

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Impacto De Nanopartículas De Óxido De Zinc y Sulfato de Zinc En Parámetros Fisiológicos Y Acumulación de Peróxido de Hidrógeno en Plantas De Cilantro

Por:

MARCO ANTONIO RAMÍREZ CASTRO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Impacto De Nanopartículas De Óxido De Zinc y Sulfato de Zinc En Parámetros Fisiológicos Y Acumulación de Peróxido de Hidrógeno en Plantas De Cilantro

Por:

MARCO ANTONIO RAMÍREZ CASTRO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Josué Israel García López
Asesor Principal Interno

Dr. Emilio Olivares Sáenz
Asesor Principal Externo

Dra. Norma Angélica Ruiz Torres
Coasesor

Dr. Antonio Flores Naveda
Coasesor

Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2021

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior, me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Marco Antonio Ramírez Castro

AGRADECIMIENTOS

A **Díos** por haberme brindado la oportunidad de continuar con mis estudios, principalmente por darme la vida, salud y bienestar para seguir adelante. Por guiar siempre mí camino. Por acompañarme siempre en este camino que ha sido largo, pero no difícil de caminar al ir de su mano. Gracias por ayudarme a cumplir uno de los más grandes sueños de mi vida.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, mi “**Alma Mater**” que me abrió las puertas para poder continuar con mis estudios y me brindo varias experiencias para mi formación profesional, orgulloso por ser parte de una de las escuelas más importantes de agronomía, por todas esas alegrías y muchas cosas más siempre seré un ¡Buitre por siempre!.

Al **Dr. Josué Israel García López**. Por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto de investigación y brindarme su valioso tiempo, paciencia y conocimientos para poder concluir con esta tesis que es la etapa final de mis estudios profesionales. Muy agradecido por el apoyo en todo momento.

A la **Dra. Norma Angélica Ruiz Torres**. Por brindarme siempre su apoyo incondicional, gracias por mostrarme un poco de sus grandes conocimientos y su gran experiencia, y por formar parte de este último proyecto tan importante en mi formación profesional.

Al **Dr. Antonio Flores Naveda**. Por su valiosa colaboración para la culminación del presente proyecto.

Al **Dr. Emilio Olivares Sáenz**. Por su ayuda para la realización de este proyecto de investigación y por formar parte del último trabajo más importante en mi formación profesional.

A mis maestros del Departamento de Fitomejoramiento. Por haberme brindado sus grandes conocimientos y experiencias, por sus consejos y motivaciones en todo momento para lograr cumplir el sueño de terminar una carrera universitaria.

Al Dr. Víctor Manuel Reyes Salas. Le agradezco inmensamente por apoyarme y sacarme en toda dificultad, es un excelente maestro y amigo, agradezco a Dios por haberlo puesto en mi camino.

A mis amigos Miguel Ángel García, Daniel Rogelio Díaz, José Alfredo Osorio y Miguel Ángel Ávila, quienes me dieron la oportunidad de convivir con ellos y formar parte de su vida durante mi estancia en la Narro, por brindarme su amistad sincera y recorrer el mismo camino juntos.

DEDICATORIAS

A mis queridos padres:

Minerva Castro Ramírez y Crispín Ramírez Andrés

Gracias primeramente por haberme brindado la oportunidad de continuar con mis estudios y por haberme dado las herramientas para construir este sueño. Gracias por la confianza, por su valioso apoyo y por su gran cariño que han depositado en mí para lograr concluir esta etapa tan importante en mi vida. Han sabido guiarme de la mejor manera posible y estar junto a mí en los momentos más difíciles, por su apoyo incondicional además corrigiéndome, indicándome mis errores y aprender de ellos para ser mejor persona. Hemos vivido muchos tropiezos, alegrías e incluso tristezas, pero siempre juntos y eso nos ha permitido crecer y superarnos día con día. Gracias por sus consejos y por escucharme siempre que lo necesito. Agradezco todo el gran esfuerzo que han hecho para cumplir juntos esta meta. Han sido una de mis fortalezas a pesar de la distancia, espero y estén orgullosos de mí. Por eso y mucho más los amo y admiro mucho.

A mis queridos hermanos:

- Alberto Ramírez Castro
- Gabriela Ramírez Castro
- Salvador Ramírez Castro

Les agradezco por el apoyo incondicional brindado en todo momento cuando más lo necesite, por preocuparse por mí en todo momento. Por ser una de mis fortalezas para salir adelante en la vida y con mis estudios, dándome y guiándome de sus buenos consejos y motivaciones. Gracias por creer en mí y hacer mis metas en suyas también.

Los quiero mucho, hermanos queridos.

A mis sobrinos:

Alan, Brayan y Jaziel

Gracias por ser uno de mis principales motores para salir adelante, aprecio su compañía lo cual hace que este feliz con solo tener su presencia.

A mis abuelos:

Isabel y Teresa

Gracias por su apoyo tan inmenso y por estar siempre pendiente de mí, por sus sabios consejos y motivaciones para poder salir adelante. Los quiero mucho y espero poder conservarlos por muchos más años.

A toda mi familia:

Tíos, tías, primos, primas, por brindarme su apoyo en todo momento en mi formación profesional.

A mi amigo Miguel Ángel García Arenas

Gracias por su amistad, por el apoyo, por los buenos y malos momentos, le agradezco por acompañarme y recorrer el mismo camino juntos, le agradezco a Dios por haberlo puesto en mi camino. Espero y algún día volvamos a compartir experiencias.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

Contenido	Pág
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general.....	2
Hipótesis	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
Aplicación del zinc (Zn).....	3
El Zn en suelo.....	3
El Zn en la nutrición de cultivos	5
Nanotecnología en la agricultura	7
Captación y acumulación de NPs	10
Agentes no enzimáticos del sistema de defensa antioxidante.....	16
Antioxidantes enzimáticos del sistema de defensa antioxidante	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
Materiales a base de zinc y semillas de cilantro	18
Preparación de soluciones/suspensiones a base de zinc y su aplicación al suelo	18
Condiciones de crecimiento de las plantas.....	18
Cosecha de plantas	19
Cuantificación elemental de Zn mediante espectrometría de emisión atómica por inducción de plasma acoplado.....	19
Contenido de pigmentos de clorofila y carotenoides.....	20
Contenido de H ₂ O ₂	20
Determinación de las actividades de las enzimas antioxidantes	21

Actividad de POD.....	21
Actividad de APX	21
Actividad de CAT	22
Análisis estadístico	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
Absorción de Zn en raíz y brotes	23
Concentración de pigmentos fotosintéticos	26
Contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y actividad enzimática.....	29
5. CONCLUSIONES.....	33
6. LITERATURA CITADA	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para la absorción de Zn en raíz y brote de plantas de cilantro, cultivadas en suelo modificado con ZnSO ₄ y NPs ZnO.	23
Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de clorofila a (CA), clorofila b (CB), clorofila total (CT) y carotenoides (CAR) en plantas de cilantro cultivadas en suelo modificado con ZnSO ₄ y NPs ZnO.	26
Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂), catalasas (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POD) en plantas de cilantro cultivadas en suelo modificado con ZnSO ₄ y NPs ZnO	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Categorización de los distintos mecanismos de toxicidad que pueden generar las NPs (Karl-Josef y Simone, 2011).	8
Figura 2. Descripción general de la vía de captación, translocación y biotransformación de las NPs ZnO en un sistema vegetal; (A) sección transversal de la hoja que muestra la entrada de NPs a través de los estomas, la penetración de la cutícula y heridas; (B) corte transversal de la raíz que muestra la entrada de NPs a través de lesiones o biotransformación en iones de Zn y siguen vías apoplásticas y simplásticas (Singh <i>et al.</i> , 2017).....	14
Figura 3. Los mecanismos de toxicidad de NPs Zn y Cu a través de la producción de ROS.	15
Figura 4. Absorción de Zn en raíz (A) y brote (B) en plantas de cilantro expuestas a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mg Zn/Kg suelo con ZnSO ₄ y NPs ZnO. Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).	24
Figura 5. Contenido de clorofila a (CA) (A), clorofila b (CB) (B), clorofila total (CT) (C) y carotenoides (CAR) (D) en plantas de cilantro expuestas a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mg Zn/Kg suelo con ZnSO ₄ y NPs ZnO. Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).	27
Figura 6. Contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) (A), catalasas (CAT) (B), ascorbato peroxidasas (APX) (C) y peroxidasas (POD) (D) en plantas de cilantro expuestas a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mg Zn/Kg suelo con ZnSO ₄ y NPs ZnO. Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).....	31

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la aplicación de nanopartículas metálicas de óxido de zinc (NPs ZnO) y sulfato de zinc (ZnSO_4) en plantas de cilantro (*Coriandrum sativum*), bajo condiciones controladas en un invernadero. Los fertilizantes (ZnSO_4 y NPs ZnO) se prepararon a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 mg de Zn/kg de suelo. La cosecha se realizó a los 59 días después de la siembra, donde se retiraron diez plantas/tratamiento, las cuales fueron utilizadas para la cuantificación de Zn en tejido vegetal, y para la determinación de pigmentos fotosintéticos y análisis bioquímicos (H_2O_2 , MDA y enzimas antioxidantes). La mayor concentración de Zn se encontró en las raíces y en los brotes de las plantas tratadas con ZnSO_4 , lo cual se debe, a una mayor absorción de Zn por las raíces de las plantas a partir de esta fuente, como catión libre (Zn^{++}). De acuerdo con los resultados, el suelo modificado con ZnSO_4 y NPs ZnO a una concentración de 200 a 300 mg/kg permitió una mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos en las hojas. Para el caso del contenido de carotenoides la mayor acumulación se encontró en una concentración de 100 mg/kg en las dos fuentes respectivamente de Zn; ZnSO_4 y NPs ZnO. Sin embargo, el ZnSO_4 en todas las concentraciones generó una mayor acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que resultó en una mayor actividad de enzimas antioxidantes.

Palabras clave: pigmentos fotosintéticos, enzimas antioxidantes, toxicidad, absorción, nanofertilizantes.

1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de la nanotecnología en la agricultura, comenzó con la idea de que las tecnologías agrícolas convencionales no podían ser capaces de lograr una productividad más elevada, ni restaurar los ecosistemas dañados por las técnicas existentes, debido a que los efectos a largo plazo de la agricultura con semillas mejoradas genéticamente, en conjunto con el riego, fertilizantes y pesticidas se han cuestionado (Muckhopadhyay, 2014). La agricultura suele ser un sector donde nuevas tecnologías se aplican para mejorar el rendimiento de los cultivos.

La aplicación de la nanotecnología y el desarrollo de nuevos nanodispositivos y nanomateriales tiene un amplio potencial en la agricultura y en la biotecnología (Srilatha, 2011). La nanoagricultura como su nombre lo dice, se refiere a la aplicación de partículas con tamaño nano en los sistemas de producción agrícola, puesto que estas partículas ofrecen grandes beneficios para los cultivos. Además, con la intervención de la nanotecnología en la agricultura, se tiene grandes expectativas por ejemplo: para mejorar la eficiencia del uso de los nutrientes a través de nanoformulaciones de fertilizantes, el manejo y control de plagas, el desarrollo de pesticidas e insecticidas comerciales de nueva generación disminuyendo así la cantidad de producto a aplicar al suelo o al follaje, en dosis significativamente menores que las que se utilizan de manera convencional, de esta manera se busca proteger el agroecosistema (Xue *et al.*, 2014).

Las NPs de óxido de zinc (NPs ZnO) se están utilizando como fertilizantes aplicados para mejorar el rendimiento y la productividad de cultivos, también, se utilizan como antimicrobiales para el control de enfermedades de plantas, como promotores de germinación y crecimiento vegetal, así como nanofertilizantes (Liu y Lal, 2015). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de NPs ZnO y ZnSO₄ en parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas de cilantro (*Coriandrum sativum*) cultivadas en suelo modificado con los compuestos de Zn a 100, 200, 300 y 400 mg de Zn/kg de suelo.

