

## Aplicación de nanopartículas de quitosano (NP-QN) en el cultivo de tomate y su efecto en la actividad enzimática

Application of chitosan nanoparticles (NP-QN) in tomato crop and its effect in enzymatic activity.

Eva Michelle Hernández-Guzmán<sup>1</sup>, Juan Salvador Campa-Rivera<sup>1</sup>, Jesús Rubén Rodríguez-Núñez<sup>1</sup>, Laura Mejía-Teniente<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, Av. Mutualismo Esq. Prolongación Río Lerma S/N, Celaya, Gto. C.P. 38060. México

\*laura.mejia@ugto.mx

### Resumen

Las plantas frecuentemente están sometidas a condiciones de estrés biótico o abiótico. El estrés desencadena una serie de respuestas en la planta, en este sentido, las enzimas son conocidas por ser participes en las respuestas de protección ante daño oxidativo, regulación hormonal y modificación de la expresión génica de los sistemas de defensa. La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante la cual juega un rol indispensable en la capacidad de protección antioxidativa, y la fenilalanina amonio liasa (PAL) es una enzima que participa activamente en la respuesta contra estrés biótico. No obstante, este tipo de respuestas también pueden ser inducidas por la aplicación de elicitores, con la finalidad de inducir el sistema de defensa de la planta. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto bioquímico de actividades enzimáticas (CAT y PAL) y contenido de clorofila, que tiene la aplicación de elicitores de nanopartículas de quitosano (NP-QN) y NP-QN cargadas con ADN viral fragmentado en el cultivo de tomate. Se evaluaron un total de seis tratamientos (T1-T6) y un control (T0). Del T1-T3 se evaluaron concentraciones de 0.3, 0.6 y 1.2 g/mL de NP-QN y del T4-T6 NP-QN cargadas con una concentración constante de ADN viral [100 ng/μL]. Los resultados muestran que el T4 – 0.3 g/mL NP-QN cargadas con 100 ng/μL de ADN viral – fue el tratamiento con mayor contenido de proteína ( $2.15 \pm 0.02$  mg/mg hoja fresca), actividad CAT de  $0.00095 \pm 1.575 \times 10^{-4}$  μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> respecto al control y que el T5 (0.6 g/mL NP-QN cargadas con 100 ng/μL de ADN viral) fue el de mayor actividad PAL ( $0.0259 \pm 0.0046$  U/mg proteína) respecto al control y tratamientos que sólo contienen NP-QN, sugiriendo que el ADN viral cargado en la NP-QN es necesario para generar una mayor respuesta enzimática.

**Palabras clave:** Actividad enzimática, nanopartículas de quitosano, ADN fragmentado, PepGMV, tomate.

### Introducción

Las plantas a menudo están inmersas en condiciones que las someten en un constante estrés, biótico o abiótico. El estrés abiótico abarca todos los factores ambientales, como temperaturas extremas, exceso o falta de luz, suelos altamente salinos, sequía, inundaciones, etcétera. El estrés biótico se refiere a enfermedades por patógenos, herbívoros y competencia de recursos con otras plantas<sup>1</sup>. El estrés, ya sea biótico o abiótico, desencadena una serie de respuestas en la planta, como la alteración en la expresión génica, el metabolismo celular, cambios en la tasa de crecimiento y en el rendimiento del cultivo<sup>2</sup>. Siendo una de las primeras respuestas la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y presente en los mecanismos de defensa de las plantas sometidas a estrés. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una ROS que participa en el control y la regulación de procesos biológicos, como el crecimiento, el ciclo celular, la muerte celular programada y la señalización hormonal<sup>3</sup>. Como parte de la respuesta de defensa, las plantas también

