

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Aplicación de Nanopartículas y Micropartículas de Óxido de Zinc y Sulfato de Fierro, y su Efecto en la Germinación y el Crecimiento de Plántulas de Calabaza (*Cucurbita pepo*).

Por:

LAURA IVONNE CRUZ RUIZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México.

Mayo, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Aplicación de Nanopartículas y Micropartículas de Óxido de Zinc y Sulfato de Fierro, y su Efecto en la Germinación y el Crecimiento de Plántulas de Calabaza (*Cucurbita pepo*)

Por:

LAURA IVONNE CRUZ RUIZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría



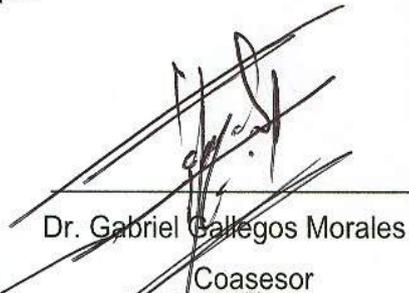
Dra. Norma Angélica Ruiz Torres

Asesor Principal



Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación

Salttilo, Coahuila, México, División de Agronomía

Mayo, 2017

DEDICATORIAS

A Mis Padres

Matilde Ruiz Olvera y Juan Miguel Cruz Moran

A quienes la ilusión de su vida ha sido verme convertida en una persona de provecho porque gracias a su apoyo y consejo he llegado a realizar una de mis más grandes metas, la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir, fruto del inmenso apoyo y confianza que en mi se depositó, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes, porque sin su apoyo y aliento jamás lo hubiese logrado, are que cada día que estuvimos lejos, cada kilómetro que nos separó valga la pena, trabajare duro y me esforzare por ser lo que siempre soñaron que fuera, una profesionista, una persona de bien, alegre como mi madre, y firme como mi padre, gracias eternamente, los amo.

Con Amor su hija.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Porque de él, y por él, y para él, son todas las cosas. A él sea la gloria por los siglos. Amén. Romanos 11:36

A mis Padres

Gracias por el apoyo brindado a lo largo de mi vida, por estar siempre en los buenos y malos momentos les agradezco infinitamente la confianza que en mi depositaron, gracias por los buenos valores que en mi inculcaron, les pido una última cosa que siempre nos mantengamos unidos, felices y amándonos. El objetivo se ha cumplido, y no queda más que agradecerles y decirles que los amo con todo mi ser, Gracias.

A Jose Pedro Lozano Hernández

Gracias por el apoyo y tu amor brindado durante esta etapa de nuestras vidas, este es el principio de muchos más éxitos que nos esperan, para ello tendremos que trabajar duro y esforzarnos para cumplir nuestros sueños, recompensar a nuestros padres por tan gran esfuerzo y en un futuro no lejano podamos exclamar satisfechos “Lo Logramos”.

Sembremos buena semilla, cultivemos nuestro amor y cosecharemos éxitos y bendiciones en nuestras vidas, con Amor Ivonne.

A mis Hermanos

Les agradezco el apoyo que me han brindado, Salva gracias por regalarnos una de las mayores bendiciones que hemos recibido, a esos dos pequeños seres que amo Esteban y Andrea sé que no ha sido fácil el camino, pero te pido que seas perseverante y jamás te estanques. Cielito gracias por ser una extraordinaria hermana, por estar siempre cuando te he necesitado, algunas veces pensé en rendirme, pero después vi que alguien seguía mis pasos, te amo y te digo señálame una meta; el cielo, que el camino a seguir Dios te lo dice. Los amo hermanos.

A mi Alma Mater

Por brindarme un lugar en esta adorada institución, gracias querida UAAAN porque en tus aulas conocí a personas extraordinarias, maestros, amigos y el amor, gracias por cada experiencia que me regalaste. ¡Buitre por siempre!

A la Dra. Norma

Porque aun sin conocerme usted confió en mí, le agradezco el apoyo y la oportunidad brindada.

Contenido

ÍNDICE DE CUADROS	i
RESUMEN	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVO GENERAL.....	3
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 Nanotecnología.....	4
4.2 Nanopartículas y sus aplicaciones	5
4.2.1 Salud	6
4.2.2 Cosméticos.....	7
4.2.3 Óptica.....	8
4.2.4 Textiles.....	9
4.2.5 Alimentación y Agricultura	10
4.3 Uso de Nanopartículas en la Agricultura	12
4.3.1 Aplicación de la Nanotecnología en semillas	13
4.3.2 Aplicación en plantas: Nanofertilizantes y Nanopesticidas	16
4.4 Toxicidad	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Ubicación del sitio experimental	22
5.2 Preparación de las soluciones con nanopartículas	22
5.3 Imbibición de semillas	22
5.4 Variables evaluadas en las semillas germinadas:	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
VII. CONCLUSIÓN.....	33

VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	34
ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos con MPs de FeSO ₄ y de ZnO, y con NPs de ZnO puras otras de ZnO + Fe, aplicadas en semillas de calabaza en condiciones de laboratorio.....	23
Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para ensayo de germinación en semillas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).....	29
Cuadro 3. Comparación de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semillas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) por tratamiento.....	30
Cuadro 4. Comparación de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semillas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) por concentración.....	31

RESUMEN

Aplicación de Nanopartículas y Micropartículas de Óxido de Zinc y Sulfato de Hierro, y su Efecto en la Germinación y el Crecimiento de Plántulas de Calabaza (*Cucurbita pepo*)

El presente trabajo se llevó a cabo en dos fases durante los meses Enero-Febrero del 2017 en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), con el objetivo de evaluar la efectividad *in vitro* de la aplicación de nanopartículas (NPs) y de micropartículas (MPs) de ZnO y FeSO₄, como una opción para promover el vigor de germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Cucurbita pepo*. Se establecieron bioensayos *in vitro* que constaron de cuatro tratamientos (MPsFeSO₄, NPsZnO, MPsZnO y NPs ZnO+Fe), a tres concentraciones (0, 5 y 10 ppm), cada tratamiento constó de 150 semillas divididas en seis repeticiones de 25 semillas cada uno. Las semillas se trataron con dos aplicaciones de las soluciones respectivas conteniendo las NPs y las MPs, en cajas Petri sobre una doble capa de papel filtro, la primera aplicación de las NPs y de las MPs se realizó vertiendo 30 mL⁻¹ de las soluciones previamente preparadas, la segunda aplicación constó del vertimiento de 20 mL⁻¹ más de las soluciones, esta se realizó a las 24 horas después de la primera aplicación, el testigo (0 ppm consistió de aplicar agua destilada). Siendo así la aplicación total de 50 mL⁻¹ de NPs y de MPs dejándose imbibir durante 48 horas.

Posterior al tratamiento las semillas fueron sembradas entre dos capas de papel Anchor con agua destilada, enrollándolos en forma de tacos para ser introducidos a una cámara bioclimática a una temperatura de 25°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Los datos de las variables fueron sometidos a un análisis de varianza (ANVA) para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos (NPs y MPs), y entre concentraciones, posteriormente se realizó una comparación de medias con la Prueba de Tukey, para establecer el orden de eficiencia de tratamientos (0, 5 y 10 ppm) utilizando el programa SAS Inc. (2008)

Los resultados obtenidos indican que la NP compuesta de Zn + Fe (NPZnFe) a una concentración de 10 ppm en semillas de *Cucurbita pepo* var. Grey zucchini tiene un efecto positivo en el vigor y en el incremento de la longitud de plúmula, sin embargo a una concentración de 5 ppm presenta un efecto similar incrementando el vigor y la longitud de radícula. Así mismo se observó que las NPZnO, presentan una tendencia similar a lo mencionado.

Palabras clave: nanoparticulas, vigor, óxido de zinc, fierro, plúmula y radícula.

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Royal Society (2004), la nanotecnología (NT) es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica. Para tener una idea de lo que se está hablando, la medida “*nano*” (10^{-9} m) equivale a 70 mil veces menos el espesor de un cabello. Se espera que la NT desempeñe un papel vital en varias disciplinas, ya que se está convirtiendo en una megatendencia del campo científico más innovador.

El trabajo de Razzaq et al. (2016) sugiere que la NT se está visualizando como un campo que tiene potencial para revolucionar la agricultura y mejorar las condiciones de los productores y de los sistemas de producción. Tiene potencial para proporcionar seguridad alimentaria mejorando la producción en la agricultura de precisión, hacer un uso más eficiente del agua, protección contra plagas y enfermedades; proporcionando nuevas herramientas para la detección de patógenos y la protección del medio ambiente.

Los avances en NT están siendo integrados en la biología para la aparición de una nueva y excitante disciplina llamada agronanobiotecnología.

Las nanopartículas (NPs) son materiales que tienen dimensiones entre de 1-100 nm; son de gran relevancia en la investigación científica, debido a que tienen una amplia variedad de aplicaciones en diversos campos como el

biomédico, biológico, óptico y electrónico, entre otros. (Ball, 2002; Karunaratne, 2007).

Esta novedosa tecnología tiene un gran potencial, ya que puede además mejorar la calidad de vida a través de sus aplicaciones en diversos campos como son la agricultura y la tecnología de los alimentos (Walker y Bucher, 2009).

Dicha tecnología está siendo objeto de estudio debido al interés que posee para el desarrollo de productos agrícolas, pudiendo aminorar la cantidad de agroquímicos utilizados en la actualidad.

Es así como la NT aplicada a la agricultura tiene por objetivo formular productos con ingredientes activos de tamaño nanométrico, lo cual los hace más eficientes y de fácil biodisponibilidad, además de minimizar las pérdidas al aplicar el producto (Ruiz Torres *et al.*, 2016).

Con la finalidad de entender cuáles son los posibles beneficios de la aplicación de la NT en la agricultura, es necesario plantearse objetivos y realizar investigaciones exhaustivas en diferentes áreas para la producción de un cultivo, siendo así la aplicación de NPs en semillas uno de los primeros objetivos o áreas a analizar para conocer el efecto que tiene sobre procesos fisiológicos.

