

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Evaluación del Efecto de las Nanopartículas de Óxido de Cobre (CuO) en cuanto a la Germinación, Desarrollo de Planta y Asimilación de CO₂ en Tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Río Grande

Por:

ADÁN GUTIÉRREZ RAMÍREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Evaluación del Efecto de las Nanopartículas de Óxido de Cobre (CuO) en Cuanto a la Germinación, Desarrollo de Planta y Asimilación de CO₂ en Tomate (*Solanum lycopersicum*) Variedad Río Grande

Por:

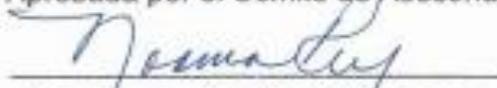
ADÁN GUTIÉRREZ RAMÍREZ

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. Arturo Mancera Rico

Coasesor



Mtro. Josué Israel García López

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2018

AGRADECIMIENTOS

A DIOS. Por darme la oportunidad y las fuerzas de continuar con mis estudios, principalmente por darme la vida, salud y bienestar para seguir adelante.

A mí alma mater. Por abrirme sus puertas para yo poder continuar con mis estudios de nivel superior, por todas esas alegrías vividas en esta casa de estudios que me dio tanto en mi formación como profesionalista. Por eso y por tantas cosas más seré un *¡Buitre por siempre!*

A la Dra. Norma Angélica Ruíz Torres. Por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto de investigación y brindarme su valioso tiempo, paciencia y conocimientos para poder terminar con esta tesis que es la etapa final de mis estudios profesionales.

Al Dr. Arturo Mancera Ríco. Por sus asesorías y colaboración en la revisión del presente trabajo.

Al Mtro. Josué Israel García López. Por su valioso tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Antonio Flores Naveda. Por su colaboración en la revisión del presente trabajo y por sus aportaciones hechas para la mejora de su estructura y complejidad del mismo.

DEDICATORIAS

El presente trabajo lo dedico con mucho cariño y amor a las dos personas más importantes en mi vida, a mis padres a quienes admiro y quiero mucho, gracias a su valioso apoyo he logrado concluir esta etapa tan importante en mi vida. Gracias por haber puesto su confianza en mí, por ayudarme a lograr mis objetivos y metas, además por darme la vida y porque me enseñaron a salir siempre adelante con sus ejemplos. A mi papá Sr. *José Gutiérrez Solano* que con sus consejos y en algunas ocasiones regaños cuando lo merecía, supo hacer de mí una persona de bien y siempre me ha guiado en mi camino y me ha enseñado con esa tenacidad que él me inculcó a luchar siempre por conseguir todo lo que me propongo. A mi mamá Sra. *Paula Ramírez Chávez* por su amor, cariño y esa humildad que siempre ha tenido como persona para con los demás y sobre todo con sus hijos. Mil gracias mamá por escucharme siempre que yo lo necesito, por ser esa compañera, amiga y mamá como tú siempre me lo dices, no tengo palabras para agradecerte todo lo que me has dado.

A mis hermanos por brindarme su apoyo cuando más lo necesitaba para seguir adelante con mis estudios, por su comprensión y apoyo moral en los momentos difíciles que todos afrontamos en cada etapa de nuestras vidas. Con todo respeto y cariño para ellos.

Cándido Gutiérrez Ramírez
Orfelina Gutiérrez Ramírez
Sergía Gutiérrez Ramírez
Belinda Gutiérrez Ramírez

José Ángel Gutiérrez Ramírez
Luis Enrique Gutiérrez Ramírez
Jorge Miguel Gutiérrez Ramírez

A mí hermanita Yare que, aunque no seamos hermanos de padre y madre, siempre te he querido como tal desde el primer día que te conocí, gracias por inspirarme a seguir siempre adelante y luchar por cumplir mis sueños.

A toda mi familia: Tíos, tías, primos, primas, sobrinos, por brindarme su apoyo en todo momento.

A Karen por su amistad y por inspirarme siempre a seguir adelante y luchar por mis metas y objetivos en la vida.

A mi cuñada Tommy por su apoyo e inspiración para seguir superándome día a día y cumplir mis metas.

A mis compañeros de generación. Por todas esas alegrías que juntos vivimos durante esta etapa que fue la más bonita de mi vida, por alentarme a seguir adelante en momentos difíciles y tristes por los que pase durante este tiempo.

A mis profesores. Por todas sus enseñanzas y sabios conocimientos que si no hubiese sido por ellos no hubiera logrado tal cosa.

A mis amigos *Martín, Eriberto, Bolívar, Cípriano, Isaac, Julio, Goyo, Melquí, Noé, Paco y Tímoteo* por su amistad y apoyo incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS	X
RESUMEN	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.2. HIPÓTESIS	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Aplicaciones de la nanotecnología y los nanomateriales	5
2.1.1. La nanotecnología en la agricultura	7
2.1.2. Modo de absorción y translocación de las nanopartículas	9
2.1.3. Efecto de las nanopartículas en la germinación de las semillas	10
2.2. La importancia del cobre (Cu)	15
2.2.1. Absorción y translocación del cobre en las plantas.....	16
2.3. La fotosíntesis y su importancia	16
2.3.2. Factores intrínsecos de la planta que influyen en la fotosíntesis	20

2.3.3. Conductancia estomática	20
2.3.4. Estomas	21
2.3.5. Enzima RUBISCO	21
2.3.6. Transpiración	22
2.3.7. Magnitud de la transpiración	23
2.3.8. Factores que afectan la transpiración	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Ubicación del sitio experimental.....	25
3.1.1. Estudio I. Efecto de las NPsCuO en la germinación de semillas de tomate variedad Río Grande.....	25
3.1.2. Material genético.....	25
3.1.3. Prueba de germinación	25
3.1.4. Variables evaluadas en las semillas germinadas.....	26
3.2. Estudio II. Respuesta fisiológica y agronómica a la aplicación de NPsCuO de plantas de tomate.....	28
3.2.1. Localización del lugar.....	28
3.2.2. Imbibición y siembra	28
3.2.3. Trasplante	28
3.2.4. Nutrición mineral	29
3.2.5. Solución de Hoagland	29

3.2.6 Aplicación de NPsCuO.....	30
3.2.7. Altura de planta y diámetro de tallo.....	30
3.2.8. Contenido de clorofila	31
3.2.9. Tasa de asimilación de CO ₂ (Fotosíntesis)	31
3.2.10. Diseño experimental	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Estudio I. Efecto de las NPsCuO en la germinación de semillas de tomate variedad Río Grande.....	33
4.2. Estudio II. Respuesta fisiológica y agronómica a la aplicación de NPsCuO de plantas de tomate.....	37
V. CONCLUSIONES	53
VI. LITERATURA CITADA.....	54
VII. ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de soluciones madre para preparar Hoagland.	30
Cuadro 2 Cuadros medios del análisis de varianza para variables evaluadas en prueba de germinación de semillas de tomate tratadas con suspensiones de NPsCuO.	34
Cuadro 3. Comparación de medias para variables evaluadas en prueba de germinación de semillas de tomate con la aplicación de NPsCuO.....	36

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis de varianza para variables agronómicas evaluadas en plantas de tomate en ensayo de invernadero con la aplicación de NPsCuO.	38
Cuadro 5 Comparación de medias de variables agronómicas evaluadas en invernadero en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.	39
Cuadro 6. Comparación de medias por fecha para variables agronómicas evaluadas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.	40
Cuadro 7. Cuadrados medios del análisis de varianza para variables relacionadas con la tasa de asimilación de CO ₂ , evaluadas en plantas de tomate en ensayo de invernadero con la aplicación de NPsCuO.	44
Cuadro 8 Comparación de medias por etapa para variables relacionadas con la tasa de asimilación de CO ₂ , evaluadas en plantas de tomate en ensayo de invernadero tratadas con NPsCuO.	46
Cuadro 9. Comparación de medias por dosis para variables relacionadas con la tasa de asimilación de CO ₂ , evaluadas en plantas de tomate en ensayo de invernadero tratadas con NPsCuO.	48
Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para la variable clorofila en plantas de tomate, tratadas con NPsCuO.	50
Cuadro 11. Comparación de medias por concentración de NPs aplicadas al sustrato, para la variable clorofila, determinada en invernadero en plantas de tomate, tratadas con NPsCuO.	51
Cuadro 12. Comparación de medias de la variable clorofila por hora, evaluada en invernadero en plantas de tomate, tratadas con NPsCuO.	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Comparación de la tasa de asimilación de CO ₂ en diferentes etapas fenológicas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.	63
Anexo 2. Comparación de la conductancia estomática en diferentes etapas fenológicas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.	63
Anexo 3. Comparación del CO ₂ intercelular determinado en diferentes etapas fenológicas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.	64
Anexo 4. Comparación de la tasa de transpiración en diferentes etapas fenológicas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.	64
Anexo 5. Diámetro medio de tallo en mm, determinado en siete mediciones diferentes en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.	65
Anexo 6. Altura media de planta en cm, determinada en siete mediciones diferentes en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.	65

RESUMEN

Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales a escalas nanométricas. Las NPs pueden tener una mayor reactividad química y ser más bioactivas que las partículas más grandes, por su tamaño, tienen mejor acceso a cualquier cuerpo y tienen probabilidad de entrar en células tejidos y órganos. Ofrece la posibilidad de generar nanoproductos como fertilizantes, plaguicidas, sensores y promotores de crecimiento de plantas. La justificación de este trabajo, radica en la posibilidad de usar nanopartículas metálicas en forma de nano promotores de la germinación y/o como nano fertilizantes en cultivos de invernadero.

La presente investigación comprendió dos estudios, el primero se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas (CCDTS), de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en donde se evaluó el efecto de cuatro concentraciones (0, 25, 50 y 100 ppm) de nanopartículas de Óxido de Cobre (NPsCuO) sobre el vigor y germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*), variedad Río Grande

En el Estudio 2, semillas previamente imbibidas en NPsCuO (0, 25, 50 y 100 ppm), se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades. Posteriormente se trasplantaron a maceta en donde se aplicó al sustrato NPsCuO (0, 25, 50 y 100 ppm), y subsiguientemente se determinó altura de planta, diámetro de tallo, e índice de clorofila utilizando un SPAD modelo 502. Además, se

usó un determinador portátil marca LI-COR 6400, para medir la tasa de asimilación de CO₂, CO₂ intercelular, transpiración y conductancia estomática.

Estudio 1. Los resultados indican que la aplicación de NPsCuO a las semillas durante el proceso de imbibición, no influyó sobre el vigor y la germinación de semillas de tomate Río Grande; sin embargo, a 50 y 100 ppm de NPsCuO, se obtuvo mayor peso seco de plántula, longitud media de vástago y de radícula, ambas concentraciones con valores estadísticamente iguales.

Estudio 2. En invernadero, el uso de NPsCuO aplicadas al sustrato en forma de suspensión a concentraciones altas (50 y 100 ppm), inhibieron el desarrollo de la planta, causando fitotoxicidad, lo cual se reflejó en un menor diámetro de tallo y altura de planta. En cuanto a la tasa de asimilación de CO₂, los tratamientos evaluados modificaron la eficiencia del mesófilo para la fijación del CO₂. Durante la etapa reproductiva se obtuvo mayor tasa de asimilación de CO₂, esto pudo deberse a que, durante dicha etapa, la planta requiere una mayor cantidad de fotosintatos para la floración y el llenado de frutos. El contenido de clorofila, aumentó a medida que transcurrieron las horas después de la aplicación de NPsCuO, así como con el tiempo de desarrollo del cultivo.

Palabras clave: clorofila, fotosíntesis, germinación, nanopartículas, vigor

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología (NT) es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación, manejo, operación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas a nano escala.

Por esta razón en la actualidad, está siendo considerada parte de la nueva revolución tecnológica; ya que brinda grandes posibilidades de desarrollo a medida que se asimila y difunde en la sociedad (Contreras, 2016). Entre las diversas áreas de aplicación encontramos el desarrollo de películas para celdas solares, almacenamiento de energía, nanogeneradores, la catálisis de combustible, y de tratamiento de agua (Khan, 2014).

Los diversos usos potenciales de la NT en la agricultura han creado gran interés, ya que ofrecen la posibilidad de mejorar la producción agrícola mediante diversas estrategias, las cuales pueden incrementar la producción de alimentos utilizando menores insumos de energía, así como reduciendo los costos de producción y desperdicios de agroquímicos; todo esto es una prioridad para gobiernos e instituciones, que están conscientes del daño que hemos venido ocasionando a nuestro planeta y que ha contribuido significativamente a los grandes problemas mundiales como son el calentamiento global y el cambio climático.

La NT tiene aplicación en la agricultura; a través del mejoramiento de la eficiencia de los nutrientes, desarrollo de pesticidas de nueva generación. Así como los mecanismos de interacciones huésped-parasito a nivel molecular, la

búsqueda de compuestos para la conservación y envasado de alimentos etc. (Mukhopadhyay, 2014). En la agricultura moderna sustentable la nanotecnología promete aportar soluciones usando nanopartículas (NPs), las cuales poseen tres mecanismos principales de acción: 1. generación de especies reactivas de oxígeno, 2. liberación de iones, y 3. acumulación o penetración de la membrana celular (Alvarado *et al.*, 2014 y Resham *et al.*, 2015). Además, el desarrollo de NPs ha llegado con el espectro amplio para producir agentes antimicrobianos (Yah y Simate 2015). En estudios recientes se ha demostrado que uno de los principales potenciales de las nanopartículas metálicas es su efecto antimicrobiano en patógenos de humanos y plantas siendo un factor importante su tamaño debido a que entre menor tamaño mayor es su efecto antimicrobial (Yamamoto, 2001; Betancourt *et al.*, 2014).

Del Castillo (2012) indica que la revolución nanotecnológica se asocia, por una parte, a la "fabricación molecular" cuya viabilidad tendría un impacto enorme en nuestras vidas, en las economías, los países y en la sociedad en general en un futuro no lejano. Entre los efectos, destacan sus potenciales impactos en la medicina, la biología, el ambiente, la informática y la construcción.

