

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Efecto De La Aplicación Foliar De Nanopartículas De Cobre En Plantas De
Tomate Bajo Estrés Salino

Por:

DANIEL LÓPEZ VARGAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila, México.

Febrero, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Efecto De La Aplicación Foliar De Nanopartículas De Cobre En Plantas De
Tomate Bajo Estrés Salino.

Por:

DANIEL LÓPEZ VARGAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Antonio Juárez Maldonado
Asesor Principal

Dr. Alberto Sandoval Rangel
Coasesor

Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Coasesor

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



Saltillo, Coahuila, México.

Febrero, 2020

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fortaleza de no rendirme y permitir haber concluido mis estudios satisfactoriamente.

“A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro”

Un total y profundo agradecimiento a mi ALMA MATER por la atención, preparación y cobijo que me dio durante mi estancia en ella logrando mi formación profesional.

Al Dr. Antonio Juárez Maldonado por la asesoría y tiempo que me brindo para hacer este trabajo.

A mi Comité de asesores, por su gran apoyo y conducción del trabajo de investigación.

A todos mis maestros de la universidad.

Por transmitirme sus conocimientos, experiencias y orientarme por mí paso en la universidad logrando integrar un profesionista más al mundo laboral.

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme continuar aquí, asombrándome cada vez más de su enorme energía.

A mis padres, hermanos y familiares por todo su apoyo.

Finalmente, a todos aquellos que en parte o de algún modo me han ayudado, gracias porque todos aportaron su granito de arena para aprender algo de todos y cada uno de ustedes, lo cual me ha servido para formarme día a día en la parte más difícil, a formarme como persona

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIAS.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
INDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
HIPÓTESIS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Generalidades del tomate.....	5
Características morfológicas.....	6
Tallo.....	6
Raíz.....	6
Hoja.....	6
Flores.....	6
Fruto.....	6
Requerimientos del cultivo.....	7
Temperatura.....	7

La luz o régimen luminoso	7
Humedad del suelo	7
Humedad relativa	8
Tipo de suelo.....	8
pH	8
Calidad de fruto	8
Sólidos solubles totales.....	9
El índice de acidez (pH).	9
Acidez titulable total	9
Importancia económica del cultivo.....	10
Salinidad en los cultivos	11
Tolerancia al estrés salino.....	15
Importancia del Cobre en las plantas	17
Nanotecnología en la agricultura	19
Nanopartículas y salinidad.....	21
Nanopartículas de Cobre	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Ubicación del experimento	26
Desarrollo de cultivo	26
Nanopartículas de Cobre.....	28

Tratamientos.....	28
Crecimiento y desarrollo	29
Contenido de minerales.....	30
Pigmentos fotosintéticos.....	30
Calidad de fruto	31
Análisis estadístico	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Variables agronómicas	33
Contenido de minerales en hojas y frutos.....	35
Variables de pigmentos fotosintéticos	37
Variables de calidad de fruto	38
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido nutricional del fruto de tomate (composición química media en masa fresca)	10
Tabla 2. Variables agronómicas de las plantas de tomate con aplicación foliar de NPs de Cu y bajo estrés salino.....	34
Tabla 3. Contenido de minerales en hojas y frutos de las plantas de tomate con aplicación foliar de NPs de Cu y bajo estrés salino.....	36
Tabla 4. Contenido de clorofilas en las hojas de las plantas de tomate con aplicación foliar de NPs de Cu y bajo estrés salino.....	38
Tabla 5. Calidad de fruto de las plantas de tomate con aplicación foliar de NPs de Cu y bajo estrés salino.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de tomate tratadas con nanopartículas de cobre y sometidas a estrés salino.....	27
Figura 2. Morfología de las nanopartículas de cobre obtenidas por SEM.....	28
Figura 3. Aplicación de las nanopartículas de cobre en plantas de tomate....	.29
Figura 4. Digestión de muestras de fruto de tomate con ácido nítrico.....	30
Figura 5. Frutos de tomate colectado para análisis de calidad de fruto.....	33

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en invernadero y laboratorios de la UAAAN y el CIQA. Se utilizó el tomate de tipo saladette y crecimiento indeterminado de la variedad Huno F1. Las NPs de Cu se sintetizaron en el CIQA. Los tratamientos fueron: 250 mg L⁻¹ de NPs de Cu, NaCl (50 mM), 250 mg L⁻¹ de NPs de Cu + NaCl (50 mM) y un Testigo absoluto (agua destilada).

El diseño experimental fue bloques completos al azar. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias LSD ($p \leq 0.05$), los datos fueron evaluados con el software Infostat 2018. Se determinaron variables agronómicas, pigmentos fotosintéticos, elementos minerales y calidad de fruto.

Para las variables agronómicas se utilizaron 18 unidades experimentales por tratamiento y para el resto de las variables se consideraron 6 repeticiones por tratamiento. En los resultados obtenidos, el tratamiento NPs de Cu + NaCl disminuyó la altura de la planta, peso fresco aéreo, peso seco aéreo y rendimiento en 7.41%, 13.97% 15.42% y 37.37%, respectivamente comparado con el testigo. Se observó una mayor acumulación de Cu en hojas y frutos en todos los tratamientos. Los pigmentos fotosintéticos no presentaron diferencias significativas con el testigo.

En la firmeza de los frutos se observó un incremento de 21.41% con NPs de Cu, 21.05% con NPs de Cu + NaCl y 15.44% con NaCl, con respecto al testigo. Para el pH se obtuvieron incrementos de 0.23% con NaCl, 2.52% con NPs de Cu y 2.75% con NPs de Cu + NaCl y para la CE, 25.53% con NaCl, 9.91% con NPs de Cu y 10.81 con NPs de Cu + NaCl.

El contenido de SST incremento 17.48% con NaCl y 17.86 con NPs de Cu + NaCl y para la acidez titulable se observó una disminución de 14.90%, comparadas con el testigo. Estos resultados demostraron que la aplicación foliar de nanopartículas de cobre puede modificar la capacidad de adaptación de la planta de tomate lo que posiblemente genere una tolerancia al estrés salino.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas, cobre, foliar, estrés, salinidad, tomate.

INTRODUCCIÓN

El estrés por salinidad es el factor limitante para la producción sostenible de cultivos. Un suelo se considera salino cuando la conductividad eléctrica (CE) de la solución saturada del suelo alcanza 4 dS m^{-1} , que es equivalente a aproximadamente 40 mM de NaCl. Este nivel de salinidad genera una presión osmótica de aproximadamente 0.2 MPa y reduce el crecimiento y los rendimientos en un rango de 20% a 50% de la mayoría de las plantas (Munns y Tester, 2008; Shrivastava y Kumar 2015) debido a que produce toxicidad iónica, estrés osmótico y un desequilibrio de nutrientes en el sistema de las plantas (Kumar *et al.*, 2018).

Por otro lado, el progreso en la ciencia ha permitido el desarrollo de nuevas tecnologías para enfrentar los problemas presentes en la agricultura. Una de estas es la aplicación de la nanotecnología (NT) debido a su capacidad para proporcionar una entrega adecuada de nutrientes y plaguicidas resultantes en la mejora de los rendimientos o los valores nutricionales de la cosecha (De la Rosa *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016).

Actualmente, se ha reconocido el potencial de la nanotecnología con la aplicación de nanomateriales (NMs) como nanofertilizantes, nanopartículas (NPs), o nanopesticidas (De la Rosa *et al.*, 2017). Éstos NMs pueden facilitar una germinación más rápida de las plantas, o ayudar a las plantas a tolerar estrés biótico y abiótico, favorecen un manejo más eficiente de nutrientes, y aumentan el crecimiento de las plantas, lo que puede generar un impacto ambiental reducido en comparación con los métodos tradicionales (Genady *et al.*, 2017).

Wang *et al.* 2016, mencionan que la NT requiere la utilización de NPs con propiedades excepcionales para aumentar los rendimientos y la productividad de los cultivos. Las NPs fabricadas son materiales entre 1 y 100 nm y existen como metaloides, óxidos metálicos, no metales y NMs de carbono y como dendrímeros funcionalizados, liposomas, y puntos cuánticos.

En particular, el cobre es un micronutriente esencial asociado con los procesos biológicos de las plantas y desempeña un papel importante en el mantenimiento del metabolismo natural y el crecimiento de las plantas (Tie *et al.*, 2012).

Diversos estudios han investigado sobre el efecto de las NPs en plantas sometidas a estrés salino. Se ha reportado que las NPs de ZnO en concentraciones de 15 a 30 mg L⁻¹ tienen efectos positivos sobre el metabolismo de las plantas de tomate bajo estrés salino (Alharby *et al.*, 2016). Del mismo modo, se ha demostrado que las concentraciones de 0,05 a 2,5 mg L⁻¹ de Ag NPs podrían mejorar la tolerancia de las plantas de tomate a la salinidad (Khan *et al.*, 2017). Hernández-Hernández *et al.*, 2017 reportaron un incremento de 9% en el rendimiento de tomate bajo estrés salino, así como un aumento de vitamina c de 42% en frutos de tomate tratados con quitosán y NPs de Cu.

Además, se ha demostrado que el estrés por salinidad en tomate causa cambios en la calidad de la fruta, lo que afecta indirectamente al rendimiento (Pašalić *et al.*, 2016), sin embargo, muchos investigadores creen que las plantas de tomate que se cultivan en condiciones de alta salinidad podrían contener niveles elevados de fructosa, glucosa, sólidos solubles totales, aminoácidos y ácidos orgánicos (Zhang *et al.*, 2017).

Noaman *et al.*, 2004, mencionan que los cambios inducidos por la sal en el sistema de la planta podrían mejorarse mediante la aplicación foliar de nutrientes.

La razón es que los nutrientes aplicados exógenamente son fácilmente accesibles para las plantas en comparación con el suelo aplicado y, además, no se fijan ni diluyen en el gran volumen de suelo (Baloch *et al.*, 2008).

Con lo anterior, debido a las propiedades que presentan las NPs en comparación con los materiales a granel y con las funciones que tiene el cobre, se puede inferir que las NPs de Cu aplicadas foliarmente podrían disminuir los efectos de las sales en las plantas de tomate. Por lo que el presente trabajo evaluó el efecto de la aplicación foliar de NPs de Cu en plantas de tomate bajo estrés salino para conocer las respuestas de tolerancia y los mecanismos de defensa

OBJETIVO GENERAL

Conocer los efectos de la aplicación foliar de NPs de Cu en el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate y determinar la capacidad para inducir la tolerancia al estrés salino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate bajo estrés salino y tratadas con NPs de Cu aplicadas foliarmente.
- Evaluar los pigmentos de la hoja para conocer los cambios derivados con la aplicación de las nanopartículas de cobre y NaCl.
- Determinar el contenido mineral de Cu en hojas y frutos de tomate bajo estrés salino y tratados con NPs de Cu absorbidos foliarmente.

- Evaluar la calidad de fruto de plantas de tomate bajo estrés salino para conocer los cambios asociados a la calidad nutracéutica derivada de la aplicación foliar de NPs de Cu.

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de cobre aplicadas foliarmente pueden modificar la capacidad de adaptación de las plantas, aumentando la tolerancia al estrés salino.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades del tomate

Desde el descubrimiento de América, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se ha distribuido en todo el mundo. Al principio, se consideró una curiosidad y se informó erróneamente que tenía frutos venenosos. No fue hasta principios del siglo XX cuando el tomate se hizo realmente popular y, en los últimos años, se ha convertido en una de las frutas más importantes producidas en todo el mundo (Morris y Taylor, 2017).

