

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Nanotubos de Carbono (NTC) y su Efecto en el Vigor de Germinación y Otros
Parámetros Determinados en Plántulas de Calabaza (*Cucurbita pepo*)

Por:

DANIELA LUCERO DUARTE GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Nanotubos de Carbono (NTC) y su Efecto en el Vigor de Germinación y Otros
Parámetros Determinados en Plántulas de Calabaza (*Cucurbita pepo*)

Por:

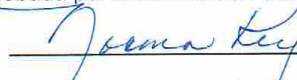
DANIELA LUCERO DUARTE GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dra. Norma Angélica Ruíz Torres

Asesor Principal



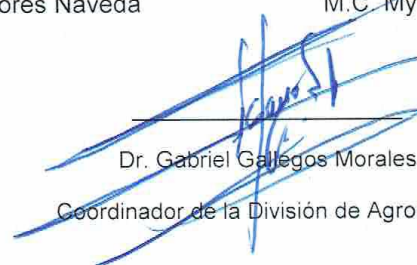
Dr. Antonio Flores Naveda

Coasesor



M.C. Myrna Julieta Ayala Ortega

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2018

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco **a Dios** por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por su amor y su bondad, gracias por permitirme sonreírle a todos y cada uno de mis logros que son resultado de su ayuda. Me caigo y me pone a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que los pone en frente mío para que mejore como ser humano y, crezca en diversas formas.

A mis padres el Sr. Daniel Duarte Zaragoza y la Sra. Eva García Herrera por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por confiar y creer en mí. Gracias por sus valiosos consejos que me ayudaron a culminar esta etapa de mi vida.

A Mi Alma Terra Mater. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, instituto que sin pedir mucho te lo da todo para formarte como todo un profesional, por ser la casa de estudios que me dio la oportunidad de poder alcanzar este logro y por darme las herramientas necesarias para seguir día a día.

Ala planta docente del **Departamento de Fitomejoramiento** por su catedra, sus enseñanzas y el apoyo que me brindaron a lo largo de mi carrera profesional.

A la **Dra. Norma Angélica Ruíz Torres**, por darme la oportunidad de realizar mi tesis con ella, además por su apoyo incondicional y todas sus atenciones brindadas para presentar este trabajo de investigación.

Al **Dr. Antonio Flores Naveda** y a **M.C. Myrna Julieta Ayala Ortega**, por el apoyo brindado para presentar este trabajo de investigación.

A mis hermanos(as). María Eva García, María de Jesús Duarte, Valeria Duarte y Daniel Duarte, gracias por siempre estar ahí dándome los mejores consejos, los ánimos, su apoyo incondicional para seguir con mi carrera profesional.

A mis sobrinos. Ángel Manuel Alexander Martínez, Danna Geraldine González y Pamela Liseth Martínez, por ser mi motivación y darles un buen ejemplo a seguir.

A mis cuñados. Antonio Martínez, David Gómez y Pedro González por su apoyo y consejos muchas gracias.

A mi novio. Jorge Negrete Armenta gracias por todo el apoyo brindado durante mi carrera, por siempre motivarme a ser mejor persona y nunca dejarme sola, por su comprensión y por siempre creer en mí.

A mis mejores amigos (as). Héctor Abraham Pérez, Johana Vargas, Magaly Maldonado, Gabriela Javalois, gracias por todos los momentos que pasamos juntos, por haber hecho el papel de una familia verdadera en todo momento, gracias por su apoyo, comprensión y sobre todo por su valiosa amistad.

A mis profesores en los diferentes niveles educativos ya que sin su guía no habría sido posible enfrentar los retos de una vida profesional altamente demandante; gracias por darme las herramientas teóricas y prácticas para competir y salir en el ámbito profesional, gracias por transmitirme sus conocimientos.

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que de una u otra forma invirtieron de su valioso tiempo para llevar a cabo este trabajo. Gracias a todos los que me apoyaron, confiaron y creyeron en mí.

DEDICATORIA

A **Dios**, gracias señor por concederme esta vida y vocación.

A mi Madre, **Eva García Herrera**, Gracias por tanto amor, por tu apoyo y por ser quien eres. ¡Lo logramos Mami! Te Amo Con Todo Mi Corazón.

A mi Padre, **Daniel Duarte Zaragoza**, Gracias Papi por tener la palabra exacta, por todo tu apoyo y amor, por creer en mí. Te amo mucho.

A mis hermanos (as).

María Eva García.

María de Jesús Duarte.

Valeria Duarte García.

Daniel Duarte García.

Las amo y te amo hermano son el mejor regalo que mis padres pudieron darme. Muchas gracias por todo su apoyo, consejos y nunca dejarme sola, lo hemos logrado.

A mis Sobrinos (as).

Ángel Manuel Alexander Martínez.

Danna Geraldine González Duarte.

Pamela Liseth Martínez.

Por ser mi motivación día a día y darles un buen ejemplo a seguir.

A mis cuñados.

Antonio Martínez.

David Gómez.

Pedro González

Por su apoyo y consejos muchas gracias.

A mi mejor amigo, mi compañero, mi novio **Jorge Negrete Armenta**, por todo tu apoyo incondicional, tus palabras y tus consejos. Te amo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS.....	3
1.1.1. Objetivo general	3
1.1.2. Objetivos Específicos	3
1.2. HIPÓTESIS.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Nanotecnología.....	4
2.2. Clasificación de Nanomateriales.....	5
2.3. ¿Qué son las nanopartículas?	5
2.3.1. Nanopartículas y su efecto en la germinación	6
2.4. Nanotubos de Carbono.....	7
2.4.1. Nanotubos de Carbono en la Agricultura.....	8
2.4.2. Nanotubos de Carbono y su efecto en la germinación	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Material biológico.....	11
3.2. Ubicación del sitio experimental	11
3.3. Preparación de soluciones con Nanotubos de Carbono.....	11
3.4. Proceso de imbibición.....	11
3.5. Variables evaluadas en el bioensayo	12
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
V. CONCLUSIONES	19
IV. LITERATURA CITADA	20
IIV. ANEXOS	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadrados medios deL análisis de varianza para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) tratadas con NTC	15
Cuadro 2.Comparación de medias de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de los nanomateriales usados en una gran diversidad de aplicaciones biológicas e industriales.	8
---	---

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Por ciento de vigor y germinación de semilla tratada con NTC.	24
Anexo 2. Longitud de vástago y de radícula de plántulas obtenidas de semillas tratadas con NTC.....	24
Anexo 3. Plántulas anormales generadas de semillas tratadas con NTC.....	25
Anexo 4. Plántulas anormales y semillas sin germinar generadas por semillas tratadas por NTC.	25
Anexo 5. Peso seco de plántulas obtenidas de semillas tratadas con solución de NTC.	26

RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología 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 la respuesta a la aplicación de Nanotubos de Carbono (NTC), en el vigor de germinación de semillas deterioradas y en el crecimiento de plántulas de *Cucurbita pepo*. Se estableció un bioensayo con seis tratamientos (0 (Testigo), 50, 100, 200, 300 y 500 ppm). Se establecieron tres repeticiones por tratamiento, y cada repetición constó de 100 semillas. Las semillas se depositaron en cajas Petri sobre papel filtro, donde se dejaron imbibir la suspensión con NTC por 48 h de acuerdo a los tratamientos. Se aplicó 50 mL⁻¹ de suspensión en cada caja Petri. Posterior al tratamiento, las semillas fueron sembradas entre dos capas de papel Anchor, humedecido con agua destilada, enrollándolos en forma de taco, posteriormente se mantuvieron en una cámara bioclimática a una temperatura de 25°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar. A través de un análisis de varianza, se determinaron diferencias estadísticas entre concentraciones (0 (Testigo), 50, 100, 200, 300 y 500 ppm). Los resultados indican que la aplicación de NTC a una concentración de 200 ppm, durante el periodo de imbibición en semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*), tienen un efecto positivo en la variable vigor de germinación, demostrando tener el potencial para ser utilizados como promotoras en de una rápida germinación.

