

Nanopartículas de cobre como promotor del vigor de la germinación en semillas de pepino

Copper nanoparticles as a promoter of germination vigour in cucumber seeds

Esmeralda Jackelin Silverio-Mata^{*1}, Norma Angélica Ruiz-Torres¹, Celestino Flores-López¹, Ileana Vera-Reyes², Ricardo Hugo Lira-Saldívar²

¹Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. C.P. 25315. Saltillo, Coah., México. ²Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Plásticos en la Agricultura del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIOA), Blvd. Enrique Reyna No. 140, Col. San José de los Cerritos, 25294 Saltillo, Coah. Email: jack.medy6@hotmail.com [*Autor responsable].

RESUMEN

En la presente investigación se determinaron los efectos que provoca la aplicación de NPsCu a altas y bajas concentraciones en el proceso de la germinación y vigor de semillas de *Cucumis sativus* que se someten a periodos de 12 y 24 h de imbibición. El experimento se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas (CCDTS) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; en éste se utilizaron NPsCu de 25 nm, y se efectuaron pruebas fisiológicas de vigor y germinación estándar bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial A x B, 22 tratamientos de 0 hasta 500 ppm con 12 y 24 h de imbibición, con cuatro repeticiones cada una. Se evaluó: porcentaje de vigor, germinación, plántulas anormales, semilla sin germinar, longitud de vástago y radícula. En este trabajo se encontró que el vigor se vio afectado por el tiempo de imbibición y el incremento de concentraciones; que los tratamientos con bajas concentraciones, a 12 h de imbibición con NPsCu, mantuvieron porcentajes de germinación aceptables, mientras que los de altas concentraciones, en sus dos periodos de imbibición, tuvieron efectos inversamente proporcionales en el vigor y la germinación, además se les detectó fitotoxicidad, que se expresó al incrementar el porcentaje de plántulas anormales y presentar la inhibición del crecimiento de las raíces principales.

Palabras claves: NPsCu, *Cucumis sativus*, germinación, vigor.

ABSTRACT

The effects of NPsCu application at high and low concentrations in the process of germination and vigor of *Cucumis sativus* seeds subjected to periods of 12 and 24 h of imbibition were determined. The experiment was carried out in the Laboratory of Physiology and Biochemistry at the Center for Training and Development in Seed Technology (CCDTS), at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. In this experiment, 25 nm NPsCu were used. Physiological tests for vigor and standard germination were carried out under a completely randomized design with factorial arrangement using 22 treatments from 0 to 500 ppm, 12 and 24 h of imbibition, and 4 repetitions each. The percentage of vigor, germination, abnormal seedlings, ungerminated seed, stem length and radicle were evaluated. It was found that the vigor was affected by the imbibition time and the increase of concentrations, while treatments with low concentrations at 12 h of imbibition with NPsCu maintained acceptable germination percentages, and high concentrations in their two imbibition periods had inversely proportional effects. In addition to the vigor and germination, phytotoxicity was detected, which was expressed by increasing the percentage of abnormal seedlings and by presenting the inhibition of the growth of the main roots.

Key words: NPsCu, *Cucumis sativus*, germination, vigor.

INTRODUCCIÓN

El término nanotecnología (NT) se utilizó por primera vez en 1974 por el japonés Norio Taniguchi, un investigador de la Universidad de Tokio, quien señaló la posibilidad de poder manejar materiales a nivel nanométrico. El prefijo *nano* se refiere a una millonésima (1×10^{-9}), y la palabra nanotecnología a las diferentes estructuras de la materia y su control a escalas de entre 1 y 100 nanómetros (Mejias *et al.*, 2009). La NT involucra el diseño, la caracterización y la aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica (Royal Society, 2004).