Con base en lo antes expuesto en el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos de la evaluación del proceso germinativo de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*) mediante la aplicación de NPs y micropartículas (MPs) de ZnO y FeSO₄, a dos diferentes concentraciones

II. HIPÓTESIS

La aplicación de NPs de ZnO y de FeSO₄ en concentraciones de 5 y 10 ppm, estimulará el vigor de germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Cucurbita pepo*, superando el efecto de las MPs y del tratamiento control o testigo.

III. OBJETIVO GENERAL

Analizar la efectividad *in vitro* de la aplicación de tratamientos de NPs y/o de MPs de ZnO y de FeSO₄, en la posible promoción del vigor de germinación de semillas y en el crecimiento de plántulas de *Cucurbita pepo*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer el efecto sobre la germinación de semillas debido a la aplicación de NPs o de MPs de ZnO y de FeSO₄.
- Determinar si existe alguna diferencia en respuesta del vigor de la semilla a la aplicación de NPs o de MPs en *Cucurbita pepo*.
- Investigar si las NPS y las MPs de ZnO y de FeSO₄ aplicadas en semillas de *Cucurbita pepo* en diferentes dosis, tienen efecto promotor o fitotóxico en procesos relacionados con la germinación y el crecimiento de plántulas.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Nanotecnología

En un sentido amplio Serena y Correia (2003) describen a la NT como la combinación de diversas técnicas provenientes de diferentes áreas de investigación para el estudio, diseño y creación de materiales a escala atómica y molecular.

La NT es objeto de estudio en diversas áreas de investigación como la medicina, la odontología, electrónica, alimentos, agricultura, entre otros. Su investigación dentro del área agronómica se relaciona con lo mencionado por Ruiz Torres *et al.* (2016), quienes indican que la utilización de NT representa una excelente oportunidad para aminorar el uso de agroquímicos sintéticos, con la posibilidad de reducir el impacto ambiental que se ha venido dando en las últimas décadas.

Por su parte Lira Saldivar *et al.* (2014) mencionan que la NT tiene el potencial de revolucionar los sistemas agroalimentarios, esto a través de la utilización eficiente del agua, la protección contra insectos y enfermedades, proporcionando nuevas herramientas para la biología molecular y celular, creando nuevos materiales para la detección y protección del medio ambiente.

4.2 Nanopartículas y sus aplicaciones

Las nanopartículas (NPs) son agregados atómicos o moleculares Ball (2002), los principales tipos son los basados en metales, carbono, dendrímeros y nanocompuestos (Gutiérrez Praena et al., 2009).

Basados en metales, en ellos se incluyen los puntos cuánticos y las NPs de plata, oro y óxidos de metales, tales como el dióxido de titanio. Los puntos cuánticos consisten en cristales semiconductores muy compactos compuestos por cientos o miles de átomos.

Basados en carbono, estas NPs están compuestas principalmente por carbono, generalmente formando esferas, elipses y tubos huecos. Las NPs de carbono esféricas y elipsoides se conocen como fullerenos, mientras que los cilíndricos son llamados nanotubos. Dichas NPs tienen aplicaciones potenciales, incluyendo películas mejoradas y recubrimientos, obteniendo materiales más fuertes y ligeros.

Los dendrímeros, consisten en polímeros de tamaño nano construidos a partir de unidades ramificadas. La superficie de los dendrímeros tiene numerosos extremos de cadena, que pueden ser adaptados para realizar funciones químicas específicas. Los dendrímeros tridimensionales contienen cavidades interiores se pueden introducir otras moléculas, útiles para la administración de fármacos.

Los nanocompuestos, poseen NPs mezcladas con otras NPs o con materiales más grandes.

Existen diversas áreas a las que se integra el uso de las NPs para el estudio, diseño y creación de nuevos materiales, que según el área en la que se desarrollen mejorarán aspectos cotidianos de nuestras vidas, así como un enfoque con posibilidad de contrarrestar los daños generados a causa de la contaminación ambiental.

Según un informe de 2015 de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), la manufacturación de productos que utilizan NPs pasará del 0.1% en 2013, a 15% en 2016, con aplicaciones en el transporte, energía, medio ambiente, electrónica, biotecnología, ciencias de la salud, sector textil y construcción.

4.2.1 Salud

El término nanomedicina, se refiere a la aplicación de la NT en las ciencias de la salud. El uso de la NT en estos temas ha tenido gran importancia debido a sus significativas aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. La detección temprana de enfermedades, su tratamiento precoz personalizado y un preciso seguimiento posterior de su evolución, serán posibles en los próximos años gracias a la aplicación de las herramientas nanotecnológicas que se están desarrollando actualmente (Lechuga, 2011).

Esta rama de la NT agrupa tres áreas principales: el nano diagnóstico, la liberación controlada de fármacos y la medicina regenerativa. El nano diagnóstico desarrolla sistemas de análisis y de imagen para detectar una enfermedad o un mal funcionamiento celular en los estadios más tempranos posibles, los nanos sistemas de liberación de fármacos transportan los

medicamentos sólo a las células o zonas afectadas porque así el tratamiento será más efectivo y con menos efectos secundarios. La medicina regenerativa pretende reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nano biotecnológicas (Poveda-Burgos *et al.*, 2016).

Pastrana y Ávila (2007) mencionan que se han desarrollado diversas soluciones, utilizando estructuras como dreamers, nanoesferas, nanoporos y puntos cuánticos, para el tratamiento eficaz y diagnóstico temprano de diversas enfermedades conocidas por todos, pero de difícil manejo; como el infarto cardiaco, cáncer, diabetes, insuficiencia renal, e infección por el virus de inmunodeficiencia humana. Los importantes avances en este campo podrían dar lugar a sistemas de diagnósticos y tratamientos terapéuticos de mayor eficacia que los existentes, lo que redundaría en una mayor calidad de vida para los humanos.

4.2.2 Cosméticos

El uso de la NT ha tenido extensión a través de varios flujos de la ciencia, desde la electrónica hasta la medicina y ahora ha encontrado aplicaciones en el campo de los cosméticos tomando el nombre de nanocosméticos.

Esta amplia influencia de la NT en las industrias cosméticas se debe a las propiedades mejoradas alcanzadas por las partículas a nivel nanométrico incluyendo el color, la transparencia, la solubilidad, etc. Los diferentes tipos de nanomateriales empleados en cosméticos incluyen nanosomas, liposomas, fullerenos, NPs de lípidos sólidos y otros. (Raj *et al.*, 2012).

4.2.3 Óptica

La NT ha aunado esfuerzos entre los centros de investigación, universidades y la Industria privada, con el fin de aportar a la humanidad nuevos inventos tecnológicos transdisciplinarios, que puedan ayudar a pacientes afectados.

Tal es el caso de las retinas artificiales que funcionan como biobaterías y permiten convertir señales de luz en señales eléctricas y nanotransportadores de iones naturales y sintéticos, que están siendo probados con éxito en modelos animales, como córneas artificiales, con las cuales ya se están realizando cirugías (Geoffrey *et al.*, 2006).

Durán Ospina (2007) menciona en su artículo que estudios realizados en Estados Unidos por el físico Gislin Dagnelie perteneciente al Centro de Rehabilitación e Investigación de la Vista en el Instituto Oftalmológico Wilmer de la Universidad John Hopkins de Baltimore, ha diseñado un ojo artificial, el cual consiste en una mini cámara de video, colocada en los lentes de la persona y a su vez conectada a un chip de computadora, que se instala detrás del ojo humano estimulando el nervio óptico. Las imágenes capturadas por la cámara son traducidas por el microchip a impulsos eléctricos, que el cerebro puede interpretar después como imágenes. Esta prótesis visual produce una estimulación eléctrica de la retina, provocando fosfenos y percepción de destellos luminosos en ausencia de estímulos visuales. Esta invención podrá ser implantada en pacientes cuyo nervio óptico continúe funcionando, pero el investigador advierte que es difícil que les sirva a personas adultas que nacieron ciegas, ya que es probable que sus cerebros no reconozcan las imágenes producidas.

4.2.4 Textiles

No cabe duda de que la NT estará en todos los materiales de la industria textil, los nanotextiles son materiales fibrosos a nanoescala que pueden ser funcionalizados con una amplia gama de nuevas propiedades, incluyendo actividad antibiótica, auto limpieza y la capacidad de aumentar dichas propiedades (Ratiu, 2015).

Estos materiales se utilizan no sólo como tela, sino como materiales filtrantes y gasas para curar heridas. Esto es posible gracias a desarrollos de nuevos materiales, fibras y acabados; polímeros inherentemente conductores; nanotubos de carbón y antimicrobianos.

En los últimos años se ha demostrado que la NT puede utilizarse para mejorar los atributos textiles, como la suavidad del tejido, durabilidad y transpirabilidad, repelencia al agua, resistencia al fuego, así como propiedades antimicrobianas en las fibras, hilos y tejidos (Ratiu, 2015).

El desarrollo de nanotextiles inteligentes tiene el potencial de revolucionar la producción de fibras, telas y la funcionalidad de nuestra ropa y todo tipo de productos textiles y aplicaciones. La NT es considerada una de las tecnologías más prometedoras para el siglo XXI. Hoy se dice que si la NT es hoy la ola del presente, también será la ola del futuro.

4.2.5 Alimentación y Agricultura

En la industria agroalimentaria, la NT brinda grandes oportunidades para la obtención de productos y aplicaciones innovadoras para la agricultura y la ganadería, el tratamiento de las aguas y la producción, elaboración, conservación y envasado de los alimentos. Para ello, se utilizan una gran diversidad de nanomateriales, que van desde metales y óxidos de metales inorgánicos a nanomateriales orgánicos que llevan ingredientes bioactivos (Ávalos-Fúnez *et al.*, 2016). La NT permite buscar aplicaciones en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos, desde el manejo agronómico, hasta el procesamiento y embalaje de alimentos (Berekaa, 2015)

4.2.5.1 Alimentación

Generalmente las NPs usadas para la alimentación se dividen en 3 grupos (Peters *et al.*, 2014): NPs orgánicas, NPs combinadas orgánico/inorgánico (superficie modificada) y las NPs inorgánicas. La mayoría de las aplicaciones con NPs orgánicas se deben a la encapsulación de aditivos (vitaminas, antioxidantes, colorantes). Estos nanoencapsulados consisten generalmente en micelas, liposomas o nanoesferas y suelen ser considerados como materiales seguros y de bajo impacto ambiental (Peters *et al.*, 2011).

