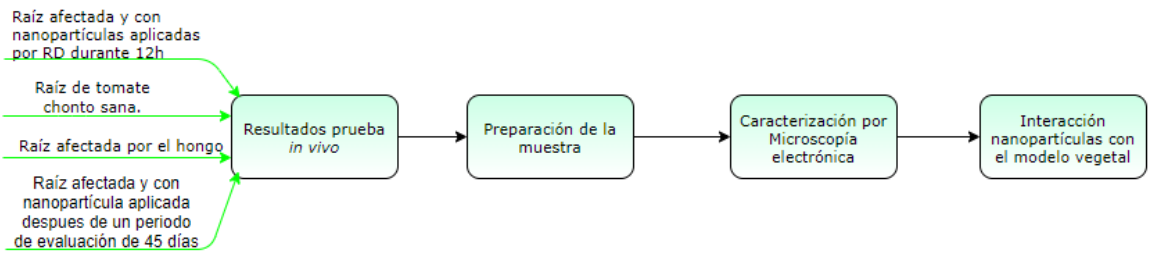

Figura 19. Esquema metodología para la fase de caracterización con microscopia electrónica en el modelo vegetal

Para la caracterización de la interacción y el análisis del efecto que tiene la nanopartícula QNP2 al ser aplicada en la zona radicular de la planta de tomate chonto previamente infectada por el hongo se utilizó la técnica MET. La preparación de la muestra se realizó según Y. P. Zhang et al., (2018), por lo que se tomó 2mm^3 de la raíz de las muestras donde se veían signos de podredumbre en pie de tomate en la raíz y luego se fijaron por inmersión en glutaraldehído al 2,5% v/v. Estas muestras fueron preparadas, de la misma forma y bajo las mismas

condiciones que las muestras *in vitro*, proceso realizado por la Fundación Santa Fe de Bogotá (Resultados 6.3.).

5.4. MARCO NORMATIVO

Fusarium solani (American Type Culture Collection, 2018) es un microorganismo con nivel de bioseguridad tipo 2, por lo cual deben seguirse los lineamientos establecidos en por la clasificación de bioseguridad basada *en* "U.S. Public Health Service Guidelines" para asegurar su adecuado manejo. A continuación se mencionar las reglas de bioseguridad para el los organismos clasificados en el grupo 2.

El nivel de bioseguridad 2 se basa en los parámetros del nivel de bioseguridad 1 y se aplica para el trabajo donde se involucran agentes que presentan riesgos moderados para el personal y el medio ambiente (U.S. Department of Health and Human Services, 2009). Adicionalmente a lo contenido en el nivel de bioseguridad 1 se tiene que:

- El personal de laboratorio tiene capacitación específica en el manejo de agentes patógenos y está supervisado por científicos competentes en el manejo de agentes infecciosos y procedimientos asociados (2009)
- El acceso al laboratorio está restringido cuando se está trabajando(2009)
- Todos los procedimientos en los que se pueden crear aerosoles infecciosos o salpicaduras se llevan a cabo en cabina de flujo laminar u otro equipo de contención física (2009).

5.4.1. Practicas estándar, equipos de seguridad y requisitos de instalación se aplican a nivel de bioseguridad 2.

5.4.1.1 Prácticas microbiológicas estándar

Se deben cumplir los siguientes parámetros para el trabajo (2009):

- Las personas deben lavarse las manos después de trabajar con materiales potencialmente peligrosos y antes de abandonar el laboratorio.
- No se debe permitir comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, aplicarse cosméticos y almacenar alimentos para el consumo humano en las áreas de laboratorio.
- No pipetear con la boca
- Material corto punzante debe desecharse en los guardianes
- Realizar todos los procedimientos con el fin de minimizar la creación de salpicaduras y / o aerosoles.
- Descontaminar las superficies de trabajo después de terminar el trabajo

5.4.1.2. Equipos de seguridad

El equipo de seguridad se incluye barreras primarias y equipo de protección personal, como batas, batas, batas o uniformes de laboratorio de protección designados para el uso de laboratorio. Así mismo se tiene en cuenta el equipo u otros dispositivos físicos de contención deben usarse siempre que se vayan a causar salpicaduras o general aerosoles (2009).

Se recomienda el uso de protección para los ojos y la cara (gafas protectoras, máscara, máscara) La manipulación del material fuera de la cabina de flujo laminar debe hacerse con protección ocular y facial (2009).

Se bebe eliminar los artículos de protección desechables con otros residuos de laboratorio contaminados o descontaminarse antes de volver a utilizarlos.
Se debe usar guantes para proteger las manos de la exposición a sustancias peligrosas, los cuales no deben ser usados fuera del laboratorio. Además, si los guantes están en mal estado se debe cambiar los guantes y lavar las manos al finalizar la práctica (2009).

5.5. PRUEBAS PRELIMINARES

Las pruebas preliminares se realizaron con el fin de escoger las nanopartículas a evaluar, ya que inicialmente se proporcionaron 5 nanopartículas diferentes por el grupo Granados, Guzmán y Sánchez (2018) descritas a continuación:

- QNP1: 2,0mg/ml de quitosano, 1mg/ml de TPP y 30mg/ml de PEG y filtradas después de la preparación
- QNP2: 2,0mg/ml de quitosano, 1mg/ml de TPP y 50mg/ml de PEG y filtradas después de la preparación
- QNP3: 2,0mg/ml de quitosano, 1mg/ml de TPP y 5mg/ml de PEG y filtradas después de la preparación
- QNP4: 2,0mg/ml de quitosano, 1mg/ml de TPP y 5mg/ml de PEG sin filtrar después de la preparación
- QNP5: 2,0mg/ml de quitosano, 1mg/ml de TPP, sin PEG y sin filtrar después de la preparación

Estas nanopartículas se les realizo la prueba realizando los 3 métodos de aplicación propuestos (5.2. Tabla 6) en el diseño pero solo efectuando 1 caja por método, con el fin de evidenciar si había crecimiento del hongo y si los métodos de aplicación funcionaban para estas nanopartículas. De estas pruebas se registraron los datos de crecimiento micelial y se obtuvo lo siguiente:

Tabla 10. Datos del crecimiento en diámetro para los días de evaluación

Método de aplicación	Tratamiento	Día de evaluación 1 Diámetro (mm)				Día de evaluación 2 Diámetro (mm)				Día de evaluación 3 Diámetro (mm)			
Dilución en Agar	QNP3	31	32	33	33	78	80	80	79	83	85	85	84
	QNP4	37	37	37	37	81	81	82	82	83	86	85	85
	QNP5												
Pozos	QNP3												
	QNP4	29	29	28	30	81	82	80	79	87	85	84	83
	QNP5	38	39	37	38	81	81	81	81	81	83	85	85
Disco micelio	QNP3	5	5	5	5	47	45	44	48	56	55	53	55
	QNP4	40	41	40	42	85	84	85	84	90	90	90	90
	QNP5	37	38	37	37	78	80	81	80	84	80	84	86

Observando esta tabla se puede inferir que las nanopartículas QNP3 y QNP5 no permiten el crecimiento del hongo en los métodos de dilución en agar e inoculación del hongo por suspensión de conidios en pozos. Por lo que no es posible evaluarlas bajo el protocolo propuesto. Y la nanopartícula QNP4 alcanza a llenar la totalidad de la caja de Petri al mismo tiempo que el control negativo por lo que no es posible evaluarla para la duración de este ensayo.

Finalmente se tomaron las nanopartículas QNP1 y QNP2 para realizar la evaluación con este protocolo las cuales si presentaron resultados de crecimiento micelial e inhibición del mismo a ser evaluado por estos métodos como se muestra en el siguiente capítulo.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*).

Para evidenciar el cumplimento del primer objetivo específico, a continuación se relacionan los siguientes resultados obtenidos a partir del protocolo planteado en el numeral 5.3.1.: la caracterización macro, microscópica y curva de crecimiento del hongo *F. solani*, la evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG sobre crecimiento *In vitro* de *F. solani* mediante los métodos de dilución en agar, inoculación con suspensión de conidios en pozos de agar e inoculación con discos de micelio.

6.1.1. Caracterización microscopia y Macroscópica del hongo *F. solani*

Se caracterizó *Fusarium solani* en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) (Figura 20), donde se observó en el anverso un micelio blanco (Figura 20A) y al reverso blanco crema con textura algodonosa laxa y sin pigmento difusible al medio (Figura 20B). Se obtuvo un cultivo libre de contaminantes, como se observa en la siguiente figura.

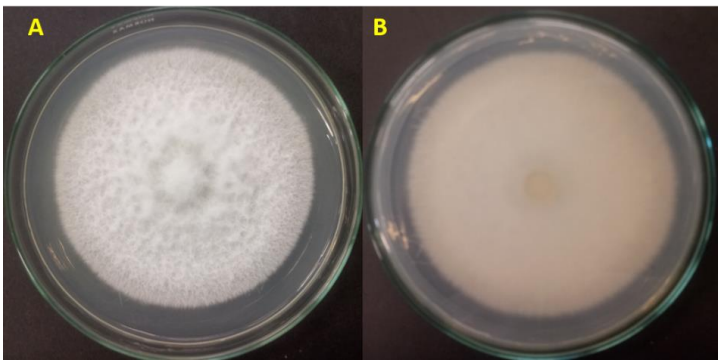

Figura 20. Macroscopía de Fusarium solani en PDA, anverso (A) y Reverso (B).

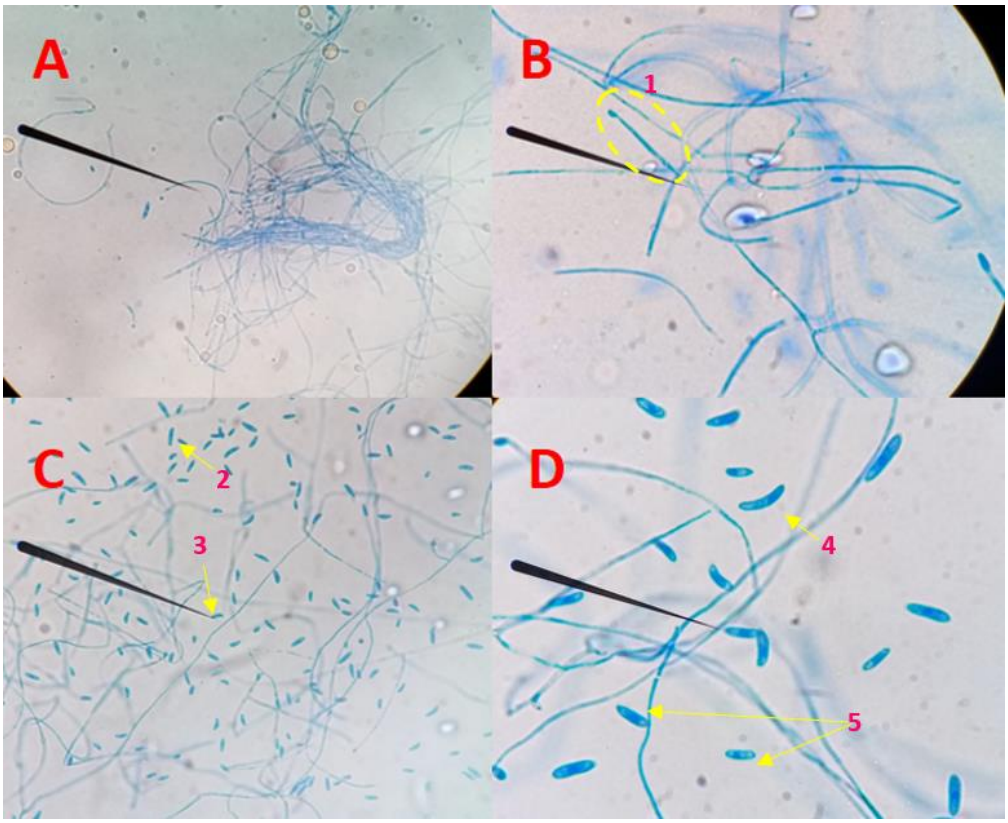

Figura 21. Microscopia de Fusarium solani. A.10X, hifas hialinas delgadas septadas, presencia de macroconidios. B. 40X, Hifas hialinas septadas delgadas monofiálide (1) con generación de conidios blástico en arreglo solitario. C. 40X. Macroconidios (2) y microconidios (3) hialinos. D. 100X, macroconidios (4) hialinos curvados con extremos redondos y microconidios (5) amero y didimoconidios hialinos ovalados

En la morfología microscópica se evidenció que *Fusarium solani* es un hongo mitospórico con hifas hialinas como se puede ver en la Figura 21 (A), septadas y delgadas (Figura 21B y D). Presenta fiálides alargadas (Figura 21B), se producen macroconidios fragmentados (fragmoconidios) hialinos de origen blástico en forma de medialuna alargados con extremos redondos (Figura 21D) y microconidios unicelulares (ameroconidios) o con un septo (didimoconidios) hialinos de origen blástico y forma ovoide, ambos en arreglo solitario.

6.1.2. Curva de crecimiento de *F. solani*

La curva de crecimiento se realizó durante 15 días en 7 cajas de Petri con agar PDA registrando 10 de las medidas (Anexo 3), de las cuales se tomó el registro fotográfico como se observa en la Figura 22.

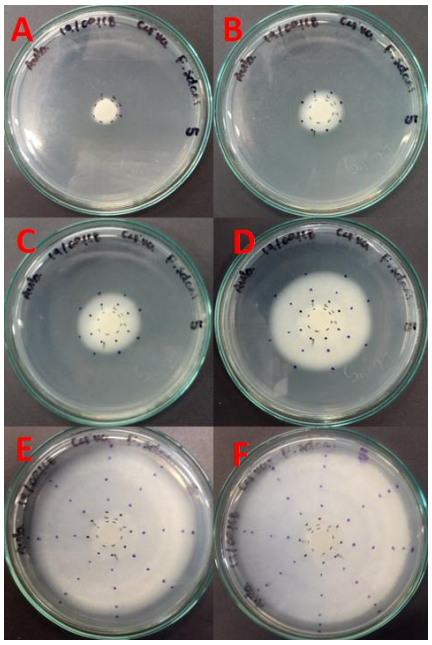

Figura 22. Registro fotográfico de la curva de crecimiento realizada en 1 de las réplicas. Registro a: A. 24h B. 48 h C. 72h D 4 días E. 7 días F. 9 días.

A continuación se observa la curva de crecimiento (Figura 23) realizada con el fin de conocer al microorganismo en las condiciones de cultivo utilizadas. Como se puede evidenciar el hongo creció durante 15 días hasta llenar la caja de Petri con PDA. Como se puede evidenciar en la gráfica de la Figura 23 el hongo tiende dos fases: Idiofase donde presento una etapa de adaptación del metabolismo durante los primeros 3 días (Figura 22A y B) y luego la etapa de crecimiento exponencial (Figura 22C a 21E) de unos 10 días; y la Trofofase donde se evidencia una etapa estacionaria de 2 días donde se le termina el medio de cultivo para crecer y baja su metabolismo (Figura 22F). Esta curva permite inferir que la evaluación *in vitro* tendrá una duración de aproximadamente 15 días bajo condiciones de cultivo similares, es decir, en agar PDA a 25°C.

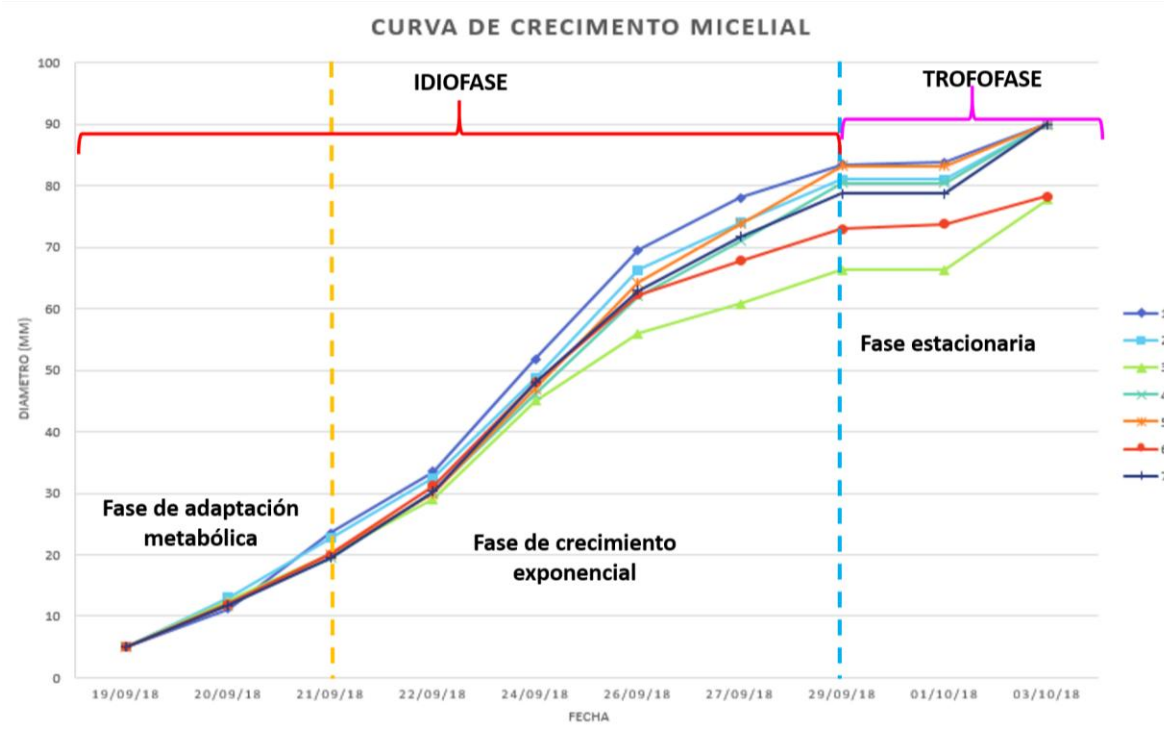

Figura 23. Gráfico del crecimiento micelial del hongo Fusarium solani.

6.1.3. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG sobre crecimiento *In vitro* de *Fusarium solani*

Para la evaluación *in vitro* se aplicó el diseño factorial propuesto en el cual se evaluó los diferentes tratamientos (QNP1, QNP2, QNP3, quitosano al 0.5mg/ml, quitosano a 2mg/ml, fungicida al 0.5mg/ml, fungicida a 2mg/ml, Ácido acético 0.15% p/v) mediante 3 técnicas: Dilución en Agar, Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar e Inoculación con Disco de micelio. El fungicida comercial utilizado fue Mertect utilizado para controlar *Fusarium* sp. ya que cuenta con tiabendazol como ingrediente activo, un fungicida de amplio espectro según lo recomendado por Elosan et al. (2007). Para cada una de las técnicas se aplicó 100µL del tratamiento al medio y se registraron los resultados de medida de crecimiento micelial y de esporulación así como del control negativo para ser comparados posteriormente.

6.1.3.1. Método de Dilución en Agar

Para el ensayo con el método de dilución en agar se tomaron los datos del diámetro del micelio en 3 días diferentes (Ver Anexo 4. Tabla 1) y el registro fotográfico (figura 24). A grandes rasgos se puede ver en la figura 24 que las diferencias entre los tratamientos no es muy notoria por lo cual se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial o PICR del micelio (Ver Anexo 5)

con el fin de evidenciar las diferencias entre los tratamientos y se registró este resultado en la siguiente tabla.

Tabla 11. Datos de PICR para el ensayo utilizando el método de Dilución en Agar

Tratamiento	**Repetición**	**72h**	**240h**
		PICR	PICR
QNP1	1	-6,85%	3,24%
	2	-4,11%	3,85%
	3	-4,11%	0,79%
QNP 2	1	-0,68%	7,81%
	2	0,68%	7,20%
	3	-3,42%	20,33%
QC1	1	11,64%	7,20%
	2	8,90%	7,51%
	3	2,74%	5,07%
QC2	1	2,05%	1,71%
	2	-2,05%	4,15%
	3	-0,68%	4,46%
F1	1	32,19%	67,95%
	2	17,12%	6,29%
	3	17,12%	14,53%
F2	1	79,45%	54,52%
	2	69,18%	49,33%
	3	57,53%	72,22%
Cr	1	23,29%	2,93%
	2	17,12%	2,93%
	3	27,40%	4,15%

Se realizó en ANOVA One Way entre los diferentes tratamientos para el PICR de cada día a excepción del último día de evaluación, ya que fue el día en el que el control negativo lleno la caja de Petri y al no conocer el momento exacto en el cual alcanza este momento los datos no se pueden analizar. El nivel de significancia en cada uno de los días es menor a p valor 0.05, por lo que se observa (Tabla 12) que cada día en el que se evaluaron los tratamientos, son significativamente diferentes con valores de p de 0.002 para ambos días. Luego se aplicó un test Tukey (Tabla 13) para ver la diferencia entre tratamientos para cada uno de los días.

