

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Estudio Fisiológico de la Germinación, Desarrollo de Plántulas, y Contenido de Clorofila, como Respuesta a la Aplicación de Nanopartículas de Óxido de Cobre a Semillas de un Híbrido Comercial de Maíz (*Zea mays L.*).

Por:

MARÍA KARINA MÉNDEZ PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 202

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Estudio Fisiológico de la Germinación, Desarrollo de Plántulas, y Contenido de Clorofila, como Respuesta a la Aplicación de Nanopartículas de Óxido de Cobre a Semillas de un Híbrido Comercial de Maíz (*Zea mays* L.).

Por:

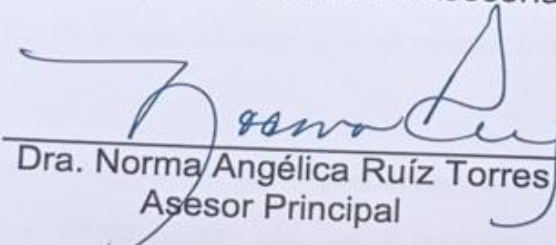
MARIA KARINA MÉNDEZ PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:


INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dra. Norma Angélica Ruíz Torres
Asesor Principal


MC. Pilar Espitia Hernández
Coasesor


MC. Hilda Cecilia Burciaga Dávila
Coasesor


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

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México
Diciembre, 2021.




DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y 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 el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Autor principal



María Karina Méndez Pérez

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud **a Dios**, que siempre me acompaño todo el trayecto de mi carrera, por cuidarme y bendecirme en cada paso de mi vida, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultades y de debilidades, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

Mis padres

Por todo el apoyo incondicional que me pudieron brindar en todo el trayecto de mi carrera la confianza y los valores que me brindaron para ser la persona que soy a pesar de las dificultades que pasamos siempre estuvieron aconsejándome para ser mejor cada día de mi vida.

A mi Alma Mater, por brindarme sus puertas para yo poder continuar con mis estudios de nivel superior, por todas esas alegrías vividas en esta casa de estudios que me dio tanto en mi formación como profesional. Por eso y por tantas cosas más seré un ¡buitre por siempre!

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

DEDICATORIA

A mis padres

La Sra. Eufemia Pérez Hernández y el Sr. Asunción Méndez Pérez.

Por darme la vida, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, gracias por todo mamá y papá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor.

A mis hermanos:

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

Carlos Enrique Méndez Pérez y Kevin Eduardo Méndez Pérez.

A toda mi familia:

Gracias a cada uno de mis abuelos, primos, primas, tíos, tías, que, a pesar de estar lejos de casa, siempre estuvieron apoyándome gracias en cada elección y emprendimiento para seguir adelante, siempre los llevo en mi corazón.

En especial a mis tíos, **José Bernabé Pérez Hernández, María Abundia Pérez Hernández, Antonio Pérez Hernández y Alejandro Pérez Hernández** personas que más aprecio y quiero mucho en el mundo por apoyarme y aconsejarme en mi carrera universitaria por sus palabras de aliento para seguir estudiando.

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

A María del Rosario Rendón Escobar. gracias por enseñarme el valor de la amistad, por tus buenos y sabios consejos durante todo el proceso de la carrera por estar en los momentos difíciles que compartimos cada una, risa, llanto, nostalgia,

tristeza y sobre todo que entre nosotras encontramos la oportunidad de ser hermanas para toda la vida te quiero.

A mis amigas Emma, Mahory, Yazmin, Xóchitl y Ximena por su amistad y apoyo incondicional. Además de mis **amigos** (puñetas) Adrián, Pablo, Daniel, Juancho, Cristian, Gual Fred, Héctor y Leonardo que compartieron muchos buenos momentos.

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

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.OBJETIVOS	13
1.1.1. Objetivo general	13
1.1.2. Objetivos específicos.....	13
1.2. HIPÓTESIS	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1.Qué es nanotecnología.....	14
2.2. Nanoparticulas	15
2.3.Origen de las nanoparticulas (NPs)	16
2.4. Antecedentes de la nanotecnología.....	16
2.5. Aplicaciones de la nanotecnología en la agricultura.....	17
2.6. Características del cobre.....	18
2.7. Nanoparticulas de cobre	19
2.8. Funciones del cobre en las plantas y semillas.....	20
2.9. Deficiencia y toxicidad del cobre	21
2.10. Deficiencia del cobre	21
2.11. Exceso de cobre	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Localización del sitio experimental.....	23
3.2. Material genético.....	23
3.3. Variables evaluadas.....	24
3.4. Diseño experimental	26

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
V. CONCLUSIONES.....	35
VI. LITERATURA CITADA.....	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadrados medios de analisis de varianza para variables evaluadas de semillas de maiz tratadas con NPsCuO-----	28
Cuadro 2. Cuadrados medios del analisis de varianza de variables evaluadas en bioensayo para determinar clorofilas en plantulas derivadas de semillas tratadas con NPsCuO. -----	29
Cuadro 3. Comparacion de medias de variables evaluadas en bioensayo de germinacion, desarrollo de plantula y acumulacion de materia seca, con la aplicaci3n de NPsCuO a semillas durante la imbibicion. -----	30
Cuadro 4. Comparacion de medias de variables evaluadas en biensayo para determinar clorofilas, en plantas obtenida de semillas tratadas con NPsCuO. -----	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que ilustra las diferentes aplicaciones potenciales de la NT en diversos aspectos de la agricultura moderna -----	18
---	----

RESUMEN

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), con el objetivo de evaluar mediante un bioensayo el efecto de la aplicación de nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO), sobre parámetros de calidad fisiológica en semillas de un híbrido comercial de maíz, para determinar la germinación y desarrollo de la plántula de maíz.

El estudio consistió en un bioensayo donde se establecieron 3 repeticiones de 25 semillas para cada tratamiento con NPsCuO (0, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm). Las semillas fueron colocadas en cajas de Petri, y se imbibieron con 15 ml de suspensión de NPsCuO con la concentración que se estableció para cada tratamiento, para después ser colocadas en una cámara bioclimática a una temperatura de 25 °C, durante 24 h. Después se sembraron, colocando 25 semillas entre dos capas de papel Anchor humedecido con agua destilada, enrollados en forma de taco, colocándolos en bolsas de polietileno transparente, las cuales se ubicaron dentro de una cámara bioclimática a una temperatura 25 °C y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Las variables evaluadas fueron porcentaje de vigor de germinación, porcentaje de germinación, plántulas de alto vigor, plántulas de bajo vigor, plántulas anormales, semillas sin germinar, longitud de plúmula, longitud de radícula, peso seco de plúmula, peso seco de radícula y contenido de clorofila. El experimento fue realizado bajo un diseño experimental completamente al azar, los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza para determinar diferencias estadísticas por concentración, posteriormente se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS Institute (2004). Con los resultados obtenidos se observó que las concentraciones de 100, 500 y 1000 ppm de NPsCuO impactaron positivamente en la variable porcentaje vigor de germinación.