Es una especie incluida dentro de la familia de las Solanáceas cultivada en todo el mundo para su consumo tanto fresco como procesado. Se conocen nueve especies del género *Solanum*, pero solamente *Solanum lycopersicum* es cultivado comercialmente como hortaliza (Nuez y Díez, 2013).

Se trata de una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Hay dos tipos diferenciados por el tipo de crecimiento que tienen. Están las de crecimiento determinado y las de crecimiento indeterminado. La planta indeterminada es la normal, en ella, los tallos presentan segmentos uniformes con tres hojas (con yemas) y una inflorescencia, terminando siempre con un ápice vegetativo. A diferencia de esta, la planta determinada tiene tallos con segmentos que presentan progresivamente menos hojas por inflorescencia y terminan en una inflorescencia, lo que resulta en un crecimiento limitado (Gómez *et al.*, 2010).

Características morfológicas

Tallo

Los tallos son gruesos y angulosos, de color verde, y la planta presenta tallos secundarios que salen de las axilas de las hojas.

Raíz

El sistema radicular está compuesto por una raíz principal corta y débil, y raíces secundarias que son numerosas y potentes.

Hoja

Las hojas son compuestas anchas, planas con 7-11 folíolos peciolados, lobulados y borde dentado.

Flores

Las flores son hermafroditas, simétricas, regulares e hipóginas. La inflorescencia está compuesta de 4 a 12 flores. La flor contiene cinco estambres fusionados a la corola por sus filamentos, las anteras largas de color amarillo, están unidas lateralmente, formando un cono estaminal que envuelve el gineceo.

Fruto

El fruto es una baya con gran diversidad de tamaños y formas, generalmente de color rojo, bilocular o multilocular, de gruesa placenta con numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginosa. Está unido a la planta por un pedicelo con un engrosamiento articulado que contiene la capa de abscisión. Posee una semilla discoidal lenticular comprimida y embrión enrollado, de diámetro más o menos uniforme.

Requerimientos del cultivo

Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores ambientales que afecta la eficiencia de la fotosíntesis y limita los rendimientos de los cultivos hortícolas (Maroto, 2008). El tomate es una planta hortícola, que se desarrolla muy bien en climas con temperaturas entre 18 y 26 °C, pero exige temperaturas nocturnas de 17 ± 3 °C y diurnas de 23 ± 3 °C para su mejor desarrollo y fructificación (Gómez *et al.*, 2010).

La luz o régimen luminoso

La luz es otro factor importante en la producción de tomate. Los efectos de la intensidad luminosa sobre el crecimiento de las plantas, están relacionados principalmente con la fotosíntesis y la transpiración vegetal (Gómez *et al.*, 2010). El tomate necesita condiciones de muy buena luminosidad, de lo contrario los procesos de crecimiento, desarrollo, floración, polinización y maduración de los frutos pueden verse significativamente afectados (Casanova *et al.*, 2007).

Humedad del suelo

Las exigencias de las plantas de tomate en cuanto a la humedad del suelo son medias y están determinadas por las características del sistema radical y de las hojas, la productividad y calidad del cultivo se ven rápidamente afectadas ante situaciones de exceso o déficit de humedad del suelo, ya que el metabolismo de la planta se altera de manera general (Jaramillo *et al.*, 2007).

Humedad relativa

La humedad relativa es considerada uno de los factores, que mayor incidencia tiene sobre la productividad del cultivo de tomate. El valor óptimo para el desarrollo del tomate se considera del 50-60 %, ya que los altos valores de este indicador favorecen el ataque de plagas y enfermedades (Gómez *et al.*, 2010).

Tipo de suelo

Los suelos más adecuados para el cultivo del tomate son aquellos que poseen una buena estructura y un buen drenaje superficial e interno; de manera tal que los suelos arenosos, areno-arcillosos, arcillo-arenosos y fluvisoles son los que se utilizan regularmente para este cultivo (Casanova *et al.*, 2007)

pH

El tomate puede desarrollarse en suelos con un rango bastante amplio del pH. No obstante, se ha reportado por un gran número de autores que el pH del suelo más adecuado para el cultivo del tomate es de 5,5 a 7,5; mientras que otros señalan que el rango de pH óptimo para el exitoso crecimiento y desarrollo del mismo se encuentra en el rango de 6,0 a 6,5 (Jaramillo *et al.*, 2007).

Calidad de fruto

Los principales componentes que determinan la calidad de las hortalizas, se basan en los siguientes aspectos: apariencia, textura, sabor, acidez, aroma, tamaño, dulzor, forma, color, brillo, firmeza, dureza, astringencia, defectos (externos, internos, patológicos, entomológicos, físicos y mecánicos), valor

nutritivo (contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales) (Sánchez *et al.*, 2011).

En el caso del tomate y considerando las apreciaciones del consumidor y las necesidades del mercado, el estudio de la calidad se ha centrado en los aspectos organolépticos, los cuales dependen principalmente de una mezcla compleja formada por azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos volátiles (Baldwin *et al.*, 2008).

Actualmente, la calidad interna del tomate es estimada a partir de estudios sensoriales y a través de la medición de diferentes parámetros o indicadores como: sólidos solubles totales, pH, acidez titulable y la relación sólidos solubles totales/acidez titulable (Anjanappa *et al.*, 2013; Bartell *et al.*, 2010).

Sólidos solubles totales.

El contenido en sólidos solubles totales es expresado en °Brix. Éste indicador se sitúa entre 4,5 y 7,5 °Brix y puede estar influenciado por otros factores como, el clima, el riego, el estado de madurez de los frutos y otros.

El índice de acidez (pH).

Para la producción industrial de puré de tomate, el pH del zumo se sitúa normalmente entre 4,2 y 4,4, siendo muy raro que se superen estos valores.

Acidez titulable total

La acidez total suele oscilar entre 3.5 y 4.0 g L⁻¹ de pulpa.

El sabor y la textura de los frutos son factores cruciales, que determinan las características organolépticas del tomate, ya que son componentes críticos de la percepción de los consumidores a la hora de seleccionar el producto (Chaib *et al.*, 2007).

La importancia alimenticia del fruto de tomate se debe exclusivamente a sus cualidades nutritivas y a su elevado contenido de sales minerales (Ca, P, K, Fe y Mg) y vitaminas, carotenoides, principalmente el licopeno y fenoles como los flavonoides hacen del fruto de tomate un excelente “alimento funcional” que conlleva unos beneficios fisiológicos adicionales (Tabla 1), así como de requerimientos nutricionales básicos para el normal desarrollo y correcto funcionamiento de los diferentes órganos humanos (Manan *et al.*, 2016). Estas propiedades hacen del tomate una hortaliza de gran interés nutricional y comercial.

Tabla 1. Contenido nutricional del fruto de tomate (composición química media en masa fresca)

Componente	Cantidad	Unidad	Componente	Cantidad	Unidad
Agua	940,0	g kg ⁻¹	Magnesio	200,0	mg kg ⁻¹
Carbohidratos	43,0	g kg ⁻¹	Yodo	17,0	µg kg ⁻¹
Grasa	2,0	g kg ⁻¹	Zinc	2,4	mg kg ⁻¹
Fibra	10,4	g kg ⁻¹	Vitamina B1	0,6	mg kg ⁻¹
Proteína	9,0	g kg ⁻¹	Vitamina B2	0,4	mg kg ⁻¹
Energía	170,0	kcal kg ⁻¹	Vitamina E	7,0	mg kg ⁻¹
Calcio	140,0	mg kg ⁻¹	Vitamina C	137,0	mg kg ⁻¹
Hierro	5,0	mg kg ⁻¹	Vitamina A	136,0	µg kg ⁻¹
Fósforo	230,0	mg kg ⁻¹	Licopeno	160,3	mg kg ⁻¹
Potasio	2040,0	mg kg ⁻¹	Ácidos fenólicos	53,6	mg kg ⁻¹
Sodio	130,0	mg kg ⁻¹	Flavonoides	50,2	mg kg ⁻¹

Fuente: Frusciante *et al.* (2007)

Importancia económica del cultivo

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el tomate es el segundo vegetal más cultivado en el mundo, después de la papa, alcanzándose en el año 2014 valores de

producción de aproximadamente 170.7 millones de toneladas de tomate fresco en todo el mundo, además destaca que el aumento en la producción mundial de tomate con respecto al año anterior ha sido de 7.031 millones de toneladas, un incremento del 4.29 %.

Entre los cinco países más productores del mundo encontramos a China, India, EEUU, Turquía y Egipto. México es el principal proveedor a nivel mundial de tomate con una participación en el mercado internacional de 25.11% del valor de las exportaciones mundiales. Durante 2016, el tomate cubrió 90.67% de las importaciones de EEUU y 65.31% de Canadá (FAOSTAT, 2014).

Actualmente se satisface 100% los requerimientos nacionales con producción interna, Sinaloa es el líder productor, aportó 813 mil toneladas, 37% del total; le siguen San Luis Potosí, Zacatecas y Sonora, con producciones mucho menores, conjuntamente generan 21% del total nacional (SIAP, 2018).

Salinidad en los cultivos

Por otro lado, la salinidad es un problema global para los agricultores, especialmente para los cultivos que se irrigan. La acumulación de sal está relacionada principalmente a un clima seco, materiales parentales ricos en sal para la formación del suelo, drenaje insuficiente y agua subterránea o irrigación con agua salina (Dikilitas y Karakas, 2010).

En el cultivo en invernadero, debido a la alimentación suplementaria intensiva y la falta de lixiviación natural de la tierra, a menudo se produce un estrés salino, especialmente a altas temperaturas y un alto consumo de agua por transpiración de plantas (Pašalić *et al.*, 2016).

Entre todas las sales, el NaCl es la sal más soluble y la sensibilidad de la planta al estrés por NaCl varía significativamente según la especie, el órgano de la planta y la etapa de desarrollo, lo que también afecta la especificidad en las estrategias de defensa antioxidante (Pašalić *et al.*, 2016).

La alta salinidad afecta a las plantas de varias maneras: estrés hídrico osmótico, toxicidad iónica, trastornos nutricionales, estrés oxidativo, alteración de los procesos metabólicos, desorganización de la membrana, reducción de la división y expansión celular y genotoxicidad. También disminuye la eficiencia del fotosistema II, la reducción de la conductancia estomática y la disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas sometidas a estrés por sal (Parida *et al.*, 2005).

Un estrés osmótico genera una escasez de agua (estrés hídrico) que reduce la expansión celular en los extremos de la raíz y en las hojas jóvenes, causando también un cierre de estomas y un desequilibrio iónico afecta el metabolismo de la planta (Turan y Tripathy, 2015).

A nivel celular, el exceso de sal causa la deposición de materiales a nivel de pared celular, disminuyendo su elasticidad. Esto no permite el crecimiento celular, afectando el área foliar, factor que regula la capacidad fotosintética de la planta y así alterando su capacidad metabólica. Los cambios en estos parámetros van a depender de la severidad y duración del estrés y de la especie de planta (Amirjani, 2010).

Monirifar y Barghi (2009) afirmaron que la reducción en el contenido de clorofila en las plantas de alfalfa se correlacionó con la acumulación de Cl, aunque, el ión Cl⁻ es esencial como micronutriente para el crecimiento de las

plantas y participa en la fotosíntesis y en el mantenimiento de la neutralidad eléctrica en las membranas.