Tabla 12. ANOVA para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro *para el método de dilución en agar.*

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
PICR día 1	Entre grupos	11779,668	6	1963,278	53,946	,000
	Dentro de grupos	509,505	14	36,393		
	Total	12289,173	20			
PICR día 2	Entre grupos	7824,080	6	1304,013	6,880	,001
	Dentro de grupos	2653,387	14	189,528		
	Total	10477,467	20			

Tabla 13. HSD Tukey para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro *para el método de dilución en agar.*

PICR día 1				PICR día 2		
Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05			Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2	3		1	2
QNP1	-5,0233			QNP1	2,6267	
QNP2	-1,1400			A. Acético	3,3367	
QC2	-0,2267			QC2	3,4400	
QC1	7,7600	7,7600		QC1	6,5933	
F1		22,1433		QNP2	11,7800	
A. Acético		22,6033		F1	29,5900	29,5900
F2			68,7200	F2|		58,6900
Sig.	0,199	0,101	1,000	Sig.	0,268	0,201

Según lo observado se puede ver que el PICR es significativamente alto para la mayoría de los datos del control positivo de Mertect en ambas concentraciones arrojando resultados entre un 14% a un 75% de PICR. Como se puede ver en la tabla 11, F1 Y F2 se encuentran en el subconjuntos diferentes a los tratamientos con las nanopartículas y el quitosano por lo cual estos tratamientos con Mertect son significativamente diferentes de los otros tratamientos y demostrando más efectividad con respecto a estos, lo que se puede observar claramente en la figura 24E y 24F donde a simple vista se evidencia que el crecimiento de la colonia se ve limitado en mayor porcentaje con respecto a otros tratamientos.

El control positivo de quitosano para ambas concentraciones no presento inhibición micelial los primeros días de evaluación pero los últimos se obtuvo un PICR de entre 7% y el 14% donde no se mostró diferencia significativa entre el PICR para cada una de las concentraciones. El nivel se significancia para los

tratamientos con quitosano QC1 y QC2 son con respecto a los otros tratamientos (Ver Anexo 7. Tabla 1.) Mayores de p, excluyendo a los realizados con Mertect, por lo que no son tratamientos relativamente diferentes a los otros en la mayoría de los casos.

Las nanopartículas obtuvieron un PICR diferentes para cada una de ellas, en los primeros días no se presentó un alto porcentaje de inhibición más al avanzar el ensayo la inhibición del micelio tuvo mejor resultado: QNP1 tuvo entre un 0,79% y 3,85% el segundo día; QNP2 tuvo mejor PICR obteniendo resultados de 7,20-20,33% de porcentaje de inhibición para el segundo día, mostrando una mejoría con respecto a las otras nanopartículas, mas sin embargo no es significativamente representativo con respecto a los tratamientos realizados con las otras nanopartículas o controles con quitosano.

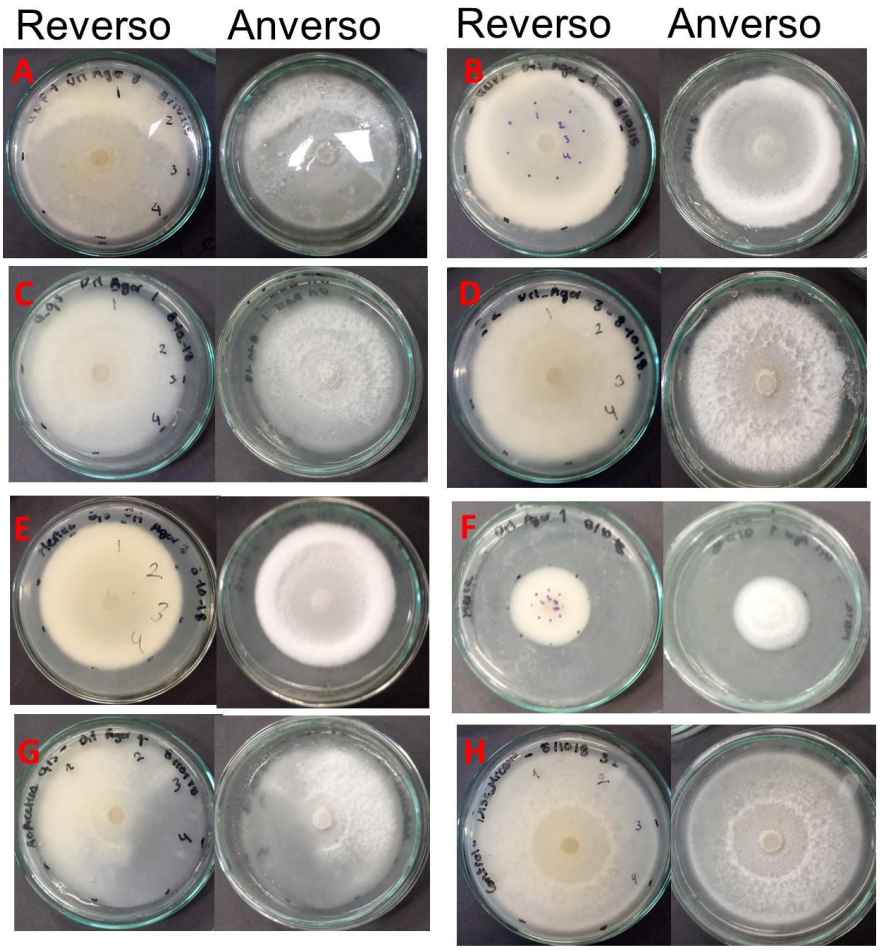

Figura 24. Resultados de la evaluación in vitro utilizando la técnica de Dilución en Agar donde se observa el Anverso y reverso para cada uno de los tratamientos en una de las réplicas. Tratamientos: A. QNP1, B. QNP2, C. Quitosano al 0.5mg/ml, D. Quitosano a 2mg/ml, E. Mertect al 0.5mg/ml, F. Mertect al 2mg/ml, G. Ácido acético 0.15% p/v e H. Control Negativo.

El ácido acético también se evaluó y presento un PICR de entre 15% y 30% primer día y entre el 6% y 12% al final del ensayo mostrando que a pesar actividad antifúngica esta decrece al paso del tiempo por lo cual se realiza comparación de los PICR (

Tabla 14) de las QNP1 y QNP2, el quitosano QC1 y QC2 teniendo en cuenta el diámetro del no influenciado como los promedio del diámetro del ácido acético y el influenciado como los tratamientos mencionados.

Tabla 14. PICR para los tratamientos que son preparados con ácido acético al 0.15%p/v

Tratamiento	**Repetición**	**PICR día 1**	**PICR día 2**
QNP1	1	-38,05%	0%
	2	-34,51%	1%
	3	-34,51%	-3%
QNP 2	1	-30,09%	5%
	2	-28,32%	4%
	3	-33,63%	18%
QC1	1	-14,16%	4%
	2	-17,70%	4%
	3	-25,66%	2%
QC2	1	-26,55%	-2%
	2	-31,86%	1%
	3	-30,09%	1%

Como se puede ver en la tabla anterior los PICR son negativos aunque van disminuyendo a medida del paso del tiempo. Por lo que no se puede realizar un análisis ANOVA para estos datos. Pero se puede inferir que el ácido acético para preparar las nanopartículas y el quitosano pierde su efecto inhibitorio con el quitosano y las ChNPs+TPP+PEG, ya que al observar los PICR no se evidencia el efecto inhibidor de este compuesto (Ver Discusión 7.1.).

Teniendo en cuenta esto se analizan los datos por ANOVA de los diámetros registrados para los días en los que se evaluó el crecimiento micelial y con los cuales se calcularon los PICR de la

Tabla 14, para evidenciar diferencias entre los tratamientos QNP1, QNP2, QC1 y QC2.

Tabla 15. Resultados del ANOVA para los tratamientos QNP1, QNP2, QNP3, QC1 y QC2

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Diámetro de crecimiento en día 1 (mm)	Entre grupos	46,354	3	15,451	31,900	,000
	Dentro de grupos	3,875	8	,484		
	Total	50,229	11			
Diámetro de crecimiento en día 2 (mm)	Entre grupos	104,016	3	34,672	3,360	,076
	Dentro de grupos	82,542	8	10,318		
	Total	186,557	11			

Tabla 16. Comparación de los tratamientos QNP1, QNP2, QC1 y QC2 con test de Tukey.

Diámetro de crecimiento en día 1 (mm)			
		Subconjunto para alfa = 0.05	
Tratamientos	N	1	2
QC1	3	33,0000	
QC2	3		36,5833
QNP2	3		36,9167
QNP1	3		38,3333
Sig.		1,000	0,059

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se puede observar que el nivel de significancia para los resultados en el día 1 de evaluaciones de 0.000 por lo que se acepta la hipótesis de que los tratamientos son significativamente diferentes entre ellos y por lo cual se realiza el test post-hoc (Tabla 15). En el caso del segundo día al ser el p valor de significancia mayor a 0.05 se evidencia que en este caso los tratamientos no son diferentes al influenciar negativamente el crecimiento del hongo.

El test de Tukey para el día 1 de evaluación (Tabla 15) permite evidenciar que una concentración de quitosano de 0.5mg/ml es significativamente diferente a los otros tratamientos mencionados en la tabla, por lo cual se encuentra en un subconjunto diferente. Los tratamientos de quitosano al 2,0mg/ml son tratamientos que causan el mismo efecto en el hongo por lo que no son diferente entre sí.

6.1.3.2. Método de Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar

La inoculación de una suspensión de conidios para la evaluación se realizó con el fin de determinar si el efecto antifúngico mejoraba teniendo en cuenta el

crecimiento o generación de micelio a partir de estructuras de reproducción como lo son los conidios como se ha presentado en otros ensayos con *Fusarium* sp.(Rozo Rodríguez & Rodríguez Bocanegra, 2012). Al igual que en la prueba anterior se tomaron los datos en 3 días diferentes (Ver Anexo 4. Tabla 2.) Y se calculó el PICR para los datos obtenidos evidenciado en la siguiente tabla.

El registro fotográfico se tomó al igual que en el ensayo anterior y se puede evidenciar en la Figura 25, donde se observa que, al igual que en ensayo anterior, al segundo día de evaluación la diferencia de los tratamientos no es evidente al mirar los crecimientos en las cajas de Petri entre estos, excluyendo aquellas en los que se evaluó con Mertect; el PICR permite evidenciar las diferencias entre estos tratamientos.

Tabla 17. Datos de PICR para el ensayo utilizando el método de Inoculación por Pozos

Tratamiento	**Repetición**	**Día 2**	**Día 3**
		PICR	PICR
QNP1	1	5,19%	5,65%
	2	3,25%	6,25%
	3	5,84%	3,27%
QNP 2	1	4,55%	10,12%
	2	4,55%	9,52%
	3	10,39%	22,32%
QC1	1	-9,09%	0,89%
	2	52,60%	19,94%
	3	57,79%	18,45%
QC2	1	-18,18%	5,36%
	2	-0,65%	1,79%
	3	0,00%	1,49%
F1	1	87,01%	70,54%
	2	87,01%	66,07%
	3	87,01%	73,21%
F2	1	87,01%	75,00%
	2	87,01%	73,81%
	3	87,01%	69,64%
Cr	1	89,61%	37,20%
	2	46,10%	11,01%
	3	38,31%	21,13%

Para el ANOVA One Way entre los diferentes tratamientos para el PICR de cada día. El nivel de significancia en cada uno de los días es menor a p valor de 0.05 (Tabla 18) que en cada día que se evaluó los tratamientos son significativamente

diferentes con valores de p de 0.000 para los 2 días de evaluación. Luego se aplicó un test Tukey para ver la diferencia entre tratamientos para cada uno de los días.

Tabla 18. ANOVA para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro *para el método de Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar*

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
PICR día 1	Entre grupos	27830,022	6	4638,337	14,315	,000
	Dentro de grupos	4536,121	14	324,009		
	Total	32366,142	20			
PICR día 2	Entre grupos	16076,410	6	2679,402	51,173	,000
	Dentro de grupos	733,037	14	52,360		
	Total	16809,447	20			

Tabla 19. HSD Tukey para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro para el método de Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar

PICR día 1				PICR día 2		
Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05			Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2	3		1	2
QC2	-6,2767			QC2	2,9800	
QNP1	4,7600			QNP1	5,0567	
QNP2	6,4967			QC1	13,0933	
QC1	33,7667	33,7667		QNP2	13,9867	
A. Acético		58,0067	58,0067	A. Acético	23,1133	
F1			87,0100	F1		69,9400
F2			87,0100	F2		72,8167
Sig.	0,162	0,656	0,470	Sig.	0,051	0,999

Según lo observado en la Tabla 17, y en los datos del ANOVA y el test Tukey (Tabla 18 y Tabla 19) se puede ver que así como en Dilución en Agar los PICR para el control positivo del fungicida son significativamente mejores con respecto a cualquiera de los otros tratamientos con datos de PICR de entre un 60-87% (Figura 25 F y G) ya que estos dos tratamientos se encuentran en el subconjunto 3 para el día de evaluación 1 y en el subconjunto 2 para el día de evaluación 2, indiciando que son diferentes de los que se encuentran en los otros dos subconjuntos; se puede observar que en este caso la actividad antifúngica es mejor al principio del ensayo pero decrece conforme pasa el tiempo.

En el caso de las soluciones de quitosano para la de 0,5mg/ml se observaron buenos PICR al inicio del ensayo comenzado con una actividad e inhibición del 50% pero con el paso del tiempo esta decrece hasta un 6-18%; en cambio la actividad antifúngica para la solución de quitosano al 2,0mg/ml no presenta tanta efectividad como la anterior al principio pero su capacidad de inhibir el crecimiento del micelio aumenta conforme al paso de los días. Se puede observar en la Tabla 19 que los datos del tratamiento con quitosano con 2,0mg/ml no son significativamente diferentes a los de las nanopartículas en el día de evaluación 1; sin embargo la concentración de quitosano QC1 presenta diferencia significativa con los tratamientos de las nanopartículas QNP1 y QNP2 y parecida a la acción inhibidora del ácido acético.

En el caso de las nanopartículas de quitosano mantienen un efecto antifúngico constante. QNP1 tiene un PCIR del 5-8% y al final del ensayo su actividad aumenta a un 7-12%. QNP2 mantiene su efecto de un 4.10% durante el ensayo por lo que se puede evidenciar que la actividad antifúngica de estas no es significativa con respecto a conidios como lo es con respecto al micelio del hongo (Pruebas de Dilución en agar y disco micelio.

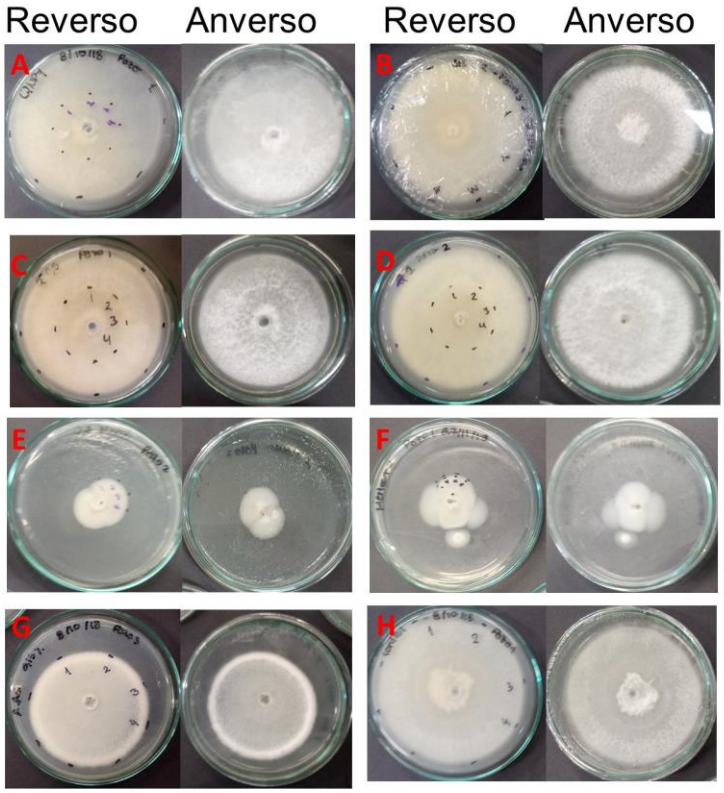

Figura 25. Resultados de la evaluación in vitro utilizando la técnica de Pozos donde se observa el Anverso y reverso para cada uno de los tratamientos en una de las réplicas. Tratamientos: A. QNP1, B. QNP2, C. Quitosano al 0.5mg/ml, D. Quitosano a 2mg/ml, E. Mertect al 0.5mg/ml, F. Mertect al 2mg/ml, G. Ácido acético 0.15% p/v e H. Control Negativo.

Al igual que en el método de evaluación anterior se realiza el cálculo de los PICR teniendo en cuenta el ácido acético como el tratamiento no influenciado y los tratamientos influenciados como las nanopartículas y el quitosano (Tabla 20). Y se realiza un ANOVA (Tabla 21) para los datos crudos del diámetro.

Tabla 20. PICR para los tratamientos que son preparados con ácido acético al 0.15%p/v

Tratamiento	**Repetición**	**PICR día 1**	**PICR día 2**
QNP1	1	-126%	-23%
	2	-126%	-22%
	3	-120%	-26%
QNP 2	1	-123%	-17%
	2	-123%	-18%
	3	-109%	-1%
QC1	1	-155%	-29%
	2	-11%	-4%
	3	2%	-6%
QC2	1	-176%	-23%
	2	-135%	-28%
	3	-13%	-28%

Tabla 21. ANOVA para el diámetro de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro *para el método de Inoculación por suspensión de conidios en pozos de agar*

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
diámetro de crecimiento del hongo día 1 (mm)	Entre grupos	376,266	3	125,422	2,172	0,169
	Dentro de grupos	461,917	8	57,740		
	Total	838,182	11			
Diámetro de crecimiento del hongo día 2 (mm)	Entre grupos	199,891	3	66,630	2,202	0,165
	Dentro de grupos	242,042	8	30,255		
	Total	441,932	11			

Debido a que los datos del ANOVA muestran que el nivel de significancia entre los tratamientos es mayores a 0.05 como se evidencia en la Tabla 21, se determina que los tratamientos no son significativamente diferentes entre ellos, por lo que no se justifica realizar un análisis de comparaciones múltiples como el Tukey.

6.1.3.3. Método de Inoculación con Discos de Micelio

Este método se realizó la toma de los datos al igual que en las técnicas anteriores en 3 días diferentes y se calculó el PICR de cada tratamiento. Esta técnica permite ver a comparación del método anterior si la inhibición mejora al inocular la forma vegetativa del hongo en vez de la reproductiva (conidios) con el tratamiento en la parte superficial del medio usado. La Figura 26 permite observar que al igual que en los métodos de evaluación anteriores los diámetros del crecimiento micelial y la morfología macroscopía del hongo no es diferentes entre tratamientos a simple vista, exceptuando los resultados del fungicida Mertect (Figura 26 E y F). Al calcular el PICR se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 22. Datos de PICR para el ensayo utilizando el método de Inoculación con Discos de micelio

Tratamiento	**Repetición**	**Día 2**	**Día 3**
		PICR	PICR
QNP1	1	-1,37%	3,24%
	2	0,68%	0,79%
	3	-1,37%	2,32%
QNP 2	1	-2,74%	-3,48%
	2	-2,05%	3,54%
	3	-0,68%	1,40%
QC1	1	-4,11%	-1,95%
	2	-7,53%	1,71%
	3	-6,85%	-1,65%
QC2	1	-10,96%	-0,43%
	2	-4,79%	2,63%
	3	-5,48%	0,79%
F1	1	62,33%	58,18%
	2	68,49%	59,71%
	3	66,44%	59,71%
F2	1	70,55%	25,82%
	2	71,92%	29,18%
	3	69,86%	36,51%
Cr	1	17,81%	12,70%
	2	17,12%	5,98%
	3	86,30%	51,77%

Para el ANOVA One Way entre los diferentes tratamientos para el PICR de cada día. El nivel de significancia en cada uno de los días es menor al p valor (0.05) (Tabla 23) con valores de p entre 0.000-0.001 lo que muestra que los tratamiento

entre ellos para cada día son significativamente diferentes. Luego se aplicó un test Tukey para ver la diferencia entre tratamientos para cada uno de los días.

Tabla 23. ANOVA para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro *para el método de Inoculación con discos de micelio*

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
PICR día 1	Entre grupos	22037,767	6	3672,961	15,992	0
	Dentro de grupos	3215,370	14	229,669		
	Total	25253,136	20			
PICR día 2	Entre grupos	9195,558	6	1532,593	16,180	0
	Dentro de grupos	1326,067	14	94,719		
	Total	10521,625	20			

Tabla 24. HSD Tukey para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro *para el método de Inoculación con discos de micelio*

PICR día 1				PICR día 2			
Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05			Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3		1	2	3
QC2	-7,0767			QC1	-0,6300		
QC1	-6,1633			QNP2	0,4867		
QNP2	-1,8233	-1,8233		QC2	0,9967		
QNP1	-0,6867	-0,6867		QNP1	2,1167		
A. Acético		40,4100	40,4100	A. Acético	23,4833	23,4833	
F1			65,7533	F2		30,5033	
F2			70,7767	F1			59,2000
Sig.	0,998	0,050	0,247	Sig.	0,097	0,969	1,000

Teniendo en cuenta los resultados anteriores (Tabla 22Tabla 23Tabla 24) se puede observar que al igual que las otras técnicas empeladas el fungicida comercial Mertect tuvo el mejor resultado de inhibición (Figura 26) de micelio (20-70%), más sin embargo la actividad antifúngica de este compuesto decrece a medida del tiempo, como se puede observar en la tabla 20. Estos tratamientos se encuentran en el subconjunto 2 y 3 siendo los tratamientos significativamente diferentes con respecto al resto al igual que en el resto de los tipos de evaluación propuestos anteriormente.