Palabras clave: Nanopartículas, germinación, vigor y clorofila.

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología (NT) representa una de las más novedosas innovaciones científicas, y en muchos sentidos, la de mayor alcance en lo referente a la alta tecnología para la agricultura y los alimentos frescos. Se estima que en todo el mundo hay más de 300 nanoproductos alimenticios disponibles en el mercado y se prevé que a futuro la NT se utilizará en el 40% de la industria alimentaria. El uso de las NPs en la industria alimentaria se debe a su actividad antimicrobiana, un ejemplo es el dióxido de titanio, colorante que puede utilizarse como barrera de protección en el envasado de alimentos. Las NPs orgánicas se emplean principalmente para mejorar el valor nutritivo de los alimentos, utilizándose como vehículo para la liberación de vitaminas y otros nutrientes (nanocápsulas).

En términos generales se puede decir que hoy en día podremos utilizar esta tecnología que nos puede ayudar para grandes beneficios en la agricultura además de facilitar diversos usos potenciales de interés en la producción agrícola mediante diversas estrategias por otra parte, la NT tiene aplicaciones en la agricultura; a través del mejoramiento de la eficiencia de los nutrientes, desarrollo de pesticidas de nueva generación.

Al presente la agricultura es un área donde las nuevas tecnologías se aplican para mejorar el rendimiento de los cultivos. Nanoagricultura implica el empleo de NPs en la agricultura, considerando que estas tendrán algunos efectos beneficiosos para los cultivos. La aparición de nuevos nanodispositivos y nanomateriales dan oportunidad a aplicaciones potenciales y líneas de investigación. Las NPs son materiales lo suficientemente pequeños como para caer dentro del rango nanométrico (10 a 100 nm). Estos materiales pueden ser usados para liberar pesticidas o fertilizantes en un momento y sitio específico, logrando de esta manera aplicar suspensiones en aéreas muy localizadas, que podrán disminuir el daño a otros tejidos de la planta y a la vez en cantidades pequeñas, reduciendo así el efecto adverso al medio ambiente (Srilatha, 2011).

En este trabajo de investigación, se estudió la respuesta de semillas y de plántulas de maíz híbrido comercial, a la aplicación de tratamientos con NPsCuO, a diferentes dosis, en variables como porcentaje de germinación, desarrollo de plántula, acumulación de biomasa y contenido de clorofila a, b y total.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Determinar la respuesta fisiológica a la aplicación de NPsCuO, en el proceso germinativo y en el desarrollo de plántulas de maíz.

Conocer el efecto que tiene la aplicación de diferentes concentraciones NPsCuO durante la imbibición de las semillas, en la acumulación de biomasa y en el contenido de clorofila.

1.1.2. Objetivos específicos

Evaluar la respuesta de la evaluación del efecto de las NPsCuO para determinar la germinación y desarrollo de la plántula de maíz.

1.2. HIPÓTESIS

Ho: La imbibición de semillas con NPsCuO durante el proceso de germinación, no promueve el vigor de germinación y el desarrollo de plántulas, ni incrementa la biomasa y el contenido de clorofila.

Ha: Al menos uno de los tratamientos con NPSCuO durante la imbibición, promueve el vigor de germinación y el desarrollo de la plántula, así mismo incrementa la biomasa y el contenido de clorofila.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Qué es la nanotecnología

La nanotecnología es un área de investigación, así como su aplicación en la fabricación de dispositivos y productos, que estudia las propiedades de los materiales que tienen entre uno y 100 nanómetros de tamaño. En segundo aspecto es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala. Podríamos destacar que varios científicos aprueban la NT para crear materiales y sistemas de innovación para garantizar materiales a escala muy pequeña de mejor tamaño, y tener bajo costo en la tecnología (Díaz, 2012). se hace necesario resaltar que la nanotecnología le ha dado mayor alcance a la agricultura y a la producción de alimentos frescos, logrando un alto nivel de eficiencia y calidad de aquellos cultivos (Lira *et al.*, 2014). En términos generales, nos ayuda para facilitar el área técnica y científica en garantizar información nueva con experimentos que brindan resultados auténticos de laboratorio para procesos de producción.

Se hace necesario resaltar que en la agricultura moderna han comenzado a investigarse los nanomateriales, porque ofrecen incrementar la producción de alimentos; además la NT puede brindar la posibilidad de generar nanofertilizantes y promotores de crecimiento. Debido a esto científicos agrícolas buscan la manera de como innovar el estancamiento en el rendimiento de los cultivos, para un mejor aprovechamiento en la baja eficiencia en el uso de nutrientes, materia orgánica del suelo, nutrientes, cambio climático, superficie agrícola y escasez de agua para riego (Dubey y Mailapalli, 2016).

2.2. Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) ya sean de nanopolvo, nanoracimo, o nanocrystal, son partículas microscópicas con una característica en partículas la cual por tener una dimensión menor de 100 nm o menos, y un gran número de átomos, les permite una mayor superficie por peso, por lo tanto, comparten características con varias partículas (Alam *et al.*, 2013). En cuanto a la agricultura, se puede decir que hay varios experimentos realizados que han dado resultado en el tamaño óptico, forma y concentración de las NPs, para que estas puedan ser aplicadas a las plantas para mejor penetración y translocación. Esto indica que las NPs son capaces de penetrar los tejidos vegetales cuando se aplican sobre las hojas de las plantas, y estas se desplazan hacia diferentes partes y tejidos. Asimismo, los resultados han demostrado que tan solo 14.7 % del nanomaterial aplicado a las plantas, se pierde mediante la técnica de aerosol (usando nebulizador) en comparación con la pérdida del 32.5 en técnicas convencionales. De este modo bajo concentraciones menores a 5 ppm, las nanopartículas se pueden absorber mejor y movilizarse a través de las hojas de las plantas; por ello, a mayor tamaño de nanopartículas menor será la penetración en las plantas (Tarafdar *et al.*, 2012).

A continuación (Betancourt *et al.*, 2013) menciona que las NPsCuO llegan a ser muy interesantes en cuanto a sus características y propiedades que contiene tanto químicas, físicas y microbianas para un mejor metal semiconductor que puede ayudar para facilitar en laboratorios o campo mediante su aplicación en proyectos que puedan brindarnos información para tratar de mejorar áreas de agricultura en la producción agrícola o en otro ámbito innovador. No obstante, el cobre ha sido de interés particular porque presenta un aspecto amplio de acción contra bacterias y hongos.

2.3. Origen de las nanopartículas (NPs)

La unidad de referencia del mundo Nano es el nanómetro (nm). El prefijo “nano” proviene del griego “nannos” que significa enano. Esta escala es la del átomo, el “ladrillo” elemental de cualquier materia.

$$1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} = 0,000 \ 000 \ 001 \text{ m}$$

Las nanopartículas son consideradas un descubrimiento de la ciencia moderna, pero en realidad tienen una larga historia. Ya que muchas de ellas están presentes en la naturaleza como las cenizas de los volcanes, la arena del desierto, algunos microorganismos.