Las NPs combinadas, también llamadas NPs funcionalizadas, son NPs que añaden cierto tipo de funcionalidad, como puede ser la actividad antimicrobiana. Un ejemplo de este material son las nanoarcillas usadas para el desarrollo de envases alimentarios (Singla *et al.*, 2012). Finalmente,

las NPs inorgánicas constan de metales, principalmente NPs de metales oxidados cuya aplicación mayoritaria consiste en el desarrollo de envasado de alimentos. Entre los metales más usados están las NPs de plata, hierro, calcio, magnesio, selenio, dióxido de silicio y dióxido de titanio (Weir *et al.*, 2012).

4.2.5.2 Agricultura

En referencia a la aplicación de la NT en la producción agrícola destacan: la mejora de la productividad optimizando el uso del agua, los fertilizantes, los productos fitosanitarios y la protección fitosanitaria. Sin embargo, en la actualidad solo unos pocos productos están comercializados, y la mayoría de las aplicaciones se encuentran en la etapa de desarrollo (Perlatti *et al.*, 2012).

Una de las principales aplicaciones de las NPs son los pesticidas, como por ejemplo el uso de nano-encapsulados para liberación de pesticidas y otras sustancias químicas Kah *et al.* (2012), con la consecuente ventaja de controlar mejor su liberación en el medio ambiente y su movimiento. Es decir, los recubrimientos pueden permitir que las NPs no se adhieran a las plantas debido a su afinidad y así no se produzca la acumulación de esta sustancia tóxica en la planta. También la liberación del compuesto se produce más lentamente y por tanto no hay problemas de sobredosis temporal, minimizando la contaminación.

Además, la NT no solo puede proteger los cultivos y productos alimenticios de plagas, sino que también se emplea para aumentar la producción y calidad de los cultivos (Kole *et al.*, 2013).

Fertilizantes en forma de nanoemulsiones se utilizan para aumentar la potencia de ingredientes activos o para reducir potencialmente la cantidad de fertilizante que debe ser aplicado (Barati, 2010).

Otras de las aplicaciones de las NPs en la agricultura son la gestión de residuos agrícolas mediante nanofibras de algodón, el proceso de purificación del agua y la limpieza de suelos (FAO, 2010).

La mayoría de los estudios reportados apuntan a los efectos positivos de las NPs sobre el crecimiento de plantas. El uso cuidadoso y juicioso de la NT puede garantizar la seguridad alimentaria, a través del incremento en la producción del sector primario, ya que su principal efecto es la mejora en el crecimiento de plantas y rendimiento de la cosecha. No obstante, se requiere la experimentación exhaustiva para establecer la concentración adecuada, el tamaño y la forma de aplicación (Razzaq *et al.*, 2016).

4.3 Uso de Nanopartículas en la Agricultura

La demanda mundial de nanomateriales aumentará más de dos veces y media a 5.500 millones de dólares en 2016, impulsado por una combinación del aumento de la penetración en el mercado de los materiales existentes y el desarrollo continuo de nuevos materiales y aplicaciones. (Ratiu, 2015)

La investigación sobre las aplicaciones de la NT para su uso en la agricultura se ha vuelto cada vez más popular en la última década, con un interés particular en el desarrollo de nuevos nano agroquímicos en forma de los llamados "nanopesticidas" y "nanofertilizantes". (Lira-Saldivar *et al.*, 2016).

Sobre el tema, muchos autores han previsto una revolución en las prácticas agrícolas actuales (Kah, 2015).

4.3.1 Aplicación de la Nanotecnología en semillas

Una buena semilla es la base principal para el aseguramiento de un cultivo productivo, existen cuatro tipos de atributos de calidad (físico, genético, fisiológico y sanitario) cuando la semilla cuenta con estas cuatro cualidades los agricultores tienen mayores probabilidades de producir un cultivo sano y con mayor rendimiento, aunque también existen otros factores a tomar en cuenta para el éxito de un cultivo, como son la lluvia, el suelo, las prácticas agronómicas y manejo de plagas.

Sin embargo, la calidad de las semillas disminuye con el transcurso del tiempo, y la tasa de deterioro depende de las condiciones ambientales durante el almacenamiento y el tiempo en que estas permanecen almacenadas. El primer componente de la calidad que muestra señales de deterioro es el vigor de las semillas, seguido por una reducción en la germinación o de la producción de plántulas normales, y finalmente la muerte de las semillas (Ferguson, 1995).

Chinnamuthu y Boopathi (2009) indican que la NT ofrece como herramienta la aplicación de NPs, que tienen la cualidad de mejorar la germinación de las semillas y los parámetros fisiológicos relacionados, para optimizar la capacidad de absorción, degradación de reservas y división celular.

El efecto de las NPs comienza a manifestarse desde la germinación de las semillas, reflejándose en una mayor emergencia y uniformidad que se

observa en la germinación final, debido principalmente a la penetración de nanomateriales en la semilla, lo que permiten aumentar la imbibición de agua y micronutrientes, acelerando la degradación de reservas, y beneficiando a las primeras etapas del proceso germinativo. (Mahmoodzadeh *et al.*, 2013).

Como ejemplo se puede mencionar el estudio realizado por Prasad *et al.* (2012), el cual indica que semillas de cacahuete tratadas con NPsZnO a una concentración de 1000 mg L^{-1} promovió la germinación, así como la elongación de raíz y tallo de las plantas.

Estudios realizados con semillas de tomate, aplicando tratamientos de NPs sobre papel en cajas Petri por 24 h, con diferentes niveles de NPsCu y MPsCuSO₄ (micro partículas de CuSO₄) en concentraciones de: 0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 y 50 ppm, revelaron que las NPsCu a 5 y 10 ppm promovieron mayor vigor de germinación de las semillas, superando estadísticamente ambos tratamientos al testigo. Por otra parte, el tratamiento con 10 ppm incrementó la longitud del tallo y el tratamiento con 5 ppm la longitud de radícula, en ambas variables los resultados mostraron diferencias estadísticas con respecto al testigo (Ruiz Torres *et al.*, 2016).

En el mismo sentido Siddiqui y Al-Whalbi (2013) mencionan que la aplicación de NPs SiO₂ del tamaño de 12 nm mejoró significativamente la germinación de semillas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill), siendo la concentración de 8 g/L^{-1} de NPs SiO₂ la que incrementó de manera significativa el porcentaje de germinación de semillas, así como el tiempo de germinación, índice de vigor, biomasa fresca y seca de plántulas.

Por otra parte, Savithramma *et al.* (2012) encontró que la aplicación de NPs de plata (Ag) sobre semillas del árbol medicinal *Boswellia ovalifoliolata*, endémico y amenazado en la India, mejora la germinación de estas semillas.

El experimento determinó la germinación de semillas en medio Murashige y Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento, a cuatro concentraciones diferentes (0, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) de NPs Ag. Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos con NPs Ag lograron una germinación del 95%, mientras que el testigo solamente obtuvo 70% de germinación.

Las semillas tratadas con NPs Ag tardaron solo 10 días en germinar, mientras que el testigo se retardó 10 días más; en cuanto a la altura máxima observada (10.6 cm) se detectó en las plántulas tratadas con NPs Ag. Estos resultados se atribuyen a la posibilidad de penetración de las NPs Ag y agua a través de la capa de semilla acelerando la germinación y el crecimiento de plántulas de *B. ovalifoliolata*.

Lin y Xing (2007), experimentaron con la aplicación de diversas NPs (nanotubos de carbono de paredes múltiples, aluminio, alúmina, zinc y óxido de zinc) en seis especies: rábano, colza, centeno, lechuga, maíz y pepino, encontrando que la aplicación de las NPs ZnO no afecta la germinación de la mayoría de las especies, a excepción del maíz, con la aplicación de 2000 mg L^{-1} ; sin embargo a bajas concentraciones se promueve el crecimiento de raíces en la mayoría de las especies.

En contraparte Hojjat y Hojjat (2016), mencionan que la aplicación de NPs Ag no influyó sobre la germinación en semillas de lenteja, aunque la interacción de la semilla con las NPs disparó el crecimiento de la longitud de

la raíz y la acumulación de materia seca. Por lo tanto, el efecto de las NPs en semillas y plantas puede ser positivo o negativo dependiendo de la concentración de NPs aplicada, así como del tipo de NPs, ya sean metálicas o derivadas del carbono. Una preocupación para la aplicación de NPs en la germinación de las semillas es su fitotoxicidad en altas concentraciones (Castiglione y Cremonini, 2009); este mismo efecto puede ser detectado con casi cualquier agroquímico que se utilice en exceso en las prácticas agronómicas

4.3.2 Aplicación en plantas: Nanofertilizantes y Nanopesticidas

Los nanofertilizantes son una nueva generación de fertilizantes sintéticos que contienen nutrientes fácilmente disponibles en el rango de nanoescala. (Janmohammad *et al.*, 2016). Los nanofertilizantes pueden suministrar uno o más nutrientes a las plantas y aumentar el crecimiento y rendimiento de las estas o mejorar el rendimiento de los fertilizantes convencionales.

Estos nanocompuestos son una de las opciones potencialmente eficaces para la mejora significativa de la producción mundial de alimentos. Los nanofertilizantes pueden clasificarse como macronutrientes y micronutrientes. En comparación con los fertilizantes convencionales, los nanofertilizantes se usan con el objetivo de mejorar la eficiencia de estos agroquímicos, para apoyar la reducción de las pérdidas de nutrientes y minimizar los efectos ambientales adversos (Ruiqiang y Rattan, 2016).

Janmohammadi *et al.* (2016) en un estudio realizado en papa, mencionan que la aplicación de Zn + B en forma de nanofertilizante y de N-P-K nanoquelados, aumentó significativamente la altura de la planta, el número de tallos, el diámetro del tallo principal y el número de hojas, además aceleró el cierre de la hilera de papa debido al gran desarrollo del área foliar.