La inhibición en los tratamientos con quitosano no fue muy alta manteniéndose menor al 10% por lo que no son tratamientos altamente significativos con respecto a ninguno de los otros tratamientos ya que al observar los tratamientos en la figura

26C y 24D y además el valor p para los tratamientos con quitosano Q2.0 y Q0.5 todos son mayores a 0.05 (Ver Anexo 7 Tabla3). Por lo que se acepta que los tratamientos no son significativamente diferentes entre sí.

Las nanopartículas QNP1 y QNP2 no mostraron un nivel de inhibición del crecimiento del micelio significativamente alto ya que su PICR alcanzó un máximo de 10% aproximadamente (Tabla 22).

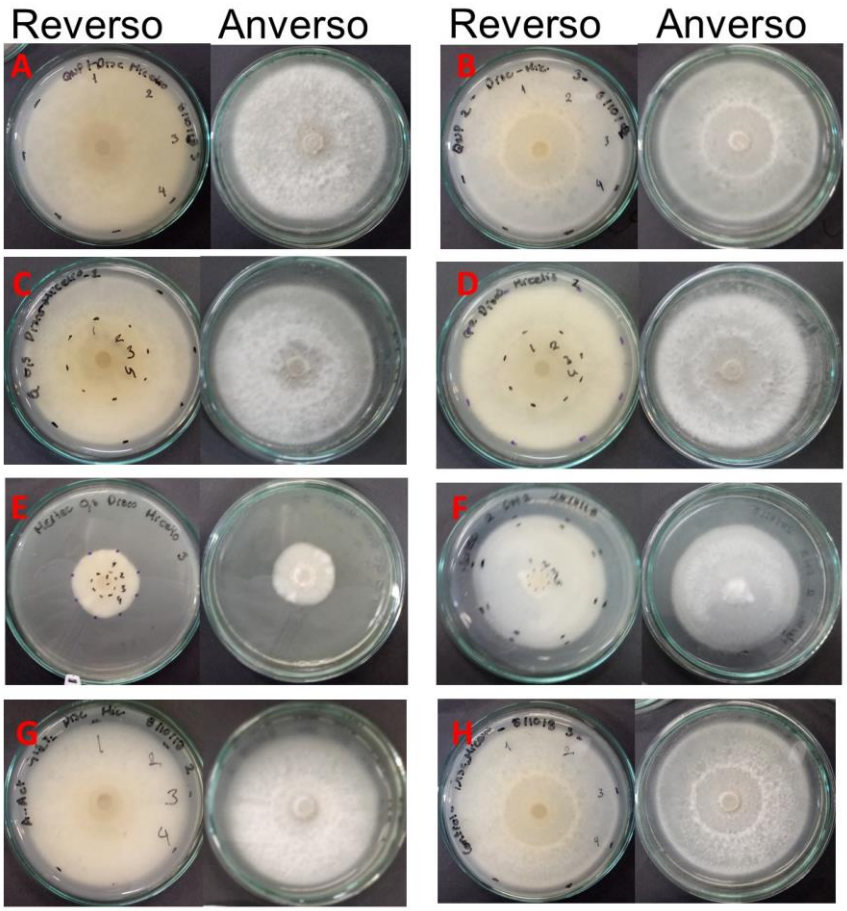

Figura 26. Resultados de la evaluación in vitro utilizando la técnica de Disco de micelio donde se observa el Anverso y reverso para cada uno de los tratamientos en una de las réplicas. Tratamientos: A. QNP1, B. QNP2, C... Quitosano al 0.5mg/ml, D. Quitosano a 2mg/ml, E. Mertect al 0.5mg/ml, F. Mertect al 2mg/ml, G. Ácido acético 0.15% p/v e H. Control Negativo.

Como se puede evidenciar en la tabla 20 y en la figura 26G el ácido acético presenta un leve efecto inhibitorio, por lo cual se compara este efecto con el de los tratamientos que contiene ácido acético en su preparación, calculando el PICR con el ácido acético como el no influenciado, datos que se observan en la tabla a continuación:

Tabla 25. PICR para los tratamientos que son preparados con ácido acético al 0.15%p/v

Tratamiento	**Repetición**	**PICR día 1**	**PICR día 2**
QNP1	1	-70%	-26%
	2	-67%	-30%
	3	-70%	-28%
QNP 2	1	-72%	-35%
	2	-71%	-26%
	3	-69%	-29%
QC1	1	-75%	-33%
	2	-80%	-28%
	3	-79%	-33%
QC2	1	-86%	-31%
	2	-76%	-27%
	3	-77%	-30%

Tabla 26. ANOVA para el PICR de los diferentes días evaluados en el ensayo in vitro *para el método de Inoculación con discos de micelio*

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
diámetro día de evaluación 1 (mm)	Entre grupos	52,349	3	17,450	2,006	0,192
	Dentro de grupos	69,583	8	8,698		
	Total	121,932	11			
diámetro día de evaluación 2 (mm)	Entre grupos	7,854	3	2,618	,745	0,555
	Dentro de grupos	28,125	8	3,516		
	Total	35,979	11			

Se realizó el análisis ANOVA a los datos de diámetro para los tratamientos QNP1, QNP2, QC1 y QC2; con el fin de encontrar alguna diferencia entre los tratamientos. Los datos de significancia, como se puede evidenciar en la Tabla 26, para los dos días de evaluación sean mayores a 0.05 por lo que no se realiza un test Tukey que permita comparar los tratamientos ya que de todos ellos no hay uno significativamente diferente.

6.1.3.4. Esporulación.

Una vez realizada la toma de datos del diámetro y al final de la evaluación se decide conocer el nivel de afectación que le causa las ChNPs+TPP+PEG al hongo es su proceso de generación de conidios; para lo cual se realizó un conteo de conidios en cada ensayo propuesto. Los datos se registraron en la tabla a continuación:

Tabla 27. Resultados del conteo de conidios realizado a cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Conidios/mL		
	M1	M2	M3
QNP1	8,1 x10^6	6,6 x10^6	5,9 x10^6
QNP2	9,5 x10^5	3,1 x10^6	4,4 x10^6
QC1	5,2 x10^6	4,0 x10^6	8,5 x10^6
QC2	5,2 x10^6	7,5 x10^6	4,2 x10^6
F1	3,1 x10^6	6,0 x10^5	4,0 x10^5
F2	7,5 x10^5	4,0 x10^5	5,0 x10^5
AC	5,7 x10^6	2,4 x10^6	1,0 x10^7
CN	7,4 x10^6	9,7 x10^6	7,4 x10^6

En el primer caso se evalúa estos datos para el método de aplicación 1 (Dilución en agar) y se observa que los datos son significativamente menores en los tratamientos QNP2 y F2 con resultados en el orden de 10^5 conidios/ml mientras que el control negativo se encuentra con 10^6 conidios/mL.

En el caso de M2(Inoculación por pozos) la mayoría de los datos son menores al control negativo pero son los resultados del fungicida Mertect los que tiene mejor efecto en este caso; de las nanopartículas la muestra QNP2 obtiene un resultado significativamente más bajo que el dato del control negativo.

Los datos del M3 (Método de inoculación con discos de agar micelio) evidencia nuevamente un gran diferencia entre el fungicida Mertect pero también sobre QNP2 y QC2 donde los datos son considerablemente menores a los datos del control negativo.

6.1.4. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG en modelo *in vivo.*

Para la evaluación *in vivo* se aplicó el diseño factorial propuesto anteriormente. Se construyó un invernadero (Ver Anexo 10) en Madrid, Cundinamarca donde se instaló la prueba de evaluación *in* vivo durante los 45 días que duró. Se recopilaron los datos de marchitez, clorosis y pérdida de turgencia y se ponderaron en una escala los síntomas de la planta enferma para cada uno de los tratamientos. A los 45 días se obtuvieron los resultados registrados en el Anexo 8 y Anexo 9:

Para cada uno de los tratamientos se realizó una gráfica como la que se muestra a continuación. Basados en esta grafica se calculó el área bajo la curva (ABC) para cada plántula en cada tratamiento y estos datos se analizaron mediante ANOVA y el test Duncan. A continuación se muestran los resultados del análisis estadístico.

Tabla 28. Resultados del ANOVA One Way para el ensayo in vivo*. ABC para cada uno de los ensayos teniendo en cuenta el tipo de inoculación usado para F. solani (Sin herida por Drench-SH/D, Sin herida por Root Dipping-SH/RD, Con herida por Drench-H/D, Con herida por Root Dipping-H/RD)*

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ABC plantas inoculadas con SH por D	Entre grupos	34088,470	10	3408,847	3,854	0,004
	Dentro de grupos	19456,667	22	884,394		
	Total	53545,136	32			
ABC plantas inoculadas con SH por RD	Entre grupos	51698,879	10	5169,888	7,858	0,000
	Dentro de grupos	14474,667	22	657,939		
	Total	66173,545	32			
ABC plantas inoculadas con H por RD	Entre grupos	49600,394	10	4960,039	6,702	0,000
	Dentro de grupos	16281,167	22	740,053		
	Total	65881,561	32			
ABC plantas inoculadas con H por D	Entre grupos	98026,879	10	9802,688	31,316	0,000
	Dentro de grupos	6886,500	22	313,023		
	Total	104913,379	32			

En los resultados de la tabla anterior se puede evidenciar que como el nivel de significancia es menor al p valor de 0.05 se determina que los tratamientos entre ensayos son significativamente diferentes. Esto se puede analizar mediante el test de Duncan.

Se puede observar que al aplicar el test de Duncan (Tabla 29, Tabla 30, Tabla 31 y Tabla 32) para cada uno de los ensayos teniendo en cuenta el método de inoculación como cada ensayo. Se analizó los diferentes tratamientos encontrando sobrelapamiento entre los subconjuntos que determinan la diferencia entre los tratamientos, por lo que los resultados obtenidos entre tratamientos son similares; sin embargo aquellos datos que no se sobrelapan muestran el mejor y peor tratamiento de cada ensayo.

En la siguiente tabla se puede observar que para el método de inoculación sin herida y por Drench el tratamiento que mejor resultado obtuvo fue el realizado al aplicar Ácido acético al 0.15% mediante la técnica de Drench y el tratamiento que obtuvo peores resultados y causo finalmente la muerte de las plántulas fue el fungicida aplicado por Root Dipping. Los tratamientos que se incluyen en el subconjunto 5 son aquellos que tuvieron resultados menos favorables causando la

muerte de la mayoría de las plántulas, datos que se pueden evidenciar en las gráficas del Anexo 11.

Tabla 29. Resultados del Test Duncan para comparaciones de los tratamientos en el ensayo de Sin herida por Drench-SH/D

ABC plantas inoculadas con SH por D					
Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05				
	1	2	3	4	5
Cr D	56,8333				
Qc D	87,1667	87,1667			
Cb D	88,3333	88,3333	88,3333		
Cn	101,1667	101,1667	101,1667	101,1667	
Qc RD		125	125	125	125
Cb RD		137,5	137,5	137,5	137,5
QNP2 D		140	140	140	140
QNP2 RD			145	145	145
F2 D			145	145	145
Cr RD				157,5	157,5
F2 RD					160
Sig.	0,107	0,066	0,052	0,053	0,22

Los resultados del test Duncan para el ensayo en el cual se inoculo sin herida y por Root Dipping se muestran en la tabla 28. Al igual que en los resultados del ensayo anterior el subconjunto final, en este caso el 4, son aquellos tratamientos en los que se causó la muerte de las plántulas. El tratamiento con mejores resultados fue para aquellas plántulas tratadas con *Trichoderma* sp. Aplicado mediante Drench. Las nanopartículas no obtuvieron buenos resultados en este ensayo, sin embargo no causó la muerte prematura de las plantas como otros tratamientos como el fungicida comercial.

Tabla 30. Resultados del Test Duncan para comparaciones de los tratamientos en el ensayo de Sin herida por Root Dipping-SH/RD

ABC plantas inoculadas con SH por RD				
	Subconjunto para alfa = 0.05			
Tratamiento	1	2	3	4
Cb D	38,0000			
Qc RD	41,8333	41,8333		
Cb RD	41,8333	41,8333		
Qc D	46,8333	46,8333		

cn	53,1667	53,1667		
Cr D	54,3333	54,3333		
Cr RD	55,6667	55,6667		
QNP2 RD		89,8333	89,8333	
QNP2 D			118,5000	118,5000
F2 D				140,0000
F2 RD				147,5000
Sig.	0,467	0,056	0,185	0,204

La siguiente tabla muestra los resultados del ensayo donde se inocularon las plántulas con herida en la raíz y por Root Dipping. Teniendo en cuenta estos resultados aquellos tratamientos en los que se causó la muerte de las plántulas antes del final del ensayo son aquellos que pertenecen al subconjunto 4 en la tabla 29. En el caso de las nanopartículas QNP2 se evidencio que en este ensayo el método de aplicación de Root Dipping fue el tratamiento con mejores resultados; otro de los tratamientos con buenos resultados es el quitosano aplicado por D.

Tabla 31. Resultados del Test Duncan para comparaciones de los tratamientos en el ensayo de con herida por Root Dipping-H/RD

ABC plantas inoculadas con H por RD				
Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
QNP2 RD	38,0000			
Qc D	38,0000			
cn	40,6667			
QNP2 D	45,6667	45,6667		
Cb D	51,8333	51,8333	51,8333	
Qc RD	86,1667	86,1667	86,1667	
Cr RD		92,3333	92,3333	
Cb RD		94,6667	94,6667	
Cr D			97,3333	
F2 D				145,0000
F2 RD				147,5000
Sig.	0,067	0,059	0,078	0,911

Por último la tabla 30 muestra los resultados del test Duncan para el ensayo en el cual se inoculo las plántulas de tomate mediante Drench en la raíz con herida, donde se tiene en cuenta que los tratamientos en el subconjunto 4 causaron la muerte de las planta días antes de la finalización de la evaluación. Para este

ensayo se encuentra que el control negativo es el tratamiento con mejor resultado, esto es debido a que en este ensayo las plántulas estaban ubicadas en una zona del invernadero donde había poca luz lo cual pudo afectar el crecimiento y desarrollo de las plántulas causando la muerte prematura de la mayoría de los tratamientos, independientemente de la incidencia de patógeno en la planta.

Tabla 32. Resultados del Test Duncan para comparaciones de los tratamientos en el ensayo de con herida por Drench-H/D

ABC plantas inoculadas con H por D				
	Subconjunto para alfa = 0.05			
Tratamiento	1	2	3	4
cn	36,6667			
Cb D	41,6667			
Cb RD	41,8333			
QNP2 D		83,5000		
Cr RD			147,5000	
F2 D			152,5000	152,5000
F2 RD			155,0000	155,0000
Qc RD			160,0000	160,0000
QNP2 RD			162,5000	162,5000
Qc D			162,5000	162,5000
Cr D				182,5000
Sig.	0,739	1,000	0,369	0,078

Muchos de los factores que pudieron influir en la muerte temprana de las plantas de tomate fueron la falta de luz solar, debido a que las plantas al estar ubicadas en estantes no recibían la misma cantidad de luz solar durante el periodo de evaluación como se puede evidenciar en el Anexo 10 donde se ve la estructura del invernadero; y la alta humedad (evidenciada al observar durante la evaluación condensación en las paredes del invernadero).

Dentro de los resultados obtenidos se observó que en el caso de las plántulas tratadas con el fungicida Mertect en una concentración de 2,0mg/ml presentaron pocos síntomas al inicio del tratamiento, pero en la 3era semana de evaluación estaban completamente enfermas en todos los ensayos propuestos como se puede observar en las Figura 27Figura 28. Esto se puede evidenciar en el análisis estadístico realizado (Tablas 27-30) donde se observa que los tratamientos del fungicida comercial (F) aplicados tanto por Root Dipping como Drench los resultados no fueron favorables ni los esperados, ya que, al encontrarse en el último subconjunto en todos los ensayos implica que son los tratamientos con peores resultados.

Figura 27 Fotografías del ensayo in vivo para el tratamiento Mertect al 2,0mg/ml. Muerte de las plantas a las 3 semanas de inocular y aplicar el tratamiento.

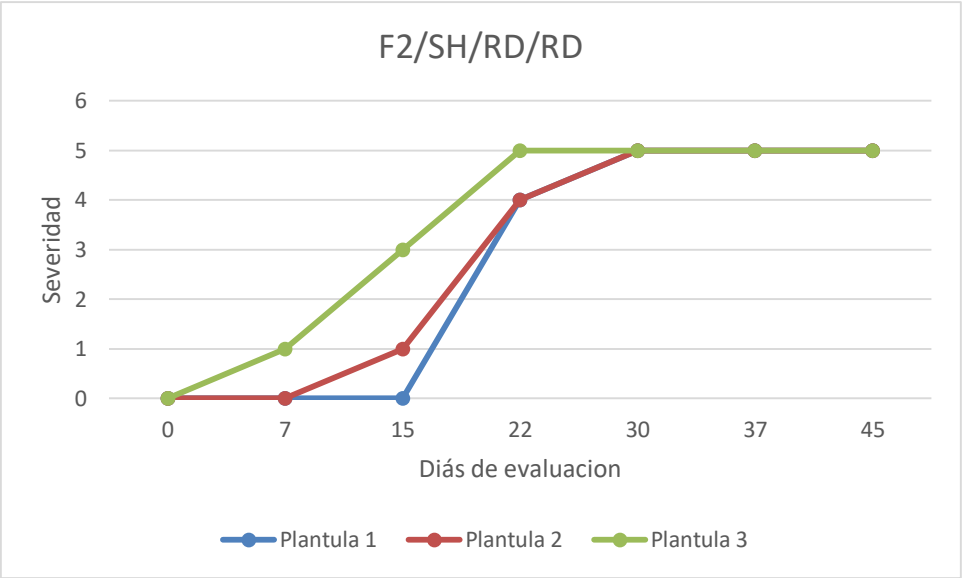

Figura 28. Grafica de la respuesta de la planta a la inoculación por Root Dipping con sin herida de F. solani y tratada posteriormente con Mertect al 2,0mg/ml por Root Dipping.

La figura anterior ejemplifica el resultado del comportamiento de este tratamiento en todos los ensayos (SH/RD, SH/D, H/RD y H/D) esto se puede ver en el Anexo 11 donde se encuentran las gráficas que ilustran el comportamiento de la sintomatología de las plantas.

En el caso de los ensayos con las nanopartículas QNP2 se observó una supervivencia de 14 de 24 plantas tratadas con estas (Ver Anexo 9 y Anexo 11). Comparando los resultados obtenidos entre los ensayos teniendo en cuenta los resultados del test Duncan el método de inoculación donde se trató con QNP2 que fue más efectivo para este tratamiento fue por Root Dipping, ya que, en los ensayos donde se inoculo por Drench las nanopartículas no obtuvieron resultados

óptimos. En cuanto al método de aplicación que obtuvo mejor efecto, se tomó en cuenta los resultados en los ensayos donde se inoculo por Root Dipping (Tabla 30Tabla 31), y se puede comprobar que el método de aplicación que obtuvo resultados óptimos fue por Root Dipping, sin embargo la aplicación por Drench presento igualmente resultados favorables en el ensayo H/RD.

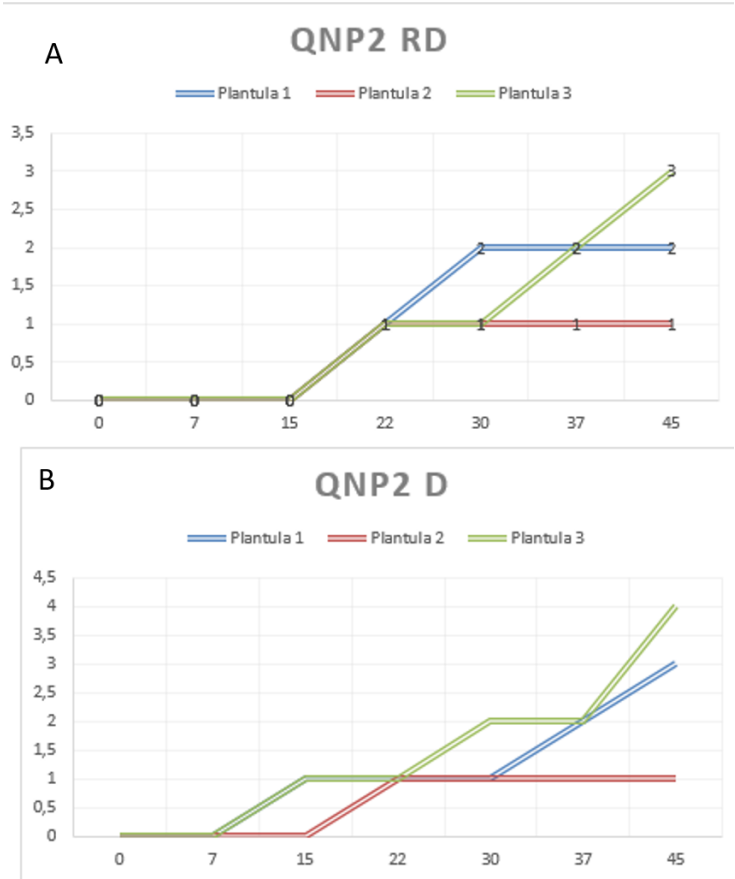

Figura 29. Gráficos de severidad vs tiempo para los ensayos con QNP2. A. (QNP2/H/RD/RD) Grafica de la respuesta de la planta a la inoculación por Root Dipping con herida den F. solani y tratada posteriormente con QNP2 por Root Dipping. B. (QNP2/H/RD/D) Grafica de la respuesta de la planta a la inoculación por Root Dipping con herida den F. solani y tratada posteriormente con QNP2 por Drench

En la figura anterior se puede observar el comportamiento del ensayo que obtuvo mejor resultado para este tratamiento; se refleja como a medida del paso del tiempo se presentan los síntomas de la enfermedad de podredumbre de pie de tomate, no obstante después de 45 días de evaluación los síntomas de la planta no son altos y el total de las plántulas tratadas se mantiene con vida (Ver Anexo 9).