El atractivo de la NT está relacionado con el hecho de que a escala nanométrica, las propiedades de la materia cambian, y presentan una superficie más grande que los materiales a macroescala. Esta característica puede hacerlos químicamente más reactivos, lo que afecta su resistencia y propiedades eléctricas, magnéticas u ópticas (Delgado, 2009). Las NPs metálicas poseen múltiples propiedades físicas, químicas, térmicas, magnéticas y ópticas que se aplican en diversas áreas tecnológicas, incluidos alimentos y productos comunes de uso diario (Trujillo, 2014).

El uso potencial de las NPs dentro de la agricultura radica en que se pueden resolver problemas que con productos a escala normal son muy costosos y no siempre lo hacen eficientemente, como lo harían los productos formulados con NPs (Carrillo y González, 2009); además, estos productos mejoran la capacidad de absorción de los cultivos de los nutrientes del suelo, lo que permite incrementar los rendimientos de las cosechas al aprovechar que las NPs tienen propiedades químicas, estructurales y bioquímicas, que representan una ventaja sobre otros productos formulados con sus homólogos sólidos (Bergeson, 2010; Balinova *et al.*, 2007).

Recientes estudios indican que los nuevos materiales metálicos y/o basados en el carbón afectan a plantas y microorganismos en diferentes formas, tanto en niveles fisiológicos, como bioquímicos, nutricionales y genéticos (Zheng *et al.*, 2005; Dehkourdi *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2009; Khodakovskaya *et al.*, 2009). Sin embargo, en algunas áreas aún no hay suficiente información documentada en lo que respecta a respuestas fisiológicas y fitotóxicas que las NPs metálicas pueden tener en plantas y semillas para algunos géneros específicos, y cómo éstos pueden ayudar a expresar su máximo potencial en la germina-

ción y vigor al ser sometidas a tratamientos con NPs de esta naturaleza. La síntesis de NPs_{Cu} han estado ganando atención debido a su alta disponibilidad, fácil manipulación y por ser un metal semiconductor debido a sus propiedades físicas, químicas, antimicrobianas, así como a su abundancia, no obstante, factores como la aglomeración y la oxidación rápida lo han convertido en un área de investigación difícil, debido a que esto representan limitaciones importantes (Usman *et al.*, 2013).

El cobre es un micronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006), y se sabe que participa en numerosos procesos fisiológicos y que es un cofactor esencial para muchas metaloproteínas, y también proteínas que contienen Cu desempeñan un papel fundamental en procesos tales como: fotosíntesis, respiración, desintoxicación de radicales superóxido y lignificación (Kirkby y Römheld, 2008). A nivel celular, el Cu también juega un papel esencial en la señalización de la transcripción y el transporte de proteínas, fosforilación oxidativa y movilización del hierro (Yruela, 2005), pero también es conocido por ser potencialmente tóxico. Algunos autores resaltan la importancia del Ciclo redox entre Cu^{2+} y Cu^{+} y cómo éste puede catalizar la producción de radicales hidroxilo altamente tóxicos, con daño subsiguiente al ADN, lípidos, proteínas y otras biomoléculas (Halliwell y Gutteridge, 1984), por lo tanto, a altas concentraciones, el Cu puede volverse extremadamente tóxico y causar síntomas como clorosis y necrosis, atrofia, decoloración de las hojas e inhibición del crecimiento de las raíces (Van Assche y Clijsters, 1990).

Sin embargo, su forma nanoparticulada es posible que cuente con otras propiedades químicas aprovechables en amplios ramos de la agricultura. Con tal propósito, el objetivo de la presente investigación es estudiar el potencial de las NPs_{Cu} como promotor del crecimiento, a la vez que establecer las dosis adecuadas para que así suceda, y determinar en qué momento las NPs pueden causar fitotoxicidad; al mismo tiempo se pretende determinar en qué especies de importancia agrícola es preciso su aplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas (CCDTs), de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro,

Cuadro 1. Descripción de tratamientos con NPsCu aplicados en semillas de *Cucumis s.* mediante imbibición.