producen ciertos metabolitos en respuesta al estrés, los cuales son sintetizados por catalizadores enzimáticos. Bajo este contexto, las enzimas son conocidas por facilitar la respuesta contra estrés biótico y abiótico <sup>1,4</sup>. La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante cuya función es la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en moléculas de agua y oxígeno molecular, teniendo un rol indispensable en la protección antioxidante contra radicales libres; junto con las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y la Glutación peroxidasa (GPx) <sup>5</sup>. Así mismo, la enzima la fenilalanina amonio liasa (PAL) juega un papel importante en la respuesta ante estrés biótico es la fenilalanina amonio liasa (PAL). La enzima PAL cataliza el primer paso en la ruta de los fenilpropanoides, transformando la L-fenilalanina en cinamato mediante desaminación. Esta ruta conduce a la formación de compuestos como ligninas, flavonoides, cumarinas y otros metabolitos especializados que cumplen funciones importantes en la estructura de la pared celular, la defensa, la pigmentación y la respuesta al estrés <sup>6</sup>. No obstante, este tipo de respuestas que habitualmente son inducidas por fitopatógenos, también pueden ser inducidas por la aplicación de elicitores, con la finalidad de inducir el sistema de defensa de la planta <sup>3</sup>. En este sentido la nanotecnología ofrece una amplia gama de moléculas que pueden actuar como nanoelicitores, destacando las nanopartículas (NP) derivadas de biopolímeros como el quitosano (QN). El cual, es un polímero natural con características importantes como biocompatibilidad, biodegradabilidad y bajo riesgo para la salud y el medio ambiente, que lo hacen factible para diversas bioaplicaciones en el sector alimentario, químico, veterinario, cosmético, médico, odontológico, ambiental, textil, de envases, biotecnológico y agrícola<sup>7</sup>. Dado el contexto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto bioquímico de actividades enzimáticas (CAT y PAL) y contenido de clorofila, que tiene la aplicación de elicitores de nanopartículas de quitosano (NP-QN) y NP-QN cargadas con ADN viral fragmentado en el cultivo de tomate, con la finalidad de obtener datos bioquímicos que respalden el papel inductor de los nanoelicitores de quitosano en el sistema de defensa de las plantas y formar parte de las tecnologías futuras de la protección de cultivos contra el estrés biótico o abiótico.

## Materiales y métodos

### Material biológico y tratamientos

Semillas de tomate Saladette var. Galilea fueron germinadas en una charola de unicel con peatmoss y perlita (7:3). Cuando alcanzaron una edad fenológica de 2-3 trifolios se pasaron a macetas y se mantuvieron con fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad hasta la aplicación del nanoelicitador. Las aplicaciones se realizaron de forma foliar y los tratamientos fueron los siguientes: T0 plantas tratadas con agua; T1 plantas inducidas con [0.3 g/mL] de NP-QN; T2 plantas inducidas con [0.6 g/mL] de NP-QN; T3 plantas inducidas con [1.2 g/mL] NP-QN. En los tratamientos siguientes, se utilizaron las mismas concentraciones de NP-QN con la distinción de haber sido cargadas con una concentración constante [100 ng/ $\mu$ L] de ADN plasmídico del geminivirus del mosaico dorado del chile (*PepGMV*), principal fitopatógeno de solanáceas, el cual fue fragmentado por sonicación. De esta forma, el T4 plantas inducidas con NP-QN a una concentración de [0.3 g/mL] cargadas con [100 ng/ $\mu$ L] de ADN plasmídico fragmentado del *PepGMV*; T5 plantas inducidas con [0.6 g/mL] NP-QN cargadas con [100 ng/ $\mu$ L] de ADN plasmídico fragmentado del *PepGMV* y T6 plantas inducidas con [1.2 g/mL] NP-QN cargadas con [100 ng/ $\mu$ L] de ADN plasmídico fragmentado del *PepGMV*.

### Preparación de extracto crudo

Los extractos crudos se obtuvieron siguiendo la metodología modificada de Sibanda y Okoh <sup>9</sup>. Se utilizaron 250 mg de tejido vegetal de muestra de cada tratamiento, congelados y posteriormente macerados en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido, hasta obtener un pulverizado. El material resultante se lavó dos veces con 500  $\mu$ L de acetona en cada lavado, y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos, esta última homogenización se almacena a 4°C por 24 h. Pasado este tiempo se realizó un último lavado con acetona y nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos para asegurar la precipitación del tejido, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. La pastilla seca se resuspendió en 1.5 mL de regulador de fosfatos pH 7.0 [0.05 M] mediante agitación en vortex y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante final se utilizó como extracto crudo para los análisis bioquímicos de actividad enzimática CAT y PAL.