La aplicación del nanofertilizante disminuyó notablemente el número de días hasta la iniciación de la tuberización. La evaluación del efecto de las NPs en los componentes del rendimiento de los tubérculos, reveló que el mayor número por planta, el peso medio, el peso de estos por planta y el índice de cosecha, se obtuvieron mediante la aplicación de un nanofertilizante completo.

En el mismo sentido, Janmohammadi *et al.* (2016) realizaron un estudio con aplicación de nanofertilizantes en plantas de cebada, sus resultados indican que las plantas se trataron separadamente con suspensiones de óxido de zinc (ZnO) quelatado y óxido férrico (Fe_2O_3) durante la fase de formación de tallos, arranque y etapas lechosas del grano. Los resultados revelaron que los días a floración y la madurez aumentaron significativamente después de la aplicación de ambos nanofertilizantes. Además, se observó una mejora considerable en la masa de grano, la longitud de espiga, el número de granos por espiga, el contenido de clorofila, el rendimiento de grano y el índice de cosecha.

En el tema de los pesticidas, estos se usan comúnmente en la agricultura para mejorar el rendimiento y la eficiencia de los cultivos, en este sentido los nanopesticidas son una de las nuevas estrategias que se utilizan para

abordar los problemas ocasionados por los pesticidas comunes (Sasson *et al.*, 2007).

El término nanopesticida abarca una amplia variedad de productos y no puede considerarse que represente una sola categoría. Muchas nanoformulaciones combinan varios polímeros y NPs metálicas en el tamaño nanométrico. Las nanoformulaciones son generalmente comunes a otras formulaciones de pesticidas, que consisten en aumentar la solubilidad aparente de los ingredientes activos poco solubles, liberar el ingrediente activo de una manera lenta, dirigida y o proteger contra la degradación prematura (Kah *et al.*, 2013).

Lira Saldívar *et al.* (2014) mencionan que en los estudios realizados usando NPs de Cu y ZnO contra el hongo *Botrytis cinerea*, el tratamiento testigo tuvo mayor crecimiento, registrando 64.54 mm de diámetro de la colonia en la caja de Petri, mientras que el tratamiento con NPsCu a 1000 y 500 ppm, registraron 18.12 cm y 21.02 mm de diámetro respectivamente. Estos tratamientos son los que tuvieron el mejor efecto respecto a la inhibición del crecimiento del hongo reportando 71.92% y 67.44% con respecto al control. La mezcla de NPsCu y ZnO resultó ser efectiva, ya que lograron una inhibición del crecimiento micelial del hongo de 53.49%.

En el mismo sentido, Adack *et al.* (2012) evaluaron la bioeficacia de las formulaciones del insecticida comercial Imidacloprid contra plagas importantes del cultivo de soya como: la mosca del tallo (*Melanagromyza sojae* Zehntmer) y la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius). La mayoría de las formulaciones de Imidacloprid mostraron un mejor control de las plagas en comparación con sus formulaciones comerciales.

Por otro lado, también se han probado nanoherbicidas comparando el efecto del nanoencapsulado con productos comerciales, como ejemplo se menciona el estudio realizado por Oliveira *et al.* (2015), en el que utilizaron nanoencapsulados de Atrazina, un herbicida que puede tener efectos nocivos en el medio ambiente.

En este caso, la actividad herbicida post-emergente de las nanocápsulas que contenían Atrazina se evaluó utilizando plantas de mostaza (*Brassica juncea*). El tratamiento de las plantas con nanocápsulas que contenían atrazina en la dosis de 1 mg mL^{-1} dio como resultado una disminución de la fotosíntesis neta y un aumento de la peroxidación lipídica de las hojas, lo que condujo a la inhibición del crecimiento de los brotes y a la aparición de síntomas severos de deterioro y deshidratación. El análisis se realizó 72 h después de la aplicación de los tratamientos, mostrando que la nanoencapsulación de la Atrazina aumenta la actividad herbicida en comparación con una formulación comercial de la misma.

Dicho resultados sugieren que las aplicaciones *in vivo* e *in vitro* de nanopesticidas funcionan para el control de plagas y enfermedades que afectan los cultivos y por ende la producción y rendimiento de los mismos, siendo estos nanoencapsulados una opción para el tratamiento de dichos factores, sin embargo, es necesario un estudio más a fondo para comprobar si existe algún efecto adverso contra los agroecosistemas.

4.4 Toxicidad

Puesto que el uso de NPs en cualquier área o enfoque es relativamente nuevo, se desconoce los posibles efectos de la aplicación de dichas NPs tanto a la salud humana como fitotoxicidad, debido a que se cuenta con relativamente poca información sobre la concentración necesaria por tipo de NPs para aplicar a cultivos y su posible efecto en el ambiente.

Existen autores que afirman que el uso de dichos nanomateriales es peligroso y nocivo para los cultivos, la salud y el ambiente, como ejemplo podemos citar a Zarate et al. (2016), quienes realizaron un estudio con el objetivo de evaluar la respuesta fisiológica de *Azolla filiculoides* a la presencia de dos tamaños de NPs ZnO: NPs grado analítico (NPs, 26.7 ± 1 nm) y partículas submicrométricas (SMPs, 238 ± 30.7 nm) grado farmacéutico, en tres concentraciones (100, 200, y 400 mg L^{-1}), y un testigo. Los resultados indicaron que la concentración de 400 mg NPs ZnO redujo el crecimiento de las plantas, así como la concentración de los pigmentos clorofilas, carotenos y xantofilas.

La fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m) se redujo en todas las concentraciones de partículas ensayadas, comparadas con el testigo, especialmente con NPs que fueron más tóxicas que las SMPs. Las NPs redujeron la actividad antioxidante total y compuestos fenólicos totales con respecto a las SMPs. La actividad de la enzima nitrogenasa disminuyó en todas las concentraciones de partículas de ZnO, independiente del tamaño.

Autores como Gutiérrez Praena et al. (2009) mencionan que la exposición humana a estas NPs se puede producir principalmente por las vías

respiratorias (NPs suspendidas en el aire), dérmica (NPs ambientales y cosméticos) y oral (alimentos y agua). Por vía pulmonar las NPs activan los mecanismos de defensa o son internalizadas en los intersticios. Por vía dérmica se pueden acumular en el estrato córneo o en los folículos pilosos, o bien atravesarlo y acumularse en la dermis. Por vía oral pueden ser absorbidas por las células epiteliales del intestino. La exposición también se puede producir a través de la instrumentación médica o prácticas clínicas, ya que se usan, por ejemplo, en el tratamiento y diagnóstico del cáncer de mama y en el control de infecciones en cirugía.

Una vez que las NPs han sido absorbidas, se distribuyen por vía sanguínea y linfática, alcanzando diferentes órganos, tales como huesos, riñones, páncreas, bazo, hígado y corazón, en los que quedan retenidas y ejercen sus efectos tóxicos. La toxicidad de estas NPs depende, entre otros factores, de su persistencia en los órganos y de si el hospedador puede provocar una respuesta biológica para eliminarlas. Los mecanismos de toxicidad no se conocen con exactitud, aunque parece ser que se incluyen daño en membranas celulares, disrupción del potencial de las membranas, oxidación de proteínas, genotoxicidad, formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) e inflamación de los tejidos.

Finalmente es importante mencionar que se necesitan estudios exhaustivos para comprobar realmente los posibles efectos tóxicos en plantas y humanos, que podrían generar el uso de nanomateriales, y de ser así tomar las medidas correspondientes para evitar futuros daños en los enfoques antes mencionados.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en dos fases durante los meses Enero-Febrero del 2017 en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada a 6 km al sur de Saltillo, Coahuila, México.

5.2 Preparación de las soluciones con nanopartículas

Las soluciones con NPs y con MPs (ZnO y FeSO₄) fueron preparadas en las concentraciones de 0, 5 y 10 mg L⁻¹ en agua destilada, posteriormente fueron dispersadas en un ultrasonicador Branson 2510, durante 20 minutos.

5.3 Imbibición de semillas

Para determinar el efecto de NPs y MPs en la germinación de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*) variedad Grey zucchini, se establecieron bioensayos *in vitro* que constaron de cuatro tratamientos, a dos concentraciones, cada uno con su respectivo testigo (Cuadro 1). Cada tratamiento constó de 150 semillas divididas en seis repeticiones de 25 semillas cada una.

Una vez contabilizadas las semillas se trataron con dos aplicaciones de las soluciones respectivas de NPs y de MPs en cajas Petri sobre una doble capa de papel filtro. La primera aplicación de NPs y MPs se realizó tras la agitación de las soluciones en un agitador Vortex marca Labnet VX100 durante 7 minutos, vertiendo 30 mL⁻¹ de la soluciones preparadas, la

segunda aplicación constó de la aplicación de 20 mL⁻¹ más de las soluciones, la cual se realizó 24 horas después de la primera aplicación. Siendo así la aplicación total de 50 mL⁻¹ de NPs o de MPs dejándose imbibir durante 48 horas.

Posterior al tratamiento y con la ayuda de pinzas de disección las semillas se sembraron entre dos capas de papel Anchor con agua destilada, enrollándolos en forma de tacos, estos fueron metidos en bolsas de polietileno transparentes y colocados en contenedores PET, para luego ser introducidos a una cámara bioclimática marca Thermo Scientific a una temperatura de 25°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Los ensayos se establecieron en un diseño completamente al azar.

Cuadro 1. Tratamientos con MPs de FeSO₄ y de ZnO, y con NPs de ZnO puras otras de ZnO + Fe, aplicadas en semillas de calabaza en condiciones de laboratorio.

Tratamiento NP o MP	Concentración (ppm*)
MPs FeSO₄	0
	5
	10
NPs ZnO	0
	5
	10
MPs ZnO	0
	5
	10
NPs ZnO + Fe	0
	5
	10

*ppm = partes por millón; NPs = nanopartículas; MPs = micropartículas.