Las nanopartículas que se descubrieron comienzan a utilizarse en 1999.

Si bien es cierto que existen algunos tipos de nanopartículas que se derivan de procesos industriales como la producción de materiales a gran escala por procedimientos a altas temperaturas (humo de sílice, partículas ultrafinas de óxido de titanio y metales ultrafinos), por procesos de combustión (diésel y carbón), en la obtención, y en procesos domésticos (Gutiérrez *et al.*, 2013).

2.4. Antecedentes de la nanotecnología.

La NT ha estado presente en la civilización desde la antigüedad y con el paso del tiempo ha ido creciendo a pasos agigantados, particularmente a partir de los 80s, manteniéndose hasta la fecha. Los orígenes de la NT se dieron por primera vez por el físico estadounidense Richard Phillips Feynman ganador del premio Nobel de Física, quien, en 1959 ante la Sociedad Americana de Física impartió la conferencia “Hay mucho sitio en el fondo”. En la conferencia, Feynman propuso manipular y fabricar artefactos con una precisión de unos pocos átomos; sus ideas permanecieron en la obscuridad por mucho tiempo. Por otro lado, en 1974 se produjo el primer registro de una patente de un dispositivo molecular por Aviram y Seiden de la corporación IBM, y en 1982 el suizo Gerd Binnig y el alemán Heinrich Rohrer inventaron el microscopio de barrido de efecto túnel, el cual permite ver objetos de tamaño nanométrico. En 1985 se descubrieron las jaulas esféricas con

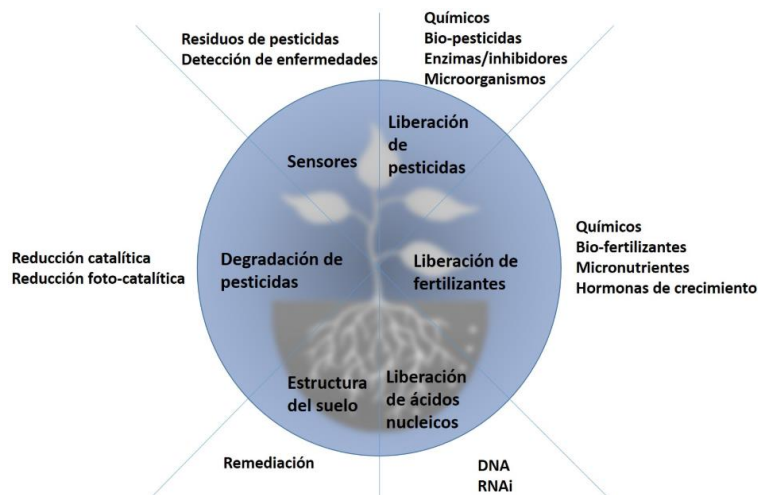
60 átomos de carbono conocidas como fullerenos por Binnig y Ruhrer. En 1986, Eric Drexler publicó el libro “Los motores de la creación”, con una amplia visión de futuro de lo que se llamaría Nanotecnología Molecular; en 1989, dos científicos de IBM hicieron posible la grabación de datos a escala manométrica y en 1991 el japonés Sumio Iijima informó de la existencia de nanotubos de carbono, de amplio uso en la actualidad. Por otra parte, la aplicación de la NT en la agricultura y en la industria alimentaria se trató por primera vez en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), en septiembre de 2003.

2.5. Aplicaciones de la nanotecnología en la agricultura.

La NT puede llegar a tener un gran avance en el área del campo agrícola sea por diferentes aplicaciones en desarrollo potencial con la biotecnología y la agricultura donde pueden destacar encapsulamiento de ingredientes activos como fertilizantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas y nutrientes, los cuales se pueden incorporar en matrices de liberación lenta o controlada en materiales naturales como la zeolita (Lateef *et al.*, 2016).

Los científicos agrícolas se enfrentan a diversos desafíos, entre ellos los bajos incrementos en el rendimiento de los cultivos, la reducida eficiencia del uso de nutrientes, la disminución de materia orgánica del suelo, deficiencias multinutricionales, el cambio climático, la reducción de la disponibilidad de tierras cultivables y la falta de agua para riego. Para dar solución a algunos de estos problemas, existe la necesidad de explorar las tecnologías de vanguardia, tal como la NT, por ejemplo, para aplicar la cantidad correcta de nutrientes y plaguicidas que promueven la productividad, y al mismo tiempo garantizar la seguridad del ambiente.

En la Figura 1 se muestra un esquema que ilustra las diferentes aplicaciones potenciales de la NT en diversos aspectos de la agricultura moderna (Ghormade *et al.*, 2011).



Las NPs también están siendo empleadas para el control de enfermedades en plantas, y en este contexto, la NT ofrece una gran oportunidad para desarrollar nuevos productos (Begum *et al.*, 2010).

2.6. Características del cobre

El cobre es uno de los metales que la humanidad utiliza desde hace más tiempo. Todavía hoy día, el cobre es junto al aluminio el metal no férreo más importante, es un metal de transición de un característico color rojizo y con tonalidades brillantes blando y dúctil, sus elevadas conductividades térmica y eléctrica son solo inferiores a las de la plata. Es por esta razón que entre las características que tiene este material, así como las del resto de metales de transición, se encuentra la de incluir en su configuración electrónica el orbital d, parcialmente lleno de electrones. Propiedades de este tipo de metales son su elevada dureza, el tener puntos de ebullición y fusión elevados y ser buenos conductores de la electricidad y el calor.

En tal sentido varias proteínas que contienen Cu desempeñan un papel fundamental en procesos como la fotosíntesis, respiración, desintoxicación de radicales superóxido y lignificación. Sin Cu no habría fotosíntesis ya que este

elemento es necesario para la formación de clorofila. Cuando se presenta una deficiencia de Cu, la actividad de estas enzimas se reduce drásticamente. La reducción del transporte fotosintético de electrones como consecuencia de menores contenidos de plastocianina, una proteína que contiene Cu, disminuye la tasa de fijación de CO₂, de modo que el contenido de almidón y de carbohidratos solubles (especialmente sacarosa) también se reduce (León y Sepúlveda, 2012).

2.7. Nanopartículas de cobre

Se estima que el cobre tiene importancia biológica en el proceso de fotosíntesis de las plantas, aunque no forma parte de la composición de la clorofila. El cobre ha tenido un gran interés por presentar un amplio espectro contra bacterias y hongos, el cual la eficiencia de este elemento depende de las condiciones del medio ambiente, la concentración de iones y el tipo de microorganismo a combatir. Dada la efectividad del cobre contra organismos patógenos asociados con enfermedades de plantas, ha sido utilizado ampliamente en el sector agropecuario en forma de pesticida desde ya hace bastante tiempo y hoy en día como promotor de crecimiento vegetal.