## Cuantificación de proteínas

La concentración total de proteínas se llevó a cabo por medio del método de Bradford. Se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford y 50  $\mu\text{L}$  de extracto crudo, mezclando cuidadosamente y dejándolo incubar durante 10 minutos en la oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia en microplaca a 595 nm. Se elaboró una curva de calibración con soluciones patrón de albumina de suero bovino (BSA), se midieron absorbancias de varias muestras a concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/mL. Se aplicó una regresión lineal en donde se ajustaron los datos a la recta y se obtuvo la ecuación ( $y=mx + b$ ). La concentración de proteínas en los extractos se determinó interpolando la absorbancia en la curva estándar, en donde  $y$  es la absorbancia,  $m$  es la pendiente de la curva;  $x$  es la concentración de la proteína y  $b$  es una constante. Los resultados se expresaron en mg de proteína por mL de extracto, y se utilizaron para normalizar las actividades enzimáticas (CAT y PAL) como unidades por miligramo de proteína. La siguiente ecuación fue utilizada para determinar el contenido de proteína total en los diferentes tratamientos:

$$\text{mg de proteína} = \left( \frac{\text{mg proteína}}{\text{mL}} \right) (\text{Volumen de celda})$$

## Actividad catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa (CAT) fue evaluada por medio de espectrofotometría, monitoreando la disminución de la absorbancia por minuto a 240 nm, asociada a la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), siguiendo el método descrito por Chandlee et al.<sup>10</sup>. Para la mezcla de reacción se tomaron 250  $\mu\text{L}$  de extracto crudo de cada tratamiento y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [0.88 M], para el blanco se tomaron 250  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfato y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [0.88 M]. Se realizó una curva de calibración de peróxido de hidrógeno, la preparación se inició a partir de una solución estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% [0.88 M], donde se realizaron siete puntos haciendo diluciones a partir del primero empleando peróxido grado reactivo, las mediciones fueron a concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 0.882 M. La actividad específica de la enzima catalasa se expresó como micromoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  descompuesto por minuto por miligramo de proteína ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  proteína).

## Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)

La determinación de la actividad PAL llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Gerasimova<sup>11</sup>. La actividad se evaluó mediante la formación de ácido cinámico a partir de L-fenilalanina, monitoreando espectrofotométricamente la absorbancia a 290 nm. Para lo cual, se utilizó el coeficiente de extinción molar del ácido cinámico ( $\epsilon$ ) =  $9630 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  y con ello obtener la concentración de ácido cinámico en los diferentes tratamientos<sup>11</sup>. La mezcla de reacción fue realizada con 100  $\mu\text{L}$  de muestra de extracto crudo y 100  $\mu\text{L}$  de L-fenilalanina a una concentración de [60  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ]. Esta mezcla fue incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 1 h, transcurrido este tiempo se detuvo la reacción con la adición de 50  $\mu\text{L}$  de TCA a una concentración 1M. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de ácido cinámico producido en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína, utilizando la concentración de proteína que fue medida por el método de Bradford.

## Contenido de clorofila

Para la determinación del contenido de clorofila en las muestras se utilizaron las técnicas de espectrofotometría, con extracción de acetona al 80%. Las hojas de cada tratamiento se pulverizaron en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido, posteriormente este pulverizado se homogenizó con 1 mL de acetona al 80% en un tubo (1.5 mL), dejándolo reposar por 24 h a temperatura ambiente, pasado este tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 646 y 663 nm en el espectrofotómetro. La concentración de clorofila se calculó utilizando la ecuación de Lichtenthaler y Wellburn<sup>12</sup>.

$$\text{Clorofila total} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 6.43 (A_{663}) + 18.43 (A_{646})$$

## Resultados

### Cuantificación de proteína

Se obtuvo la gráfica correspondiente a partir de los patrones de Albumina de Suero Bovina (Figura 1). A partir de la ecuación de la recta mostrada en la Figura 1, se obtuvieron los resultados plasmados en la Figura 2, para cada uno de los 7 tratamientos. Se corrigió según el volumen de celda y se obtuvo la masa total de proteína utilizando la ecuación descrita anteriormente en la metodología.