5.4 Variables evaluadas en las semillas germinadas:

- **Primer conteo de plántulas normales**, se realizó 5 días después de la siembra, esta evaluación es un indicador del vigor que posee la semilla para germinar en menor tiempo y establecerse en condiciones de campo, el resultado fue expresado en porcentaje.
- **Plántulas normales (PN)**, al final del bioensayo se realizó un segundo conteo de plántulas normales. Se entiende por plántulas normales aquellas que poseen todas sus partes (radícula y plúmula) sin ninguna anomalía visible.
- **Plántulas anormales (PA)**, todas aquellas que carecen de plúmula o radícula, o presentan un desarrollo irregular de alguna de sus estructuras, el resultado fue expresado en porcentaje.
- **Semillas sin germinar (SSG)**, todas aquellas semillas duras o muertas que no tuvieron la capacidad de germinar, el resultado se expresó en porcentaje.
- **Longitud media de plúmula (LP) y Longitud media de radícula (LR)**, se midieron todas las plántulas normales por repetición, esto es que no presentaran rasgo alguno de anomalía, la medida fue expresada en cm.
- **Peso seco (PS)**, esta variable se obtuvo una vez determinadas todas las anteriores, se realizó después de un secado de aquellas plantas consideradas normales, el secado tuvo una duración de 24 horas en una estufa marca Riosa H-48 a 72°C. Pasadas las 24 horas se extrajeron, y se dejaron en un desecador, para posteriormente ser

pesadas en una balanza analítica marca Precisa BJ610C, el resultado fue expresado en mg/plántula.

El experimento se estableció utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Los datos de las variables evaluadas de cada uno de los bioensayos, se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos (NPs y MPs), y entre concentraciones, posteriormente se realizó una comparación de medias con la Prueba de Tukey, para establecer el orden de eficiencia de tratamientos (0, 5 y 10 ppm), utilizando el programa SAS Inc. (2008).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acorde con los resultados obtenidos en el análisis de varianza del bioensayo de semillas de *Cucurbita pepo* var. Grey zucchini expuestas a diferentes concentraciones de NPs y de MPs, en la fuente de variación del tratamiento (MPsFeSO₄, NPsZnO, MPsZnO y NPs ZnO+Fe).

Los resultados obtenidos mostraron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) para las variables vigor, longitud media de plúmula y de radícula; mientras que para la variable semillas sin germinar se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Por otra parte, para la variación concentración de NPs (0, 5 y 10 ppm) se encontraron diferencias ($P \leq 0.01$) para las variables vigor, longitud media de plúmula y de radícula. En cuanto a la interacción tratamiento x

concentración, se detectaron diferencias ($P \leq 0.01$) para las variables vigor, germinación, longitud de plúmula y de radícula (Cuadro 2). Lo anterior señala claramente que el tipo de NP o de MP y la concentración, afectó la respuesta fisiológica de algunas de las variables en estudio.

Al comparar las medias por tratamiento para las variables estudiadas (Cuadro 3), se encontró que la aplicación de las NPs de Zn + Fe (NPsZnFe) modificó la expresión de las variables vigor, longitud media de plúmula y longitud media de radícula, existiendo diferencias estadísticas en relación a los tratamientos.

Se observó que las NPsZnFe tienen un efecto positivo en la velocidad de germinación de las semillas, favoreciendo también el desarrollo de plántulas, indicando una mayor elongación celular, sin presentarse diferencias en peso seco, ya que no se obtuvieron diferencias en esta variable. El vigor de germinación debido al efecto de la aplicación de NPsZnFe mostró una diferencia de 19.3 y 20.6% respectivamente con respecto al testigo, para las concentraciones de 5 y 10 ppm. En cuanto a las longitudes de plúmula y radícula, se consignó que la aplicación de NPsZnFe durante el periodo de imbibición, mejora su expresión, resultando eso en diferencias estadísticas con respecto a los otros tratamientos. Los resultados antes expresados se encuentran descritos en las gráficas en el apartado de Anexos.

Lo anterior indica que estas NPs tienen un efecto promotor del vigor, el cual está íntimamente relacionado con el metabolismo que se realiza durante el proceso de germinación. Desde el punto de vista bioquímico, el vigor involucra la capacidad que tiene un organismo para la biosíntesis de energía y compuestos metabólicos, como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos

y lípidos. Todo ello asociado a la actividad celular, la integridad de las membranas celulares y el transporte o utilización de sustancias de reserva.

El Cuadro 4 indica que para obtener un mayor vigor de plántula se deberán aplicar 10 ppm de las NPs de Zn + Fe (NPsZnFe), promoviendo también un mayor crecimiento de plúmula. Sin embargo, la aplicación de 5 ppm promueve el vigor y la elongación de radícula, factor importante en el establecimiento de las plantas en condiciones de campo. La manifestación del vigor en la germinación se muestra con rapidez, uniformidad e intensidad, al igual que la tolerancia de las plántulas a las condiciones ambientales desfavorables.

Los efectos del vigor pueden permanecer e influir en el crecimiento de la planta adulta, en la uniformidad de la cosecha y en el rendimiento de la especie. Adicionalmente, el vigor afecta la viabilidad de la semilla.

El vigor es un parámetro sumamente importante en la calidad fisiológica de las semillas, ya que es considerado como la habilidad para la emergencia en condiciones ambientales desfavorables y el desempeño de las semillas posterior al almacenamiento, particularmente en la retención de la capacidad germinativa (Hampton y Tekrony, 1995).

Por su parte Navarro (2009) indica que el vigor puede ser considerado como la interacción de aquellas propiedades bióticas y abióticas que tienen influencia en las semillas y que determinan su nivel de actividad y su comportamiento en el tiempo: las expresiones de viabilidad, la dormancia, la germinación y la emergencia. Por ello, el vigor no puede ser desvinculado como parte esencial de la calidad de las semillas.

Las semillas suelen presentar el mayor vigor y potencial germinativo una vez que han alcanzado la madurez fisiológica, de modo que es importante realizar pruebas, y con ello determinar el efecto de las NPs en el vigor, bajo diferentes condiciones (laboratorio, invernadero y campo).

Las pruebas de vigor de semillas están basadas en conceptos como la resistencia al estrés, la velocidad de germinación, la integridad de las membranas y el desarrollo de plántulas (Matthews et al. 2012). Sobre la base de las tecnologías disponibles y los descubrimientos fisiológicos recientes, los métodos de evaluación están en constante mejora (Kodde et al. 2012).

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para ensayo de germinación en semillas de calabaza *Cucúrbita pepo*.

F.V	G.L	Vigor (%)	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	G.L	LP (cm)	LR (cm)
TRAT	3	1085.03**	144.81NS	20.37NS	261.33*	17.15NS	3	322.59**	534.77**
CONC	2	854.00**	118.22NS	6.88NS	181.55NS	91.24NS	2	184.48**	392.52**
TRAT*CONC	6	230.59**	262.81**	53.70NS	99.77NS	72.49NS	6	70.53**	232.23**
Error	60	63.28	65.28	65.55	92.62	169.37	1,178	6.09	7.83
Total	71	2,232.91	591.12	146.50	635.27	350.25	1,189	583.69	1,167.35
C.V%		51.80	12.31	52.99	50.35	17.69		20.79	22.47

*, ** = Niveles de significancia al 0.05 y 0.01 respectivamente; NS = no significativo; GL = grados de libertad; Vigor = plántulas normales al primer conteo; Germinación = plántulas normales al segundo conteo; PA = plántulas anormales; SSG = semillas sin germinar; PS = peso seco; LP = longitud de plúmula; LR = longitud de radícula.

Cuadro 3. Comparación de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semillas de calabaza *Cucúrbita pepo* por tratamiento.

Tratamiento	Vigor (%)	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	LP (cm)	LR (cm)
NPsZnFe	25 a	65 a	16 a	19 ab	72.8 a	13.3 a	14.2 a
NPsZnO	18 b	66 a	15 a	19 ab	74.6 a	12.0 b	11.2 c
MPsFeSO ₄	10 c	70 a	16 a	14 b	72.5 a	11.2 c	12.5 b
MPsZnO	8 c	62 a	14 a	24 a	74.0 a	10.9 c	11.7 c
Media	15	66	15	20	73.5	11.8	12.4
Tukey ($\alpha = 0.05$)	7.0	7.1	7.1	8.4	11.4	0.5	0.5

Valores con la misma literal en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$); Vigor = plántulas normales al primer conteo; Germinación = plántulas normales al segundo conteo; PA = plántulas anormales; SSG = semillas sin germinar; PS = peso seco; LP = longitud de plúmula; LR = longitud de radícula.

Cuadro 4. Comparación de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semillas de calabaza *Cucúrbita pepo* por concentración.

Concentración (ppm)	Vigor (%)	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	LP (cm)	LR (cm)
0	9 b	63 a	15 a	22 a	75.7 a	11.0 c	11.4 c
5	18 a	68 a	16 a	17 a	72.7 a	12.0 b	13.2 a
10	20 a	66 a	16 a	18 a	72.1 a	12.4 a	12.6 b
Media	15	65	15	19	73.5	11.8	12.4
Tukey ($\alpha = 0.05$)	5.5	5.6	5.6	6.6	9.0	0.4	0.4

Valores con la misma literal en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$); ppm = partes por millón; Vigor = plántulas normales al primer conteo; Germinación = plántulas normales al segundo conteo; PA = plántulas anormales; SSG = semillas sin germinar; PS = peso seco; LP = longitud de plúmula; LR = longitud de radícula.

En el reporte de Juárez *et al.* (2016) se señala que el uso de NPs en la agricultura puede ser favorable, mejorando el crecimiento de plántulas asegurando de alguna manera el rendimiento y calidad del fruto.

Trabajos que se han desarrollado con la aplicación de NPs en diversas especies agrícolas indican que al menos las NPs de ZnO promueven la germinación y el crecimiento de plántulas (Siddiqui *et al.*, 2015). En el mismo sentido Krishna y Natarajan (2014), consignan que las NPs de Zinc (ZnO), mejoran la velocidad de germinación en semillas de cacahuate. Los efectos beneficiosos de las NPs podrían atribuirse a una mayor producción de enzimas responsables de las reacciones metabólicas. Por otra parte, se argumenta que podrían incrementar los niveles de la hormona ácido indolacético (AIA), en las raíces o brotes, que a su vez pueden incrementar el vigor de las semillas y por ende el crecimiento de plántulas.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo mencionado por Prasad *et al.* (2012), en el cual indican que en semillas de cacahuate tratadas con NPs de ZnO a una concentración de 1000 mg L^{-1} promovió la elongación de raíz y tallo. Esto es similar a lo reportado por Zafar *et al.* (2016), quienes indican que concentraciones bajas de NPs de ZnO ($1\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$) promueve la producción de raíces finas y blancas, lo cual es claro indicador de buena sanidad de las raíces.