Objetivo general

Determinar el impacto de NPs ZnO y ZnSO₄ aplicadas al suelo, en parámetros fisiológicos (concentración de clorofila), acumulación de peróxido de hidrógeno y actividad de enzimas antioxidantes en tejido vegetal de plantas de cilantro (*Coriandrum sativum*).

Hipótesis

La aplicación de NPs ZnO y ZnSO₄ en suelo, tiene un impacto en parámetros fisiológicos (concentración de clorofila), acumulación de peróxido de hidrógeno y actividad de enzimas antioxidantes en tejido vegetal de plantas de cilantro (*Coriandrum sativum*).

La aplicación de NPs ZnO y ZnSO₄ en suelo, no impacta los parámetros fisiológicos (concentración de clorofila), acumulación de peróxido de hidrógeno, ni la actividad de enzimas antioxidantes en tejido vegetal de plantas de cilantro (*Coriandrum sativum*).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Aplicación del zinc (Zn)

Según las investigaciones de la FAO a escala global, más del 30% de los suelos agrícolas tienen deficiencia de Zn (Sillanpaa, 1982). Esto demuestra que la aplicación de fertilizante de Zn merece atención. La captación de Zn por los cultivos suele ser inferior a 0.5 kg/ha/temporada. En la práctica, la deficiencia de Zn es fácil de correlacionar por pulverización o por aplicación en el suelo con fertilizantes que contienen Zn. Cakmak *et al.* (1996) informaron que en ensayos de campo con tasas de 23 kg Zn/ha el rendimiento de grano de trigo en promedio aumentó en un 43%. El ZnSO₄ es el fertilizante más utilizado en gran parte debido a su alta solubilidad. En general, se recomienda que en suelos arenosos ácidos es más preferible rociar al cultivo una fuente de Zn menos soluble porque el ZnSO₄ se lixivia muy fácilmente.

Las mismas aplicaciones para suelos alcalinos que fijan Zn muy fuertemente, en estas condiciones a menudo se utiliza quelatos de Zn. Randhawa *et al.* (1978) sostienen que muchas áreas de cultivo de arroz son deficientes en la aplicación de Zn y por lo tanto requieren Zn. Se recomiendan tasas de 50 a 100 kg Zn/ha en forma de ZnSO₄. La aplicación de Zn junto con el yeso a menudo ha demostrado ser especialmente beneficiosa (Takkar y Singh, 1978).

El Zn en suelo

La concentración promedio de Zn en suelos no contaminados está en el rango de 17 a 160 µg Zn/g de suelo (Reed y Martens, 1996). La mayor parte está presente en la estructura reticular de los minerales primarios y secundarios (Huang, 1989). El radio del Zn⁺⁺ es muy similar al de Fe⁺⁺ y Mg⁺⁺. Por lo tanto, el Zn⁺⁺ puede sustituir estos iones por reemplazo isomorfo en estructuras minerales, en particular en los minerales ferromagnesios, anfíboles (augita, hornblenda) y biotita. La aparición de

Zn en estos minerales constituye la mayor parte de Zn en muchos suelos. Además, el Zn forma una serie de sales que incluyen ZnS, esfalerita (ZnFe) S, zincita ZnO y smithsonita ZnCO₃. Sin embargo, aparte de la ZnS, que puede estar presente en condiciones reductoras, la mayoría de estas sales son demasiado solubles para persistir en los suelos durante cualquier período de tiempo (Lindsay, 1972). Los dos Zn-silicatos ZnSiO₃, y Zn₂SiO₄, (willemite) también están presentes en algunos suelos.

El Zn se disuelve en la solución del suelo en forma iónica o compleja y se puede encontrar en sitios de intercambio de minerales arcillosos y materia orgánica o se puede adsorber en superficies sólidas como Zn²⁺, ZnOH⁺ o ZnCl⁺. La concentración de Zn en la solución del suelo es muy baja y está en el rango de 3×10^{-5} a 5×10^{-3} mol (Barber, 1984). La solubilidad de Zn es altamente dependiente del pH del suelo y es muy baja a un pH alto del suelo. Es particularmente bajo cuando el CaCO₃ está presente debido a la adsorción específica de Zn²⁺ y la oclusión por carbonatos. La afinidad de adsorción a los carbonatos disminuye secuencialmente, lo que indica la afinidad más alta de Zn a Mg en relación con los carbonatos de Ca (Donner y Lynn, 1989).

La adsorción y oclusión de Zn por los carbonatos son las principales causas de la escasa disponibilidad de Zn y la aparición de la deficiencia de Zn en los suelos calcáreos. El Zn interactúa con la materia orgánica del suelo y se forman complejos orgánicos tanto solubles como insolubles de Zn. Según Hodgson *et al.* (1966), en promedio, el 60% del Zn soluble en el suelo se produce en solubles complejos de Zn orgánicos. El nivel de Zn en los suelos está muy relacionado con el material original. Los suelos que se originan a partir de rocas ígneas básicas tienen un alto contenido de Zn. En contraste, los suelos derivados de materiales parentales más silíceos son particularmente bajos. Ocasionalmente, pueden ocurrir niveles muy altos de Zn en suelos que han sido afectados por desechos y lodos (Juste y Mench, 2017).

El Zn en la nutrición de cultivos

En la mayoría de los suelos, el contenido total de Zn supera con creces el requisito de cultivo y, sin embargo, la disponibilidad de este micronutriente es el factor limitante. El Zn está presente en los minerales primarios y secundarios y puede liberarse por la intemperie en pequeñas cantidades. Se adsorbe en forma de Zn^{++} , $ZnOH^+$ y $ZnCl^+$ a minerales de arcilla, carbonatos y materia orgánica. La adsorción puede ser no específica y en este caso la disponibilidad es alta, mientras que la adsorción específica provocada principalmente por los carbonatos es más fuerte y, por lo tanto, hace que el Zn esté menos disponible.

El Zn también puede estar ocluido por carbonatos y óxidos de Fe/Al y, por lo tanto, no está disponible para las raíces de las plantas. Una proporción importante de Zn en los suelos está unida a moléculas orgánicas y esta unión incluye principalmente la complejación de Zn debido a su afinidad. Además, algunos de estos compuestos están potencialmente disponibles para la planta ya que el Zn se equilibra con los iones Zn en la solución.

La deficiencia de Zn se produce principalmente en suelos con pH alto, especialmente en suelos ricos en carbonatos (Cakmak *et al.*, 1996). Tanaka y Yoshida (1970), al examinar las áreas de cultivo de arroz más importantes de Asia, encontraron que la deficiencia de Zn del arroz solo ocurre en suelos con pH alto y en particular en suelos calcáreos de pH alto. La movilidad del Zn en los suelos es importante en relación con la disponibilidad de Zn, ya que las concentraciones de Zn en la solución del suelo son muy bajas. Los resultados de Elgawhary (1970) mostraron que el 90.5% del Zn total requerido por las plantas se mueve hacia las raíces por difusión.

Como las especies de plantas difieren en sus requerimientos de Zn, Lindsay (1972) sugirió que este puede ser un factor que explica las diferencias en la sensibilidad a la deficiencia de Zn para plantas que crecen en ambientes idénticos. Los factores

que limitan la velocidad de difusión de Zn a las raíces de las plantas también debe reducir la disponibilidad de Zn. Esta es probablemente la razón más importante por la cual la deficiencia de Zn ocurre a menudo en suelos compactados o donde el crecimiento de la raíz se restringe como en un contenedor de plantas cultivadas. La difusión de Zn en los suelos también depende mucho de la humedad del suelo y esta puede ser la razón por la cual, con frecuencia, la deficiencia de Zn ocurre en áreas áridas y semiáridas (Cakmak *et al.*, 1996).

De acuerdo con Lucas y Knezek (1972), los suelos orgánicos y los suelos húmedos pueden contener contenidos absolutamente bajos de Zn y, por lo tanto, en dichos suelos las plantas pueden sufrir deficiencia de Zn. En la práctica, se sabe que los altos niveles de fosfato en el suelo reducen la disponibilidad de Zn, lo cual puede ocurrir por la formación de fosfato de $Zn_3(PO_4)$, lo cual induce a niveles de deficiencia. Las especies o cultivares eficientes de Zn responden al estrés mediante la liberación de sideróforos que pueden movilizar al Zn de los complejos del suelo y así ponerlo a disposición de las raíces. El trigo y la cebada también liberan a los fitosideróforos de sus raíces cuando el suministro de Zn es inadecuado (Chang *et al.*, 1998). El problema necesita más investigación, ya que no existe una relación clara entre la liberación de fitosideróforos y la posibilidad de que todos los genotipos de trigo se conviertan en deficiencia de Zn (Erenoglu *et al.*, 1996).

Debido a la baja movilidad de Zn en el suelo, las micorrizas pueden aumentar sustancialmente la absorción de Zn como la de fosfato por parte de las plantas (Kothari *et al.*, 1991). Esta forma de adquisición puede ser de particular importancia para asegurar un suministro adecuado de Zn en suelos de alto pH. La aplicación de fertilizantes con fosfato generalmente disminuye la actividad de micorrizas, de modo que en suelos con un suministro deficiente de Zn, este tratamiento puede inducir deficiencia de Zn (Martens y Westermann, 1991).

Nanotecnología en la agricultura

Para contrarrestar la baja eficiencia de los fertilizantes comunes en los sistemas de producción, en la última década, el uso de nanomateriales en prácticas agrícolas como nanofertilizantes y los nanoplaguicidas ha ganado mucha atención. El desarrollo y la aplicación de fertilizantes como nanopartículas (NPs) son una de las opciones más efectivas para una mejora considerable del rendimiento agrícola. Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) y óxido de cobre (NPs Cu) se consideran un material bioseguro para las especies biológicas. Estudios anteriores han demostrado efectos positivos de las NPs ZnO durante la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas, así como la mejora en el rendimiento y la calidad de los frutos (Rossi *et al.*, 2018). Sin embargo, en la literatura actual existe controversia ya que se han reportado efectos positivos y/o negativos sobre el crecimiento y el metabolismo de las plantas en diferentes estados fenológicos (López-Moreno *et al.*, 2010).

La agricultura tradicional ha utilizado fertilizantes convencionales o quelatos de EDTA-Zn para aplicaciones foliares y dirigidas al suelo, sin embargo, la eficacia es baja, debido a que son lixiviados, degradados por fotólisis, hidrólisis y descomposición (Fageria *et al.*, 2009). Por lo tanto, la absorción de los nutrientes por las plantas parece estar determinada por la fuente de micronutrientes, para afrontar este problema se requiere reducir las pérdidas de nutrientes en la fertilización y mejorar el rendimiento del cultivo con el uso de nuevas técnicas y sus aplicaciones en mejoras a la fertilización.

La nanotecnología, con el uso de NPs está proporcionando avances en las estrategias de nutrición de las plantas (Liu y Lal, 2015). Las principales ventajas de los fertilizantes a escala nanométrica (1-100 nm) son los puntos de impacto debido a su pequeño tamaño, que podrían mejorar la interacción y la captación de micronutrientes en la fertilización de cultivos (Desai *et al.*, 2015). Las aplicaciones foliares con nanofertilizantes han demostrado ser convenientes porque pueden suministrar nutrientes a las plantas de manera gradual y más controlada que los

fertilizantes convencionales (Prasad *et al.*, 2012). Otra ventaja de usar nanofertilizantes es que la aplicación se puede hacer en cantidades más pequeñas que los fertilizantes convencionales (Davarpanah *et al.*, 2016).