En el caso de los distintos ensayos para los otros tratamientos, los síntomas de la enfermedad se fueron presentando levemente en las plantas como se evidencia

en las gráficas del Anexo 11 donde se ilustran gráficamente los síntomas presentados en cada ensayo y tratamiento. En el caso del quitosano y de *Trichoderma* sp. Se obtuvieron resultados favorables, en algunos casos se presentó muestre prematura de algunas de las plántulas y en otros se mantuvo controlado los síntomas evaluados.

Los tratamientos con quitosano tuvieron diferentes respuestas independientemente del tipo de aplicación que se realizó, este mismo comportamiento se repitió en los ensayos con Ácido acético y en algunos casos con *Trichoderma* sp. (Ver Anexo 9 y Anexo 11)

Posteriormente y al final de la evaluación se observaron las raíces de las plántulas del Control negativo y de aquellas que fueron tratadas con QNP2. Los resultados se pueden evidenciar a continuación:

Figura 30. A. QNP2 para el ensayo con H/RD/RD y B. QNPP2 para el ensayo SH/RD/D

Figura 31 Control negativo para los tratamientos (de izquierda a derecha) H/RD, H/D y SH/D

La Figura 31 permite observar signos leves de podredumbre en pie de tomate, se puede ver la necrosis del pie del tallo y la faltad de raíces secundarias en cada una de las plantas. En el caso de la Figura 30 para el ensayo de las nanopartículas se puede observar leves signos de necrosis en el pie del tallo, mas sin embargo se observan (30A y 30B) una mayor cantidad de raíces con respecto al control negativo. En algunos casos se observaron raíces secundarias y en la Figura 30B el tamaño de la raíz era mayor con respecto al control negativo.

6.2. Identificación el daño celular del hongo *F. solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica.

Para la identificación del daño celular que las ChNPs+TPP+PEG causan a *F. solani* en la evaluación *in vitro*, se realizó la preparación de la muestra cómo se menciona en el apartado 5.3.2. Las muestras fueron remitidas al área de microscopia electrónica de la Fundación Santa Fe de Bogotá donde se procesó la muestra cómo se describió anteriormente y se colocó en una rejilla de cobre donde se realizó una tinción de contraste para ser observado en el MET. Las imágenes obtenidas de las muestras se encuentran a continuación:

Las ChNPs+TPP+PEG fueron caracterizadas mediante MET (Figura 32). Se encontraron aglomerados de nanopartículas aparentemente uniformes con tamaños 50-100 nm.

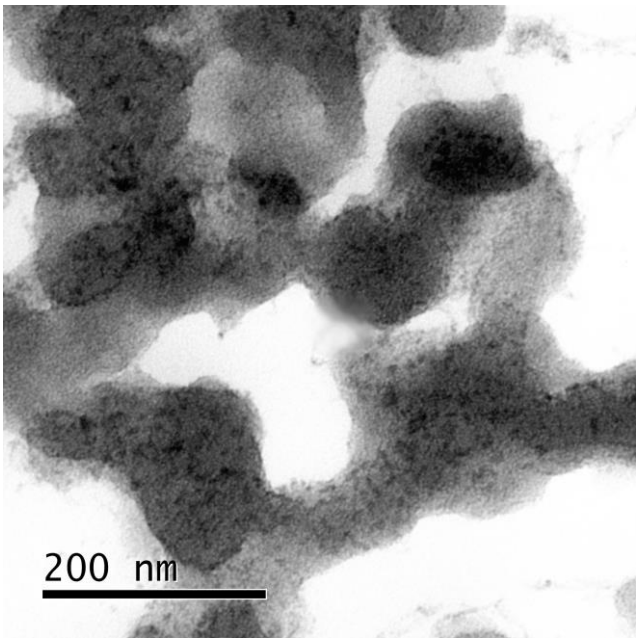

Figura 32. Micrografía MET de las ChNPs+TPP+PEG del modelo experimental 2.

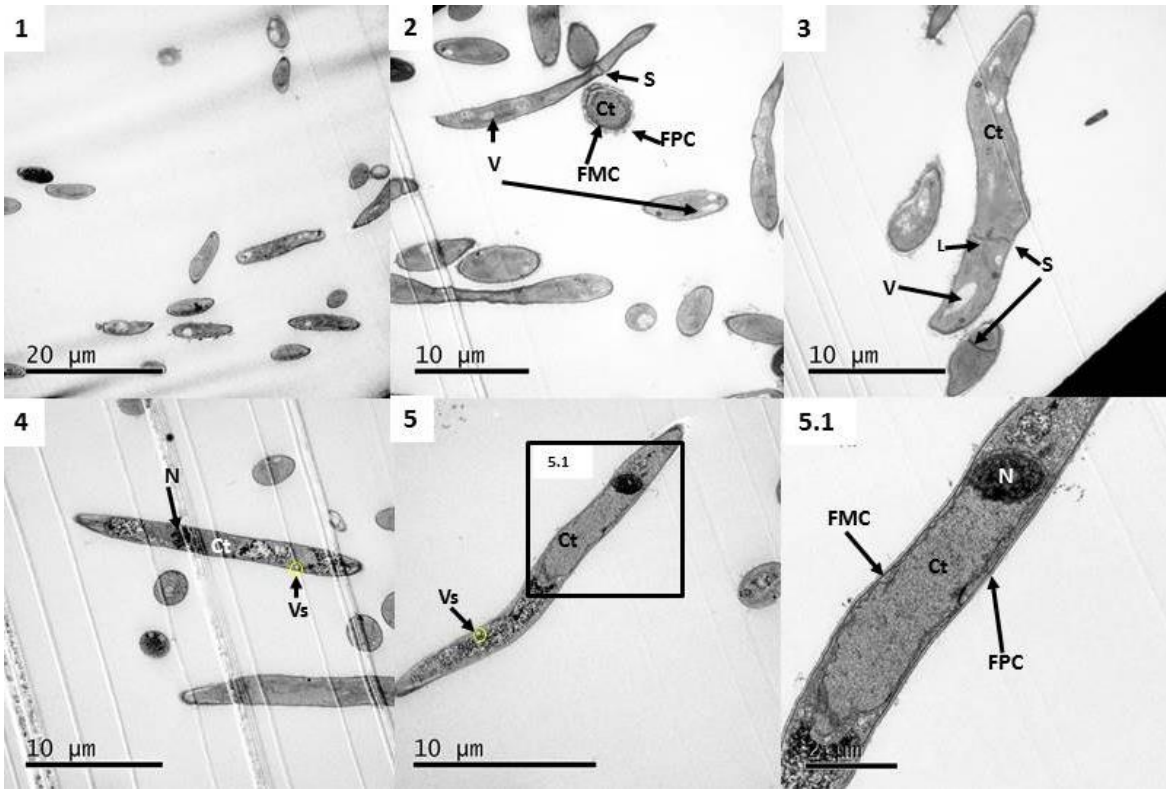

Figura 33. MET del control negativo (F. solani sin tratamiento) donde se observan hifas con cortes transversales y longitudinales. N: Núcleo, Ct: Citoplasma V: Vacuola S: Septo L: Lípidos FPC: Pared celular de F. solani FMC: Membrana celular de F. solani

Se puede observar en la figura anterior, células fúngicas donde se distingue la pared celular, la membrana plasmática, el citoplasma el cual contiene diferentes organelos como el núcleo, vacuolas, lípidos y otros organelos del hongo. Se pudo ver que tanto la membrana como la pared están claramente definidas y se logró detectar septos de las hifas, el contenido citoplasmático tiene una densidad normal como se encuentra reportado por Benhamou & Be (1998) .

En la Figura 34 donde se trató el hongo con el fungicida Mertect se pudo observar alteración a nivel de la pared, membrana, citoplasma y núcleo, así mismo se evidencian restos de *F. solani* en la microscopia (Figura 34. 1-5). En las Figura 34. 1.1., 5.1. y 5.2. se evidencio que la pared celular no está claramente definida como se observa en el control negativo (Figura 33), de igual forma en todas las imágenes se advirtió que más de un núcleo de las células presenta una densidad mayor a comparación de aquellos que no se trataron con Mertect. La imagen 2.1 de la figura 40 permite contemplar que el contenido citoplasmático de la célula fúngica está afectado, presentándose gránulos de alta densidad en él; Así mimo se observa una gran cantidad de vesículas y vacuolas en el citoplasma en comparación al control negativo.

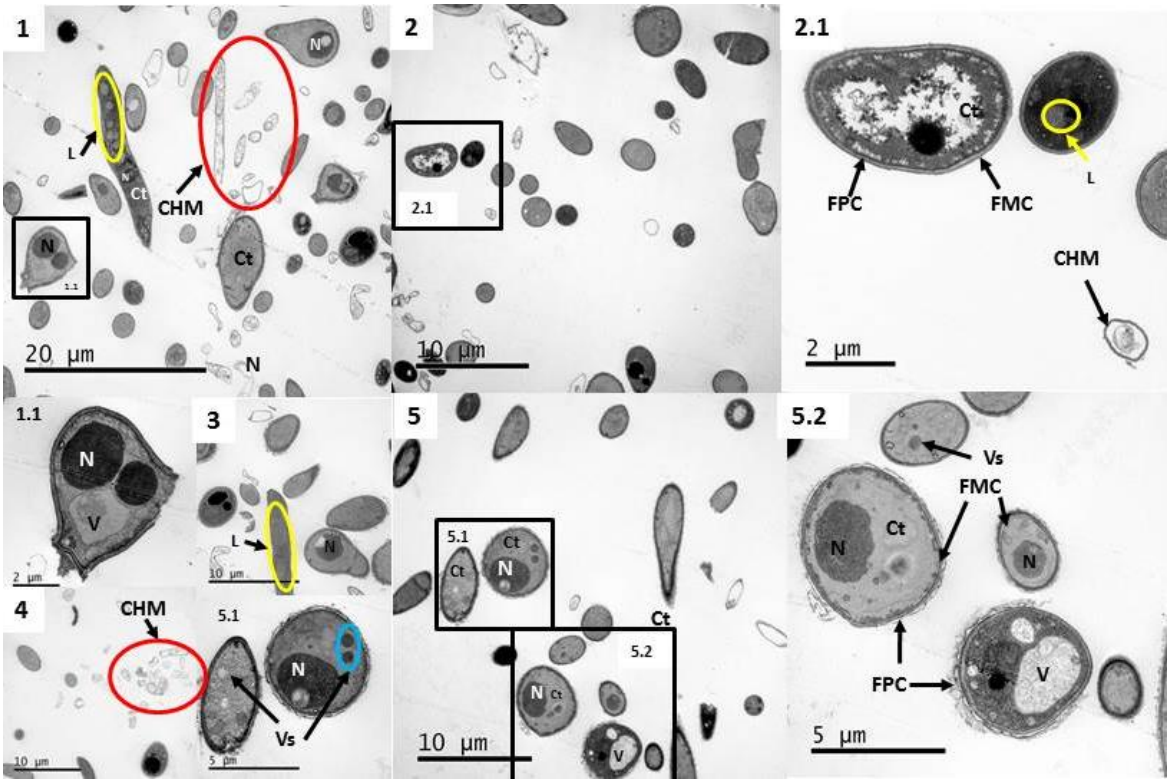

Figura 34. MET del control positivo (F. solani expuesto al fungicida Mertect con una concentración de 2.0mg/ml) 1. Células del hongo afectadas por la presencia del fungicida, amorfas y rastro de células del hongo muertas (CHM) 1.1. Ampliación de F. solani afectado por el fungicida, perdida de pared y membrana. 2. Células fúngicas afectadas por el fungicida. 2.1. Ampliación dela imagen 2, se observa perdida de la consistencia del citoplasma (Ct). 3 y 4. Células de F. solani afectadas a nivel de pared y restos células de F. solani. 5. F. solani afectado por el fungicida a nivel de pared. 5.1 y 5.2. Ampliación de células fúngicas con daño en la pared. N: Núcleo, Ct: Citoplasma V: Vacuola S: Septo L: Lípidos FPC: Pared celular de F. solani FMC: Membrana celular de F. solani Vs: Vesículas.

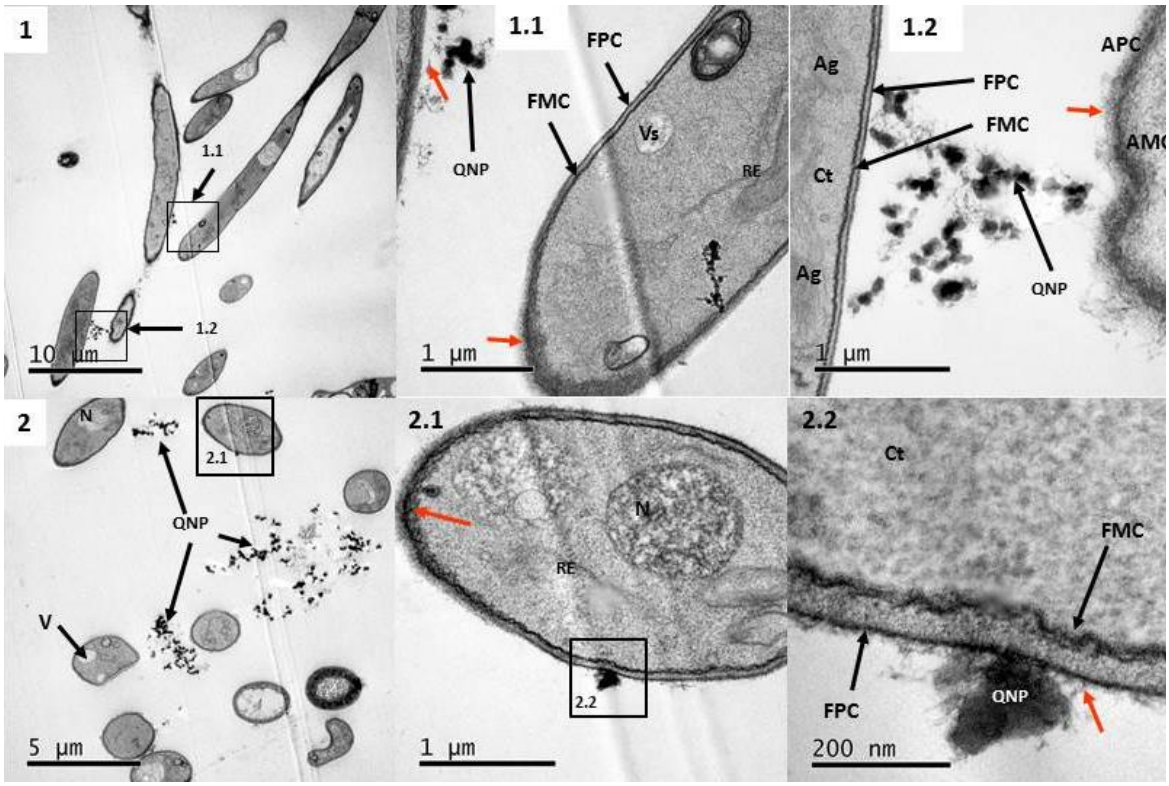

Figura 35. . MET del tratamiento con las ChNPs+TPP+PEG (F. solani expuesto a las nanopartículas QNP2) La flecha roja muestra el daño a causa de las QNP2, se observa la presencia de aglomerados de QNP2 alrededor de la pared celular 1, 2. Células del hongo afectadas por la presencia de QNP2, 1.1., 1.2., 2.1., 2.2., Ampliación de la pared de F. solani afectado por las nanopartículas QNP2 con signos de daño en pared y membrana. N: Núcleo, Ct: Citoplasma V: Vacuola S: Septo L: Lípidos, Ag: Aparato de Golgi, M: Mitocondria, RE: Retículo endoplasmatico. FPC: Pared celular de F. solani FMC: Membrana celular de F. solani Vs: Vesículas. QNP: QNP2. APC: Pared celular afectada, AMC: Membrana celular afectada

Los resultados del MET realizado a la muestra de *F. solani* y tratado con QNP2 muestran que hay una interacción entre las nanopartículas QNP2 a nivel de la pared celular y la membrana plasmática, donde se afecta la estructura de estas; esto es evidente en la Figura 35 y Figura 36donde se señala (flechas rojas) los lugares donde estas han sido perjudicadas por la presencia de estos aglomerados de nanopartículas de un tamaño desde los 100nm. Como se puede ver claramente en la imagen 3.1. de la Figura 36, las QNP2 al interactuar con la pared y la membrana generan la disgregación de estas, lo cual se evidencia claramente al dejar de presentarse como estructuras definidas como se observa con respecto a las zonas donde no se ha interactuado con ellas o en comparación al control negativo (Figura 33). En estas muestras se percibe la presencia de organelos en el citoplasma como el núcleo con una densidad aparentemente normal, aparato de Golgi, retículo endoplasmatico y mitocondrias bien definidas y en comparación al control positivo se encuentra menos presencia de vacuolas y vesículas lipídicas.

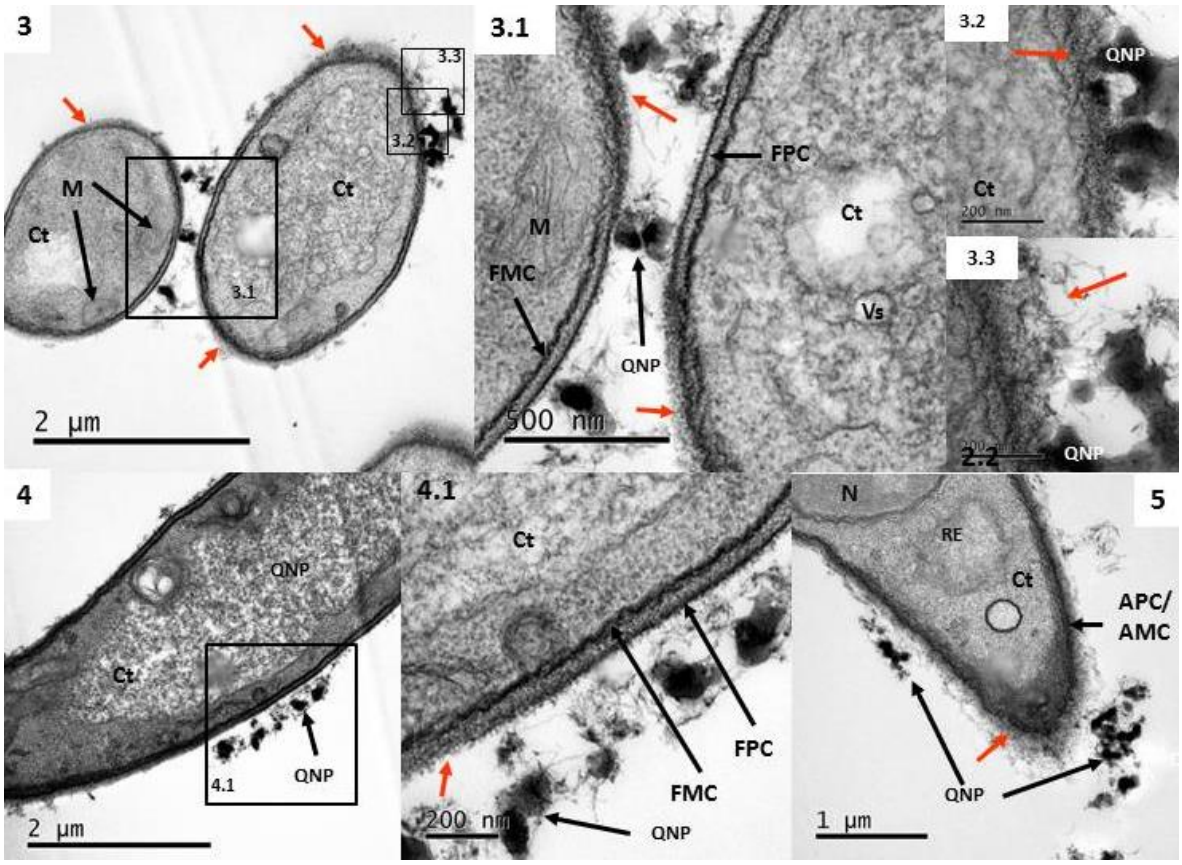

Figura 36. MET del tratamiento con las ChNPs+TPP+PEG (F. solani expuesto a las nanopartículas QNP2) La flecha roja muestra el daño a causa de las QNP2, se observa la presencia de aglomerados de QNP2 alrededor de la pared celular 3, 4, 5. Células del hongo afectadas por la presencia de QNP2, 3.1., 3.2., 3.3. y 4.1. Ampliación en la pared de F. solani afectado por las nanopartículas QNP2 con signos de daño en pared y membrana poco definidas con respecto al control negativo. N: Núcleo, Ct: Citoplasma V: Vacuola S: Septo L: Lípidos, Ag: Aparato de Golgi, M: Mitocondria, RE: Retículo endoplasmatico. FPC: Pared celular de F. solani FMC: Membrana celular de F. solani Vs: Vesículas. QNP: QNP2. APC: Pared celular afectada, AMC: Membrana celular afectada.