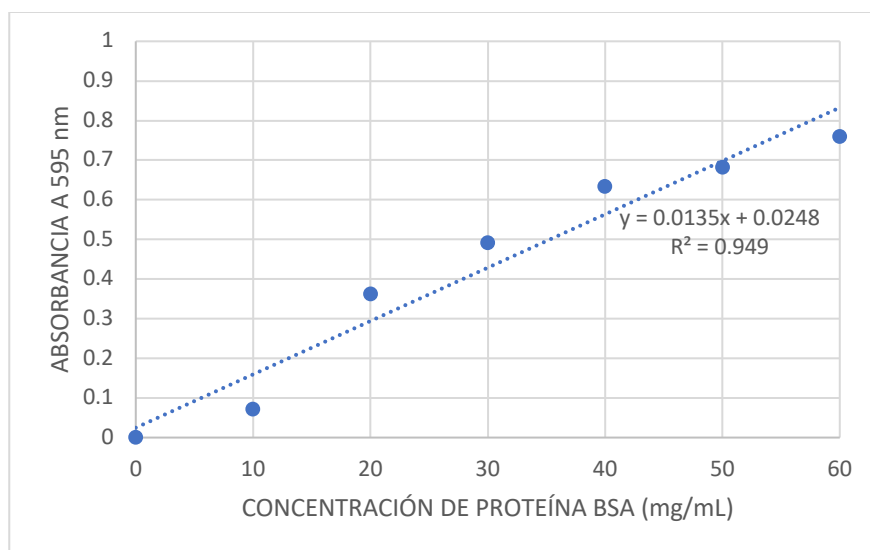


Figura 1. Regresión lineal del ensayo de Bradford con estándares de BSA para cuantificar la concentración de proteínas en los tratamientos de NP-QN. Elaboración propia.

En la Figura 2 se muestra un gráfico de barras para la cantidad de proteína total obtenidas para cada tratamiento de plantas de *tomate* sometidas a estrés biótico. Los resultados muestran que el T4 [0.3 g/mL] NP-QN cargadas con [100 ng/μL] de ADN viral, fue el tratamiento con mayor contenido de proteína ( $2.15 \pm 0.02$  mg/mg hoja fresca), respecto al tratamiento control y los tratamientos que sólo contenían NP-QN.

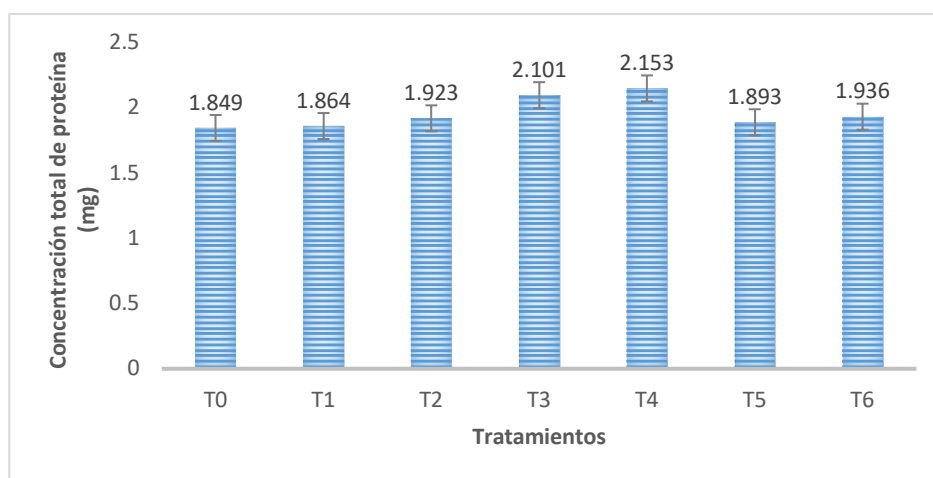


Figura 2. Cantidad de proteína total (mg) en el cultivo de tomate. T0: Control, T1: NP-QN [0.3 g/mL], T2: NP-QN [0.6 g/mL], T3: NP-QN [1.2 g/mL], T4: NP-QN [0.3 g/mL] cargada con [100 ng/μL] de ADN viral fragmentado de PepGMV, T5: NP-QN [0.6 g/mL] cargada con 100 ng/μL de ADN viral fragmentado de PepGMV, T6: NP-QN [1.2 g/mL] cargada con [100 ng/μL] de ADN viral fragmentado de PepGMV. Elaboración propia.

### Actividad Catalasa (CAT)

Para determinar la actividad catalasa (CAT), se realizó la lectura por triplicado en espectrofotómetro de siete concentraciones conocidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [0.1 – 0.882 M], para la generación de una curva de calibración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y posterior regresión lineal (Figura 3) que fue utilizada para conocer el contenido inicial y final del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los diferentes tratamientos al cabo de un minuto como lo indica la metodología de actividad CAT, citada en materiales y métodos.