En general, las NTC aplicadas en suspensión a semillas durante el proceso de imbibición, favorecen el desarrollo de plántula, promoviendo el crecimiento tanto de tallo como de radícula.

Palabras clave: Nanotecnología, Nanotubos de carbono, vigor, plántula, radícula.

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura moderna demanda semilla de alta calidad, siendo esta el principal insumo que en la agricultura debe cumplir con diferentes atributos, entre estos se encuentran el genético, el fisiológico, el físico y el sanitario. Las pruebas de germinación y de viabilidad han sido utilizadas ampliamente en la evaluación de la calidad de las semillas, cabe destacar que la calidad fisiológica hace referencia a mecanismos intrínsecos de la semilla que determinan su capacidad de germinación, la emergencia y el desarrollo de aquellas estructuras esenciales para producir una plántula normal bajo condiciones favorables. Sin embargo, en los últimos años se ha dado énfasis en la medición de otros parámetros, tales como el vigor y las variables asociadas con este parámetro.

La calidad fisiológica de la semilla abarca la suma de todas las propiedades o características, las cuales determinan el nivel potencial del comportamiento de las semillas y el establecimiento del cultivo (Velázquez, 2014). La calidad fisiológica puede ser beneficiada a través de pre-tratamientos directos en la semilla antes de la siembra.

Sin embargo, los componentes de calidad pueden ser afectados adversariamente durante la producción, beneficio, almacenamiento y transporte de las semillas (Méndez *et al.*, 2007). De tal manera, es fundamental realizar un control de calidad y dentro de este se ven involucrados los diferentes métodos útiles y confiables para determinar las principales características de lotes de semillas con buena calidad, con la finalidad de cumplir con los estándares de germinación y vigor. Este aspecto adquiere mayor relevancia aún, ya que el mercado de las semillas ha experimentado importantes cambios como la globalización y el incremento de su valor (Contreras, 2002).

La nanotecnología (NT) es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación, manejo, operación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas a nano escala.

Por esta razón, en la actualidad está siendo considerada parte de la nueva revolución tecnológica, ya que brinda grandes posibilidades de desarrollo a medida que se asimila y difunde en la sociedad (Contreras, 2016).

La nanotecnología (NT) estudia los materiales que están dentro de la escala atómica y molecular (1-100 nm), los más estudiados son las nanopartículas metálicas (NPs) y las derivadas del carbón. En la agricultura moderna han comenzado a investigarse esos nanomateriales, porque ofrecen incrementar la producción de alimentos.

Los nanotubos de carbono (NTC) son nano-materiales ampliamente usados en ciencias biológicas y de materiales, por lo que los NTC de pared simple o de pared múltiple son usados para transportar agua, nutrientes y medicamentos. Como los NTC poseen una extensa superficie, tienen el potencial de regular la humedad bajo condiciones de estrés, por lo que pueden llegar a resolver el problema en sistemas de siembra en temporal.

Los efectos positivos de los NTC en el crecimiento y desarrollo de las plantas han sido descritos por varios grupos de investigación, habiendo reportado que incrementan el crecimiento de las raíces en plantas de cebolla y pepino (Cañas, et al., 2008), así como de zacate *rye grass* (Lin y Xing, 2007). También se ha demostrado que los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCM) pueden activar el crecimiento de plantas de tomate y afectar a la expresión de genes que son esenciales para la división celular y el desarrollo de la planta (Khodakovskaya et al., 2011; Villagarcía et al., 2012).

En este trabajo de investigación se estudió el efecto que tienen los NTC, a diferentes concentraciones, en la germinación y desarrollo de plántulas de semillas calabaza (*Cucurbita pepo*).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Evaluar y determinar la efectividad biológica de la aplicación de los tratamientos con Nanotubos de Carbono (NTC), como una alternativa innovadora para mejorar la capacidad germinativa de semillas deterioradas y el crecimiento en plántulas de *Cucurbita pepo*.

1.1.2. Objetivos Específicos

Conocer el efecto promotor sobre la germinación que tiene el uso de NTC en semillas deterioradas de *Cucurbita pepo*.

Determinar si existe alguna diferencia en respuesta del vigor de germinación de la semilla, a la aplicación de diferentes tratamientos de NTC en *Cucurbita pepo*.

Indagar sobre el uso de NTC en semillas deterioradas y su efecto promotor o fitotóxico en procesos relacionados con la germinación y el crecimiento de plántulas.

1.2. HIPÓTESIS

La aplicación de NTC a semillas deterioradas, en la etapa de imbibición, estimula el vigor de la germinación, por lo tanto se mejora el crecimiento de plántulas, en *Cucurbita pepo*.

La aplicación de NTC a semillas deterioradas, en la etapa de imbibición, no estimula el vigor de la germinación, ni mejora el crecimiento de plántulas de *Cucurbita pepo*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Nanotecnología

La nanotecnología (NT) es un extenso campo de la investigación interdisciplinaria, ya que con ella se abre un amplio abanico de oportunidades en diversas áreas como la medicina, la industria farmacéutica, la electrónica y la agricultura sustentable (Prasad *et al.*, 2014). En la agricultura moderna sustentable la (NT) promete aportar soluciones usando nanopartículas (NPs), las cuales poseen tres mecanismos principales de acción: 1) generación de especies reactivas de oxígeno, 2) liberación de iones, y 3) acumulación o penetración de la membrana celular (Alvarado *et al.*, 2014 y Resham *et al.*, 2015). La tendencia es formular productos con ingredientes activos de tamaño nanométrico, lo cual los hace más eficientes y de fácil disponibilidad, además de minimizar las pérdidas al aplicar el producto (Ruiz Torres *et al.*, 2016).

Mejias *et al.* (2009) indican que la nanotecnología deriva del griego “nano” que significa enano. Sin embargo, Del Castillo (2012) define la NT como el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala.

La NT puede incrementar la eficacia de los pesticidas e insecticidas comerciales, reduciendo la cantidad de aplicación al suelo o follaje a dosis significativamente menores que las requeridas convencionalmente, con la mejora que eso implica para los ecosistemas (Xue *et al.*, 2014). Así como también puede mejorar las técnicas del manejo de cultivos existentes en el corto y mediano plazo. Las nanocápsulas ayudarán a evitar problemas en los cultivos mediante la utilización de herbicidas sistémicos contra malezas parásitas (Yin *et al.*, 2012). La nanoencapsulación puede mejorar la aplicación de herbicidas, proporcionando una mejor penetración a través de cutículas y tejidos, ya que permite la liberación lenta y constante de las sustancias activas.