El impacto de las NPs ZnO se ha evaluado en diversos cultivos. Un estudio realizado por Rossi *et al.* (2018) demostró que la aplicación foliar de NPs ZnO influyó positivamente en el crecimiento y la fisiología de plantas de café (*Coffea arabica* L.), con efectos más favorables que las sales de Zn ($ZnSO_4$), principalmente debido a su mayor capacidad para penetrar en la hoja. Otra investigación realizada en arboles de granada (*Punica granatum* cv. Ardestani) mostró que la fertilización foliar con cantidades relativamente bajas de nanofertilizantes de Zn y B incrementó el rendimiento y la calidad de los frutos, incluyendo aumentos en los azúcares del jugo e incrementos en el índice de madurez (Davarpanah *et al.*, 2016).

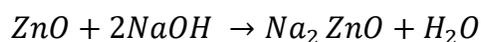
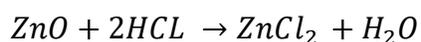
Los efectos de las NPs en las plantas son el resultado del hecho de que los materiales aplicados como nanofertilizantes cambian sus características físicas, químicas y biológicas, así como sus propiedades catalíticas, que, a su vez, afectan las actividades químicas que pueden inducir estrés oxidativo y toxicidad en plantas, junto con la estimulación de los sistemas antioxidantes (Qados, 2015). Un estudio reciente concluyó que la nanotoxicidad depende tanto de la composición y concentración de las NPs, así como la especie evaluada (Figura 1) (Nhan *et al.*, 2015).



Figura 1. Categorización de los distintos mecanismos de toxicidad que pueden generar las NPs (Karl-Josef y Simone, 2011).

Las NPs ZnO mejoraron la germinación, los pigmentos, el azúcar y los contenidos de proteínas con un aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes en diversos cultivos de vegetales (Singh *et al.*, 2013). Las NPs ZnO tienen un efecto significativo en la epidermis de la raíz y la corteza de *Lolium perenne* con la internalización de las NPs en los tejidos endodérmicos y vasculares (Lin y Xing, 2008). Además, las NPs ZnO poseen actividad antimicrobiana contra muchos organismos patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni* (Xie *et al.*, 2011). El aumento en el rendimiento está directamente relacionado con la disminución en el número de microorganismos patógenos y también con el valor nutricional del tipo de NPs, principalmente de micronutrientes esenciales para la planta, como el Zn y Cu (Servin *et al.*, 2015).

Kopittke *et al.* (2011) evaluaron el efecto de las NPs ZnO en plantas de *Phaseolus vulgaris* y encontraron que entre el 65-85% del zinc se regulaba como un complejo de zinc-fitato. Los iones de Zn⁺⁺ activan la enzima fitasa, que puede estar unida al ácido fítico para generar fitato de Zn. El ácido fítico es altamente inestable y, por lo tanto, se estabiliza en forma de una sal metálica. En este caso, los iones de Zn libres se unen al ácido fítico a través del oxígeno que da como resultado complejo de zinc-fitato. Considerando, que solo una fracción del Zn disuelto esta biodisponible y puede ser absorbido y translocado en las diferentes partes de las plantas, la solubilidad del óxido de Zn depende del pH, por qué es de naturaleza anfótera y se disuelve tanto en el ácido como en medios alcalinos como se muestra a continuación.



La biotransformación de las NPs puede aumentar la toxicidad o desintoxicar el sistema dentro de las plantas (Marslin *et al.*, 2017). Dichas transformaciones están relacionadas con la reacción redox, la sulfuración, la fosforilación y la modificación molecular (Lowry *et al.*, 2012). La sulfuración de las NPs Ag disminuyó la toxicidad

en *E. coli* debido a la menor solubilidad del Ag_2S , del mismo modo, la formación de AgCl a partir de AgNO_3 en presencia de iones cloruro también tiene el mismo efecto. Las plantas que son expuestas a NPs pueden absorberlas y translocarlas en diferentes tejidos.

Captación y acumulación de NPs

En el medio ambiente, el transporte de las NPs en las plantas es el factor más crítico para estimar el impacto de estos materiales en el metabolismo de las plantas. La captación de las NPs depende del desplazamiento, el tamaño de partícula, la composición química, la estabilidad y la concentración (Pérez-de-Luque, 2017).

Una de las propiedades más importantes que impactan la absorción de las NPs a través de las raíces y hojas de las plantas, es el tamaño de las partículas. Algunos estudios han determinado que existe una selección de tamaño en la absorción de las NPs por parte de las plantas. Los iones y el agua pueden moverse fácilmente a través de canales iónicos y acuaporinas, porque el tamaño de los iones y las moléculas de agua están alrededor 0.28 nm, mientras que el tamaño de los poros de la pared celular fluctúa entre 2 y 20 nm (Nair *et al.*, 2010). Por lo tanto, el efecto de las NPs no solo puede atribuirse a la disolución del elemento en la superficie de la raíz o de la hoja, sino también a la captación de NPs (eficiencia externa) o la utilización de mineral activo de las NPs (eficiencia interna) en las células (Lough y Lucas, 2006).

Según Klaine *et al.* (2008), las características superficiales de las NPs también son importantes por su patrón de agregación, movimiento en los ecosistemas acuáticos y terrestres e interacciones con algas, plantas y hongos. Sabo-Attwood *et al.* (2012) utilizaron la tecnología de μ -XRF y TEM, y observaron que las NPs Au de 3.5 nm fueron absorbidas por las raíces de plantas de tabaco, pero las NPs de 18 nm permanecieron aglomeradas en las superficies externas de la raíz. Por su parte, Taylor *et al.* (2014) al utilizar TEM encontraron que las NPs Ag de 108 nm no fueron absorbidas directamente por las raíces de *Arabidopsis thaliana*. Así mismo, Slomberg y Schoenfisch (2012) mencionaron que al utilizar TEM observaron que las

NP SiO₂ de 200 nm podían ser absorbidas por las raíces de *Arabidopsis thaliana*, aunque se observaron menos partículas a medida que aumentaba el tamaño de partícula (14, 50, 200 nm).

La absorción y acumulación de las NPs ZnO (8 nm) en plántulas de *Glycine max* fueron examinadas por López-Moreno *et al.* (2010). La captación de Zn por las plántulas de soja fue mayor a 500 mg L⁻¹ debido a una menor agregación, mientras que en concentraciones altas (1000-4000 mg L⁻¹), se formaron aglomerados de NPs, lo que dificultó el paso a través de del poro en la pared celular, en consecuencia, se redujo la absorción y acumulación de Zn. En un experimento con el uso de TEM y μ -XRF se evaluó la captación y el transporte dependientes del tamaño de las NPs TiO₂ en plantas de trigo (*Triticum aestivum*), los resultados de esta investigación evidenciaron que las NPs con diámetros de 36 nm se acumularon en las raíces y se distribuyeron por todo el tejido de la planta sin disolución o transformación, mientras que las NPs con diámetros en el rango de 36 a 140 nm se acumularon en la parénquima de la raíz de las plantas de trigo, lo cual no les permito alcanzar las haces vasculares y por lo tanto no se translocaron a los brotes (Larue *et al.*, 2012).

Los resultados del estudio de Wang *et al.* (2013) demostraron que las NPs ZnO no se translocaron desde la raíz hasta los brotes de la planta de *Vigna unguiculata*, a pesar de la gran cantidad de NPs alrededor de la superficie de la raíz. Por lo tanto, el coeficiente de transferencia de Zn, que es la fracción de Zn en la hoja en comparación con la raíz, fue bastante bajo. La NPs ZnO en el medio ambiente se adhieren o disuelven rápidamente en las partículas del suelo, esto explica la ausencia de NPs ZnO en brotes (Scheckel *et al.*, 2010). Las raíces de las plantas tienen una superficie rugosa debido a la presencia de pelos radicales que pueden segregar mucílago o moléculas pequeñas como los ácidos orgánicos, y por lo tanto la superficie de la raíz generalmente muestra una carga negativa. Estas características hacen que las NPs con una carga superficial positiva sean más propensas a ser adsorbidas y se acumulen en la superficie de la raíz (Zhou *et al.*, 2011).

A pesar, de que se han realizado investigaciones relacionadas con la absorción de las NPs a través de las raíces y hojas, todavía es imposible estimar el tamaño idóneo para la asimilación de nutrientes en forma de NPs por la planta. Otro factor a considerar, es que los tamaños de las NPs en la rizosfera son completamente diferentes de los originales.

Para que se produzca la captación y la translocación, estos materiales deben atravesar una serie de barreras fisiológicas desde la superficie hasta los vasos del xilema, incluida la cutícula de la superficie de la raíz, la epidermis, la corteza, la endodermis, la banda caspariana y finalmente el transporte hacia arriba hasta los brotes a través del xilema (Singh *et al.*, 2017). El papel y la composición de la cutícula de la superficie de la raíz son similares a los de la cutícula de la superficie de la hoja. Aún se desconoce si los NPs pueden penetrar en la superficie de la raíz. Sin embargo, la cutícula está subdesarrollada en la superficie de los pelos radiculares y desarrolla puntas radiculares de las raíces principales y secundarias, por lo que las NPs pueden estar directamente en contacto con la epidermis en estas regiones (Schwab *et al.*, 2016). Al acercarse a la epidermis de la raíz, existen dos vías básicas para la absorción de las NPs en las raíces de las plantas. La mayoría de los estudios han propuesto la vía apoplástica, en la que las NPs primero penetran en los poros de la pared celular y luego se difunden en el espacio entre la pared celular y la membrana plasmática o pasan a través del espacio intercelular sin cruzar la membrana celular (Pérez-de-Luque, 2017).

Para entender el transporte de NPs a través del plasmodesma, es importante entender que los plasmodesmos no son estructuras huecas, la estructura básica de los plasmodesmos es un canal lineal o ramificado a través de la pared celular, revestido por la membrana celular. El canal contiene una hebra denominada desmotúbulo del retículo endoplasmático (ER) que conecta los ER de dos células. El espacio entre la membrana celular y el desmotúbulo en el que se transporta la mayoría de los solutos, se denomina manga citoplásmica (Roberts y Oparka, 2003). El desmotúbulo y la membrana celular están conectados por proteínas, que

subdividen el cilindro citoplásmico en varios microcanales de 3 a 4 nm de diámetro (Lucas y Jung-Youn, 2004; Roberts y Oparka, 2003). Los plasmodesmos, debido al tamaño de los microcanales tienen un límite de exclusión de tamaño basal (SEL) en tejidos adultos de 3-4 nm, o 580–900 Da (Dietz y Herth, 2011; Roberts y Oparka, 2003).

Las moléculas más grandes que el SEL basal, incluyendo al ARN, proteínas, factores de transcripción y virus de plantas, experimentan cambios conformacionales en el canal plasmodésmico (Roberts y Oparka, 2003). Dada la incapacidad de la mayoría de las NPs para sufrir cambios conformacionales, esto significa que los plasmodesmas, en circunstancias normales, no transportan las NPs con tamaños mayores de 4 a 43 nm (Dietz y Herth, 2011). Sólo los solutos más pequeños que el SEL basal, como los azúcares, aminoácidos y/o iones se difunden directamente a través de los microcanales en el plasmodesma. Los plasmodesmos en células maduras tienen un diámetro de 20 a 40 nm en la región del cuello del cilindro citoplasmático y 50 a 60 nm de diámetro en el punto medio más ancho (Lin *et al.*, 2008).

Sin embargo, recientemente se ha mencionado un cambio en el paradigma del plasmodesmo rígido a fluido, dinámico y flexible que subraya la flexibilidad del SEL. La apertura del plasmodesmo puede ser modificada por calcio (Roberts y Oparka, 2003), proteínas o virus (Scholthof, 2005) y estrés ambiental (Dietz y Herth, 2011). Por ejemplo, todos los virus de las plantas se translocan a través de plasmodesmos, a través de proteínas de movimiento, estas proteínas dilatan las aberturas de los plasmodesmas en la región del cuello para permitir el paso de complejos de ácidos nucleicos de proteína virales (Scholthof, 2005). Por los factores antes mencionados y otros mecanismos, el SEL del plasmodesmo se puede expandir de 30-40 kDa. Las macromoléculas que poseen un diámetro de 10 nm pueden transitar a través de plasmodesmos (Larue *et al.*, 2012).