6.3. Caracterización la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica.

En el caso de la caracterización para los ensayos *in vivo* se realizó la preparación como se describió en la metodología (Apartado 5.3.3.). Las muestras fueron remitidas a la Fundación Santa Fe de Bogotá donde se hizo el fijado de la muestra y se obtuvieron las imágenes que se muestran a continuación:

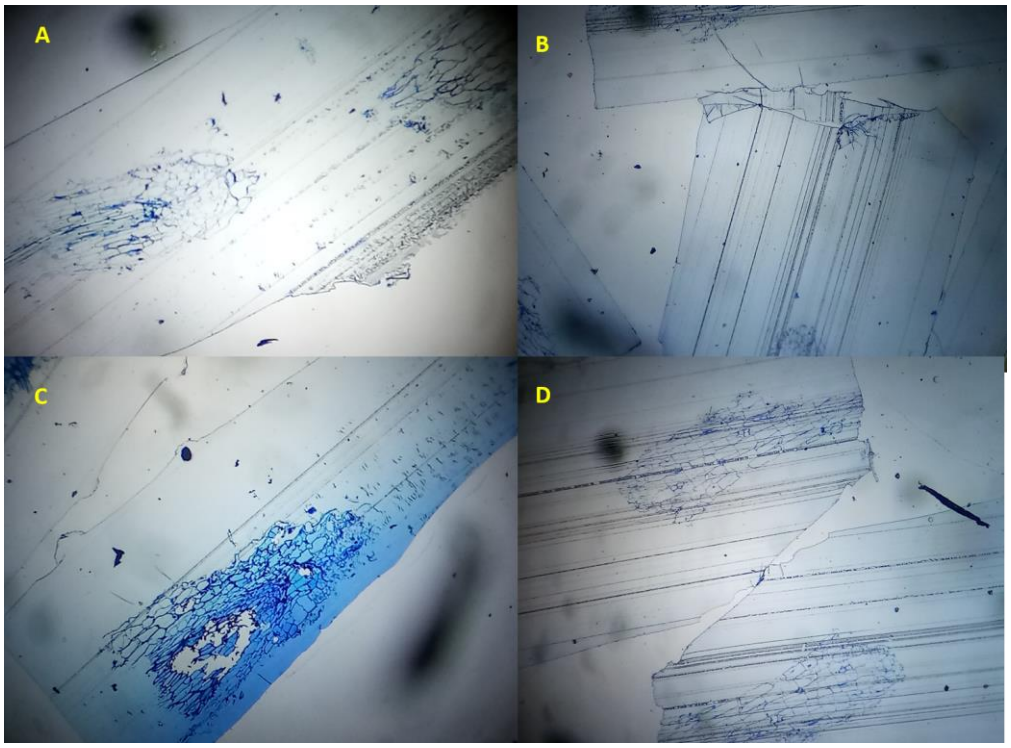

Figura 37. Visualización de las muestras fijada en microscopia óptica a 10X. A. Raíz de planta sana. B. Raíz de planta infectada con F. solani C. Raíz de planta infectada con F. solani y tratada con QNP2 después de 45 días de evaluación. D. . Raíz de planta infectada con F. solani y tratada con QNP2 durante 12h por RD.

En la imagen anterior se pueden observar las diferentes muestras a las cuales se les realizo el MET. La finalidad de observar las muestras en el microscopio óptico es escoger el mejor campo visual para realizar el corte ultra-fino para su posterior visualización en el MET. Se puede observar en la figura la estructura general de la raíz de la planta sana (Figura 37A) donde no se ven las células con pérdida de turgencia daños en la pared o algún otro tipo de cambio. En los ensayos donde se tiene la raíz infectada por el hongo se observaron algunas células dañadas, poco turgentes y en algunos casos se pudo observar rompimiento de la estructura celular (Figura 37 B y 37C). Finalmente en la Figura 37 D se observan pocos daños celulares en la raíz.

Luego a las muestras se le realizó el corte ultra fino (<90nm) y se colocó en una rejilla de cobre donde se realiza un proceso de tinción con metales pesados y se obtuvieron las siguientes imágenes:

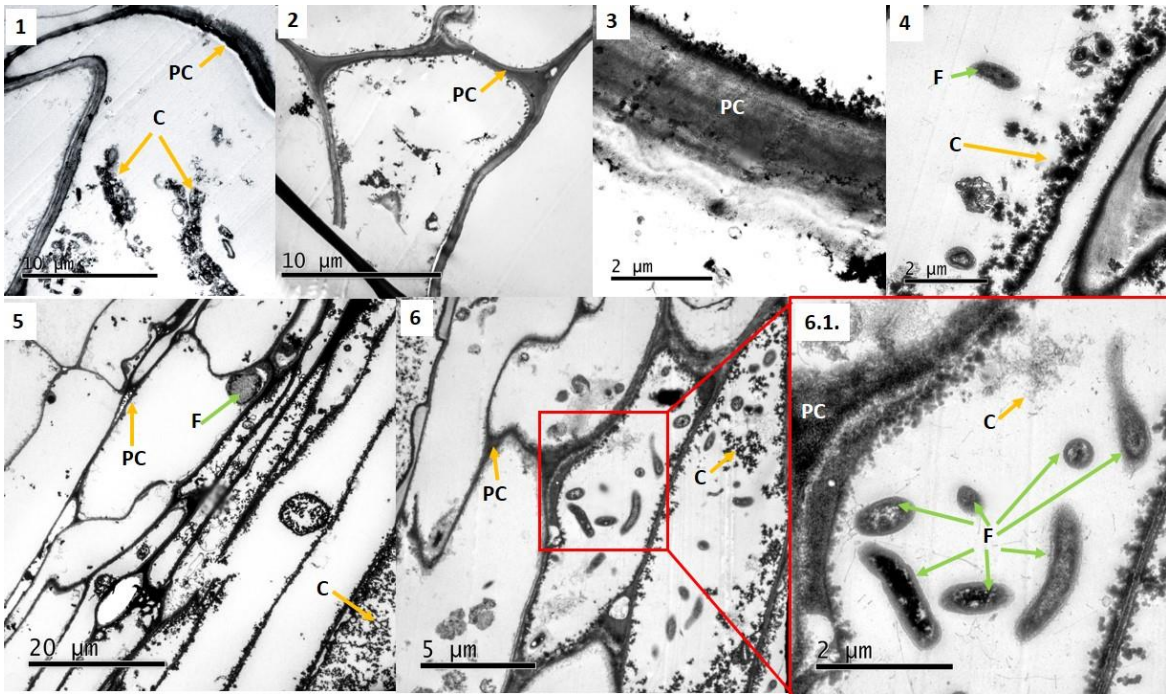

Figura 38. MET de las muestras de raíz de plántula de tomate chonto.1, 2 y 3. Planta sana (S) Plántula sin inocular con F. solani. Control negativo (C-) Plántula de tomate chonto inoculada con F. solani. PC: Pared celular de la raíz de la plántula. C: Contenido citoplasmático de la raíz de la plántula. F: F. solani

La microscopia electrónica permitió evidenciar las estructuras de la raíz de la planta y del hongo. En la Figura 38 1-3 se observan estructuras sanas, es decir la raíz de la planta sin haberse inoculado con *F. solani;* las células de la raíz de la plántula de tomate chonto, la pared celular se encuentra claramente definida, se ven restos del contenido citoplasmático mas no se evidencian ningún otro organelos. En cuanto al control negativo se (Figura 38 4 - 6.1) se observa la invasión de la célula hospedera (raíz de planta de tomate) por estructuras fúngicas iguales a las observadas en el MET para las muestras *in vitro* (Figura 33) donde se evidencia células de *F. solani* con pared celular y membrana plasmática definidas, así como el contenido citoplasmático normal. El contenido citoplasmático de la célula hospedera ser ve afectada ya que se observa gránulos de alta densidad en las células colonizadas por el hongo.

Las imágenes obtenidas a partir de la muestra en la cual se aplicó QNP2 y se tomó la muestra a los 45 días para ser procesada para la MET (Figura 39) deja ver la estructura general de la célula hospedera donde se observa colonización del hongo en esta y presencia de QNP2 dentro de la célula. Las imágenes 1.1., 3 y 3.1. de la Figura 39 muestra aglomerados de QNP2 dentro del citoplasma de la célula hospedera; estos aglomerados tienen tamaños desde 200nm así como se pudo observar en la parte in vitro. En la imagen 1.2 de esta figura se observan los aglomerados de las ChNPs+TPP+PEG en el citoplasma de la célula hospedera y

rodeando células de *F. solani* que muestran estrés en pared y membrana como se presentó en la muestra *in vitro* (Figura 35Figura 36), ya que, estas estructuras se ven desintegradas y en la imagen 2.1. Las células de F. solani se ven afectadas tanto a nivel de pared y membrana como de forma debido a la presencia de las ChNPs+TPP+PEG.

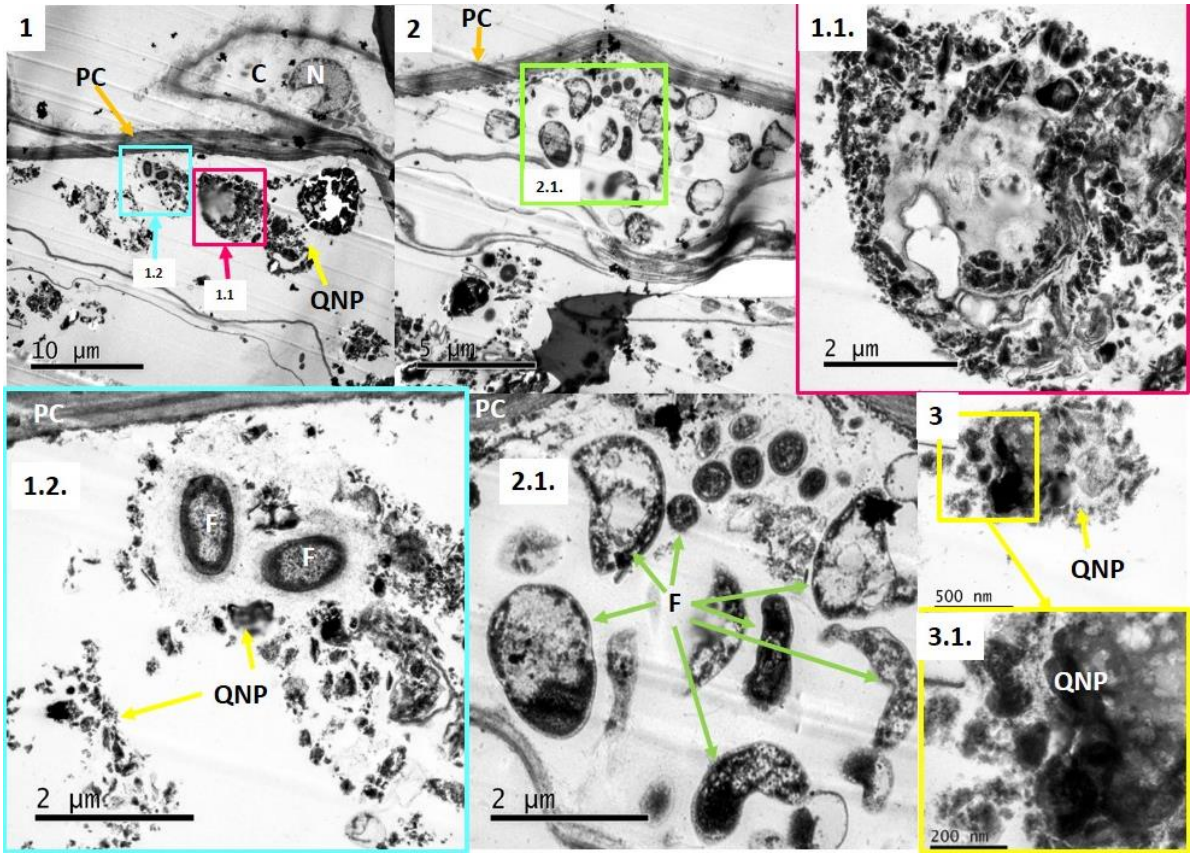

Figura 39. MET de las muestras de raíz de plántula de tomate chonto tratada con QNP2 a los 3 días de haberse inoculado con F. solani y se tomó la muestra a los 45 días después de aplicadas.1. Raíz de tomate chonto con evidencia de F. solani y de aglomerados de QNP2, 1.1. Amplificación de la imagen donde se evidencian aglomerados de ChNPs+TPP+PEG de gran tamaño, 1.2. F. solani. Dentro de la célula de la plata con afectación de su pared celular con QNP2 alrededor de las estructuras fúngicas. 2. Raíz de tomate chonto con evidencia de F. solani. 2.1. Invasión de células amorfas F. solani en la célula de la raíz de la planta. 3. Aglomerados de QNP2 de un tamaño <1µm, 3.1. Aglomerados de QNP2 de ≤200nm. PC: Pared celular de la raíz de la plántula. C: Contenido citoplasmático de la raíz de la plántula. N. Núcleo de la célula de la raíz de la plántula. F: F. solani QNP: QNP2

Por último en la muestra donde se aplicó QNP2 en suspensión durante 12 h en una plántula de tomate inoculada con F. solani se logró observar que las células de la planta hospedera habían sido afectadas por el hongo, la pared celular de estas se pueden ver dañadas, el citoplasma de la célula se encuentra en ciertos casos rasgado (Figura 40 1.). Se observa los espacios intercelulares claramente

entre varias celulares hospederas y poca colonización del agente fitopatógeno, así como la presencia de las nanopartículas en el citoplasma de la célula de la raíz de tomate. En la micrografía (Figura 40 3 y 3.1.) se evidencia la presencia de una célula fúngica que muestra signos de estrés en las zonas de la pared celular fúngica donde esta no se encuentra definida y donde se observa nuevamente ciento grado de descomposición de la pared y en otros lugares presencia de vesículas extracelulares.

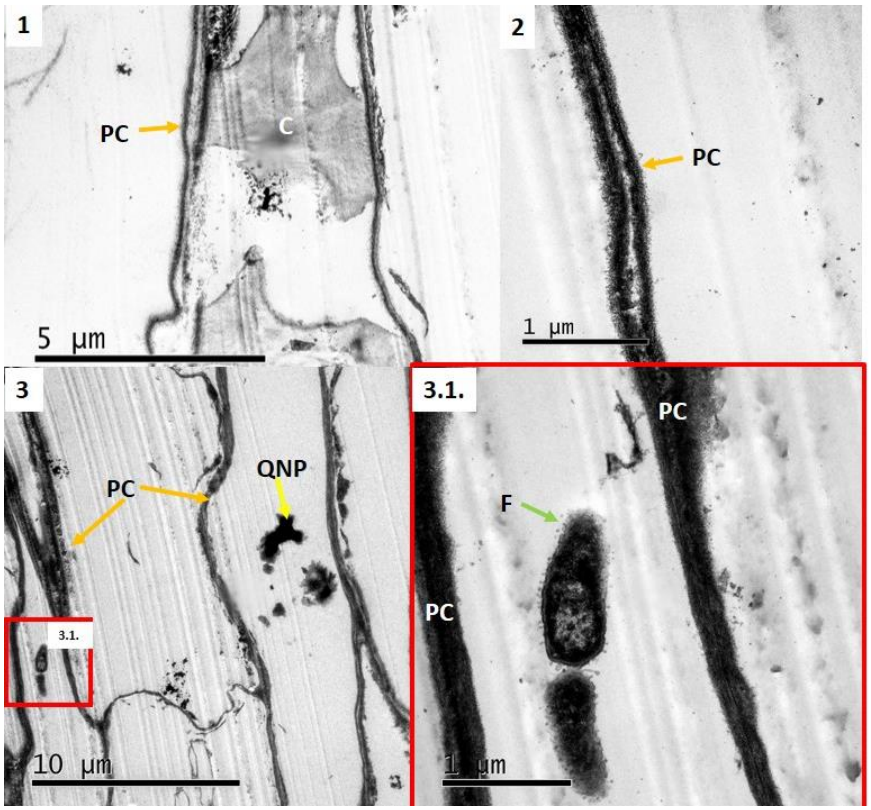

Figura 40. MET de las muestras de raíz de plántula de tomate chonto tratada con una suspensión de QNP2 por 12h a los 3 días de haberse inoculado con F. solani..1. Raíz de tomate chonto con evidencia de daño en la pared celular de la plántula y en el contenido citoplasmático. 2 pared celular de la raíz de la planta. 3. Raíz de tomate chonto con evidencia de invasión de F. solani y aglomerados de QNP2, 3.1. F. solani donde se evidencia estrés en la pared del hongo. PC: Pared celular de la raíz de la plántula. C: Contenido citoplasmático de la raíz de la plántula. N. Núcleo de la célula de la raíz de la plántula. F: F. solani QNP: QNP2

6.4. Consolidación de la metodología evaluada. Protocolo establecido a partir de la evaluación *in vitro e in vivo*

Como producto final de este trabajo de grado se entrega la siguiente metodología consolidad a partir de los resultados obtenidos en el desarrollo experimental. El documento del protocolo completo de esta metodología se encuentra en el anexo 13

6.4.1. Materiales y reactivos para la ejecución del protocolo de evaluación

Materiales

- Cajas de Petri
- Tubos tapa rosca
- Asa redonda
- Aguja de disección
- Palillos de madera estériles
- Micropipeta de 10-100µL
- Micropipeta de 100-1000 µL
- Puntas azules y amarillas para micropipeta
- Cámara de Neubauer
- Microscopio Óptico
- Laminas
- Laminillas
- Rastrillos

Reactivos

- Agar PDA
- Agar microbiológico
- Solución salina al 0.85%
- Ácido acético al 0.15%v/v
- Quitosano
- Cepa de *F. solani*
- Cepa de *Trichoderma* sp.
- Azul de lactofenol.
- Agua desionizada estéril.
- Fungicida comercial.

6.4.2. Metodología

La metodología propuesta a partir de los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* e *in vivo* consolidan los métodos necesarios para la evaluación de las ChNPs+TPP+PEG utilizadas en este trabajo frente a *F. solani.*

6.4.2.1. Evaluación *in vitro*

- Caracterización macro y microscópica del hongo *F. solani*

La cepa utilizada de *Fusarium solani* debe ser reactivada con 7 días de antelación en medio PDA e incubada a 25°C. Se debe realizar el reconocimiento del hongo *F. solani* mediante el cultivo del mismo en el agar papa dextrosa (PDA) para evidenciar las características macroscópicas del hongo (Color de anverso y reverso, textura y aspecto).

Para la caracterización microscópica se realiza tinción con azul de lactofenol; esta consiste en colocar una gota de azul de lactofenol en una lámina de vidrio, con la aguja de disección se toma un poco de micelio de la periferia de la colonia y se extiende sobre la lámina con azul de lactofenol, luego se coloca una laminilla y se observa en el microscopio óptico a 40X.

- Curva de crecimiento

Para determinar el crecimiento y desarrollo del hongo se realiza una curva de crecimiento, sembrando el hongo por punción en el centro de una caja de Petri con medio de cultivo PDA, luego se mide el crecimiento del micelio tomando 4 medidas del diámetro del micelio, cada 24 h y registrándose los datos hasta que el hongo llene por completo la caja de Petri. Para este procedimiento se deben realizar 5 réplicas.

- Evaluación de la actividad antifúngica ChNPs+TPP+PEG en cultivo *in vitro* sobre *F. solani*

La evaluación de estas nanopartículas se debe hacer con la presencia de otros tratamientos para la comparación estadística. Realizar 3 réplicas (mínimo) por tratamiento.

Tratamientos para cultivo *in vitro*:

- Tratamientos con ChNPs+TPP+PEG.
- Tratamiento con quitosano comercial.
- Control del reactivo: Tratamiento con ácido acético al 0.15%
- Control negativo

Métodos de aplicación del tratamiento: Se implementa el **método de dilución en agar** según la metodología propuesta por Saharan, y otros, (2015). Para lo cual se añade 100µl (Pardo, 2017) de cada uno de los tratamientos respectivos para caja una de las cajas de Petri con medio PDA en fase liquida, se distribuye el tratamiento en toda la caja y se deja solificar en cabina de flujo laminar, posteriormente se sembró el hongo con discos de micelio agar y se incubó a 25°C durante 12 días.

- Crecimiento micelial

Para evidenciar la actividad antifúngica se den tomar los datos del crecimiento micelial en las cajas de Petri durante el periodo que dure la evaluación, es decir, hasta que el control negativo llene la caja de Petri. Luego se calculó el PICR para estos tres días según la siguiente formula.

$$PICR = \frac{R1-R2}{R1} * 100\% \text{ (1) (Juniors et al., 2017)}$$

R1 - crecimiento radial del no influenciado (Control negativo)

R2 - crecimiento radial influenciado (Tratamiento)

6.4.2.2. Evaluación *in vivo*

- Escalamiento síntomas de podredumbre de pie de tomate chonto causado por *F. solani.*

Para la evaluación *in vivo* se debe realizar una escala de severidad en la planta de tomate chonto, donde se inocula la planta al sumergir la raíz en una suspensión de $1x10^6$conidios/ml durante 2 minutos, luego se trasplanta a suelo estéril y se evalúa hasta la muerte de las plántulas (Marlatt, Correll, Kaufmann y Cooper ,1996, y Herrera Cid, 2017)

- Inoculación de *F. solani* en plántulas de tomate chonto.