Akça y Samsunlu (2012) investigaron los efectos de la salinidad del agua de riego sobre el contenido de clorofila (entre otras variables) en tres cultivos de nogal, encontrando una disminución del crecimiento de las plantas y del contenido de las clorofilas a y b en condiciones de salinidad. Los contenidos de clorofila a y b, prolina y sodio en relación a los diferentes niveles de salinidad mostraron diferencias significativas.

A su vez, Taffouo *et al.*, (2010) estudiaron el efecto del estrés salino sobre seis cultivares de tomate, encontrando un aumento del contenido de sodio en raíz, tallo y hojas, mientras que el contenido de potasio y calcio disminuyeron. Algunos cultivares (considerados tolerantes o moderadamente tolerantes a la salinidad) no modificaron significativamente su contenido de clorofila.

Turan *et al.*, (2009) investigaron el efecto del NaCl sobre el crecimiento y concentración total de clorofila en cultivos de maíz bajo condiciones de invernadero, encontrando que el peso seco de las plantas disminuyó al igual que el contenido total de clorofila. Ante estos efectos, la asimilación de CO₂ disminuye en condiciones salinas, lo que conduce a menores tasas de crecimiento y productividad (Kumar *et al.*, 2018).

La ingesta excesiva de Cl⁻ desde el suelo o el sustrato a los elementos de los vasos del xilema a través de la vía sintética hace que se produzcan fugas de electrolitos e inestabilidad de la membrana, así como toxicidad para los órganos fotosintéticos (Tripathi y Müller, 2015).

Por otro lado, el ion Na⁺ se transloca fácilmente a los brotes y hojas a través de la corriente de transpiración en el xilema, por lo que la acumulación de Na⁺

es mayor en las hojas y brotes que en las raíces. Los altos niveles de sodio desequilibran la captación de otros nutrientes (1) interfiriendo con los transportadores en la membrana plasmática de la raíz, tales como los canales selectivos de potasio, y (2) la reducción del crecimiento de la raíz, lo que disminuye la captación de agua, nutrientes limitantes del crecimiento (fósforo, hierro o zinc) y el crecimiento de microorganismos del suelo, como las micorrizas (Parvaiz y Satyawati, 2008).

Además, los tejidos vegetativos se alimentan principalmente a través del xilema y, por lo tanto, tienden a tener niveles más altos de Na^+ . La toxicidad metabólica de Na^+ generalmente se atribuye a la competencia de Na^+ con K^+ (Kumar *et al.*, 2018).

La presencia de elevadas concentraciones de iones Na^+ y Cl^- pueden modificar la absorción de los nutrientes esenciales, lo que podría derivar en un desequilibrio nutricional, ya que el ión Cl^- puede interferir con los sitios aniónicos implicados en el ligamiento de ARN y con metabolitos aniónicos como bicarbonatos, carboxilatos y azúcares fosfatos, y el Na^+ puede interferir con los sitios catiónicos implicados en el ligamiento de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Munns y Tester, 2008).

La toxicidad iónica es un factor agravante de los síntomas generados por el estrés salino, más que un estrés meramente osmótico, ya que procesos como la germinación, crecimiento, rendimiento, floración y fructificación son afectados por altas concentraciones de sales (Zepeda, 2010).

Además, la salinidad también produce, a más largo plazo, un estrés oxidativo en las plantas, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS).

Tolerancia al estrés salino

Munns y Tester (2008) definieron la tolerancia a la salinidad como la capacidad del cultivo a completar su ciclo de vida desarrollándose en un medio que contiene altas concentraciones de sales solubles. Las diferentes especies vegetales difieren notablemente en sus respuestas de desarrollo frente a la salinidad, clasificándose en tres grandes grupos:

1. Halófitas.

Plantas muy tolerantes, capaces de completar su ciclo de vida en suelos con elevadas concentraciones salinas que oscilan entre 200 y 500 mM NaCl.

2. Halófitas-Glicófitas.

A este grupo pertenecen plantas halófitas que toleran menores concentraciones salinas en un rango de 100-200 mM NaCl y glicófitas tolerantes que son capaces de crecer en ambientes con concentraciones salinas comprendidas entre 50-100 mM de NaCl como el tomate, lechuga, uva, espinaca, pimiento, maíz, pepino, sandía, brócoli, coliflor y flores en general.

3. Glicófitas.

Plantas muy sensibles a la salinidad, que ven afectado su crecimiento a concentraciones de 50 mM NaCl como la manzana, cereza, pera, ciruela, zanahoria, berenjena, fresa, los cítricos y cebolla.

En este sentido la producción de plantas tolerantes al estrés salino es esencialmente necesaria debido a la creciente amenaza del calentamiento global sobre la productividad agrícola, además de la explosión de población prevista en el futuro cercano.

Diversos estudios recientes han demostrado que las plantas ya han evolucionado de desarrollo, morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y tácticas moleculares para detectar y hacer frente a los efectos perjudiciales del estrés por sal (Chandna *et al.*, 2013).

Algunos mecanismos de defensa para la tolerancia a la sal incluyen la osmorregulación, exclusión de sales, estabilización de membrana, antioxidantes y liberación de hormonas (Boriboonkaset *et al.*, 2012).

El estudio de la respuesta al estrés salino en plantas enteras (con un nivel organizacional complejo a diferencia de los cultivos celulares y cultivos de callos) permite analizar procesos como la exclusión de iones en raíz, excreción de iones en brotes o retoños, y deposición de iones en tejidos viejos (Wu *et al.*, 2005).

La base fundamental de la adaptación al estrés salino es el control del transporte de sales a nivel del plasmalema y el tonoplasto y su compartimentalización en los diferentes órganos de la planta. La concentración de sales en el suelo genera un potencial hídrico negativo y una reducción del potencial osmótico, lo que reduce la captación de agua por la planta, generando pérdida de la rigidez de los tejidos y una disminución del potencial osmótico citoplasmático, lo cual es la primera respuesta al estrés salino (Casierra *et al.*, 2000).

La epidermis radicular es el primer tejido que entra en contacto con la sal y por tanto el primero en recibir los cambios osmóticos e iónicos en las células y de disparar los mecanismos de respuesta. Estos mecanismos incluyen: (i) la salida de agua de la célula debido al gradiente osmótico; (ii) la reducción de la disposición de K⁺ en las raíces debido a la reducida actividad de este catión

en la solución del suelo; (iii) el incremento de la salida de K^+ a través de canales selectivos y no selectivos; y (iv) la propagación de estos eventos iónicos generados en la membrana plasmática de la epidermis de la raíz hacia los organelos intracelulares (vacuola principalmente) y hacia otros tejidos de la planta (Zepeda, 2010).

En muchos casos, la principal respuesta que se genera en las glicofitas será la exclusión de iones, principalmente el sodio, primero a nivel de la raíz hacia los diferentes órganos, permitiendo que las plantas toleren concentraciones extracelulares muy elevadas de sales, sobre todo el sodio (Reyes *et al.*, 2008).

Considerando el cultivo de tomate, las investigaciones han demostrado que el estrés por salinidad causa cambios en la calidad de la fruta, lo que afecta indirectamente al rendimiento (Pašalić *et al.*, 2016), sin embargo, muchos investigadores creen que las plantas de tomate que se cultivan en condiciones de alta salinidad podrían contener niveles elevados de fructosa, glucosa, sólidos solubles totales, aminoácidos y ácidos orgánicos (Zhang *et al.*, 2017), esto debido a que un bajo contenido de azúcar activa la fotosíntesis, la movilización de reservas y la exportación, mientras que la presencia abundante de azúcares promueve el crecimiento y el almacenamiento de carbohidratos y a medida que aumenta la concentración de sal, el contenido de sacarosa disminuye mientras que el de glucosa y fructosa aumenta (Gupta y Kaur, 2005).

Importancia del Cobre en las plantas

El cobre es un micronutriente esencial asociado con los procesos biológicos de las plantas. Se absorbe principalmente en forma de Cu^{2+} por las raíces, ya que su forma monovalente (Cu^+) es inestable (Hansch y Mendel, 2009).

Desempeña un papel indispensable en procesos como la respiración mitocondrial, fotosíntesis, el metabolismo del carbono y nitrógeno y en la protección contra el estrés oxidativo, además, imparte resistencia a las enfermedades de las plantas.

También es esencial en la realización de actividades celulares. Por ejemplo, la síntesis de la pared celular requiere Cu, ya que desempeña un papel importante en el metabolismo de las quinonas y los fenoles que afectan la síntesis de metabolitos secundarios (Hansch y Mendel, 2009).

La participación del cobre en la biosíntesis de lignina contribuye a la resistencia contra la penetración de patógenos. La protección contra patógenos también se ofrece a través de niveles elevados de cobre amina oxidasas que generan especies reactivas de oxígeno que son citotóxicas para patógenos y activan el mecanismo de defensa del huésped (Sağlam *et al.*, 2016).

Además, el cobre juega un papel protector contra el estrés abiótico y biótico, ya que funciona como agente reductor y oxidante en las reacciones bioquímicas, debido a que es un componente importante de enzimas como las diamina oxidasas, el citocromo C oxidasa, la polifenol oxidasa, la ascorbato oxidasa, la superóxido dismutasa (Cu-Zn-SOD), (Hasanuzzaman *et al.*, 2018).

La superóxido dismutasa con cofactor Cu-Zn (Cu-Zn SOD) se localiza cerca del complejo PSI y cataliza la rápida desintoxicación de iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) generada en condiciones fotoinhibitorias. La disminución de la actividad SOD de Cu-Zn como resultado del suministro inadecuado de cobre debilita el sistema de defensa antioxidante de las plantas y las hace susceptibles al daño oxidativo (Yu y Rengel, 1999).

Por otro lado, en concentraciones por encima de sus niveles óptimos induce toxicidad en la planta (Chen *et al.*, 2015). Una absorción excesiva de Cu perturba los procesos celulares como la fotosíntesis, la respiración y el metabolismo de las paredes celulares, altera las estructuras proteicas, inactiva algunas enzimas e inhibe el crecimiento de las plantas (Adrees *et al.*, 2015; Cuypers *et al.*, 2011; Mostofa y Fujita, 2013).

Un efecto significativo de la toxicidad del cobre es el estrés oxidativo, como metal redox activo, el Cu produce la formación EROs mediante las reacciones de Fenton-Haber-Weiss, que puede dañar moléculas y membranas mediante la inducción de la peroxidación lipídica (Angelé *et al.*, 2017).

Nanotecnología en la agricultura

Dado el crecimiento de la población mundial, las tecnologías modernas son necesarias en la agricultura y la ciencia de los alimentos, tales como la nanotecnología (NT) y nanobiotecnología.

La NT es un campo de investigación interdisciplinario que juega un papel importante en la promoción de la agricultura y los productos agrícolas. Numerosos nanomateriales (NMs), generalmente a base de metal y a base de carbono se producen para su asimilación, translocación, almacenamiento, y específicamente, por sus efectos en el desarrollo y la mejora en el rendimiento de los cultivos (Ojha *et al.*, 2018), sin embargo se ha demostrado que tienen un efecto mixto en plantas como la alteración del metabolismo, la biomasa y el rendimiento, ya en algunos pueden ser positivos y en otros casos ocasiona efectos negativos (Aslani *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016).

La absorción, translocación y acumulación de éstos NMs depende de su tamaño, concentración, medio de suspensión y también de las plantas que pueden aceptar y rechazar su absorción (Tripathi *et al.*, 2017).

Cuando se exponen a las raíces de las plantas, la captación estos NMs puede ocurrir a través de vías tanto apoplásticas como simplásticas (Deng *et al.*, 2014).