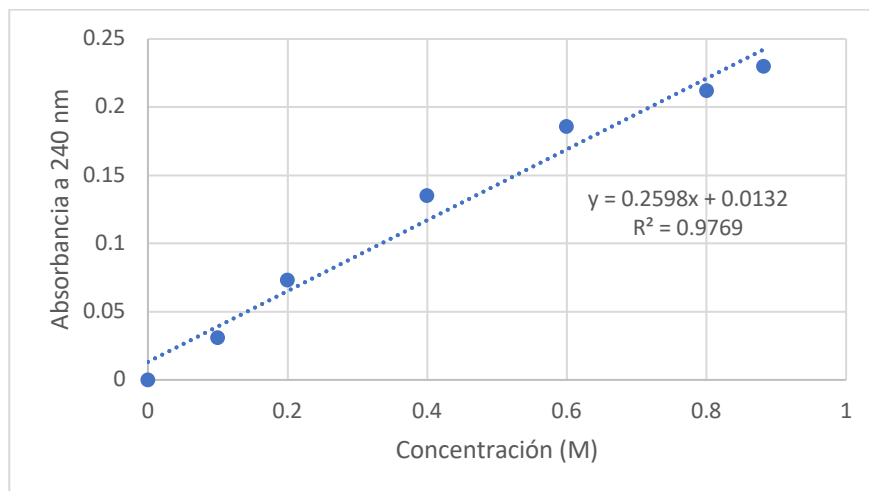


Figura 3. Regresión lineal del ensayo de calibración estándares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para la posterior determinación de actividad CAT en los tratamientos de NP-QN. Elaboración propia.

De acuerdo con lo ya mencionado, se obtuvo la concentración inicial y final de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para obtener la reducción en la concentración de este en cada muestra de los tratamientos evaluados. Una vez obtenida la regresión lineal de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se obtuvo la actividad específica de CAT tomando en cuenta un factor de dilución 10 para las muestras. Los resultados expresados en la Figura 4, muestran que el T4 generó una mayor actividad específica de CAT ( $0.00095 \pm 1.575 \times 10^{-4} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) respecto al resto de los tratamientos. Cabe mencionar que, durante la molienda del tejido, no fue posible recuperar cantidad suficiente en los T5 y T6, por lo cual será necesario repetir la determinación de la actividad enzimática de CAT.

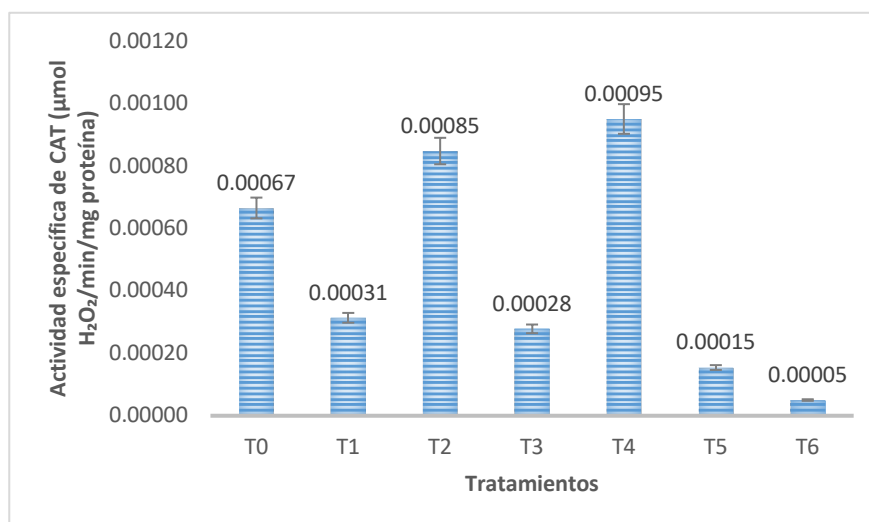


Figura 4. Actividad específica de CAT en el cultivo de tomate. T0: Control, T1: NP-QN [0.3 g/mL], T2: NP-QN [0.6 g/mL], T3: NP-QN [1.2 g/mL], T4: NP-QN [0.3 g/mL] cargada con [100 ng/  $\mu\text{L}$ ] de ADN viral fragmentado de PepGMV, T5: NP-QN [0.6 g/mL] cargada con 100 ng/  $\mu\text{L}$  de ADN viral fragmentado de PepGMV, T6: NP-QN [1.2 g/mL] cargada con [100 ng/  $\mu\text{L}$ ] de ADN viral fragmentado de PepGMV. Elaboración propia.

### Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)

La lectura por triplicado en espectrofotómetro de los diferentes tratamientos aplicados en el cultivo de tomate, NP-QN, NP-QN cargadas con ADN viral fragmentado y el control, fue empleada para determinar el contenido de ácido cinámico como factor de respuesta de la actividad enzimática PAL, el cual fue determinado a través de la Ley de Beer-Lambert y que es generado en un tiempo de reposo de 60 minutos de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 5, se observa que el T5 (0.6 g/mL NP-QN cargadas con 100 ng/ $\mu$ L de ADN viral) fue el de mayor actividad PAL ( $0.0259 \pm 0.0046$  U/mg proteína) respecto al control y tratamientos que sólo contienen NP-QN, sugiriendo que el ADN viral cargado en la NP-QN es necesario para generar una mayor respuesta enzimática.

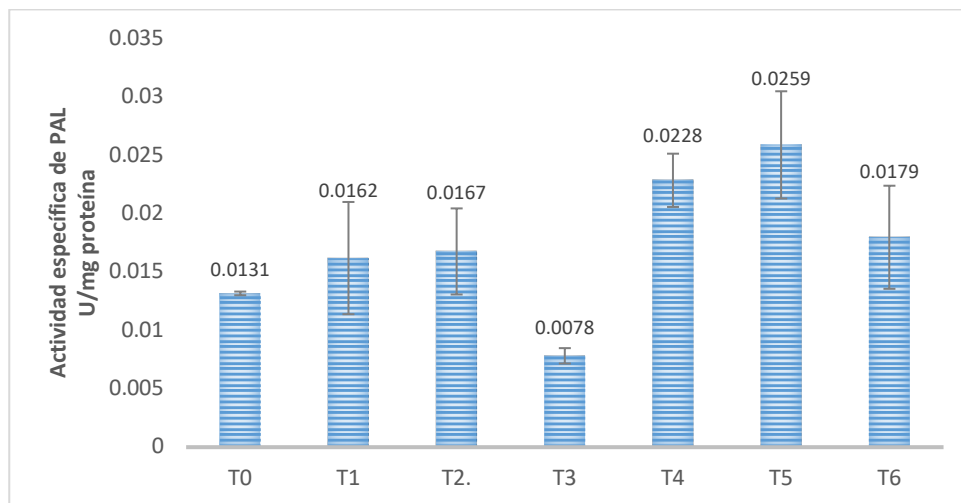


Figura 5. Actividad específica de PAL en el cultivo de tomate inducido con NP-QN. T0: Control, T1: NP-QN [0.3 g/mL], T2: NP-QN [0.6 g/mL], T3: NP-QN [1.2 g/mL], T4: NP-QN [0.3 g/mL] cargada con [100 ng/ $\mu$ L] de ADN viral fragmentado de PepGMV, T5: NP-QN [0.6 g/mL] cargada con 100 ng/ $\mu$ L de ADN viral fragmentado de PepGMV, T6: NP-QN [1.2 g/mL] cargada con [100 ng/ $\mu$ L] de ADN viral fragmentado de PepGMV. Elaboración propia.

### Contenido de clorofila

El contenido total de clorofila se estimó con la ecuación de Lichtenthaler y Wellburn<sup>10</sup>, para lo cual se realizó por triplicado la lectura en microplaca a dos longitudes de onda, 663 nm para clorofila a (Tabla 1) y 646 nm para clorofila b (Tabla 2), de los diferentes tratamientos de NP-QN y NP-QN cargados con ADN viral fragmentado de PepGMV; útiles para determinar el contenido total de clorofila (Figura 5).

**Tabla 1.** Absorbancias obtenidas a 646 nm. Elaboración propia.

Tratamientos/Repeticiones	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Rep 1	0.354	0.515	0.591	0.540	0.228	0.643	0.461
Rep 2	0.691	0.569	0.721	0.710	0.266	0.769	0.501
Rep 3	0.676	0.650	0.788	0.725	0.288	0.780	0.548
Promedio	0.573	0.578	0.700	0.658	0.260	0.730	0.503



**Tabla 2.** Absorbancias obtenidas a 663 nm. Elaboración propia.

Tratamientos/Repeticiones	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Rep 1	0.734	1.066	1.237	1.187	0.472	1.181	0.980
Rep 2	1.477	1.174	1.527	1.548	0.561	1.452	1.101
Rep 3	1.422	1.340	1.701	1.559	0.606	1.486	1.170
Promedio	1.211	1.193	1.488	1.431	0.546	1.373	1.083