En un trabajo realizado por Lin y Xing (2007), donde probaron la aplicación de diversas NPs (nanotubos de carbono de paredes múltiples, aluminio, zinc y óxido de zinc) en seis especies (rábano, colza, centeno, lechuga, maíz y pepino), se encontró que la aplicación de las NPs de ZnO no afectan la germinación de la mayoría de las especies, a excepción del maíz, con la

aplicación de 2000 mg L⁻¹, sin embargo a bajas concentraciones se promueve el crecimiento de raíces en la mayoría de las especies, demostrando de esta manera que las NPs pueden actuar en forma benéfica o no, dependiendo del tipo, especie y concentración a la que sean aplicadas.

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las NPs compuesta de Zn + Fe (NPZnFe) a una concentración de 10 ppm, aplicadas durante el periodo de imbibición en semillas de *Cucurbita pepo* var. Grey zucchini, tienen un efecto positivo en el vigor y en el incremento de la longitud de plúmula. Sin embargo, a una concentración de 5 ppm el vigor también se ve incrementado, así como la longitud de radícula, observándose que estas NPs favorecen el desarrollo de plántulas, promoviendo el crecimiento tanto de plúmula como de radícula, esto debido principalmente a la promoción de la elongación celular. Así mismo se observó que las NPsZnO, presentaron una tendencia similar.

Este trabajo reforza las observaciones de que el vigor está asociado a la actividad celular, a la integridad de las membranas celulares y el transporte o utilización de sustancias de reserva durante el proceso de germinación.

Es importante señalar que el uso de NPs como las de ZnO y Fe, pudiesen ser empleadas en apoyo a programas de agricultura sustentable, toda vez que sean empleadas en muy pequeñas cantidades, por lo que su uso es amigable con los agroecosistemas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adack, T., J. Kumar, N. A. Shakil, y S. Walia. 2012. Development of controlled release formulations of imidacloprid employing novel nano-ranged amphiphilic polymers. *Journal of Environmental Science and Health: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 47:217-225. DOI:<http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2012.634365>.
- Ávalos Fúnez, A., A. I. Haza Duaso, y P. Morales Gómez. 2016. Nanotechnology in the food industry: Applications. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. pp. 2-4.
- Ball, P. 2002. Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnology*. pp. 15-20.
- Barati, A. 2010. Nano-composite superabsorbent containing fertilizer nutrients used in agriculture. Patent application: Pub. No.: US 2010/0139347 A1 .
- Berekaa, M. M. 2015. Nanotechnology in Food Industry: Advances in Food processing, Packaging and Food Safety. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. pp. 345-350.
- Chinnamuthu, C. R., y P. Murugesu Boopathi. 2009. Nanotechnology and Agroecosystem. *Madras Agric*. 96: 17-19.
- Crawford Geoffrey, J., C. R. Hicks, L. Xia, S. Vijayasekaran, D. Tan, B. Mulholland, C. V. Traian, J. Lan. 2006. Constable The Chirila Keratoprosthesis: phase I human clinical trial Abstract. *Ophthalmology*. 88-91.
- Durán Ospina, P. 2007. Nanotecnología: presente y futuro de las ciencias de la salud visual. *Investigaciones Andina*. pp 81-91.
- FAO. 2010. FAO/WHO Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications Meeting report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.

- Ferguson, J. 1995. An introduction to seed vigor testing. In: Seed vigor testing seminar. Zurich: International Seed Testing Association. pp. 1-9.
- Gutiérrez Praena , D., A. Jos, S. Pichardo, M. Puerto, E. Sánchez Granados, A. Grilo y A. M. Cameán. 2009. Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. *Revista de Toxicología*. 26: 87-92.
- Hampton, J.G. and D.M. Tekrony. (1995). *Handbook of vigour test methods*. 3rd Edition. International Seed Testing Assoc. Zürich, Switzerland. pp.117.
- Janmohammadi, M., N. Pornour, A. Javanmard, y N. Sabaghnia. 2016. Effects of bio-organic, conventional and nanofertilizers on growth, yield and quality of potato in cold steppe. *Botanica Lithuanica*. 22(2): pp 133–134. DOI: <https://doi.org/10.1515/botlit-2016-0014>.
- Janmohammadi, M., T. Amanzadeh, N. Sabaghnia, y S. Dashti. 2016. Impact of foliar application of nano micronutrient fertilizers and titanium dioxide nanoparticles on the growth and yield components of barley under supplemental irrigation. *Acta Agriculturae Slovenica*. 107 (2). pp 265-276. DOI: [10.14720/aas.2016.107.2.01](https://doi.org/10.14720/aas.2016.107.2.01).
- Juárez, A., H. Ortega Ortíz, F. Pérez Labrada, G. Cadenas Pliego, and A. Benavides Mendoza. (2016). Cu Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological, production, and quality characteristics of tomato. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 89:183-189.
- Kah, M. 2015. Nanopesticides and nanofertilizers: emerging contaminants or opportunities for risk mitigation?. *Frontiers in chemistry*. 3:64. Doi [10.3389/fchem.2015.00064](https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00064).
- Kah, M., S. Beulke, K. Tiede, and T. Hofmann. 2012. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. pp 1823- 1826. DOI: [10.1080/10643389.2012.671750](https://doi.org/10.1080/10643389.2012.671750).

- Karunaratne, D. N. 2007. Nanotechnology in medicine. *Journal of Natural Science*. 35(3): 149-152
- Kodde, J., Buckley, W.T., Groot, C.C., Retiere, M., Zamora, A. M. V. & Groot, S.P.C. 2012. A fast ethanol assay to detect seed deterioration. *Seed Science Research*. 22:55
- Kole, C., P. Kole, K. Manoj Randunu, P. Choudhary, R. Podila, P. Chun Ke, A. Rao, M. Marcus, K. Richard. 2013. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytochemistry content in bitter melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnology*. DOI: 10.1186/1472-6750-13-37.
- Krishna, K. and N. Natarajan. (2014). Customizing zinc oxide, silver and titanium dioxide nanoparticles for enhancing groundnut seed quality. *Indian Journal of Science and Technology* 7(9):1376-1381.
- Lechuga, L. M. 2011. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. *Biotecnología aplicada a la salud humana*. pp. 98-100.
- Lin D., and B. Xing. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. pp. 247–249
- Lira Saldivar, R. H., R. Betancourt Galindo, L. A. García Cerda, B. Puente Urbina. Departamento de Agroplasticultura, J. Corrales Flores, M. Hernández Suárez, Depto. Parasitología UAAAN, Depto. de Materiales Avanzados CIQA. 2014. Actividad antifúngica de nanopartículas de cobre y óxido de zinc-plata contra *Botrytis cinerea*. Congreso Internacional Metalurgia y Materiales, At Monclova, Coah., México. Volume:7. pp. 4-7.
- Lira Saldivar, R., A. Hernández, L. A. Valdez, A. Cárdenas, L. Ibarra, M. Hernández, N. A. Ruiz Torres. 2014. *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradices* co-inoculation stimulate growth and yield of cherry tomato under shade house conditions. *Phyton International Journal of Experimental Botany*. pp. 133-138.

- Lira-Saldivar, R.H., R. Ponce Zambrano, N.A. Ruiz Torres, B. Méndez Argüello, E. Mendoza Mendoza, L.A. García Cerda, I. Vera Reyes, 2016. Synthesis of zinc oxide nanoparticles and its influence on seed germination and growth of *Solanum lycopersicum* seedlings. *Wulfenia Journal* 23(9): 220-235.
- Mahmoodzadeh, H., M. Nabavi, and H. Kashef. 2013. Effect of nanoscale titanium dioxide particles on the germination and growth of canola (*Brassica napus*). *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. 3(1):30.
- Matthews, S. 1980. Controlled deterioration: a new vigour test for crop seeds. In: Seed production (P. D. Herbbblethwaite, Ed.). Butterworths. London. pp. 647.
- Navarro, M. (2009). Comportamiento interactivo de la germinación, la dormancia, la emergencia y el crecimiento inicial como atributos biológicos para evaluar el vigor de las semillas de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. PhD Thesis. Universidad Agraria de La Habana. Cuba. pp. 101.
- Oliveira, H. C., R. Stolf Moreira, C. Bueno Reis Martinez, R. Grillo, M. Bispo de Jesus, y L. Fernandes Fraceto. 2015. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. *PLoS ONE*. 10(7). DOI:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132971>.
- Pastrana, H. F., y A. Ávila. 2007. Nanomedicina: Estado del Arte. *Revista de Ingeniería*. pp. 60-69.
- Perlatti, B., P. L. de Souza Bergo, M. F. Fernandes da Silva, J. Batista Fernandes, y M. R. Forim. 2013. Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. In S. Trdan, Chapter from the book *Insecticides - Development of Safer and More Effective*. pp. 545-550.
- Peters, R., G. Dam, H. Bouwmeester, H. Helsper, G. Allmaier, F. Kammer, R. Ramsch, C. Solans, M. Tomaniová, J. Hajslova, S. Weigel. 2011.

Identification and characterization of organic nanoparticles in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. pp. 100-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.10.004>.

Peters, R., P. Brandhoff, S. Weigel, H. Marvin, H. Bowmeester, K. Aschberger, H. Rauscher, V. Amenta, M. Arena, F. Botelho Moniz, S. Gottardo y A. Mech. 2014. Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. EFSA Supporting Publications. DOI: 10.2903/sp.efsa.2014.EN-621.

Poveda Burgos, G., J. C. Castro García, A. S. Betancourt Vera, F. Y. Murillo Erazo, J. M. Gualli Lema, y M. F. Álava Arreaga. 2016. La nanotecnología en Japon y su impacto en el Ecuador. Observatorio Iberoamericano de la Economía y la Sociedad del Japón. pp. 2.