Dosis	Concentración (ppm)	Imbibición (h)
Bajas	0, 5, 10, 20, 50 y 100	12
	5, 10, 20, 50 y 100	24
Altas	0, 100, 200, 300, 400 y 500	12
	100, 200, 300, 400 y 500	24

ppm = Partes por millón; h = Horas; conc. = Concentración

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, ubicada a 25° 21' 19" latitud norte y a 101° 01' 48" longitud oeste a una altura de 1 779 msnm. La semilla que se trabajó fue de *Cucumis sativus* L., var. Edisto. Se utilizaron nanopartículas de cobre (NPsCu) de 25 nm de la empresa Skyspring Nanomaterials; se establecieron 22 tratamientos con cuatro repeticiones, cada uno a dos niveles de concentraciones, sometidos a periodos de imbibición de 12 y 24 h (Cuadro 1).

En el laboratorio de biotecnología del Departamento de Plásticos en la Agricultura (CIQA) se elaboraron las soluciones para los diferentes tratamientos, las cuales se realizaron a partir de una solución madre (500 ppm) que se coló, de manera individual, en un tubo falcón cónico (50 ml), para luego disolverla a diferentes concentraciones; después las soluciones se sometieron a un proceso de sonicación ultrasónica en un ultrasonificador *Branson 2510*, durante tres periodos de 20 minutos cada uno.

Se usaron 25 semillas por repetición, que se colocaron en cajas de *Petri* (vidrio, 60 x 15 mm), en las que se adicionaron 30 mL de cada solución. Las cajas se taparon, identificaron y sellaron con papel parafilm y, finalmente, se colocaron en un agitador orbital horizontal tipo shaker a 90 rpm durante periodos de 12 y 24 h.

Una vez transcurrido el tiempo de imbibición, se sembraron 25 semillas entre papel anchor, mismas que se distribuyeron en una hilera horizontal entre dos hojas previamente humedecidas con agua destilada sobre una superficie plana, y se enrollaron en forma de "taco", para luego colocarlas en canastas plásticas, y de forma aleatoria se introdujeron en una cámara germinadora Seedburo, a una temperatura constante de 25° C durante ocho días, y se regaron cada tercer día.

La evaluación del estudio se realizó de acuerdo con la normatividad de la International Seed Testing Association (ISTA, 2009), y se efectuó la valoración de las siguientes variables:

- **Porcentaje de plántulas normales (PN).** Éste se tomó como indicativo del vigor de la germinación, y considera que las plántulas presenten todas sus estructuras esenciales: raíces, tallo, cotiledones, yemas terminales completas y sanas, lo que indica un desarrollo satisfactorio de la nueva planta. Se evaluaron al cuarto día después de la siembra.
- **Porcentaje de germinación (GERM).** Total de plántulas normales al octavo día después de la siembra.
- **Longitud de vástago (LV) y longitud de radícula (LR).** Para la evaluación de estas variables se tomaron las mediciones en centímetros al octavo día después de la siembra; se consideraron todas las plántulas normales de las cuatro repeticiones de cada tratamiento.
- **Plántulas anormales (PA).** Se refiere a las que presentan algunas de sus estructuras con daños irreparables, con un desarrollo inadecuado o deformaciones, por lo que no muestran potencial de desarrollo.
- **Semillas sin germinar (SSG).** Semillas que no germinaron o iniciaron el proceso sin concluir todas las etapas de la germinación.

Con la información que se obtuvo del análisis fisiológico, se efectuó un análisis de varianza y una prueba de comparación de Medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) y se analizaron con el paquete estadístico del programa SAS, versión 9.0.

Cuadro 2. Análisis de varianza para las variables fisiológicas evaluadas en semillas de *C. sativus* tratadas con NPsCu a dosis altas y bajas durante diferentes periodos de imbibición (12 y 24 h).