Los resultados muestran que, a diferencia de las actividades enzimáticas, el tratamiento con mayor contenido de clorofila fue el T2, un tratamiento constituido únicamente por NP-QN a una concentración de [0.6 g/mL] y que generó 22.46 µg/mL de clorofila total. Seguido del T5, el cual constituido por NP-QN [0.6 g/mL] cargadas con [100 ng/µL] de ADN fragmentado del geminivirus PepGMV. También, puede observarse que el T4 es el que menor clorofila produjo [8.302 µg/mL]. Infiriendo que es el tratamiento que mas gasto metabólico esta induciendo en el cultivo de tomate, y que podría estar relacionado al estrés que generan en la naturaleza los diversos factores bióticos. Esto, porque en la agricultura, la clorofila es un indicador de salud y producción de los cultivos; y cuando las plantas son sometidas al estrés biótico generado por fitopatógenos la cantidad de clorofila se reduce, lo que se traduce en una disminución de la capacidad de la planta para absorber luz y realizar una fotosíntesis eficiente<sup>8</sup>. En este sentido, se busca que los elicitores no afecten la capacidad fotosintética de la planta, pero si que tengan una rápida respuesta para cuando la planta este sometida a un estrés real por un fitopatógeno.

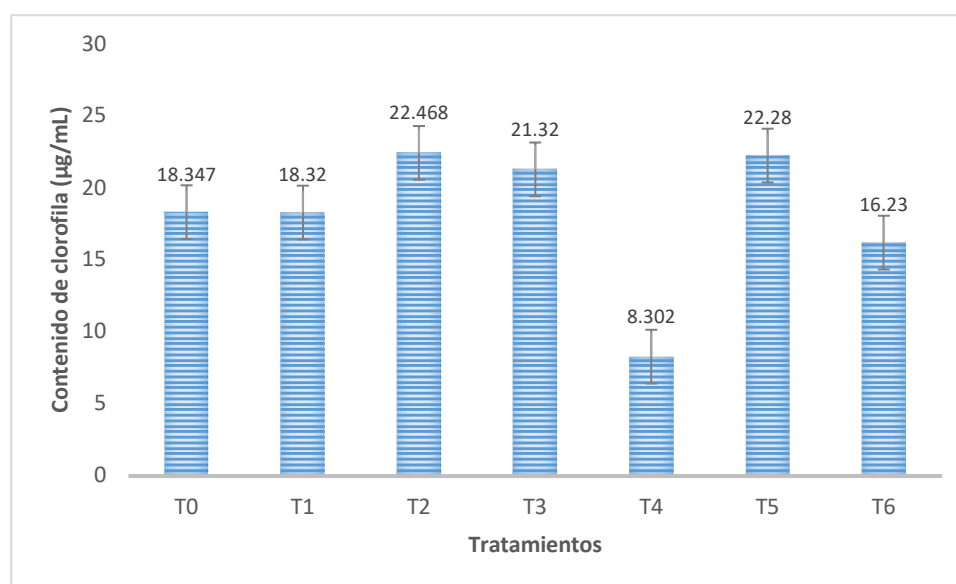


Figura 5. Contenido de clorofila en el cultivo de tomate tratados con NP-QN y NP-QN cargadas con ADN viral fragmentado. T0: Control, T1: NP-QN [0.3 g/mL], T2: NP-QN [0.6 g/mL], T3: NP-QN [1.2 g/mL], T4: NP-QN [0.3 g/mL] cargada con [100 ng/ µL] de ADN viral fragmentado de PepGMV, T5: NP-QN [0.6 g/mL] cargada con 100 ng/ µL de ADN viral fragmentado de PepGMV, T6: NP-QN [1.2 g/mL] cargada con [100 ng/ µL] de ADN viral fragmentado de PepGMV. Elaboración propia.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron que los nanoelicitores son un eficiente sistema para generar cambios en las actividades enzimáticas y contenido de clorofila, infiriendo que son capaces de inducir el sistema de defensa de las plantas. Los resultados tanto de la actividad catalasa (CAT) como de la fenilalanina amonio liasa (PAL) presentan variaciones en su actividad enzimática dependiendo del tratamiento aplicado, lo cual indica que dichas enzimas son sensibles a los estímulos de las nanopartículas de quitosán (NP-QN) y también las que se encuentran cargadas con ADN viral fragmentado del PepGMV (NP-QN-ADN), capaces de inducir