Los NMs pueden difundirse entre las paredes celulares y la membrana plasmática y sus movimientos subsiguientes pueden verse influidos por la presión osmótica y las fuerzas capilares (Lin *et al.*, 2009). También pueden ingresar a las células a través de endocitosis, dependiendo de su morfología, como los nanotubos de carbono, pueden perforar la membrana celular y entrar en el citoplasma (Rico *et al.*, 2011).

Una vez dentro del citoplasma, interactúan con su entorno y se unen con proteínas para formar estructuras más complejas denominadas proteínas corona. Estos complejos se mueven a través de plasmodesmos e interactúan con otros orgánulos, lo que ocasiona alteraciones en los procesos metabólicos, estrés oxidativo y modificaciones genéticas (Nel *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2014).

Cuando se aplican al follaje, los NMs penetran las hojas a través de aberturas estomáticas y pueden ser posteriormente desplazados a otros órganos de la planta, como las raíces (Hong *et al.*, 2014). Las propiedades fisicoquímicas tales como tamaño, forma, pureza, agregación, composición, química y área de superficie, disolución y los grupos funcionales de eNPs de Cu entran entre los principales factores asociados con la variabilidad en la captación de plantas de NMs (Rico *et al.*, 2011).

Los nanomateriales en general, incluyen partículas naturales o sintéticas con al menos de una dimensión menor a 100 nanómetros (nm), mientras que las nanopartículas incluyen al menos dos de sus dimensiones entre 1 y 100 nm y son sintetizados y modificados con el fin de mejorar su desempeño en procesos tecnológicos y la composición del material difiere de acuerdo a su uso potencial (Raza *et al.*, 2017)

Diversos autores han estudiado el efecto de NPs de Cerio (Ce), Cobre (Cu), Oro (Au), Plata (Ag), Níquel (Ni), Silicio (Si), Hierro (Fe), Selenio (Se) y Zinc (Zn), en la germinación, producción, protección y mejoramiento de cultivos, la gestión de fertilizantes y el riego en diferentes cultivos (Shalaby *et al.*, 2016). La habilidad de manipular la materia a nanoescala tiene un enorme potencial para diversas aplicaciones e innovaciones, involucrando nuevos materiales para áreas tan distintas como la alimentaria, textil, química, medicina, tecnologías para la información y energía por mencionar solo algunas. Sus aplicaciones han alcanzado casi todos los aspectos de nuestra vida.

Nanopartículas y salinidad

Wang *et al.*, 2016, mencionan que la NT requiere la utilización de NPs con propiedades excepcionales para aumentar los rendimientos y la productividad de los cultivos. Las NPs fabricadas son materiales entre 1 y 100 nm y existen como metaloides, óxidos metálicos, no metales y NMs de carbono y como dendrímeros funcionalizados, liposomas, y puntos cuánticos (Kumar *et al.*, 2018). Las NPs pueden clasificarse según su dimensionalidad, morfología, composición, uniformidad y aglomeración, ya que pueden ser esféricas, tubulares, de forma irregular y también pueden existir en formas fusionadas, agregadas o aglomeradas.

La dimensionalidad se refiere a su forma o morfología, que puede clasificarlos según su número de dimensiones, tales como unidimensional (1D), bidimensional (2D), tridimensional (3D) (Remedios *et al.*, 2012).

Además, pueden tener diferentes composiciones de superficie, diferentes tipos y densidades de sitios, y diferente reactividad con respecto a procesos como las reacciones de adsorción y redox, que podrían usarse de manera ventajosa para su síntesis y uso en la agricultura (Kumar *et al.*, 2018).

En este ámbito, se encontró que las NPs pueden ingresar a los tejidos de las plantas a través de los tejidos de las raíces o de los órganos y tejidos por encima del suelo (p. Ej., Cutículas, tricomas, estomas, estigmas e hidátodos), así como a través de heridas y uniones de las raíces.

Éstas características han permitido su uso como biosensores para el diagnóstico de enfermedades de las plantas y como vehículos de suministro para el material genético, fertilizantes, y agroquímicos (De la Rosa *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2015).

Además, las NPs pueden facilitar una germinación más rápida de las plantas, o ayudar a las plantas a tolerar estrés biótico y abiótico, un manejo más eficiente de nutrientes, y el aumento del crecimiento de las plantas, lo que puede generar un impacto ambiental reducido en comparación con los métodos tradicionales (Genady *et al.*, 2017).

En este sentido la NT puede generar tolerancia a la salinidad a través de las nanopartículas frente a la regeneración de la fertilidad del suelo o mediante la recuperación de los suelos afectados por la sal, la mayoría de los estudios se basan en eventos fenológicos, análisis morfológico y estado antioxidante, por

lo que la aplicación de diferentes NPs podría ser un enfoque potencial para superar el estrés de salinidad.

Diversos estudios indican que, bajo estrés por salinidad, las NPs de SiO₂ desarrollan una capa en las paredes celulares que ayudan a las plantas a superar el estrés y mantener el rendimiento (Derosa *et al.*, 2010). La aplicación de NPs de SiO₂ aumenta la germinación de las semillas y mejora los sistemas antioxidantes en el tomate y la calabaza (Siddiqui *et al.*, 2014; Haghghi y Pourkhaloee, 2013), por lo que la aplicación de nano SiO₂ provoca una regulación positiva de diversas actividades fisiológicas y bioquímicas y mejora la tolerancia a un estrés abiótico en las plantas (Siddiqui *et al.*, 2014).

Esto se confirma con los estudios realizados por Sabaghnia y Janmohammad, (2015) quienes mencionan que, bajo un estrés por salinidad, la germinación de las semillas y el crecimiento de las lentejas en las plántulas se incrementa con la aplicación de NPs de SiO₂.

La toxicidad del ión Na produce una reducción del rendimiento del cultivo bajo estrés por salinidad y para mitigar la toxicidad de la sal, las NPs aumentan el mecanismo de defensa de las plantas lo que lleva a un aumento y una mejor producción del cultivo en estas condiciones adversas (Savvas *et al.*, 2009).

Nanopartículas de Cobre

A diferencia del Cu a granel, las NPs de Cu tienen propiedades ligadas a su bajo tamaño y alta superficie específica que les confieren características diferentes, como resistencias físicas, reactividad química, conductividad eléctrica, magnetismo y efectos ópticos en comparación con el material de cobre a granel (Hong *et al.*, 2015).

Dosis bajas de estas NPs (5-20 mg de Cu por planta), generan efectos metabólicos debido a la acumulación de Cu y la generación de EROs (Keller *et al.*, 2017). Hong *et al.*, 2015 describieron que las NPs de Cu (0-20 mg L⁻¹) aplicadas vía riego no sólo reducían el crecimiento de lechuga y la alfalfa, sino que también alteraban el contenido nutricional y la actividad enzimática.

Las NPs de CuO (0-2000 mg L⁻¹) aplicadas vía riego inhibieron significativamente el crecimiento de algodón transgénico y convencional a concentraciones superiores a 10 mg L⁻¹ (Le *et al.*, 2014). Mientras que las NPs de CuO (0-200 mg⁻¹) aplicadas foliarmente en plantas de pepino redujeron significativamente la firmeza del fruto comparado con el control a excepción de la concentración de 100 mg L⁻¹ y a 200 mg L⁻¹ redujo el Mo de la fruta en 51% comparado con el control (Hong *et al.*, 2016).

La exposición a concentraciones de 1000 mg L⁻¹ de NPs de Cu redujo el 90% de la biomasa en calabacín (Stampoulis *et al.* 2009) y fue nocivo para el crecimiento de frijol mungo y trigo (Lee *et al.*, 2008). En arroz, se trató con NPs de CuO y se estudió su comportamiento fisiológico y bioquímico. La investigación reveló que la tasa de germinación, la longitud de la raíz y el brote, la biomasa, la tasa fotosintética, la tasa de transpiración, la conductancia estomática, el rendimiento cuántico máximo de fotoquímica PSII y los contenidos de pigmento fotosintético disminuyeron a 1000 mg L⁻¹ de NPs de CuO mientras que la captación de Cu en raíces y brotes aumentó debido a la alta concentración de NPs de CuO. Se encontró un menor número de tilacoides por granum en los cloroplastos, esto por la acumulación de NPs de CuO en las células, también ocasiono un aumento de compuestos antioxidantes como consecuencia del estrés oxidativo y osmótico. Esto reveló

el efecto tóxico de la acumulación de Cu en las raíces y brotes que dio lugar a la pérdida de la fotosíntesis (Da Costa y Sharma 2016).

También se ha demostrado que las NPs de Cu (0.006 mg L^{-1}) en bajas concentraciones aplicadas al sustrato aumentan los fenoles totales y modifican la concentración de compuestos enzimáticos y no enzimáticos en el cultivo de tomate (Juárez-Maldonado *et al.*, 2016) y en chile jalapeño con NPs de Cu+Quitosán+PVA ($0-10 \text{ mg g}^{-1}$) aplicado en sustrato (Pinedo-Guerrero *et al.*, 2017).

Diversos estudios han investigado sobre el efecto de las NPs en plantas sometidas a estrés salino. Se ha reportado que las NPs de ZnO en concentraciones de 15 a 30 mg L^{-1} tienen efectos positivos sobre el metabolismo de las plantas de tomate bajo estrés salino (Alharby *et al.*, 2016). Del mismo modo, se ha demostrado que las concentraciones de $0,05$ a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Ag NPs podrían mejorar la tolerancia de las plantas de tomate a la salinidad (Khan *et al.*, 2017). Además, Se ha demostrado que el estrés por salinidad en tomate causa cambios en la calidad de la fruta, lo que afecta indirectamente al rendimiento (Pašalić *et al.*, 2016), sin embargo, muchos investigadores creen que las plantas de tomate que se cultivan en condiciones de alta salinidad podrían contener niveles elevados de fructosa, glucosa, sólidos solubles totales, aminoácidos y ácidos orgánicos (Zhang *et al.*, 2017). Al igual, Hernández-Hernández *et al.*, (2017) reportaron un incremento de 9% en el rendimiento de tomate bajo estrés salino, así como un aumento de vitamina c de 42% en frutos de tomate tratados con quitosán y NPs de Cu.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El estudio se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México (25 ° 22 'N y 101 ° 00' O, 1760 m).

Se estableció un cultivo de tomate variedad HUNO F1 (Harris Moran Seed Company) de tipo saladette y crecimiento indeterminado en un invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, tipo multitúnel y con cubierta de polietileno.

Desarrollo de cultivo

El desarrollo experimental consistió en el establecimiento de un cultivo de tomate variedad HUNO F1 (Harris Moran Seed Company) de tipo saladette y crecimiento indeterminado.

El trasplante fue realizado a los 36 días después de la siembra en bolsas de polietileno color negro con capacidad de 10 L. El cultivo fue manejado a un solo tallo, y se desarrolló por 100 días a partir del trasplante hasta obtener frutos para las evaluaciones (Fig. 1). Se utilizó como sustrato una mezcla de perlita-peat moss en proporción 1:1 (v:v).



Figura 1. Plantas de tomate tratadas con nanopartículas de cobre y sometidas a estrés salino.

Para la aplicación del riego se utilizó un sistema de riego dirigido. A los 50 ddt, 36 plantas fueron irrigadas con solución nutritiva Steiner (1961) y 36 con solución nutritiva Steiner (1961) combinada con 50 mM de cloruro de sodio (NaCl) las cuales fueron preparadas en tinacos diferentes con capacidad de 1100 L.