2.2. Clasificación de Nanomateriales

Según Fages (2012), los nanomateriales se pueden clasificar conforme a su naturaleza química, en cuatro grandes familias:

- Nanomateriales derivados del silicio: nanoarcillas, nanoesferas de sílice, nanoesferas de silicio y nanocompuestos tipo POSS.
- Nanomateriales derivados del carbono: fullerenos, nanotubos y nanofibras de carbono.
- Nanopartículas metálicas y derivados de éstas: plata, oro, cobre, titanio, zinc, dióxido de titanio, óxido de zinc, óxido de cerio, fierro, manganeso etc.
- Nanopartículas poliméricas: dendrímeros.

2.3. ¿Qué son las nanopartículas?

Las nanopartículas (NPs) son agregados atómicos o moleculares con al menos una dimensión entre 1 y 100 nm (Ball, 2002; Roco, 2003), que se pueden modificar drásticamente en sus propiedades físico-químicas en comparación con el material a granel (Nel *et al.*, 2006). Tienen una amplia variedad de aplicaciones en diversos campos, entre ellos el biomédico, biológico, óptico y electrónico (Ball, 2002; Karunaratne, 2007). Walker y Bucher (2009) ya avisaron su potencial en la agricultura y en la tecnología de los alimentos.

La mayoría de las NPs tienen efectos positivos y negativos en los cultivos, la eficacia de aplicación se determina por su genotipo, composición química, tamaño, revestimiento superficial, reactividad y lo más importante, la dosis en la cual son eficaces los cuales dependen del tipo, fuente y tamaño de NPs, esta tienen mucha variación con respecto a las especie, etapa de crecimiento, condiciones de desarrollo, método de aplicación y estos a su vez afectan los procesos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas (Muhammad *et al.*, 2016; Khodakovskaya *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Hatami *et al.*, 2014; Mingyu *et al.*, 2007). Algunas NPs como las de CuO

muestran un efecto positivo sobre la reactividad de fitohormonas, especialmente del ácido indolacético (AIA), así como del ácido salicílico, esto hace que se facilite o incremente la acción fitoestimulante de las NPs (Wang *et al.*, 2015; Demidchik, 2015; Srilatha, 2011). Bajo este punto de vista, es recomendable no solo evaluar la respuesta de diversos genotipos a la aplicación de NPs durante la germinación, sino ir más allá para conocer la capacidad de estos a etapas subsecuentes (Buu *et al.*, 2014).

2.3.1. Nanopartículas y su efecto en la germinación

El efecto de las NPs comienza a manifestarse desde la germinación de las semillas, reflejándose en una mayor emergencia y uniformidad que se observa en la germinación final, debido principalmente a la penetración de nanomateriales en la semilla, que permiten aumentar la imbibición de agua y micronutrientes, acelerando la degradación de reservas, y beneficiando a las primeras etapas del proceso germinativo. En estudios realizados por Mahmoodzadeh *et al.* (2012), se evidencian los efectos del titanio a nanoescala con partículas de TiO₂, reportando una promoción de la germinación del 75 % con la aplicación de NPs (20 nm de tamaño de partícula a 2000 mg L⁻¹ de concentración).

Feizi *et al.* (2012) reportaron mejor porcentaje de germinación en trigo (*Triticum aestivum* L.) tratado con NPs de óxido de titanio (TiO₂), comparado con el TiO₂ a granel. El tratamiento de NPs de TiO₂, en la concentración adecuada, aceleró el proceso de germinación en semillas de espinaca, además, las semillas tratadas con estas NPs presentaron plantas con mayor peso seco, tasa fotosintética más alta, y un aumento en la formación de clorofila, además se observó que menor tamaño de partícula, mejor efecto tiene en la germinación (Zheng *et al.*, 2005).

Abbasi *et al.* (2016) indican que las NPs de plata y sílice pueden tener un efecto positivo sobre la germinación de semillas y rasgos iniciales de crecimiento. La introducción de NPs en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas

podría tener un impacto significativo y por lo tanto, se puede utilizar para aplicaciones agrícolas para un mejor crecimiento y rendimiento. Es importante considerar que los pre-tratamientos con NPs en semillas se apliquen antes de la siembra, para mejorar la germinación y generar un fortalecimiento efectivo en plántulas. En este sentido, Azimi *et al.* (2016) señalan que la aplicación de SiO₂, acelera el establecimiento temprano de las plántulas, que a su vez mejora el crecimiento de las plantas y la acumulación de materia seca.

2.4. Nanotubos de Carbono

El carbono es uno de los elementos más comunes que existen en la naturaleza, se presenta en varias formas, algunas de ellas son: diamante, grafito, fulerenos, nanotubos de carbono y grafeno. Actualmente, los nanotubos de carbono (NTC) son considerados como una nueva forma de carbón puro y pueden ser visualizados como hojas de grafito con una red hexagonal de carbonos enrollada; puede ser de dos tipo: de pared simple, el cual es como un cilindro y multipared que consiste en muchos cilindros anillados cuyos radios sucesivos difieren en el espacio entre capas de grafito (Gogotsi, 2006).

Los NTC poseen una correcta combinación de propiedades: un diámetro nanométrico, integridad estructural, alta conductividad eléctrica y estabilidad química (Ajayan y Zhou, 2001). Las aplicaciones de los NTC en el campo de la biotecnología son varias y estas incluyen a los nanotubos como componentes para ADN, proteínas y como biosensores, bloqueadores de canales iónicos, biocatálisis, en neurociencias e ingeniería de tejidos (Klingeler y Sim, 2001).

Los nanotubos de carbono (NTC) son nano-materiales ampliamente usados en ciencias biológicas y de materiales, por lo que los NTC de pared simple o de pared múltiple son usados para transportar agua, nutrientes y medicamentos. Como los NTC poseen una extensa superficie, tienen el potencial de regular la humedad bajo condiciones de estrés, por lo que pueden llegar a resolver el problema en sistemas de siembra en temporal.

2.4.1. Nanotubos de Carbono en la Agricultura

Diversos nanomateriales se han venido utilizando e investigando por su función biológica en células de humanos y plantas, como nanotubos de carbono (NTC), fullerenos, liposomas, proteínas y polímeros (Figura 1), incluyendo biopolímeros como el quitosán (Grillo et al., 2014).