1.1. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar el efecto de la aplicación de nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO) en la germinación, desarrollo de planta y asimilación de CO₂, en el cultivo de tomate.

Objetivos específicos

- Determinar la respuesta a la imbibición de semillas de tomate, en suspensiones de NPsCuO, de variables relacionada con la calidad fisiológica.
- Evaluar el efecto de la aplicación de NPsCuO en variables agronómicas de plantas de tomate cultivado en invernadero.
- Cuantificar la respuesta a la aplicación de suspensiones de NPsCuO de variables fisiológicas: índice de clorofila, altura de planta, diámetro de tallo y tasa de asimilación de CO₂.

1.2. HIPÓTESIS

- La aplicación de NPsCuO afecta la germinación, desarrollo de planta y la tasa de asimilación de CO₂ en tomate. Por lo tanto se pueden mejorar características asociadas con el desarrollo de la plántula y establecimiento del cultivo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales a escalas nanométricas ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), lo que comúnmente se conoce como “Nanobiotenología” (NT) (Savage *et al.*, 2007). Esta nueva ciencia multidisciplinaria proporciona productos con nuevas propiedades fisicoquímicas diferentes a las de las moléculas individuales o sólidos de la misma composición (Medina *et al.*, 2007).

En un intervalo de tiempo relativamente corto, la NT ha tenido un impacto significativo en numerosos sectores incluyendo la agroindustria. La NT, considerada como una tecnología emergente, se orienta a la caracterización, elaboración y aplicación de materiales de dimensiones muy pequeñas, en el rango de 1 a 100 nanómetros (nm), o sea de 1 a 100 billonésimas de metro (Yadollahi *et al.*, 2009), por lo que se ubica dentro de la escala atómica y molecular. La NT es un extenso campo de la investigación interdisciplinaria, ya que con ella se abre un amplio abanico de oportunidades en diversas áreas como la medicina, la industria farmacéutica, la electrónica y la agricultura sustentable (Prasad, *et al.*, 2014).

Los avances en la NT se están integrando en la biología que se ha llevado al surgimiento de una nueva disciplina apasionante llamada nanobiotecnología (Razzaq *et al.*, 2015).

La investigación nanotecnológica puede aportar a nuestro país la innovación tan necesaria para generar empresas de alta tecnología que incrementen la competitividad del país y produzcan empleos bien remunerados.

Desde que se elaboró el Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012, se consideró a la NT como sector estratégico y como una tecnología precursora, debido a que tienen una fuerte incidencia sobre el desarrollo de muchas actividades productivas, y porque se prevé que en el futuro su utilización será determinante para el desarrollo de muchas ramas de los sectores agropecuario, industrial y de servicios; y por lo tanto para la productividad y competitividad del país. Es un hecho que la nanociencia está llamada a convertirse en un nuevo paradigma en el conocimiento humano. La NT en el nuevo milenio promete ser la cuarta revolución industrial (Maynard *et al.*, 2015), de manera que aquellos países que no logren incorporarse podrían quedar fuera de la nueva redistribución industrial resultante de la competencia. Además, la economía mundial, basada cada vez más en el conocimiento y en la innovación tecnológica, coloca en desventaja a aquellos países que no invierten en educación y conocimiento. En este contexto la nanotecnología aparece como una obligación, en lugar de una opción, y México ha comprado esa receta de desarrollo (Zayago-Lau y Foladori, 2010).

2.1. Aplicaciones de la nanotecnología y los nanomateriales

Las propiedades y efectos de las partículas y materiales a nano escala difieren considerablemente de las partículas más grandes con igual composición química.

Las NPs pueden tener una mayor reactividad química y ser más bioactivas que las partículas más grandes, por su tamaño, tienen mejor acceso a cualquier

cuerpo y tienen probabilidad de entrar en células, tejidos y órganos (Lugo-Medina *et al.*, 2010).

El mismo autor menciona que la NT tiene aplicación en sistemas de alimentación y agricultura sustentable, mientras que los nanomateriales ofrecen innovación de productos a la industria de alimentos, en forma de colorantes, saborizantes, aditivos nutricionales e ingredientes antibacterianos para el envasado, así como agroquímicos y fertilizantes más potentes.

Molins (2008) menciona que la NT contribuye con nuevas clases de estructuras moleculares originales, muestra rápidos avances que prometen cambiar o afectar muchas esferas de la ciencia y la tecnología. Además, ofrece innumerables posibilidades para el progreso humano, mediante la creación de varios tipos de nanomateriales aplicables en revolucionarios tratamientos médicos en la investigación agrícola y métodos de diagnóstico de inocuidad alimentaria, en procedimientos de restauración ambiental aplicaciones energéticas como el revestimiento de células solares, incluso en productos cotidianos de gran volumen como los cosméticos, tejidos repelentes de la suciedad y pintura auto-lavable. No obstante, es esencial y urgente evaluar no sólo los beneficios, sino también los posibles riesgos que plantean las NPs y acordar medidas efectivas mediante criterios reguladores adecuados.

El mismo autor menciona que la NT tiene aplicación en sistemas de alimentación y agricultura sustentable, mientras que los nanomateriales ofrecen innovación de productos a la industria de alimentos, en forma de colorantes,

saborizantes, aditivos nutricionales e ingredientes antibacterianos para el envasado, así como agroquímicos y fertilizantes más potentes.

Las NPs están relacionadas con la reducción del impacto ecológico al requerirse menor cantidad de aplicaciones y agroinsumos en productos generados por esta tecnología. (Lira-Saldívar *et al.*, 2016). Por lo anterior, se propone el empleo de nanomateriales como antagonistas de microorganismos fitopatógenos siendo amigables con el ambiente; reduciendo los riesgos de intoxicación para los seres vivos (Espinoza, 2014).

2.1.1. La nanotecnología en la agricultura

La nanotecnología (NT) es una ciencia que proporciona nanomateriales con nuevas propiedades físicoquímicas, que tienen una gran cantidad de aplicaciones en la agricultura. Ofrece la posibilidad de generar nanoproductos como fertilizantes, plaguicidas, sensores y promotores de crecimiento de plantas. Sin embargo, las aplicaciones de estos nanomateriales pueden provocar toxicidad e interferir en el metabolismo a través de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) (Tang *et al.*, 2016).

La NT ha generado gran interés en el desarrollo de productos de uso agrícola, ya que 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. 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 disponibilidad, además de minimizar las pérdidas al aplicar el producto.

La NT tiene también el potencial de revolucionar los sistemas agroalimentarios, 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. Esta observación se centra en las estrategias modernas utilizadas para el manejo del agua, el uso de pesticidas sintéticos tradicionales y el potencial de los nanomateriales en la agricultura sustentable como un enfoque moderno en la nueva revolución verde (Lira-Saldívar *et al.*, 2014).

En este mismo sentido, Chinnamuthu y Boopathi (2009) indican las diversas áreas de aplicación de la NT en la agricultura: 1. Almacenamiento de energía, producción y conversión (módulos fotovoltaicos), 2. Incremento de la productividad agrícola (zeolitas nanoporosas para la liberación prolongada y eficiente de fertilizantes), 3. Nanocápsulas para la liberación puntual de pesticidas, 4. Nanosensores para monitorear la calidad del suelo y la vitalidad de la planta, 5. Nanosensores para la detección de plagas y de fitopatógenos y 6. Uso como pesticidas.

La NT permite detectar la presencia de plagas y enfermedades, contaminación de alimentos y aplicar la cantidad correcta de nutrientes y pesticidas que promuevan la productividad, al mismo tiempo que garanticen la seguridad del medio ambiente y una mayor eficiencia en el uso de insumos agrícolas (Nuruzzaman *et al.*, 2016). En este contexto, se han desarrollado nuevos

nanomateriales basados en el uso de NPs metálicas, poliméricas, inorgánicas, etc., que permitan aumentar la productividad y que buscan encontrar aplicaciones para el perfeccionamiento de nanosistemas inteligentes para la captura e inmovilización de nutrientes y su gradual liberación en el suelo (Kottegoda *et al.*, 2011).

Esos sistemas tienen la ventaja de reducir al mínimo la lixiviación, al tiempo que mejoran la absorción de nutrientes por las plantas y coadyuvan a mitigar la eutrofización al reducir la transferencia de nitrógeno a los mantos acuíferos subterráneos (Liu y Lal, 2015).

Las aplicaciones de la NT en la agricultura son muy diversas, destacando principalmente la elaboración de nanopesticidas encapsulados para su liberación controlada (Grillo *et al.*, 2016), para la producción de nano, macro y micronutrientes, así como para hacer más eficiente el uso y aplicaciones de los agroquímicos (Nuruzzaman *et al.*, 2016).

La NT puede incrementar la eficacia de los pesticidas e insecticidas comerciales, reduciendo la cantidad de aplicación al suelo o follaje a dosis significativamente menores que las requeridas convencionalmente, con la mejora que eso implica para los ecosistemas (Xue *et al.*, 2014).

2.1.2. Modo de absorción y translocación de las nanopartículas

Cuando las NPs son aplicadas al follaje, se absorben a través de los estomas y su translocación o transporte es basipétalo hacia la base del tallo por el

floema. Al ser aplicadas al suelo o en el agua de riego penetran a través de la epidermis de la raíz y la corteza, posteriormente pasan a la endodermis y finalmente entran al tejido conductivo del xilema para ser translocadas a larga distancia hasta las ramas y el follaje de las plantas (Peng *et al.*, 2015). Se ha señalado que las paredes y membranas celulares actúan como una eficaz barrera a la entrada de cualquier tipo de NPs, y que la efectividad de su entrada y transporte está determinada por el tamaño de los poros de la pared celular, que están en el rango de 5 a 20 nm (Fleischer *et al.*, 1999; Eichert *et al.*, 2008). Por lo tanto, sólo NPs de un tamaño menor al de los poros de la pared celular pueden pasar con facilidad y penetrar al citoplasma celular.

2.1.3. Efecto de las nanopartículas en la germinación de las semillas

La calidad de la semilla es un concepto basado en la valoración de diferentes atributos, cada uno con la finalidad de mejorar el establecimiento de la planta en condiciones de campo, entre estos se encuentran la calidad genética, la fisiológica, la física y la sanitaria (Basra, 1995; Copeland y McDonald, 1995; Marcos-Filho, 1998).

La calidad de las semillas abarca la suma de todas las propiedades o características las cuales determinan el potencial de comportamiento de las semillas o lotes de semillas y establecimiento del cultivo (Velázquez, 2015). Una semilla de alta calidad es importante para la obtención de un cultivo con buena densidad de población y un rápido desarrollo de plantas aún bajo condiciones de

estrés, aunque hay otros factores como la lluvia, las prácticas agronómicas, la fertilidad del suelo y el control de plagas que también son decisivos (FAO, 2011).

La calidad fisiológica de un lote de semillas implica que además de ser viables, estas germinen y generen plántulas con sus estructuras esenciales desarrolladas normalmente. Es así como la calidad fisiológica y, en particular el vigor de semilla, se relacionan con la tasa y uniformidad de la germinación, desarrollo de plántulas y establecimiento en campo. 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 (Bewley, 1986; Bewley y Black, 1994).

Sin embargo, la calidad de las semillas se restringe con el transcurso del tiempo y la tasa de deterioro depende de las condiciones ambientales durante el almacenamiento y el tiempo en que éstas permanecen almacenadas. El primer componente de la calidad fisiológica que muestra señales de deterioro es el vigor de las semillas, seguido de una reducción en la germinación y de un mayor porcentaje de plántulas anormales (Ferguson, 1995).

Chinnamuthu y Boopathi (2009) mencionan que las NPs pueden ser usadas en el manejo de las semillas e indican una variedad de aplicaciones, entre las que incluyen la imbibición con nano-encapsulaciones de cepas específicas de bacterias a lo cual denominan “semillas inteligentes”, asegurando el establecimiento en campo, mejorando la productividad de los cultivos. Estos autores también indican que la NT ofrece como herramienta la aplicación de NPs,

que mejoran la germinación de las semillas y los parámetros fisiológicos relacionados, para optimar la capacidad de absorción, degradación de reservas y división celular.

Otros autores (Hashemi y Mousa, 2013; Ullah y Arshad, 2014) mencionan que las semillas tratadas con materiales a nano escala, generan un cambio en la dinámica de la germinación, observándose un incremento en el porcentaje de germinación y el índice de velocidad de emergencia. El periodo de germinación se acelera debido a la mayor disponibilidad de agua, y el porcentaje de germinación final se incrementa, lo cual indica condiciones adecuadas para el crecimiento de las semillas. La clave para el aumento de la tasa final de germinación de las semillas es la penetración de nanomateriales en la semilla (Khodakovskaya *et al.*, 2009).

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, que permiten aumentar la imbibición de agua y micronutrientes, acelerando la degradación de reservas, y beneficiando a las primeras etapas del proceso germinativo. En estudios realizados por Mahmoodzadeh *et al.* (2013), se evidencian los efectos de titanio a nano escala con partículas de TiO₂, reportando una promoción de la germinación del 75 % con la aplicación de NPs (20 nm de tamaño de partícula a 2000 mg L⁻¹ de concentración).

Savithramma *et al.* (2012) demostraron que la tasa de germinación de semillas tratadas con NPs de plata es 28 % mayor que la del control. De acuerdo a

los autores, la contribución de las NPs fue facilitar el movimiento de agua y nutrientes a través de la cubierta de la semilla para acelerar la germinación de semillas y crecimiento de plántulas.

Abbasi *et al.* (2016) indican que las NPs de plata y sílice pueden tener un efecto positivo sobre la germinación de semillas y rasgos iniciales de crecimiento. La introducción de NPs en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas podría tener un impacto significativo y, por lo tanto, se puede utilizar para aplicaciones agrícolas para un mejor crecimiento y rendimiento. Krishna y Natarajan (2014) indican que las NPs de Zinc (ZnO), plata (Ag) y dióxido de titanio (TiO₂) mejoran la velocidad de germinación en semillas de cacahuete. Los efectos beneficiosos de las NPs podrían atribuirse a una mayor producción de enzimas responsables de las reacciones metabólicas. Por otra parte, podrían incrementar los niveles de 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.

