

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Respuestas Fisiológicas en Semillas de Rábano (*Rhapanus sativus*) y Maíz (*Zea mays* L.) Promovidas por el Efecto de Nanopartículas de Hidroxiapatita

Por:

ALEJANDRA YATZIRI ARROYO GUZMÁN

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Respuestas Fisiológicas en Semillas de Rábano (*Rhapanus sativus*) y Maíz (*Zea mays* L.) Promovidas por el Efecto de Nanopartículas de Hidroxiapatita

Por:

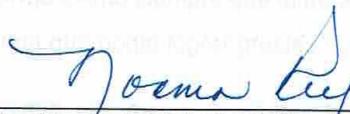
ALEJANDRA YATZIRI ARROYO GUZMÁN

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dra. Norma Angélica Ruiz Torres
Asesor Principal


Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar
Coasesor


M.C. Myrna Julieta Ayala Ortega
Coasesor


Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2019

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: por la vida, por siempre estar en mi camino y nunca abandonarme, por darme las herramientas necesarias, por iluminarme siempre y darme la fortaleza de seguir adelante, gracias por cruzar a gente excepcional en mi camino.

A MI MADRE: Alejandra Guzmán Gutiérrez

Gracias infinitas por tu apoyo incondicional, porque sin ti este proyecto no hubiese sido posible, por todo el soporte en esta etapa tan maravillosa, gracias por nunca abandonarme y siempre estar para mí, gracias por tu amor.

A MI HERMANA: Aurea Guadalupe Arroyo Guzmán

Por ser mi motor de vida, mi cómplice, mi compañera, mi ejemplo, mi mayor motivación y orgullo, por darme animo siempre que lo necesitaba, por confiar en mí incluso más de lo que yo creía que podía lograr gracias.

A MIS ABUELOS MATERNOS (†): Aurea Gutiérrez Sánchez y Abel Guzmán Michel

Por ser mis ángeles y nunca dejarme caer, gracias por darme el gusto y la pasión por la agronomía. A pesar de que no están físicamente, sé que en cada paso ustedes siempre están conmigo.

A mis **Familiares** por confiar en mí y darme el soporte de salir adelante, que a pesar de la distancia siempre estuvieron al pendiente de mí.

A mis **Amigos y Compañeros** me es imposible nombrar a todos ya que cada uno de ustedes formaron parte de esta maravillosa experiencia que es la universidad, gracias por cada momento que vivimos juntos, las risas, los sustos, los enojos, los bailes, y todos los recuerdos inolvidables que marcaron mi vida, son la familia que elegí.

A **J. Alejandro Gutiérrez Martínez** por estar conmigo en todo momento a pesar de la distancia, por tu apoyo y tus palabras de aliento, por formar parte fundamental en mi vida y por creer en mí.

A mi **ALMA MATER Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por brindarme la oportunidad de desenvolverme en el ámbito profesional a nivel nacional e internacional.

Al **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)** por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto y por todas las facilidades concedidas durante el proceso.

A la **Dra. Norma Angélica Ruiz Torres** por darme la oportunidad y la confianza de realizar este trabajo de investigación, por su paciencia, sus consejos, por alentarme a no rendirme y por el tiempo que me brindó para lograr llevar acabo esta tesis hasta el final.

Al **Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar** por su apoyo y asesoría incondicional durante este tiempo Gracias por sus precisas aportaciones para el desarrollo de esta tesis.

A la **M.C. Myrna Julieta Ayala Ortega** por su disposición a compartir su experiencia y poder llevar acabo la evaluación de este proyecto.

A MIS MAESTROS:

Porque con sus conocimientos y experiencias contribuyeron a mi formación moral y profesional, dándome las herramientas necesarias para desarrollarme en el mercado laboral. Gracias infinitas por todo su apoyo y vocación de servicio.

DEDICATORIA

A DIOS: por sostenerme en cada momento, por ser mi guía y protector, por darme la fortaleza y por iluminarme en todo momento.

A MI EQUIPO DE TRES:

Mi mamá

Alejandra Guzmán Gutiérrez

A ti mamita te dedico este proyecto, lleno de ilusiones, por darme la oportunidad de salir y emprender vuelo, sin ti no hubiese sido posible, por ser mi fiel compañera en todos mis errores y aciertos, por confiar y creer en mí. Te dedico este logro porque también es tuyo fue gracias a tu apoyo incondicional que logramos el objetivo.

Te amo Guzmán.

Mi hermanita

Aurea Guadalupe Arroyo Guzmán

A ti hermanita, te dedico este logro por siempre tener las palabras de apoyo y llenarme de anhelos, por demostrarme que, si se puede, por ser la mejor hermana del mundo, por ser increíble y maravillosa, por estar siempre a mi lado, por apoyarme y respetar mis decisiones, por nunca dejarme caer, por creer en mí y luchar conmigo cada batalla para conseguir este sueño, por acompañarme en todo momento, y sobre todo por llenar mi vida de alegría, amor, cariño, confianza, bondad y enseñarme que la perseverancia es lo que me ayudará a llegar lejos.

Te amo con todo mí ser hermanita.

TABLA DE CONTENIDO

ÌNDICE DE CUADROS.....	iii
ÌNDICE DE FIGURAS	iv
ÌNDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Objetivo general.....	5
1.2 Objetivos específicos	5
1.3 Hipótesis	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Principios de la nanotecnología.....	6
2.2 Que son las nanopartículas	6
2.2.1 Áreas de aplicación de las nanopartículas en la agricultura.....	8
2.3 Síntesis de nanopartículas.....	9
2.4 Efecto de nanopartículas en diferentes variables fisiológicas.....	10
2.5¿Que es la hidroxiapatita?.....	11
2.5.1 Beneficios de hidroxiapatita	12
2.5.2 Nanohíbridos de hidroxiapatita.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Localización del sitio experimental	15
3.2. Material biológico	15
3.3. Diseño experimental	15
3.4. Tipo de nanopartícula.....	16
3.5. Establecimiento del bioensayo	16
3.5.1 Germinación de semillas.....	16
3.6. Evaluación del bioensayo.....	18
3.6.1 Variables evaluadas	18
3.6.2 Metodología para la evaluación de las variables.....	18
a) Vigor de germinación	18
b) Porciento de germinación	18
c) Porciento de plántulas anormales	19

d) Por ciento de semillas sin germinar	19
e) Longitud de plúmula en maíz y de vástago en rábano	19
f) Longitud de radícula	19
g) Peso seco de plántula.....	19
h) Índice de vigor	20
3.7 Análisis del bioensayo	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
V. CONCLUSIONES	35
VI. LITERATURA CITADA.....	37
VII. ANEXOS.....	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos de NPsHA aplicados para evaluar su efecto en la germinación y el vigor de semillas de maíz de la variedad GENEX-724, y de rábano variedad Champion.	15
Cuadro 2. Cuadros medios del análisis de varianza para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de maíz tratadas con NPsHA.	22
Cuadro 3. Cuadros medios del análisis de varianza para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de rábano tratadas con NPsHA.	23
Cuadro 4. Comparación de medias de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de maíz (<i>Zea mays</i>) tratadas con NPsHA.	25
Cuadro 5. Comparación de medias de la variable índice de vigor evaluada en el bioensayo de germinación de semillas de maíz (<i>Zea mays</i>) tratadas con NPsHA.	26
Cuadro 6. Comparación de medias de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de rábano (<i>Rhapanus sativus</i>) tratadas con NPsHA.	28
Cuadro 7. Comparación de medias de la variable índice de vigor determinada en el bioensayo de germinación de semillas de rábano tratadas con NPsHA.	29
Cuadro 8. Coeficientes de correlación Pearson de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de maíz (<i>Zea mays</i>) tratadas con NPsHA.	31
Cuadro 9. Coeficientes de correlación Pearson de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de rábano (<i>Rhapanus sativus</i>) tratadas con NPsHA.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aplicaciones de la nanotecnología en la ciencia de plantas	7
Figura 2. Usos potenciales de las nanopartículas en la agricultura	9
Figura 3. Patrones de crecimiento de plantas y tasa de germinación	13

ÌNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Longitud de plúmula (cm) por concentración en plántulas de Maíz (<i>Zea mays</i>) tratadas con NPsHA.	40
Anexo 2. Peso seco (mg/plántula) por concentración en plántulas de Maíz (<i>Zea mays</i>) tratadas con NPsHA.	40
Anexo 3. Por ciento de vigor de germinación por concentración en semillas de rábano (<i>Rhapanus sativus</i>) tratadas con NPsHA.	41
Anexo 4. Por ciento de germinación por concentración en plántulas de rábano (<i>Rhapanus sativus</i>) tratadas con NPsHA.	41
Anexo 5. Peso seco (mg/plántula) por concentración en plántulas de rábano (<i>Rhapanus sativus</i>) tratadas con NPsHA.	42
Anexo 6. Longitud de vástago (cm) por concentración en plántulas de rábano (<i>Rhapanus sativus</i>) tratadas con NPsHA.	42
Anexo 7. Longitud de radícula (cm) por concentración en plántulas de rábano (<i>Rhapanus sativus</i>) tratadas con NPsHA.	43

RESUMEN

Respuestas Fisiológicas en Semillas de Rábano (*Rhapanus sativus*) y Maíz (*Zea mays* L.) Promovidas por el Efecto de Nanopartículas de Hidroxiapatita

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 hidroxiapatita (NPShA) sintetizadas en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Se analizó el efecto de este nanomaterial de forma redonda, sobre parámetros de calidad fisiológica en semillas de rábano (*Rhapanus sativus*) y de maíz (*Zea mays* L.) para determinar si promueven o inhiben el vigor de germinación y crecimiento de plántulas.

El bioensayo consistió en siete tratamientos de NPShA (0, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm), cada tratamiento constó de 100 semillas fraccionados en 4 repeticiones de 25 cada una.

El estudio se estableció en cajas de Petri, y en cada caja se añadieron 30 ml de la suspensión de cada tratamiento, mientras que el testigo (0 ppm) consistió únicamente en agua destilada, esto para inducir el proceso de germinación de las semillas, las cuales fueron sometidas a un proceso de imbibición por 22 horas para maíz y 24 horas para rábano, con el fin de que el proceso de germinación se iniciara con la absorción de las diferentes. La hidratación de los tejidos en la semilla es un proceso físico con una duración versátil según la especie considerada; una vez que la semilla se ha hidratado, comienzan a activarse toda una serie de procesos metabólicos que son fundamentales para que tengan lugar las tres etapas de la germinación (imbibición, metabolismo y emergencia de radícula).