Por otro lado, el cobre desempeña un papel vital ya que es considerado uno de los metales más importantes en las tecnologías modernas. Las nanopartículas de cobre han sido sintetizadas por diversas técnicas a partir de las cuales se puede tener control en el tamaño y morfología de estas, los parámetros más importantes a considerar son la relación molar, temperatura, pH, velocidad de agitación, entre otros. Asimismo, existen diversos métodos de obtención de nanopartículas entre los que se encuentran: micro emulsión, deposición al vacío, método de polirol, descomposición térmica, entre otros más.

2.8. Funciones del cobre en las plantas y semillas

El cobre es un elemento que se requiere en cantidades muy pequeñas para el buen desarrollo y salud de las plantas. Se le conoce como "microelemento" (Richter, G.1980). Es así como el cobre se necesita solo en trazas, pero es por completo esencial por formar parte de diversas enzimas aportando citocromo-oxidasa, que estimula la oxidación respiratoria final. Para tal efecto las plantas la mayor parte del cobre se encuentra combinado con las proteínas, ejemplos de estos catalizadores orgánicos son la tirosinasa, la lacasa y la oxidasa ascórbica (Richter, 1980). El cobre está presente en los cloroplastos, desempeñando un papel esencial en la fotosíntesis de la cual depende la agricultura y, por lo tanto, todos los tipos de vida animal y humana (Fueyo, 1986). La planta toma del suelo el cobre que necesita, bien en estado iónico o en cualquier otra forma de cobre soluble. Una pequeña cantidad de cobre en el suelo (4 partes por millón de suelo seco), es suficiente para satisfacer las necesidades de la mayoría de las plantas cultivadas. Si el cobre "útil" es menor, generalmente se producen cambios fisiológicos en la planta, cuya intensidad depende de la magnitud de la deficiencia. Además, todas las plantas, incluidos arbustos y árboles, expresan rápidamente la falta de cobre; la mayoría de los cereales como la avena, la cebada y el trigo, son especialmente sensibles (Fueyo, 1986). Al mismo tiempo, el tomate, el tabaco y la cebolla son menos sensibles. Entre los frutales, los ciruelos, los papayos, los manzanos y los perales son muy sensibles a la falta de cobre. Dicho de otro modo, es difícil diagnosticar las carencias de cobre con la simple observación exterior de la planta, por lo que, muchas veces el trastorno observado puede no ser debido a la simple carencia de cobre útil, sino estar complicada con la falta o exceso de otros microelementos. Un ejemplo es la carencia de manganeso, o eventualmente anormal exceso de molibdeno en el suelo. Además, las necesidades mínimas de cobre de las diferentes especies de plantas no son las mismas, variando también en los diferentes estados de desarrollo (Trocme y Gras, 1985).

2.9. Deficiencia y toxicidad del cobre

La concentración de Cu en el suelo presenta una amplia variación, encontrándose concentraciones menores de $5 \mu\text{g g}^{-1}$ en países como Bélgica, Croacia o Grecia, mientras que valores superiores a $100 \mu\text{g g}^{-1}$ se han encontrado en países como Italia, Noruega o España (Heijerick *et al.*, 2006). El Cu se encuentra principalmente de manera insoluble en los suelos, adsorbido a arcilla, o materia orgánica, lo que se ve incrementado en suelos alcalinos, que representan aproximadamente el 30% de los suelos del mundo (Bradl, 2004; Palmer y Guerinot, 2009). Es por esta razón que, en el medio ambiente, la deficiencia de Cu es más común que la toxicidad, aunque en condiciones de campo, es poco frecuente la deficiencia de un solo elemento, siendo más común que la deficiencia sea múltiple (Barceló *et al.*, 2001). La cantidad de Cu presente en los tejidos fotosintéticos de las plantas se encuentra en el rango de $5\text{--}20 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, dependiendo de la especie. Este amplio rango de Cu en las plantas sugiere una necesidad variable de Cu por parte de éstas (Fernández y Henríquez, 1991; Marschner, 1995).

2.10. Deficiencia de cobre

Tanto la deficiencia de Cu como la toxicidad pueden ocasionar daños en las plantas, apreciables por la aparición de síntomas característicos. Una cantidad insuficiente de Cu en las plantas puede producir fenómenos que afectan, en primer lugar, a los tejidos jóvenes y reproductivos; posteriormente las plantas sometidas a deficiencia de Cu sufren una reducción en el crecimiento, clorosis de las hojas jóvenes, curvatura de los márgenes de las hojas, daño en los meristemos apicales, disminución de la formación de frutos, defectos en la pared celular, disminución del desarrollo y viabilidad del polen y desarrollo embrionario incorrecto (Dell, 1981; Barceló *et al.*, 2001; Burkhead *et al.*, 2009). La deficiencia de Cu produce también una reducción de la actividad fotosintética y aumento de la movilización y adquisición de Cu. Otro de los problemas derivados del desequilibrio nutricional, es

el hecho de que la deficiencia de Cu puede causar el exceso relativo de otros metales en la célula y, consecuentemente, las proteínas que carecen de su cofactor nativo son susceptibles de incorporar un metal incorrecto (López-Maury et al., 2012; Blaby-Haas y Merchant, 2014).

2.11. Exceso de cobre

No obstante, el Cu también puede aparecer en exceso en el suelo de determinadas áreas. Los metales pesados se encuentran de manera natural en el suelo y éstos pueden aparecer en niveles tóxicos de manera inherente o debido a actividades antrópicas como la minería o el uso excesivo de fertilizantes y fungicidas (Fernández y Henriques, 1991; White y Brown, 2010; Wuana y Okieimen, 2011). El exceso de Cu puede producir una reducción en la biomasa de la parte aérea y radicular de las plantas (Wojcik y Tukiendorf, 2003; Lequeux et al., 2010), clorosis y necrosis de las hojas (Drazkiewicz y col., 2004; Bouazizi et al., 2010), disminución de la viabilidad de las células de la raíz (Rodrigo-Moreno et al., 2013), rediseño del sistema radicular, alteración del patrón de auxinas, cambios en la deposición de lignina (Lequeux et al., 2010) e inhibición de la germinación. El exceso de Cu también afecta a la actividad fotosintética (Yruela, 2013), causa peroxidación de lípidos, daños en el ADN y proteínas, afecta a la adquisición de otros nutrientes esenciales (Adrees et al., 2015) y favorece la producción de ROS y estrés oxidativo (Yruela, 2009; Chaffai y Koyama, 2011; Sethy y Ghosh, 2013). Las especies de oxígeno parcialmente reducidas se producen cuando el oxígeno molecular acepta electrones de otras moléculas (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004; Ravet y Pilon, 2013). Las zonas de mayor generación de ROS son los centros de reacción del Fotosistema I (PSI) y el Fotosistema II (PSII) en los tilacoides (Asada, 2006). Algunos procesos dependientes de Cu reducen el oxígeno a superóxido (O_2^-) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2), moléculas que tienen, por sí mismas, una citotoxicidad limitada, pero que pueden ser sustratos para la producción de radicales hidroxilos (OH^-), que no pueden ser eliminados enzimáticamente y son los mayores responsables del daño oxidativo en los sistemas biológicos (Robinson y Winge, 2010; Ravety Pilon, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Con coordenadas 25° 23' 42'' de latitud norte, 100° 50' 57'' de longitud oeste y a una altitud de 1742 msnm en Buenavista; Saltillo, Coahuila, México durante el ciclo primavera-verano 2020.