Las NPs debido a sus características físico-químicas, son algunos de los posibles candidatos para modular el estado redox y el cambio de la germinación de las semillas, el crecimiento, el rendimiento y la calidad de las plantas (Mukherjee y Mahapatra, 2009). La aplicación de NPs estimula la germinación de la mayoría de las especies, sin embargo, esta respuesta depende de la concentración y el genotipo (Hatami *et al.*, 2014). Por lo tanto, existe la posibilidad de aplicar una amplia gama de NPs para mejorar las características fisiológicas y morfológicas de los cultivos (Mingyu *et al.*, 2007).

Trabajos desarrollados en diversas especies de plantas confirman que al menos las NPsZnO promueven la germinación y crecimiento de plántulas (Siddiqui *et al.*, 2014). Como ejemplo se puede citar el estudio realizado por Prasad *et al.* (2012), donde indican que en semillas de cacahuate una concentración de 1000 mg L⁻¹ de NPsZnO promueve la germinación, así como la elongación de raíz y tallo.

Una preocupación para la aplicación de nanomateriales en la germinación de las semillas es su fitotoxicidad (Mónica y Cremonini, 2009).

Almutairi y Alharbi (2015) estudiaron el efecto de NPsAg en el porcentaje de germinación, la tasa de germinación, longitud de raíz, peso fresco y peso seco en plántulas melón, maíz y calabaza. Evaluaron siete concentraciones (0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg ml⁻¹) de AgNPs en semillas durante el proceso de germinación. Las tres especies respondieron de manera diferente, en semillas tratadas de melón y calabacita se incrementó el porcentaje de germinación, en relación a la semilla no tratada. Las NPsAg mostraron efecto tóxico, inhibición del crecimiento de radícula de maíz, mientras que en melón y calabacita se presentó promoción con ciertas concentraciones de NPsAg. Este estudio demostró que puede presentarse efectos negativos y positivos en la germinación, dependiendo de la respuesta del cultivo.

2.2. La importancia del cobre (Cu)

El cobre es un metal de color rojo, blando y dúctil, sus elevadas conductividades térmica y eléctrica son solo inferiores a las de la plata (Cotton, 1981).

Está presente en la plastocianina de los cloroplastos, un componente importante del sistema transportador de electrones de la fotosíntesis y puede estar involucrado en la reducción de nitritos (Bidwell, 1979). El Cobre es necesario en cantidades extremadamente pequeñas. En suelos con pH mayores de 7, la disponibilidad de cobre es limitada (O' Barr, 1977).

Varias proteínas que contienen Cu desempeñan un papel fundamental en procesos como la fotosíntesis, respiración, desintoxicación de radicales superóxido y lignificación. Sin Cu no habría fotosíntesis ya que este elemento es necesario para la formación de clorofila. Cuando se presenta una deficiencia de Cu, la actividad de estas enzimas se reduce drásticamente. La reducción del transporte fotosintético de electrones como consecuencia de menores contenidos de plastocianina, una proteína que contiene Cu, disminuye la tasa de fijación de CO₂, de modo que el contenido de almidón y de carbohidratos solubles (especialmente sacarosa) también se reduce (León y Sepúlveda, 2012).

2.2.1. Absorción y translocación del cobre en las plantas

El Cu puede ser absorbido por las plantas tanto en la forma de catión monovalente como divalente. La forma monovalente es absorbida solo en los suelos húmedos con disponibilidad de oxígeno limitada (Mengel y Kirby, 2001).

El Cu es un elemento móvil en el floema que puede ser retraslocado desde las hojas viejas y los órganos vivaces hacia otras partes de la planta que lo demanden, aunque este reciclaje no parece ser muy eficiente para las hojas jóvenes que se ven más afectadas por la deficiencia de Cu que las hojas viejas (Marschner, 1995).

El Cu interviene en la formación del polen, la fecundación, la lignificación de los tejidos y la defensa frente a las enfermedades (Bavaresco *et al.*, 2010).

2.3. La fotosíntesis y su importancia

La fotosíntesis es el único mecanismo de entrada de energía para la biosfera (con excepción de los procesos que realizan algunas bacterias quimiosintéticas que obtienen energía de la oxidación de sustratos inorgánicos) (Salisbury y Ross, 1994).

Básicamente consiste en la reducción de CO₂ atmosférico a carbohidratos en plantas verdes, gracias a la luz.

La fotosíntesis es un proceso endergónico porque se necesita la participación de la energía radiante del sol para iniciar la cadena de reacciones

que llevan a la formación de los compuestos orgánicos que almacena el organismo (Cogua, 2011).

La importancia de la fotosíntesis desde el punto de vista químico, es la transformación de la energía luminosa en energía química.

La fotosíntesis es importante para el hombre, entre otros aspectos, porque mediante ella se producen alimentos y oxígeno (Barceló *et al.*, 1983). Pero, además de forma directa o indirecta ella alimenta casi la totalidad del mundo vivo en el planeta (Campbell y Reece, 2005).

2.3.1. Factores ambientales que influyen en la fotosíntesis

La fotosíntesis está influida por un gran número de factores ambientales, tales como luz, temperatura, concentración de O₂ y CO₂ del aire, disponibilidad de agua en el suelo, nutrición mineral y aplicación de productos químicos, así como los insectos, enfermedades y todas sus posibles interacciones. A corto plazo (de días a semanas), las condiciones ambientales influyen sobre la fotosíntesis mediante la regulación de la conductancia estomática y la actividad fotosintética. A largo plazo, es regulada a través de cambios en el área foliar. Entre los factores que influyen en la fotosíntesis se encuentran:

- **Luz.** - La radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm de longitud de onda), es la fuente de energía para el proceso fotosintético. Promueve los procesos de apertura estomática e influye en la tasa de difusión de CO₂. Una alta intensidad luminosa puede producir daño en el aparato fotosintético, lo que se conoce como fotoinhibición (Powles, 1984). En

oscuridad no se realiza la fotosíntesis, se libera el CO₂ producido por la respiración. A medida que se produce un aumento de luz, la tasa de fotosíntesis incrementa hasta llegar a un punto en el cual la toma de CO₂ por la fotosíntesis y la pérdida de CO₂ por la respiración se equilibran, de manera que el intercambio gaseoso neto se hace cero. Si la intensidad luminosa sigue aumentando se alcanza un valor máximo de fotosíntesis a partir del cual ya no se produce un aumento en la captura de CO₂ con la luz (punto de compensación luminoso). El punto de compensación luminoso varía entre las especies, genotipo, tipo de hoja, edad de la hoja, concentración de CO₂ y temperatura (Kozlowski *et al.*, 1991).

- **Temperatura.** - La fotosíntesis en los árboles tiene lugar en un rango de temperatura que va desde cerca del punto de congelación hasta temperaturas por encima de 40 °C. El rango de temperatura específico depende de la especie, genotipo, edad de la planta, origen y época. En la mayoría de las especies de las zonas templadas la fotosíntesis aumenta desde 0 °C hasta alcanzar su máximo entre 15 y 25 °C. En las especies tropicales la tasa de fotosíntesis disminuye a temperaturas por debajo de los 15 grados centígrados (Kozlowski & Pallardy, 1997).
- **Concentración de O₂ y CO₂ del aire.** - Un aumento en la concentración de O₂ disminuye la fotosíntesis favoreciendo el proceso de fotorrespiración, por el contrario, una disminución de su concentración favorecerá enormemente la fotosíntesis. Dado que la concentración a la que se encuentra el O₂ en el aire es (21 %) es muy grande comparada con la de CO₂ (0.040 %) cualquier pequeña oscilación, que en condiciones naturales se puede

producir en su concentración, no afecta el funcionamiento del aparato fotosintético, mientras que una oscilación de la misma magnitud en la concentración de CO₂ produce grandes cambios (Miller & Rüsck, 1960).

- **Disponibilidad de agua en el suelo.** - Tanto un déficit como un exceso de agua en el suelo afectan la fotosíntesis. A corto plazo, la reducción de la fotosíntesis por la sequía se atribuye a un aumento en la resistencia a la difusión del CO₂ a los cloroplastos y a una reducción en la actividad fotosintética debida principalmente a un cierre estomático. A largo plazo, reduce el área foliar con lo que se reduce la actividad fotosintética (David y Kozlowski, 1974; Grace *et al.*, 1975; Turner *et al.*, 1984).
- **Nutrición mineral.** - La deficiencia de macro y micronutrientes, así como la falta de equilibrio en el balance de nutrientes, produce una disminución en la tasa de fotosíntesis. En las hojas, la deficiencia mineral produce una bajada en la tasa de fotosíntesis neta por diversos motivos: disminución en la síntesis de clorofila, disminución en la capacidad del transporte electrónico fotosintético, disminución en la actividad de carboxilación y de otras enzimas, descenso de la conductancia estomática y aumento en los procesos respiratorios (Kozlowki & Pallardy, 1997).
- **Aplicación de compuestos químicos.** - Un gran número de compuestos químicos produce efectos adversos sobre la fotosíntesis, especialmente cuando se aplican a dosis más altas de las recomendadas (Ayers & Barden, 1975; Kozlowski y Constantinidou, 1986). Tales productos químicos

incluyen insecticidas, fungicidas, herbicidas y antitranspirantes (Olofinboba *et al.*, 1974; Kramer y Kozlowski, 1979; Kozlowski, 1986).

2.3.2. Factores intrínsecos de la planta que influyen en la fotosíntesis

La tasa de fotosíntesis varía no sólo con el ambiente, sino con diferentes factores propios de la planta como son: la tasa de fijación de CO₂ en el mesófilo, la anatomía y edad de la hoja, el tamaño de los estomas, la frecuencia estomática y el control de la apertura estomática (Ehleringer *et al.*, 1976).

2.3.3. Conductancia estomática

El cierre y la apertura de los estomas regula la cantidad de CO₂ disponible en el lugar donde se encuentra la RUBISCO, y por lo tanto, limita la fotosíntesis como consecuencia de las distintas condiciones de estrés (Farquhar y Sharkey, 1982).

La conductancia de los estomas (g_s) es una medida de la capacidad de difusión de los gases, que está determinada por la apertura del poro y por el número de estomas.

Si por ejemplo, los niveles de CO₂ atmosférico se elevan haciendo subir el C_i , los estomas cierran el poro reduciendo su g_s y su E , pero mantendrán niveles similares o incluso mayores de C_i con los que continúan su actividad fotosintética (Schroeder, 2001; Long *et al.*, 2004).

Varios factores ambientales tienen importantes efectos en la conductancia estomática (luz, CO₂, humedad y temperatura), y factores internos como el status hídrico de los tejidos y el nivel de ciertos reguladores como el ácido abscísico (ABA) y las citoquininas (Cowan, 1977).

2.3.4. Estomas

Los estomas son grupos de dos o más células epidérmicas especializadas que se encuentran en la parte aérea de las plantas y cuya función es regular el intercambio gaseoso. Constan de un ostiolo o poro rodeado de dos células (células oclusivas) (Sánchez & Aguirreolea, 2000).

Cuando los vegetales realizan el intercambio gaseoso, la ganancia de CO₂ se acompaña de una pérdida de agua a la atmósfera por transpiración. Por lo tanto, las células oclusivas deben estar bien reguladas para evitar la deshidratación (Jones, 1998).

2.3.5. Enzima RUBISCO

La enzima RUBISCO cataliza el paso inicial de la asimilación fotosintética del carbono, la carboxilación de la RuBP genera dos moléculas de 3PGA, que son empleadas en la formación de moléculas orgánicas vitales (Anderson, 2008). La RUBISCO se encuentra presente en la mayoría de organismos autótrofos, tanto procariotas (bacterias fotosintéticas y cianobacterias), como eucariotas (algas y plantas superiores) (Andersson & Backlund, 2008). Está constituida por 8

subunidades grandes que se disponen en 4 dímeros que forman un núcleo octamérico y 8 subunidades pequeñas situadas alrededor del núcleo (Knight *et al.*, 1993) que al ensamblarse generan una holoenzima con una estructura hedecamérica (Andersson, 2008).

Posee una serie de características, tales como, una lenta velocidad catalítica (Parry *et al.*, 2007), una baja afinidad por el CO₂ atmosférico y la posibilidad de emplear O₂ como sustrato en la fotorrespiración, que hacen que sea notoriamente ineficiente como enzima inicial fijadora de CO₂ en la fotosíntesis (Portis, 2003; Portis & Parry, 2007; Andersson 2008).

2.3.6. Transpiración

La transpiración es la salida de agua hacia la atmósfera circundante desde las superficies celulares que, en conjunto al intercambio de dióxido de carbono (CO₂), determinan la eficiencia del uso de agua de una planta y se encuentra relacionado con la fotosíntesis (Azcon-Bieto & Talón, 2000). Su pérdida se produce a través de estructuras anatómicas como los estomas, lenticelas o cutícula siendo de esta manera un determinante primario del balance energético de la hoja y del estado hídrico de la planta (Squeo & León, 2007).

La pérdida de agua se puede producir por:

- ✓ **Cutícula** (10%): pérdida de agua a través de la epidermis, la cual está cubierta con una cutícula (deposición de cutina).

- ✓ **Lenticelas** (5%): pérdida de agua a través de las lenticelas (porciones del peridermis con ordenación celular floja y menor suberificación) en la corteza de árboles o en frutos.
- ✓ **Estomas** (90%): la mayor parte de la pérdida de agua que ocurre, tiene lugar a través de los estomas de las hojas.

2.3.7. Magnitud de la transpiración

La transpiración es la fuerza motriz que impulsa el agua desde el suelo hasta la atmósfera, y se mide en moles de agua por área foliar por tiempo.

La magnitud de la transpiración varía mucho de unas plantas a otras; desde unos dos o tres kilogramos de agua que puede perder una planta de maíz en un día hasta un cactus grande que solo puede perder veinticinco gramos de agua diarios (Aguilar Gutiérrez, 2000).