Después del tratamiento con las NPShA, las semillas fueron sembradas utilizando el método de germinación entre papel, colocando las semillas entre dos hojas de papel Anchor, humedecidas con agua destilada y dobladas a manera de "taco", los cuales se introdujeron en bolsas de plástico y se colocaron en una cámara

de germinación a una temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a una humedad relativa de 75%. El bioensayo se estableció en un diseño completamente al azar, conformado por las NPsHA a siete concentraciones (0, 25,50, 100, 200 500 y 1000 ppm).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar las diferencias estadísticas entre concentraciones, posteriormente se efectuó una comparación de medias utilizando la Prueba de Tukey ($P \leq 0.01$), con el fin de establecer el orden de eficiencia de los tratamientos, utilizando el programa SAS Inc. (2009).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que las plántulas mostraron una mejor respuesta para la expresión del peso seco de plántula y longitud de vástago y de radícula, al aplicar 200 ppm, lo cual muestra que, a dosis altas moderadas se promueve un incremento notorio de estas variables, como resultado del estímulo que las NPsHA generan durante los procesos de imbibición y de germinación.

Se demostró que la aplicación de las NPsHA estimula la promoción del crecimiento y el desarrollo, al evidenciar un mayor tamaño de plántulas y un incremento en el peso seco de las mismas, al efectuar la comparación de medias entre tipos de concentraciones se encontró que las NPsHA sintetizadas concentraciones altas moderadas de 50 y 200 ppm, manifestaron una mejor respuesta en las variables longitud de vástago y peso seco de plántula, sin embargo, en el caso de la longitud media de plúmula y de radícula en semillas de maíz no se encontraron diferencias estadísticas. En este estudio se aprecia la posibilidad de generar un incremento en la respuesta fisiológica de los diversos cultivos, a través del efecto promotor de las NPsHA en diversas variables asociadas con la germinación y crecimiento de plántula durante el proceso de desarrollo, asumiendo que la concentración óptima depende del tipo de la especie vegetal que se esté evaluando.

Palabras clave: nanopartículas, hidroxiapatita, desarrollo, vigor, germinación, peso seco, plúmula, vástago y radícula.

I. INTRODUCCIÓN

Se ha señalado que, en este siglo, la Nanotecnología (NT) está teniendo una revolución científica y tecnológica, sustentada en la capacidad de medir, manipular, y organizar la materia a escala nanométrica, que se refiere, a 10^{-9} metros (Rodríguez-Fernández, 2016).

La NT es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación, manejo, operación y aplicación de materiales aparatos y sistemas a nano escala. Esta tiene un gran potencial, puesto que puede optimizar la calidad de vida a través de sus aplicaciones en numerosos campos, por ejemplo, la agricultura y la tecnología de los alimentos (Ruiz-Torres *et al.*, 2016).

Según define la agronanotecnología como la ciencia de producir nanopartículas y nanoelementos de materiales diversos para generar productos agrícolas como nanosensores, nanoplaguicidas, nanoherbicidas y nanofertilizantes encapsulados para una liberación controlada (Rodríguez-Fernández, 2016).

Ruiz-Torres *et al.* (2016) señalan que la agronanotecnología representa una gran oportunidad para disminuir el uso de agroquímicos sintéticos, con la probabilidad de reducir el impacto ambiental que ha surgido en las últimas décadas. Es por lo que la NT aplicada en la agroindustria tiene como fin crear productos con ingredientes activos de tamaño nanométrico de fácil disponibilidad, asimismo minimizar pérdidas al suministrar el producto. Con el uso de nanomateriales se puede lograr un uso eficiente del agua, control de plagas y enfermedades, fomentando la agricultura sustentable para la detección y protección del medio ambiente.

Asimismo, los nanomateriales reducen al mínimo la lixiviación, al tiempo que optimizan la absorción de nutrientes por las plantas y contribuyen a moderar la eutrofización al reducir la transferencia de nitrógeno a los mantos acuíferos subterráneos. Asimismo, es importante indicar que los nanomateriales también podrían ser explotados para optimizar la estructura y función de los plaguicidas mediante el incremento de solubilidad, la resistencia contra la hidrólisis, mejorando

su fotodescomposición y/o suministrando una manera más eficaz de liberación controlada hacia los organismos (Lira-Saldívar *et al.*, 2016a).

Los autores mencionados anteriormente también señalan que los diversos usos potenciales de la NT en la agricultura han desarrollado un gran interés, ya que brindan la probabilidad de mejorar la producción de alimentos, reduciendo costos de producción y de desechos de agroquímicos.

En la actualidad estos nanocomponentes están aún investigándose, su aplicación se ha ido ampliando, y se pronostica que continúe extendiéndose en el futuro.

Mencionado lo anterior, es preciso generar investigación oportuna respecto al efecto de las nanopartículas en los cultivos, sustentado que el uso de estas beneficia la producción en el sector agrícola.

En el presente trabajo se estudió la aplicación de distintas concentraciones de nanopartículas de Hidroxiapatita (NP_{SHA}), de tipo ingeniería, sobre el proceso de germinación en semillas de maíz *var.* GENEX-724 y rábano *var.* Champion, para evaluar el efecto causado en los parámetros de calidad fisiológica durante la germinación, y así comprobar si este tipo de NPs promueven el crecimiento y desarrollo del cultivo durante sus primeras etapas.

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de nanopartículas de hidroxiapatita (NPShA), de síntesis, a diferentes concentraciones sobre el proceso de germinación en semillas de maíz *var.* GENEX-724 y de rábano *var.* Champion, y su respuesta en parámetros de calidad fisiológica.

1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar si las NPShA actúan como un agente promotor de la germinación, en semillas de maíz y rábano.

2. Determinar si las NPShA actúan como un agente promotor del vigor, crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz y de rábano.

1.3 Hipótesis

1. El uso y aplicación de NPShA promueve una respuesta positiva en el vigor y la germinación de las semillas, en comparación con el testigo.

2. La aplicación de NPShA no tienen un efecto promotor en el vigor y en la germinación de las semillas, en comparación con el testigo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Principios de la nanotecnología

La nanotecnología (NT) es un término que deriva del griego *nanno*, cuyo significado es enano y permite un manejo de la naturaleza a escala molecular, atómica y subatómica; es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica. Ya que el término NT abarca un amplio rango de herramientas, técnicas y viables aplicaciones, algunos científicos encuentran conveniente llamarlas nanotecnologías, y entre las disciplinas se encuentran la química, la física, la biología, la medicina y la ingeniería, entre otras (Mendoza-Urbe y Rodríguez-López, 2007).

Los autores mencionados anteriormente indican que el término NT fue usado por primera vez en 1974 por un investigador de la Universidad de Tokio llamado Norio Taniguchi, quien señaló la capacidad de manejar materiales a nivel nanométrico (nm). Sugiere que el rango de tamaño de mayor beneficio para la nanociencia y las nanotecnologías es de 100 nm o menos debido a que es cuando los materiales pueden realzar sus propiedades o adquirir otras totalmente diferentes.

2.2 Que son las nanopartículas

Las NPs son materiales cerámicos, polímeros semiconductores, o una combinación de estos, que conservan un tamaño que oscila entre 1 y 100 nm. Dicha característica les cede la capacidad de pasar a través de las membranas de los organismos y su variedad es extensa, ya que pueden, en teoría ser procesadas casi por cualquier sustancia química (Chávez Mendoza, 2018).

Las NPs inorgánicas son particularmente atractivas como piezas de construcción para ciertos propósitos, debido a sus propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas, de las cuales pueden ser moduladas

simplemente cambiando su tamaño, forma, o la funcionalización de la superficie de la nanopartícula, sin cambiar la composición del material. Hasta ahora se han realizado avances significativos utilizando estrategias de química húmeda, para sintetizar nanopartículas de alta calidad de una gran variedad de materiales inorgánicos, incluyendo oro, plata, óxido de hierro y semiconductores (Zanella, 2012). Según este mismo autor las NPs debido a sus propiedades físicas y químicas únicas usualmente son descritas como átomos artificiales.

Los avances en los procesos de síntesis consienten el control preciso sobre los parámetros estructurales que rigen la formación de las nanopartículas lo que ha permitido adaptar las propiedades de estos átomos artificiales de acuerdo con su uso específico (Figura 1).

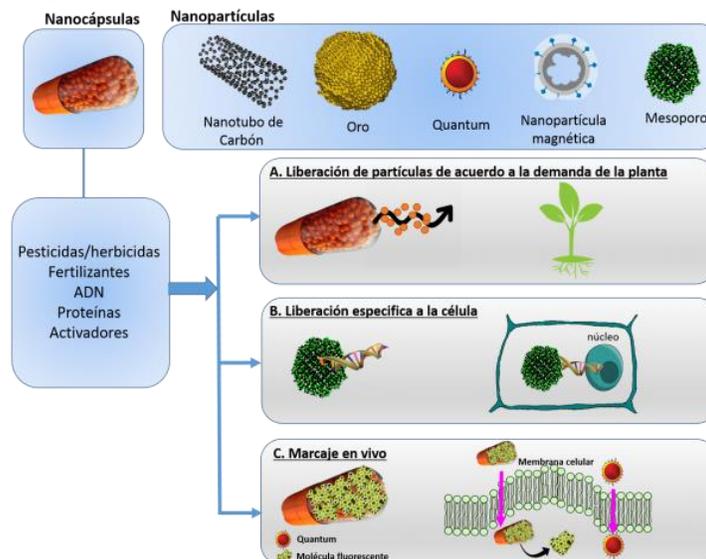


Figura 1. Aplicaciones de la nanotecnología en la ciencia de plantas (Biogenetic, 2017).

Acorde con este esquema, en el entorno biológico de las plantas, las NPs pueden ser empleadas en diversas formas, pero destacan tres puntos importantes: (A). Liberación de agroquímicos y moléculas bio-activas dependiendo del estado de la planta. (B). Liberación de moléculas bio-activas (ejemplo nucleótidos, proteínas y otras moléculas fitoactivas) en las células de la planta. (C). Transporte y liberación de elementos fluorescentes (por ejemplo, moléculas cuánticas o proteínas fluorescentes) para el marcaje intracelular y la obtención de imágenes microscópicas (Biogenetic, 2017).