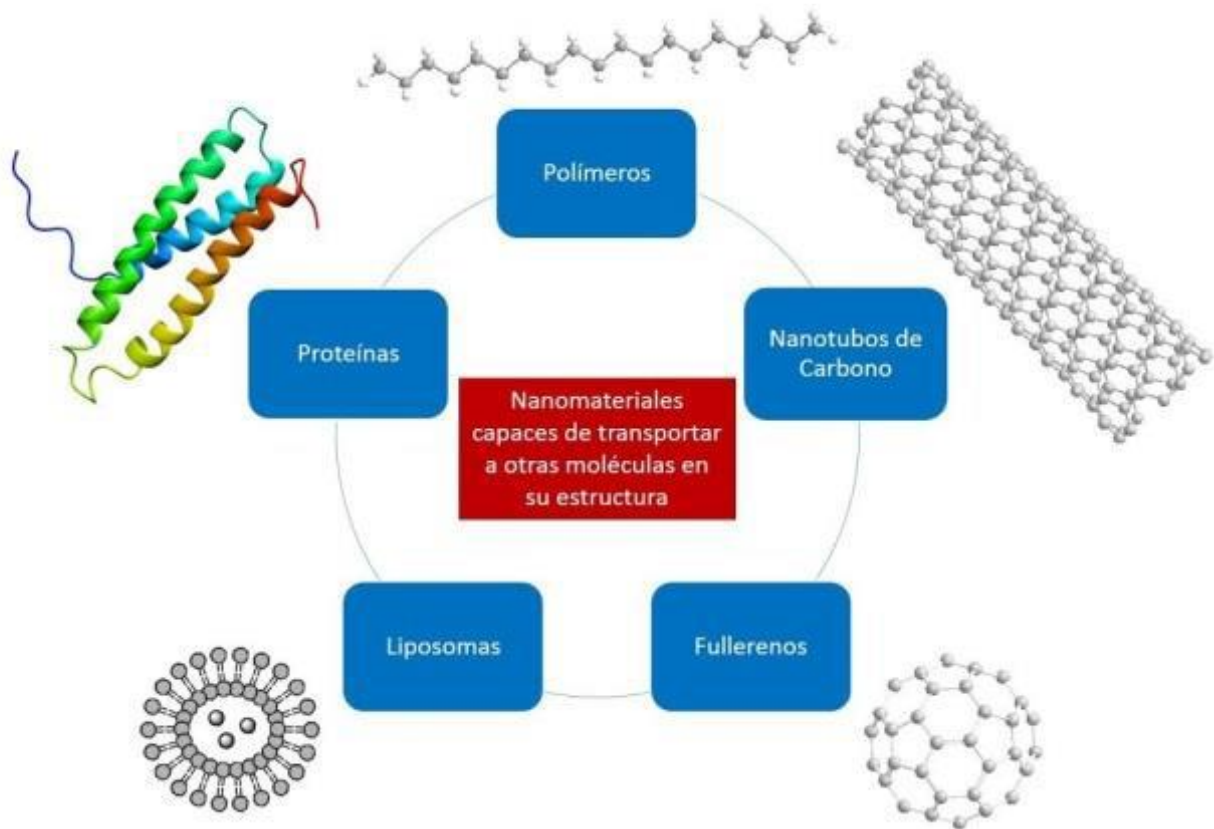


Figura 1. Características de los nanomateriales usados en una gran diversidad de aplicaciones biológicas e industriales.

Los efectos positivos de los NTC en el crecimiento y desarrollo de las plantas han sido descritos por varios grupos de investigación, habiendo reportado que incrementan el crecimiento de las raíces en plantas de cebolla y pepino (Cañas,

et al., 2008), así como de zacate rye grass (Lin y Xing, 2007). También se ha demostrado que los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCM) pueden activar el crecimiento de plantas de tomate y afectar a la expresión de genes que son esenciales para la división celular y el desarrollo de la planta (Khodakovskaya *et al.*, 2011; Villagarcía *et al.*, 2012).

Liu *et al.* (2009) demostraron que los nanotubos de carbón de pared sencilla poseen el tamaño adecuado como para penetrar en las paredes y membranas de las células de tabaco, esta capacidad de las NPs de penetrar en las células de plantas ha generado interés, porque de manera similar a las aquaporinas pueden ayudar a transportar muy rápidamente agua y nutrientes dentro de las plantas (Joseph y Aluru, 2008). También son útiles para procesos de desalinización, ya que pueden cargarse internamente con iones de Na⁺ y Cl⁻ para luego eliminar del sistema las sales en exceso (Goh *et al.*, 2013).

Para el caso de la horticultura, se están utilizando nanomateriales para el tratamiento de algunas enfermedades de plantas, para la detección precoz de los patógenos que las producen (Krishnaraj *et al.*, 2016), para la mejora de la asimilación de nutrientes esenciales (Martínez *et al.*, 2016), e incluso para construir nanobiosensores importantes en determinados procesos biológicos (Vimala *et al.*, 2016). La NT puede incrementar la eficacia de los pesticidas e insecticidas comerciales, reduciendo la cantidad de aplicación al suelo o follaje a dosis significativamente menores que las requeridas convencionalmente, con la mejora que eso implica para los ecosistemas (Xue *et al.*, 2014).

2.4.2. Nanotubos de Carbono y su efecto en la germinación

Natarajan y Tarafdar (2011) mencionan que la semilla es el principal insumo que define la productividad en campo de cualquier cultivo. Como ejemplo señalan que en la India, de manera convencional, la semilla se analiza en laboratorio para determinar el porcentaje de germinación y posteriormente se distribuye a los agricultores para su siembra. El porcentaje de germinación en

laboratorio puede ser de 80-90 %, sin embargo esto raramente se observa en campo, debido a la insuficiente humedad en el suelo en sistemas de temporal, que comprende el 60 % de las áreas destinadas a la siembra, por lo que ya consideraban adecuado desarrollar tecnologías para este tipo de agricultura. La idea es crear un método innovador que mejore la germinación en sistemas de siembra que dependen del temporal.

Khodakovskaya *et al.* (2009) encontraron que los NTC penetran las semillas de tomate y afectan su germinación y tasa de desarrollo. El porcentaje de germinación se incrementó al aplicar NTC (10-40 mg/mL) en comparación al testigo. Métodos analíticos indicaron que los NTC pueden penetrar la testa y apoyar la absorción de agua al interior de las semillas, proceso que puede afectar la germinación y desarrollo de plántulas de tomate.

En un estudio realizado por Rahimi *et al.* (2016), en semillas de (*Alnus subcordata*) (especie nativa de Irán) bajo condiciones de estrés, se encontró que la aplicación de NTC incrementa el índice de vigor de las semillas, las longitudes de raíz y tallo y la acumulación de materia seca. Atribuyendo esto, al incremento del vigor en la semilla por la aplicación de NTC, que posiblemente mejora el potencial hídrico de la semilla y su metabolismo, reflejándose en plántulas de mayor porte.

En contraste, Mushtaq (2011) estudió el efecto de Fe_3O_4 , TiO_2 y NPs de carbón en semillas de pepino (*Cucumis sativus*), en la tasa de geminación, elongación de la semilla, e índice de germinación. Usaron concentraciones de 0 a 5000 $\mu\text{g/ml}$, encontraron reducción en el desarrollo de la raíz y en menor grado en el porcentaje de germinación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se utilizó semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*), proporcionada por 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. La semilla presentó bajo vigor de germinación (11 %) y bajo porcentaje de germinación (47 %), dejando ver su nivel de deterioro.

3.2. Ubicación del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo 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) en Saltillo, Coah., México.

3.3. Preparación de soluciones con Nanotubos de Carbono

El experimento consistió en el establecimiento de un bioensayo para determinar el efecto de las NTC en la germinación. Se establecieron 3 repeticiones para cada concentración (testigo, 50, 100, 200, 300 y 500 ppm).

Para la preparación de las suspensiones de los NTC, se pesó el producto de acuerdo a la concentración deseada en una balanza analítica (AND modelo HR-200), y se depositaron en tubos tipo Falcon, aforando con agua destilada a 50 ml. Se colocó cada tubo durante un periodo de 5 minutos en un agitador Vortex marca Labnet modelo VX100 para lograr la máxima dispersión de los NTC.