La magnitud de la transpiración puede ser expresada como la diferencia de Ψ_{H_2O} entre la hoja y la atmósfera sobre la sumatoria de las resistencias que se oponen a la pérdida de agua.

2.3.8. Factores que afectan la transpiración

Algunos de los factores que afectan la transpiración son:

- **Radiación.** - La planta absorbe luz y radiación infrarroja desde su alrededor, pero también irradia energía infrarroja. Si absorbe más energía

que la que irradia entonces el exceso se disipará por convección y/o transpiración ya que tiene un efecto directo sobre la apertura estomática.

- **Humedad relativa.** - El contenido de agua o humedad del aire modifica el $\%H_2O$ en la atmósfera y es la diferencia entre este y el de la hoja lo que favorece o no la salida del vapor de agua del vegetal.
- **Temperatura.** - Es el factor que controla la presión de vapor del agua. A medida que aumenta la temperatura, aumenta la presión de vapor de una forma exponencial.
- **Velocidad del viento.** - La capa límite de aire en contacto con la superficie de la hoja en ausencia de viento se satura del vapor de agua perdido por la hoja. La velocidad del viento favorecerá la salida del vapor. Muy altas velocidades de viento pueden llevar al cierre de los estomas.
- **Suministro de agua.** - La disponibilidad de agua en la interface suelo-raíz, pueda influenciar la transpiración directamente, causando una disminución del potencial hídrico de la hoja y un aumento en la resistencia estomática.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del sitio experimental

El trabajo se inició en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas (CCDTS) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) con coordenadas 25° 23' 42'' de latitud norte, 100° 50' 57'' de longitud oeste y a una altitud de 1742 msnm en Buenavista; Saltillo, Coahuila, México durante el ciclo primavera-verano del 2017.

3.1.1. Estudio I. Efecto de las NPsCuO en la germinación de semillas de tomate variedad Río Grande.

3.1.2. Material genético

Se utilizó semilla de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Río grande. Variedad de tomate rastrero, crecimiento determinado destinado principalmente para conserva. Frutos alargados, cilíndricos con mucha pulpa y buen sabor.

3.1.3. Prueba de germinación

El experimento consistió en el establecimiento de un bioensayo para determinar el efecto de las NPs de óxido de cobre en la germinación. Se establecieron 4 repeticiones para cada concentración (testigo, 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm).

Para la preparación de las suspensiones de NPsCuO, se pesó el producto de acuerdo a la concentración deseada en una balanza analítica (AND modelo HR-200), y se depositaron en tubos tipo Falcon, aforando con agua destilada a 50

mL. Se colocó cada tubo durante un periodo de 15 minutos en un agitador Vortex marca Labnet modelo VX100 para lograr la máxima dispersión de las NPsCuO.

La imbibición se realizó en cajas Petri, para lo cual se utilizaron 400 semillas de tomate variedad Río Grande, cien por cada tratamiento, sobre dos capas de papel filtro en el interior. Posteriormente se realizó la aplicación de 15 mL de suspensión de NPsCuO, con la concentración establecida y se colocaron las cajas Petri en una cámara bioclimática marca Thermo Scientific a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa de 50 % y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad durante 2 días (48 h).

Posterior al tratamiento y con la ayuda de pinzas de disección, las semillas se sembraron entre dos capas de papel Anchor, humedecido con agua destilada, enrollando en forma de taco, y colocándolos en bolsas de polietileno transparentes y éstas en contenedores de plástico, y posteriormente fueron introducidos a una cámara bioclimática marca Thermo Scientific a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa de 50 % y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

3.1.4. Variables evaluadas en las semillas germinadas

Al quinto día después de la siembra se determinó el vigor de germinación o primer conteo de plántulas normales. Esta variable es un indicador del vigor que posee la semilla para germinar en menor tiempo y establecerse en campo, el resultado fue expresado en porciento. A los catorce días se determinó el número de plántulas normales, considerando aquellas que poseen todas sus partes (radícula y vástago (plúmula)) sin ninguna anomalía visible y que representan

el porcentaje de germinación (GER). Asimismo, el número de plántulas anormales (PA), contabilizando las que carecían de tallo o radícula, o tenían un desarrollo irregular de alguna de sus estructuras. También se obtuvo el porcentaje de semillas sin germinar (SSG), incluyendo aquellas semillas duras o muertas que no tuvieron la capacidad de germinar, el resultado se expresó en porcentaje. En todas las plántulas normales se determinó la longitud media de tallo (LMT) y la longitud media de radícula (LMR), para lo cual se midieron por repetición todas las plántulas normales, expresándose en cm. También se determinó el peso seco (PS) de las plántulas normales, el secado tuvo una duración de 24 horas en una estufa Riosa H-48 a 72 °C. Pasadas las 24 horas, se extrajeron y se colocaron en un desecador, para posteriormente ser pesadas en una balanza analítica Precisa BJ610C, el resultado fue expresado en mg/plántula.

Los datos se analizaron para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos, posteriormente se realizó una comparación de medias por medio de la Prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico SAS (2004).

Modelo estadístico

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Valor observado

μ = Efecto de la media

τ_i = Efecto de los tratamientos

ε_{ij} = Error experimental

3.2. Estudio II. Respuesta fisiológica y agronómica a la aplicación de NPsCuO de plantas de tomate.

3.2.1. Localización del lugar

El trabajo de invernadero se llevó a cabo en el invernadero 2 del área de invernaderos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), el cual es un invernadero de mediana tecnología que cuenta con ventilación activa (pared húmeda y ventiladores) y mantenía una temperatura promedio de 25 °C dentro del invernadero.

3.2.2. Imbibición y siembra

Las semillas fueron puestas a imbibir en cajas Petri por 48 h, y posteriormente sembradas en charolas de poliestireno de 200 cavidades. El sustrato que se utilizó se compuso de perlita y vermiculita en proporción 1:1. Las charolas se conservaron en una cámara bioclimática de la marca Thermo Scientific, a una temperatura de 25 °C ± 2 °C, con una humedad relativa de 50 % y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

Se proporcionaron diariamente 3 ml de agua destilada a cada planta y una fertilización con Triple 17 cada tres días, igual de 3 ml/planta. El fertilizante Triple 17 se preparó en una proporción de 0.5 g/L de agua.

3.2.3. Trasplante

A los 40 días después de la siembra en las charolas, las plantas fueron trasplantadas en macetas de 10 L, se usó sustrato compuesto por perlita y vermiculita en proporción 1.5:1, respectivamente. Cabe destacar que las plantas

fueron aclimatadas un día antes del trasplante para que no resintieran el cambio de un ambiente a otro. Para cada tratamiento se establecieron 10 macetas, con un total de 40 plantas trasplantadas. Veinte días después del trasplante se aplicó Fertidrip (12-60-00) una vez por semana, en una proporción de 20 g/L de agua. La función del Fertidrip en la planta es lograr el amarre de frutos.

3.2.4. Nutrición mineral

Una vez ya establecidas las plantas en el invernadero, se les proporcionó solución nutritiva “Hoagland”, la cual se suministró en el riego en una cantidad de 100 ml/planta a diario, excepto los días en que se aplicaba la suspensión con nanopartículas (lunes y viernes). La solución Hoagland usada en los tratamientos no incluyó Cu, el cual fue el elemento a evaluar en este trabajo.

3.2.5. Solución de Hoagland

La solución de Hoagland modificada contiene todos los elementos necesarios para un crecimiento vegetal rápido. Las concentraciones de estos elementos son máximas sin provocar síntomas de toxicidad o estrés salino, y por lo tanto pueden ser varios órdenes de magnitud superior a las que las raíces vegetales encuentran en el suelo.

Por ejemplo, mientras que el fósforo está presente en la solución del suelo a una concentración menor de 0,06 ppm, en esta solución se emplean 62 ppm (Epstein, 1972).

Otra propiedad importante de esta formulación es que el nitrógeno se aporta como mezcla de amonio (NH_4^+) y de nitrato (NO_3^-).

Las formulaciones más modernas de las soluciones nutritivas incluyen el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA o ácido pentético) como agentes quelantes (Sievers y Bailar, 1962).

Cuadro 1. Composición de soluciones madre para preparar Hoagland.

Símbolo	Compuesto	Concentración
A	Ca (NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	1 M (236 g/L)
B	KNO ₃	1 M (101 g/L)
C	MgSO ₄ .7 H ₂ O	1 M (246.5 g/L)
D	KH ₂ PO ₄	1 M (136 g/L)
E	Quelato de Fe (FeSO ₄ +Na ₂ EDTA)	5 g/L de Fe
F	Micronutrientes	(1.81 g MnCl ₂ .4H ₂ O+2.86 g H ₃ BO ₃ +0.22 g ZnSO ₄ .7H ₂ O+0.09 g H ₂ MoO ₄ en 250 mL de agua destilada).

M= Molaridad (gramos de sal por litro de solución); ppm= partes por millón (número de partes de la sal en un millón de partes de solución).

3.2.6 Aplicación de NPsCuO

Las aplicaciones de las NPsCuO se hicieron los días lunes y viernes. Éstas fueron en el riego directamente a la raíz con un vaso de precipitado, a cada planta se le proporcionaron 100 ml al igual que la solución nutritiva. En total se hicieron 11 aplicaciones de suspensiones de NPsCuO.

Medición de variables

3.2.7. Altura de planta y diámetro de tallo

Tres semanas después del trasplante en el invernadero se midió altura de planta y diámetro de tallo, estas variables se determinaron cada semana durante siete semanas, y se expresaron en centímetros y milímetros, respectivamente. Para la medición de la variable altura de planta se utilizó una regla y para el

diámetro de tallo un Vernier digital. Tomando en cuenta en la medición de la altura de planta desde la base de la misma hasta sus últimas hojas apicales.

3.2.8. Contenido de clorofila

Se hicieron mediciones de índice de clorofila (Minolta SPAD 502) a las 0 horas, es decir, al momento en que se aplicaban las NPs, a las 24 y 48 horas después de su aplicación.

3.2.9. Tasa de asimilación de CO₂ (Fotosíntesis)

Un mes después del trasplante con el aparato LI-COR 6400 se determinaron las variables relacionadas con la fotosíntesis, tasa de asimilación de CO₂, conductancia estomática, CO₂ intercelular y transpiración.

Para la medición de todas estas variables se seleccionó una hoja joven, verde, con por lo menos 6 cm² de área foliar y se utilizaron un total de seis plantas por tratamiento, es decir, 24 plantas a las cuales se les midieron las variables mencionadas, siendo en todos los tratamientos las repeticiones uno a la seis.

Las variables determinadas fueron:

- Tasa de asimilación de CO₂ (**A**), expresado en $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.
- CO₂ intercelular (**C_i**) expresada en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$.
- Transpiración (**E**) expresada en $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.
- Conductancia estomática al H₂O (**g_s**), expresada en $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.
- Radiación fotosintéticamente activa (**PAR**), expresada en $\mu\text{mol luz m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.
- Temperatura de hoja (**T**), expresada en °C.

3.2.10. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 4, esto es 2 etapas fenológicas y 4 concentraciones, con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y pruebas de rango múltiple Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS Institute (2004).

Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk}$$

En donde:

μ = Media general

α_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A (Etapa fenológica)

β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor B (Concentración de NPsCuO)

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el factor α β_j

e_{ijk} = Componente del error aleatorio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio I. Efecto de las NPsCuO en la germinación de semillas de tomate variedad Río Grande.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Cuadro 2), en bioensayos de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Río Grande, tratadas con NPsCuO indican que, en las variables por ciento de vigor de germinación, por ciento de germinación, plántulas anormales y semillas sin germinar; no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos. Mientras que para las variables peso seco de plántula, longitud de vástago y longitud de radícula, se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.01$).

Los resultados en este trabajo coinciden con lo mencionado por (Saeid y Hojjat, 2016), quienes indican que la aplicación de NPs de plata no presentó diferencias significativas en la germinación de semillas de genotipos de lentejas.

En cuanto a la comparación de medias (Cuadro 3), el porcentaje de vigor de germinación y germinación, no presentaron diferencias estadísticas, indicando que al imbibir la semilla en NPsCuO la respuesta fisiológica es similar. Por el contrario, Reyhaneh *et al.* (2013) dieron a conocer la existencia del efecto de las NPs con TiO_2 , señalando que el porcentaje de germinación se mejoró en un 9 % tras la exposición a 5 ppm. Los autores mencionan que el tamaño de nano TiO_2 puede aumentar la absorción de nutrientes aprovechables por la semilla, mejorando la velocidad de germinación. Por lo tanto, el efecto de las NPs en semillas y plantas puede ser positivo o negativo y esto puede deberse a la concentración y el genotipo.

Cuadro 2 Cuadrados medios del análisis de varianza para variables evaluadas en prueba de germinación de semillas de tomate tratadas con suspensiones de NPsCuO.

FV	GL	VIGOR (%)	GER (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	GL	LV (cm)	LR (cm)
Tratamientos	3	3.66	8.00	1.00	11.66	0.73**	3	34.01**	39.75**
E. Exp.	12	3.66	72.66	25.66	39.00	0.03	332	3.01	4.26
CV (%)		12.98	10.14	75.05	67.51	13.89		28.11	25.07

**Significativo al 0.01% de probabilidad. FV= Fuente de variación; GL= Grados libertad; GER= Germinación; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; PS= Peso seco de la plántula; LV= Longitud de vástago; LR= Longitud de radícula.

En lo que respecta a la comparación de medias por tratamiento (Cuadro 3), se observó que tratar la semilla con NPsCuO a 50 ppm resulta en mayor peso seco, con 1.56 mg/plántula, sin embargo, es estadísticamente igual que tratar las semillas con 100 ppm (1.74 mg/plántula). La diferencia entre el testigo y el peso que se obtuvo al tratar la semilla con 50 ppm NPsCuO es de 0.78 mg/plántula, esto es, se duplicó el peso seco. Aquí es importante mencionar que, al ser los valores estadísticamente iguales, en caso de elegir la concentración adecuada, es conveniente tratar la semilla con NPsCuO a 50 ppm.