Para las NPs, el valor es menor porque a diferencia de las macromoléculas la mayoría de las NPs no pueden sufrir cambios conformacionales (Dietz y Herth, 2011). Además, las NPs en sí pueden dilatar las SEL de los plasmodesmos, ya sea directamente o mediante cambios estructurales inducidos por NPs (Larue *et al.*, 2012). Por ejemplo, las NPs TiO_2 rompió los microfilamentos en las raíces del trigo, lo cual permitió el tránsito de NPs de una célula a otra con diámetros superiores a 420 nm (Larue *et al.*, 2012). En la Figura 2, se muestra un esquema que representa la vía de captación, translocación y la acumulación de NPs en la planta; para una comprensión más detallada se muestra que la hoja y la raíz tienen vías y mecanismos de absorción y translocación de las NPs (Singh *et al.*, 2017).

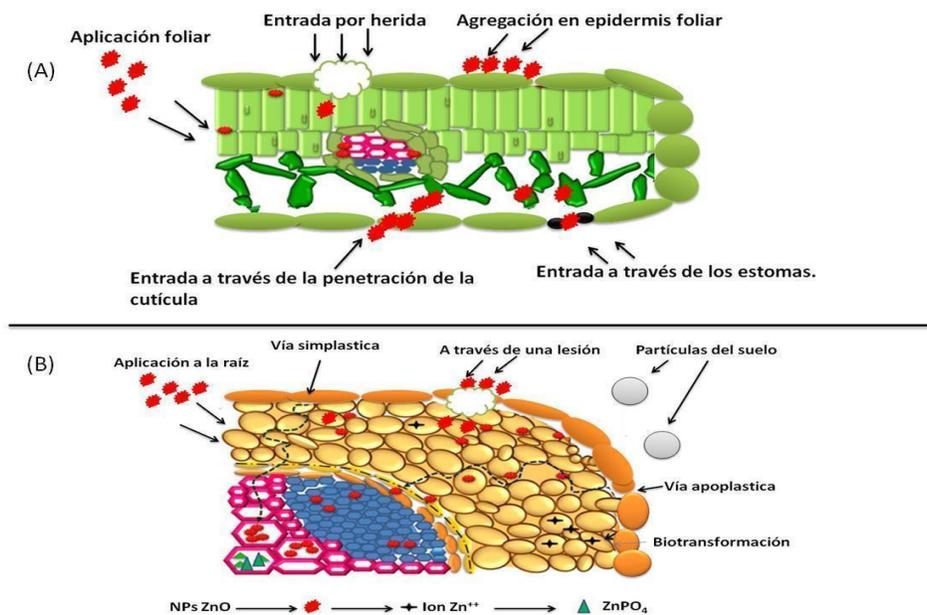


Figura 2. Descripción general de la vía de captación, translocación y biotransformación de las NPs ZnO en un sistema vegetal; (A) sección transversal de la hoja que muestra la entrada de NPs a través de los estomas, la penetración de la cutícula y heridas; (B) corte transversal de la raíz que muestra la entrada de NPs a través de lesiones o biotransformación en iones de Zn y siguen vías apoplásticas y simplásticas (Singh *et al.*, 2017).

La entrada de NPs como resultado de la fuerza motriz de protones y la captación de iones de zinc disueltos causa estrés oxidativo dentro de las células y genera

especies reactivas de oxígeno (ROS). La toxicidad de ROS está acreditada por su alta reactividad y propiedades oxidantes, las especies reactivas, incluido el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radicales hidróxidos (OH^-) y súper oxido (O_2^-) (Yang *et al.*, 2017). La toxicidad de estas especies incluye el daño de componentes celulares como los lípidos, el ADN y las proteínas, como resultado de su incorporación a la membrana de la célula.

Las ROS son el producto del metabolismo aeróbico en una planta común, que actúa como moléculas de señalización (Thannickal y Fanburg 2000), mientras que el exceso de ROS causaría efectos adversos (estrés oxidativo), que aparecen cuando el nivel de ROS supera los mecanismos de defensa, y es capaz de representar una amenaza para las células al inducir daño en el ADN, oxidación de proteínas, pérdida de electrolitos, peroxidación de lípidos y daño a la membrana, lo que finalmente causa la muerte celular (Figura 3) (Meriga *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2012).

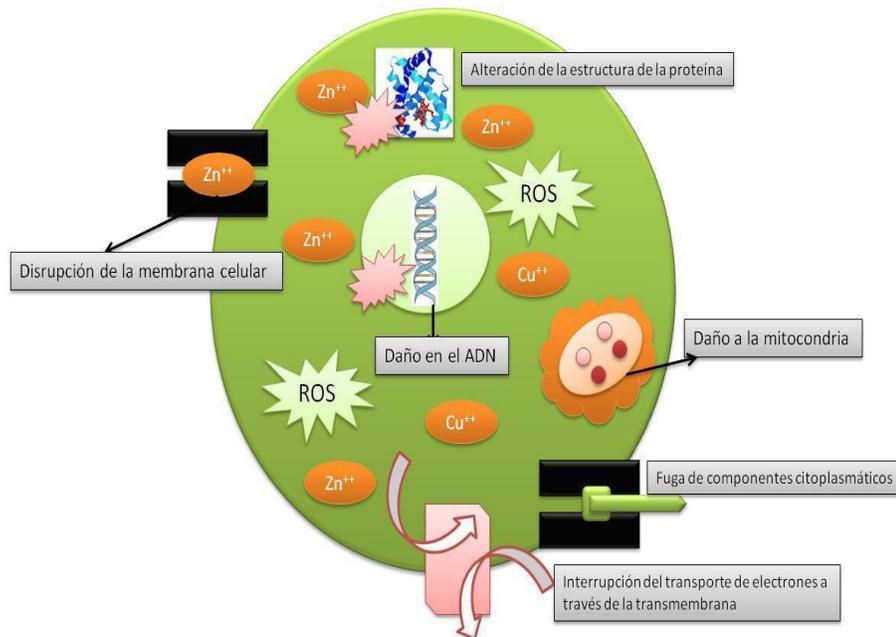


Figura 3. Los mecanismos de toxicidad de NPs Zn y Cu a través de la producción de ROS.

Frente al estrés oxidativo causado por la acumulación de ROS, los sistemas de defensa antioxidante de las plantas se activan, entre los principales se encuentran los antioxidantes no enzimáticos, incluidos los tioles, glutatión (GSH), compuestos fenólicos, ascorbato (AA) y componentes enzimáticos como catalasas (CAT), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa de guaiacol (GPOX), ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POD) (Singh *et al.*, 2015).

Agentes no enzimáticos del sistema de defensa antioxidante

Los tioles y AA son los antioxidantes de peso molecular significativamente más bajo. AA es un antioxidante crucial que puede resistir el estrés oxidativo inducido por el nivel promovido de la generación de ROS. Debido a que tiene la capacidad de donar electrones de AA en diversas reacciones no enzimáticas y enzimáticas, puede eliminar $O_2^{\cdot-}$ y OH y regeneran el α -tocoferol a partir del radical tocopheroxyl para proteger las membranas directamente (Noctor y Foyer, 1998).

El GSH, es uno de los metabolitos fundamentales (un tiol no proteico con bajo peso molecular) en las plantas, desempeña un papel clave en la defensa antioxidante intercelular contra el estrés oxidativo inducido por ROS. En tejidos vegetales, el GSH se encuentra comúnmente en todos los compartimentos celulares, incluidos los cloroplastos, mitocondrias, vacuola, citosol, así como en los peroxisomas (Foyer y Noctor, 2003).

Para preservar el estado normal de las células, el GSH desempeña un papel esencial para enfrentar el daño oxidativo inducido por las ROS. Como antioxidante, GSH actúa como donador de protones en los radicales libres orgánicos y/o en presencia de ROS, eliminando ROS y reduciendo a una forma de disulfuro, glutatión oxidado (GSSG) (Foyer y Halliwell, 1976).

Los compuestos fenólicos, por poseer propiedades antioxidantes pueden eliminar las especies ROS, al quelar los iones de los metales en transición e inhibir la peroxidación de lípidos mediante la captura de los polifenoles del alcoxi lipídico (-OCH₃) (García-López *et al.*, 2019). Los carotenoides, en particular son miembros

de los antioxidantes lipofílicos y pueden desintoxicar muchas formas de ROS (Young, 1991). Sin embargo, la investigación de compuestos fenólicos, carotenoides y tocoferoles en respuesta a la exposición de NPs es muy escasa.

Antioxidantes enzimáticos del sistema de defensa antioxidante

SOD, es la metaloenzima intracelular más efectiva, juega un papel fundamental en el sistema de defensa antioxidante contra el estrés oxidativo al catalizar ROS altamente tóxicos ($O_2^{\cdot-}$) a H_2O_2 y O_2 que son menos tóxicos. Contiene tres isozimas, incluyendo SOD de hierro (Fe-SOD), SOD de manganeso (Mn-SOD) y SOD de cobre/zinc (Cu/Zn-SOD) (Fridovich, 1989). Al sobre producirse el H_2O_2 , ya sea por el estrés abiótico o biótico, la inducción de SOD en el sistema de defensa es capaz de evitar el estrés oxidativo como la peroxidación de lípidos.

CAT, desempeña un papel indispensable en la desintoxicación de ROS bajo estrés (Garg y Manchanda, 2009). Se encuentra ampliamente en enzimas que contienen hemo tetramérico y convierte el H_2O_2 en O_2 y H_2O . APX, también es considerado como el eliminador de ROS más importante para proteger plantas superiores, evita el estrés oxidativo y desempeña un papel central en la regulación del ciclo AA-GSH. En comparación con CAT y POD, APX tiene una mayor afinidad por el H_2O_2 , por lo tanto, puede convertir el H_2O_2 en H_2O molécula no tóxica por oxidación de AA en deshidroascorbato y MDA. Es una enzima dependiente de NADPH que cataliza la oxidación de GSH a GSSG, que puede mantener una alta proporción de GSH/GSSG en las células (Rao *et al.* 2006).

Las investigaciones recientes se están enfocando en identificar los mecanismos de defensa de las plantas contra el estrés oxidativo inducido por las NPs. Es importante entender la fitotoxicidad de las NPs en las plantas y comprender como el sistema antioxidante enzimático y no enzimático se regula frente a altas concentraciones de ROS.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales a base de zinc y semillas de cilantro

Las NPs ZnO (18 nm) se adquirieron de Nanomateriales de investigación Inc. (Houston, TX, USA). El ZnSO₄ (ACS reagent ≥ 99.0% pureza) se adquirió de Sigma-Aldrich (San Luis, Mo, USA). Las semillas de cilantro se obtuvieron de KristenSeed (Guadalajara, Jal, Mex).

Preparación de soluciones/suspensiones a base de zinc y su aplicación al suelo

El ZnSO₄ y las NPs ZnO se prepararon a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 mg/kg, con base en los estudios previos realizados por Pullagurala *et al.* 2018. Para asegurar una dispersión uniforme de los compuestos a base de Zn, las soluciones/suspensiones se prepararon en agua desionizada DI y se homogenizaron con un sonicador Autoscience AS2060B (Instrumentación Científica, Bs, As) durante 30 min a 110 voltios-3 amperios y 50 a 60 Ghz. Al finalizar el tiempo de sonicación, las suspensiones de los compuestos a base de Zn se añadieron y mezclaron manualmente con suelo inerte utilizando una mezcla de perlita y vermiculita (relación 1:1 volumen sustrato), material inerte de pH neutro y sin contenido de nutrientes minerales (Papadopoulos *et al.*, 2018; Garza-Alonso *et al.*, 2020) para obtener concentraciones finales de 100, 200, 300 y 400 mg de Zn/kg de suelo.