2.2.1 Áreas de aplicación de las nanopartículas en la agricultura

Ruiz-Torres *et al.* (2016) mencionan diversas áreas de aplicación de las nanopartículas en la agricultura como:

- Almacenamiento de energía; producción y conversión (módulos fotovoltaicos). El uso de componentes nanoestructurados es eficiente en sistemas de iluminación y calefacción, permite aumentar la capacidad de almacenamiento eléctrico y lleva a una disminución de la contaminación por el uso de la energía.
- Incremento de la productividad agrícola (zeolitas nanoporosas para la liberación prolongada y eficiente de fertilizantes). La zeolita actúa como una enmienda o mejorador de suelos que permite incrementar la eficiencia de los fertilizantes, admitiendo una disponibilidad controlada de los cationes que son utilizados por las plantas en su nutrición (Díaz-Álvarez *et al.*, 2019).
- Nanocápsulas para la liberación puntual de pesticidas. Las compañías agroquímicas han reducido el tamaño de las partículas de las emulsiones químicas existentes, llevándolas a dimensiones nanoscópicas, o han encapsulado los ingredientes activos en nanocápsulas diseñadas para abrirse bajo ciertas condiciones, respuesta a la luz solar, el calor o condiciones alcalinas en el tubo digestivo de un insecto (Lugo-Medina *et al.*, 2010).
- Nanosensores, con la finalidad de monitorear la calidad del suelo y la vitalidad de la planta. Los sensores son instrumentos o herramientas que transforman magnitudes químicas o físicas en señales eléctricas, ópticas o térmicas, y se utilizan para la detección rápida de sustancias en el ambiente. (Carrillo-González y González-Chávez, 2009).
- Nanosensores para la detección de plagas y de fitopatógenos. En este caso, el uso de NPs puede ayudar a incrementar la especificidad y eficiencia de

herbicidas, plaguicidas y/o fitopatógenos, así como extender el periodo de actividad de los principios activos por liberación prolongada (Figura 2).

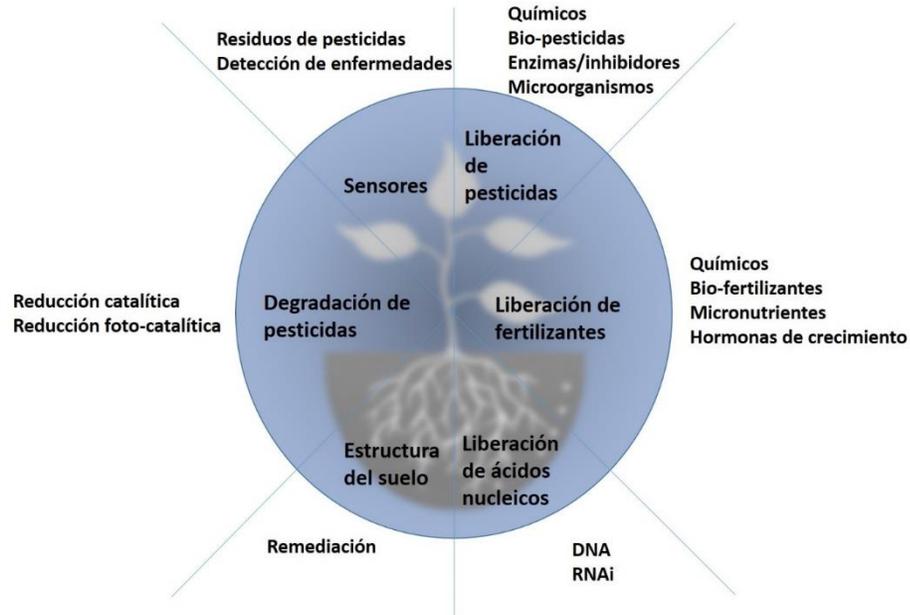


Figura 2. Usos potenciales de las nanopartículas en la agricultura, con enfoque a fertilizantes, pesticidas, sensores, mejoradores del suelo y otros (Biogenic, 2017).

2.3 Síntesis de nanopartículas

Zanella (2012) menciona que existen diversos métodos que se utilizan para la síntesis de NPs, los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Comúnmente, inician con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. El método químico es el más útil para la obtención de NPs uniformes y pequeñas. Los métodos más característicos de esta aproximación son:

- a) El método coloidal: los coloides son partículas individuales más grandes que las divisiones anatómicas, su comportamiento dinámico en suspensión en función del tiempo se rige por las fuerzas de la gravedad y se da el fenómeno de sedimentación, si son lo suficientemente pequeños para ser coloides, entonces su movimiento irregular en suspensión puede ser atribuido a bombardeos colectivos de una multitud de moléculas térmicamente agitadas en una suspensión líquida.

- b) Reducción fotoquímica y radioquímica: hace referencia a la síntesis de nanopartículas metálicas modificando el sistema químico por medio de altas energías se asocia con la generación de reductores fuertes, altamente activos como electrones, radicales y especies excitadas.
- c) Irradiación con microondas: esta técnica produce nanopartículas con una muy baja dispersión de tamaño, si bien no siempre se logra un control preciso en la morfología. Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, idóneos de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas como las moléculas polares en un disolvente o iones conductores en un sólido.
- d) Utilización de dendrímeros: se logra alterando la naturaleza de los dendrímeros, que son moléculas altamente ramificadas, las que incluyen un núcleo central, unidades intermediarias repetitivas y grupos funcionales terminales.
- e) Síntesis solvotermal: se agrupan una serie de técnicas en las que un precursor metálico disuelto en un líquido, en un recipiente cerrado, es calentado arriba de su punto de ebullición, lo que ocasiona una presión superior a la atmosférica (normalmente moderada).
- f) Método sol-gel: parte de una solución química o sol que actúa como precursor de una red integrada ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros.

2.4 Efecto de nanopartículas en diferentes variables fisiológicas

En el trabajo de Lira-Saldívar *et al.* (2016b), sugieren que las NPs alteran algunas características agronómicas como: crecimiento de plantas, producción de biomasa y contenido de clorofila entre otras variables, lo cual influye sobre el rendimiento de estas; desafortunadamente pocos reportes incluyen el ciclo de vida de las plantas tratadas con NPs para hacer una evaluación concluyente sobre los posibles riesgos a largo plazo en los cultivos.

Las NPs interactúan con las plantas desarrollando numerosos cambios en su morfología y fisiología, dependiendo de sus propiedades. La eficacia de las NPs se establece por su composición química, tamaño revestimiento superficial, reactividad y lo más importante, la dosis conveniente.

Los efectos de las NPs tienen mucha variación con respecto al tipo de cultivo, etapa de crecimiento de este, condiciones de desarrollo, método de aplicación, dosis aplicada e intervalos de aplicación.

Además de los efectos positivos de las NPs en distintos cultivos, también se han registrado efectos negativos en los cultivos como lo son, alteración de la nutrición mineral, fotosíntesis, estrés oxidativo, genotoxicidad inducida y reducen el crecimiento de las plantas. El efecto de toxicidad por NPs aumenta con dosis o concentraciones altas de NPs aplicadas en las plantas (Lira Saldívar *et al.*, 2018c).

2.5 ¿Que es la hidroxiapatita?

La hidroxiapatita (HA) es un biocristal formado por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno, estando presente en dientes y huesos, concediéndoles su firmeza característica. Este material pertenece a la familia de las apatitas. En la naturaleza las apatitas se pueden encontrar formando parte de las rocas sedimentarias y metamórficas (García-Garduño y Reyes, 2006).

Bolívar (2019) señala que la hidroxiapatita es un mineral de fosfato de calcio, cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Junto a otros minerales y restos de materia orgánica pulverizados y compactados, menciona que esta conforma la materia prima conocida como roca fosfórica. Alude que el término hidroxilo se refiere al anión OH^- .

La hidroxiapatita se puede sintetizar mediante la reacción de hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ y ácido orto fosfórico (H_3PO_4), con una relación molar Ca/P de 10:6 (Lira Saldívar, 2018d).



Ortiz *et al.* (2012) mencionan que se conocen cinco tipos de síntesis de NPs de hidroxiapatita (NPH): 1) métodos secos, 2) métodos húmedos, 3) procesos en alta temperatura, 4) extracción biológica, 5) métodos combinados; cada uno con diversas subdivisiones.

2.5.1 Beneficios de la hidroxiapatita

Niranjan *et al.* (2014) en su estudio acerca del efecto de las NPsHA sobre el crecimiento de las plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*) y su posible uso como fertilizante, señalan que el proceso de germinación del cultivo se mejoró con la adición de NPsHA. En el caso de la muestra con 0.5 mg/ml de NPsHA, demostraron que el porcentaje de germinación fue de un 100% en 60 horas, mientras que en el tratamiento con 1.0 mg/ml se demostró una germinación del 100% en 54 horas, en relación con el testigo se observó una germinación del 88% en 60 horas. Concluyeron que las NPsHA actúan favorablemente en la germinación y regulación del crecimiento vegetal en semillas de garbanzo. La posible razón de esta respuesta es el aumento de la actividad de la hormona del crecimiento (giberelinas), debido a que la HA es biocompatible, y se puede usar como fertilizante. En la (Figura 3), se observa su aplicación: a) plántulas en la etapa de 3 días, b) en la etapa de 6 días, c) en la etapa de 12 días y d) porcentaje de germinación de semillas acuerdo al tiempo (hora).

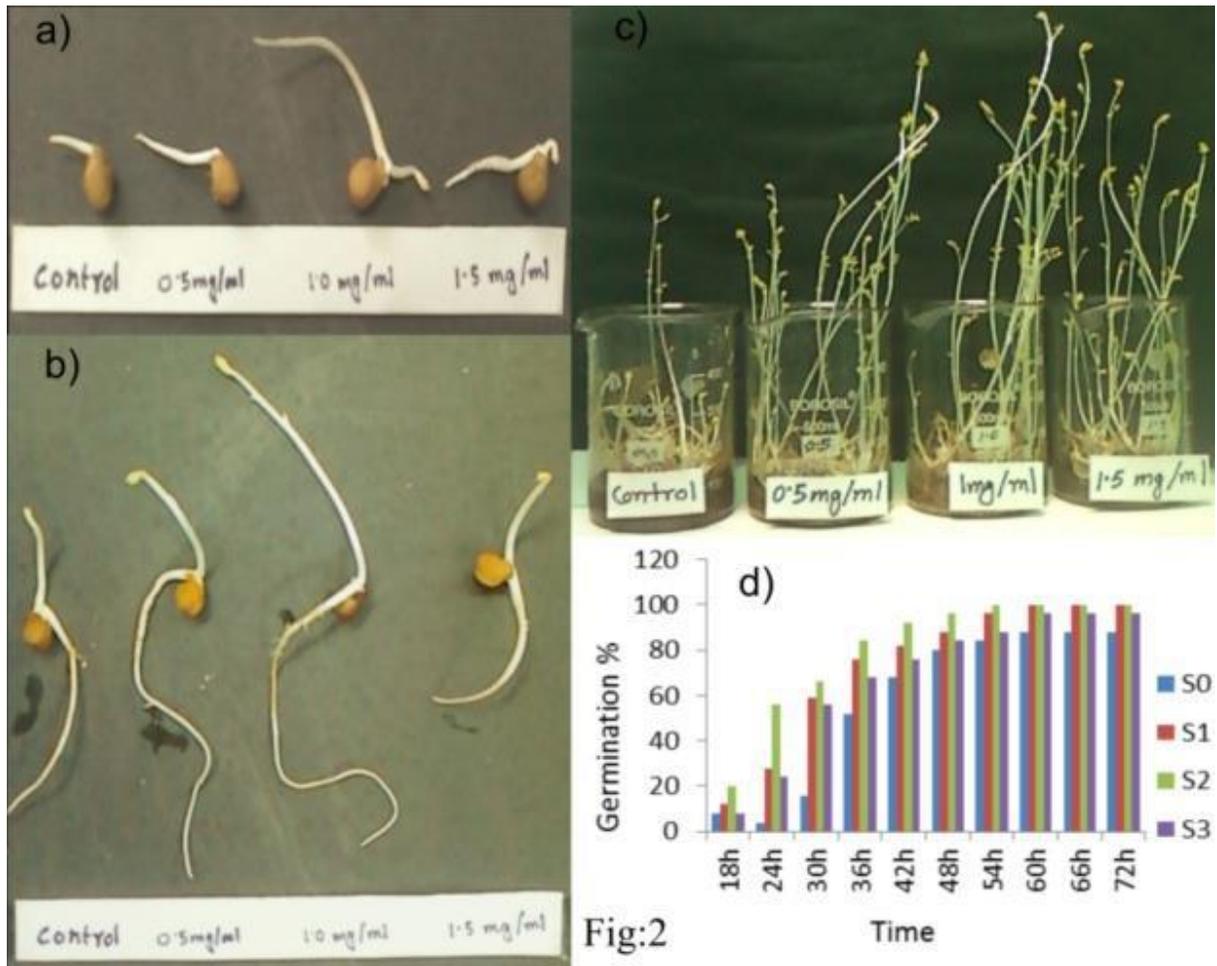


Figura 3. Patrones de crecimiento de plantas y tasa de germinación (Niranjan et al., (2014).