3.4. Proceso de imbibición

Para determinar el efecto que tiene la aplicación de NTC en el proceso de germinación de semillas de (*Cucurbita pepo*), se estableció un bioensayo en laboratorio, que constó de 6 tratamientos (0 (testigo), 50, 100, 200, 300 y 500 ppm), y 3 repeticiones de 25 semillas cada una.

Se colocaron 100 semillas dentro de una caja Petri, sobre una doble capa de papel filtro, para posteriormente ser tratadas con 30 ml de suspensión de NTC,

imbibiendo las semillas por 24 horas, dentro de una cámara bioclimática a 25 °C.

Posterior al tratamiento y con ayuda de unas pinzas de disección se prosiguió con la siembra, colocando 25 semillas por repetición entre dos capas de papel Anchor humedecidas con agua destilada, enrollándolos en forma de taco, posteriormente se colocaron en bolsas de polietileno transparente y estas dentro de contenedores de plástico, para luego ser introducidos a una cámara bioclimática marca Thermo Scientific a una temperatura de 25°C y un fotoperiodo 16/8 h, luz/obscuridad.

Los datos se analizaron para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos, posteriormente se realizó una comparación de medias por medio de la Prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico SAS (2004).

Modelo estadístico

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

Dónde:

Y_{ij} = Valor observado

μ = Efecto de la media

τ_i = Efecto de los tratamientos

ε_{ij} = Error experimental

3.5. Variables evaluadas en el bioensayo

Se determinaron las siguientes variables: primer conteo de plántulas normales (VIGOR), se realizó 5 días después de la siembra, esta variable es un indicador del vigor que posee la semilla para germinar en menor tiempo y establecerse en campo, el resultado fue expresado en porcentaje.

Al octavo día se determinó el número de plántulas normales, considerando aquellas que poseen todas sus partes (radícula y tallo (plúmula)) sin ninguna anomalía visible y que representan el porcentaje de germinación (GER).

Asimismo, el número de plántulas anormales (PA), contabilizando las que carecían de tallo o radícula, o presentaron un desarrollo irregular de alguna de sus estructuras.

También se obtuvo el porcentaje de semillas sin germinar (SSG), incluyendo aquellas semillas duras o muertas que no tuvieron la capacidad de germinar, el resultado se expresó en porcentaje.

En todas las plántulas normales se determinó la longitud media de tallo (LMT) y la longitud media de radícula (LMR), para lo cual se midieron por repetición todas las plántulas normales, expresándose en cm.

También se determinó el peso seco (PS) de plántulas normales, para lo cual se realizó un secado de todas las plántulas clasificadas como normales, el secado tuvo una duración de 24 horas en una estufa marca Riosa H-48 a 72°C. Pasadas las 24 horas se extrajeron, y se dejaron en un desecador, para posteriormente ser pesadas en una balanza analítica marca Precisa BJ610C el resultado fue expresado en mg/plántula.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Cuadro 1), en bioensayos de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*), tratadas con Nanotubos de Carbono indican que, en las variables por ciento de vigor de germinación, por ciento de germinación y longitud de radícula, se encontraron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre tratamientos. Mientras que para las variables longitud de vástago y semillas sin germinar, se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Para las variables plantas anormales y peso seco de plántula no se encontraron diferencias significativas.

Los resultados indican que la aplicación de NTC influye en la respuesta de algunas variables evaluadas en este bioensayo, teniendo relación directa con el proceso de germinación.

Los efectos significativos de los NTC en el crecimiento y desarrollo de las plantas han sido puntualizados por varios grupos de investigación, habiendo reportado diferencias y respuestas positivas en plantas de cebolla y pepino (Cañas *et al.*, 2008), así como de zacate rye grass (Lin y Xing, 2007). También que los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCM), pueden afectar la expresión de genes que son esenciales para la división celular y el desarrollo de la planta (Khodakovskaya *et al.*, 2011; Villagarcía *et al.*, 2012).

Tomado en cuenta las diferencias significativas observadas y el tamaño nanométrico de los NTC, se puede discernir el hecho de la facilidad de penetración a través de las membranas biológicas, en comparación con los materiales con escala micrométrica. En plantas los NTC tienen mayor facilidad de penetrar la membrana y pared celular trayendo consigo diferentes respuestas en los atributos de calidad de las semillas.

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*) tratadas con NTC .

FV	GL	VIGOR (%)	GERMINACIÓN (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	GL	LV (cm)	LR (cm)
Concentración	5	69.15**	88.88**	103.28 _{NS}	289.42*	24.23 _{NS}	5	19.85*	41.35**
Error	12	3.55	14.22	58.66	82.66	21.58	182	8.32	10.11
Total	17	72.7	103.1	161.94	372.08	45.81	187	28.17	51.46
CV (%)		19.73	8.23	35.53	26.91	6.12		22.48	20.09

** = Significativo al 0.01% de probabilidad; * = Significativo al 0.05% de probabilidad; FV = Fuente de variación; GL= Grados libertad; GER = Germinación; PA = Plántulas anormales; SSG = Semillas sin germinar; PS = Peso seco de la plántula; LV = Longitud de vástago; LR = Longitud de radícula.

En el Cuadro 2 se presenta la comparación de medias por tratamiento, se observó que para la variable vigor de germinación (VIGOR), la concentración de 200 ppm fue la que mostró mejor resultado con 17 %, en comparación con el testigo que obtuvo 11 %, lo anterior indica que al imbibir la semilla en NTC la respuesta fisiológica fue diferente, incrementando el porcentaje de semillas germinadas al quinto día. En sí, el vigor se relaciona con la velocidad y uniformidad de germinación y crecimiento de plántulas. La ISTA (2004) lo define como la suma total de aquellas propiedades que determinan el nivel de actividad y capacidad de la semilla o lote de semillas de germinación aceptable, en un amplio rango de ambientes. Por otro lado, la AOSA (1983) define vigor como la suma total de aquellas propiedades de la semilla que determinan el potencial para una rápida y uniforme emergencia y desarrollo de plántulas normales bajo un amplio rango de condiciones de campo.

El incremento en el porcentaje de vigor podría atribuirse principalmente a la penetración de nanomateriales en la semilla, que permiten aumentar la imbibición de agua y micronutrientes, acelerando la degradación de reservas, y beneficiando a las primeras etapas del proceso germinativo (Ruíz-Torres *et al.*, 2016)

Por otra parte, para la variable porcentaje de germinación a una concentración de 50 ppm, mostró un mayor porcentaje con 52%, sin embargo se encuentra dentro del mismo grupo estadístico que otros tratamientos (testigo, 100 y 200 ppm).

Khodakovskaya *et al.* (2009) encontraron que los NTC penetran las semillas de tomate y afectan su germinación y tasa de desarrollo. El porcentaje de germinación se incrementó al aplicar NTC (10-40 mg/ml) en comparación al testigo. Métodos analíticos indicaron que los NTC pueden penetrar la testa y apoyar la absorción de agua al interior de las semillas, proceso que puede afectar la germinación y desarrollo de plántulas de tomate.

Para la variable plántulas anormales no se encontraron diferencias estadísticas, pero si numéricas, siendo la concentración de 200 ppm la de menor porcentaje con 11%.