FV	GL	VIG [%]	GERM [%]	PA [%]	SSG [%]	LR [cm]	LV [cm]
Tiempo	1	2904*	416 ns	486 ns	6 ns	2038**	16 ns
Dosis	1	53016**	79350**	71722**	170**	0.69 ns	913**
Dosis de tiempo	1	130 ns	1014 ns	1232 ns	24 ns	1308**	71*
Error		697	811	787	9.5	31.7	9.1
C.V. [%]		50.1	44.4	83.3	138	38.1	34

*, ** = Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad respectivamente; FV = Fuente de variación; GL = Grados de libertad; CV = Coeficiente de variación; VIG = Vigor; GERM = Germinación; PA = Plántulas anormales; SSG = Semillas sin germinar; LV = Longitud de vástago; LR = Longitud de radícula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado, la aplicación de dosis bajas y altas de NPsCu provocó diferencias en las variables vigor (%), mostró diferencias en la FV tiempo y dosis, y respecto a la variable germinación (%) se encontraron diferencias en la FV dosis; para la variable plántulas anormales, las diferencias se encontraron en las FV dosis ($P < 0.01$); en cuanto a la variable longitud de vástago, sólo hubo diferencias en la FV dosis y dosis por tiempo y, finalmente, para la variable LR las diferencias se presentaron en las FV tiempo, dosis por tiempo ($P < 0.01$) (Cuadro 2).

De acuerdo con la comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$), para la variable vigor se observó que ningún tratamiento superó al control (Figura 1A); sin embargo, en la FV el tiempo a 12 h de imbibición superó 11% al porcentaje obtenido a 24 h, y a altas dosis de NPsCu el vigor disminuyó hasta 47% (Figura 2), por lo que se determinó que conforme se incrementa la concentración y al duplicar el tiempo de imbibición, el vigor de semillas de *C. melo* se afecta negativamente. Partiendo del hecho de que el vigor es aquella propiedad de las semillas que determina su potencial para una emergencia rápida y uniforme, y de que los efectos del nivel de vigor pueden persistir para influir en el crecimiento de las plantas maduras, y en la uniformidad y rendimiento del cultivo, se utilizó un amplio orden de métodos para caracterizar y determinar el vigor de las semillas.

En lo que respecta a la variable germinación, se observó que todos los tratamientos a concentraciones bajas resultaron favorables, ya que presentaron porcentajes aceptables cercanos al control (Figura 1B), por lo que es posible mejorar la germinación a dosis bajas por tiempos de imbibición cortos (Figura 2); por otro lado, los tratamientos en dosis altas mostraron que el porcentaje de germinación es inversamente proporcional a las concentraciones, es decir, que entre más altas sean las dosis de NPsCu, el porcentaje de germinación disminuye (Figura 1B).

En plántulas anormales, los porcentajes aumentan de forma exponencial dentro de los tratamientos en altas dosis de NPsCu (Figura 1C), lo que indica que la plántula mostró una respuesta por toxicidad, de manera que a 500 ppm las anormalidades aumentaron a 97%, lo que significa que niveles de altas concentraciones y tiempos prolongados de imbibición aumentan la toxicidad y, por ende, una respuesta morfológica (anormalidades); al evaluar la variable LR en ambos tiempos de imbibición, se comprobó la inhibición del desarrollo de raíces primarias bajo efecto de tratamientos con altas concentraciones; sin embargo, a concentraciones de 50 y 100 ppm la LR aumentó 1.8 respecto al control (Figura 3B). Finalmente, para la variable LV, los mejores tratamientos fueron 10 y 50 ppm al aumentar 6 y 4 cm respecto al control. Lo anterior nos indica que la respuesta de las semillas de *C. sativus* no es independiente del tiempo de imbibición y del nivel de concentración aplicado (Figura 3A).