La CE de las soluciones fue monitoreada durante el ciclo y éstas oscilaban entre 1.7-2.3 para la solución Steiner y 3.5-6.2 para la solución con NaCl.

Se realizaron lavados de sustrato en las plantas tratadas con cloruro de sodio (NaCl) realizando la medición de CE la cual era alrededor de 3.2-3.5.

El pH de la solución nutritiva se ajustó con ácido sulfúrico concentrado a un valor de 6.5 para favorecer la absorción de nutrimentos.

Nanopartículas de Cobre

Las nanopartículas de cobre utilizadas fueron sintetizadas en el Centro de Investigación en Química Aplicada siguiendo la metodología descrita por Cadenas-Pliego *et al.*, (2013), las cuales presentaron un tamaño promedio de 50 nm y una forma esférica (Fig. 2).

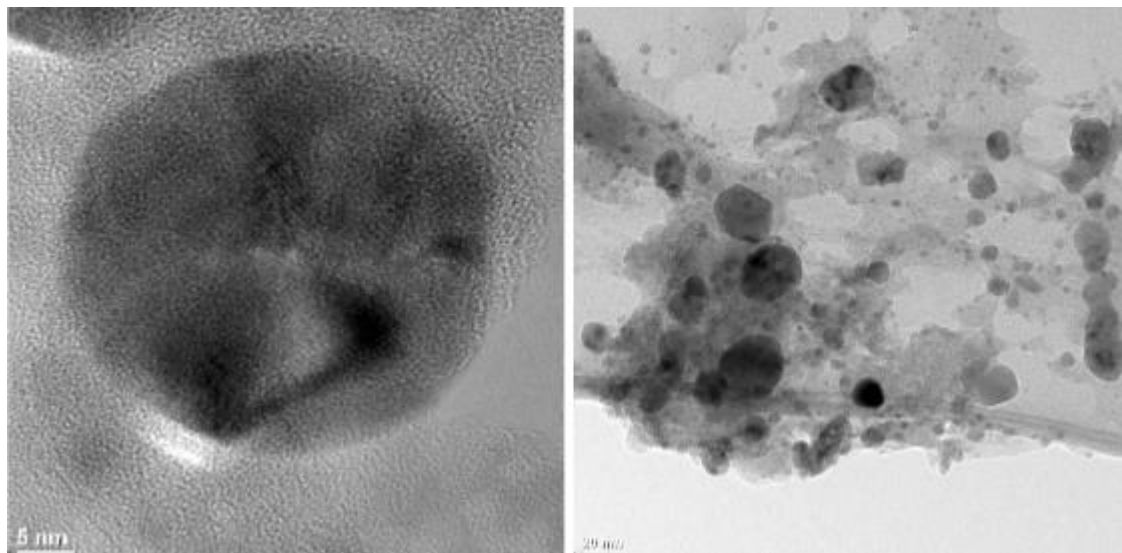


Figura 2. Morfología de las nanopartículas de cobre obtenidas por SEM.

Tratamientos

Se utilizaron 3 tratamientos: solución con 50 mM de NaCl (T1), NPs de Cu a 250 ppm (250 mg L^{-1}) (T2), NPs de Cu a 250 ppm más NaCl (T3) y un testigo absoluto que consistió en agua destilada (T0). Las aplicaciones de NPs de Cu se llevaron a cabo a los 57 y 78 días después del trasplante (ddt).

Para la primera aplicación se preparó 1 L de solución la cual contenía 500 ml de NPs de Cu y 500 ml de agua destilada obteniendo la concentración de 250 ppm.

Se aplicaron 25 ml por planta aproximadamente, asperjando de manera uniforme desde la parte baja, media y alta en ambos lados de cada planta de los tratamientos 2 y 3.

En la segunda aplicación se prepararon 1.4 L (700 ml de NPs de Cu y 700 ml de agua destilada) aplicando alrededor de 35 ml por planta, asperjando de manera uniforme desde la parte baja, media y alta en ambos lados de cada planta (Fig. 3).



Figura 3. Aplicación de las nanopartículas de cobre en plantas de tomate.

Crecimiento y desarrollo

Para la evaluación del crecimiento y producción de las plantas de tomate se realizó lo siguiente: se realizaron 2 aplicaciones de NPs de Cu a los 57 y 78 ddt. A los 15 días después de cada aplicación con la ayuda de un flexómetro se midió la altura de planta (cm), el diámetro de tallo (mm) se midió con un vernier digital, y se contó el número de hojas, racimos, flores y frutos.

Para las variables de rendimiento y biomasa fresca se contabilizó el peso de frutos por planta (g), el peso fresco de tallo y hojas (g), utilizando una balanza digital marca OHAUS. El peso seco de tallo y hojas (g) se obtuvo después de secar en una estufa de secado marca Drying Oven modelo DHG9240A durante 72 h a una temperatura constante de 80°C.

Contenido de minerales

El contenido de mineral en los frutos y hojas de tomate fue determinado con un espectrofotómetro de emisión de plasma (ICP, modelo Thermo Jarrel Ash Irish Advantage 14034000). Para este proceso, un gramo de cada muestra fue digerido con HNO₃ y H₂O₂ a 400 °C (Fig. 4) siguiendo el método de Hernández-Hernández *et al.*, 2018.



Figura 4. Digestión de muestras de fruto de tomate con ácido nítrico.

Pigmentos fotosintéticos

La metodología de extracción se realizó de acuerdo con Nagata y Yamashita (1992) con algunas modificaciones. Se pesó 1 gr de muestra fresca de hojas, se

maceró en un mortero adicionando 5 ml de acetona al 90% hasta homogenizar, después se agregó una pizca de carbonato de magnesio ($MgCO_3$) y se maceró por 2 minutos. Se recolectaron 2 ml de la muestra en un tubo eppendorf y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min a 2°C.

El contenido de clorofila a y clorofila b se determinó mediante espectrofotometría usando la absorbancia (A) leída a 663 nm y 645 nm en las ecuaciones 1 y 2. La clorofila total se obtiene con la ecuación 3. El blanco fue acetona al 90%. Los resultados se expresaron en $mg\ g^{-1}$ de peso fresco.

$$\text{Clorofila a } (\mu g \cdot g^{-1}) = 25.38 * A\ 663 + 3.64 * A\ 645 \quad (1)$$

$$\text{Clorofila b } (\mu g \cdot g^{-1}) = 30.38 * A\ 645 - 6.58 * A\ 663 \quad (2)$$

$$\text{Clorofila total } (\mu g \cdot g^{-1}) = 18.8 * A\ 663 + 34.02 * A\ 645 \quad (3)$$

Calidad de fruto

Se colectaron frutos de tamaño uniforme, y en estado de madurez 6 (rojo ligero) de acuerdo a la escala de visual de color del (USDA, 1991) (Fig. 5). El potencial de hidrógeno (pH) y la conductividad eléctrica (CE) se determinaron utilizando un potenciómetro digital HI 98130 (Hanna Instruments).

Los sólidos solubles totales se midieron en 10 ml de la pulpa de los frutos usando un refractómetro digital PR-101ATAGO PALETTE. La firmeza de los frutos se determinó con un penetrómetro manual (WAGNER Force Dial FDK 20). El potencial de óxido reducción (ORP) fue medido con un potenciómetro (DAIGGER 5500 pH/ORP modelo 6173).

La acidez titulable (AT) se determinó mediante técnica colorimétrica de acuerdo a la metodología de la AOAC (1990). Para esto se utilizaron 10 ml de pulpa del fruto, a la que se añadieron dos gotas de fenolftaleína (1%) y se tituló con NaOH (0.1 N) expresando los datos como porcentaje de ácido cítrico.

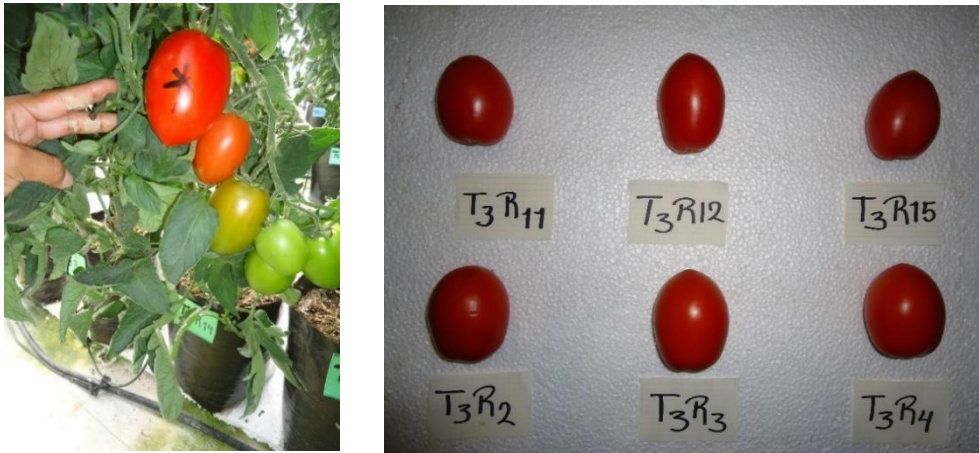


Figura 5. Frutos de tomate colectado para análisis de calidad de fruto.

Análisis estadístico

Para las variables evaluadas se consideraron seis repeticiones por tratamiento. Se usó un diseño completamente al azar. El análisis de varianza y prueba de medias de Fisher LSD ($p \leq 0.05$) se realizaron en el software Infostat versión 2016.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables agronómicas

Se observaron disminuciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate bajo estrés salino, así como rendimientos bajos. Las variables altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco aéreo, peso seco aéreo y rendimiento por planta mostraron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, la aplicación foliar de NPs de Cu indujo un comportamiento similar de las variables altura de planta, peso fresco aéreo, peso seco aéreo y rendimiento con respecto al testigo (Tabla 1).

Se encontraron disminuciones de 7.41%, 13.97% 15.42% y 37.37% con NPs de Cu + NaCl y 6.33%, 12.45%. 17.98% y 41.48% con NaCl en altura de planta, peso fresco aéreo, peso seco aéreo y rendimiento, respectivamente, comparados con el testigo, contrario a lo encontrado con el diámetro de tallo que se observó un incremento de 12.53% (NPs de Cu) y 7.77% (NPs de Cu + NaCl).

Diversas investigaciones han demostrado que las NPs metálicas son capaces de producir estrés en la planta, generando un exceso de EROs, especialmente en altas concentraciones alteran la eficiencia fotosintética, la fluorescencia fotoquímica y el rendimiento cuántico en las plantas, debido a las interacciones de estas con los fotosistemas, ya que diversos estudios demostraron que las clorofilas transfieren la energía a las NPs (Rico *et al.*, 2015).

Lira *et al.*, (2016) sometieron plantas de lechuga con NPs de Cu (OH) (mg L^{-1}) a través de aplicación foliar durante un mes y los datos generados indicaron que entre 97 a 99% del Cu aplicado se absorbió en las hojas y sólo un pequeño porcentaje (1-3%) se translocó a través del tejido del floema a la raíz.

También, Hernández-Hernández *et al.*, (2018) encontraron que aplicando 10 mg de NPs de Cu sobre el sustrato de crecimiento de tomate bajo salinidad se induce un efecto positivo en el rendimiento del fruto. Este resultado difiere con nuestros resultados obtenidos ya que la aplicación foliar de NPs de Cu + NaCl disminuyó notablemente el rendimiento.