Se observó que tratar la semilla con NTC a 300 ppm resulta en mayor peso seco, con 87.35 mg/plántula, sin embargo, es estadísticamente igual al testigo. La diferencia entre el testigo y el peso que se obtuvo al tratar la semilla con 300 ppm NTC fue de 8.7 mg/plántula.

La aplicación de NTC tuvo un efecto positivo para la variable longitud de vástago a una concentración de 50 ppm con 13.75 cm, sin embargo es estadísticamente igual a los tratamientos (0, 100, 200 y 500).

Para la variable longitud de radícula, al ser tratadas las semillas con 500 ppm, el crecimiento se incrementó con respecto al testigo en 2.35 cm respectivamente.

En contraste, Mushtaq (2011) estudió el efecto de Fe_3O_4 , TiO_2 y NPs de carbón en semillas de pepino (*Cucumis sativus*), en la tasa de germinación, elongación de la semilla, e índice de germinación. Usaron concentraciones de 0 a 5000 $\mu\text{g/ml}$, encontraron reducción en el desarrollo de la raíz y en menor grado en el porcentaje de germinación.

Lo anterior señala claramente que la aplicación de NTC modifica la respuesta fisiológica de las variables longitud de vástago y de radícula, mostrando un efecto positivo, favoreciendo así el desarrollo de las plántulas

En un estudio realizado por Rahimi *et al.* (2016), en semillas de (*Alnus subcordata*) (especie nativa de Irán) bajo condiciones de estrés, se encontró que la aplicación de NTC incrementa el índice de vigor de las semillas, las longitudes de raíz y tallo y la acumulación de materia seca. Atribuyendo esto, al incremento del vigor en la semilla por la aplicación de NTC, que posiblemente mejora el potencial hídrico de la semilla y su metabolismo, reflejándose en plántulas de mayor porte.

Cuadro 2.Comparación de medias de las variables evaluadas en el bioensayo de germinación de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*).

Concentración	VIGOR (%)	GERMINACIÓN (%)	PA (%)	SSG (%)	PS (mg/plántula)	LV (cm)	LR (cm)
0	11 bc	47 abc	16 a	37 ab	78.65 ab	13.14 ab	15.07 b
50	12 b	52 a	29 a	19 b	73.88 b	13.75 a	16.93 ab
100	7 cd	48 ab	24 a	28 ab	75.93 b	12.18 ab	14.68 b
200	17 a	49 ab	11 a	40 a	73.85 b	13.48 ab	16.40 ab
300	4 d	37 c	16 a	47 a	87.35 a	11.64 b	14.89 b
500	7 cd	42 c	26 a	32 ab	75.84 b	12.65 ab	17.42 a
Media	10	46	20	34	75.83	12.82	15.82
Tukey	5.17	10.34	21.00	24.93	10.57	2.11	2.33

Valores con la misma literal dentro de una columna son estadísticamente iguales (Tukey = 0.05).

GER = Germinación; PA = Plántulas anormales; SSG = Semillas sin germinar; PS = Peso seco de la plántula; LV = Longitud de vástago; LR= Longitud de radícula.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que los NTC a una concentración de 200 ppm, aplicadas durante el periodo de imbibición en semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*), tienen un efecto positivo en la variable vigor de germinación, demostrando tener el potencial para ser utilizados como promotoras del crecimiento, puesto que tienen efecto positivo al incrementar el índice de vigor en 6% con respecto al testigo (0 ppm).

Los NTC a 50 ppm incrementaron el porcentaje de germinación en 5 %, con respecto al testigo, así como la longitud de vástago en 0.61 cm.

Mayor peso seco de plántula se observó al tratar semillas con NTC a 300 ppm.

En cuanto a longitud de radícula, 500 ppm resultó en mayor longitud, sin embargo estadísticamente igual a los resultados obtenidos con 50 y 200 ppm.

En general, las NTC aplicadas en suspensión a semillas durante el proceso de imbibición, favorecen el desarrollo de plántula, promoviendo el crecimiento tanto de tallo como de radícula.

Estos resultados sugieren que la aplicación de NTC en dosis correctas, pueden mejorar la calidad y uniformidad de plántulas de *Cucurbita pepo*, para su establecimiento en campo. Por lo tanto, los NTC pudiesen representar una nueva opción como un agroinsumo promotor de la germinación y crecimiento de plántulas de diferentes especies. Debido a que la aplicación de NTC en muy pequeñas cantidades, puede tener un buen potencial para coadyuvar en la promoción de una agricultura sustentable.

IV. LITERATURA CITADA

- Abbasi, M., A. Ghorbani, and M. Moameri. 2016. Effects of silica and silver nanoparticles on seed germination traits of (*Thymus kotschyanus*) in laboratory conditions. *Journal of Rangeland Science* 6(3):222-231.
- Alvarado, R., F. Solera and J.R. Vega-Baudrit. 2014. Síntesis química de nanopartículas de óxido de zinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(3): 134-148.
- Azimi, R., G. Heshmati and R. Kavandi. 2016. Evaluation of SiO₂ nanoparticle effects on seed germination in (*Astragalus squarrosus*). *Journal of Rangeland Science* 6(2):135-143.
- Ball, P. 2002. Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnology* 13:15 – 28.
- Buu, Q., T. Hien, H. Chau, X. Tin, T. Van, T. Duong, and T. Ha. 2014. Effects of nano crystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51). *Vietnam Academy of Science and Technology* 5:1-7.
- Cañas, J.E., M. Long, S. Nations, R. Vadan, L. Dai, M. Luo, D. Olszyk. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27: 1922-1931.
- Contreras, S. (2002). The international seed industry. In: *Proceedings International Seed Seminar: Trade, Production and Technology*. Edts. M. pp. 1-9.
- Demidchik, V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109: 212-228.
- Fages, S. E. 2012. Investigación de fibras de polipropileno aditivas con nanopartículas de plata para la mejora de propiedades bioactivas en el sector textil. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 399.

- Feizi, H., P.R. Moghaddam, N. Shahtahmassebi., A. Fotovat. 2011. Impact of Bulk and Nanosized Titanium Dioxide (TiO₂) on Wheat Seed Germination and Seedling Growth. *Biological Trace Element Research*. 146. pp. 101-106 DOI:10.107/s12011-011-9222-7.
- Gogotsi, Y. 2006. *Nanomaterials Handbook*. Ed. Gogotsi Y., New York, pp. 105
- Goh, P.S., Ismail, A.F, Ng, B.C. (2013). Carbon nanotubes for desalination: performance evaluation and current hurdles. *Desalination*. 308: 2-14.
- Grillo, R., A.E. Pereira, C.S. Nishisaka, R. de Lima, K. Oehlke, R. Greiner, L.F. Fraceto. (2014). Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: an environmentally safer alternative for weed control. *Journal of hazardous materials*. 278:163-171.
- Hatami, M., M. Ghorbanpour and H. Salehiarjomand. 2014. Nano-anatase TiO₂ modulates the germination behavior and seedling vigority of some commercially important medicinal and aromatic plants. *J. Biol. Environ. Sci.* 8(22):53-59.
- Joseph, S., N.R. Aluru. 2008. Why are carbon nanotubes fast transporters of water?. *Nano letters*. 8: 452-458.
- Karunaratne, D.N. 2007. Nanotechnology in medicine. *Journal of Natural Science*. 35(3): 149-152.
- Khodakovskaya, M., K. De Silva, K. Biris, A.S. Dervishi, E. Villagarcia. 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano* 6(3):2128–2135.
- Khodakovskaya, M.V, K. de Silva, D.A. Nedosekin, E. Dervishi, A.S. Biris, E.V. Shashkov, V.P. Zharov.(2011). Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108: 1028-1033.
- Krishnaraj, C., B.J Ji, S.L. Harper, S.I. Yun. 2016. Plant extract-mediated biogenic synthesis of silver, manganese dioxide, silver-doped manganese dioxide nanoparticles and their antibacterial activity against food-and water-borne pathogens. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 1: 1-14.