3.2 Material genético

En esta investigación se utilizó semillas de un híbrido comercial de maíz (*Zea mays*).

3.3 Aplicación de nanopartículas, imbibición y germinación

El experimento consistió en el establecimiento de un bioensayo con el fin de determinar el efecto de las NPs de óxido de cobre con un tamaño de 40-60 nm (NPsCuO), en la germinación, desarrollo de plántula, contenido de clorofila y acumulación de biomasa. Para cada concentración (0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ppm), se contaron 700 semillas de maíz, cien por cada tratamiento (4 repeticiones de 25 semillas) establecido en cajas de Petri. La preparación de las suspensiones de NPsCuO consistió en pesar el producto de acuerdo en la concentración deseada en una balanza analítica (AND modelo HR-200), posteriormente se depositaron las NPsCuO en tubos tipo Falcon con tapa de rosca, aforando con agua destilada a 50 ml. Enseguida los tubos Falcon fueron ultrasonificados en un equipo Ultrasonic Cleaner (AS2060B), por dos tiempos de 15 minutos para homogeneizar la suspensión con NPsCuO. Al concluir con el proceso de sonicación, se acomodaron

las semillas de acuerdo a cada tratamiento, realizando la aplicación de 15 ml de suspensión de NPsCuO. Posteriormente las cajas de Petri fueron ubicadas en una cámara bioclimática a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa de 50% y un fotoperiodo de 16/8 h luz/obscuridad, durante 24h.

Una vez transcurrido este tiempo, se sembraron las 4 repeticiones de 25 semillas de maíz de cada tratamiento, sobre el papel Anchor humedecido con agua destilada, en línea y de forma horizontal, con el embrión en la misma dirección. Después de la siembra de la semilla, se cubrió con un pliego más de papel previamente humedecido, enrollando ambos para formar un taco. Las 4 repeticiones de cada tratamiento se colocaron en posición vertical, dentro de un recipiente de plástico, y este en una cámara de germinación, a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa 50% y un fotoperiodo de 16/8 h luz/obscuridad.

3.4. Variables evaluadas

El primer conteo se realizó al cuarto día después de iniciar el proceso de imbibición, determinando la variable **Vigor de Germinación (Vigor)**, para lo cual se contaron todas las plántulas normales, esto es, que desarrollaron plúmula y radícula normal, y que ambas estructuras median de manera independiente 2 cm o más. Esta variable se expresó en porciento.

Germinación (Capacidad germinativa): correspondió al segundo conteo al séptimo día; realizando un conteo de plántulas normales, considerando a aquellas que presentaban todas las estructuras bien desarrolladas y se expresó en porciento.

Plántulas de alto vigor (PAV): En esta variable se cuantificaron las plántulas normales que sobresalieron en su crecimiento, que presentaron un sistema apical bien desarrollado, al igual que el sistema radicular, incluyendo la primer y segunda hoja.

Plántulas de bajo vigor (PBV): se consideraron aquellas plántulas normales, que presentaron sus estructuras bien desarrolladas, sin embargo, con un menor crecimiento.

Plántulas Anormales (PA): Para esta variable se tomaron en cuenta las plántulas que no lograron desarrollar alguna de las estructuras esenciales, limitando su óptimo crecimiento.

Semillas sin Germinar (SSG): Semillas que no presentaron indicios de emergencia de raíz o tallo (coleóptilo).

Longitud de Plúmula y de Radícula (LP) y (LR): Para determinar estos parámetros, se midió cada una de las estructuras y se reportó en centímetros (cm), estas dos variables se consideran un indicativo del vigor de plántula.

Peso seco de plúmula (PSP) y de radícula: Cada plántula normal (de alto y de bajo vigor), se separaron con un bisturí en plúmula y en radícula, y se pusieron en bolsas de papel estraza perforadas e identificadas, luego se sometieron a una temperatura de 70°C durante un periodo de 24 horas en una estufa marca RIOSA modelo H-24, posteriormente se colocaron en un desecador para evitar que la humedad del ambiente afectara el valor real, en seguida se pesó cada repetición en una balanza analítica (AND modelo HR-200), para conocer el valor del peso seco representado en mg plúmula⁻¹ y mg radícula⁻¹.

Determinación de clorofila a, b y total.

Para la determinación de la clorofila se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Hiscox e Israelstam (1979), consistió en cortar finamente hojas en tiras de 0.5 cm², posteriormente se pesaron 0.5 g de muestra y se maceraron en un mortero adicionando 5 ml de solución de acetona al 80%, hasta extraer toda la clorofila de la muestra. En seguida se colocó cada muestra en un tubo para centrifuga, y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, se separó el sobrenadante

que contenían los pigmentos, se ajustó cada tubo a 6 ml con acetona al 80%, se tomó 0.5 ml del sobrenadante de cada uno de los extractos y se diluyó hasta 5 ml con acetona al 80%. Se midió en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 645 y 663 nm utilizando una muestra de acetona al 80% como blanco. Los análisis fueron realizados por duplicado. Para la determinación de clorofila a, b y total se utilizaron las ecuaciones descritas por Arnon (1949), usando los coeficientes de absorción específicos dados por Mackinney (1941) estas fueron:

$$\text{Clorofila A} = (12.7 \times \text{Abs } 663) - (2.69 \times \text{Abs } 645)$$

$$\text{Clorofila B} = (22.9 \times \text{Abs } 645) - (4.68 \times \text{Abs } 663)$$

$$\text{Clorofila Total} = (20.2 \times \text{Abs } 645) + (8.02 \times \text{Abs } 663)$$

3.5. Diseño experimental.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar, con 7 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento, después se llevó a cabo, una comparación de medias con la Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), para lo cual se utilizó el paquete estadístico SAS Institute (2004).

Modelo estadístico

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

Dónde:

Y_{ij} = Valor observado

μ = Media

τ_i = Efecto de los tratamientos

ε_{ij} = Error experimental

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza del bioensayo de germinación y de vigor en semilla de maíz (*Zea mays*), tratadas con NPsCuO, para la fuente de variación concentración, los resultados mostraron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para las variables plántulas de alto vigor, plántulas de bajo vigor, longitud de plúmula, longitud de radícula y peso seco de radícula, mientras que para las variables vigor de germinación y peso seco de plúmula indicaron diferencia significativas ($P < 0.05$). Las variables porcentaje de germinación, plántulas anormales y semillas sin germinar, no presentaron diferencias estadísticas significativas (Cuadro 1).

Estos resultados muestran que la aplicación de NPsCuO influyó en la respuesta de algunas de las variables evaluadas en este bioensayo, teniendo relación directa con el proceso de germinación. Más adelante en el escrito, al revisar la comparación de medias, se tendrá certeza en cuanto a la respuesta a la aplicación de NPsCuO a semillas, en diferentes concentraciones.