Se utiliza una suspensión de $1x10^5$ conidios/ml de *F. solani* y se aplica mediante Root Dipping (RD) (El-mohamedy & Abdel-kareem, 2014; Lopez, Hernandez, Álvarez, Méndez, & Mendoza, 2017) Las plantas se inoculan para cada técnica con la raíz con herida (H) y raíz sin herida (SH) de la siguiente forma:

- Root Dipping (RD) + raíz con herida (H): se retiran las plántulas del suelo removiendo con cuidado la tierra de las raíces y enjuagando con un suave chorro de agua para eliminar el exceso, luego se cortaron con tijeras dos centímetros de la punta de la raíz de cada planta y se sumergen por separado durante dos minutos en la suspensión de conidios, posteriormente las plántulas se trasplantan recipientes con suelo estéril (López Benítez, Hernández Martínez, Álvarez Ojeda, Méndez Aguilar, & Mendoza, 2016).
- Root Dipping (RD) + raíz sin herida (SH): se extrajeron igualmente las plántulas del suelo y se retiró este con cuidado igual que en el proceso anterior. Sin realizar el corte se sumergen las raíces por separado durante dos minutos en la suspensión de conidios y finalmente se trasplantan en las mismas condiciones que la técnica anterior (2016).

Se realizan 3 repeticiones por material y 3 días después de inocular se aplican los diferentes tratamientos mediante Root Dipping.

- Aplicación de las ChNPs+TPP+PEG a las plántulas infectadas previamente con *F. solani.*

Para la aplicación de las nanopartículas por Root Dipping se realiza de manera individual para cada planta inoculada con *F. solani,* para esto las plantas de tomate son extraídas

del suelo, se les retira el exceso de tierra a las raíces, y se sumerge durante 30 minutos en una suspensión de ChNPs+TPP+PEG. Dicha suspensión es preparada en proporción 1:10, al añadir 10ml de nanopartículas a 100ml de agua desionizada y estéril.

Se realiza el montaje de 2 testigos, uno donde la planta este sana y uno donde la planta este inoculada con *F. solani,* pero sin aplicarse las nanopartículas. Para esta técnica se realiza por triplicado y se evalúa síntomas de la podredumbre de pie de tallo de tomate como la marchitez, clorosis y pérdida de turgencia cada 7 días durante un periodo de 45 días registrando, el daño en la planta según la escala de severidad establecida (Apartado 4.4)

6.4.2.3. Análisis estadístico para los resultados obtenidos

Todos los datos obtenidos, tanto de las pruebas *in vitro* (PICR) como *in vivo* (Área bajo la curva a partir de la escala de severidad de los síntomas), se analizan estadísticamente mediante el test ANOVA One Way. Se realiza un test Tukey para el ensayo *in vitro* y un test Duncan para el ensayo *in vivo* con $p<0,5$ para identificar el nivel de significancia de los tratamientos.

6.4.3. Recomendaciones

Evaluar todos los tratamientos el mismo día cada 24 h, para la evaluación *in vitro*. Cuando el control negativo llene la caja se toma como el día final de la evaluación, este dato no se usa para el análisis estadístico.

En caso de obtener resultados de PICR negativos cuando se calcula con el ácido acético como el crecimiento del no influenciado, realizar el análisis estadístico ANOVA con las el promedio de las medidas de diámetro registradas.

7. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se realiza el análisis de los resultados de cada uno de los objetivos propuestos para la evaluación de las ChNPs+TPP+PEG teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado 6. Al final de esta sección de discusión se adiciona una sección de consolidación de la metodología evaluada y la actividad antifúngica observada en la MET realizada.

7.1. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de quitosano+TPP+PEG sobre *Fusarium solani* empleando tomate chonto como modelo vegetal (*Solanum lycopersicum*).

Como se describió en el apartado 6.1. Donde se pudieron observar los resultados obtenidos por el análisis *in vitro* e *in vivo* de acuerdo con el protocolo planteado para su evaluación, las ChNPs+TPP+PEG presentaron resultados favorables de acción antifúngica, los cuales que se analizan a continuación y permitió establece un protocolo de evaluación (Anexo 13) para las ChNPs+TPP+PEG.

Para realizar un análisis completo de evaluación antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG frente al hongo *F. solani*, primero se realizó un reconocimiento macro y microscópico del hongo. Se identificaron (Figura 21) *in vitro* estructuras celulares propias de este microrganismo tales como hifas hialinas septadas y delgadas, con conidióforos con células conidiogénicas fiálides alargadas que producen macroconidios fragmentados (fragmoconidios) hialinos con forma de medialuna, alargados con extremos redondos; así como también se observaron microconidios hialinos de forma ovoide. Estas estructuras son propias del genero *Fusarium* spp. como lo indica Robles Yerena et al. (2016). Este reconocimiento microscópico indica que todo el desarrollo experimental realizado en este trabajo se enfocó particularmente en el hongo del genero *Fusarium* sp.

Otra característica importante para definir las condiciones de cultivo de un hongo es la curva de crecimiento, para estandarizar las condiciones experimentales propias de este trabajo y cómo se comporta el microorganismo en el medio de cultivo empleado. Esta curva de crecimiento que permitió establecer un estimado de tiempo de crecimiento del hongo utilizando como condiciones de cultivo, medio PDA e incubación a 25°C (American Type Culture Collection, 2018). Los resultados obtenidos demostraron que *F. solani*, a pesar de tener un crecimiento durante un periodo de 15 días, la evaluación duró 12 días - cuando el control negativo llenó la totalidad de la caja de Petri. Esta curva de crecimiento permitió establecer un estimado del crecimiento de 15 días utilizando como condiciones de crecimiento agar PDA a 25°C; sin embargo al observar que la evaluación tuvo una duración de tan solo 12 días se evidencio la importancia de realizar controles negativos aun cuando se conozca el comportamiento del microorganismo.

7.1.1. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG sobre crecimiento *In vitro* de *Fusarium solani*

La evaluación *in vitro* permitió determinar la eficacia del uso de las ChNPs+TPP+PEG en 2 muestras QNP1 y QNP2. Con el fin de evidenciar electo antifúngico se realizó el cálculo del PICR para cada uno de los métodos de evaluación propuestos (M1, M2 y M3). Se obtuvo que el método de evaluación que mostro mejores resultados al evaluar QNP1 y QNP2 fue M1, ya que al realizar la comparación de QNP1 y QNP2 con las concentraciones de quitosano QC1 y QC2 se evidencio una diferencia significativa (Tabla 16) entre los tratamientos. Esta comparación se realizó debido a que los resultados mostraron que el ácido acético presento un efecto inhibidor del crecimiento mayor a los presentados en los tratamientos de QNP1, QNP2, QC1 y QC2 en los 3 métodos y, ya que estos tratamientos incluyen ácido acético en su preparación, se calculó el PICR el teniendo en cuenta este compuesto como el diámetro del crecimiento no influenciado, lo que permitió la comparación de las ChNPs+TPP+PEG con las soluciones de quitosano.

Como se mencionó, el ácido acético presto un efecto inhibidor del crecimiento (Tabla 11, Tabla 17, Tabla 22), el cual fue inicialmente alto sin embargo disminuye con el tiempo. Al realizar el cálculo del PICR (para QC1, QC2, QNP1 y QNP2) con el ácido acético como el control y al obtenerse resultados negativos, se sugiere que el efecto inhibidor del ácido acético no se mantiene en la preparación de las muestras con quitosano y las nanopartículas. Al realizar la comparación de los PICR calculados para QNP1 y QNP2 frente a QC1 y QC2 se evidencio que en el caso de las soluciones de quitosano el PICR fue más alto (5-20%), lo cual indica que el TPP y el PEG disminuyen el efecto del quitosano ligeramente. Esta disminución del efecto antifúngico del quitosano en el compuesto nanoparticulado se presenta debido a que, tanto el TPP como el PEG, se unen a los grupos amino del quitosano al entrecruzarse para generar la conformación de las nanopartículas (N. Rodríguez, Valderrama, Alarcón, & López, 2010), los cuales son los responsables de generar un efecto antifúngico en el hongo (Cárdenas et al., 2015). Razón por la cual es necesario que en futuros trabajos se busque conocer la concentración final TPP y el PEG que conforman finalmente las ChNPs+TPP+PEG, así mismo se propone tener controles para los reactivos TPP y PEG a pesar de que no hayan reportes de acción antifúngica de estos.

A diferencia de otras ChNPs donde se utiliza tan solo TPP para su conformación, las que se utilizan en esta evaluación utilizan PEG. La inclusión del PEG le confiere ventajas a sistema nanoparticulado, ya que, gracias a la introducción de este compuesto sea reportado que se obtienen nanopartículas de mayor tamaño a comparación de aquellas que no lo tienen (N. Rodríguez et al., 2010). Esto es de suma importancia, puesto que la cantidad de PEG utilizado no solo influiría posiblemente en la actividad antifúngica como se mencionó anteriormente, sino que también influye en el tamaño de las ChNPs+TPP+PEG, como lo demuestra

Rodríguez et al. (2010). Se ha demostrado según un estudio realizado por Ing, Zin, Sarwar, & Katas (2012) que las ChNPs con tamaños de entre 150 y 250nm muestran mejor efecto antifúngico que unas de menor o mayor tamaño. Esta es la razón por la que posiblemente al tener 2 modelos experimentales de ChNPs+TPP+PEG, donde la diferencia fue la concentración de PEG; se sugiere que esta concentración de PEG, al ser mayor en QNP2 (PEG=50mg/ml) que en QNP1 (PEG=10mg/ml), podría favorecer el efecto antifúngico de QNP2, pues como se ve en el cálculo de los PICR, la media de este valor en QNP1 está entre -5 y 5% y en QNP2 de -1 a 15%.

Al realizar el ANOVA para los tratamientos QNP1, QNP2, QC1 y QC2 con datos del diámetro, puesto que los resultados de PICR fueron negativos al ser calculados con el ácido acético como control (Tabla 15Tabla 16Tabla 20Tabla 21Tabla 26), se pudo realizar la comparación estadística entre las ChNPs+TPP+PEG y el quitosano. Las diferencias presentadas entre estos tratamientos solo fue posible evidenciarla en el método de evaluación (M1) dilución en agar, donde se evidencia una diferencia significativa entre QC1 y QNP1, QNP2 y QC2 (Tabla 16) con un efecto antifúngico mayor de estos tres últimos tratamientos mencionados. No se evidencia una diferencia significativa entre QNP1, QNP2 y QC2 debido a que todos contienen una concentración de quitosano de 2,0mg/ml la cual se ha reportado como una concentración con efecto antifúngico (El-mohamedy & Abdel-kareem, 2014).

Para verificar la eficacia de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG, estas fueron comparadas con un control positivo, en este caso el fungicida comercial Mertect, el cual presento tiene un efecto inhibidor del crecimiento fúngico considerablemente mayor a los otros tratamientos. En las Figura 24 ,Figura 25 Figura 26 E y F se puede observar a simple vista que el crecimiento micelial para el Mertect es de menor tamaño frente a los tratamientos de las ChNPs+TPP+PEG, el quitosano y el ácido acético, lo cual se confirma con los resultados obtenidos den test Tukey en las Tabla 13, Tabla 19, y Tabla 24, donde se evidencia que M1 y M2 se encuentran agrupados en un subconjunto diferentes a QC1, QC2, QNP1 y QNP2. El compuesto activo del Mertect este es el Tiabendazol, el cual, a diferencia del quitosano que actúa sobre la pared y membrana (Cárdenas et al., 2015), actúa sobre la tubulina del citoesqueleto del hongo impidiendo la división celular (Sygenta S.A., 2016), lo que finalmente general la inhibición del crecimiento micelial.

En definitiva las ChNPs+TPP+PEG presentan un efecto antifúngico, el cual se logra evidenciar claramente en el método de dilución en agar (M1) donde se logró observar diferencias significativas entre estas y el control de quitosano. Así mismo se determinó que, de las dos muestras de nanopartículas evaluadas QNP1 y QNP2, la que presento un mejor efecto antifúngico fue QNP2 debido a los PICR presentados, por lo tanto es esta nanopartícula la escogida para la etapa de evaluación *in vivo.*

7.1.2. Evaluación de la actividad antifúngica de las ChNPs+TPP+PEG en modelo *in vivo.*

En caso de la evaluación *in vivo* se registraron los síntomas de las plantas causados por la infección causada por *F solani* en las plantas de tomate chonto. En los ensayos realizados se les tomo los datos de estos síntomas presentados tales como: marchitez, clorosis y pérdida de turgencia. De acuerdo a la evaluación de los síntomas como se evidencian en el apartado 6.1.4 el método de aplicación seleccionado para QNP2 fue Root Dipping.

Para determinar el método de inoculación del patógeno, se compararon los métodos de inoculación del microrganismo fitopatógeno. Se puede evidenciar que aquellos ensayos donde se inoculo sin herida (SH) mostraron síntomas más severos, en cambio aquellas plántulas donde se inoculó con herida (H) y por Root Dipping (RD) tuvieron mejor resistencia a la colonización del por el hongo del tejido radicular. Esta resistencia se genera por la reacción de la planta frente al estrés inducido al realizar una herida en la zona radicular y al estar en presencia de un patógeno necrótico como lo es *F. solani*. Cuando esto ocurre se induce una respuesta de resistencia sistémica adquirida (SAR) desencadenando una respuesta metabólica en la planta, la cual le confiere protección frente al microorganismo patógeno mediante la producción de sustancias con actividad antimicrobiana y compuestos que fortalecen la pared (Jones & Dangl, 2006; Pieterse & Van Loon, 1999; Ramírez & Rodríguez, 2012).

La presencia de una herida en la zona radicular genera esta respuesta SAR que tiene como consecuencia una respuesta localizada, donde se produce una muerte celular controlada por las especies reactivas de oxigeno que lisan la pared vegetal (Durrant & Dong, 2004); así mismo se inicia una reacción donde moléculas señalizadoras como el ácido jasmónico, compuesto relacionado con la síntesis de novo de raíz (G. Zhang et al., 2019) y el cual se genera cuando se presentan heridas en los tejidos de las plantas (Howe, 2004) y frente a organismos necróticos(Zhao *et al*., 2005; Desender *et al*., 2007; Camarena & De La Torre, 2007), y el ácido salicílico, que está asociado a la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, lo que genera resistencia frente a la invasión del hongo (Durrant & Dong, 2004), esto resulta finalmente en la síntesis de fitoalexinas, que tienen efecto antimicrobiano, y el fortalecimiento de la pared celular mediante la generación de calosa que recubre al microorganismo y el engrosamiento de las paredes con material fibroso lo cual impide la colonización del hongo (Camarena & De La Torre, 2007). Por el contrario en aquellas plántulas donde se inoculo sin herida, la producción de ácido jasmónico no se presenta debido a la respuesta inducida por el daño en el tejido vegetal, por consiguiente no se genera un protección a la raíz ni la regeneración de la misma como lo menciona G. Zhang et al. (2019) frente al organismo fitopatogeno.

Para determinar el método de aplicación de los tratamientos, se realizó un análisis de los métodos de aplicación para los tratamientos. Se presentó que en algunos casos, donde se aplicó por RD, se realizaron daños a la raíz de la planta al retirase del sustrato, lo cual predisponía a la plántula a enfermarse más, debido a las lesiones causadas en la zona radicular las cuales permitían el ingreso de este fitopatogeno (Wolcan & Lori, 1991), sin embargo como se mencionó anteriormente la planta genera un respuesta sistémica que le confiere protección frente al patógeno (Camarena & De La Torre, 2007; Ramírez & Rodríguez, 2012) ; por otro lado el método de aplicación Drench permite aplicar el tratamiento de forma más eficaz, sin causar daños en la raíz de la planta y es un método más cercano a como se realizaría normalmente en el ámbito agrario. La razón para realizar el método de aplicación Root Dipping (RD) es simular los daños que al momento del trasplante se pueden causar a la raíz, sucesos que se dan en el sector agrario.

Los resultados para los cuales QNP2 presentó mayor inhibición del crecimiento fueron aquellos donde se inoculo el hongo por Root Dipping, a diferencia de aquellos donde se inóculo mediante el método Drench, esto es favorable teniendo en cuenta que en la manipulación de las plántulas al trasplantarlas, se pueden generar heridas en las raíces, lo cual hace ideal el tratamiento con las ChNPs+TPP+PEG que pueden proteger la planta de alguna infección causada por *Fusarium* sp. Haciendo referencia a los métodos usados para la aplicación del tratamiento QNP2, se compara Root Dipping y Drench, los resultados muestran que RD presenta mejor efecto al inhibir el desarrollo del hongo en la planta frente a Drench, esto probablemente se presenta por que las QNP2 están en contacto directo con la zona radicular de la planta le permite permear de forma más fácil al complejo nanoparticulado en las células vegetales invadidas por *F. solani,* esto está relacionado con el tamaño de las nanopartículas, ya que, como se mencionó anteriormente en el estudio realizado por Ing et al. (2012) las moléculas de quitosano que permean la pared deben ser menores a 5µm. Las QNP2 al interactuar con las plantas tiene probablemente el mismo efecto que el quitosano, el cual es reconocido por los receptores fúngicos en la planta (Hernández Ileana, 2004), lo que simula un ataque por el hongo, generando mecanismos de defensa de la planta relacionados con síntesis de lignina y calosa, que fortalecen la pared celular de la planta, biosíntesis de fitoalexinas y producción de proteasas como las quitinasas, peroxidasas y quitosinasas (García-Vera, 2014). Debido a la conformación de la matriz reticulada entre el quitosano y el PEG y TPP en QNP2 las quitosinasas producidas no afectan el quitosano que se encuentra recubierto por estos polímeros sintéticos y por su tamaño permanecen latentes en la célula vegetal (Ver resultados 6.3 y discusión 7.3). Es recomendable para futuros trabajos registrar la producción de proteínas asociadas a la respuesta del tratamiento con las nanopartículas.

Comparando los otros ensayos y los tratamientos se evidencio (figura 27) que todas las plántulas tratadas con el fungicida Mertect causaron la muerte prematura

de la plantas, esto se debe a la toxicidad del compuesto activo, Tiabendazol, para las plántulas de tomate chonto. Este agro insumo es usado para el control de *Fusarium* sp. en plantas de papa, sin embargo esta recomendado por Elosan et al. (2007) para su uso en tomate. A pesar de esto Sygenta S.A. (2016) advierte su uso solo en los cultivos mencionados en la ficha técnica y en las dosis mencionadas, no se tiene datos ni seguridad de que no es toxico en plantas de tomate; en algunos casos se ha mencionado (Blancard, 2011) que para el cultivo de tomate otros compuestos de la familia de los bezimidazoles son de uso cuidadoso al aplicarse en cultivos por efectos de fitotoxicidad.

En resumidas palabras las QNP2 presentan una actividad antifúngica en el modelo vegetal frente a *F. solani* inoculado por Root Dipping, utilizando un método de aplicación para estas QNP2 por Root Dipping, y en comparación con otros tratamientos como el Mertect, que puede ser toxico para la planta, o como el quitosano que puede ser degradado por quitosinasas producidas por la planta.

7.2 Identificación del daño celular del hongo *F. solani* causado por la acción de las nanopartículas de quitosano mediante técnicas de microscopia electrónica.

La MET permitió observar la ultraestructura de *F. solani* y la morfología de las ChNPs+TPP+PEG. Las nanopartículas escogidas para ser visualizadas en esta microscopia fueron las del modelo experimental 2, es decir, QNP2 ya que según los resultados del *in vitro* estas presentaron valores de PICR mayores al modelo experimental 1 (QNP1) indicando un mejor desempeño de inhibición de crecimiento

Las nanopartículas QNP2 se pudieron observar (Figura 32) con esta microscopia donde se evidenciaron aglomerados de nanopartículas en toda la muestra. Estas nanopartículas poseen un tamaño de entre 50-200 nm lo que cumple con los requerimientos propuestos en el apartado 5.1.1. Tabla 1. La morfología de estas nanopartículas se comparó con los resultados obtenidos por Kaloti & Bohidar (2010), Karimirad, Behnamian, & Dezhsetan (2019) y Omidi & Kakanejadifard (2019) quienes caracterizaron nanopartículas de quitosano con otros compuestos como TPP. La morfología de aglomerados es similar a la presentada en los estudios presentados previamente, quienes describen aglomerados de ChNPs con tamaños entre los 30 a 300nm, rangos dentro de los cuales se encontraron las nanopartículas evaluadas en este proyecto.

Las micrografías del control negativo (Figura 33) se compararon según estudios realizados por Benhamou & Be, 1998; Elsherbiny, Amin, & Baka, 2016; Maciá-Vicente, Jansson, Mendgen, & Lopez-Llorca, 2008; Pârvu, Barbu-Tudoran, Roşca-Casian, Vlase, & Tripon, 2010, donde se observaron pared y membrana celular definidas, así como núcleo, presencia de vacuolas y otros organelos en el citoplasma, los cuales no presentaron alteraciones o irregularidades morfológicas.