estrés oxidativo y mimetizar estrés biótico con la finalidad de inducir el sistema de defensa de las plantas de tomate. La actividad enzimática CAT mostró una mayor actividad específica en el tratamiento 4: NP-QN [0.3 g/mL] cargada con [100 ng/μL] de ADN viral fragmentado de PepGMV, seguido del tratamiento 2: NP-QN [0.6 g/mL] y el tratamiento control con agua, lo que indica una mayor respuesta ante el estrés oxidativo al que estaban sujetas las plantas con los nanoelicitores. La alta actividad CAT está relacionada a la descomposición rápida del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es generado en los sistemas vegetales que han sido inducidos con elicitores como el quitosano<sup>3</sup>. Infiriéndose, que el nanoelicitador está generando un efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) similar al generado por los diferentes tipos de estrés y que podría ser efectivo en la inducción de los sistemas de defensa de las plantas de tomate. Así mismo, la actividad enzimática PAL mostró una mayor actividad específica en el T4, seguido por el tratamiento 3: NP-QN [1.2 g/mL] y posteriormente el tratamiento 6: NP-QN [1.2 g/mL] cargada con [100 ng/μL] de ADN viral fragmentado de PepGMV, indicando una mayor respuesta al estrés biótico al que están sometidas las muestras.

De igual manera, se logró integrar la cuantificación de clorofila como un parámetro complementario para evaluar el impacto del estrés biótico en la fisiología de la planta. La disminución del contenido de clorofila en algunos tratamientos, como el tratamiento 4, podría significar una posible afectación en la capacidad fotosintética, lo cual refuerza la idea de que los tratamientos inducen respuestas de estrés significativas.

## Bibliografía/Referencias

1. Du, B., Haensch, R., Alfarraj, S., & Rennenberg, H. (2024). Strategies of plants to overcome abiotic and biotic stresses. *Biological Reviews/Biological Reviews Of The Cambridge Philosophical Society*, 99(4), 1524-1536. <https://doi.org/10.1111/brv.13079>
2. Gull, A., Ahmad Lone, A., & Ul Islam Wani, N. (2019). Biotic and Abiotic Stresses in Plants. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.85832
3. Mejía-Teniente, L., De Dalia Durán-Flores, F., Chapa-Oliver, A., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M., Ocampo-Velázquez, R., & Guevara-González, R. (2013). Oxidative and Molecular Responses in *Capsicum annuum* L. after Hydrogen Peroxide, Salicylic Acid and Chitosan Foliar Applications. *International Journal Of Molecular Sciences*, 14(5), 10178-10196. <https://doi.org/10.3390/ijms140510178>
4. Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
5. Baker, A., Lin, C., Lett, C., Karpinska, B., Wright, M. H., & Foyer, C. H. (2023). Catalase: A critical node in the regulation of cell fate. *Free Radical Biology And Medicine*, 199, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.02.009>
6. Barros, J., & Dixon, R. A. (2019). Plant Phenylalanine/Tyrosine ammonia-lyases. *Trends In Plant Science*, 25(1), 66-79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>
7. García-García, R. A., Madera-Santana, T. J., Grijalva-Verdugo, C., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2024). Elaboración y caracterización de nanopartículas de quitosano como acarreador de péptidos bioactivos. *Jóvenes en la Ciencia*, 31, 55-59. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/4659>
8. Pérez-Bueno, M. L., Pineda, M., & Barón, M. (2019). Phenotyping Plant Responses to Biotic Stress by Chlorophyll Fluorescence Imaging. *Frontiers in plant science*, 10, 1135. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01135>
9. Sibanda, T., & Okoh, A. I. (2008). In vitro evaluation of the interactions between acetone extracts of *Garcinia kola* seeds and some antibiotics. *African Journal of Biotechnology*, 7(11). <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58760>
10. Chandlee, J. M., Tsafaris, A. S., & Scandalios, J. G. (1983). Purification and partial characterization of three genetically defined catalases of maize. *Plant Science Letters*, 29(2-3), 117-131.
11. Gerasimova, N. G., Pridvorova, S. M., & Ozeretskovskaya, O. L. (2005). Role of L-phenylalanine ammonia Lyase in the induced resistance and susceptibility of tomato plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(1), 103-105.



12. Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.
13. Zucker, M. (1965). Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 40(5), 779–784.