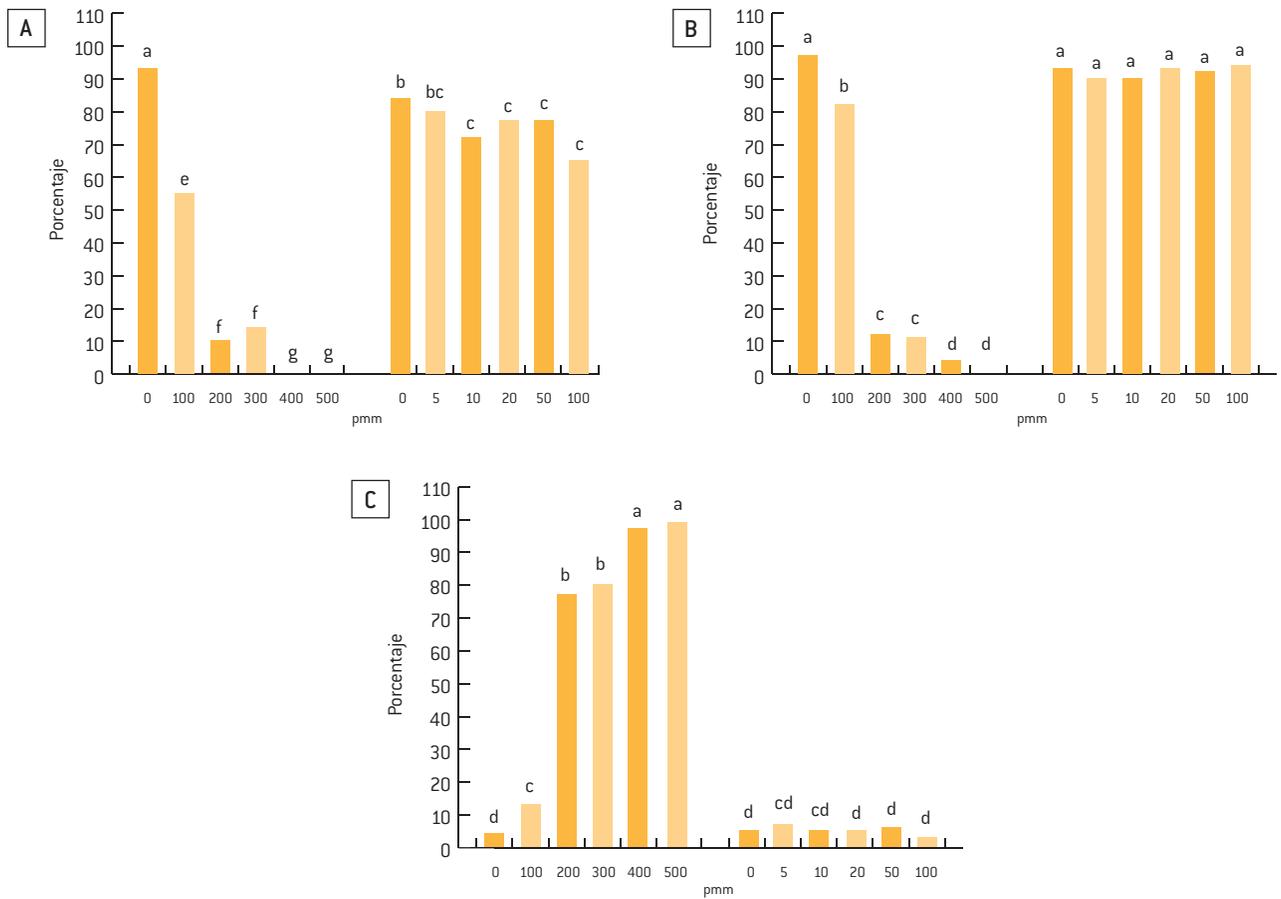


Figura 1. Diferentes concentraciones de NPsCu aplicadas a semillas de *C. sativus* y su efecto en el vigor (A), la germinación (B) y porcentaje de plántulas anormales (C). Las barras en cada gráfico señalan valores promedio para cada variable, y literales diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas según una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