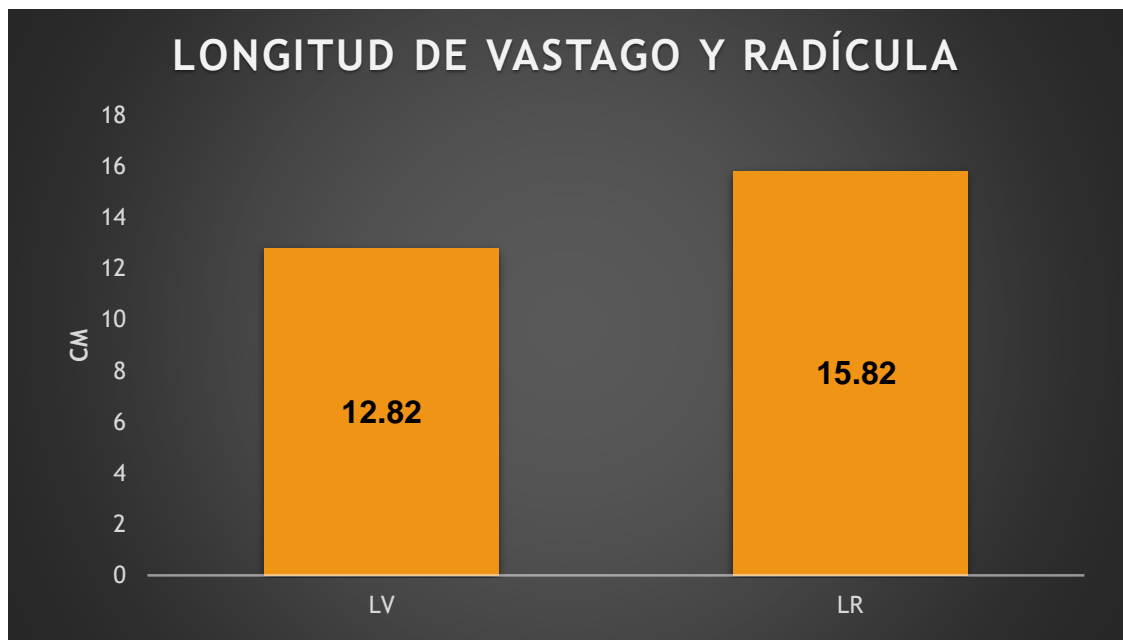
- Lin, D. and B. Xing. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 150: 243-250.
- Liu, Q., B. Chen, Q. Wang, X. Shi, Z. Xiao, J. Lin, X. Fang. 2009. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano letters*. 9: 1007-1010.
- Mejias, S.Y., N. C. Cabrera, A. F. Toledo, and O. M. Duany. 2009. La Nanotecnología y sus Posibilidades de Aplicación en el Campo Científico-Tecnológico. *Revista Cubana de Salud Pública*. p. 2-3.
- Mahmoodzadeh, H., M. Nabavi, and H. Kashef. 2013. Effect of nanoscale titanium dioxide particles on the germination and growth of canola (*Brassica napus*). *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. 3(1):30-37.
- Méndez, J., L. Ysavit, y J. Merazo. 2007. Uso de agua caliente para evaluar la calidad de la semilla de maíz (*Zea mays* L.) Departamento de Agronomía. Escuela de Ingeniería Agronómica. Núcleo de Monagas. Universidad de Oriente, Campus los Guaritos. Maturín, Estado Mongas, Venezuela. 8 p.
- Mingyu, S., W. Xiao, L. Chunxiang, Q. Xiaoqing, L. Liang, C. Hao, and H. Fashui. 2007. Promotion of energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II by nano-anatase TiO₂. *Biol Trace Elem Res* 119:183–192.
- Mushtaq, Y.K. 2011. Effect of nanoscale Fe₃O₄, TiO₂ and carbon particles on cucumber seed germination. Vol. 46, 1732-1735. doi: 10.1080/10934529.2011.633403.
- Prasad, R., V. Kumar, and K.S. Prasad. 2014. Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *African Journal of Biotechnology*. 13: 705-713.
- Rahimi, D., D. Kartoolinejad, K. Nourmohammadi, and R. Naghdi. 2016. Increasing drought resistance of *Alnus subcordata* C.A. Mey seeds using a nano priming technique
- Resham, S., M. Khalid, and A.G. Kazi. 2015. Nanobiotechnology in Agricultural Development. In *Plantomics: The Omics of Plant Science*. 683-698.

- Ruiz Torres, N.A., J.I. García López, R.H. Lira Saldívar, I. Vera Reyes, y B. Méndez Argüello. 2016. Efecto de Nanopartículas Metálicas y Derivadas del Carbón en la Fisiología de Semillas. In R. H. Lira Saldívar, & B. Méndez Argüello, *Agronano Tecnología Nueva frontera de la Revolución Verde*. Saltillo, Coah. UAAAN. pp. 42-60.
- Srilatha B. 2011. Nanotechnology in Agriculture. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*. (2):123. doi:10.4172/2157-7439.1000123.
- Velázquez, H. 2014. Estudio fisiológico en familias prolíficas de un lote de producción de semilla de la variedad de maíz JAGUAN. Tesis de Maestría Profesional, especialidad en Granos y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 13 p.
- Vimala, V., S.K. Clarke, S. Urvinder Kaur. 2016. Pesticides detection using acetylcholinesterase nanobiosensor. *Biosens Journal*, 5: 1-4.
- Villagarcía, H., E. Dervishi, K. de Silva, A.S. Biris, M.V. Khodakovskaya. (2012). Surface chemistry of carbon nanotubes impacts the growth and expression of water channel protein in tomato plants. *Small*. 8: 2328-2334.
- Walker N., and J. Bucher. 2009. A 21st Century Paradigm for Evaluating the Health Hazards of Nanoscale Materials?. *Toxicological Sciences*. 110(2): 250-251. DOI: 10.1093/toxsci/kfp106.
- Wang, S., H. Liu, Y. Zhang, H. Xin. 2015. Effect of CuO nanoparticles on reactive oxygen species and cell cycle gene expression in roots of rice. *Environmental Toxicological Chemistry*, 34: 554-561
- Xue, J., Z. Luo, L. Li, P. Ding, Y. Cui, Q. Wu. 2014. A residue-free green synergistic antifungal nanotechnology for pesticide thiram by ZnO nanoparticles. *Scientific Reports*. 4: 1-9.
- Yin, Y., Q. Guo, Y. Han, L. Wang, S. Wan. 2012. Preparation, characterization and nematicidal activity of lansiumamide B nano-capsules. *Journal of Integrative Agriculture*. 11: 1151-1158.
- Zheng, L., F. Hong, S. Lu, C. Liu. 2005. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological trace element research*. Vol. 104, pp. 83-91.