Condiciones de crecimiento de las plantas

El experimento se realizó en condiciones controladas en un invernadero, con una temperatura media diaria de 24.7 °C y una humedad relativa del 68%. Las semillas de cilantro se sembraron en bolsas de plástico negro de uso general (4.5 × 4.5 × 3.5 pulgadas) que contenían 450 g de suelo modificado con los compuestos a base

de Zn, se asignaron cinco repeticiones por tratamiento en un diseño completamente aleatorio, junto con el control (suelo sin compuestos a base de Zn), colocando diez semillas de cilantro en cada maceta. Durante el desarrollo del cultivo (58 días después de la siembra), las plantas se regaron con 30 mL por día de solución nutritiva (sin zinc), utilizando una formulación comercial de macronutrientes (FertiDrip N11-P02-K42) en agua desionizada DI, con un pH 6.47 y conductividad eléctrica de $0.41 \mu\text{S cm}^{-1}$, en cantidades iguales para cada maceta, siguiendo la recomendación del fabricante (AGROformuladora Delta, Monterrey, NL, Mex).

Cosecha de plantas

La cosecha se realizó el día 59 después de la siembra, para ello se retiraron del suelo las diez plantas/tratamiento, las cuales fueron utilizadas para la cuantificación de Zn, y para la determinación de pigmentos fotosintéticos y análisis bioquímicos (H_2O_2 , MDA y enzimas antioxidantes). Durante la cosecha, las plantas se separaron en raíces y brotes (tallos y hojas) y se enjuagaron con agua de la llave para eliminar el exceso de tierra, luego se enjuagaron por 20 s con HNO_3 0.01 M, posteriormente se volvieron a enjuagar tres veces con agua desionizada (DI). Enseguida, los tejidos vegetales se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Cuantificación elemental de Zn mediante espectrometría de emisión atómica por inducción de plasma acoplado

Después de la cosecha, 0.2 g del tejido vegetal (raíces y brotes) se secaron a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ en un horno Yamato Scientific DX 602C (Santa Clara, CA, USA) durante 72 h. El material resultante fue triturado y sometido a digestión ácida en una mezcla de ácido perclórico y ácido nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). Las concentraciones de Zn en los tejidos, se llevó a cabo utilizando el extracto de digestión ácida mediante un espectrómetro ICP-AES Agilent 725-ES de emisión atómica de inducción de plasma acoplado (Santa Clara, CA, USA).

Contenido de pigmentos de clorofila y carotenoides

La evaluación cuantitativa de clorofila-a (CHLa), clorofila-b (CHLb) y clorofila total (CHLt) se llevó a cabo por el método de Rajput y Patil (2017), mientras que los carotenoides se determinaron siguiendo lo establecido por Macalacham y Zalík (1963). Para ello, se tomó 1 g de material de hojas frescas y se homogeneizó con 10 mL de acetona al 80%, enseguida el extracto se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recuperó para ser analizado, y la absorbancia de la solución extraída se midió a 480, 510, 645 y 663 nm, a partir de estas lecturas, se determinaron las concentraciones de pigmento de clorofilas y carotenoides utilizando la siguiente fórmula/ecuación:

$$\text{Chlorophyll} - a \text{ mg g}^{-1} \text{ FW} = \frac{12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645}) \times V}{1000} \times W$$

$$\text{Chlorophyll} - b \text{ mg g}^{-1} \text{ FW} = \frac{22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663}) \times V}{1000} \times W$$

$$\text{Total chlorophyll mg g}^{-1} \text{ FW} = \frac{20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663}) \times V}{1000} \times W$$

$$\text{Carotenoid mg g}^{-1} \text{ FW} = \frac{7.6 (A_{480}) - 1.49 (A_{510}) \times V}{1000} \times W$$

Donde,

A = Absorbancia a longitudes de onda específicas

V = Volumen final de extracto de clorofila en acetona al 80%

W = Peso fresco de tejido extraído

Contenido de H₂O₂

El contenido de H₂O₂ en los brotes (tallos y hojas) se midió según el método descrito por Singh *et al.* (2006), para ello se homogenizaron 0.3 g de tejido fresco con 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 0.1%. Tras centrifugar a 7500 rpm durante 15 min, se añadieron 0.5 mL del sobrenadante a 0.5 mL de tampón de fosfato (100 mmol L⁻¹, pH 7) y 1 mL de KI 1 M. La concentración de H₂O₂ fue estimada basado en la absorbancia del sobrenadante a 390 nm con base en la siguiente formula: $(A_{390} \times V_{sn}) / (\text{mg muestra} / V_{TCA})$. Donde V_{sn} es el volumen del sobrenadante, y V_{TCA}

corresponde al volumen de TCA empleado en la extracción. El contenido de H₂O se expresó como microgramos por gramo de peso fresco ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW).

Determinación de las actividades de las enzimas antioxidantes

Las muestras del tejido fresco de brotes fueron procesadas para determinar la actividad de peroxidasas (POD), ascorbato peroxidasas (APX) y catalasas (CAT). Para obtener el extracto proteico, se utilizaron 0.2 g de tejido y se colocó en un mortero precongelado, enseguida el tejido se macero con nitrógeno líquido añadiendo polivinilpirrolidona (PVP) al 0.1%, luego las muestras se recogieron en microtubos de centrifugación y 1 mL de tampón de extracción (tampón de fosfato 100 mmol L⁻¹, pH 7, suplementado con EDTA 0.1 mmol L⁻¹) se agregó a cada muestra. Las mezclas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4 °C. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Actividad de POD

La actividad de POD se determinó de acuerdo con Kwak *et al.* (1995) usando pirogalol como sustrato. El volumen de reacción fue de 3 mL que contenía 15 μL del extracto de proteico, 2.5 mL de tampón fosfato (pH 8, 100 mmol L⁻¹), 320 μL de pirogalol al 5% y se hizo reaccionar con 165 μL de H₂O₂ a 0.147 mmol L⁻¹ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La reacción se inició mediante la adición de H₂O₂, y el aumento de la absorbancia se midió a 420 nm cada 20 s durante 1 min. Una unidad de actividad de POD se define como 1.0 mg de purpurogallina formada en 20 s a pH 6 a $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Actividad de APX

La actividad APX se determinó como se describe por Nakano y Asada (1981); después de la disminución de la absorbancia a 290 nm debido a la oxidación del ascorbato. La mezcla de reacción consistió en 15 μL de extracto de proteína, 885 μL de tampón fosfato (pH 7, 50 mmol L⁻¹), 50 μL de ácido ascórbico a 10 mmol L⁻¹

y reaccionó con 50 μL a 10 mmol L^{-1} de H_2O_2 ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad APX se expresó como la cantidad de proteína que produce 1 mmol de ascorbato oxidado por minuto.

Actividad de CAT

La descomposición de H_2O_2 se midió por la disminución de la absorbancia a 240 nm según Elavarthi y Martin (2010). La mezcla de reacción consistió en 15 μL de extracto de proteína, 965 μL de tampón fosfato ($\text{pH } 7$, 50 mmol L^{-1}) y reaccionó con 20 μL al 0.5 mmol L^{-1} de H_2O_2 en un volumen de reacción de 1 mL ($\epsilon = 0.04 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Análisis estadístico

El cultivo se estableció utilizando un diseño completamente aleatorio, con nueve tratamientos y cinco unidades experimentales para cada tratamiento (la unidad experimental consistió de una bolsa de plástico que contenían diez plantas de cilantro). Los resultados se informaron como media \pm desviación estándar, las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras se analizaron con un ANOVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Absorción de Zn en raíz y brotes

En el Cuadro 1, se observan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para la absorción de Zn en raíz y brote por la aplicación de tratamientos con dos fuentes de Zn ($ZnSO_4$ y NPs ZnO), lo anterior indica que los tratamientos a base de Zn permitieron la absorción de este compuesto en diferentes niveles, que son determinados por la fuente de Zn y la concentración del elemento aplicado. Los resultados de la comparación de medias se presentan en la Figura 2.

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para la absorción de Zn en raíz y brote de plantas de cilantro, cultivadas en suelo modificado con $ZnSO_4$ y NPs ZnO.

FV	GL	Absorción de Zn en raíz (mg/kg de tejido)	Absorción de Zn en brotes (mg/kg de tejido)
Trat	8	139323.11**	2692.57*
Error	9	633.04	16.37
CV		5.02	5.22

Trat = tratamientos, CV = coeficiente variación, GL= grados de libertad

Absorción de Zn en tejidos vegetales

Los resultados indican que la absorción de Zn en la raíz depende de la fuente de fertilización y de la concentración (Figura 4). Es evidente, que la mayor concentración de Zn se encontró en las raíces de las plantas expuestas a $ZnSO_4$; a 400 mg/kg se encontró un incremento de 95.9% y 21.1%, respectivamente en comparación con el control y las NPs ZnO a la misma concentración (400 mg/kg, Figura 4A). Los resultados indican que la absorción de Zn en los brotes depende de la fuente de fertilización y de la concentración (Figura 4B). La mayor concentración de Zn se encontró en brotes de las plantas expuestas a $ZnSO_4$ a 400 mg/kg, y se encontró un incremento de 84.4% y 20.2%, respectivamente en comparación con el control y las NPs ZnO a la misma concentración (400 mg/kg, Figura 4B).

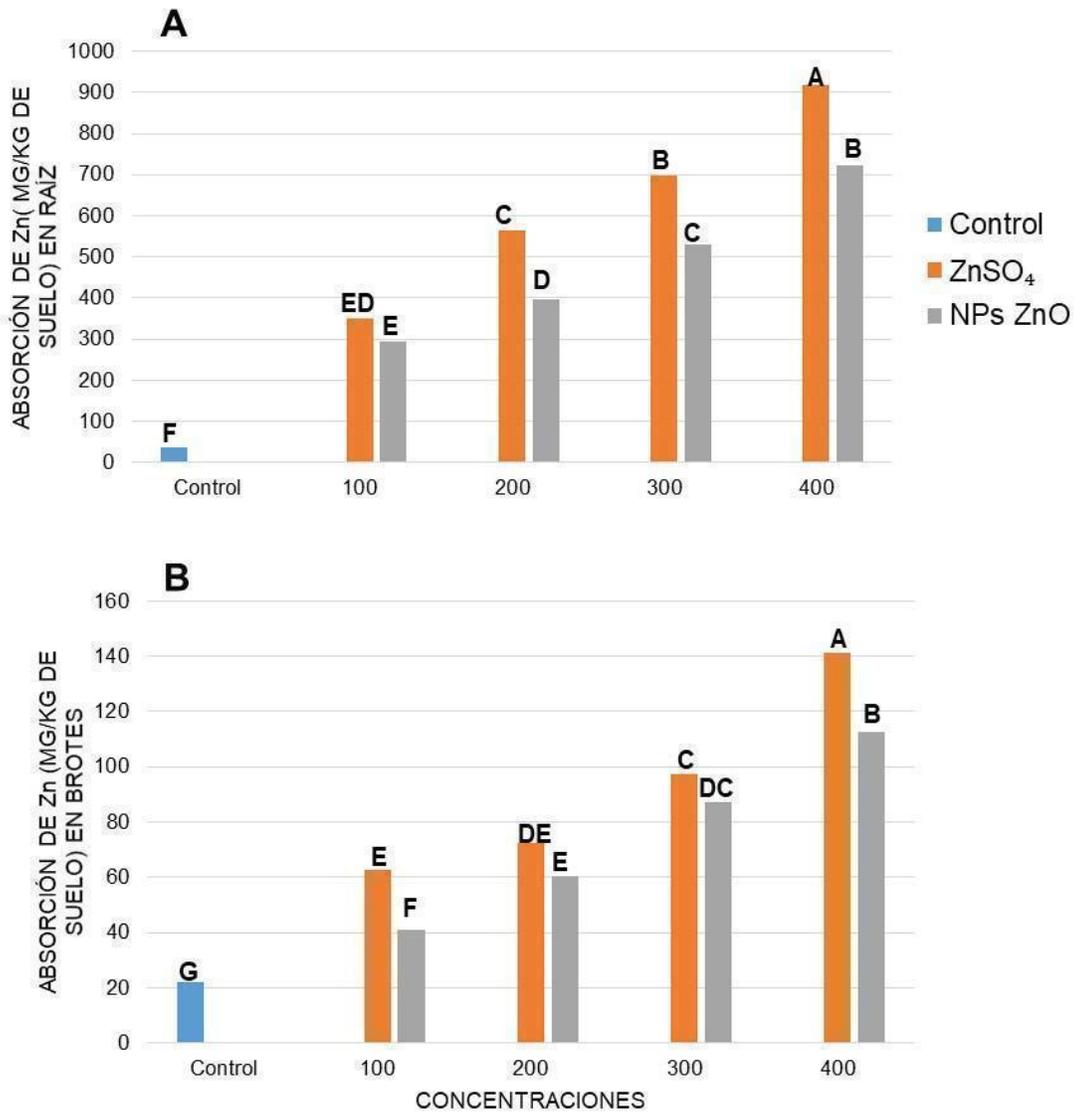


Figura 4. Absorción de Zn en raíz (A) y brote (B) en plantas de cilantro expuestas a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mg Zn/Kg suelo con ZnSO₄ y NPs ZnO. Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).