Ortiz *et al.* (2012) en ensayo realizado con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) observaron que las NPsHA no tienen efectos tóxicos en el proceso germinativo. La concentración de fósforo disponible en los minerales no fue suficiente para ser absorbida por las semillas, por último, la reducción en el tamaño de NPsHA no facilitó su absorción. Se aplicaron pequeñas cantidades de esta, y el pH de la solución no expresó algún efecto tóxico en la planta.

2.5.2 Nanohíbridos de Hidroxiapatita

Consiste en la cruce de dos nanopartículas, las combinaciones de los nanocomponentes dan lugar a propiedades multifuncionales debido a los efectos sinérgicos de las interacciones entre partículas.

Desde un punto de vista científico, los grupos funcionales de superficie reactiva de la hidroxiapatita ofrecen oportunidades para la modificación de la superficie mediante la inmovilización de productos químicos estratégicos para la creación de nanohíbridos con propiedades multifuncionales (Kottegoda *et al.*, 2017).

En la actualidad, casi la mitad de la población mundial depende del aumento de los rendimientos de los cultivos, especialmente el trigo y el arroz, mediante el uso de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, la descomposición prematura de la urea en el suelo se produce debido a la acción del agua, la volatilización y la enzima ureasa que conduce a la evolución del amoníaco, antes de que las plantas puedan adsorberlo de manera eficiente. Este es un desafío para la agricultura mundial y amenaza la seguridad alimentaria.

Estudios realizados en el cultivo de arroz, obtienen como resultado que los nanohíbridos de urea e HA exhiben una liberación lenta de N, en contraste con la urea pura que se libera en minutos. El trabajo demuestra que la NT puede usarse para desarrollar fertilizantes de liberación lenta, que consiguen aumentar significativamente la eficiencia con una menor cantidad de otros productos químicos utilizados manteniendo el rendimiento (Kottegoda *et al.*, 2017), lo anterior en comparación con agroquímicos tradicionales de uso actual.

Existen múltiples investigaciones respecto al uso de la hidroxiapatita en el área de la salud, y estrechamente para el ámbito agrícola, por lo que la presente investigación se enfoca en el efecto de estas NPs en semillas de rábano y maíz.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El trabajo se condujo en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en Buenavista, al sur del municipio de Saltillo, Coahuila, México.

3.2 Material biológico

El material biológico utilizado en este trabajo es una variedad sintética de maíz denominada "GENEX-724" adaptada para ambientes de 0 a 1000 metros sobre nivel del mar, y semilla de rábano "Champion" apropiada para climas cálidos.

3.3 Diseño experimental

El bioensayo se estableció en un diseño al azar conformado por NPShA de tipo Ingeniería a siete concentraciones (0, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm). Los tratamientos se constituyeron de suspensiones preparadas con agua destilada, empleada como vehículo de aplicación y NPShA a diferentes concentraciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos de NPsHA aplicados para evaluar su efecto en la germinación y el vigor de semillas de maíz de la variedad GENEX-724, y de rábano variedad Champion.

Concentración (ppm)
0
25
50
100
200
500
1000

3.4 Tipo de nanopartícula

Se usó un tipo de nanopartícula de ingeniería tipo redonda, elaborada a base hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ y ácido orto fosfórico (H_3PO_4) (NPsHA), con un tamaño entre 15 a 30 nanómetros, elaborada y caracterizada en el Laboratorio de Materiales Avanzados del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA).

3.5 Establecimiento del Bioensayo

3.5.1 Germinación de semillas

Para evaluar el efecto de la aplicación de los materiales nanoestructurados en la germinación de semillas de maíz y de rábano, se establecieron dos bioensayos, los cuales consistieron en siete tratamientos y de cuatro repeticiones de 25 semillas cada uno, para semillas de maíz y 50 de rábano.

Con la finalidad de evaluar la aplicación de las suspensiones con NPsHA, se utilizaron cajas de Petri, las cuales fueron esterilizadas de manera previa, posteriormente, con ayuda de unas pinzas estériles se distribuyeron 100 semillas de maíz en cada una de las cajas y en otras 200 (rábano).

Antes de la aplicación de los tratamientos, cada solución se sometió a un proceso de sonicación durante quince minutos para obtener una dispersión adecuada de las NPsHA, se utilizó un sonicador marca Autoscience modelo AS2060B Ultrasonic Cleaner. Posteriormente se añadió cada solución con ayuda de una micropipeta, empleando 30 ml en cada caja de Petri, según el tratamiento correspondiente y realizando una dispersión uniforme sobre las semillas.

Posterior a la imbibición por 22 horas de las semillas de maíz y por 24 las de rábano, se procedió a la siembra para el ensayo de germinación a través de la técnica "Entre papel". Se manejaron hojas de papel Anchor humedecidas en agua destilada, sembrando con ayuda de unas pinzas, 25 semillas por repetición de maíz, y 50 semillas por repetición en rábano. Una vez sembradas de manera uniforme en línea horizontal, se cubrieron las semillas con otra hoja de papel Anchor humedecida con agua destilada, y se envolvió en forma de "taco", esta acción se efectuó para las cuatro repeticiones de los siete tratamientos.

Una vez realizada la siembra, se colocaron los tacos en una bolsa de polietileno de 25 x 40 cm, utilizando una bolsa por cada tratamiento, y ubicados en una bandeja de plástico profunda. Las siete bolsas de semillas con los tacos de maíz y las siete bolsas con tacos de semillas de rábano fueron rotuladas para identificarlas al momento de su evaluación, después fueron colocadas dentro de una cámara de germinación marca Thermo Scientific, a una temperatura de 25 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, una humedad relativa de 75 %.

3.6 Evaluación del bioensayo

3.6.1 Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron el porcentaje de vigor de germinación (%), el porcentaje de germinación (%), porcentaje de plántulas anormales (%), porcentaje de semillas sin germinar, longitud de plúmula (maíz) y de vástago (rábano) (cm), longitud de radícula (cm), peso seco de plántulas (mg/plántula) y se calculó un índice de vigor.

3.6.2 Metodología para la evaluación de las variables

a) Vigor de germinación

Al cuarto día después de la siembra de semillas de rábano, y al cuarto día en semillas de maíz se realizó el primer conteo para determinar el número de plántulas normales, a fin de conocer el vigor de germinación de las semillas, ya que es un parámetro muy relevante, debido a que representa la velocidad y uniformidad de la germinación, el crecimiento de plántulas y la habilidad de conservar la capacidad de germinación después del almacenamiento. Se consideran plántulas normales las que tienen la capacidad de germinar y continuar con su desarrollo de manera adecuada, bajo condiciones favorables de luz, humedad y temperatura (Manfrini, 2004).

El vigor de germinación se estableció de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Vigor de germinación (\%)} = \frac{\text{Número total de semillas normales}}{\text{Número total de semillas sembradas}} \times 100$$

b) Porcentaje de germinación

Al séptimo día se efectuó la evaluación final del bioensayo, se realizó el segundo conteo para conocer el número total de plántulas normales, plántulas

anormales y el número de semillas sin germinar. El porcentaje de plántulas normales se tomó en cuenta como el dato útil para evaluar el porcentaje de germinación utilizando la fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación (\%)} = \frac{\text{Número de plántulas normales}}{\text{Número total de semillas sembradas}} \times 100$$

c) Porcentaje de plántulas anormales

Con la finalidad de obtener el porcentaje de esta variable se evaluaron todas las plántulas que presentaron un desarrollo irregular en la constitución de esta, como algunas plántulas con un tamaño dos veces menor al que presenta su semilla o que la plúmula o radícula no se desarrollaron correctamente.

d) Porcentaje de semillas sin germinar

Las semillas que no manifestaron la capacidad de germinar se registraron para presentar esta variable en porcentaje.

e) Longitud de plúmula (maíz) y de vástago (rábano)

Para realizar la evaluación de longitud de plúmula y de vástago se midieron todas las plántulas normales de cada tratamiento y repetición, manipulando una hoja milimétrica graduada en cm.

f) Longitud de radícula

En las plántulas normales obtenidas de cada tratamiento se midió la longitud de radícula expresada en cm, con ayuda de una hoja milimétrica graduada en tal magnitud.

g) Peso seco de plántula

Una vez obtenida la evaluación del bioensayo, se utilizaron las plántulas normales por cada tratamiento, se colocaron en bolsas de papel de estraza rotuladas para su identificación, posteriormente se ubicaron en una estufa de

secado marca Riossa modelo H-48, a una temperatura de 72 °C por un lapso de 24 horas.