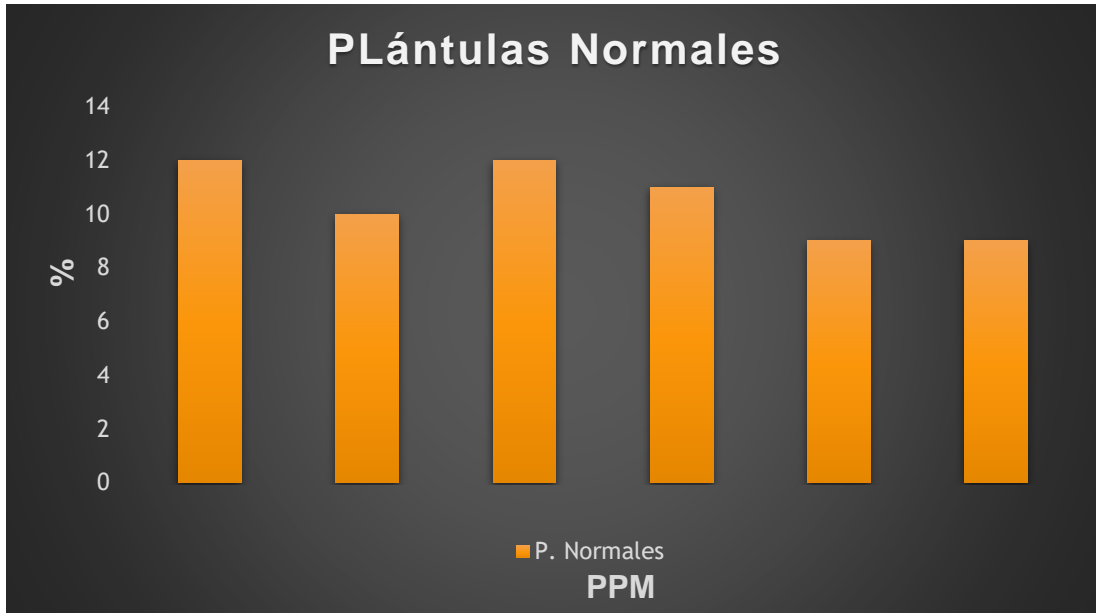
IV. ANEXOS



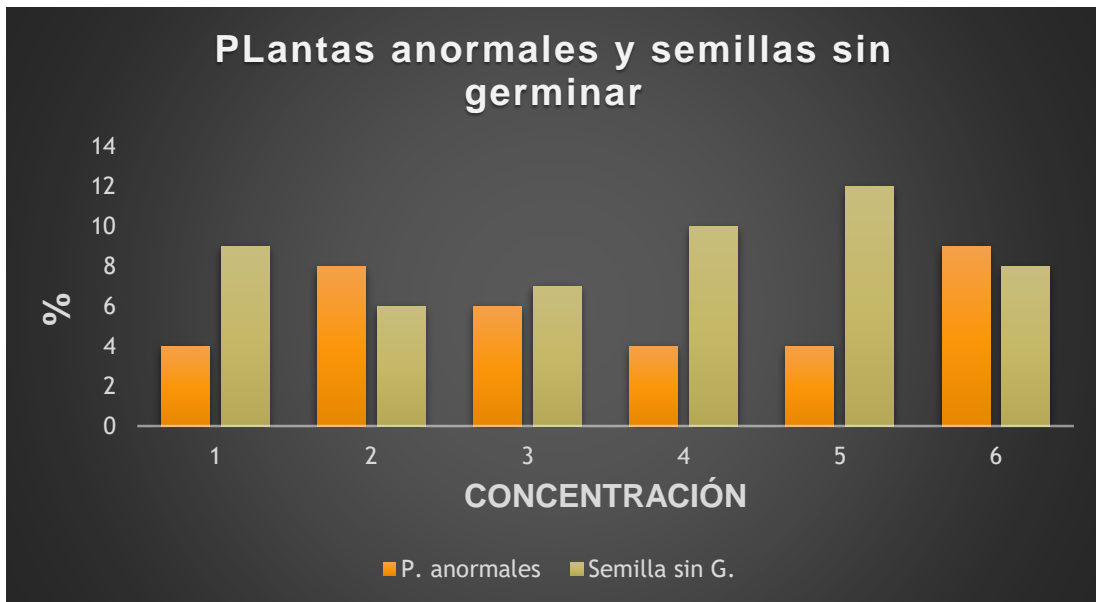
Anexo 1. Porcentaje de vigor y germinación de semilla tratada con NTC.



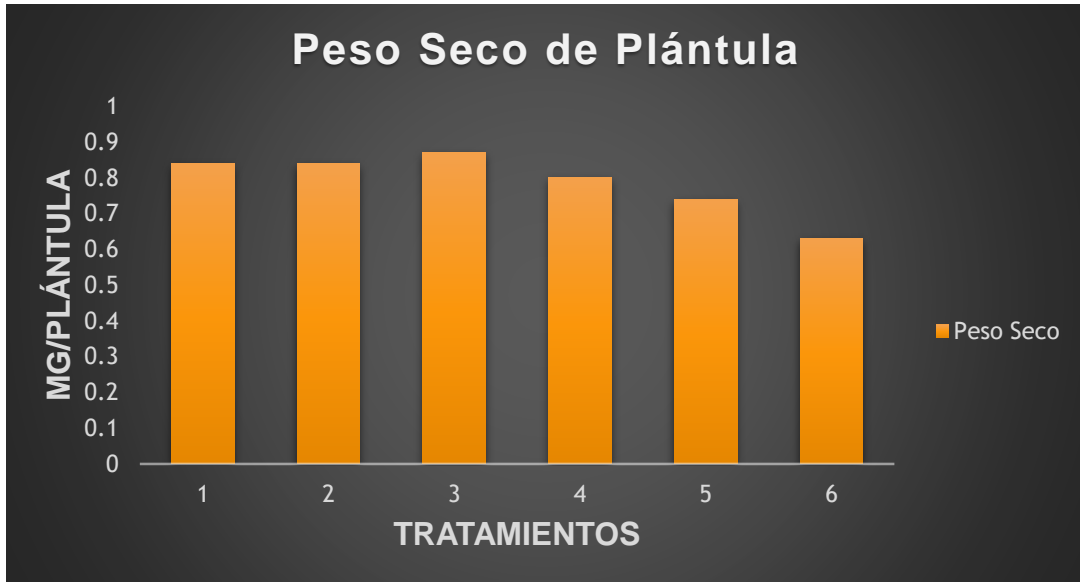
Anexo 2. Longitud de vástago y de radícula de plántulas obtenidas de semillas tratadas con NTC.



Anexo 3. Plántulas anormales generadas de semillas tratadas con NTC.



Anexo 4. Plántulas anormales y semillas sin germinar generadas por semillas tratadas por NTC.



Anexo 5. Peso seco de plántulas obtenidas de semillas tratadas con solución de NTC.

.