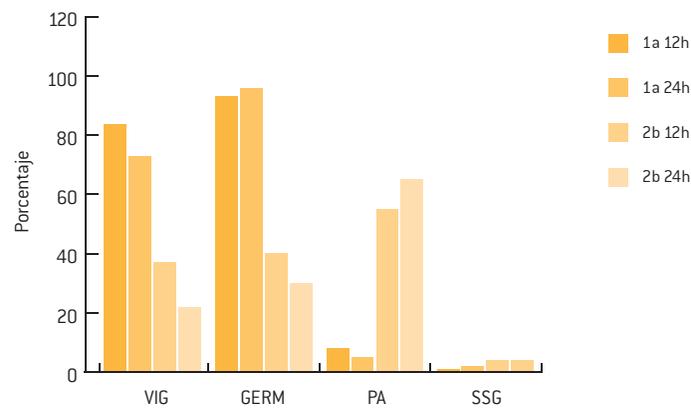


Figura 2. Efecto de dos dosis de NPsCu aplicadas en semillas de *C. sativus*: bajas concentraciones a 12 h (1a 12 h), y 24 h de imbibición (1a 24 h); y altas concentraciones a 12 h (2b 12 h) y 24 h (2b 24 h) de imbibición.

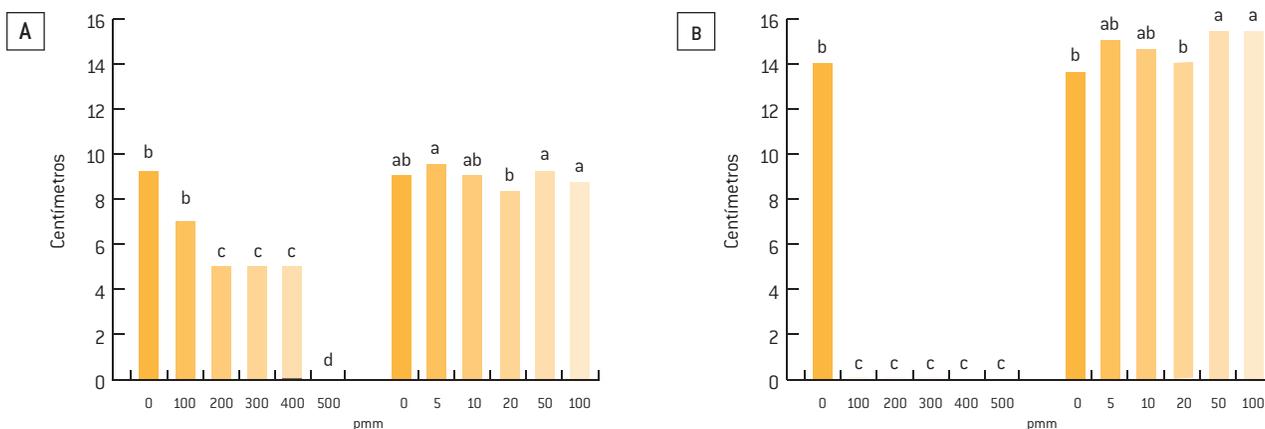


Figura 3. Diferentes concentraciones de NPsCu aplicadas a semillas de *C. sativus* y su efecto en la longitud de vástago [A] y longitud de radícula [B]. Las barras en cada gráfico señalan valores promedio para cada variable, y literales diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas según una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Los resultados anteriormente descritos demostraron que las NPsCu a bajas concentraciones sólo promueven el vigor si las semillas pasan por periodos cortos de imbibición, y que a medida que aumentan las concentraciones, el vigor se ve afectado de forma progresiva; sin embargo, los porcentajes de germinación y longitud de vástago se mantienen constantes respecto al control, mientras que la LR se afecta conforme el tiempo de imbibición y la aplicación de altas concentraciones de NPsCu. Es posible que el cobre no afecte significativamente el porcentaje de germinación y la longitud de vástago a dosis bajas, debido a que la planta requiere mínimas cantidades de este elemento; sin embargo, aunque el cobre es un micronutriente y participa en numerosos procesos fisiológicos, y además es un cofactor esencial para muchas metaloproteínas, surgen problemas cuando el exceso de cobre está presente en las células, y se expresa con la inhibición del crecimiento de plantas, principalmente de raíces, y además deteriora importantes procesos celulares.