En el caso del control positivo (Figura 34) donde se evidencio la acción antifúngica del fungicida comercial Mertect se encontró alteración en la ultraestructura fúngica al ser comparados con el control negativo. La densidad del núcleo y citoplasma se vieron afectado esto se debe a que el componente activo del fungicida, el Tiabendazol, es un compuesto que tiene como mecanismo de acción degradar la tubulina del citoesqueleto evitando la división celular (Sygenta S.A., 2016), se observaron cambios en la pared y membrana del hongo y a nivel de citoplasma se observaron gránulos de alta densidad y un aumento en el tamaño de las vacuolas y la cantidad de vesículas lipídicas, reacción que se genera probablemente debido al estrés que le causa el tiabendazole a la célula fúngica.

En el caso de las QNP2 evaluadas, se observó (Figura 35 y Figura 36) que al entrar en contacto con la pared y membrana del hongo se genera una perturbación en la estructura celular de estas. La pared celular de los hongos del genero *Fusarium* spp. está compuesta principalmente de 2 polímeros el glucano y la quitina, se ha encontrado en algunas especies de este hongo que contiene quitosano, sin embargo, la proporción de quitina es considerablemente mayor con respecto a la del quitosano con aproximadamente un 20% de quitina y <2% de quitosano en la pared celular (Hadwiger & Beckman, 2008), por lo que se puede considerar la presencia de este polímero en las nanopartículas, no afecta en gran proporción la acción antifúngica del quitosano. No obstante, si les confiere cierta resistencia , ya que, según Cárdenas et al. (2015) la presencia de este en la pared le confiere al hongo resistencia frente a la interacción electrostática causada por el quitosano externo, razón que puede explicar que el efecto antifúngico causado por las QNP2 sea inferior al generado con el fungicida Mertect. Cabe resaltar como se ha mencionado previamente que este fungicida puede presentar fitotoxicidad en la planta al ser implementado en concentraciones no recomendadas (Blancard, 2011; Sygenta S.A., 2016)

Varios estudios han reportado el efecto antifúngico del quitosano frente a diversas cepas de *F. solani* (Cárdenas et al., 2015; Hadwiger & Beckman, 2008; Ing et al., 2012) y otras especies de *Fusarium.* Se reporta que el quitosano posee un efecto fungistático mayor cuando las partículas de quitosano tienen un tamaño de 5µm o menos, lo cual hace ideal el uso de las nanopartículas, ya que teniendo tamaños entre 100-500nm, tienden a adherirse más fácilmente a la pared celular del hongo, lo cual se puede evidenciar con las ChNPs+TPP+PEG que se usaron en esta evaluación, como se puede ver en las figuras 35 y 36, donde se evidencia que los aglomerados de QNP2 se reúnen alrededor de las células fúngicas e interactúan con la pared y la membrana celular.

Ing et al. (2012) reportaron actividad antifúngica frente a *F. solani* con ChNPs+TPP realizadas con diferentes tipos de quitosano y concentraciones; dentro de estas obtuvieron ChNPs preparadas con 1 mg/ml y 2mg/ml de quitosano con tamaños de entre 100-200nm y 150-300nm tamaños que concuerdan con las

nanopartículas que se utilizaron en el presente proyecto, donde se encontraron tamaños entre 50-200nm, sin embargo, según los resultados del estudio publicado efecto antifúngico mayor paras las ChNPs que se hicieron con 1mg/ml de quitosano de alto peso molecular, lo cual sugiere que para estudios futuros se pueda tener en cuenta el uso de quitosano de alto peso molecular.

La actividad antifúngica del quitosano y por tanto de las ChNPs está relacionado tanto por el tamaño de las nanopartículas como por el tipo de quitosano usado, puesto que, la actividad fungicida del quitosano está asociada a la cantidad cationes, lo cual explica que los grupos amino libres, que se encuentran cargados positivamente, al interaccionar con las macromoléculas del hongo cargadas negativamente expuestas en la pared afectan la permeabilidad de esta y de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones (Cárdenas et al., 2015), razón por la cual en las Figura 35 y Figura 36, se observa como la interacción entre QNP2 y la pared y membrana del hongo causa la desintegración de estas, perdiendo su estructura firme y definida, y posiblemente liberando cadenas de polímeros que conforman la pared, entre ellas la quitina y el glucano.

Aunque el efecto antifúngico de las QNP2 fue menor al generado por el fungicida Mertect se puede evidenciar que una las ventaja importante en el uso de las QNP2 es que genero un daño en la célula fúngica pero no produjo respuesta físicas al estrés causado por la descomposición de su pared y membrana, proceso que si sucedió en el control positivo (Mertect), como se mencionó anteriormente (Ver resultados 6.2 y Figura 34) , el Mertect causo la generación de vacuolas de gran tamaño y una gran numero de vesículas lipídicas. Esto resultados presentados por las QNP2 se deben probablemente a que la composición de la nanopartícula por incluir TPP y PEG, estos forman una matriz reticular que protege al quitosano evitando que el hongo detecte la presencia de este y pueda generar alguna reacción de estrés como la ocurrida con el Tiabendazol. No obstante, para aumentar la actividad antifúngica de las QNP2 utilizadas en este estudio se sugiere que en trabajos futuros se buscar la implementación de estas ChNPs+TPP+PEG en conjunto con compuestos naturales fungicidas como extractos naturales, tal y como lo demuestran A. T. Rodríguez, Morales, & Ramírez (2000) al utilizar extractos hidroalcohólicos de aroma amarilla (*Acacia farnesiana*), escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*) y salvia cimarrona (*Pluchea carlinensis*) para el control de *Fusarium oxysporum.*

7.3. Caracterización de la interacción de las nanopartículas de quitosano con el tejido radicular de las plantas de tomate empleando microscopía electrónica.

En el apartado 6.3. se pueden observar los resultados obtenidos a partir del MET realizado a las muestras de raíz de tomate chonto expuesto a los diferentes tratamiento escogidos (Ver apartado 5.3.3.), donde se observó la estructura celular

de la célula hospedera (Raíz de tomate choto *Solanum lycopersicum)* tanto sana como infectada por *F. solani.*

La figura 38 (1 – 3), permitió evidenciar las características de la célula hospedera sin el hongo; donde se distinguió la pared celular de ésta sin ninguna alteración morfológica, en contraste las imágenes 4 a 6.1 de la misma figura, se observa como *F. solani* coloniza la célula de la raíz de la planta presentado hifas del hongo dentro del citoplasma de la célula vegetal y afecta la densidad de la pared de la célula hospedera, tal como se describe en estudios publicados previamente en los cuales se muestra la invasión de *Fusarium* sp. en las células de tomate (Benhamou & Be, 1998), donde las celular fúngicas están restringidas a la epidermis de la planta donde se multiplican, y las paredes de las células hospederas poseen una densidad mayor al estar infectadas con el hongo al contrario de las células sanas de la planta. Al comparar estos controles con la muestra donde se encuentran las QNP2 se evidencia, como se mencionó en el apartado de resultados (6.3.), aglomerados de nanopartículas similares a las observadas en la micrografía *In vitro.*

Las imágenes del MET realizado a la muestra con QNP2 permitieron observar que dichas nanopartículas se absorben fácilmente en la raíz de la planta, ya que, como se evidencia en las figuras 39 y 40 se absorben encuentran en el citoplasma de las células hospederas y no se ve afectada la pared celular a causa de estas. Se ha reportado (Lal, Xiang, & Heiden, 2015) que el quitosano se absorbe fácilmente en tamaños menores a los 5 µm en las superficies de las plantas como las hojas, raíces y tallo, las nanopartículas basadas en este polímero permean fácilmente la célula hospedera, razón por la cual en nuestros resultados se identifican dichas nanopartículas dentro de la célula como se explicó previamente. Otros estudios reportan que las ChNPs facilitan la captación de compuestos que posteriormente son liberados lentamente dentro de la célula vegetal (Lal et al., 2015), lo cual sugiere que las ChNPs pueden ser utilizadas como transportadores de sustancias antifúngicas.

Los cambios presentados en la morfología de la célula de la plántula (Figura 39) son consistentes con los que se observan en el control negativo (Figura 38 4 a 6.1.), es decir, que la pérdida de turgencia en las células vegetales y las afectación presentada su membrana y en el citoplasma son causados por la invasión de *F. solani.* Este microorganismo es común que invada células de plantas de tomate que son resistentes a cepas de *Fusarium oxysporum* (Montealegre et al., 2003), en esta caso las plántulas utilizadas en este estudio presentan esta característica (Ver Anexo 12)

Las nanopartículas QNP2 evidenciaron actividad antifúngica en las plántulas de tomate infectadas previamente con el hongo, este resultados se evidencia cuando se observa que la colonización del hongo en las células de la planta de tomate fue menor en comparación al control negativo. La figura 39 permite evidenciar como

se afectan las células de *F. solani*, muchas de estas presentan, no solo daños a nivel de la pared y membrana, si no también alteración morfológica, así mismo se afecta el citoplasma pues se observan gránulos de alta densidad en el interior del mismo, resultados similares se presentaron en el ensayo *in vitro*. Estos cúmulos o gránulos almacenados son el resultado de la condensación del citoesqueleto por pérdida o degradación de la tubulina (Sygenta S.A., 2016)después de haber sido afectado por las nanopartículas durante el periodo de evaluación (45 días).

La interacción presentada con las QNP2 y la raíz de la planta es evidente al observarse la inclusión de éstas en las células del tejido radicular, ésta interacción pudo establecerse posiblemente por la presencia del hongo que ha colonizado la célula de la planta, al ser aplicada QNP2 en la planta se generan las respuestas metabólicas mencionadas anteriormente, donde se produce la biosíntesis de lignina y celulosa lo cual fortalece la estructura de la pared celular vegetal y evita que al devolver las plantas al sustrato infestado con *F. solani* continúe la invasión de este hongo en la planta (García-Vera, 2014; Hernández Ileana, 2004). Como se mencionó en el numeral anterior el quitosano tienen su propiedad fungistática relacionada con el número de grupos aminos disponibles para interactuar con la pared del hongo y que al hacerlo este induce cambios morfológicos en la pared celular del hongo, causando reducción del tamaño de las células fúngicas (Hernández Ileana, 2004) lo que se pudo evidenciar en la figura 39.

Es necesario en próximas caracterizaciones el montaje las muestras de las ChNPs+TPP+PEG en tejido radicular sin haberse inoculado con el hongo fitopatogeno, con el fin de compararla con una muestra con la raíz infectada para identificar si las ChNPs+TPP+PEG se absorben rápidamente al no estar condicionado por la presencia del hongo; así mimo se aconseja tomar muestras durante varios días con el fin de evidenciar si hay cambios en la cantidad de colonización del hongo y mayor o menor presencia de ChNPs+TPP+PEG con el tiempo, ya que se evidencio que después de 45 días de evaluación las ChNPs+TPP+PEG se mantienen latentes en el citoplasma de la célula vegetal sin alterar su conformación y continúan interactuando con *F. solani*

7.4. Consolidación de la metodología evaluada para la actividad antifúngica de QNP2 frente al modelo *in vivo* e *in vitro*

Resumiendo lo analizado en esta sección se puede concluir que las ChNPs+TPP+PEG usadas en esta evaluación poseen un efecto antifúngico sobre *Fusarium solani,* como se evidencia en el protocolo de evaluación y en las MET realizadas tanto *in vitro* como *in vivo.*

Según estudios publicados en la literatura, la acción de ChNPs depende de varios factores como tamaño y conformación. Las nanopartículas QNP2 evaluadas en este trabajo presentaron un tamaño de entre 50-200nm, medidas similares a las

reportadas por Ing et al. (2012). Las QNP2 también presentaron efecto antifúngico sobre *F. Solani* según los resultados obtenidos en este trabajo, estos resultados son comprables con los resultados publicados por Ing *et al*. (2012); dichos estudios reportan que el tamaño esta mediado por la cantidad de PEG usado (N. Rodríguez et al., 2010), lo cual permite inferirle al PEG una importancia en el tamaño. Según los resultados de la figura 39 se evidencia que las QNP2 al ser aplicada en la zona radicular de la planta por Root Dipping, pueden permear la pared celular vegetal y establecerse en el citoplasma, estos resultados son soportados por el estudios realizado por Hadwiger & Beckman (2008) quienes indican que partículas de quitosano inferiores a 5µm tiene alta capacidad de permear la pared y membrana celular.

La figura 41 permite evidenciar la interacción entre la nanopartícula QNP2 a la con pared y membrana del hongo tanto en cultivo *in vitro* (Figura 41.2.) como la interacción con el hongo dentro de la célula vegetal (Figura 41.1.). N. Rodríguez et al (2010) reporta que la conformación de la matriz reticulada entre el PEG, TPP y el quitosano en nanopartículas le confiere estabilidad a este complejo nanoparticulado frente a metabolitos secundarios, como por ejemplo aquellos que son producidos por la planta como las quitosinasas frente a la presencia del quitosano de las nanopartículas y del hongo (Durrant & Dong, 2004; Howe, 2004; Ramírez & Rodríguez, 2012), lo que permite inferir que el quitosano al encontrarse en un material nanoparticulado con PEG y TPP puede llegar a presentar más estabilidad frente a la interacción con la estructura celular, es decir, menor capacidad de degradación.

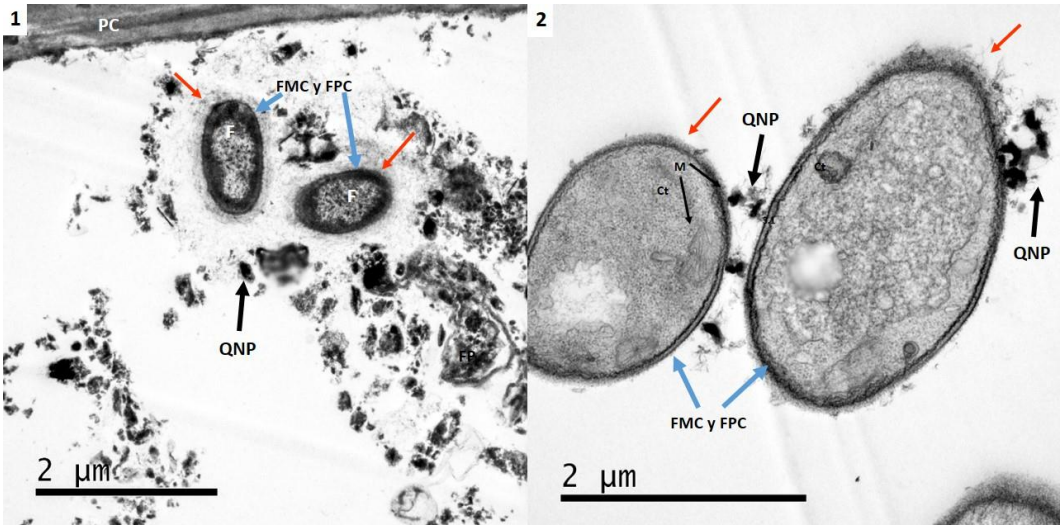

Figura 41. Comparación de los resultados del MET para el ensayo in vivo (1) e in vitro (2). Las flechas rojas señalan daño en la pared y membrana celular del hongo F. solani. 1. MET in vivo donde se observan células de tamaño reducido de F. solani y aglomerados de QNP2 en el citoplasma de la célula hospedera. 2. MET in vitro donde se evidencian cortes trasversales de hifas de F. solani y QNP2 interactuando con la pared y membrana de las células fúngicas. .F: F. solani FPC: Pared celular de F. solani FMC: membrana celular de F. solani QNP: QNP2

La acción antifúngica en los modelos *In vitro* e *In vivo* se puede evidenciar en la figura 41, donde las QNP2 se aglomeraron cerca o alrededor de las células del hongo, generando daños en la pared y membrana, con pérdida de consistencia de estas estructuras celulares, como se observa en dicha figura esta interacción se presenta posiblemente debido a la interacción entre los grupo amino positivos del quitosano y las macromoléculas cargadas negativamente en pared y membrana (Cárdenas et al., 2015), estos resultados permiten decir que es comparable la acción antifúngica de las QNP2 tanto en el modelo *in vitro* como en el *in vivo*, al observarse el cambio morfológico de la pared y membrana del hongo en los 2 modelos.

Con base en todos los resultados obtenidos a partir del riguroso diseño experimental realizado en este trabajo de grado, se puede indicar que la metodología propuesta como producto final (Apartado 6.4 y Anexo 13) funciona de manera exitosa bajo los requerimientos establecidos en el protocolo, esto indica que se cumplió el objetivo general de este proyecto, sin embargo, se recomienda realizar estudios posteriores que complementen los resultados obtenidos en este trabajo a nivel de la caracterización físico-química de las nanopartículas.

8. CONCLUSIONES

El protocolo *in vitro* de evaluación aplicado en este trabajo permitió identificar la acción de las nanopartículas del modelo experimental 1 (QNP1) y el modelo experimental 2 (QNP2) sobre el hongo fitopatógeno como *Fusarium solani*, utilizando inóculos de diferentes procedencia (estructuras vegetativas como hifas y estructuras reproductivas como conidios).

Es importante implementar siempre pruebas previas que permitan seleccionar las nanopartículas de quitosano con tripolifosfato y polietilenglicol que puedan ser evaluadas por los 3 métodos y durante el tiempo total de la evaluación.

Se determinó que las nanopartículas de ambos modelos experimentales propuestos (QNP1 y QNP2) tienen un efecto antifúngico similar al tratamiento con una solución de quitosano al 2,0mg/ml (QC2), sin embargo, el uso de las nanopartículas en el modelo *In vivo* tiene la ventaja permear la pared celular sin degradarse por la presencia de quitosinasas y establecerse en el citoplasma de la célula hospedera para generar un mayor efecto a nivel intracelular.

El ácido acético demostró tener un efecto antifúngico que influye en la preparación de las nanopartículas de quitosano con tripolifosfato y polietilenglicol, sin embargo, este efecto disminuyó con el tiempo de evaluación y se mantuvo la acción antifúngica de las nanopartículas.

El fungicida comercial Mertect como se esperaba presentó resultados de alta actividad antifúngica en el ensayo *in vitro*, sin embargo, teniendo en cuenta que en el ensayo *in vivo* influyen diferentes factores como las variables ambientales y la afectación causada por *F. solani*, se debe realizar un diagnóstico de la presencia del patógeno para conocer las causas de la muerte de las plantas y asegurar que esta podría ser causada por la fitotoxicidad del compuesto.

La sección *in vivo* del protocolo (Anexo 13) generado en este trabajo de grado, puede ser aplicado posiblemente a otros hongos fitopatógenos que afecten el cultivo de tomate, por lo cual se recomienda ser implementado.

En consistencia con los resultados presentados se generó un protocolo de evaluación para las nanopartículas del modelo experimental 2 QNP2 (Anexo 13) donde se utiliza como método de evaluación *in vitro* el método de dilución en agar y en el ensayo *in vivo* un método de inoculación con herida y sin herida por Root Dipping y la aplicación de las nanopartículas (QNP2) por Root Dipping.

Las nanopartículas del modelo experimental 2 (QNP2) generan probablemente una respuesta sistémica en la planta, confiriéndole a esta resistencia frente al hongo mediante la inducción de producción de fitoalexinas, síntesis de lignina,

celulosa y calosa y proteasas que atacan al hongo(Durrant & Dong, 2004; García-Vera, 2014; Ramírez & Rodríguez, 2012; Camarena & De La Torre, 2007).

La identificación del daño estructural que causan las nanopartículas QNP2 al hongo *F. solani* permitió evidenciar como se afectan 2 estructuras importantes en la morfología del hongo: membrana y pared celular, las cuales se descomponen en presencia de estas nanopartículas por la acción de los grupos amino positivos del quitosano (Cárdenas et al., 2015), resultado que se puede evidenciar en la caracterización *in vitro e in vivo.*

La interacción de las nanopartículas QNP2 con el modelo vegetal se evidencia al observar que estas nanopartículas son absorbidas por la raíz de la plántula de tomate chonto y se incluyen el citoplasma de la célula vegetal, allí estas nanopartículas interactúan directamente con la célula fúngica causando daños en pared y membrana, cambios morfológicos alteración del contenido citoplasmático incluso después de varios días de aplicación.

Finalmente se concluye que las nanopartículas del modelo experimental QNP2 tienen una acción antifúngica que le permite actuar sobre las estructuras primarias de protección del hongo (pared y membrana) generando desestabilización de estas estructuras. Estas nanopartículas se aglomeran alrededor del hongo y permean fácilmente la célula vegetal permitiéndole actuar sobre los microgramos invasores.

Estas nanopartículas del modelo QNP2 se proponen como un método alterno de controlador biológico, a futuro con la inclusión de extractos antifúngicos naturales dentro de estos compuestos nanoparticulados, enfocado en el mercado de bioplaguidas.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda para posteriores trabajos donde se realice la evaluación *in vitro* e *in vivo* trabajar con nanopartículas de ChNPs+TPP+PEG que contengan concentraciones de quitosano usadas para la preparación en un rango de 0.5-1 mg/ml según lo recomendado por bibliografía (El-mohamedy & Abdel-kareem, 2014; Ing et al., 2012). Así mismo se propone el uso de quitosano de alto peso molecular, ya que se ha reportado (Ing et al., 2012) que tiene mejor efecto frente a la inhibición del crecimiento en *F. solani..*

Otra de las recomendaciones es incluir en el protocolo de evaluación los controles de los reactivos PEG y TPP, con el fin de evidenciar los efectos que éstos tienen sobre el hongo (Inductor o inhibidor de crecimiento).