Importante es destacar que el vigor de las semillas es el conjunto de propiedades que determinan la actividad y desempeño en la germinación y el crecimiento favorable de las plántulas en lotes de semillas. Navarro (2009) indica que el vigor es considerado como la interacción que tienen las propiedades bióticas y abióticas que poseen un efecto en las semillas, además de que determina su comportamiento a través del tiempo, y el nivel de actividad que presentan. Es por eso por lo que el vigor no puede ser desvinculado como parte esencial de la calidad de semillas.

En el Cuadro 2 se incluyen los cuadrados medios del análisis de varianza para las variables contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total.

Cuadro 1. Cuadrados medios de análisis de varianza para variables evaluadas en bioensayo de semillas de maíz tratadas con NPsCuO.

F.V.	GL	VIGOR (%)	GER (%)	PAV (%)	PBV (%)	PA (%)	SSG (%)	LP (cm)	LR (cm)	PSP mg/plúmula	PSR mg/plúmula
CONCENTRACIÓN	7	211.30*	15.49ns	1587.30**	1503.49**	5.33ns	22.60ns	4.80**	13.12**	11.80*	25.05**
ERROR	14	49.52	10.66	88.38	99.80	7.61	8.38	0.65	1.31	2.18	2.87
CV %		9.32	3.48	13.16	44.82	103.50	79.99	4.97	6.67	4.44	9.43

** = Altamente significativo ($P \leq 0.01$); * = Significativo ($P \leq 0.05$); ns= No significativo; F.V.= Fuente de variación; GL= Grados de libertad; CV= Coeficiente de variación; GER=Germinación; PAV= Plántulas de alto vigor; PBV= Plántulas de Bajo vigor; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; LP= Longitud de plúmula; LR= Longitud de radícula; PSP= Peso seco de plúmula; PSR= Peso seco de radícula.

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza de variables evaluadas en bioensayo para determinar clorofilas en plántulas derivadas de semillas tratadas con NPsCuO.

FV	CLO a (µg/g)	CLO b (µg/g)	CLO T (µg/g)
CONC	479.9*	5760.58**	7516.29**
ERROR	118.7	714.85	564.72
CV %	6.78	8.41	4.96

** = Altamente significativo ($P \leq 0.01$); * Significativo ($P \leq 0.05$); FV = fuente de variación, CLO a = clorofila A, CLO b = clorofila B, CLO T = clorofila total.

Se observaron diferencias significativas en las respuestas de las hojas procedentes de plántulas obtenidas de semillas tratadas con las NPsCuO, para ambos pigmentos, clorofila a) y clorofila b), así como para clorofilas totales. Esto indica que las NPsCuO modificaron el metabolismo de síntesis de estos pigmentos. Es conocido que el cobre es un micronutriente esencial para el crecimiento y reproducción de las plantas, permite una correcta acción del magnesio que forma la clorofila, por lo tanto, tiene influencia en la fotosíntesis. La diferencia entre ambas clorofilas es que, la clorofila a presenta un grupo metilo (-CH₃) en el perímetro del anillo tetrapirrólico, mientras que en Clorofila b, este grupo ha sido oxidado para formar un grupo formol (-CH=O), también conocido como grupo formilo. Esta diferencia permite que las clorofilas a y b absorban luz de longitudes de onda ligeramente diferentes dentro del espectro visible. La clorofila es sintetizada en el cloroplasto.

En el Cuadro 3 se presenta la comparación de medias para las variables evaluadas en el bioensayo de semillas tratadas con NPsCuO.

Cuadro 3. Comparación de medias de variables evaluadas en bioensayo de germinación, desarrollo de plántula y acumulación de materia seca, con la aplicación de NPsCuO a semillas durante la imbibición.

Concentración (ppm)	VIGOR (%)	GER (%)	PAV (%)	PBV (%)	PA (%)	SSG (%)	LP (cm)	LR (cm)	PSP mg/plúmula	PSR mg/plúmula
0	59 b	93 a	41 b	52 a	1 a	6 a	14.30 c	13.76 c	28.62 b	11.00 b
50	79 a	96 a	93 a	2 b	1 a	4 a	17.72 a	20.82 a	34.28 ab	20.91 a
100	73 ab	96 a	80 a	16 b	4 a	0 a	16.86 ab	17.43 b	31.96 ab	18.33 a
250	84 a	93 a	89 a	4 b	3 a	3 a	15.82 abc	17.74 ab	35.15 a	21.40 a
500	76 ab	95 a	87 a	8 b	4 a	1 a	16.53 abc	17.54 b	35.95 a	20.03 a
750	83 a	89 a	72 a	17 b	3 a	8 a	17.63 a	16.40 bc	33.79 ab	17.12 ab
1000	75 ab	93 a	37 b	56 a	2 a	5 a	15.19 bc	16.70 bc	32.99ab	16.93 ab
Media	75	94	72	22	2	4	16.29	17.19	33.24	17.96
Tukey (P=0.05)	19.62	9.1	26.21	27.85	7.69	8.07	2.26	3.19	5.86	6.71

ppm = partes por millón; GER=Germinación; PAV= Plántulas de alto vigor; PBV= Plántulas de Bajo vigor; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; LP= Longitud de plúmula; LR= Longitud de radícula; PSP= Peso seco de plúmula; PSR= Peso seco de radícula.

En la variable vigor de germinación, que se refiere a la velocidad con la que germinan las semillas una vez que imbiben agua, se observó que al tratar las semillas con NPsCuO a 50 ppm, se incrementó considerablemente el porcentaje, aumentando de 59 a 79 %. Con el resto de los tratamientos se obtuvo una respuesta estadísticamente igual al tratamiento con 50 ppm. Por lo tanto, el vigor de germinación es una variable que responde favorablemente a este tratamiento, posiblemente mejorando la actividad de algunas enzimas, como las oxidasas, además el cobre es un poderoso antioxidante (Marschner, 2012).

En cuanto al porcentaje de germinación, no se observaron diferencias estadísticas, pero si numéricas, las concentraciones de 50 y 100 ppm, presentaron el mayor valor con 96 %, seguido de las concentraciones de 1000 ppm (95 %), mientras que la respuesta más baja fue con 750 ppm, con 89 % de germinación.

Las plántulas normales se clasificaron como de alto y de bajo vigor. En cuanto a las de alto vigor, la concentración de 50 ppm fue la que presentó el valor más alto con 93 % y el más bajo fue 37 % con la concentración de 1000 ppm, de esta manera se observó que las NPsCuO también pueden tener un efecto de toxicidad (1000 ppm). Exceso de cobre puede inhibir el crecimiento de la planta, causar un daño oxidativo a las células e interferir con el proceso de fotosíntesis. Cuando se encuentra en exceso, el cobre puede reemplazar al Mg^{+2} en la molécula de clorofila, e interferir en la fotosíntesis. La toxicidad por exceso de cobre puede causar interacciones antagónicas con otros nutrientes, como manganeso y zinc (Marschner, 2012).