También es preciso considerar el hecho que el cobre es un elemento de fácil aglomeración y tiende a tener poca movilidad dentro de la planta. Los hallazgos encontrados en el presente estudio son similares a los reportados por Liu *et al.* (2016), quienes desarrollaron estudios para determinar si las NPs pueden asimilarse por las plantas o producir respuestas de fitotoxicidad, además de evaluar CuO, iones de Cu y NPsCu a concentraciones basadas en los siguientes requerimientos nutritivos: 0, 0.02, 0.04, 0.4, 4 y 8 ppm, y sus efectos en semillas de *Lactuca sativa* L.,

y determinaron que las CuO son ligeramente más tóxicas que los iones de Cu, en tanto que las NPsCu no suprimieron significativamente el porcentaje de germinación en concentraciones de 0.02 a 8 ppm, pero redujeron la longitud de la raíz en todas estas concentraciones, lo que indica una toxicidad directa de las NPCu sobre la lechuga.

Otros investigadores coinciden con estos resultados como Stampoulis *et al.* (2009), quienes al evaluar NPsCu y su contraparte a granel (polvo) (1000 mg L⁻¹) y su efecto en la germinación, elongación de raíz y biomasa en semillas de *Cucurbita pepo*, observaron que ninguno de los tratamientos afectó la germinación, pero NPsCu presentaron una reducción considerable (77%) de la longitud de raíces y, por ende, una reducción de biomasa de 90% respecto al control. De forma similar, Lee *et al.* (2008), también demostraron que NPsCu a concentraciones de <200 mg L⁻¹ afectan el crecimiento (reducción) de plántulas de *Phaseolus radiatus* y *Triticum aestivum*, y a 800 mg L⁻¹ se encontró que la reducción de la longitud se presentó principalmente en las raíces, con lo que se concluyó que la longitud de plántulas se relaciona negativamente con las concentración de exposición, y que la raíz es la parte más sensible a la toxicidad, debido a que la absorción de NPs ocurre durante la absorción de humedad y absorción de nutrientes. Con ello coinciden Yasmeeen *et al.* (2015), que comprobaron el efecto inhibitorio de NPsCu adicionadas mediante tres métodos a semillas de *Triticum aestivum* L., con lo que concluyeron que éstas NPs no son buenas candidatas como promotores del crecimiento.

CONCLUSIONES

Las NPsCu a bajas concentraciones sólo promueven el vigor si las semillas pasan por periodos cortos de imbibición, y lo afectan negativamente si aumentan las concentraciones y duplican el tiempo de imbibición, aunque es posible mantener porcentajes aceptables de germinación si se aplica NPsCu a concentraciones bajas (0- 100 ppm), durante periodos cortos de imbibición.

La aplicación de altas concentraciones de NPs de cobre provocan toxicidad, la cual se expresó en la longitud de radícula, que se vio afectada en ambos periodos de imbibición.

La información obtenida permite establecer que bajas concentraciones pueden resultar mejores como nanofertilizantes y promotores de crecimiento, y los resultados a altas concentraciones podrían aprovecharse para la formulación de herbicidas sistémicos o de contacto para especies de malezas específicas, como la *Cucurbita foetidissima* K., sin descartar un estudio previo de acumulación y toxicidad por NPsCu en el suelo y su residualidad en el ambiente.