Al término de este periodo de tiempo se retiraron las muestras de la estufa y se colocaron en un desecador, con el fin de evitar que adquirieran humedad del ambiente durante 10 minutos de enfriamiento. Posteriormente se pesó cada muestra en una balanza analítica marca AND modelo HR-200, para obtener el peso de materia seca expresado en mg/plántula.

h) Índice de vigor

El vigor, se basa en el comportamiento físico o fisiológico de un lote de semillas, e incluye: 1) cambios en los procesos bioquímicos, 2) tasa y uniformidad de la germinación y el crecimiento de las plántulas, y 3) la germinación o capacidad de emergencia de las semillas al ser expuestas a condiciones de estrés. A continuación, se explica el porcentaje de plántulas normales que se tomó en cuenta como el antecedente útil para evaluar el porcentaje de índice de vigor (IV) utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Índice de Vigor} = ((\text{longitud de vástago} + \text{longitud de radícula}) * 10) * \% \text{ de germinación}$$

3.7 Análisis del bioensayo

Con los datos obtenidos de las variables evaluadas del bioensayo realizó un análisis de varianza, para revelar la existencia de diferencias estadísticas entre las distintas concentraciones de NPsHA, además se realizó una comparación de medias utilizando la Prueba estadística de Tukey ($P < 0.05$), para conocer el orden de eficacia de los tratamientos. Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa SAS Inc. (2009).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en los cuadrados medios del análisis de varianza (Cuadro 2) para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas maíz var. GENEX-724, sometidas a diferentes concentraciones de NPsHA de tipo ingeniería, en la fuente de variación tratamiento, los resultados mostraron diferencia altamente significativa ($P \leq 0.001$) para la variable de peso seco de plántula, mientras que para las variables longitud de plúmula e índice de vigor se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

En cuanto al porcentaje de vigor de germinación, germinación, plántulas anormales, semillas sin germinar y longitud de radícula en semillas de maíz no presentaron diferencias estadísticas.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los cuadrados medios del análisis de varianza (Cuadro 3) para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de rábano var. Champion, sometidas a diferentes concentraciones de NPsHA de tipo ingeniería, en la fuente de variación tratamiento, los resultados mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las variables porcentaje de vigor de germinación, germinación, longitud de vástago, longitud de radícula, peso seco e índice de vigor.

No se observaron diferencias altamente significativas, de igual forma, las variables como plántulas anormales y semillas sin germinar no presentaron diferencias estadísticas (Cuadro 3).

Lo anterior hace referencia, a que las nanopartículas es un factor fundamental que influye en la expresión de algunas de las variables fisiológicas, en ambas semillas, relacionadas con la germinación y que fueron evaluadas en este estudio. Méndez-Argüello, *et al.* (2016) mencionan que otro factor que puede contribuir a los efectos positivos de las NP aplicadas, es su tamaño micrométrico, ya que el tamaño nano les permite la entrada fácilmente a través de las paredes y membranas celulares, incidiendo así de manera más directa en los diferentes organelos de las células.

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de maíz tratadas con NPsHA.

FV	Vigor de germinación (%)	Germinación (%)	PA	SSG	LP	LR	PS	INVIGOR
Tratamiento	17.90 _{NS}	14.28 _{NS}	4.57 _{NS}	19.81 _{NS}	2.13*	0.37 _{NS}	76.87**	8107578.46*
Error	22.86	26.48	8.57	16.76	0.56	0.85	10.91	3277707.2
CV (%)	5.15	5.51	136.62	89.56	6.31	3.63	4.24	5.22

F. V= Fuente de variación; Vigor= Plántulas normales al primer conteo; Germinación= Plántulas normales al segundo conteo; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; LP= Longitud de plúmula; LR= Longitud de radícula; PS= Peso seco; INVIGOR= índice de vigor; ERROR= Error experimental; CV= Coeficiente de variación; NS= Diferencias no significativas; *= Diferencias significativas (P≤ 0.05). **=Diferencias altamente significativas (P≤0.001).

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de rábano tratadas con NPShA.

FV	Vigor de germinación (%)	Germinación (%)	PA	SSG	LVAS	LR	PS	INVIGOR
Tratamiento	40.80*	70.66*	9.14 _{NS}	11.57 _{NS}	0.45*	2.49*	876809.537*	6513146.88*
Error	13.66	28.04	10.52	11.57	0.12	0.83	282605.95	2416773.49
CV (%)	4.25	6.26	46.82	44.50	4.72	6.59	7.50	8.70

F. V= Fuente de variación; Vigor= Plántulas normales al primer conteo; Germinación= Plántulas normales al segundo conteo; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; LVAS= Longitud de vástago; LR= Longitud de radícula; PS= Peso seco; INVIGOR= índice de vigor; ERROR= Error experimental; CV= Coeficiente de variación; NS= Diferencias no significativas; *= Diferencias significativas (P≤ 0.05). **=Diferencias altamente significativas (P≤0.001).

Al efectuar la comparación de medias por tratamiento (Cuadros 4 y 5) en semillas y plántulas de maíz, se demostró que la aplicación de NPShA, genera una alteración en respuesta fisiológica para las variables longitud de plúmula y peso seco de plántula, identificando diferencias estadísticas en las concentraciones de los tratamientos empleados.

En el caso de la longitud de plúmula en plántulas de maíz (Cuadro 4), se encontró que el suministro de NPShA en concentraciones de 0 a 500 ppm durante la imbibición, genera el mismo efecto, ya que son estadísticamente iguales. Sin embargo, numéricamente se observa una reducción gradual del crecimiento. El tratamiento con 1000 ppm particularmente mostró la menor longitud en centímetros, con una media de 10.46cm (Anexo 1).

En general se observó para esta variable, una reducción en el crecimiento de la plúmula al incrementar la concentración de las NPShA, indicando posiblemente un efecto negativo en la división o elongación celular.

Respecto a la variable peso seco de plántula de maíz (Cuadro 4), se encontró que entre las concentraciones de 50 y 200ppm son los tratamientos con la media de más miligramos por plántula en peso seco, en cambio el segundo tratamiento (25 ppm) mostró un valor medio estadísticamente igual a las concentraciones del testigo ya 500,100 y1000ppm (Anexo 2).

Por otra parte, y de acuerdo con el ANOVA, la comparación de medias de las variables evaluadas en maíz, porcentaje de vigor de germinación, germinación, plántulas anormales, semillas sin germinar, longitud de radícula e índice de vigor, no presentaron diferencias estadísticas significativas (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 4. Comparación de medias de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*) tratadas con NPSHA.

Tratamiento (ppm)	Vigor de germinación (%)	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)	LP (cm)	LR (cm)	PS (mg/plántula)
0	94 a	94 a	2 a	4 a	12.29 a	25.05 a	75.59 c
25	93 a	94 a	1 a	5 a	12.68 a	26.04 a	79.09 abc
50	94 a	93 a	4 a	3 a	12.36 a	26.04 a	83.62 a
100	89 a	90 a	2 a	8 a	11.94 ab	25.13 a	72.54 c
200	95 a	96 a	2 a	2 a	11.74 ab	25.15 a	83.44 a
500	94 a	94 a	3 a	3 a	11.51 ab	25.21 a	75.88 bc
1000	91 a	92 a	1 a	7 a	10.46 b	24.80 a	74.40 c
Media	92.86	93.29	2.14	4.57	11.85	25.35	77.94
Tukey ($\alpha=0.05$)	10.99	11.83	6.73	9.41	1.72	2.097	7.59

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

Cuadro 5. Comparación de medias de la variable índice de vigor evaluada en el bioensayo de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*) tratadas con NPsHA.

Tratamiento (ppm)	Índice de vigor (%)
0	35091 a
25	36409 a
50	35704 a
100	33362 a
200	35410 a
500	34522 a
1000	32301 a
Media	34685.57
Tukey ($\alpha=0.05$)	4161.6

Medias con la misma literal son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$); ppm= partes por millón

Al efectuar la comparación de medias por concentración en semillas de rábano (Cuadro 6 y 7), se evidenció que la aplicación de NPShA, genera una modificación en la respuesta fisiológica para las variables vigor de germinación, porcentaje de germinación, longitud de vástago, longitud de radícula y peso seco de plántula identificándose diferencias estadísticas entre los tratamientos empleados.

En el caso del porcentaje de vigor de germinación se encontró que el suministro de NPShA en concentración de 500ppm durante la imbibición, genera un efecto de inhibición ya que mostró un menor porcentaje de vigor de germinación en comparación a los otros tratamientos e incluso el testigo, que particularmente mostró el mayor porcentaje, con una media de 93 % (Anexo 3).

De igual manera en el porcentaje de germinación (Cuadro 6) se observó que en la aplicación de NPShA en concentración de 1000ppm durante la imbibición, generó el mismo efecto negativo, ya que se obtuvo un menor porcentaje de germinación en comparación a los otros tratamientos e incluso el testigo, que particularmente mostró el mayor porcentaje, con una media de 90% (Anexo 4). Mientras que la variable peso seco de plántula a una concentración de 1000ppm obtuvo un mayor peso seco de 8.08mg/plántula, en comparación a las demás concentraciones (Anexo 5).

Lo anterior indica que, tratando la semilla con 500 ppm, se disminuye el porcentaje de vigor de germinación de 93% (Testigo) a 82%, también a una concentración de 1000ppm se reduce el porcentaje de germinación de 90% (Testigo) a 77%. Por lo que, aportar a la semilla de rábano, durante la imbibición concentraciones altas de NPShA, afecta el vigor y emergencia de plántula.

No obstante respecto a las variables longitud de vástago y de radícula en rábano, se notó un cambio favorable con la aplicación de NPShA a una concentración de 200ppm, mostrando un mayor desarrollo con 7.71cm de longitud de vástago y 14.45cm longitud de radícula (Anexos 6 y 7).

Cuadro 6. Comparación de medias de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de rábano (*Rhapanus sativus*) tratadas con NPShA.

Tratamiento (ppm)	Vigor de germinación (%)	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)	LVAS (cm)	LR (cm)	PS (mg/plántula)
0	93 a	90 a	5.5 a	5 a	7.04 ab	13.43 ab	6.75 b
25	87 ab	84 ab	9 a	7.5 a	6.74 b	12.23 b	7.10 ab
50	88 ab	86 ab	6 a	8 a	7.44 ab	14.29 ab	6.81 b
100	87 ab	87 ab	7 a	6 a	7.46 ab	14.02 ab	7.08 ab
200	88 ab	87 ab	5 a	8 a	7.71 a	14.45 a	6.72 b
500	82 b	82 ab	8.5 a	10 a	7.44 ab	14.29 ab	7.03 ab
1000	87 ab	77 b	7.5 a	9 a	7.06 ab	14.25 ab	8.08 a
Media	87	85	6.93	7.64	7.27	13.85	7.08
Tukey ($\alpha=0.05$)	8.4	12.17	7.46	7.82	0.79	2.097	1.22

Medias con la misma literal son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$); ppm= partes por millón; Vigor= plántulas normales al primer conteo; Germinación= plántulas normales al segundo conteo; PA= plántulas anormales; SSG= semillas sin germinar; LVAS= longitud de vástago; LR= longitud de radícula. PS= peso seco.

Cuadro 7. Comparación de medias de la variable índice de vigor determinada en el bioensayo de germinación de semillas de rábano tratadas con NPSHA.

Tratamiento (ppm)	Índice de vigor (%)
0	18359 a
25	15824 a
50	18674 a
100	18680 a
200	19284 a
500	17748 a
1000	16447 a
Media	17863.71
Tukey ($\alpha=0.05$)	3573.5

Medias con la misma literal son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$); ppm= partes por millón

Con relación a lo mencionado, se calcularon coeficientes de correlación de Pearson para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de maíz con NPsHA (Cuadro 8).