Para la variable plántulas de bajo vigor, el valor más alto se mostró con 1000 ppm, (53 %), asimismo el valor más bajo (3 %) se observó con 50 ppm. Los síntomas de toxicidad pueden incluir además de retraso en el crecimiento, inhibición del crecimiento radicular e inhibición del crecimiento de los brotes (Marschner, 2012).

La variable plántulas anormales no reportó diferencias estadísticas, pero si numéricas, el menor porcentaje lo obtuvo el testigo con 50 ppm con 1 %, se observó que al aumentar la concentración de NPsCuO, se incrementó la tasa de plántulas anormales, los porcentajes más altos se obtuvieron con la concentración de 100 y

500 ppm, con un 4 %, las demás concentraciones se mantuvieron entre estos valores. Como se indicó anteriormente, altas concentraciones de Cu^{+2} , inhiben el crecimiento de brotes, y reducen el crecimiento de la radícula.

Igualmente, para la variable semillas sin germinar no hubo diferencias estadísticas, pero si diferencias numéricas, el mayor porcentaje se obtuvo en la concentración de 750 ppm con un 8 %, y 0 % con la concentración de 100 ppm.

Con relación a la variable longitud de plúmula, la comparación de medias indicó que la concentración de 50 ppm originó mayor crecimiento con 17.72 cm, mientras que el testigo originó menor longitud, con 14.30 cm. El resto de los tratamientos resultaron ser estadísticamente iguales a 50 ppm, excepto el de 1000 ppm, que redujo en gran medida el crecimiento. De acuerdo con INTAGRI (2020), el Cu^{+2} , incrementa el crecimiento de los cultivos.

La longitud de radícula es una característica de gran importancia para el productor, por lo que, a mayor longitud, mayor será la capacidad de absorción de agua y de nutrientes por la plántula, lo que facilita el trasplante, tanto en la agricultura protegida como a campo abierto. La concentración de 50 ppm obtuvo la mayor longitud con 20.82 cm, mientras que la concentración de 250 ppm obtuvo el segundo lugar con 17.74 cm; sin embargo, las concentraciones 500, 100, 1000, 750 y testigo ppm, se mantuvieron, con valores de 17.54, 17.43, 16.70, 16.40 y 13.76 cm, respectivamente.

En la variable peso seco de plúmula, se obtuvieron los siguientes resultados, tratar las semillas con 500 ppm tuvo el mayor peso, con 35.95 mg/plántula, seguido de la concentración de 250 ppm con 35.15 mg/plántula, sin embargo, el testigo obtuvo el menor valor con 28.62 mg/plántula, y las demás concentraciones presentaron valores intermedios, pero estadísticamente iguales a 50 ppm. Las NPsCuO presentaron efecto positivo en la variable de peso seco de plántula con 250 y 500 ppm, y fueron estadísticamente diferentes al testigo.

La variable peso seco de radícula obtuvo con la concentración de 250 ppm, la mayor acumulación de materia seca (21.40 mg/radícula), seguido la

concentración de 50 ppm con 20.91 mg/ plántula. Sin embargo, todos los tratamientos excepto el testigo, resultaron estadísticamente iguales. En tal sentido, el testigo obtuvo el menor valor con 11.00 mg/ plúmula, y las demás concentraciones presentaron valores más altos.

El cobre es un metal esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas. El contenido en sus tejidos es de $10 \mu\text{g}^{-1}$, participa en procesos bioquímicos como la fotosíntesis, respiración, respuesta al estrés oxidativo, metabolismo de la pared celular y señalización de hormonas, cofactor de varias enzimas como la superóxido dismutasa, citocromo oxidasa, amino oxidasa, lacasa, plastocianina y polifenol oxidasa, además juega un papel esencial de señalización de transcripción y tráfico de proteínas (Yruela, 2005).

Los resultados de las comparaciones de medias para las variables clorofila a, b y total, con la aplicación de NPsCuO en diferentes concentraciones, mostraron resultados estadísticamente significativos. Para clorofila a, el valor más alto se observó con 750 ppm 179.82 $\mu\text{g/g}$, por otro lado, el testigo obtuvo 144.57 ($\mu\text{g/g}$) de clorofila, siendo la más baja de todas las concentraciones.

Cuadro 4. Comparación de medias de variables evaluadas en bioensayo para determinar clorofilas, en plantas obtenida de semillas tratadas con NPsCuO.

CONCENTRACION (ppm)	CLO a ($\mu\text{g/g}$)	CLO b ($\mu\text{g/g}$)	CLO T ($\mu\text{g/g}$)
0	144.57 b	248.33 c	392.77 c
50	169.03 a b	393.85 a	562.68 a
100	167.32 a b	320.21 a b c	487.36 b
250	153.26 a b	332.33 a b	485.41 b
500	162.79 a b	324.29 a b	486.91 b
750	179.82 a	293.04 b c	472.7 b
1000	148.01 b	311.48 b c	459.33 b
Media	146.29	279.905	426.05
Tukey (P=0.05)	30.37	74.54	66.25

ppm = partes por millón, CLO a = clorofila a, CLO b = clorofila b, CLO T = clorofila total.

La clorofila b, resultó más alta (393.85 µg/g) con la concentración de 50 ppm de NPsCuO, esto indica que, a menor concentración, mayor cantidad de clorofila se sintetiza, seguido de 250 ppm con 332.33 µg/g. El resultado más bajo se observó en el testigo con 248.33 µg/g de clorofila.

Para la variable clorofila total, tratar las semillas con 50 ppm NPsCuO resultó en superior contenido de clorofila (562.68 µg/g), y estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. Por otro lado, la concentración más baja fue el testigo con 392.77 µg/g de clorofila, las demás concentraciones presentaron valores intermedios.

El contenido de clorofila en las hojas es un parámetro muy útil para evaluar el estado fisiológico de las plantas. Todas las hojas verdes presentan mayor capacidad de absorción en el rango de 400 - 700 nm, en donde sucede la transmisión de electrones entre clorofilas y carotenos (Zhang et al. 2007). Por otra parte, la clorofila tiene una función primordial, absorber energía lumínica, que depende en gran medida de la concentración de clorofila y de otros pigmentos accesorios. Pero también depende de la cantidad de luz disponible y de la calidad de esta, esto es, que contenga suficiente radiación comprendida en la banda de absorción. El cobre (Cu) es un micronutriente fundamental para las plantas. Su actividad principal se desarrolla en el campo de las enzimas, aunque también forma parte de la plastocianina contenida en los cloroplastos, y participa en la cadena transportadora de electrones en la fotosíntesis (Dominguez, 1997).

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que la aplicación de NPsCuO a semillas de maíz durante el proceso de imbibición, modifica la respuesta fisiológica del proceso germinativo, principalmente a través de las variables vigor de germinación, plántulas de alto vigor, longitud de plúmula, longitud de radícula, peso seco de radícula y de plúmula, así como el contenido de clorofilas.