Se sugiere estudiar el efecto de NPsCu a bajas concentraciones, durante periodos de 8 y 12 h de imbibición, para así determinar un rango más específico en cuanto a tiempos favorables que permitan niveles óptimos de germinación y vigor. También es preciso un estudio bioquímico para relacionar la toxicidad provocada, a nivel morfológico, con la posible producción de ERO, y cuantificar el sistema antioxidante de defensa enzimático, de tal manera que se amplíe el panorama en cuanto la participación de las NPs en el estrés oxidativo de las plantas.

LITERATURA CITADA

BALINOVA, A.; Mladenova, R.; Shtereva D. 2007. Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography-mass spectrometric and gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in crops. *Journal of Chromatography A*. 1150(1), 136-144.

BERGESON, L. L. 2010. Nanosilver: US EPA's pesticide office considers how best to proceed. *Environmental Quality Management*, 19(3) pp. 79-85.

CARRILLO G. R., M. D. C. A. González. 2009. La nanotecnología en la agricultura y rehabilitación de suelos contaminados. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 2(2).

DEHKOURDI, E. H.; Chehrazhi, M.; Hosseini, H.; Hosseini, M. 2014. The effect of anatase nanoparticles (TiO₂) on pepper seed germination (*Capsicum annum* L.). *International Journal of Biosciences (IJB)*. 4(5). pp. 141-145.

DELGADO, G. 2009. Nanotecnología y producción de alimentos: Impactos económicos, sociales y ambientales. *Estudios Sociales* 17(34): 186-205.

HALLIWELL, B. y Gutteridge, J. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 219(1), 1.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA. 2009. *International Rules for Seed Testing. Chapter 5: The germination test*. ISTA. Bassersdorf, Switzerland.

KHODAKOVSKAYA, M., E. Dervishi, M. Mahmood, Y. Xu, Z. Li, F. Watanabe, 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). pp. 3221-3227.

KIRBY, E. y Römheld, V. 2008. Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad. *Informaciones Agronómicas*, (68). pp. 1-3.

LEE, W. M.; An, Y. J.; Yoon, H.; Kweon, H. S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental toxicology and chemistry*. 27(9). pp. 1915-1921.

LIU, R. y Zhang, H. R. 2016. Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients? *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(1). pp. 42.

MEJIAS S. Y.; Cruz, C. N.; Fernández, A. M. T.; Machado. O. J. D. 2009. La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. *Revista Cubana de Salud Pública*, 35(3).

ROYAL SOCIETY, UK. (2004) *Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and uncertainties*. National Academy of Science and the Royal Academy on Engineering.

STAMPOULIS, D.; Sinha, S. K.; White. J. C. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology*, 43(24), 9473-9479.

TAIZ, L. y E. Zeiger, 2006. *Fisiología vegetal*. Vol. 10. Universitat Jaume I.

USMAN, M. S., M. E Zowalaty, K. Shamel, N. Zainuddin, M., Salama, N. A. Ibrahim. 2013. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 8, 4467.

TRUJILLO R. J.; Majumdar, S., C. E. Botez, V. J. R Peralta.; Gardea T. J. L. (2014). Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*)

- plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard? *Journal of hazardous materials*, 267, 255-263.
- VAN A. F. y H. Clijsters. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, cell and environment*, 13(3), 195-206.
- YAO, K.S., S.J. Li, K.C. Tzeng, T.C. Cheng, C.Y. Chang, C.Y. Chiu, C.Y. Liao, J.J. Hsu, Z.P. Lin. 2009. Fluorescence silica nanoprobe as a biomarker for rapid detection of plant pathogens. *Advanced Materials Research. Trans Tech Publications*. Vol. 79. pp. 513-516.
- YASMEEN, F.; Razzaq A., M. N.; Jhanzab H. M. 2015. Effect of silver, copper and iron nanoparticles on wheat germination. *International Journal of Biosciences*, vol. 6(4), 112-117.
- YRUELA, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145-156.
- ZHENG L.; Hong F.; Lu S.; Liu C. 2005. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research* 105, 83-91.