Los resultados mostraron correlación positiva entre la variable vigor de germinación con porcentaje de germinación ($r=0.94^{**}$) e índice de vigor ($r=0.75^{**}$), en cambio la relación con la variable semillas sin germinar fue negativa, mientras que para la variable plántulas anormales se encontró correlación negativa significativa ($r=-0.42^*$); las variables como peso seco, longitud de plúmula y longitud de radícula no presentaron correlaciones significativas con el porcentaje de vigor de germinación (Cuadro 8), para semillas y plántulas de maíz..

Igualmente, los resultados manifestaron correlación negativa altamente significativa entre germinación y plántulas anormales ($r=-0.52^{**}$) y semillas sin germinar ($r=-0.82^{**}$), y una correlación positiva con el índice de vigor ($r=0.74^{**}$); en cambio las demás variables como peso seco, longitud de plúmula y longitud de radícula no presentaron correlación significativa con el porcentaje de germinación (Cuadro 8).

El porcentaje de plántulas anormales solo mostró una correlación positiva significativa con la variable del peso seco de plántula ($r=0.35^*$). Las variables restantes no presentaron diferencias estadísticas en correlación con la variable plántulas anormales (Cuadro 8). En cuanto a las semillas sin germinar de maíz, se manifestó solo una correlación negativa altamente significativa con índice de vigor ($r=-0.67^{**}$), las variables restantes no presentaron diferencias estadísticas.

Por otro lado, se mostraron un par de correlaciones positivas significativas entre la variable de peso seco de plántula con longitud de plúmula ($r=0.35^*$) y con longitud radícula ($r=0.34^*$) (Cuadro 8).

La variable longitud de vástago presentó una relación positiva significativa con el índice de vigor ($r=0.38^*$). Por último, respecto al bioensayo con semillas de maíz la longitud de radícula presentó una correlación significativa con el índice de vigor ($r=0.43^*$).

Cuadro 8. Coeficientes de correlación Pearson de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de maíz (*Zea mays*) tratadas con NPsHA.

Variab les	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	LP (cm)	LR (cm)	INVIGOR
Vigor (%)	0.94**	-0.42*	-0.82**	-0.07 _{NS}	-0.17 _{NS}	0.00 _{NS}	0.75**
Germinación (%)		-0.52**	-0.82**	-0.14 _{NS}	-0.21 _{NS}	-0.13 _{NS}	0.74**
PA (%)			0.06 _{NS}	0.35*	0.08 _{NS}	0.30 _{NS}	0.29 _{NS}
SSG (%)				-0.07 _{NS}	0.19 _{NS}	-0.05 _{NS}	-0.67**
PS (mg/plántula)					0.35*	0.34*	0.17 _{NS}
LVAS (cm)						0.29 _{NS}	0.38*
LR (cm)							0.43*

Vigor= Plántulas normales al primer conteo; Germinación= Plántulas normales al segundo conteo; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; PS= Peso seco; LP= Longitud de plúmula; LR= Longitud de radícula; INVIGOR= Índice de vigor; NS= Diferencias no significativas; *= Diferencias significativas ($P \leq 0.05$). **=Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.001$).

Para las variables evaluadas en semillas y plántulas de rábano, también se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson (Cuadro 9).

La información generada en este trabajo mostró una correlación positiva altamente significativa entre vigor de germinación con porcentaje de germinación ($r=0.69^{**}$), en cuanto a la relación con la variable semillas sin germinar fue negativa altamente significativa ($r=-0.79^{**}$); mientras que para la variable plántulas anormales ($r=-0.46^{*}$) se encontró correlación negativa significativa e índice de vigor se encontró correlación positiva significativa ($r=0.45^{*}$); las variables como peso seco de plántula, longitud de vástago y longitud de radícula no presentaron diferencias estadísticas en correlación con el porcentaje de vigor de germinación.

La correlación entre la variable porcentaje de germinación y plántulas anormales ($r=-0.67^{**}$), semillas sin germinar ($r=-0.68^{**}$) y peso seco ($r=-0.69^{**}$) resultaron negativas y significativas; pero, habiendo una correlación positiva con índice de vigor ($r=0.79^{**}$); en cambio, las demás variables como longitud de vástago y longitud de radícula no presentaron correlación significativa con el porcentaje de germinación.

El porcentaje de las plántulas anormales mostró una correlación positiva altamente significativa con la variable del peso seco de plántula ($r=0.56^{**}$) y una relación negativa altamente significativa con el índice de vigor ($r=-0.72^{**}$). En relación con longitud de vástago ($r=-0.33^{**}$) y con la longitud de radícula ($r=-0.38^{*}$), se observó una correlación negativa significativa y no se obtuvo relación estadística con respecto a la variable semillas sin germinar.

En cuanto a las semillas sin germinar se manifestó solo una correlación negativa significativa con índice de vigor de germinación ($r=-0.45^{*}$), las variables restantes no presentaron relaciones estadísticas.

En cambio, con la variable peso seco, se obtuvo una correlación negativa altamente significativa entre la variable de índice de vigor ($r=-0.54^{**}$). Las variables restantes no presentaron correlaciones estadísticas con el peso seco de plántula.

La longitud de vástago presentó un par de correlaciones positivas significativas con longitud de radícula ($r=0.43^*$) y con el índice de vigor ($r=0.47^*$).

Por último, respecto al bioensayo con semillas de rábano la longitud de radícula presentó una correlación altamente significativa con el índice de vigor ($r=0.69^{**}$).

Considerando la información obtenida en estos bioensayos con dos especies agrícolas, podemos señalar que el uso de la NT y su aplicación en el área agrícola puede aportar innovación necesaria para mejorar algunos procesos de producción, que coadyuven en la obtención de mayores producciones y de alta calidad, así como incrementar la competitividad y desarrollo del sector agropecuario.

El trabajo realizado por Niranjan *et al.* (2014), menciona que hasta ahora se han realizado pocos estudios sobre el efecto favorable de las NP_sHA en el sistema de la planta. Sin embargo, sus resultados han demostrado que las NPs de hidroxiapatita mejoraron la germinación y la tasa de crecimiento de las semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de nanopartículas de hidroxiapatita (NP_sHA), a diferentes concentraciones sobre el proceso de germinación en semillas de maíz *var.* GENEX-724 y de rábano *var.* Champion, así como su respuesta en parámetros de calidad fisiológica. En este trabajo se observó que la aplicación de NP_sHA durante la fase de imbibición de la semilla, inhibe la germinación, pero mejora la expresión de algunas variables evaluadas. Esto permite sugerir que estas NPs poseen un efecto positivo al aplicarse a diferentes cultivos siempre y cuando se utilicen en las dosis adecuadas para evitar problemas de fitotoxicidad.

Ya se ha señalado que la concentración óptima de cualquier tipo de NPs por aplicar depende de la especie en estudio. No obstante, los estudios efectuados hasta ahora revelan que las NP_sHA generan un incremento en algunas respuestas fisiológicas en las semillas, pero de igual manera estas respuestas son diferentes, dependiendo de la especie estudiada.

Cuadro 9. Coeficientes de correlación Pearson de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de rábano (*Rhapanus sativus*) tratadas con NPsHA.

Variables	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	LVAS (cm)	LR (cm)	INVIGOR
Vigor (%)	0.69**	-0.46*	-0.79**	-0.21 _{NS}	-0.26 _{NS}	0.012 _{NS}	0.45*
Germinación (%)		-0.67**	-0.68**	-0.69**	0.08 _{NS}	0.15 _{NS}	0.79**
PA (%)			0.14 _{NS}	0.56**	-0.33*	-0.38*	-0.72**
SSG (%)				0.15 _{NS}	0.30 _{NS}	-0.06 _{NS}	-0.45*
PS (mg/plántula)					-0.29 _{NS}	-0.009 _{NS}	-0.54**
LVAS (cm)						0.43*	0.47*
LR (cm)							0.69**

Vigor= Plántulas normales al primer conteo; Germinación= Plántulas normales al segundo conteo; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; PS= Peso seco; LVAS= Longitud de vástago; LR= Longitud de radícula; INVIGOR= Índice de vigor; NS= Diferencias no significativas; *= Diferencias significativas ($P \leq 0.05$). **=Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.0001$).

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que las NPsHA aplicadas a semillas de maíz var. GENEX-724 y a semillas de rábano var. Champion, a través de suspensiones durante el proceso de imbibición, promueven un aumento en la longitud de vástago, longitud de radícula y en el peso seco de plántula, debido posiblemente al incremento en la división y elongación celular.

Las NPsHA aplicadas en semillas de maíz variedad GENEX-724, generaron una expresión positiva en la variable peso seco de la plántula al imbibir en 50 y 200 ppm.

En maíz, se obtuvo correlación positiva significativa entre el índice de vigor y las siguientes variables: vigor de germinación, germinación, longitud de vástago y longitud de radícula.

Las plántulas de rábano mostraron una mejor respuesta al imbibir semillas en NPsHA, ya que el peso seco de plántula, la longitud de vástago y de radícula, al aplicar 200ppm, presentaron un incremento, con respecto a los otros tratamientos.

En rábano se observó una correlación positiva y significativa entre la variable porcentaje de vigor de germinación y porcentaje de germinación, así mismo entre longitud de radícula y longitud de vástago. Otra correlación positiva y significativa se presentó entre índice de vigor y longitud de vástago y longitud de radícula.

Los resultados anteriores permiten concluir que la aplicación de NPsHA a ciertas concentraciones funcionan como promotoras de desarrollo, al evidenciar un mayor tamaño de plántulas y un incremento en el crecimiento y en el peso seco de estas.

Mejía- de Tafur y Menjívar-Flores (2010) sugieren que el fósforo participa en los procesos metabólicos, tales como la fotosíntesis, la transferencia de energía y la síntesis y degradación de los carbohidratos. Por lo que en conjunto con el calcio tienen una relación para el mejor desarrollo de las plántulas; sin embargo, no mejoraron la germinación de las semillas.

RECOMENDACIONES

Cabe destacar que el empleo de NPsHA pueden fomentarse para su uso en los diversos sistemas de producción agrícola en dosis moderadas, para poder reducir el impacto ambiental derivado del excesivo uso de fertilizantes agrícolas empleados para abastecer la demanda que los cultivos, por estos y otros elementos esenciales para una óptima nutrición y desarrollo.

Por otro lado, las NPsHA al ser aplicadas pudiesen fortalecer los sistemas de producción para obtener una mejor respuesta en el crecimiento de las especies vegetales, a través las diferentes etapas de desarrollo, a fin de incrementar al máximo la productividad y el rendimiento de cada especie en particular.