De acuerdo a lo anterior se puede inferir que una la aplicación foliar de NPs de Cu combinada con el estrés salino, ocasionó una perturbación en la actividad fotosintética, lo que se traduce en estrés oxidativo en las plantas y bajo rendimiento de estas. Además, Pérez-de-Luque (2017) menciona que las respuestas en el crecimiento y desarrollo de las plantas encontradas con la aplicación de NPs puede diferir en gran medida por el tipo de NP, concentración, forma y etapa de aplicación, así como el material biológico utilizado.

Tabla 2. Variables agronómicas de las plantas de tomate con aplicación foliar de NPs de Cu y bajo estrés salino.

Tratamiento	AP (cm)	DT (mm)	PFA (g)	PSA (g)	R (g)
NaCl	245.78 b ± 7.05	12.07 ab ± 0.84	1248.38 b ± 173.75	171.38 b ± 23.65	3604.51 b ± 496.19
NPs de Cu	263.33 a ± 12.91	12.53 a ± 1.79	1500.99 a ± 222.34	213.29 a ± 36.41	5950.14 a ± 513.51
NPs de Cu + NaCl	242.94 b ± 9.25	12.49 a ± 0.81	1226.69 b ± 173.33	176.73 b ± 22.82	3857.12 b ± 560.85
Control	262.39 a ± 11.95	11.59 b ± 0.63	1425.93 a ± 193.69	208.94 a ± 28.55	6158.88 a ± 836.84

Datos representan la media (n=18). Diferentes letras por columna indican diferencias significativas entre tratamientos según LSD Fisher ($P \leq 0.05$). AP: altura de planta, DT: diámetro de tallo, PFA: peso fresco aéreo, PSA: peso seco aéreo, R: rendimiento.

Contenido de minerales en hojas y frutos

El contenido de minerales en hojas mostró diferencias significativas, con excepción del P, Ca, S, Fe, Zn y Mn. El K disminuyó 11.83% con NaCl y 10.69% con NPs de Cu+NaCl con respecto al testigo. Como era de esperarse, se obtuvieron aumentos del 166.41% con NaCl y 149.22 con NPs de Cu+NaCl del elemento Na y 576.92% con NPs de Cu y 560.37% con NPs de Cu+NaCl para el Cu.

El contenido de minerales en frutos mostró diferencias significativas entre los tratamientos con excepción del Ca y Fe. El P disminuyó 20.37% con NaCl y 10.33% con NPs de Cu+NaCl con respecto al testigo. Para el K, los tratamientos se comportaron de manera similar al testigo, sin embargo, el tratamiento NaCl lo disminuyó 9.74% con respecto al tratamiento NPs de Cu. El Mg disminuyó con los tratamientos con NaCl y NPs de Cu+NaCl en 11% y 14% respectivamente. El S se vio afectado con una disminución de 15.39% con el tratamiento NaCl. Para el caso del Na, aumento 89.26% y 64.29% con NaCl y NPs de Cu+NaCl. Con respecto al cobre se observaron incrementos de 3.07% (NaCl), 16.60% (NPs de Cu) y 9.74% (NPs de Cu+NaCl). El Zn se obtuvieron valores similares, sin embargo, se observó una disminución con el tratamiento NPs de Cu de 17.14% comparado con el tratamiento NaCl. El Mn se vio afectado con una disminución de 21.30% (NaCl) y 25.83% (NPs de Cu+NaCl).

En general, el contenido de Cu fue mayor en el tejido foliar comparado con el fruto lo que sugiere mayor acumulación de Cu en las hojas derivado a que este tejido estuvo expuesto directamente a las NPs mientras que en fruto hubo una menor traslocación.

Hong *et al.*, (2014) mencionan que los NMs, en este caso las nanopartículas penetran las hojas a través de aberturas estomáticas y pueden ser posteriormente desplazados a otros órganos de la planta, como las raíces, sin embargo, Lira *et al.*, (2016) reportó que la aplicación foliar de NPs de Cu (OH) (mg L⁻¹) en plantas de lechuga el Cu se absorbió en las hojas entre 97 a 99% del NPs de Cu aplicado sólo un pequeño porcentaje (1-3%) se translocó a través del tejido del floema a la raíz.

Por otro lado, el incremento de Na⁺ difiere con lo encontrado por Hernández-Hernández *et al.*, (2018) quienes reportan una reducción en el contenido de Na⁺ foliar de tomate desarrollado con salinidad (100 mM) al aplicar 10 mg de NPs de Cu sobre el sustrato de crecimiento. Esta diferencia encontrada puede deberse a la concentración de NaCl evaluada ya que en este trabajo se evaluó la mitad de lo reportado por los autores (50 mM).

Tabla 3. Contenido de minerales en hojas y frutos de las plantas de tomate con aplicación foliar de NPs de Cu y bajo estrés salino.

Órgano	Tratamiento	P	K	Ca	Mg	S	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
Hoja	NaCl	4.16a ± 0.40	17.81b ± 1.07	43.27 a ± 3.06	6.92a ± 0.48	11.11 a ± 0.41	3.41 a ± 0.34	74.92 a ± 13.23	4.88b ± 0.72	16.33 a ± 2.98	248.96a ± 13.10
	NPs de Cu	4.15a ± 0.60	19.37a ± 1.10	44.54 a ± 5.65	6.73a ± 0.89	10.68 a ± 1.14	1.27 b ± 0.15	70.33 a ± 6.03	29.04 a ± 10.12	14.00 a ± 2.48	263.42a ± 33.86
	NPs de Cu + NaCl	3.95a ± 0.27	18.04b ± 0.88	40.57 a ± 2.48	6.38a ± 0.33	10.90 a ± 0.93	3.19 a ± 0.39	77.54 a ± 11.87	28.33 a ± 6.09	15.00 a ± 1.95	250.42a ± 19.34
	Control	3.95a ± 0.30	20.20a ± 1.07	42.57 a ± 3.06	6.59a ± 0.48	10.62 a ± 0.60	1.28 b ± 0.16	77.00 a ± 9.48	4.29b ± 0.53	14.54 a ± 1.56	256.29a ± 22.07

Fruto	NaCl	2.62c ± 0.19	19.00c ± 1.12	1.59a ± 0.84	0.89b ± 0.09	1.21b ± 0.07	1.06 a ± 0.18	47.50 a ± 8.77	5.71a b ± 0.75	16.54 b ± 3.04	13.71b ± 1.53
	NPs de Cu	3.30a ± 0.09	21.05a ± 0.80	1.46a ± 0.11	0.98a ± 0.03	1.51a ± 0.04	0.54 b ± 0.06	53.25 a ± 5.65	6.46a ± 0.37	19.96 a ± 1.90	16.17a ± 0.88
	NPs de Cu + NaCl	2.95b ± 0.20	20.28a b ± 0.86	1.09a ± 0.15	0.86b ± 0.05	1.48a ± 0.12	0.92 a ± 0.17	53.46 a ± 8.11	6.08a b ± 0.93	18.17 ab ± 3.08	12.92b ± 1.25
	Control	3.29a ± 0.19	19.68b c ± 0.39	1.55a ± 0.21	1.00a ± 0.05	1.43a ± 0.08	0.56 b ± 0.06	53.33 a ± 4.14	5.54b ± 0.62	17.13 ab ± 0.72	17.42a ± 1.85

Datos representan la media (n=6). Diferentes letras por columna indican diferencias significativas entre tratamientos según LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

Variables de pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofilas en hojas de plantas de tomate presentó algunas diferencias significativas, sin embargo, todos los tratamientos presentaron valores similares con respecto al Control. La aplicación foliar de NPs de Cu afectó la concentración de clorofila a y clorofilas totales, ya que se observó una disminución de 24.33% y 23.55% respectivamente con NPs de Cu + NaCl comparado con NaCl. Para la clorofila b, el valor más alto se observó con NPs de Cu con 4.94 % con respecto al testigo, sin embargo, se observa una disminución de 28.66% con NPs de Cu + NaCl.

La relación A/B de clorofilas no se vio afectada con ningún tratamiento (Tabla 3). Lo anterior difiere con lo reportado por (Hernández-Hernández *et al.*, 2018) quienes citan un incremento en el contenido de los clorofilas al aplicar NPs de Cu (10 mg L^{-1}) y NaCl (100 mM) en plantas de tomate. La diferencia en el contenido de estos pigmentos fotosintéticos posiblemente fue ocasionada por la acumulación de Cu en las hojas lo que causó un estrés oxidativo.

Monirifar y Barghi (2009) afirmaron que una reducción en el contenido de clorofila en las plantas de alfalfa se correlacionó con la acumulación de Cl^- . Además, el Na^+ se transloca fácilmente a los brotes por transpiración en el xilema y su acumulación es mayor en las hojas y brotes que en las raíces, por lo que un exceso de Na^+ ocasiona un desequilibrio de la fotosíntesis en las hojas (Dikilitas y Karakas, 2014). Esto explica la reducción significativa de éstos pigmentos fotosintéticos al aplicar NPs de Cu + NaCl.

Tabla 4. Contenido de clorofilas en las hojas de las plantas de tomate con aplicación foliar de NPs de Cu y bajo estrés salino.

Tratamiento	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila total	Relación A/B
	(µg g ⁻¹)			
NaCl	239.82 a ±	63.83 ab ±	306.64 a ±	3.67 a ± 0.47
	40.61	17.07	56.30	
NPs de Cu	213.93 ab ±	77.93 a ±	291.85 ab ±	2.95 a ± 0.86
	54.15	25.10	70.86	
NPs de Cu + NaCl	181.46 b ±	52.98 b ±	234.44 b ±	3.54 a ± 0.74
	16.66	10.41	17.28	
Control	216.20 ab ±	74.26 ab ±	290.45 ab ±	3.06 a ± 1.01
	50.63	15.31	49.46	

Datos representan la media (n=6). Diferentes letras por columna indican diferencias significativas entre tratamientos según LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

Variables de calidad de fruto

Los tratamientos de NPs de Cu y NaCl aumentaron la firmeza, el pH y la CE de los frutos con respecto al testigo. Para la firmeza de los frutos se observó un incremento de 21.41% con NPs de Cu, 21.05% con NPs de Cu + NaCl y 15.44% con NaCl, con respecto al testigo (Tabla 4). Un estudio realizado con NPs de Cu

y quitosán (0.06 mg L^{-1}) reportó un incremento del 9% de firmeza en frutos de tomate (Juarez-Maldonado *et al.*, 2016).

Por otro lado Hong *et al.*, 2016 reportaron que la aplicación foliar de NPs de CuO (200 mg L^{-1}) redujo la firmeza en frutos de pepino, ambos estudios fueron evaluados sin salinidad.

En este sentido, Rodríguez-Ortega *et al.*, 2017 mencionan que un exceso de NaCl ocasiona una disminución de la firmeza en frutos de tomate, por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos, la aplicación foliar de NPs de Cu ayuda a disminuir los efectos causados por la salinidad en los frutos de tomate.

Para el pH se obtuvieron incrementos de 0.23% con NaCl, 2.52% con NPs de Cu y 2.75% con NPs de Cu + NaCl y para la CE, 25.53% con NaCl, 9.91% con NPs de Cu y 10.81 con NPs de Cu + NaCl, ambas comparadas con el testigo. (Tabla 4). Esto concuerda con lo reportado por Hernández-Hernández *et al.*, 2017 quienes obtuvieron un aumento aproximado del 1% en pH en frutos de tomates tratados con NPs de Cu + quitosán (2 mg) y NaCl (100mM) con respecto al control, contrario a lo que reporta Yurtseven *et al.* (2005) quienes mencionan que en tratamientos salinos el pH disminuye hasta un 12% en tomate.