Por otra parte, para la variable longitud de vástago, al tratar las semillas con 25 ppm se redujo el crecimiento con respecto al testigo en 0.78 cm, pero, al incrementar las concentraciones a 50 y 100 ppm, los resultados mostraron valores superiores al compararlos con el testigo. En esta variable (LV), se observó que al imbibir las semillas con 50 y 100 ppm se obtiene 0.65 y 0.45 cm más que el testigo (6.09 cm).

Para la variable longitud de radícula, al ser tratadas las semillas con 25 y 50 ppm, el crecimiento se redujo con respecto al testigo en 1.41 y 0.14 cm respectivamente, en cambio no fue así al incrementar la concentración a 100 ppm la cual mostró el mismo resultado que el testigo (8.62 cm).

Sharma *et al.* (2012) reportan que las NPsAg promueven el crecimiento de plántulas de mostaza (*Brassica juncea*) en concentraciones de 25 y 50 mg L⁻¹, reflejándose en mayor longitud de raíz, biomasa seca y altura. Sin embargo, altas concentraciones (250-500 mg kg⁻¹ de suelo), impiden el crecimiento de las plantas.

Cuadro 3. Comparación de medias para variables evaluadas en prueba de germinación de semillas de tomate con la aplicación de NPsCuO.

Tratamiento (ppm)	VIGOR (%)	GER (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	LV (cm)	LR (cm)
0	15	83	7	10	0.78 b	6.09 a	8.62 a
25	14	84	7	9	1.14 b	5.31 b	7.21 b
50	16	83	6	11	1.56 a	6.74 a	8.48 a
100	14	86	7	7	1.74 a	6.54 a	8.62 a
Media	15	84	7	9	1.30	6.17	8.23
Tukey	4.01	17.89	10.63	13.11	0.3812	0.6917	0.8229

Valores con la misma literal dentro de una columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

GER= Germinación; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; PS= Peso seco de la plántula; LV= Longitud de vástago; LR= Longitud de radícula.

4.2. Estudio II. Respuesta fisiológica y agronómica a la aplicación de NPsCuO de plantas de tomate.

a). Variables agronómicas

Diámetro de tallo y altura de planta

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Cuadro 4), para variables agronómicas evaluadas en el ensayo de invernadero, indican que, en las variables altura de planta y diámetro de tallo se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.01$), en lo que respecta a las fechas de medición y tratamientos aplicados, esto se debe a que en cuanto va pasando el tiempo (fecha de medición), la planta va desarrollándose y en base a eso va incrementando su altura y su diámetro de tallo.

La interacción fecha de medición*tratamiento, no mostró significancia en la variable (DT), esto se puede atribuir a que las diferentes concentraciones aplicadas al sustrato, en las diferentes fechas de evaluación, no modificaron su expresión.

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis de varianza para variables agronómicas evaluadas en plantas de tomate en ensayo de invernadero con la aplicación de NPsCuO.

FV	GL	DT (mm)	AP (cm)
Medición	6	42.56**	6780.07**
Tratamientos	3	4.15**	288.00**
Med*Trat	18	0.21 _{NS}	54.60**
E. Exp.	196	0.30	20.61
CV (%)		8.86	10.47

**Significativo al 0.01% de probabilidad; NS= No significativo. FV= Fuente de variación; GL= Grados libertad; DT= Diámetro de tallo; AP= Altura de planta.

En la comparación de medias por tratamiento (Cuadro 5), se observó que para la variable diámetro de tallo la concentración de 25 ppm fue la que mostró mejores resultados con 6.43 mm, sin embargo, es estadísticamente igual al testigo (6.36 mm). La diferencia que se obtuvo entre la concentración 25 ppm NPsCuO y el testigo es de 0.07 mm. Sin embargo, al comparar el testigo con las concentraciones de 50 y 100 ppm, se observó una reducción de 0.35 y 0.59 mm, respectivamente. Lo anterior indica que las NPsCuO al aplicarse al sustrato en concentraciones de 50 y 100 ppm, inhiben el desarrollo de la planta, reflejándose en menor DT. En caso de tener que elegir una concentración adecuada, es más conveniente aplicar al sustrato suspensiones con NPsCuO a 25 ppm.

Por otra parte, para la variable altura de planta, al aplicar al sustrato una concentración de 25 ppm se obtuvo una respuesta estadísticamente igual al testigo. Mientras que al incrementar las concentraciones a 50 y 100 ppm, las

plantas mostraron efectos por fitotoxicidad. Para esta variable (AP), se observó que al aplicar concentraciones de 50 y 100 ppm se redujo drásticamente el crecimiento en comparación con el testigo en 3.00 y 4.66 cm, respectivamente.

Salama (2012) trató plantas foliarmente con dosis de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm de nanopartículas de plata (NPsAg), con aplicaciones diarias de 15 ml para cada concentración durante 12 días, mostraron que bajas concentraciones (20-60 ppm) tuvieron un efecto estimulante sobre el crecimiento de las plántulas, mientras que las concentraciones altas (>80 ppm) indujeron un efecto fitotóxico. Adicionalmente observó que las concentraciones de 20 a 60 ppm incrementaron el diámetro de tallo, longitud de raíz, área foliar, índice de clorofila, concentración de carbohidratos y contenido de proteína en las plantas.

Cuadro 5 Comparación de medias de variables agronómicas evaluadas en invernadero en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.

Tratamiento (ppm)	DT (mm)	AP (cm)
0	6.36 a	45.29 a
25	6.43 a	45.13 a
50	6.08 b	42.29 b
100	5.84 b	40.63 b
Media	6.18	43.33
Tukey	0.26	2.22

Valores con la misma literal dentro una columna son estadísticamente iguales. DT= Diámetro de tallo; AP= Altura de planta.

En cuanto a los resultados obtenidos en la comparación de medias por fechas de medición de las variables DT y AP (Cuadro 6) (Anexos 5 y 6), se observó lo esperado, esto es, que a medida en que la planta va desarrollándose,

su diámetro y altura también están en constante crecimiento, es por eso que en las mediciones que se hicieron (7), la literal a, corresponde a la última medición y presenta el valor más alto. Hubo dos mediciones que quedaron dentro de la misma literal, la 5 y la 6 en la variable (DT) con 6.94 y 7.11 mm, respectivamente.

Para la variable (AP), igualmente se observó que al transcurrir el tiempo se incrementó, presentando valores estadísticamente diferentes.

Algunos estudios señalan que concentraciones elevadas de nanopartículas de óxido de zinc (1000 mg L^{-1}) causan fitotoxicidad e inhibición de la germinación (Kyung-Seok y Kong, 2014; Zhang *et al.*, 2015); mientras que dosis bajas ($< 50 \text{ mg L}^{-1}$) han demostrado efectos significativos en el crecimiento y desarrollo (Prasad *et al.*, 2012), reflejándose en una mayor biomasa seca y área foliar.

Cuadro 6. Comparación de medias por fecha para variables agronómicas evaluadas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.

Fechas (DDT)	DT (mm)	AP (cm)
1 (20)	4.35 f	19.01 g
2 (27)	5.10 e	30.79 f
3 (34)	5.89 d	40.14 e
4 (41)	6.32 c	46.05 d
5 (48)	6.94 b	51.70 c
6 (55)	7.11 b	55.10 b
7 (62)	7.56 a	60.55 a
Media	6.18	43.3
Tukey	0.4	3.38

Valores con la misma literal dentro de una columna son estadísticamente iguales.
DT= Diámetro de tallo; AP= Altura de planta; DDT= Días después del trasplante.

b). Medición de la tasa de asimilación de CO₂ (fotosíntesis).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Cuadro 7), las variables relacionadas con la tasa de asimilación de CO₂ indican que en ambas etapas hubo diferencias altamente significativas en la variable g_s (Conductancia estomática), mientras que las variables A (Fotosíntesis) y C_i (CO₂ intercelular) mostraron diferencias significativas con valores de cuadrados medios de 3.46 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 2113.33 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$, respectivamente.

Por otra parte, en la fuente de variación dosis de NPsCuO, se encontraron diferencias altamente significativas en la variable A (Tasa de asimilación de CO₂) y diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la variable E (Transpiración).

En la interacción Etapa*dosis solo hubo diferencias altamente significativas en la variable A (Tasa de asimilación de CO₂) ($P \leq 0.01$).

Las plantas se enfrentan al compromiso de obtener CO₂ para mantener la fotosíntesis. A través de los estomas se lleva a cabo el intercambio más importante de H₂O y CO₂, jugando la apertura estomática un papel crucial tanto en la transpiración como en la fotosíntesis foliar (Taiz y Zeiger, 2006).

Los resultados obtenidos indican que los tratamientos evaluados modifican en la eficiencia del mesófilo para la fijación del CO₂. Tanto la etapa de crecimiento como la dosis aplicada respondieron de diferente manera ante la aplicación de NPsCuO, reflejándose en la interacción significativa que presentó la tasa de asimilación de CO₂.

El mesófilo es la parte de la hoja donde se lleva a cabo la asimilación del CO₂, y responde a factores internos como lo es el C_i (CO₂ intercelular), y a factores externos como la temperatura. El C_i, incrementa o se reduce de acuerdo a la apertura de los estomas y a la eficiencia del mesófilo, que depende en gran medida de la activación de la enzima RUBISCO. De acuerdo a los resultados significativos en el análisis de varianza, se puede intuir que la aplicación de NPsCuO, modifica la asimilación de CO₂ por medio de la actividad de la enzima RUBISCO.

La actividad fotosintética depende de la edad y posición de la hoja y desciende de forma muy importante al iniciarse la senescencia (Peat, 1970). Aún cuando la iluminación, temperatura y concentración de CO₂ sean óptimas, la actividad fotosintética no permanece constante. Este comportamiento ha sido atribuido a diversos factores, como el aumento de la fotorrespiración, la disminución de la fotosíntesis causada por el cierre de los estomas y la distorsión de los cloroplastos (Gosiewski *et al.*, 1982).

En las primeras etapas de desarrollo de un cultivo, las hojas y los tallos herbáceos son los principales órganos de asimilación fotosintética y el crecimiento depende del área foliar y la tasa de asimilación fotosintética por unidad de área foliar (Evans, 1988).

Según Crofts *et al.*, (1971), medir la fotosíntesis de un cultivo, basado únicamente en la superficie de área foliar, es inadecuado puesto que se debe de considerar la eficiencia de la fotosíntesis. La cual se ve afectada por factores

ambientales como la irradiación, concentración de CO₂, humedad y también por factores mismos de la planta (Hans, 1974).

Cuadro 7. Cuadrados medios del análisis de varianza para variables relacionadas con la tasa de asimilación de CO₂, evaluadas en plantas de tomate en ensayo de invernadero con la aplicación de NPsCuO.

FV	GL	A ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$)	E ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Etapa	1	3.46*	0.11**	2113.33*	1.19
Dosis	3	5.92**	0.02	774.80	8.98*
Etapa*Dosis	3	3.94**	0.01	334.72	7.00
CV (%)		11.87	35.67	5.75	20.63

**Altamente significativo al 0.01% de probabilidad; *Significativo al 0.05% de probabilidad.

FV= Fuente de variación; GL= Grados libertad; A= Tasa de asimilación de CO₂; g_s= Conductancia estomática; C_i= CO₂ intercelular; E= Transpiración.

En la comparación de medias por etapa (Cuadro 8), muestra que en la etapa reproductiva la planta tuvo mayor tasa de asimilación de CO₂, así como conductancia estomática y CO₂ intercelular (Anexos 1, 2 y 3), no siendo así para la variable transpiración, en la cual no se mostraron diferencias estadísticas, pero sí numéricas en la etapa vegetativa y reproductiva con 8.24 y 8.56 mol H₂O m⁻² s⁻¹ (Anexo 4). Esto puede deberse a que la planta requiere mayor cantidad de fotosintatos durante la etapa reproductiva ya que estos se requieren para la floración y el llenado de frutos.

En plantas anuales como el pepino, el tomate y otras especies, los primordios florales que se forman poco antes de la floración completa compiten por los fotoasimilados con los frutos existentes y los órganos vegetativos en crecimiento. En estos casos los efectos de la posición relativa de los frutos, el orden de polinización y la competencia entre estos son realmente importantes (Ho, 1992).

Algunos estudios realizados han puesto de manifiesto una marcada similitud en las curvas de respuesta a la luz de especies de pinos (Teskey *et al.*, 1994) encontrándose, además, que factores como el estado fenológico, la temperatura, la nutrición mineral o el estado hídrico influyen considerablemente en la respuesta fotosintética.

La falta de Cu afecta al crecimiento reproductivo (formación de granos, semillas y frutos) mucho más que al crecimiento vegetativo, lo cual está ampliamente relacionado con la tasa de asimilación de CO₂ y la producción de materia seca (Agarwala *et al.*, 1980).

Cuadro 8 Comparación de medias por etapa para variables relacionadas con la tasa de asimilación de CO₂, evaluadas en plantas de tomate en ensayo de invernadero tratadas con NPsCuO.

Etapas	A ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$)	E ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Vegetativa	6.26 b	0.21 b	314.04 b	8.24 a
Reproductiva	6.80 a	0.31 a	327.37 a	8.56 a
Media	6.53	0.26	320.70	8.40
Tukey	0.45	0.05	10.76	1.01

Valores con la misma literal dentro de una columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

A= Tasa de asimilación de CO₂; g_s= Conductancia estomática; C_i= CO₂ intercelular; E= Transpiración.

En la comparación de medias por dosis (Cuadro 9), se observó que la concentración 100 ppm fue la que eficientizó la actividad de la enzima RUBISCO, provocando una mayor tasa de asimilación de CO₂ con 7.50 μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹, superando a las demás concentraciones.

La variable g_s no muestra diferencias estadísticas, pero si numéricas. Donde se observa que el testigo tuvo mayor valor superando el resto de las concentraciones, mientras tanto el comportamiento indica que a concentraciones altas de NPsCuO, numéricamente varían por 1 mol H₂O m⁻² s⁻¹.