Una mejor respuesta, en comparación con el testigo, se obtuvo al aplicar a semillas 50 ppm NPsCuO durante el proceso de imbibición, resultando en mayor expresión de vigor, indicado por la velocidad de germinación, el mejor desarrollo de plántulas (raíz y plúmula) y mejor peso seco de plúmula y de radícula.

El contenido de clorofila a fue superior al tratar semillas con 750 ppm, sin embargo, estadísticamente igual a 50 ppm. Por otra parte, para clorofila b y clorofila total, plántulas desarrolladas de semillas tratadas con 50 ppm de NPsCuO, superaron estadísticamente al testigo y al resto de los tratamientos.

Este estudio permite concluir sobre la importancia del cobre en procesos fisiológicos relacionados con el proceso germinativo, principalmente como cofactor de enzimas.

VI. LITERATURA CITADA

- Alam, M. N., Roy, N., Mandal, D., and Begum, N. A. 2013. Green chemistry for nanochemistry: exploring medicinal plants for the biogenic synthesis of metal NPs with fine-tuned properties. RSC Adv. 3:11935-11956.
- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Zia-Ur-Rehman, M., Irshad, M. K., and Bharwana, S. 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. Environ Sci Pollut Res Int. (22):8148-8162.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant. Physiol. 141(2):391-396.
- Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B., Sánchez, R. 2001. Fisiología vegetal, pp 566. Ediciones Pirámide, Madrid.
- Begum, N., Sharma, B., and Pandey, R. S. 2010. Evaluation of insecticidal efficacy of *Calotropis procera* and *Annona squamosa* ethanol extracts against *Musca domestica*. Journal of Biofertilizers and Biopesticides. 1:101-109.
- Betancourt, R., Reyes, P. Y., Puente, B., Ávila-Orta, C., Rodríguez, O., Cadenas, G., Lira-Saldívar, R. H. and García-Cerda, L. A. 2013. Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. Journal of Nanomaterials. 1:980545, pp. 5.
- Disponible en:
http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/5/2013/anuales/anu_1070-6-2014-05-1.pdf. (Citado: Marzo, /2016).
- Bradl, H. 2004. Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. J. Colloid. Interface. Sci. 277(1):1-18.
- Dell, B. 1981. Male sterility and anther wall structure in copper-deficient plants. Ann. Bot. 48(5):599-608.
- Díaz del Castillo, R. F. 2012. Introducción a los nanomateriales. Lecturas de ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 79 p.
- Domínguez, A. 1997. Tratado de Fertilización. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

- Drazkiewicz, M., Skorzynska-Polit, E., and Krupa, Z. 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals*. 17(4):379-387.
- Dubey, A., and Mailapalli, D. R. 2016. Nanofertilizers, nanopesticides, nanosensors of pest and nanotoxicity in agriculture. En Lichtfouse, E. (ed.), *Sustainable Agriculture Reviews* (pp. 307-330). Springer International Publishing.
- Fernandez, J. C, and Henriques, FS. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57(3):246-273.
- Fueyo, McD, J., 1986, Apuntes de "El cobre en la agricultura" Cuproquim de México, S.A. de C.V., 7 páginas.
- Gutiérrez, G. L., Hernández Jiménez, M. J., y Molina, B. L. 2013. Daños para la salud tras exposición laboral a nanopartículas. *Medicina y Seguridad del Trabajo*. 59(231):276-296.
- Ghormade, V., Deshpande, M. V., and Paknikar, K. M. 2011. Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances*. 29:792–803.
- Heijerick, D. G., Van, S., P. A., and Van, H. A. D. 2006. Ambient copper concentrations in agricultural and natural European soils: An overview. *Environ Toxicol Chem.* 25(3):858-864.
- Hiscox, J. D., and Israelstam, G. F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*. 57:1332-1334.
- INTAGRI. 2020. El cobre en la nutrición vegetal. *Serie nutrición vegetal*.135:1-5.
- Lateef, A., Nazir, R., Jamil, N., Alam, S., Shah, R., Khan, M., and Saleem, M. 2016. Synthesis and characterization of zeolite based nano-composite: An environment friendly slow release fertilizer. *Microporous and Mesoporous Materials*. 232:174-183.
- Lequeux, H., Hermans, C., Lutt, S., and Verbruggen, N. 2010. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant. Physiol. Biochem.* 48(8):673-682.

- Lira Saldívar, R. H., A. Hernández., L. A. Valdez, A. Cárdenas, L. Ibarra, M. Hernández, N. A. Ruiz Torres. 2014. *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradices* co-inoculation stimulate growth and yield of cherry tomato under shade house conditions. *Phyton International Journal of Experimental Botany*. 83: 133-138.
- León, J. y Sepúlveda, G. 2012. El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta antioxidante de las plantas. *Interciencia*. 37(11):805811.
- López-Maury, L., Giner-Lamia, J., and Florencio, F. J. 2012. Redox control of copper homeostasis in cyanobacteria. *Plant Signal Behav*. 7(12):1712-1714.
- Marschner, H. 2012. *Mineral Nutrition of higher plants*. Academic Press, San Diego. 651 p.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 7(9):405-410.
- Navarro, M. 2009. Interactive behavior of germination, dormancy, emergence and initial growth as biological attributes to evaluate the vigor of the seeds of *Albizia lebeck* L. Benth. PhD Thesis. Agrarian University of Havana. Cuba. p.101.
- Richter, G. 1980. *Fisiología del metabolismo de las plantas*, Ed. Cecsa, páginas 137, 263 -280.
- Robinson, N. J., and Winge, D. R. 2010. Copper metallochaperones. *Annu. Rev. Biochem*. 79:537-562.
- Rodrigo-Moreno, A., Andrés-Colés, N., Poschenrieder, C., Gunse, B., Peñarrubia, L., and Shabala, S., 2013. Calcium and potassium permeable plasma membrane transporters are activated by copper in *Arabidopsis* root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant. Cell. Environ*. 36(4):844-855.
- Rojas G, M. 1982, *Fisiología vegetal aplicada*, Ed. Me Graw Hill, pp. 103 - 105.
- Srilatha, B. 2011. Nanotechnology in Agriculture. *J. Nanomedic Nanotechnol*. 2:123-128.
- Tarafdar, J. C., Xiang, Y., Wang, W. N., Dong, Q., and Biswas, P. 2012. Standardization of size, shape and concentration of nanoparticle for plant application. *Applied Biological Research*. 14(2):138-144.

- Trocme y Gras, 1985, Suelo y fertilización en agricultura, Ed. Mundi-Prensa.
- Wojcik, M., Tukiendorf, A. 2003. Response of wild type of *Arabidopsis thaliana* to copper stress. *Biol. Plantarum*. 46(1):76-84.
- Yruela, I. 2005. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(1):145-156.
- Yruela, I. 2013. Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*. 5(9):1090-1109.
- Yruela, I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct. Plant. Biol.* 36(5):409-430.
- Zhang, Y., Chen, J. M. and Thomas, S. C. 2007. Retrieving seasonal variation in chlorophyll content of over story and understory sugar maple leaves from leaf-level hyperspectral data. *Can. J. Remote Sensing*. 33(5):406-415.