Con base en estos resultados, es evidente que la mayor concentración de Zn se encontró en las raíces y los brotes de las plantas tratadas con ZnSO₄, lo cual se debe, a una mayor absorción de Zn por las raíces de las plantas a partir de esta fuente, como catión libre (Zn⁺⁺) y, en consecuencia, a una mayor translocación de Zn de la raíz a los brotes. La mayor translocación de Zn de la raíz al brote con la

aplicación de ZnSO_4 (ion Zn^{++}), en comparación con las NPs ZnO , se debe probablemente a la alta solubilidad del ZnSO_4 (aproximadamente $2650 \mu\text{mol L}^{-1}$), que es mucho mayor que la solubilidad que tienen las NPs ZnO ($786 \mu\text{mol L}^{-1}$), que presentan disponibilidad lenta y gradual del Zn disuelto (Reed *et al.*, 2012; García-López *et al.*, 2019). Por lo tanto, al utilizar ZnSO_4 como fuente de fertilizante, se obtiene una mayor disponibilidad de Zn disponible para las raíces de las plantas a partir de esta fuente.

Tendencias de resultados similares han sido reportadas en la literatura, donde se ha informado que las NPs ZnO pueden atravesar las paredes celulares, penetrar en las células de la raíz y alcanzar los tejidos vacuolares a través del endodermo, sin embargo, su translocación a los brotes es mucho menor que la de los iones Zn^{++} libres. (Lin y Xing, 2008; Medina-Velo *et al.*, 2017; Pullagurala *et al.*, 2018). Por lo tanto, el efecto de las NPs ZnO depende de la disolución del elemento en la superficie de la raíz, y la utilización del mineral activo disponible para el transporte ascendente en los haces vasculares. El efecto de las NPs ZnO depende de la disolución del elemento en la superficie de la raíz, y la utilización del mineral activo disponible para el transporte ascendente en los haces vasculares.

Algunos estudios señalan que concentraciones elevadas de NPs ZnO (1000 mg L^{-1}) causan fitotoxicidad; mientras que dosis bajas (50 mg L^{-1}) han demostrado efectos significativos. Cuando las NPs son 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 traslocados a larga distancia hasta las ramas y el follaje de las plantas (Peng *et al.*, 2015). Entre las fuentes inorgánicas, el ZnSO_4 es la más utilizada y también la más recomendada. En los suelos este micronutriente es poco móvil y su contenido total normalmente varía de $10 - 300 \text{ mg/kg}$, con un promedio de 50 mg/kg . En suelos arenosos suele ser deficiente, mientras que en los arcillosos normalmente existe mayor concentración por la capacidad de adsorción y retención. Es un micronutriente esencial, la solubilidad garantiza efectividad, en este caso, a mayor solubilidad mayor efectividad de la fuente. Del contenido total de Zn, solo el que está

en la solución del suelo y el que puede ser fácilmente desadsorbido es disponible para las plantas (4 a 270 µg/L), pero también es fácilmente lixiviado como sucede en los suelos tropicales. El Zn es absorbido principalmente en forma Zn^{++} o, en condiciones de pH alto, como $ZnOH^+$.

Concentración de pigmentos fotosintéticos

En el Cuadro 2, se puede observar que las fuentes de Zn (NPs ZnO y $ZnSO_4$) a diferentes concentraciones afectaron significativamente ($p \leq 0.05$) la acumulación de pigmentos fotosintéticos. Lo anterior, posiblemente está relacionado con la función del Zn durante la biosíntesis de clorofila y el impacto que tiene cada fuente de Zn en la fisiología de la planta.

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de clorofila a (CA), clorofila b (CB), clorofila total (CT) y carotenoides (CAR) en plantas de cilantro cultivadas en suelo modificado con $ZnSO_4$ y NPs ZnO.

FV	GL	CA	CB	CT	CAR
Trat	8	139.49**	17.34*	252.21**	3.39*
Error	36	1.41	3.83	3.15	0.08
CV		4.56	19.54	4.92	3.81

Trat= tratamientos, CV= coeficiente de variación, GL= grados de libertad, CA= clorofila a, CB= clorofila b, CT= clorofila total, CAR= carotenoides.

En el siguiente apartado, se discutirá la acumulación de pigmentos fotosintéticos, que son determinados por la fuente de Zn y la concentración del elemento aplicado.

Contenido de pigmentos fotosintéticos

Los resultados indican que el contenido de pigmentos fotosintéticos (CA, CB, CT y CAR) en plantas de cilantro aumentó significativamente en todos los tratamientos con la aplicación de Zn (Figura 5). Evidentemente la mayor acumulación de CA, CB y CT fue a una concentración de 200 mg/kg con las dos fuentes de Zn; $ZnSO_4$ y NPs ZnO (Figura 5A, B y C). Las plantas expuestas a $ZnSO_4$ a 200 mg/kg, la acumulación de CA se encontró un incremento de 52.1%; 44.5% para CB; y para CT un incremento del 49.9%, por otra parte las plantas expuestas bajo NPs ZnO a

la misma concentración tuvieron incrementos similares de 50.7% para CA, 42.4% para CB, y 48.3% para CT, respectivamente en comparación con el control.

Para el caso del contenido de carotenoides la mayor acumulación se encontró en una concentración de 100 mg/kg en las dos fuentes respectivamente de Zn; ZnSO₄ y NPs ZnO (Figura 5D). Las plantas expuestas a ZnSO₄ a 100 mg/kg, la acumulación de CAR se encontró un incremento de 31.03% y sobre la misma concentración en NPs ZnO se obtuvo un incremento de 25.5% respectivamente. Sin embargo, el ZnSO₄ en una concentración de 400mg/kg produjo una reducción en el contenido de carotenoides que también fue estadísticamente significativa en comparación con las diferentes concentraciones y fuentes.

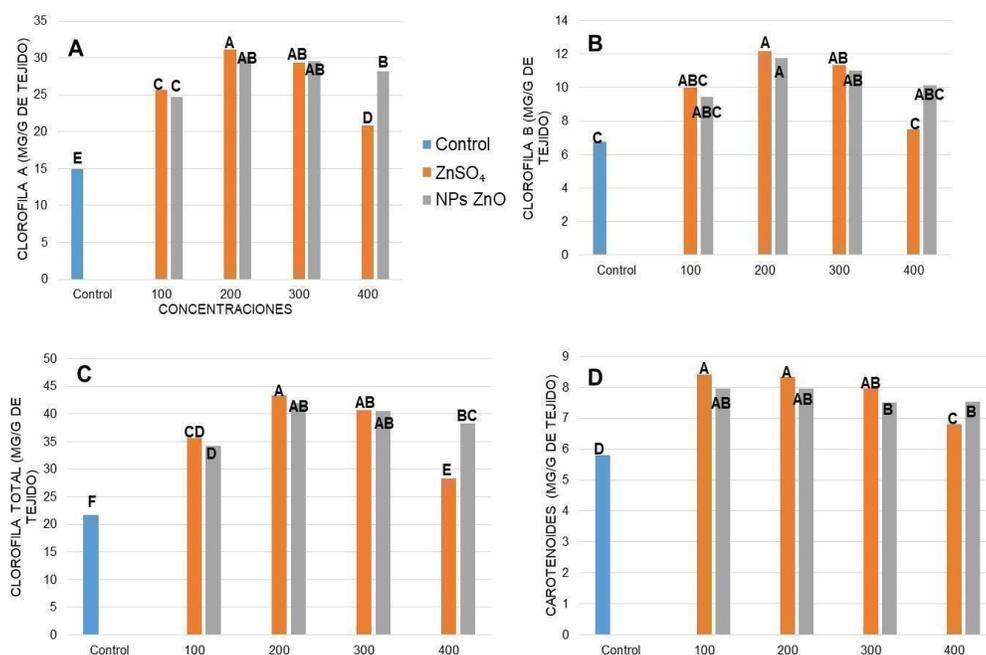


Figura 5. Contenido de clorofila a (CA) (A), clorofila b (CB) (B), clorofila total (CT) (C) y carotenoides (CAR) (D) en plantas de cilantro expuestas a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mg Zn/Kg suelo con ZnSO₄ y NPs ZnO. Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p < 0.05).

Los resultados indican que los pigmentos fotosintéticos (CA, CB y CT) en hojas de cilantro incrementaron de forma significativa ($p \leq 0,05$) en todos los tratamientos con la aplicación de compuestos de Zn (Figura 5). Según lo obtenido en este trabajo llevado a cabo en un suelo modificado con (ZnSO_4 y NPs ZnO) a una concentración de 200 a 300 mg/kg presentaron una mayor acumulación de contenido de pigmentos fotosintéticos. Samree *et al.* (2020) la cuantificación de pigmentos fotosintéticos y el estudio de su desarrollo por medio del tiempo probablemente apoyen a conocer mejor el comportamiento de las plantas durante su lapso de desarrollo, esto permitiendo una mayor translocación del Zn sobre la planta y su efecto en el crecimiento vegetal. En estudios realizados a través del suministro de Zn bajo un método hidropónico en plantas de frijol (*Vigna radiata*), se puede ver el aumento de contenido de clorofila, proteínas y minerales. Además, en cuanto a lo visto en este presente trabajo estamos en concordancia con lo dicho por (Pullagurala *et al.*, 2018), quienes destacan que, en las hojas de cilantro, la acumulación de pigmentos fotosintéticos incrementó en un 41% y 37% debido a la aplicación de compuestos de Zn debido a la aplicación de compuestos de Zn (NPs de ZnO y ZnSO_4) al suelo a concentraciones de 100 y 200 mg/kg, respectivamente.

Sin embargo, comparativamente con otras indagaciones destaca que el abasto de Zn al suelo con ZnSO_4 y ZnO NPs en altas dosis (400-800 mg/kg) ejercen efectos nocivos sobre la acumulación de clorofilas y carotenoides en plantas de arroz (*Oryza sativa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), debido a la toxicidad generada por la alta absorción de iones Zn^{++} en la planta. Por otra parte, a 400 mg/kg de ZnSO_4 , la acumulación de CA, CB y CT disminuyó en un 33,1%, 38,4% y 34,6%, respectivamente, en comparación con el tratamiento que presentó la mayor acumulación al aplicar esta fuente de Zn (200 mg/kg de ZnSO_4). Según lo mostrado en la Figura 5, las concentraciones en donde se centró la parte importante de acumulación de pigmentos fotosintéticos y de carotenoides han sido entre 100 y 300 mg/kg de ZnSO_4 y NPs ZnO, sin embargo en la Figura 5D, el contenido de carotenoides aumentó para la mayoría de los tratamientos; a pesar de ello, el ZnSO_4 a 400 mg/kg disminuyó el contenido de CAR un 19.1%, por el impacto de alta absorción de iones Zn^{++} derivado por los efectos tóxicos que afectaron en la

biosíntesis de clorofila y por consiguiente, además podrían dañar el sistema fotosintético. La alta absorción de Zn podría afectar el proceso de fotosíntesis, influyendo negativamente en el metabolismo de los carbohidratos en las plantas (Chaney, 1993).