La C_i no presentó diferencias estadísticas, pero si muestra diferencias numéricas, las cuales indican que a 25 ppm se obtuvo mayor aprovechamiento del CO₂ intercelular, ya que presenta el menor valor (313.00 μmol CO₂ mol aire⁻¹).

En la variable E el testigo tuvo una mayor transpiración con 9.32 mol H₂O m⁻² s⁻¹, lo cual se pudo deber a una mayor g_s.

La eficiencia fotosintética, se puede ver limitada al disminuir el contenido de RUBISCO y de clorofila en las hojas, así como la producción cuántica de la fotosíntesis. La correlación varía dependiendo del hábitat de la planta y de factores como la temperatura y la radiación (Evans, 1989; Toth *et al.*, 2002; Lamsfus *et al.*, 2003).

Watson (1952) propuso que la eficiencia de la fotosíntesis se puede medir por medio de la tasa del peso seco por unidad de área foliar, como una medida de la tasa de la fotosíntesis, denominada tasa de asimilación neta (TAN).

Cuadro 9. Comparación de medias por dosis para variables relacionadas con la tasa de asimilación de CO₂, evaluadas en plantas de tomate en ensayo de invernadero tratadas con NPsCuO.

Dosis	A ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$)	E ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
0	6.21 b	0.32 a	331.91 a	9.32 a
25	5.87 b	0.21 a	313.00 a	7.24 b
50	6.54 b	0.26 a	317.83 a	8.41 ab
100	7.50 a	0.25 a	320.08 a	8.64 ab
Media	6.53	0.26	320.70	8.40
Tukey	0.84	0.10	20.18	1.89

Valores con la misma literal dentro de una columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

A= Tasa de asimilación de CO₂; g_s= Conductancia estomática; C_i= CO₂ intercelular; E= Transpiración.

Contenido de clorofila

De acuerdo a los cuadrados medios del análisis de varianza para la variable contenido de clorofila (Cuadro 10), se obtuvieron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en las fuentes de variación hora de evaluación, fecha de evaluación, concentración (ppm), y también en las interacciones hora de evaluación*fecha de evaluación, y hora*evaluación*ppm). La interacción hora de evaluación* concentración mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

La clorofila, en sus diversas formas, es el pigmento fotosintético principal en las plantas superiores y su contenido en la hoja depende de la concentración de N foliar (Novoa y Loomis, 1981; Muchow, 1988).

Las clorofilas a y b son pigmentos que se ubican en los cloroplastos, su color verde se debe a que absorben todas las longitudes de onda de la luz visible excepto el verde amarillo (fenómeno conocido también como “ventana verde”), el cual es reflejado y percibido por nuestros ojos. Están conformadas por estructuras policíclicas planas estables, formados por cuatro anillos pirrólicos cíclicos con un anillo de ciclopentanona fusionado al pirrol III, donde los cuatro átomos de nitrógeno que poseen estos cuatro anillos están asociados a un átomo de Mg^{+2} . Si bien las dos son verdes, varían en el grupo unido al anillo pirrólico II, la clorofila a presenta un grupo metilo ($-CH_3$), mientras que la clorofila b presenta un grupo formilo ($-CHO$).

La mayoría de las plantas contienen el doble de clorofila a que clorofila b (Stryer, 2002). La gran eficiencia que presentan estas moléculas como

fotorreceptores se debe a la presencia alternante de enlaces simples y dobles en su estructura (Andreo, 1984).

Las clorofilas difieren en sus espectros de absorción ya que absorben la luz en dos regiones del espectro, cerca de los 400 nm y desde los 600 nm, variando y dependiendo un poco de los diferentes estados de agregación de las moléculas de clorofila o a las proteínas a las cuales estén asociadas.

Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para la variable clorofila en plantas de tomate, tratadas con NPsCuO.

FV	GL	CLOROFILA
Hora	2	125.45**
Evaluación	10	3593.29**
Concentración	3	107.09**
Hora*Evaluación	20	24.81**
Hora*Conc	6	6.99*
Hora*Evaluación*Conc	90	14.14**
Error	924	2.59
CV (%)		3.89

**Altamente significativo al 0.01 % de probabilidad; *Significativo al 0.05% de probabilidad. FV= Fuente de variación; GL= Grados libertad; CV= Coeficiente de variación.

En la comparación de medias por concentración (Cuadro 11), se observó un incremento en el índice de clorofila en las mediciones 1-4 aumentando desde 29.96 hasta 41.36 unidades SPAD. Se hicieron 11 mediciones, la literal a, corresponde a la última medición y presenta el valor más alto (49.04), siendo estadísticamente igual que la medición número 10 con 48.47. En la quinta medición el índice de clorofila disminuyó de las 41.36 unidades SPAD obtenidas en la cuarta medición hasta 39.99. En la medición número 6 el índice de clorofila

se incrementó a 40.31, manteniéndose en un rango de 40-50 unidades SPAD hasta la última medición.

Sainz y Echeverría (1998) determinaron que un valor adecuado de clorofila para un buen rendimiento de grano de maíz debe ser superior a las 50 unidades SPAD. Ellos reportaron como valor crítico para el maíz 35.3 unidades SPAD que equivale a 1,83% de N en la planta, valores que resultaron ser similares a los encontrados por Pantaleón y Ocon (2008) en sorgo.

Novoa y Villagrán (2002) evaluando híbridos de maíz encontraron en la quinta hoja 51 unidades SPAD a los 50 días después de la emergencia.

Cuadro 11. Comparación de medias por concentración de NPs aplicadas al sustrato, para la variable clorofila, determinada en invernadero en plantas de tomate, tratadas con NPsCuO.

FECHA DE EVALUACIÓN (DDT)	ÍNDICE DE CLOROFILA	
6 (1)	29.96	i
9 (2)	32.19	h
13 (3)	39.47	g
16 (4)	41.36	e
20 (5)	39.99	fg
23 (6)	40.31	f
27 (7)	42.63	d
30 (8)	44.12	c
34 (9)	47.28	b
37 (10)	48.47	a
41 (11)	49.04	a
Media	41.35	
Tukey	0.75	

Valores con la misma literal dentro de una columna son estadísticamente iguales.
DDT= Días después del trasplante.

En la comparación de medias por hora de medición del contenido de clorofila (Cuadro 12), se observaron diferencias estadísticas entre los tiempos de determinación de clorofila en unidades SPAD; en las diferencias numéricas existentes, se aprecia un incremento de los valores al transcurrir las horas después de la aplicación de NPsCuO, mostrándose mayor contenido de clorofila a los dos días (48 horas) con 41.73 unidades SPAD.

Reis *et al.* (2006) indican que el mejor lugar para la lectura del ICC de las hojas de café es el tercio medio de la planta, ya que los valores de lecturas de las hojas del ápice presentan valores sobrestimados, debido a que por ser más nuevas presentan mayor poder fotosintético.

Debido a que el valor SPAD es único, puede ser afectado por otros factores además de la cantidad de N, dentro de los cuales se destaca el tipo de suelo, especies ó variedades, estado de crecimiento, otros nutrientes, enfermedad o ataque de insectos y condiciones ambientales (Schepers *et al.*, 1992, Yamamoto *et al.*, 2002, Argenta *et al.*, 2004).

Cuadro 12. Comparación de medias de la variable clorofila por hora, evaluada en invernadero en plantas de tomate, tratadas con NPsCuO.

HORA	CLOROFILA
0	40.66 b
24	41.65 a
48	41.73 a
Media	41.35
Tukey	0.28

Valores con la misma literal dentro de una columna son estadísticamente iguales.

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que la aplicación de NPsCuO no influyó sobre el vigor y la germinación de semillas de tomate Río Grande, sin embargo, a 50 y 100 ppm de NPsCuO se obtuvo mayor peso seco de plántula, longitud media de vástago y de radícula.

Por otra parte, el uso de NPsCuO aplicadas al sustrato en forma de suspensión a concentraciones altas (50 y 100 ppm), inhiben el desarrollo de la planta, causando fitotoxicidad, lo cual se refleja en un menor diámetro de tallo y altura de planta.

En cuanto a la tasa de asimilación de CO₂, los tratamientos evaluados modifican la eficiencia del mesófilo para la fijación del CO₂. Durante la etapa reproductiva se obtuvo mayor tasa de asimilación de CO₂, esto puede deberse a que durante dicha etapa la planta requiere una mayor cantidad de fotosintatos para la floración y el llenado de frutos.

La aplicación de NPsCuO a 100 ppm dirigidas al sustrato, en forma de suspensión, fue la que eficientizó la actividad de la enzima RUBISCO, provocando una mayor tasa de asimilación de CO₂ con 7.50 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, superando a las demás concentraciones.

En cuanto a contenido de clorofila, se puede concluir que éste va aumentando a medida que transcurren las horas después de la aplicación de NPsCuO, así como con el tiempo de desarrollo del cultivo.

VI. LITERATURA CITADA

- Abbasi, M., A Ghorbani and M. Moameri. 2016. Effects of silica and silver nanoparticles and seed germination traits of *Thymus kotschyanus* in laboratory conditions. *Journal of Rangeland Science* 6 (3): 222-231.
- Agarwala, S. C., P. N. Sharma, C Charterjee and P. C. Sharma. 1980. Cooper deficiency changes induced in wheat anther. *Proceedings of the Indian National Science Academy, Calcutta* 46 (2): 172-176.
- Aguilar Gutiérrez, M. 2000. *Biomecánica: La física y la fisiología*. Madrid, España. Instituto superior de investigaciones científicas.
- Almutari, Z. M. and A. Alharbi. 2015. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 9 (6): 586-590.
- Alvarado, R., F. Solera y J. R. Vega-Baudrit. 2014. Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de zinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15 (3): 134-148.
- Andersson, I. 2008. Catalysis and regulation in Rubisco. *Journal of Experimental Botany* 59, 1555-1568.
- Andersson, I. and A. Backlund. 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 275-291.
- Andreo, C. S. 1984. *Fotosíntesis*. Secretaría general de la organización de los estados americanos, programa regional de desarrollo científico y tecnológico.
- Argenta, G., P. Ferreira and L. Sangoi. 2004. Leaf relative chlorophyll content as an indicator parameter to predict nitrogen fertilization in maize. *Ciencia Rural* 34 (5): 1379-1387.
- Ayers J. C. and J. A. Barden. 1975. Net photosynthesis and dark respiration of apple leaves as affected by pesticides. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 100: 24-28.
- Azcon-Bieto J. y M. Talón. 2000. *Fisiología Vegetal*. 2ª Edición. Madrid. McGraw-Hill/Interamericana.
- Barceló, J., R. Nicolás, B. Sabater, y R. Sánchez. *Fisiología Vegetal*. Editorial Pirámide S. A. Madrid: 1983. 813 p.

- Basra, A. S. (ed.) Food Products Press. Preface New York, USA. 49 (12), 3907-3919. L. O. Copeland and M. B. McDonald. 1995. Principles of seed science and technology. 3rd. Ed. Chapman and Hall. New York, USA. 409 p.
- Bavaresco, L., M. Gatti and M. Fregoni. 2010. Nutritional deficiencies. In methodologies and results in grapevine research; Springer: Berlin, Germany, pp. 165-191.
- Betancourt Galindo, R., P. Y. Reyes, B. Puente, C. Ávila-Orta, O. Rodríguez, G. Cadenas, R. H. Lira-Saldívar and L. A. García-Cerda. 2014. Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. Journal of Nanomaterials, Article ID 980545. 1- 5.
- Bewley, J. D. 1986. Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in seed storage. In: Physiology of the seed deterioration. (M.B. McDonald Jr. & C.J. Nelson Eds.). CCSA: Madison. USA. p. 22.
- Bewley, J. D. and M. Black. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. 2nd Ed. Plenum Press. New York, USA. 367 p.
- Bidweil, R. G. S. 1979. Plant physiology. MacMillan Publishing. New York, USA.
- Campbell, Neil y Jane Reece. Biología. Editorial Médica Panamericana S. A. Madrid: 2005. 1351 p.
- Castillo, R. F. 2012. Introducción a los nanomateriales. Facultad de estudios superiores, UNAM. Cuautitlán, Izcalli, México. 54 p.
- Cogua, J. Curso virtual de fisiología vegetal. Bogotá, D. C. Universidad Nacional de Colombia. {10 de agosto de 2011} disponible en: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap01/06_08.htm
- Copeland, L. O. and M. B. McDonald. 1995. Principles of seed science and technology. 3rd. Ed. Chapman and Hall. New York, USA. 409 p.
- Cowan, I. R. 1977. Stomatal behavior and environment. Advances in Botanical Research 4, 117-228.
- Chinnamuthu, C. R. and M. Boopathi. 2009. Nanotechnology and Agroecosystem. Tamil Madras Agric. J., 96 (6): 17-31.
- Crofts, G. C., D. L. Kachson, P. M. Martin y J. C. Patrick. 1971. los vegetales y sus cosechas, fundamentos de agricultura moderna. Editorial AEDOS. Barcelona España. pp. 245.

- Davies, W. J. and T. T. Kozlowski. 1974. Stomatal responses of five woody angiosperm species to light intensity and humidity. *Canadian Journal of Botany* 52: 1525-1534.
- Ehleringer, J., O. Björkman and H. A. Mooney. 1976. Leaf pubescence: effects on absorptance and photosynthesis in a desert shrub. *Science* 192: 376-377.
- Eichert, T., A. Kurtz, U. Steiner and H. E. Goldbach. 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum*. 134: 151-160.
- Evans, L. T. 1988. *Crop Evolution, Adaptation and Yield*. Cambridge, University Press. pp: 71.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2011. *Semillas en emergencia. Manual técnico*. Roma, Italia. 81p.
- Farquar, G. D. and T. D. Sharkey. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33, 317-345.
- Ferguson, J. 1995. An introduction to seed vigor testing. In: *Seed vigor testing seminar*. Zurich: International Seed Testing Association. Copenhagen Denmark. p. 1-9.
- Fleischer, A., M. A. O' Neill and R. Ehwald. 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiology*. 121: 829-838.
- Gosiewski, W., H. J. M. Nilwik and J. F. Bierhuizen. 1982. The influence of temperature on photosynthesis of different tomato genotypes. *Scientia Hort.*, 16:109-115.
- Grace J., D. C. Malcolm and I. K. Bradbury. 1975. The effect of wind and humidity on leaf diffusive resistance in Sitka spruce seedlings. *Journal of Applied Ecology* 12: 931-940.
- Grillo, R., P. C. Abhilash and L. F. Fraceto. 2016. Nanotechnology Applied to Bio-Encapsulation of Pesticides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 16: 1231-1234.
- Hans, J. 1974. *Photosynthesis*. Institute of molecular Biophysics, Florida State University. Primers edition. 141-145.