En este trabajo el motivo de estudio fue el cultivo del rábano y maíz, debido a que son especies agrícolas de importancia por considerarse en el sustento de la alimentación de millones de personas, además son la materia prima estratégica de la ganadería y la industrialización de alimentos. Si bien la tendencia se orienta a la búsqueda de encontrar las concentraciones óptimas de NPs para cada especie en particular, que promuevan un crecimiento y desarrollo positivo a través de las diferentes etapas fenológicas del cultivo, para explotar al máximo su potencial genético y su productividad.

Siendo la NT una ciencia novedosa que ya se aplica en todos los sectores de la industria alimenticia, médica, electrónica, mecánica, aeroespacial, etc., es importante que, en los Centros de Investigación e Instituciones de Educación Superior, se experimente e investigue, la manera de diseñar y sintetizar nanopartículas con características específicas, además que se hagan valoraciones del efecto que causan en sistemas biológicos como son plantas de interés económico y agronómico. Por último, la metodología y los tratamientos aquí aplicados deben repetirse en estas y otras condiciones, así como en otras especies agrícolas, con la finalidad de validar los resultados obtenidos y para posteriormente hacerlos del conocimiento público y tratar de transferirlos para su uso en sistemas de producción en condiciones de agricultura protegida, así como en campo abierto.

VI. LITERATURA CITADA

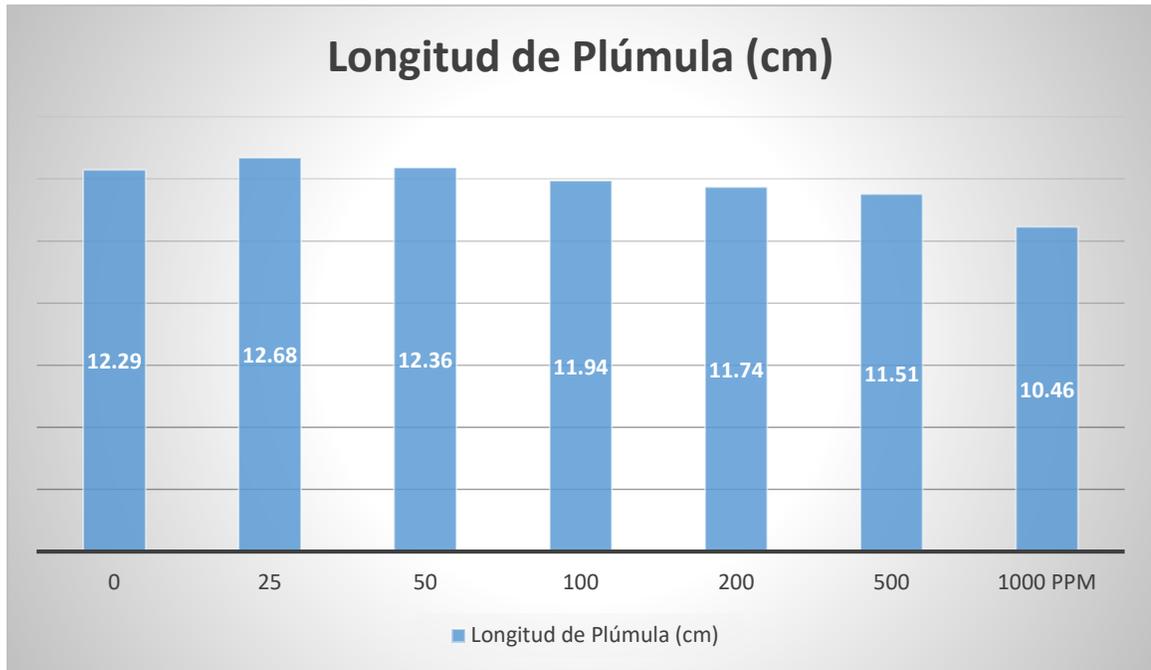
- Biogenic. 2017. Nanotecnología y su uso en la agricultura. Disponible en: <http://blogs.eltiempo.com/biogenic-colombia/2017/08/18/nanotecnologia-y-su-uso-en-la-agricultura/>
- Bolívar, G.2019. Hidroxiapatita: estructura, síntesis, cristales y usos. Disponible en: <https://www.lifeder.com/hidroxiapatita/>
- Carrillo González, R., &M. D. C. A. González Chávez. 2009. La nanotecnología en la agricultura y rehabilitación de suelos contaminados. Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología, UNAM. 2(2) pp. 50-63
- Chávez-Mendoza, R.M. 2018. Comparación del efecto de nanopartículas de óxido de zinc comerciales y de ingeniería sobre parámetros de calidad fisiológica en semillas de maíz (*Zea mays L.*).Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.Salttillo, Coahuila, México.
- Díaz Álvarez, H. J., Liriano González, R., Cruz, A., y Osmani, E. 2019. Evaluación agronómica de fertilizantes de fórmula completa mezclados con zeolita natural en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum L.*). *Centro Agrícola*, 46(1), 24-30.
- García-Garduño, M. V., y Reyes-Gasga, J. 2006. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 9(2), 90-95.
- Kottegoda, N., Sandaruwan, C., Priyadarshana, G., Siriwardhana, A., Rathnayake, U. A., Berugoda Arachchige, D. M., y Amaratunga, G. A. 2017. Urea-hydroxyapatite nanohybrids for slow release of nitrogen. *ACS nano*, 11(2), 1214-1221.
- Lira-Saldívar, R.H., Canul-Tun, C., Méndez-Argüello, B. y De Los Santos-Villareal, G. 2016b. Efecto de nanopartículas en aspectos fisiológicos, bioquímicos y

- moleculares de plantas. En R. H. Lira-Saldivar y B. Méndez-Argüello, Agronano Tecnología Nueva Frontera de la Revolución Verde. pp. 173-206.
- Lira-Saldivar, R. H., Méndez Argüello, B., Vera Reyes, I. y de los Santos Villareal, G. 2016a. Potencial de la nanotecnología para el desarrollo de la agricultura sustentable. En R. H. Lira Saldivar y B. Méndez Argüello , Agronano Tecnología Nueva Frontera de la Revolución Verde. pp. 30-74.
- Lira-Saldivar, R. H., Méndez-Argüello, B., Vera-Reyes, I. y de los Santos-Villarreal, G. 2018d. Agronanotecnología: una nueva herramienta para la agricultura moderna. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, 50(2), 395-411.
- Lira-Saldivar, R.H., y Méndez-Argüello, B. 2018c. Nanotecnología: Un Nuevo Paradigma Científico en la Producción Agrícola del Siglo XXI. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 5(13):1-2.
- Lugo Medina, E., García Gutiérrez, C., y Ruelas Ayala, R. D. 2010. Nanotecnología y nanoencapsulación de plaguicidas. Ra Ximhai, pp. 63-67.
- Manfrini, D. 2004. Aspectos a tener en cuenta: Análisis de vigor en semillas. Revista del plan agropecuario, pp. 56-58.
- Mejía de Tafur, M. S., & Menjívar Flores, J. C. (2010). Nutrición mineral de arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Méndez-Argüello, B., Vera-Reyes, I., Mendoza-Mendoza, E., García-Cerda, L. A., Puente-Urbina, B. A., & Lira-Saldivar, R. H. 2016. Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annuum* por nanopartículas de óxido de zinc. Nova scientia, 8(17), 140-156.
- Mendoza Uribe, G., y Rodríguez López, J. 2007. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. Perfiles Latinoamericanos, pp. 161-186.

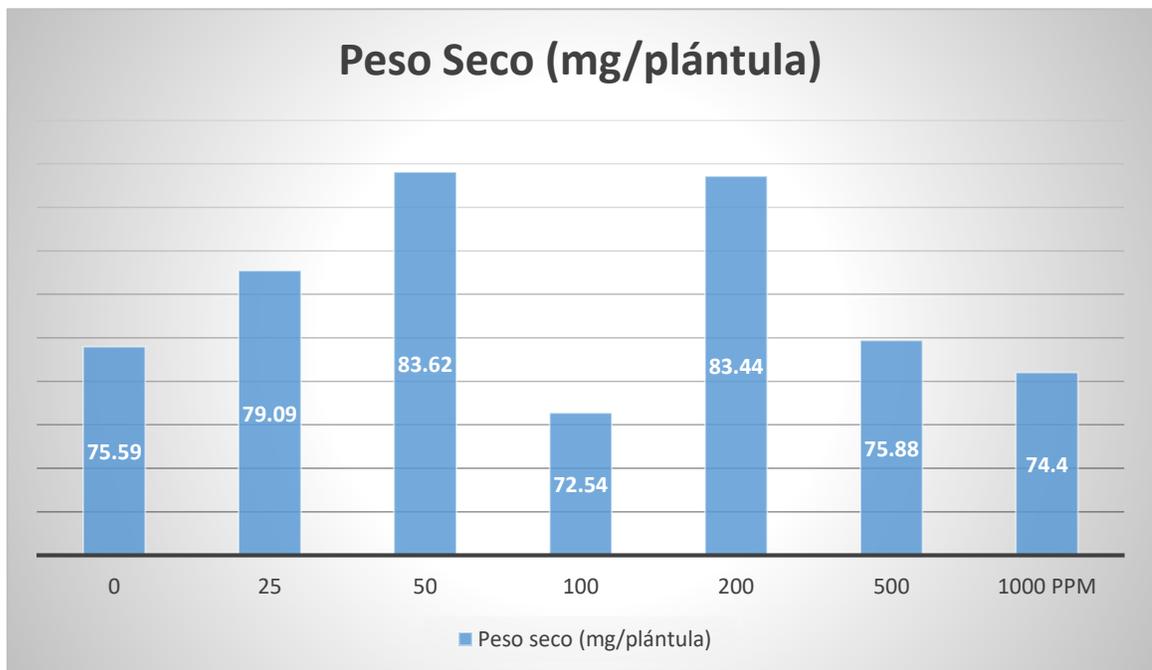
- Niranjan, B., Anindita, D., Sukhen, D., Ruma, B. y Papiya, N. 2014. Effect of hydroxyapatite nanorod on chickpea (*Cicer arietinum*) plant growth and its possible use as nano-fertilizer. *Journal of Plant Physiology*, pp. 1061-1069.
- Ortiz, C., Carrillo Gonzáles, R., González Chaves, M., y López, L. 2012. Síntesis de nanopartículas de hidroxapatita y su toxicidad en lechuga (*Lactuca sativa L.*). *Agroproductividad*, pp. 98-105.
- Rodríguez Fernández, O. 2016. Desarrollo de la investigación sobre nanotecnología en el centro de investigación en química aplicada (CIQA-CONACYT). En R. H. Lira Saldivar, & B. Méndez Argüello, *Agronano Tecnología Nueva Frontera de la Revolución Verde*. pp. 7-23.
- Ruiz Torres, N. A., García López, J. I., Lira Saldivar, R. H., Vera Reyes, I., y Méndez Argüello, B. 2016. Efecto de nanopartículas metálicas y derivadas del carbón en la fisiología de semillas. En R. H. Lira Saldivar, & B. Méndez Argüello, *Agronano Tecnología Nueva Frontera de la Revolución Verde*. pp. 75-114.
- Zanella, R. 2012. Metodologías para la síntesis de nanopartículas, controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*. pp. 69-71.