Los resultados obtenidos indican una mejor calidad en el sabor y mayor contenido de sales en el fruto de tomate. Lo que parece indicar que tanto la aplicación de NPs de Cu y NaCl inducen este efecto en los frutos de tomate.

El contenido de SST de los frutos de tomate también mostró diferencias significativas entre tratamientos. Se observó un incremento de 17.48% con NaCl y 17.86 con NPs de Cu + NaCl comparado con el testigo, mientras que para la acidez titulable se observó una disminución de 14.90%, respectivamente (Tabla

4). Estos resultados difieren con lo reportado por Hernández-Hernández *et al.*, 2017 quienes obtuvieron un incremento en la acidez titulable del 23% (2.0 mg NPs de Cu) y 19% (0.2mg NPs de Cu) con NaCl (100mM).

Las diferencias en los niveles de solutos orgánicos (azúcares, ácidos orgánicos, etc.) en condiciones salinas se deben a que las plantas se ajustan osmóticamente para evitar el efecto osmótico nocivo de la salinidad (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2017).

Oms-Oliu *et al.*, (2011) mencionan que durante la maduración de los frutos disminuyen los ácidos málico y fumárico lo que provoca la acumulación de ácido cítrico. Por lo tanto, es probable que la aplicación de NPs de Cu influya en la respiración del fruto, lo que se traduce a un retardo en la maduración y como consecuencia una disminución de la acidez titulable.

Tabla 5. Calidad de fruto de las plantas de tomate con aplicación foliar de NPs de Cu y bajo estrés salino.

Tratamiento	Firmeza (kg cm ⁻²)	pH	CE (mS cm ⁻¹)	SST (°Brix)	AT (% ac)
NaCl	3.29 a ± 0.16	4.38 b ± 0.08	4.18 a ± 0.27	6.05 a ± 0.27	0.99 a ± 0.10'
NPs de Cu	3.46 a ± 0.27	4.48 a ± 0.04	3.66 ab ± 0.56	4.93 b ± 0.12	0.80 b ± 0.09
NPs de Cu + NaCl	3.45 a ± 0.19	4.49 a ± 0.04	3.69 ab ± 0.53	6.07 a ± 0.26	0.87 ab ± 0.13
Control	2.85 b ± 0.37	4.37 b ± 0.06	3.33 b ± 0.56	5.15 b ± 0.33	0.94 a ± 0.11

Datos representan la media (n=6). Diferentes letras por columna indican diferencias significativas entre tratamientos según LSD Fisher (P ≤ 0.05). pH: potencial de hidrógeno, CE: conductividad eléctrica, SST: sólidos solubles totales, AT: acidez titulable, ac: ácido cítrico, ORP: potencial de óxido reducción.

CONCLUSIONES

La aplicación foliar de NPs de Cu bajo condiciones de salinidad dio lugar a mejoras en la calidad de fruto. Sin embargo, en las variables agronómicas, como crecimiento, desarrollo y rendimiento presentó una reducción posiblemente derivada de las alteraciones que pudo generar las NPs de Cu y el NaCl en los nutrientes de la planta, así como en los pigmentos fotosintéticos. Por lo que la aspersion foliar de NPs de Cu es factible para inducir mayor calidad de frutos de tomate.

REFERENCIAS

- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Bharwana, S. A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8148–8162. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>.
- Alharby, H. F., Metwali, E. M. R., Fuller, M. P., & Aldhebiani, A. Y. (2016). Impact of application of zinc oxide nanoparticles on callus induction, plant regeneration, element content and antioxidant enzyme activity in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under salt stress. *Archives of Biological Sciences*, 68(4), 723–735. <https://doi.org/10.2298/ABS151105017A>.
- Amirjani, M.R. 2010. Effect of NaCl on some physiological parameters of rice. *EJBS*. 3(1): 06 - 16.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts.
- Aslani, F ., Bagheri, S ., Julkapli, NM; Juraimi, AS; Hashemi, FSG; Baghdadi, A. Efectos de los nanomateriales artificiales sobre el crecimiento de las plantas: una visión general. *Sci. Mundial J*. 2014 , 2014 , 28.
- Akça, Y., Samsunlu, E. 2012. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline. and nutrient accumulation, and K/Na ratio in walnut. *Pak. J. Bot.*, 44(5): 1513-1520.
- Angelé-Martínez, C., Nguyen, K. V. T., Ameer, F. S., Anker, J. N., & Brumaghim, J. L. (2017). Reactive oxygen species generation by copper(II) oxide nanoparticles determined by DNA damage assays and EPR spectroscopy. *Nanotoxicology*, 11(2), 278–288. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1293750>.

- Anjanappa, M., Gowda, G. S. J., Kumara, B. S., others. (2013). Shelf life and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as influenced by 1-methylcyclopropene (MCP) under cold storage condition. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 47(1), 58–65.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC, methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA..
- Baldwin, E.A., Goodner, K., Plotto, A. 2008. Interaction of volatiles, sugars, and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors. *Journal of Food Science*, 73:S294–307.
- Baloch, Q. B., Chachar, Q. I., Tareen, M. N. (2008). Effect of foliar application of macro and micro nutrients on production of green chilies (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural Technology*, 4(2), 177-184.
- Bartell, D.M., Beaulieu, J.C., Shewfelt, R. 2010. Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. *Crit. Rev. Food Sci.*, 50: 369-389.
- Boriboonkaset, T.; Theerawitaya, C.; Pichakum, A.; Cha-um, S.; Takabe, T.; Kirdmanee, C. 2012. Expression levels of some starch metabolism related genes in flag leaf of two contrasting rice genotypes exposed to salt stress. *Australian Journal of Crop Science*. 6(11):1579 – 1586.
- Cadenas-Pliego, G., Pérez-Alvarez, M., Ávila, O., Sierra-Ávila, R., Ortega-Ortiz, H. Betancourt-Galindo, R. Jiménez-Regalado, E. Barriga-Castro, E. Palacios-Mireles, I. M. (2013). “Proceso de síntesis de nanopartículas

metálicas mediante el uso de moléculas bi-funcionales,” Expediente: MX/a/2013/015221 Folio MX/E/2013/09476.

Casanova, A.S., Gómez O., Pupo, F., Hernández, M., Chailloux, M., Depestre, T., Hernández, J.C., Moreno, V., León, M., Igarza, A., Duarte, C., Jiménez, I., Santos, R., Navarro, A., Marrero, A., Cardoza, O., Piñeiro, F., Arozarena, N., Villarino, L., Hernández, M.T., Salgado, J.M., Socorro, A., Cañet, F., Rodríguez, A., Osuna, A . 2007. Producción protegida de plántulas de tomate. Manual para la producción protegida de hortalizas. Ministerio de la Agricultura. IIH “Liliana Dimitrova”, La Habana, Cuba. 138 pp.

Casierra, F.; Eberf, G.; Lüdders, P. 2000, Efecto de la salinidad por Cloruro de Sodio sobre el balance de nutrientes en plantas de Lulo (*Solanum quitoense* L.). *Agronomía Colombiana*. 17: 85 - 90

Casierra-Posada, F., Aguilar, O. 2008. Calidad en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cosechados en diferentes estados de madurez. *Agronomía Colombiana*, 26(2):300- 307.

Chaib, J., Devaux, M.F., Grotte, M.G., Robini, K., Causse, M., Lahaye, M., Marty, I. 2007. Physiological relationships among physical, sensory and morphological attributes of texture in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 581:1915-1925.

Chandna, R., Azooz, M. ., & Ahmad, P. (2013). *Salt Stress in Plants. Salt stress in plants*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6108-1>

Chen, J., Shafi, M., Li, S., Wang, Y., Wu, J., Ye, Z., ... Liu, D. (2015). Copper induced oxidative stresses, antioxidant responses and phytoremediation potential of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Scientific Reports*,

5(1), 13554. <https://doi.org/10.1038/srep13554>.

Cuypers, A., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., ... Jaco, V. (2011).

The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 168(4), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.07.010>.

Da Costa, M. V. J., Sharma, P. K. (2016). Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, 54(1), 110–119. article. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0167-5>.

Deng YQ, White JC, Xing BS (2014) Interactions between engineered nanomaterials and agricultural crops: implications for food safety. *J Zhejiang Univ Sci A* 15(8):552–572.

De la Rosa, M. C., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R., Sultan, Y. (2010). Nanotechnology in fertilizers. *Nature nanotechnology*, 5(2), 91.

De la Rosa, G., García-Castañeda, C., Vázquez-Núñez, E., Alonso-Castro, Á. J., Basurto-Islas, G., Mendoza, Á., ... Molina, C. (2017). Physiological and biochemical response of plants to engineered NMs: Implications on future design. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.014>

Dikilitas, M., Karakas, S. (2010). Salts as potential environmental pollutants, their types, effects on plants and approaches for their phytoremediation. In *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp. 357-381). Springer, Dordrecht.

FAO. 2014. Food and Agricultural Organization. Estadísticas del cultivo del tomate. Disponible en: http://www.faostat.fao.org./home/index_es.html/.

[Consultado: 4 de abril del 2019].

- Frusciante, L., Carli, P., Ercolano, M.R., Pernice, R., Di-Matteo, A., Fogliano, V., Pellegrini, N. 2007. Antioxidant nutritional quality of tomato. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 609–617.
- Genady, E. A., Ahmed, S. S., Fahmy, A. H., & Ashour, R. M. (2017). Copper sulfate nanoparticles enhance growth parameters, flavonoid content and antimicrobial activity of *Ocimum basilicum* Linnaeus. *Journal of American Science*, 13(4), 108–114. <https://doi.org/10.7537/marsjas130417.14>.
- Gómez, O., Casanova, A., Cardoza, H., Piñeiro, F., Hernández, JC., Murguido, C., León, M., Hernández, A. 2010. Guía Técnica para la producción del cultivo del tomate. Editora Agroecología. Biblioteca ACTAF. IIH “Liliana Dimitrova”, La Habana, Cuba.
- Gupta, A.K.; Kaur, N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30(5): 761 – 776.
- Haghighi, M., Pessarakli, M. (2013). Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Scientia Horticulturae*, 161, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.034>.
- Haghighi, M., Pourkhaloee, A. (2013). Nanoparticles in agricultural soils: their risks and benefits for seed germination. *Minerva Biotecnol*, 25(2), 123-132.
- Hänsch, R.,; Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3), 259-266.

- Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., & Hawrylak-Nowak, B. (2018). *Plant nutrients and abiotic stress tolerance. Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8>.
- Hernández-Hernández, H., Benavides-Mendoza, A., Ortega-ortiz, H., Hernández-Fuentes, A. D., & Jua. (2017). Cu Nanoparticles in chitosan-PVA hydrogels as promoters of growth , productivity and fruit quality in tomato. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(8), 573–580. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-08-1127>.
- Hernández-Hernández, H., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., & Juárez-Maldonado, A. (2018). Effects of chitosan–PVA and Cu nanoparticles on the growth and antioxidant capacity of tomato under saline stress. *Molecules*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010178>.
- Hong, J. ; Rico, C. ; Zhao, L. ; Adeleye, AS; Keller, AA; Peralta-Videa, JR; Gardea-Torresdey, JL Los efectos tóxicos de las nanopartículas o compuestos a base de cobre a la lechuga (*Lactuca sativa*) y alfalfa (*Medicago sativa*). *Reinar. Sci. Proceso. Impactos 2015* , 17 , 177-185.
- Hong, J., Wang, L., Sun, Y., Zhao, L., Niu, G., Tan, W., ... Gardea-Torresdey, J. L. (2016). Foliar applied nanoscale and microscale CeO₂ and CuO alter cucumber (*Cucumis sativus*) fruit quality. *Science of the Total Environment*, 563, 904–911. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.029>.
- Hong, J., Peralta-Videa, J. R., Rico, C., Sahi, S., Viveros, M. N., Bartonjo, J., ... Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Evidence of Translocation and Physiological Impacts of Foliar Applied CeO₂ Nanoparticles on Cucumber (*Cucumis*

- sativus) Plants. *Environmental Science and Technology*, 48(8), 4376–4385.
<https://doi.org/10.1021/es404931g>.
- Hong, J., Wang, L., Sun, Y., Zhao, L., Niu, G., Tan, W., ... Gardea-Torresdey, J. L. (2016). Foliar applied nanoscale and microscale CeO₂ and CuO alter cucumber (*Cucumis sativus*) fruit quality. *Science of the Total Environment*, 563, 904–911. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.029>.
- Jaramillo, J., Rodríguez, V., Guzmán, M., Zapata, M., Rengifo, T. 2007. Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de tomate bajo condiciones protegidas. Manual Técnico. Tampillo, México. 122 pp.
- Juarez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Pérez-Labrada, F., Cadenas-Pliego, G., & Benavides-Mendoza, A. (2016). Cu Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological, production, and quality characteristics of tomato. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89, 183–189. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.023>
- Kumar, V., Hussain, S., Suprasanna, W. P., Lam-Son, P. T. (2018). Salinity Responses and Tolerance in Plants (Vol. 2). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-90318-7>.
- Le, V. N., Rui, Y., Gui, X., Li, X., Liu, S., Han, Y. (2014). Uptake, transport, distribution and Bio-effects of SiO₂ nanoparticles in Bt-transgenic cotton. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0050-8>.
- Lee, W.-M., An, Y.-J., Yoon, H., Kweon, H.-S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble

- nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1915–1921.
<https://doi.org/10.1897/07-481.1>.
- Lin S, Bhattacharya P, Rajapakse NC et al (2009) Effects of quantum dots adsorption on algal photosynthesis. *J Phys Chem C* 113:10962–10966.
- Keller, AA; Adeleye, AS; Conway, JR; Garner, KL; Zhao, L .; Cherr, GN; Hong, J .; Gardea-Torresdey, JL; Godwin, HA; Hanna, S .; et al. Destino ambiental comparativo y la toxicidad de los nanomateriales de cobre. *NanoImpact* 2017 , 7 , 28-40.
- Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., AlMutairi, K. A., & Siddiqui, Z. H. (2017). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 194–209.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038>
- Kumar, V., Hussain, S., Suprasanna, W. P., & Lam-Son, P. T. (2018). *Salinity Responses and Tolerance in Plants* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-90318-7>.
- Manan, A., Ayyub, C. M., Ahmad, R., Bukhari, M. A., & Mustafa, Z. (2016). Salinity Induced Deleterious Effects on Biochemical and Physiological Processes of Tomato. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 14(2), 83–90.
- Monirifar, H., Barghi, M. (2009). Identification and selection for salt tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes via physiological traits. *Notulae Scientia Biologicae*, 1(1), 63-66.
- Morris, W. L., Taylor, M. A. (2017). The Solanaceous Vegetable Crops: Potato, Tomato, Pepper, and Eggplant. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (2nd ed., Vol. 3, pp. 55–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12->

394807-6.00129-5.

Mostofa, M. G., Fujita, M. (2013). Salicylic acid alleviates copper toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by up-regulating antioxidative and glyoxalase systems. *Ecotoxicology*, 22(6), 959–973. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1073-x>.

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>

Nagata, M., and Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit Masayasu N. J. Japan. Soc. Food Sci. Technol. 39, 925–928. doi:10.3136/nskkk1962.39.925.

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, 8(7), 543.

Noaman, M. N. (2004). Effect of potassium and nitrogen fertilizers on the growth and biomass of some halophytes grown under high levels of salinity. *Journal of Agronomy*, 3(1), 25-30.

Nuez, F., & Díez, M. J. (2013). *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* (Tomato). In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., Vol. 6, pp. 476–480). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00888-3>

Ojha, S., Singh, D., Sett, A., Chetia, H., Kabiraj, D., & Bora, U. (2018). *Nanotechnology in Crop Protection. Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811487-2.00016-5>

Oms-Oliu, G., Hertog, M. L. A. T. M., Van de Poel, B., Ampofo-Asiama, J.,

- Geeraerd, A. H., & Nicolai, B. M. (2011). Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 62(1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.04.010>.
- Parida, AK; Das, AB tolerancia a la sal y salinidad efectos sobre las plantas: Una revisión. *Ecotoxicol. Reinar. Saf.* 2005 , 60 , 324-349.
- Parvaiz, A.; Satyawati, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *Plant Soil Environ.* 54(3): 89 – 99.
- Pašalić B., Todorović, V., Koleška, I., Bosančić, B., & Dekic, N. (2016). Effects of Salinity on Color Changes, Sugar and Acid Concentration in Tomato Fruit. *Agriculturae Conspectus Scientifi Cus*, 81(3), 137–142.
- Peng, C .; Zhang, H .; Fang, H .; Xu, C .; Huang, H .; Wang, Y .; Sun, L .; Yuan, X .; Chen, Y .; Shi, J. Natural orgánica alivio de la materia-inducida de la fitotoxicidad para el arroz (*Oryza sativa* L.) causada por nanopartículas de óxido de cobre. *Reinar. Toxicology. Chem.* 2015 , 34 , 1996-2003.
- Pérez-de-Luque, A. (2017). Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture? *Frontiers in Environmental Science*, 5, 12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00012>
- Pinedo-Guerrero, Z.H.; Delia Hernández-Fuentes, A.; Ortega-Ortiz, H.; Benavides-Mendoza, A.; Cadenas-Pliego, G.; Juárez-Maldonado, A. Cu nanoparticles in hydrogels of chitosan-PVA affects the characteristics of post-harvest and bioactive compounds of jalapeño pepper. *Molecules* 2017, 22, 926.
- Raza, S., Hanif, S., & Tahir, A. (2017). Role of Nanotechnology in Agriculture.

- European Journal of Pharmaceutical and Medical Research, 4(5), 138–143.
- Remédios, C., Rosário, F., Bastos, V. (2012). Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *Journal of Botany*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/751686>.
- Reyes, Y.; Mazorra, I. M.; Núñez, M. 2008. Revisión bibliográfica. Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la Tolerancia del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. *Cultivos Tropicales*. 29(4): 67 – 75.
- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3485-3498.
- Rico, C. M., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. (2015). *Chemistry, Biochemistry of Nanoparticles, and Their Role in Antioxidant Defense System in Plants*. Nanotechnology and Plant Sciences, 1-17 Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0>.
- Rodriguez-Ortega, W. M., Vicente, M., Nives, M., Camara-Zapata, J. M., & Garcia-Sanchez, F. (2017). Agronomic and physiological responses of tomato plants grown in different soilless systems to saline conditions. *PeerJ Preprints*, 5, 1–33. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.2983v1>.
- Sabaghnia, Naser, and Mohsen Janmohammadi. "Effect of nano-silicon particles application on salinity tolerance in early growth of some lentil genotypes/Wpływ nanocząstek krzemionki na tolerancję zasolenia we wczesnym rozwoju niektórych genotypów soczewicy." *Annales UMCS, Biologia* 69.2 (2015): 39-55.

- SAGARPA SIAP. (2018). Closure of agricultural production by crop. Online document:<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food-Agricultural and Fisheries Information Service., Online document:<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-mes>.
- Sağlam, A., Yetişsin, F., Demiralay, M., Terzi, R. (2016). Copper Stress and Responses in Plants. In *Plant Metal Interaction* (pp. 21–40). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00002-3>
- Sánchez, M.T., De la Haba, M.J., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A., Perez-Marin, D. 2011. Testing of a local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument. *Postharvest Biol. Technol.*, 60:130-135.
- Savvas, D., Giotis, D., Chatzieustratiou, E., Bakea, M., Patakioutas, G. (2009). Silicon supply in soilless cultivations of zucchini alleviates stress induced by salinity and powdery mildew infections. *Environmental and experimental botany*, 65(1), 11-17.
- Shalaby, T. A., Bayoumi, Y., Abdalla, N., & Taha, H. (2016). Nanoparticles, soils, plants and sustainable agriculture. In *Nanoscience in Food and Agriculture I* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39303-2>
- Shrivastava, P .; Kumar, R. salinidad de los suelos: Un grave problema ambiental y la planta de bacterias promotoras de crecimiento como una de las herramientas para su mitigación. *Arabia J. Biol. Sci.* **2015** , 22 , 123-131.
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. (2014). Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum* seeds Mill.). *Saudi Journal of Biological*

- Sciences, 21(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.005>.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. (2016). Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6(February), 1–36. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>.
- Stampoulis, D., Sinha, S. K., White, J. C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science Technology*, 43(24), 9473-9479.
- Steiner, AA un método universal para la preparación de soluciones de nutrientes de una cierta composición deseada. *Plant Soil* 1961 , 15 , 134-154.
- Taffouo, V.D.; Nouck, A.H.; Dibong, S.D.; Amougou, A. 2010. Effects of salinity stress on seedlings growth, mineral nutrients and total chlorophyll of some tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*. 9(33): 5366 - 5372.
- Tie, S. G., Tang, Z. J., Zhao, Y. M., & Li, W. (2012). Oxidative damage and antioxidant response caused by excess copper in leaves of maize. *African Journal of Biotechnology*, 11(19), 4378–4384. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3187>
- Tripathi, B. N., & Müller, M. (2015). *Stress Responses in Plants*. Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13368-3>.
- Tripathi, D. K., Shweta, G., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Chauhan, D. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and*

- Biochemistry, 110, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030>.
- Turan, M.A.; Elkarim, A.H.A.; Taban, N.; Taban, S. 2009. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. *African Journal of Agricultural Research*. 4(9): 893 – 897.
- Turan, S., Tripathy, B. C. (2015). Salt-stress induced modulation of chlorophyll biosynthesis during de-etiolation of rice seedlings. *Physiologia plantarum*, 153(3), 477-491.
- [USDA] United States Department of Agriculture. United States Standards for Grades of Fresh Tomatoes. 1997. Available online: https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tomato_Standard%5B1%5D.pdf (accessed on 27 Junio 2019).
- Wang, P.; Lombi, E.; Zhao, F. J.; Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in Plant Science*, 21(8), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>
- Wu, J.; Seliskar, D.M.; Gallagher, J.I. 2005. The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress. *American Journal of Botany*. 92(5): 852 – 858.
- Yurtseven, E., Kesmez, G. D., and Ünlükara, A. (2005). The effects of water salinity and potassium levels on yield, fruit quality and water consumption of a native central anatolian tomato species (*Lycopersicon esculantum*). *Agricultural Water Management*, 78(1-2), 128-135.
- Yu, Q., Rengel, Z. (1999). Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. *Plant Science*, 142(1), 1-11.
- Yu, Q., Rengel, Z. (1999). Micronutrient deficiency influences plant growth and

activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. *Annals of Botany*, 83(2), 175-182.

Zepeda, A.I. 2010, Mecanismos de intercambio de K⁺ y Ca⁺ en epidermis de raíces bajo estrés salino. Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima. México. 72 pág.

Zhang, P., Senge, M., & Dai, Y. (2017). Effects of Salinity Stress at Different Growth Stages on Tomato Growth, Yield and Water Use Efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 48(6), 624–634. <https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1269803>.