- Hashemi, E. and M. Mosavi. 2013. Effect of anatase nanoparticles (TiO₂) on parsley seed germination (*Petroselinum crispum*) In Vitro. Biol Trace Elem Res 155: 283-286.
- Hatami, M., M. Ghorbanpour and H. Salehjarjomand. 2014. Nano-anatase TiO₂ modulates the germination behavior and seedling vigority of some commercially important medicinal and aromatic plants. J. Biol. Environ. Sci. 8 (22): 5359.
- Ho. L. C. 1992. The distribution and identity of assimilates in tomato with special reference to stem reserves. Annual of Botany 73, 315-323.
- King B. J., M. Y. Siddiqi, T. J. Ruth, R. H. Warner and A. D. M. Glass. 1993. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. Plant Physiology 102, 1279-1286.
- Kyung-Seok, K. S. and I. C. Kong. 2014. Toxic effects of nanoparticles on bioluminescence activity, seed germination, and gene mutation. Applied microbiology and biotechnology. 98: 3295-3303.
- Kottegoda, N., I. Munaweera, N. Maduska and V. Karunaratne. 2011. A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated Wood. Current Science (Bangalore). 101: 73-78.
- Kozlowski T. T., 1986. The impact of environmental pollution on shade trees. *Journal of Arborics* 12: 29-37.
- Kozlowski T.T. and H. A. Constantinidou. 1986. Responses of woody plants to environmental pollution. Part I. Sources, types of pollutants, and plant responses. Forest Abstracts 47: 5-51.
- Kozlowski T. T., P. J. Kramer and S. G. Pallardy. 1991. The Physiological Ecology of Woody Plants. Academic Press, San Diego.
- Kozlowski T. T. and S. G. Pallardy. 1997. Physiology of Woody Plants. Academic Press, San Diego. 411 pp.
- Khan, A. S., 2014. Ethics and Nanotechnology. In Ethics in Science, Technology and Engineering, Doi:10.1109/ETHICS.2014.6893462. 1-14 pp.
- Khodakovskaya, M., M. Mahmood, Y. Xu, Z. Li, F. Watanabe and A. S. Biris. 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth ACS Nano 3: 10. 3221-3227.
- Kramer P. J. and T. T. Kozlowski. 1979. Physiology of Woody Plants. Academic Press, New York.

- 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.
- León, J. y G. Sepúlveda. 2012. El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta antioxidante de las plantas. *Interciencia* Vol. 37, N° 11, pp 805-811. Venezuela.
- Lira Saldívar, R. H., 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*. 83: 133-138.
- Lira Saldívar, R.H. and Méndez Arguello, B. 2016. *Agronotecnología*. Nueva Frontera De La Revolución Verde. CIQA. Saltillo, México. pp.11-277.
- Liu, R. Q. y R. Lal. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*. 514: 131-139.
- Long, S. P., E. A. Ainsworth, A. Rogers and D. R. Ort. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants face the future. *Annu Rev Plant Phys*. 55, 591-628.
- Lugo-Medina, E., C. García-Gutiérrez y R. Ruelas-Ayala. 2010. Nanotecnología y nano encapsulación de plaguicidas. *Revista Ra Ximhai*. 6 (1): 63-67.
- Mahmoodzadeh, H., M. Nabavi and H. Kashfi. 2013. Effect of nanoescale titanium dioxide particles on the germination and growth of canola (*Brasica napus*). *Journal of Ornamental and Horticultural Plants* 3 (1): 25-32.
- Marcos-Filho, J. 1998. New approaches to seed vigor testing. *Scientia Agricola*. 55: 27-33.
- Marschner, H. 1995. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. P. Marschner (Ed.). Academic Press, San Diego, CA.
- Maynard, A. D. 2015. Navigating the fourth industrial revolution. *Nature nanotechnology*, 10 (12), 1005-1006.
- Medina, C., M. J. Santos-Martínez, A. Radomski, O. I. Corrigan and M. W. Radomski. 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol*. 150: 552-558.
- Mengel, K. and E. A. Kirkby. 2001. *Principles of plant nutrition*, 5th ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 190: 142-145.

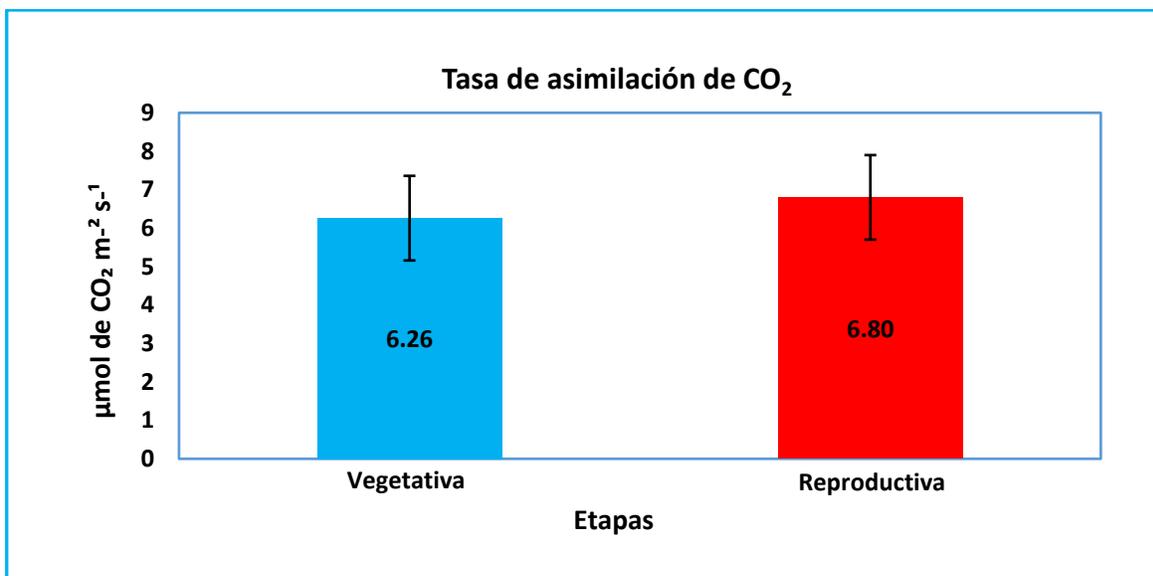
- Miller R. and J. Rüş. 1960. Zur Frage der Kohlensäureversorgung des Walder. Forstwiss. Centralbl. 79: 42-62.
- Mingyu, S., W. Xiao, L. Chunxiang, Q. Xiaoqing, L. Liang, C. Hao and H. Fashui. 2007. Promotion of energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II by nano-anatase TiO₂. Biol. Trace Elem. Res. 119: 183–192.
- Molins, R. 2008. Oportunidades y amenazas de la nanotecnología para la salud, los alimentos, la agricultura y el ambiente. IICA. Año 4. 16 (1): 38-39.
- Monica, R. C. and R. Cremonini. 2009. Nanoparticles and higher plants. Caryologia 62 (2): 161-165.
- Muchow, R.C. 1988. Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment. I. Leaf growth and leaf nitrogen. Field Crops 18:1-16.
- Mukherjee, M. and A. Mahapatra. 2009. Effect of coinage metal nanoparticles and zwitterionic surfactant on reduction of [Co (NH₃)₅Cl] (NO₃)₂ by iron (III). Colloid Surface. 350: 1-7.
- Mukhopadhyay, S. S. 2014. Nanotechnology in Agriculture: Prospects and Constraints. Journal of Nanotechnology, Science and Applications, 7: 63-71.
- Novoa R. y A. Villagrán. 2002. Evaluación de un instrumento medidor de clorofila en la determinación de niveles de nitrógeno foliar en maíz. Agricultura Técnica 62 (1):165-171.
- Novoa, R. and R. S. Loomis. 1981. Nitrogen and plant production. Plant Soli 58: 177-204.
- Nuruzzaman, M., M. M. Rahman, Y. Liu, and R. Naidu. 2016. Nanoencapsulation, Nano-Guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. Journal of agricultural and food chemistry. 64: 1447-1483.
- O 'Barr, R. D., 1977. Nutrients: Their impact. The Pecan Quarterly 11 (4): 4-10.
- Ocon P. P., 2008. Utilización el clorofilómetro SPAD 502 para diagnosticar la deficiencia de nitrógeno en sorgo (*Sorghum bicolor* L.) bajo distintas dosis de nitrógeno (tesis), Managua, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria. 55 p.
- Olofinboba M. O., T. T. Kozlowski and P. E. Marshall. 1974. Effects of antitranspirants on distribution and utilization of photosynthesis in *Pinus resinosa* seedlings. Plant Soil 40: 619-635.

- Pandey, S., W. Zhang and S. Assmann. 2007. Roles of ion channels and transporters in guard cells signal transduction. *FEBS Letters* 581, 2325-233.
- Parry M. A. J., P. J. Madgwick, J. F. C. Carvahlo, P. J. Andraloj. 2007. Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco. *Journal of Agricultural Science* 145, 31-43.
- Peat, W. E. 1970. Relationships between photosynthesis and light intensity in the tomato. *Ann. Bot.*, 34:319-348.
- Peng, C., D. Duan, C. Xu, Y. Chen, L. Sun, H. Zhang, X. Yuan, L. Zheng, Yang, J. Yang, X. Zhen, Y. Chen and J. Shi. 2015. Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environmental Pollution*. 197: 99-107.
- Portis A. R. Jr., 2003. Rubisco activates-Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* 75, 11-27.
- Portis A. R. Jr. and M. A. Parry. 2007. Discoveries in Rubisco (Ribulose-1, 5 biphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynthesis Research* 94, 121-143.
- Powles, S. B., 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 15-44.
- Prasad, T. N., P. Sudhakar, Y. Sreenivasulu, P. Latha, V. Munaswamy, K. R. Reddy y T. Pradeep. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*. 35: 905-927.
- Prasad, R., V. Kumar and K. S. Prasad. 2014. Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *African Journal of Botechnology*. 13: 705-713.
- Razzaq, A., R. Ammara, H. M. Jhanzab, T. Mhamood, A. Hafeez, and S. Hussain. 2015. A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat. *Journal of Nanoscience and Technology* 2 (1):55–58.
- Reis, A. R., E. Furlani, S. Buzetti y M. Andreotti. 2006. Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. *Bragantia*, 65: 163-171.
- Resham, S., M. Khalid and A. G. Kazi. 2015. Nanobiotechnology in Agricultural Development. In *Plantomics: The Omics of Plant Science*. 683-698.

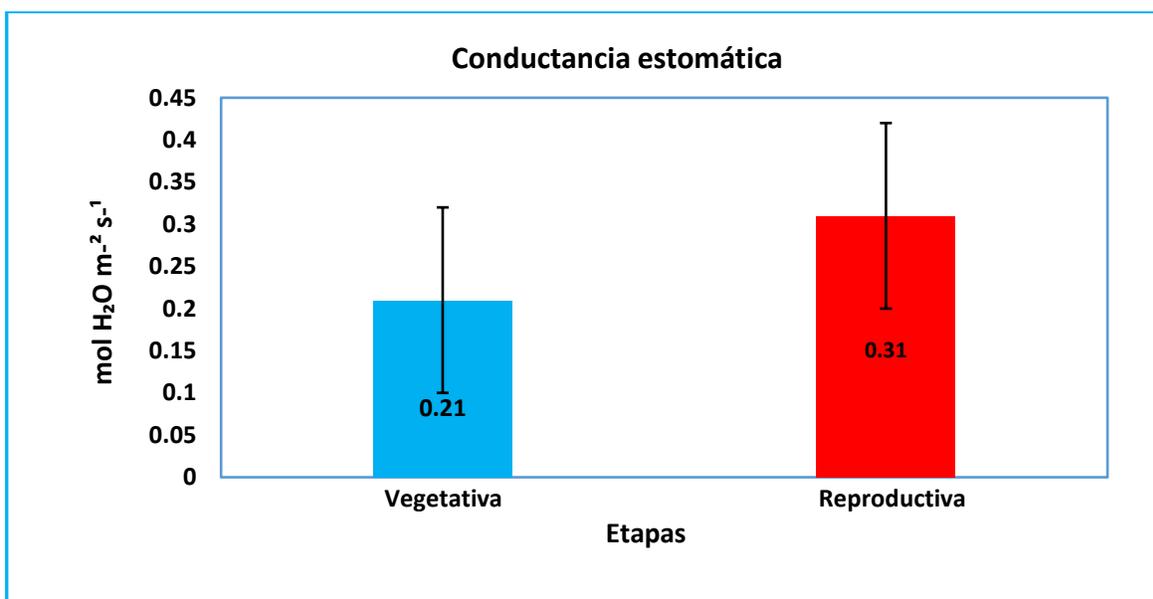
- Saeid, S. and H. Hojjat. 2016. Effects of silver nanoparticle exposure on germination of Lentil (*Lens culinaris* Medik.). International Journal of Farming and Allied Sciences 5 (3):248-252.
- Sainz R. H. y H. E. Echeverría. 1998. Relación entre las lecturas del medidor de clorofila (Minolta SPAD 502) en distintos estadios del ciclo del cultivo de maíz y el rendimiento del grano. Revista de la Facultad de Agronomía 103 (1):37-44.
- Salama H. M. H., 2012. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). Int. Res. J. Biotechnol. 3 (10): 190-197.
- Salisbury, F. y C. Ross. Fisiología vegetal. Editora Iberoamérica, México, 1994. 759 p.
- Sánchez M., J. Aguirreolea. 2000. Movimientos estomáticos y transpiración. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. J. Azcon-Bieto & M. Talón (Eds.) McGraw-Hill Interamericana, 32-43.
- Savithramma, N., S. Ankanna and G. Bhumi. 2012. Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* and endemic and endangered medicinal tree taxon. Nano vision 2: 61-68.
- Schepers, J., D. Francis, M. Pvcgil and chlorophyll meter readings. Communications in Soil Science and Plant Analysis 23 (17): 2173-2187.
- Schroeder J. I., G. J. Allen, V. Hugouvieux, J. M. Kwak and D. Waner. 2001. Guard cell signal transduction. Annu Rev Plant Phys. 52, 627-658.
- Squeo F. A. y M. F. León. 2007. Transpiración. En F. A. Squeo y L. Cardemil (eds). Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, Chile.
- Sharma, P., B. Deepesh, M. G. H. Zaidi, P. Pardha, P. K. Khanna, y A. Sandeep. 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. Applied biochemistry and biotechnology. 167: 2225-2233.
- Stryer, L., J. Berg and J. Tymoczko. 2002. Biochemistry. Freeman, New York, 974 p. 5ª edición.
- Taiz, L. and E. Zeiger. Plant Physiology. 4th ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 2006, 83 p. ISBN-10: 0878938567.
- Tang, Y., J Zhao, G. Nie, L. Xu and B. Xing. 2016. Oxidative stress induced toxicity of CuO nanoparticles and related toxicogenomic responses in *Arabidopsis thaliana*. Environment Pollution, 212, 605-614.