VII. ANEXOS

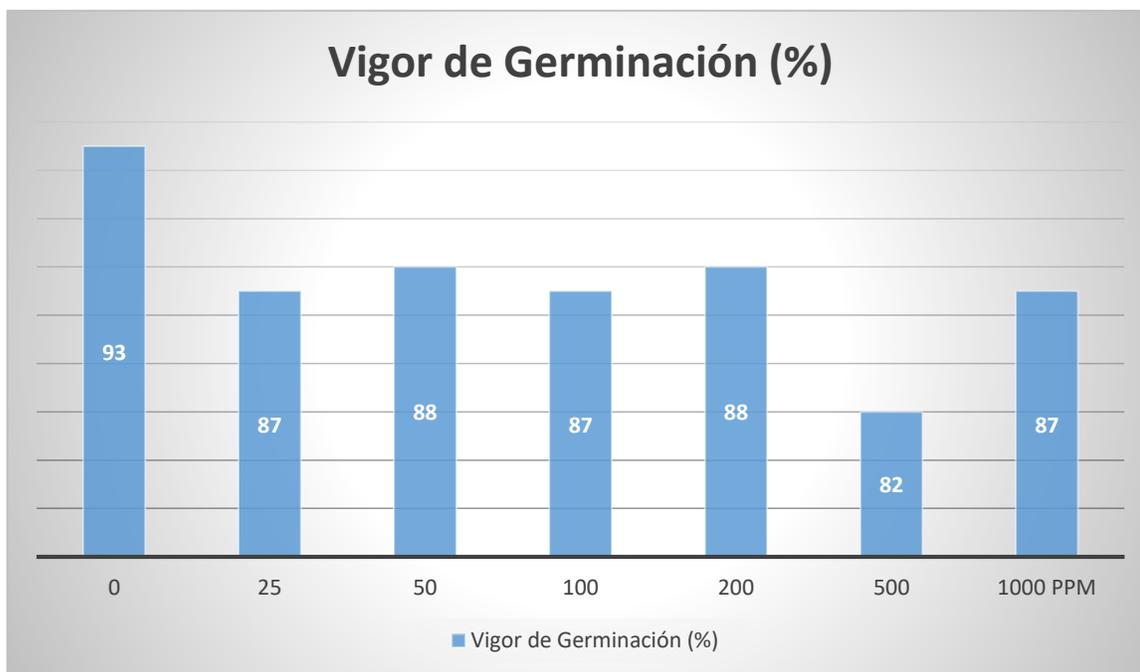
Anexo 1. Longitud de plúmula (cm) por concentración en plántulas de Maíz (*Zea mays*) tratadas con NPSHA.



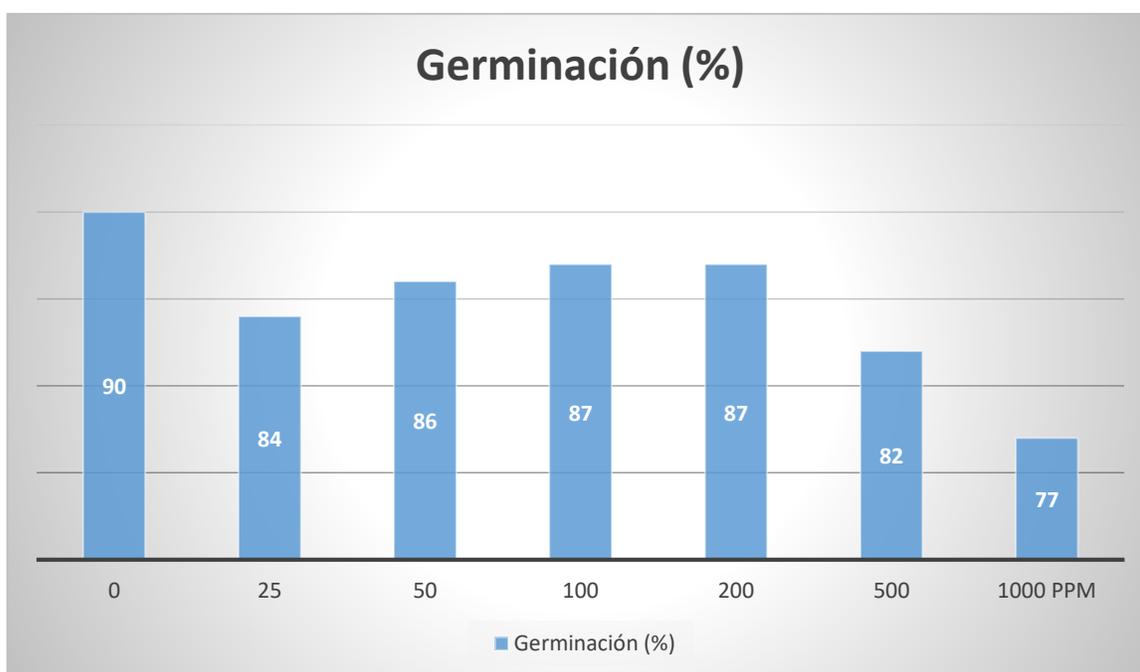
Anexo 2. Peso seco (mg/plántula) por concentración en plántulas de Maíz (*Zea mays*) tratadas con NPSHA.



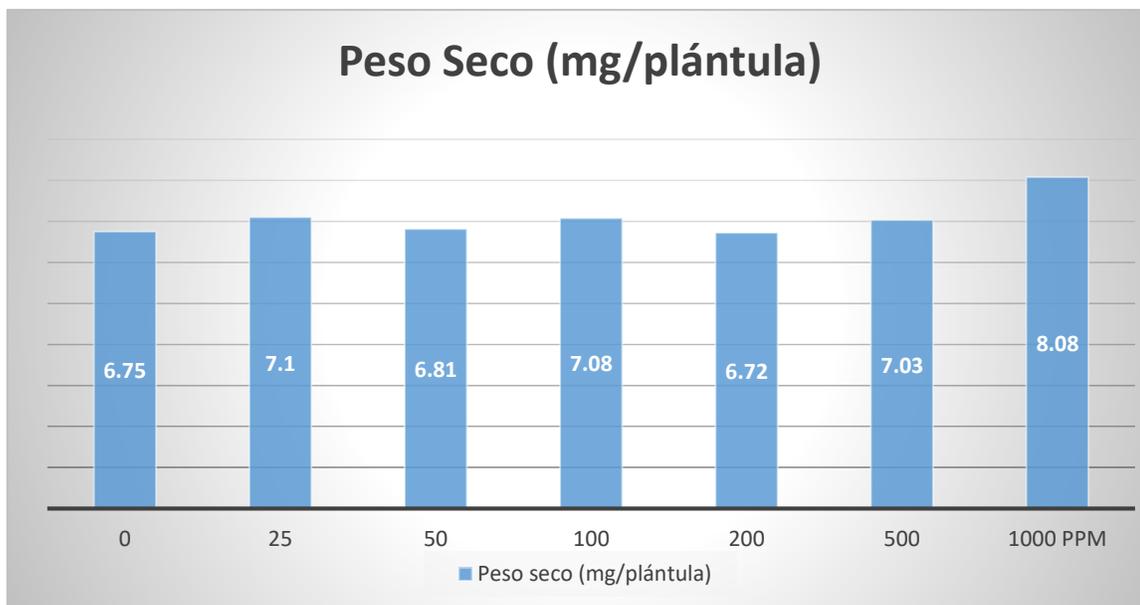
Anexo 3. Porcentaje de vigor de germinación por concentración en semillas de rábano (*Rhapanus sativus*) tratadas con NPShA.



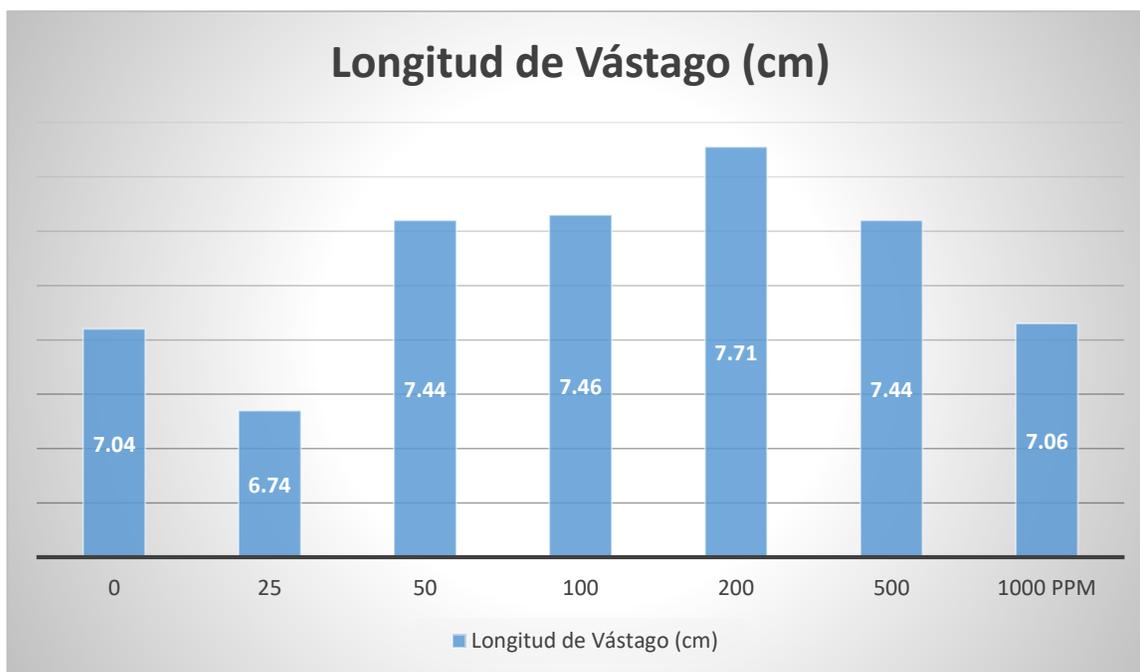
Anexo 4. Porcentaje de germinación por concentración en semillas de rábano (*Rhapanus sativus*) tratadas con NPShA.



Anexo 5. Peso seco (mg/plántula) por concentración en plántulas de rábano (*Rhapanus sativus*) tratadas con NPShA.



Anexo 6. Longitud de vástago (cm) por concentración en plántulas de rábano (*Rhapanus sativus*) tratadas con NPShA.



Anexo 7. Longitud de radícula (cm) por concentración en plántulas de rábano (*Rhapanus sativus*) tratadas con NPSHA.