Prasad, T., P. Sudhakar, Y. Sreenivasulu, P. Latha, V. Munaswamy, K. Raja Reddy, T. S. Sreepasad, P. R. Sajanalal, T. Pradeep. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*. pp. 37-41. <http://dx.doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>.

Raj, S., S. Jose, U. S. Sumod, y M. Sabitha 2012. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of pharmacy BioAllied Sciences*. pp 186-188.

Ratiu, M. 2015. Nanotechnology in textile industry. *Academic Journal*. 16: 83-88 .

Razzaq, A., R. Ammara, H. M. Jhanzab, T. Mahmood, A. Hafeez, y S. Hussain,. 2016. A Novel Nanomaterial to Enhance Growth and Yield of Wheat. *Journal of Nanoscience and Technology*. pp. 55-58.

Ruffini Castiglione, M., y R. Cremonini. 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*. 62(2): 161-165. DOI: 10.1080/00087114.2004.10589681.

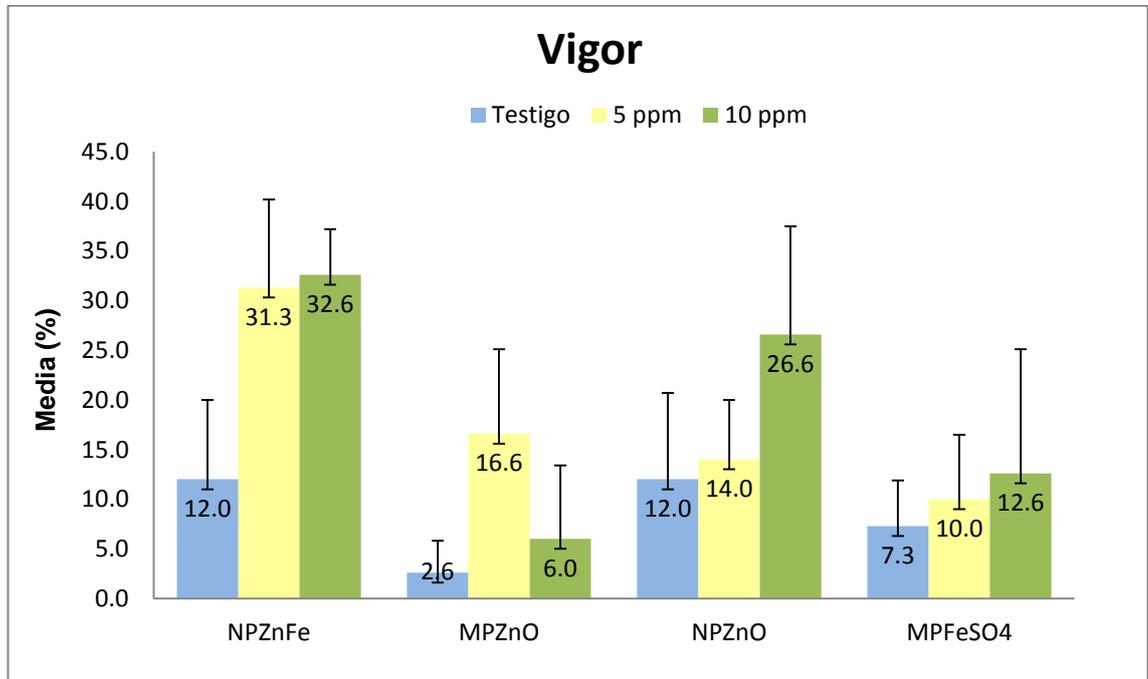
Ruiqiang , L., and L. Rattan. 2016. Nanofertilizers. *Encyclopedia of Soil Science*. 3rd edition. 1511-1515. DOI: 10.1081/E-ESS3-120053199.

- Ruiz Torres, N. A., J. I. García López, R. H. Lira Saldívar, I. Vera Reyes, y B. Méndez Argüello. 2016. Efecto de Nanopartículas Metálicas y Derivadas del Carbón en la Fisiología de Semillas. In R. H. Lira Saldívar, & B. Méndez Argüello, Agronano Tecnología Nueva frontera de la Revolución Verde. Saltillo, Coah. UAAAN. pp. 42-60.
- Saeid Hojjat, S., y H. Hojjat. 2016. Effects of silver nanoparticle exposure on germination of Lentil (*Lens culinaris Medik.*). International Journal of Farming and Allied Sciences 5 (3): 248-252.
- Sasson, Y., I. G. Levy Ruso, O. Toledano, and I. Ishaaya, 2007. Nanosuspensions: emerging novel agrochemical formulations. In: Ishaaya I, Nauen R, Horowitz AR, editors. Insecticides Design Using Advanced Technologies., Springer-Verlag; Berlin Heidelberg: pp. 1-4.
- Savithramma, N., S. Ankanna and G. Bhumi. 2012. Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* – an endemic and endangered medicinal tree taxon. Department of botany Tirupati, Andhra Pradesh, India. pp. 63-64.
- Serena, P. A., y A. Correia. 2003. Nanotecnología: el motor de la próxima revolución tecnológica. Apuntes de Ciencia y Tecnología. pp. 32-36.
- Siddiqui M. H., M. H. Al-Whaibi, M. Firoz and M. Y. Al-Khaishany. 2015. Role of Nanoparticles in Plants. In Siddiqui M. H., M. H. Al-Whaibi, M. Firoz, Nanotechnology and Plant Science: Nanoparticles and Their Impact on Plants. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. pp. 19-35. DOI:10.1007/978-3-319-14502-0.
- Siddiqui M. H., M. H. Al-Whaibi. 2013. Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum Mill*). Saudi Journal of Biological Sciences. pp. 14-15.
- Singla, P., R. Mehta, and S. N. Upadhyay. 2012. Clay Modification by the Use of Organic Cations. Scientific Research. pp. 21-25. <http://dx.doi.org/10.4236/gsc.2012.21004>.
- Society, The Royal. 2004. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. Plymouth, UK: Latimer Trend Ltd.

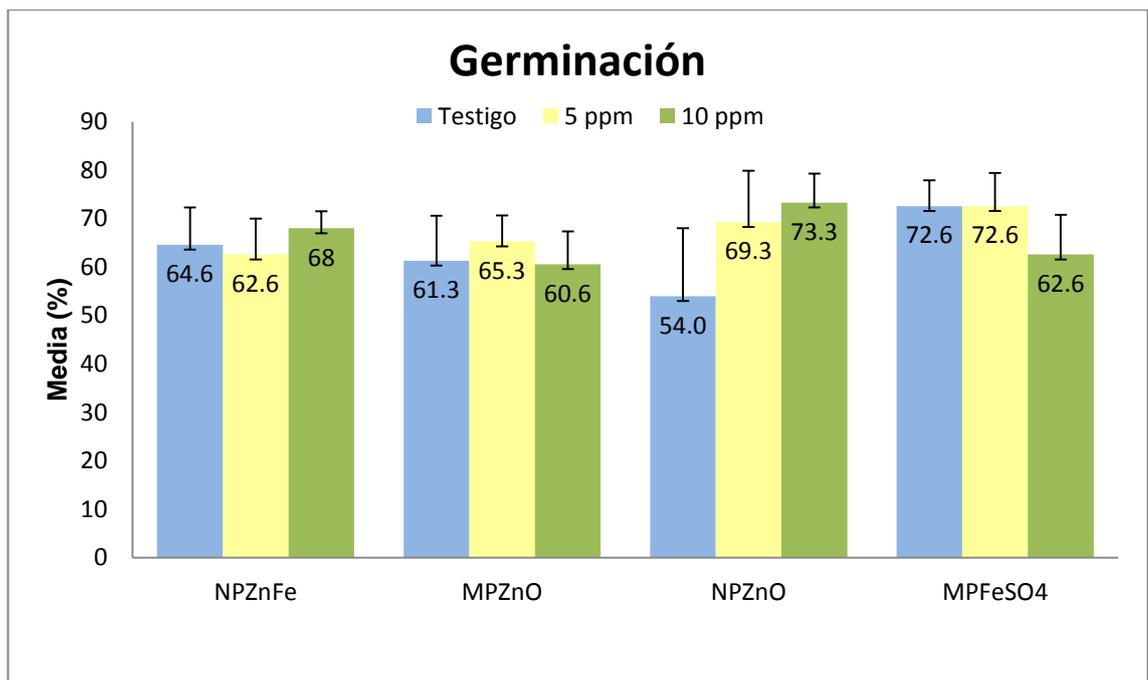
- Walker N., J. Bucher. 2009. A 21st Century Paradigm for Evaluating the Health Hazards of Nanoscale Materials?. *Toxicological Sciences*. 110(2): 250-251. DOI: 10.1093/toxsci/kfp106
- Weir, A., P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, y N. von Goetz. 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science and Technology*. pp. 2246–2250. DOI: 10.1021/es204168d.
- Zafar, H., A. Ali, J. S. Ali, I.U. Haq and M. Zia. 2016. Effect of ZnO Nanoparticles on Brassica nigra Seedlings and Stem Explants: Growth Dynamics and Antioxidative Response. *Frontiers in plant science*. pp. 1-2. doi: 10.3389/fpls.2016.00535
- Zarate Cruz, G. S., H. A. Zavaleta Mancera, A. Alarcón, and L. F. Jiménez García. 2016. Phytotoxicity of ZnO nanoparticles on the aquatic fern *Azolla filiculoides* Lam. *Agrociencia*. 50:(6). 677-681.