Los carotenoides en las plantas de cilantro expuestas a las múltiples concentraciones y fuentes de Zn ayudan a captar la luz, pero también tienen otra función importante ya que pueden verse relacionados con el aumento de H₂O₂, principalmente como un mecanismo de defensa para proteger el proceso de fotosíntesis. Según Badger *et al.* (1994), el Zn es considerado un micro elemento importante para el crecimiento de las plantas y necesario para la biosíntesis de la clorofila pues influye en la actividad de enzimas como la anhidrasa carbónica que tiene un átomo de Zn que cataliza la hidratación del CO₂, haciendo más fácil la difusión del CO₂ a los sitios de carboxilación en las plantas. El contenido de clorofila ha sido considerado un indicador confiable relacionado con la contaminación y la toxicidad de los metales pesados en las plantas (Tirani *et al.*, 2018). Concentraciones bajas de H₂O₂ (10 µm) pueden inhibir la fijación de CO₂ en un 50% y, por tanto, la acumulación de pigmentos fotosintéticos. Los niveles de estrés derivados por la aplicación de Zn en sus diferentes fuentes y concentraciones, han sido contrarrestados por la actividad de las enzimas antioxidantes, de esta manera la acumulación de radicales libres es disminuida para fin de evitar el estrés oxidativo en plantas, sin llegar a afectar su funcionamiento fisiológico.

Contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y actividad enzimática

Los resultados de la acumulación de H₂O₂ y la actividad enzimática (Cuadro 3), indican diferencia significativa (p≤0.05). Los tratamientos con las diferentes fuentes de Zn generaron la acumulación del radical H₂O₂, lo que resultó en una mayor actividad enzimática antioxidante.

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), catalasas (CAT), ascorbato peroxidadas (APX) y peroxidadas (POD) en plantas de cilantro cultivadas en suelo modificado con ZnSO₄ y NPs ZnO

FV	GL	H ₂ O ₂	CAT	APX	POD
Trat	8	0.1635**	0.2636*	0.2353**	44.9193*
Error	36	0.0007	0.0023	0.0010	0.1930
CV		5.7059	12.1283	7.2925	6.6102

Trat= tratamientos, CV= coeficiente de variación, GL= grados de libertad, H₂O₂= peróxido de hidrógeno, CAT= catalasas, APX= ascorbato peroxidadas, POD= peroxidadas.

De acuerdo con los resultados, el ZnSO₄ fue más eficaz que las NPs ZnO en el aumento de las actividades enzimáticas a una concentración de 400 mg/kg (Figura 6). Las plantas expuestas a ZnSO₄ a 400 mg/kg presentaron un incremento del 77.3% en H₂O₂, lo que resultó en incrementos del 85.8%, 81.1% y 83.45% para CAT, APX Y POD, respectivamente, en comparación con el control. Por otra parte, las plantas expuestas a NPs ZnO a la misma concentración tuvieron incrementos de 61.3% para H₂O₂, mientras que los incrementos en la actividad de las enzimas fueron del 65.3% (CAT), 64.5% (APX) y 69.9% (POD), en comparación con el control (Figura 4B, C y D). Los resultados de este estudio indican que a medida que incrementan las concentraciones de H₂O₂, se presentó una mayor actividad enzimática antioxidante en las plantas de cilantro sometidas a diferentes fuentes y concentraciones de Zn (Figura 6). Por lo tanto, estos resultados muestran que todos los tratamientos a base de Zn indujeron estrés en las plantas; sin embargo, la mayor acumulación de H₂O₂ se presentó en los brotes de las plantas sometidas a ZnSO₄.

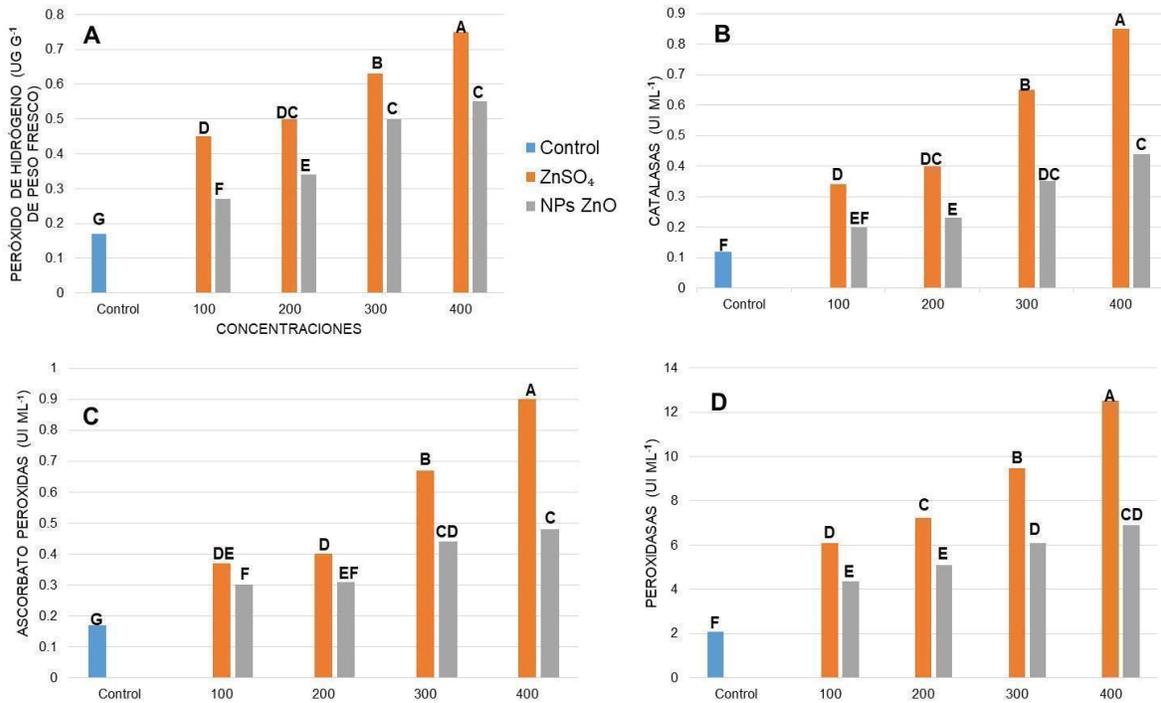


Figura 6. Contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (A), catalasas (CAT) (B), ascorbato peroxidasas (APX) (C) y peroxidasas (POD) (D) en plantas de cilantro expuestas a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mg Zn/Kg suelo con $ZnSO_4$ y NPs ZnO. Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias ($n = 5$). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En este estudio, la peroxidación lipídica causada por la toxicidad del Zn fue menor con las NPs ZnO en comparación con la fuente $ZnSO_4$, al menos en parte, debido a la liberación más lenta y gradual del Zn^{++} contenido en las NPs ZnO, a diferencia del $ZnSO_4$ (Reed *et al.*, 2012). Sin embargo, Nemcek *et al.* (2020) mencionan que al aplicar $ZnSO_4$ al suelo, el Zn logra estar más disponible debido a la formación de complejos orgánicos de Zn solubles que son transportables y están disponibles para ser absorbidos por las raíces de las plantas. En este sentido, las altas concentraciones de $ZnSO_4$ pueden generar una toxicidad en las plantas debido a su alta acumulación en los tejidos de las plantas.

Como discusión final, todos los tratamientos a base de Zn produjeron una mayor actividad de las enzimas antioxidantes en los brotes de las plantas de cilantro. Por otra parte, la actividad de las enzimas antioxidantes está asociada a un aumento de

los niveles de ROS, provocado por una alta concentración de Zn en los tejidos de las plantas (García-Gómez *et al.*, 2017). Según García-López *et al.* (2018), mencionan que altas concentraciones de ROS estimulan la actividad de enzimas antioxidantes. Las enzimas antioxidantes juegan un papel muy importante en la protección de compuestos celulares sobre el daño oxidativo ocasionado por metales pesados en las plantas. Hasanuzzaman *et al.* (2020), señalan que las plantas presentan respuestas diferenciales a las condiciones de estrés oxidativo, al mismo tiempo que les permite desarrollar resistencia a la exposición a metales pesados. Los resultados de esta investigación, evidencian que los efectos tóxicos de los fertilizantes a base de Zn dependen de la disolución del elemento en la superficie de la raíz y del uso del mineral activo disponible para su absorción en los tejidos vegetales de las plantas.

5. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que los tejidos de las plantas de cilantro sometidos a diferentes concentraciones de NPs ZnO tenían una menor absorción de Zn en comparación con el ZnSO₄.

Según los resultados, a una concentración de 200 a 300 mg/kg con ZnSO₄ y NPs ZnO se presentó una mayor acumulación de CA, CB y CT, por el contrario, a una concentración de 400 mg/kg de ZnSO₄ disminuyó el contenido de pigmentos fotosintéticos.

El ZnSO₄ fue más eficaz que las NPs ZnO para estimular la acumulación de H₂O₂ y la actividad de enzimas antioxidantes.

Por lo tanto, el impacto fisiológico y las respuestas antioxidantes de las plantas a las fuentes de fertilización utilizadas en este estudio (ZnSO₄ y NPs ZnO) podrían depender en gran medida de la solubilidad del compuesto para la liberación del elemento activo (Zn⁺⁺).

6. LITERATURA CITADA

Adhikari, T., Kundu, S., and Rao, A. S. 2016. Zinc delivery to plants through seed coating with nano-zinc oxide particles. *Journal of Plant Nutrition*, 39(1), 136-146.

Badger, M. R., and Price, G. D. 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 45(1), 369-392.

Barber, S. A. 1984. Soil bionutrient availability.

Cakmak, I., Yilmaz, A., Kalayci, M., Ekiz, H., Torun, B., Ereno, B., and Braun, H. J. 1996. Zinc deficiency as a critical problem in wheat production in Central Anatolia. *Plant and soil*, 180(2), 165-172.

Chang, Y. C., Ma, J. F., and Matsumoto, H. 1998. Mechanisms of Al-induced iron chlorosis in wheat (*Triticum aestivum*). Al-inhibited biosynthesis and secretion of phytosiderophore. *Physiologia Plantarum*, 102(1), 9-15.

Davarpanah, S., Tehranifar, A., Davarynejad, G., Abadía, J., and Khorasani, R. 2016. Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani) fruit yield and quality. *Scientia Horticulturae*, 210, 57-64.

Desai, C. V., Desai, H. B., Suthar, K. P., Singh, D., Patel, R. M., and Taslim, A. 2015. Phytotoxicity of zinc-nanoparticles and its influence on stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Biological Research*, 17(1), 1-7.

Dietz, K. J., and Herth, S. 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in plant science*, 16(11), 582-589.

Doner, H. E., and Lynn, W. C. 1989. Carbonate, halide, sulfate, and sulfide minerals. *Minerals in soil environments*, 1, 279-330.