- Turner N.C., E. D. Schulze and T. Gollan. 1984. The responses of stomatal and leaf gas exchange to vapour pressure deficits and soil water content. I. Species comparisons at high soil water contents. *Oecologia* 63: 338-342.
- Ullah, S. and M. Arshad. 2014. Exposure-Response of *Triticum aestivum* to titanium dioxide nanoparticles application: seedling vigor index and micronuclei formation. *Institute of Environmental Sciences and engineering* 20 (1): 57-61.
- Velázquez, H. 2014. Estudio fisiológico en familias prolíficas de un lote de producción de semilla de la variedad de maíz JAGUAN. Tesis de Maestría Profesional. Programa de Maestría en Tecnología de Granos y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 13 p.
- Watson, D. J. 1952. The physiological basic of variation in yield. *Adv. Agron.* 4:101- 145.
- Xue, J., Z. L. Luo, P. Li, Y. Ding, Y. Cui and Q. Wu. 2014. A residue-free green synergistic antifungal nanotechnology for pesticide thiram by ZnO nanoparticles. *Scientific Reports.* 4: 1-9.
- Yadollahi, A., K. Arzani and H. Khoshghalb. 2009. The role of nanotechnology in horticultural crops postharvest management. In *Southeast Asia Symposium on Quality and Safety of Fresh and Fresh-Cut Produce* 875. 49-56 pp.
- Yah, C. S. and G. S. Simate. 2015. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 23 (1), 1-10.
- Yamamoto, O., 2001. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials,* 3 (7), 643-646.
- Yamamoto, A., T Nakamura, J. Adu-Gyamfi and M. Saigusa. 2002. Relationship between chlorophyll content in leaves of sorghum and pigeonpea determined by extraction method and by chlorophyll meter (SPAD-502). *Journal of Plant Nutrition* 25 (10): 2295-2301.
- Zhang, D., T. Hua, F. Xiao, C. Chen, M. R. Gersberg, Y. Liu, D. Stuckey, J. W. Ng and K. S. Tan. 2015. Phytotoxicity and bioaccumulation of ZnO nanoparticles in *Schoenoplectus tabernaemontani*. *Chemosphere.* 20: 211-219.
- Zayago-Lau, E. y G. Foladori. 2010. La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. *Econ. Soc. Territ.* 10 (32), 143-17.

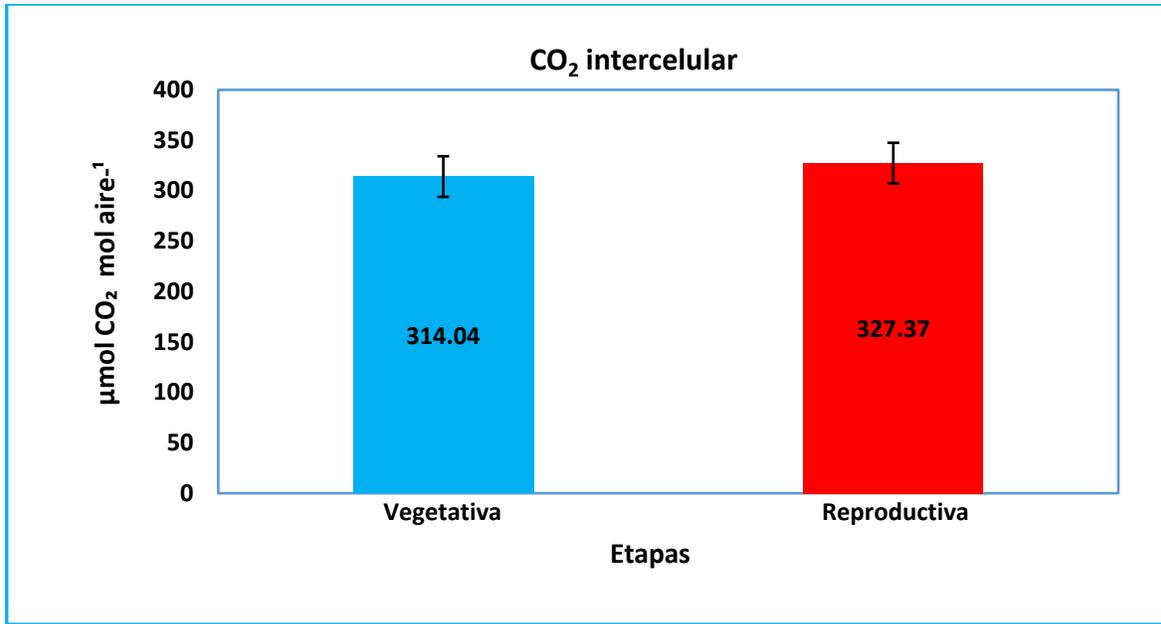
VII. ANEXOS



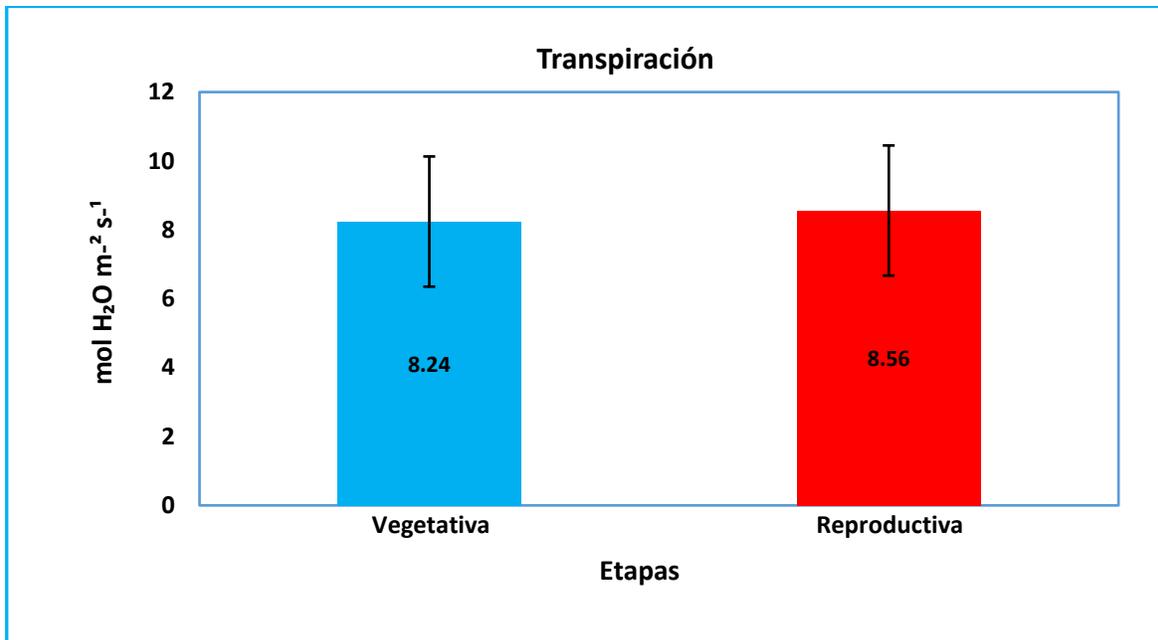
Anexo 1. Comparación de la tasa de asimilación de CO₂ en diferentes etapas fenológicas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.



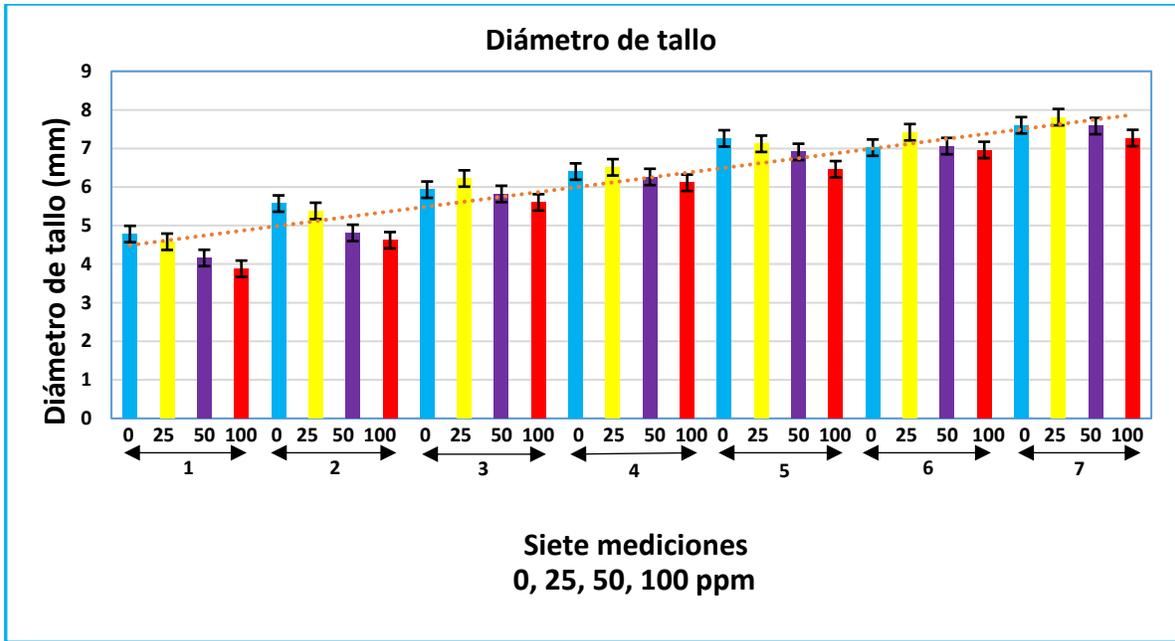
Anexo 2. Comparación de la conductancia estomática en diferentes etapas fenológicas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.



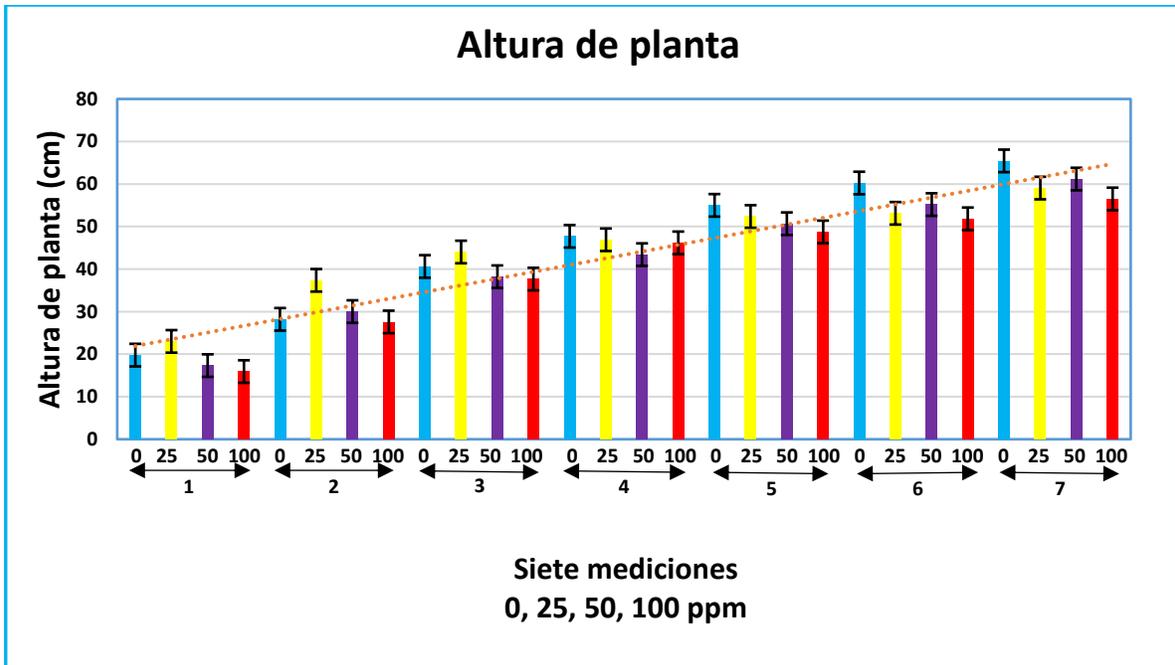
Anexo 3. Comparación del CO₂ intercelular determinado en diferentes etapas fenológicas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.



Anexo 4. Comparación de la tasa de transpiración en diferentes etapas fenológicas en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.



Anexo 5. Diámetro medio de tallo en mm, determinado en siete mediciones diferentes en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.



Anexo 6. Altura media de planta en cm, determinada en siete mediciones diferentes en plantas de tomate tratadas con NPsCuO.