ANEXOS

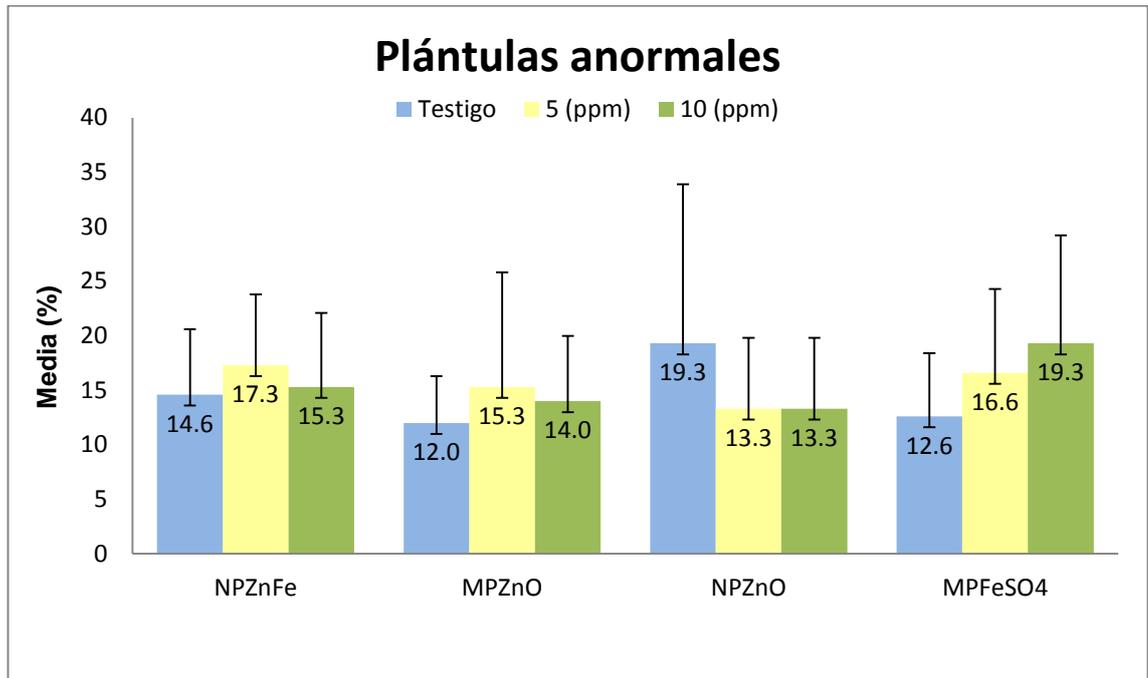
Anexo 1. Grafica de comparación de medias entre los diversos tratamientos para la variable vigor.



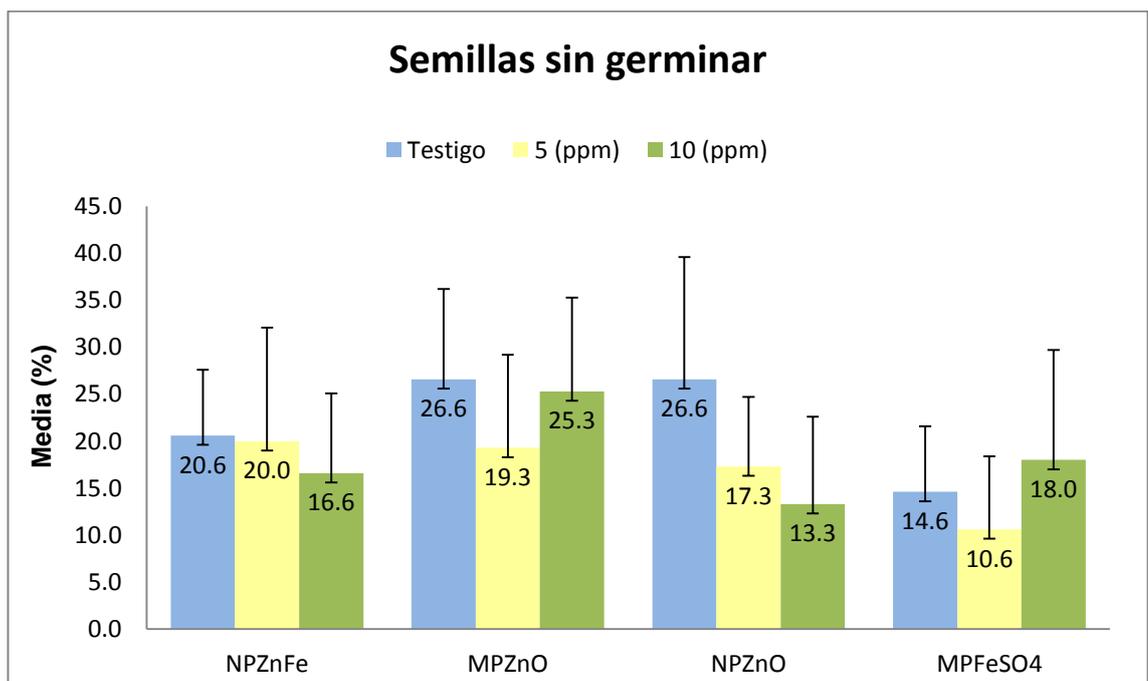
Anexo 2. Grafica de comparación de medias entre los diversos tratamientos para la variable germinación.



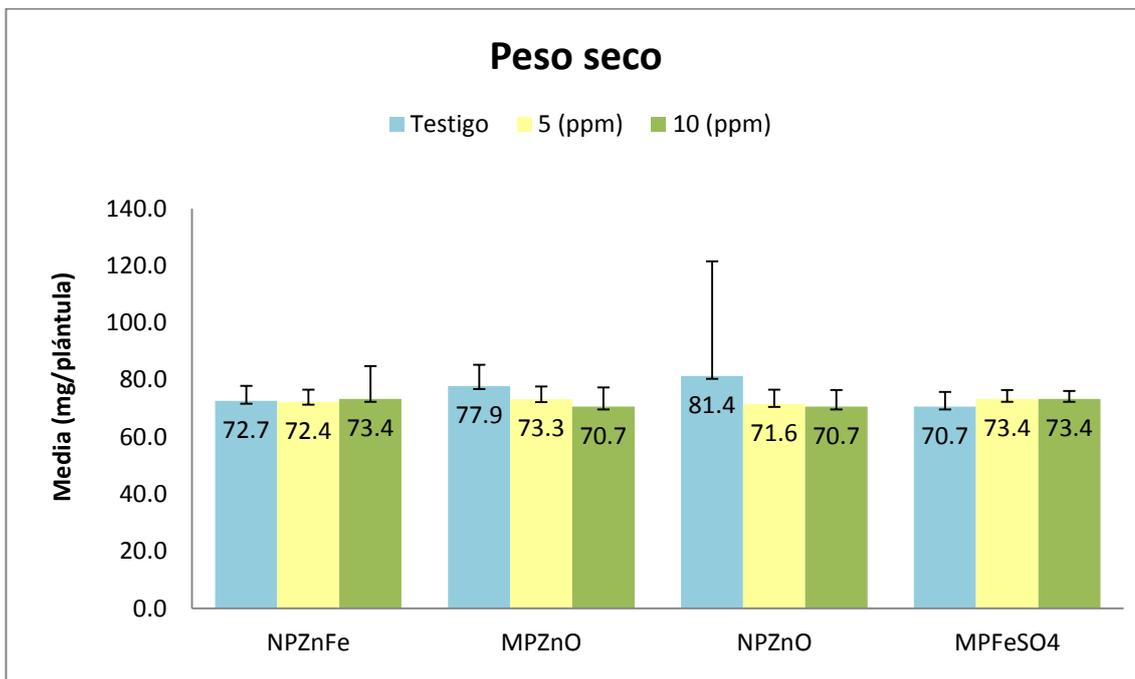
Anexo 3. Grafica de comparación de medias entre los diversos tratamientos para la variable plántulas anormales.



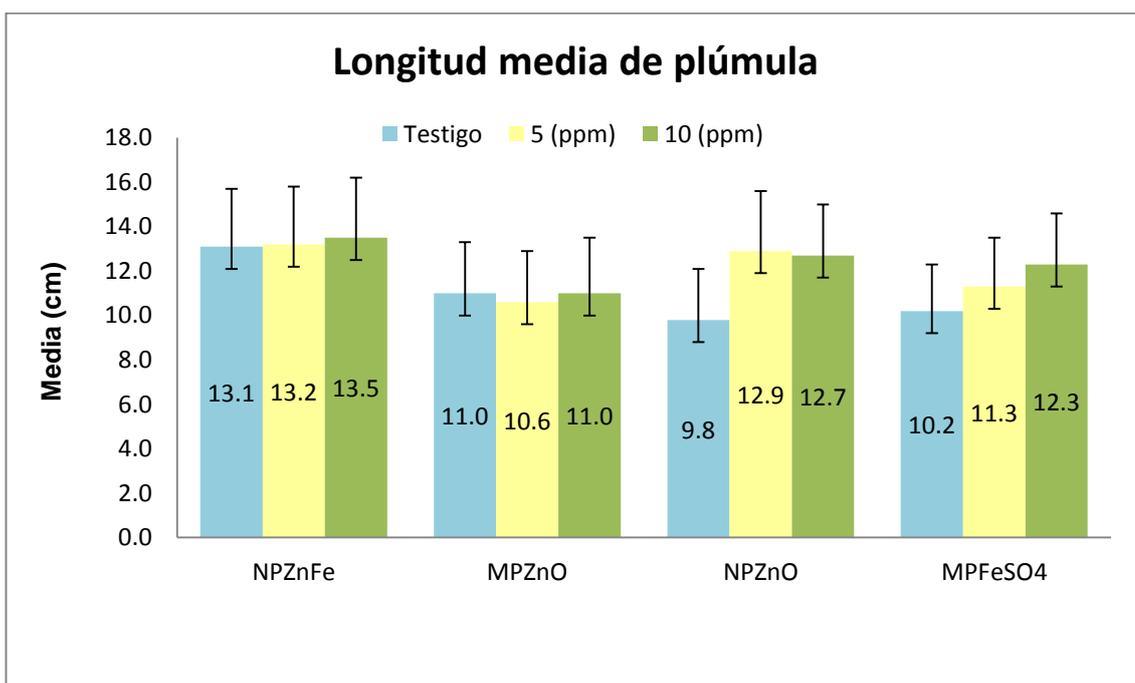
Anexo 4. Grafica de comparación de medias entre los diversos tratamientos para la variable semillas sin germinar.



Anexo 5. Grafica de comparación de medias entre los diversos tratamientos para la variable peso seco.



Anexo 6. Grafica de comparación de medias entre los diversos tratamientos para la variable longitud media de plúmula.



Anexo 7. Grafica de comparación de medias entre los diversos tratamientos para la variable longitud media de radícula