- Elgawhary, S. M., Lindsay, W. L., and Kemper, W. D. 1970. Effect of complexing agents and acids on the diffusion of zinc to a simulated root. *Soil Science Society of America Journal*, 34(2), 211-214.
- Erenoglu, B., Cakmak, I., Marschner, H., Römheld, V., Eker, S., Daghan, H., and Ekiz, H. 1996. Phytosiderophore release does not relate well with zinc efficiency in different bread wheat genotypes. *Journal of plant nutrition*, 19(12), 1569-1580.
- Fageria, N. K., Filho, M. B., Moreira, A., and Guimarães, C. M. 2009. Foliar fertilization of crop plants. *Journal of plant nutrition*, 32(6), 1044-1064.
- Foyer, C. H., and Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25.
- Foyer, C. H., and Noctor, G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes, and mitochondria. *Physiologia plantarum*, 119(3), 355-364.
- Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 7761-7764.
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., and Fernández, M. D. 2017. Comparative study of the phytotoxicity of ZnO nanoparticles and Zn accumulation in nine crops grown in a calcareous soil and an acidic soil. *Science of the total environment*, 644, 770-780.
- García-López, J. I., Niño-Medina, G., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldivar, R. H., Barriga-Castro, E. D., Vázquez-Alvarado, R., and Zavala-García, F. 2019. Foliar application of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate boosts the content of bioactive compounds in habanero peppers. *Plants*, 8(8), 254.
- García-López, J. I., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldivar, R. H., Díaz Barriga-Castro, E., Ruiz-Torres, N. A., and Niño-Medina, G. 2018. Zinc oxide nanoparticles boosts phenolic compounds and antioxidant activity of *Capsicum annuum* L. during germination. *Agronomy*, 8(10), 215.

Garg, N., and Manchanda, G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*, 143(1), 81-96.

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., and Fotopoulos, V. 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.

Hodgson, J. F., Lindsay, W. L., and Trierweiler, J. F. 1966. Micronutrient cation complexing in soil solution: II. Complexing of zinc and copper in displaced solution from calcareous soils. *Soil Science Society of America Journal*, 30(6), 723-726.

Juste, C., and Mench, M. 2017. Long-term application of sewage sludge and its effect on metal uptake by crops. In *Biogeochemistry of trace metals* (pp. 171-206). CRC Press.

Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., and Lead, J. R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1825-1851.

Kopittke, P. M., Menzies, N. W., de Jonge, M. D., McKenna, B. A., Donner, E., Webb, R. I., and Lombi, E. 2011. In situ distribution and speciation of toxic copper, nickel, and zinc in hydrated roots of cowpea. *Plant Physiology*, 156(2), 663-673.

Kothari, S. K., Marschner, H., and Römheld, V. 1991. Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil. *Plant and soil*, 131(2), 177-185.

Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard, B., Flank, A. M., and Carriere, M. 2012. Accumulation, translocation, and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase. *Science of the total environment*, 431, 197-208.

- Lin, D., and Xing, B. 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental science and technology*, 42(15), 5580-5585.
- Lin, S. H., Kuo, H. F., Canivenc, G., Lin, C. S., Lepetit, M., Hsu, P. K., and Tsay, Y. F. 2008. Mutation of the Arabidopsis NRT1. 5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant Cell*, 20(9), 2514-2528.
- Lindsay, W. L. 1972. Zinc in soils and plant nutrition. *Adv. Agron.*, T. 24, P. 147.
- Liu, R., and Lal, R. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the total environment*, 514, 131-139.
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J. Á., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental science and technology*, 44(19), 7315-7320.
- López-Vargas, E. R., Ortega-Ortíz, H., Cadenas-Pliego, G., de Alba Romenus, K., Cabrera de la Fuente, M., Benavides-Mendoza, A., and Juárez-Maldonado, A. 2018. Foliar application of copper nanoparticles increases the fruit quality and the content of bioactive compounds in tomatoes. *Applied Sciences*, 8(7), 1020.
- Lough, T. J., and Lucas, W. J. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 203-232.
- Lowry, G. V., Gregory, K. B., Apte, S. C., and Lead, J. R. 2012. Transformations of nanomaterials in the environment.
- Lucas, R. E., and Knezek, B. D. 1972. Climatic and soil conditions promoting micronutrient deficiencies in plants. *Micronutrients in agriculture*, 12, 265-288.
- Lucas, W. J., and Lee, J. Y. 2004. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(9), 712-726.

- Ma, C., Rui, Y., Liu, S., Li, X., Xing, B., and Liu, L. 2015. Phytotoxic mechanism of nanoparticles: destruction of chloroplasts and vascular bundles and alteration of nutrient absorption. *Scientific reports*, 5(1), 1-13.
- Marslin, G., Sheeba, C. J., and Franklin, G. 2017. Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in plant science*, 8, 832.
- Martens, D. C., and Westermann, D. T. 1991. Fertilizer applications for correcting micronutrient deficiencies. *Micronutrients in agriculture*, 4, 549-592.
- Medina-Velo, I. A., Barrios, A. C., Zuverza-Mena, N., Hernandez-Viezcas, J. A., Chang, C. H., Ji, Z., and Gardea-Torresdey, J. L. 2017. Comparison of the effects of commercial coated and uncoated ZnO nanomaterials and Zn compounds in kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Journal of hazardous materials*, 332, 214-222.
- Meriga, B., Reddy, B. K., Rao, K. R., Reddy, L. A., and Kishor, P. K. 2004. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of plant physiology*, 161(1), 63-68.
- Mukhopadhyay, S. S. 2014. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Nanotechnology, science and applications*, 7, 63.
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., and Kumar, D. S. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant science*, 179(3), 154-163.
- Nemcek, L., Šebesta, M., Urík, M., Bujdoš, M., Dobročka, E., and Vávra, I. 2020. Impact of bulk ZnO, ZnO nanoparticles and dissolved Zn on early growth stages of barley a pot experiment. *Plants*, 9(10), 1365.
- Noctor, G., and Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Peng, J., Xu, W., Teoh, C. L., Han, S., Kim, B., Samanta, A., and Chang, Y. T. 2015. High-efficiency in vitro and in vivo detection of Zn²⁺ by dye-assembled upconversion nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 137(6), 2336-2342.

Pérez-de-Luque, A. 2017. Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture? *Frontiers in Environmental Science*, 5, 12.

Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., and Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth, and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*, 35(6), 905-927.

Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. 2018. ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant physiology and biochemistry*, 132, 120- 127.

Qados, A. M. A. 2015. Mechanism of nanosilicon-mediated alleviation of salinity stress in faba bean (*Vicia faba* L.) plants. *Journal of Experimental Agriculture International*, 78-95.

Randhawa, N. S., Sinha, M. K., and Takkar, P. N. 1978. Micronutrients. *Soils and rice*, 581-603.

Rao, K. M., Raghavendra, A. S., and Reddy, K. J. (Eds.). 2006. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer Science & Business Media.

Reed, R. B., Ladner, D. A., Higgins, C. P., Westerhoff, P., and Ranville, J. F. 2012. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), 93-99.

Roberts, A. 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Environ. Plant, Cell and Environment*, 26, 103-124.

Rossi, L., Fedenia, L. N., Sharifan, H., Ma, X., and Lombardini, L. 2019. Effects of foliar application of zinc sulfate and zinc nanoparticles in coffee (*Coffea arabica* L.) plants. *Plant physiology and biochemistry*, 135, 160-166.

Sabo-Attwood, T., Unrine, J. M., Stone, J. W., Murphy, C. J., Ghoshroy, S., Blom, D., and Newman, L. A. 2012. Uptake, distribution, and toxicity of gold nanoparticles in tobacco (*Nicotiana xanthi*) seedlings. *Nanotoxicology*, 6(4), 353-360.

Samree, K., Srithai, P. U., Kotchaplai, P., Thuptimrang, P., Painmanakul, P., Hunsom, M., and Sairiam, S. 2020. Enhancing the antibacterial properties of PVDF membrane by hydrophilic surface modification using titanium dioxide and silver nanoparticles. *Membranes*, 10(10), 289.

Scheckel, K. G., Luxton, T. P., El Badawy, A. M., Impellitteri, C. A., and Tolaymat, T. M. 2010. Synchrotron speciation of silver and zinc oxide nanoparticles aged in a kaolin suspension. *Environmental science & technology*, 44(4), 1307-1312.

Scholthof, H. B. 2005. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends in plant science*, 10(8), 376-382.

Schwab, F., Zhai, G., Kern, M., Turner, A., Schnoor, J. L., and Wiesner, M. R. 2016. Barriers, pathways and processes for uptake, translocation, and accumulation of nanomaterials in plants—Critical review. *Nanotoxicology*, 10(3), 257-278.

Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De la Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., and Dimkpa, C. 2015. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2), 1-21.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

Shaw, A. K., Ghosh, S., Kalaji, H. M., Bosa, K., Brestic, M., Zivcak, M., and Hossain, Z. 2014. Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defense and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 102, 37-47.

Sillanpää, M. 1982. Micronutrients and the nutrient status of soils: a global study (Vol. 48). Food & Agriculture Org.

Singh, A., Singh, N. Á., Afzal, S., Singh, T., and Hussain, I. 2018. Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. *Journal of materials science*, 53(1), 185-201.

Singh, N. B., Amist, N., Yadav, K., Singh, D., Pandey, J. K., and Singh, S. C. 2013. Zinc oxide nanoparticles as fertilizer for the germination, growth and metabolism of vegetable crops. *Journal of Nanoengineering and Nanomanufacturing*, 3(4), 353-364.

Singh, V. P., Singh, S., Kumar, J., and Prasad, S. M. 2015. Investigating the roles of ascorbate-glutathione cycle and thiol metabolism in arsenate tolerance in ridged *Luffa* seedlings. *Protoplasma*, 252(5), 1217-1229.

Slomberg, D. L., and Schoenfisch, M. H. 2012. Silica nanoparticle phytotoxicity to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental science & technology*, 46(18), 10247-10254.

Srilatha, B. 2011. Nanotechnology in agriculture. *J. Nanomed. Nanotechnol*, 2(7), 5.

Takkar, P. N., and Singh, T. 1978. Zinc Nutrition of Rice as Influenced by Rates of Gypsum and Zn Fertilization of Alkali Soils 1. *Agronomy Journal*, 70(3), 447-450.

Tanaka, A., and Yoshida, S. 1970. Nutritional disorders of the rice plant in Asia. Los Baños. International Rice Research Institute.

Taylor, A. F., Rylott, E. L., Anderson, C. W., and Bruce, N. C. 2014. Investigating the toxicity, uptake, nanoparticle formation and genetic response of plants to gold. *PLOS one*, 9(4), e93793.

Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.

- Tirani, M. M., Haghjou, M. M., Sulieman, S., and Ismaili, A. 2018. Comparative evaluation of zinc oxide effects on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) grown in different media. *Journal of Agricultural Science & Technology*, 20(4).
- Wang, P., Menzies, N. W., Lombi, E., McKenna, B. A., Johannessen, B., Glover, C. J., and Kopittke, P. M. 2013. Fate of ZnO nanoparticles in soils and cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental science and technology*, 47(23), 13822-13830.
- Wang, Z., Xie, X., Zhao, J., Liu, X., Feng, W., White, J. C., and Xing, B. 2012. Xylem- and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environmental science and technology*, 46(8), 4434-4441.
- Xie, Y., He, Y., Irwin, P. L., Jin, T., and Shi, X. 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology*, 77(7), 2325-2331.
- Xue, J., Luo, Z., Li, P., Ding, Y., Cui, Y., and Wu, Q. 2014. A residue-free green synergistic antifungal nanotechnology for pesticide thiram by ZnO nanoparticles. *Scientific reports*, 4(1), 1-9.
- Yang, J., Cao, W., and Rui, Y. 2017. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. *Journal of plant interactions*, 12(1), 158-169.
- Zhou, D., Jin, S., Li, L., Wang, Y., and Weng, N. 2011. Quantifying the adsorption and uptake of CuO nanoparticles by wheat root based on chemical extractions. *Journal of Environmental Sciences*, 23(11), 1852-1857.