Igualmente se propone que en futuros trabajos se cuantifique la concentración de las ChNPs+TPP+PEG en la suspensión, para trabajar con una concentración conocida; así mimo cuantificar la cantidad de componentes, como quitina y quitosano, de la pared fúngica ya que estos varían entre la especie de Fusarium y hasta la cepa de F. solani debido a que se demostró (Hadwiger & Beckman, 2008) que el efecto fungistático varía según el F. solani utilizado.

En trabajos futuros se pueden utilizar estas ChNPs+TPP+PEG como un medio de transporte de diferentes compuestos que mejoren el efecto antifúngico de las nanopartículas y para ello el uso de compuestos naturales como los terpenos o extractos naturales que le confiriesen un efecto antifúngico de mayor evidenciado en este trabajo. Se recomienda que el compuesto que se utilice sea de origen natural con el fin de mantener este sistema nanoparticulado en el campo de los biopesticidas, y por tanto como una técnica de control biológico.

Realizar un ensayo donde se registrar la producción de proteínas asociadas a la respuesta del tratamiento con las nanopartículas y el hongo en el modelo *in vivo*.

Realizar un control para las plántulas sanas para el protocolo de la evaluación *in vivo* y tomar muestras de raíz para calcular el porcentaje de colonización. Al final de la evaluación *in vivo* sería ideal tener en cuenta la viabilidad del hongo después de ser expuesto a los diferentes tratamientos.

En el caso del MET realizado, para para identificar el daño celular directo a *F. solani,* se recomienda montar muestras en la parte *in vitro e in vivo d*el control positivo de quitosano, para conocer como este genera estrés físico en la célula fúngica y compáralo con los efecto que tienen las ChNPs+TPP+PEG a nivel celular.

Así mismo, en la parte *in vivo* tomar muestras para observar en MET a través del tiempo que dure la evaluación para evidenciar los cambios de la célula hospedera (raíz de tomate chonto) con respecto a la inoculación con el hongo fitopatogeno, y con la aplicación de las ChNPs+TPP+PEG. Igualmente tener una muestra donde se apliquen las nanopartículas en la zona radicular sin haber inoculado la planta con el hongo, con el fin de conocer si la absorción de las ChNPs+TPP+PEG está determinada o no por la presencia del este en la célula vegetal.

10. BIBLIOGRAFIA

Adriana, L., & Jairo, O. (2011). Caracterización del agente causante de la pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* Linneo), enfermedad endémica en el municipio de Manizales-, 19(2), 33–43.

Álvarez Hernández, J. C. (2012). Comportamiento agronómico e incidencia de enfermedades en injertos de jitomate en jitomate nativo de México. Acta Agronómica, 61(2), 117-125. Obtenido de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/2

American Type Culture Collection. (2018). *Fusarium keratoplasticum* ATCC 36031.

Arbeláez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del genero Fusarium y de la especie Fusarium oxysporum. Agronomía Colombiana. Universidad Nacional de Colombia, 17, 11-22.

Balvantín García, C. (2009). Biotecnología en el control de microorganismos fitopatógenos. CIENCIACIERTA, Vol 5 (19).

Barrientos, C. (2009). Reconocimiento y manejo de las plagas y enfermedades de mayor importancia económica en los cítricos de la hacienda La Cristalina en el municipio de Támesis (Tesis de Pregrado) Caldas: Corporación Universitaria Lasallista.

Bautista, S., Ventura, R. I., Correa, Z., & Corona, M. L. (2017). Chitosan: A versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. Revista Chapingo Serie Horticultura, 23(2), 103-121. doi:doi: http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030

Benhamou, N., & Be, R. R. (1998). Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f . sp . Radicis-lycopercisi in Tomato 1, 1203–1212.

Blancard, D. (2011). ENFERMEDADES DEL TOMATE. Mundi-Prensa. Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=-a0SAQAAQBAJ

Burbano, E., & Vallejo, C. (2017). Producción de líneas de tomate “chonto”, *Solanum lycopersicum* Mill., con expresión del gen sp responsable del crecimiento determinado. Revista colombiana de ciencias hortícolas, 11(1), 63-71.

Cámara de Comercio de Bogotá. (2015). Generalidades del cultivo de tomate. En Manual tomate (págs. 10-14). Bogotá: Programa de apoyo agrícola y agroindustrial vicepresidencia de fortalecimiento empresariaL.

Camarena G. y de la Torre R. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. Revista Chapingo. 2007. 13: 157-162

Cárdenas, A., Colina, M., Harvey., J, M., J, V., D, R., L, R. (2015). Evaluación del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella Fijiensis* Morelet que produce la Sigatoka negra que ataca el plátano... Revista Iberoamericana de Polímeros, 15(6), 312 - 338.

Carrillo, J. A., & García, R. S. (2012). Manejo de las principales enfermedades del tomate. (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad

Culiacán) Obtenido de HortiCultivos: https://www.horticultivos.com/cultivos/tomate/manejo-de-las-principales-enfermedades-del-tomate/

Córdova Zapata, M. I. (2003). Interacción de *Trichoderma harzianum* y micorriza (vam) en plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* en condiciones controladas en casa malla. En M. I. Córdova Zapata, Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por Trichozam® (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate (pág. 7). Zamorano, Honduras.

Cotes, A. M. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en Colombia. En W. Bettiol, M. Rivera, P. Mondino, J. Montealegre, & Y. Colmenares, Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe (págs. 169-172). Bogotá: Corpoica.

DANE. (2014). Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Bogotá: Dirección de Difusión, Mercadeo y Cultura Estadística del Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Obtenido de https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_nov_2014.pdf

DANE. (2014). Producción limpia de hortalizas, una mejor salud y bienestar. Bogotá: Dirección de Difusión, Mercadeo y Cultura Estadística del Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Obtenido de Dirección de Difusión, Mercadeo y Cultura Estadística del Departamento Administrativo Nacional de Estadística: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_feb_2014.pdf

De Silva, U. (2016). Have not got enough space in your own garden? Recuperado el 22 de 07 de 2018, de Nerdynaut: https://www.nerdynaut.com/research/biology/have-not-got-enough-space-in-your-own-garden

Desender S., et al. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity?. Cellular Microbiology. 2007. 9(1), 21–30

Doan, H., Miyao, G., & Davi, M. (2018). Fusarium Diseases of Tomato. Retrieved from http://ccvegcrops.ucanr.edu/files/255179.pdf

Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. Annual Review of Phytopathology, 42(1), 185–209. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421

El-mohamedy, R., Abdel-Kareem, F., Jaboun-Khiareddine, H., & Daami-Remadi, M. (2014). Chitosan and *Trichoderma harzianum* as Fungicide Alternatives for Controlling *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato. Tunisian Journal of Plant Protection, 9(1), 31-43.

Elosan, W. G., Benomil, S. C. T. S. C., Bezil, W. P., Dc, W. P. B., Derosal, S. C., Equation, S. C.,… Antracnosis, S. (2007). Tabla 16. Listado de plaguicidas usados para el control de enfermedades en tomate. Retrieved from http://www.fao.org/docrep/pdf/010/a1374s/a1374s06.pdf

Elsherbiny, E. A., Amin, B. H., & Baka, Z. A. (2016). Efficiency of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels extract as a high potential natural tool towards *Fusarium* dry rot on potato tubers. Postharvest Biology and Technology, 111(January), 256–263. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.019

FAO. (2001). Los efecto económicos de las plagas y enfermedades transfronterizas de los animales y plantas. Obtenido de EL ESTADO: http://www.fao.org/docrep/003/x9800s/x9800s14.htm

FAO. (2005). La importancia de la agricultura en la actualidad. Obtenido de Agricultura y diálogo de culturas nuestro patrimonio común: http://www.fao.org/docrep/008/a0015s/a0015s04.htm

FAO. (2018). Colombia en una mirada. Obtenido de FAO en Colombia: http://www.fao.org/colombia/fao-en-colombia/colombia-en-una-mirada/es/

FAO. (2018). Plagas y enfermedades en las plantas. Obtenido de La FAO en situaciones de emergencias: http://www.fao.org/emergencies/tipos-de-peligros-y-de-emergencias/plagas-y-enfermedades-de-las-plantas/es/

Garcés de Granada, E., Orozco, M., Bautista, G., & Valencia, H. (2001). Fusarium oxysporum el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana. Universidad Nacional de Colombia., 6(1), 7-25.

García-Vera, A. G. (2014). Mecanismos de defensa inducidos por la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosano en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) contra *Phytophthora drechsleri*. Tesis.

Gong, A. D., Li, H. P., Yuan, Q. S., Song, X. S., Yao, W., He, W. J., … Liao, Y. C. (2015). Antagonistic mechanism of iturin a and plipastatin a from Bacillus amyloliquefaciens S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. PLoS ONE, 10(2), 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116871

González, P. (17 de 04 de 2006). Marchitamiento vascular del tomate. (F. d. Fitopatología, Editor) Obtenido de Enfermedades del tomate: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html

Granados, M., Guzman, V., & Sanchez, F. (2018). Desarrollo de un dispositivo para la automatizacion de la síntesis de nanopartículas de quitosano con matriz polimérica de TPP + PEG. Tesis de pregrado. Bogotá: Universidad el Bosque.

Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. Biological Control, 9, 40-48.

Guerrero, B., & Guerra, R. R. (2010). Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México, (June 2014).

Hadwiger, L. A., & Beckman, J. M. (2008). Chitosan as a Component of Pea-*Fusarium solani* Interactions. Plant Physiology, 66(2), 205–211. https://doi.org/10.1104/pp.66.2.205

Hernández Ileana. (2004). Revisión bibliográfica la quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones. Cultivos Tropicales, 25(3), 97–110.

Hernández, A. N., Hernández, M., & Velázquez, M. G. (2007). Actividad Antifúngica del Quitosano en el Control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Mucor* spp. Revista Mexicana de Fitopatología, 25(2), 109-113.

Herrera Cid, R. A. (2017). Estudio etiológico de *Fusarium oxysporum* en tomate en la zona central de chile.

Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. Journal of biological science, 273-290.

Howe, G. A. (2004). Jasmonates as signals in the wound response. Journal of Plant Growth Regulation, 23(3), 223–237. https://doi.org/10.1007/s00344-004-0030-6

ICA. (2015). Plagas reglamentadas. Obtenido de Instituto colombiano agropecuario – ICA. Epidemologia Agricola: https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-Agricola/Plagas-Reglamentadas.aspx

Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. International Journal of Biomaterials, 2012, 1–9. https://doi.org/10.1155/2012/632698

Izquierdo, A., Melhem, M., Bonfietti, L., & Rodriguez, J. (2015). Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 59(19), 57-64.

Jones J.D.G y Dangl J.L. The Plant Immune system. Nature. 2006; 444: 323-329

Juárez Becerra, G. P., Sosa, M. E., & López, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Temas selectos de ingeniería de alimentos, 4(2), 14-23.

Juniors, E., Torres, P., Cabrera, A. B., Virelles, P. M., Mora, L., Reyes, Y. S., & Santana, R. C. (2017). Actividad antagónica de Trichoderma harzianum Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.) Antagonistic activity Trichoderma harzianum Rifai on the causal agent of, 44(3), 13–19.

Kaloti, M., & Bohidar, H. B. (2010). Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan-sodium tripolyphosphate solutions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 81(1), 165–173. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.006

Karimirad, R., Behnamian, M., & Dezhsetan, S. (2019). Application of chitosan nanoparticles containing Cuminum cyminum oil as a delivery system for shelf life extension of *Agaricus bisporus*. Lwt, 106(February), 218–228. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.062

Kashyapa, P. L., Xiang, X., & Heidenb, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. International Journal of Biological Macromolecules, 77, 36-51.

Lal, P., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. International Journal of Biological Macromolecules, 77, 36–51. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039

Larez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamerica. Revista UDO Agrícola, 8(1), 1-22.

López Benítez, A., Hernández Martínez, R., Álvarez Ojeda, G., Méndez Aguilar, R., & Mendoza, O. (2016). Respuesta a la inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Fol) (Sacc.) Snyder y Hansen en tomate. Memoria de la XXVIII Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED, 786-792.

Luginbuhl, S. (2010). *Fusarium_solani*. Retrieved from https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Fusarium Solani/Fusarium_solani.htm

Lugo, E., García, C., & Ruelas, R. D. (2010). Nanotecnología y nanoencapsulación de plaguicidas. (U. A. México, Ed.) Ra Ximhai. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable, 6(1), 63-67.

Maciá-Vicente, J. G., Jansson, H.-B., Mendgen, K., & Lopez-Llorca, L. V. (2008). Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. tritici . Canadian Journal of Microbiology, 54(8), 600–609. https://doi.org/10.1139/w08-047

Marlatt, M. L., Correll, J. C., Kaufmann, P., & Cooper, P. E. (1996). Two Genetically Distinct Populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 in the United States. Plant Disease, 8(12), 1336-1342.

Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutiérrez, E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Revista Tecnocientífica URU, 53-58.

Martinez, A. (2011). Hematología y citología sanguínea en reptiles. A.V.E.P.A., 31(3), 131–141. Retrieved from https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Esquema-de-la-camara-de-Neubauer-modificada-En-rojo-estan-resaltados-los_fig1_260435451

Minitab . (2017).Qué es ANOVA? Obtenido de Minitab 18: https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-anova/

Mondino, P. (2003). Control biológico de enfermedades en plantas. Uruguay: Unidad de Fitopatología. (U. d. Fitopatología, Ed.) Obtenido de Facultad de agronomía de la Universidad de la Republica: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/Control%20Biologico%20enfermedades%20de%20plantas%20libro%20.pdf

Montealegre, J., Donoso, S., Herrera, R., & Besoain, X. (2003). Identificacion de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Como agente causal de la Podredumbre del pie de Tomate. Boletín Micológico, 18(Tabla 1), 53–55. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/318693237_IDENTIFICACION_DE_Fusarium_solani_Mart_Sacc_COMO_AGENTE_CAUSAL_DE_LA_PODREDUMBRE_DEL_PIE_DE_TOMATE

Nicholls Estrada, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.

O'Farrill-Nieves, H. (2004). Técnicas para aplicar los plaguicidas. En Aplique los plaguicidas correctamente: manual para agricultores (págs. 15-16). Servicio de Extensión Agrícola, Colegio de Ciencias Agrícolas.

Omidi, S., & Kakanejadifard, A. (2019). Modification of chitosan and chitosan nanoparticle by long chain pyridinium compounds: Synthesis, characterization, antibacterial, and antioxidant activities. Carbohydrate Polymers, 208(December 2018), 477–485. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.097

Pardo, J. (2017). Protocolo preliminar para la sintesis de nanopartículas de quitosano con matriz polimérica de tripolifosfato y polietilenglicol, con aplicación antifúngica (Tesis de pregrado). Bogotá: Universidad El Bosque.

Pârvu, M., Barbu-Tudoran, L., Roşca-Casian, O., Vlase, L., & Tripon, S. (2010). Ultrastructural changes in *Fusarium oxysporum* f. sp. tulipae hyphae treated in vitro with allium fistulosum plant extract. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 15(2), 65–72.

PBS and ABSP II. (2004). What is Agricultural Biotechnology? Obtenido de U.S. Agency for International Development, Agricultural Biotechnology Support Project II, and the Program for Biosafety Systems: http://absp2.cornell.edu/resources/briefs/documents/warp_briefs_eng_scr.pdf

Peña, A., Sánchez, N. S., & Calahorra, M. (2013). Effects of Chitosan on Candida albicans: Conditions for Its Antifungal Activity. BioMed Research International, 1-15. doi:https://doi.org/10.1155/2013/527549.

Perfetti, J. J., Balcázar, Á., Hernández, A., & Leibovich, J. (2013). Oportunidades de desarrollo de la agricultura colombiana. En Políticas para el desarrollo de la Agricultura en Colombia (págs. 28-30). Bogotá: Fedesarrollo, Sociedad de Agricultores de Colombia (SAC), Incoder, Finagro, Banco Agrario.

Pieterse, C. M., & van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends in plant science, 4 (2), 52-58

Prats, G. (2006). Micología. Sensibilidad a los antifúngicos. En G. Prats, Microbiología Clínica (págs. 99-105). Bogotá: Editorial Panamericana.

Rad UV, Mueller MJ, Durner J. (2005) Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. New Phytol;165:191–202

Ramírez, M., & Rodríguez, A. (2012). Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. Revista Colombiana de Biotecnología, 14(1), 271–284.

Reyes Jurado, F., Palou, E., & Lopez Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 8(1), 68-78.

Robles Yerena, L., Leyva, S., & Cruz, A. (2016). *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero. Revista Mexicana de Ciencias Forestales, 7(36). Retrieved from https://www.redalyc.org/jatsRepo/634/63449186003/index.html

Rodríguez, A. T., Morales, D., & Ramírez, M. A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *In Vitro* de hongos fitopatógenos, 21, 79–82.

Rodríguez, N., Valderrama, A., Alarcón, H., & López, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. Revista de la Sociedad Química del Perú, 76(4), 336-354.

Rodríguez, N., Valderrama, A., Alarcón, H., & López, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. Rev Soc Quím Perú, 76(4), 336–354. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2010000400005&script=sci_arttext

Rozo Rodríguez, J. C., & Rodríguez Bocanegra, M. X. (2012). Evaluación de acibenzolar-s-metil como inductor de la producción de fitoalexinas frente a *Fusarium oxysporum*, agente causal del marchitamiento vascular en uchuva. [Recurso electrónico]. Bogotá. Retrieved from http://ezproxy.javeriana.edu.co:2048/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat01040a&AN=pujbc.880647&lang=es&site=eds-live

Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S., & Pal, A. (2013). Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. International Journal of Biological Macromolecules, 62, 677-683.

Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Kumari Choudhary, M., Sharma, S., Pal, A., . . . Biswas, P. (2015). Synthesis and *in vitro* antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. International Journal of Biological Macromolecules, 75, 346-353.

Sathiyabama, M., & Parthasarathy, R. (2016). Biological preparation of chitosan nanoparticles and its *in vitro* antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. Carbohydrate Polymers, 151, 321-325

SEPSA. (2012). Bioplaguicidas. Obtenido de InfoAgro. Costa Rica: http://www.infoagro.go.cr/Infoagro/HojasDivulgativas/Bioplaguicidas.pdf

Serrano Carreón, L., & Galindo Fentanes, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. Instituto de biotecnología de la UNAM, 77-88.

Stéphane Declerck, D. G. (2005). Root Dipping. En D. G. Stéphane Declerck, In Vitro Culture of Mycorrhizas (pág. 322). Alemania: Springer Science & Business Media.

Sygenta S.A. (2016). Mertect ® 500 sc •.

Tortora, G., Funke, B., & Christine, C. (2007). Observación de los microorganismos a través del microscopio. En Introducción a la microbiología (pág. 66). Editorial Panamericana.

U.S. Department of Health and Human Services. (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.

Universidad de Málaga. (2004). Tema 14. Microscopía electrónica. Obtenido de Ampliación de Química Inorgánica. Parte II: Técnicas estructurales, 5º curso: http://webdeptos.uma.es/qicm/doc_docencia/tema14_me.pdf

Universidad Nacional de Rosario. (2013). Pruebas de sensibilidad a antifúngicos. Obtenido de Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/Pruebas_de_sensibilidad_a_los_antimicrobianos.pdf

Vásquez, L. M., & Castaño, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 20(2), 363-374.

Villa–Martínez, A., Pérez–Leal1, R., Morales–Morales, H. A., Basurto–Sotelo, M., Soto–Parra, J. M., & Martínez–Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Acta Agronómica, 64(2), 194–205. Retrieved from https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358

Wolcan, S. M., & Lori, G. (1991). Podredumbre del pie del tomate causada por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Revista Fac. Agronomica, 12(1), 47–51. Retrieved from https://docplayer.es/74961458-Podredumbre-del-p-i-e-del-tomate-causada-por-fusarium-solani-mart-sacc-1.html

Yerena, R., Mir, L., Gerardo, S., & Gómez, C. (2016). Precisión de los coeficientes y cocientes de forma en la estimación del volumen de *Pinus montezumae* Lamb . Accuracy of form coefficients and quotients in estimating the volume of Pinus montezumae Lamb .

Yuri. (23 de 06 de 2012). *Fusarium oxysporum*. Obtenido de Fun With Microbiology (What's Buggin' You?): http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com.co/2012/06/fusarium-oxysporum.html

Zhang, G., Zhao, F., Chen, L., Pan, Y., Sun, L., Bao, N., … Xu, L. (2019). Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. Nature Plants. https://doi.org/10.1038/s41477-019-0408-x

Zhang, W., Mou, Z., Wang, Y., Chen, Y., Yang, E., Guo, F., … Wang, W. (2019). Molybdenum disulfide nanosheets loaded with chitosan and silver nanoparticles effective antifungal activities: in vitro and in vivo. Materials Science and Engineering C, 97(August 2017), 486–497. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.052

Zhang, Y. P., Qu, S. P., Yang, X. M., Xu, F., Zhang, L. F., Wang, J. H., & He, Y. Q. (2018). Compare to ultrastructure of Root of resistant and susceptible oriental lily clones by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 104(October 2017), 103–107. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.07.002

Zhao J.T. Davis L.C. y Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. 2005. Biotechnology Advances 23: 283–333